



Univerzitet u Novom Sadu  
Tehnološki fakultet Novi Sad



# IZDVAJANJE, KARAKTERIZACIJA I ENZIMSKA MODIFIKACIJA PEKTINSKOG POLISAHARIDA MUSKATNE TIKVE (*Cucurbita moschata*)

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
prof. dr Mirjana Antov

Kandidat:  
Maja Milošević

Novi Sad, 2023.







University of Novi Sad  
Faculty of Technology Novi Sad



# ISOLATION, CHARACTERISATION AND ENZYMATIC MODIFICATION OF PECTIC POLYSACCHARIDE FROM BUTTERNUT SQUASH (*Cucurbita moschata*)

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Dr. Mirjana Antov, Professor

Candidate:  
Maja Milošević

Novi Sad, 2023



# Zahvalnica

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Mirjani Antov, na nesebičnom angažovanju, prenesenom znanju, strpljenju i razumevanju. Podrška i saveti tokom koncipiranja i realizacije eksperimentalnog rada, kao i pisanja ove doktorske disertacije su za mene bili od neprocenjive vrednosti. Hvala joj na divnoj saradnji i poverenju koje mi je ukazala.*

*Kolegincama, Milici i Tanji, hvala na prijateljskim savetima i pozitivnoj atmosferi tokom eksperimentalnog rada.*

*Mojim roditeljima i sestri Jeleni, neizmerno hvala na bezuslovnoj ljubavi i podršci. Hvala im što su uvek verovali u mene.*

*I na kraju, beskrajno hvala mom Borisu, na neizrecivoj ljubavi, podršci, razumevanju i ohrabrivanju. Hvala mu što je uvek saslušao svaki moj problem i učinio ovaj put lakšim.*

*Maja*



KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA<sup>1</sup>

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Maja Milošević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija):	Dr Mirjana Antov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada:	Izdvajanje, karakterizacija i enzimski modifikacija pektinskog polisaharida muskatne tikve ( <i>Cucurbita moschata</i> )
Jezik publikacije (pismo):	Srpski jezik (latinica)
Fizički opis rada:	Stranica: 121 Poglavlja: 7 Referenci: 159 Tabela: 16 Slika: 36 Priloga: 13
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biotehnologija (Biomolekuli i enzimski modifikacije)
Ključne reči / predmetna odrednica:	Pektin, enzimski ekstrakcije, enzimski modifikacije, kompleksna koacervacija, muskatna tikva
Rezime na jeziku rada:	<p>U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana mogućnost korišćenja muskatne tikve (<i>Cucurbita moschata</i>) za dobijanje visokovrednih pektinskih polisaharida. Pektinski polisaharidi su dobijeni konvencionalnom kiselim ekstrakcijom, enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama i enzimskim ekstrakcijama, a zatim su okarakterisani. Generalno, prinos pektinskog polisaharida je, u odnosu na konvencionalnu kiselu ekstrakciju (60,6 mg/g<sub>SM</sub>), bio povećan kada je koraku sa kiselinom prethodio enzimski tretman. S druge strane, prinosi enzimskih ekstrakcija su bili slični ili niži u poređenju sa kiselim ekstrakcijom. Najveći prinos ekstrakcije (104,4 mg/g<sub>SM</sub>) je postignut nakon kisele ekstrakcije potpomognute ksilanazom, celulazom i amilazom.</p> <p>Primena enzima u postupku ekstrakcije je omogućila izdvajanje pektinskih polisaharida muskatne tikve koji su imali i do 3 puta veći sadržaj galakturonske kiseline u odnosu na onaj iz konvencionalne kisele ekstrakcije; najviše galakturonske kiseline je sadržao pektin dobijen u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji (84,4 g/100 g). Isto je važno i za sadržaj homogalakturonana, a suprotno za sadržaj</p>

<sup>1</sup>Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:

5b – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i dozvola za objavljivanje ličnih podataka;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriste se sa tezom.

ramnogalakturonana-I. Na osnovu stepena metoksilacije, svi pektinski polisaharidi, osim kiselo ekstrahovanog, su se mogli uvrstiti u niskometoksilovane pektine. Korišćenje kiseline u ekstrakciji pektinskih polisaharida muskatne tikve je imalo negativan uticaj na sadržaj ukupnih fenola, antioksidativnu i gvožđe(II)-helirajuću aktivnost. Najveći sadržaj ukupnih fenola je određen u pektinu ekstrahovanom celulazom i ksilanazom (1,16 mg FK/g). *In-vitro* antioksidativna aktivnost je bila najveća kod pektina ekstrahovanog celulazom, ksilanazom i amilazom (2,42 mM TE/100 g), a najveća Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost kod onog ekstrahovanog amilazom (2,13 mM EDTA/100 g). Određivanjem molarnih masa je utvrđeno da su kiselo ekstrahovani pektinski polisaharidi u rastvoru bili skloniji agregaciji i da su enzimski ekstrahovani uzorci u proseku imali manje molarne mase od kiselo ekstrahovanih. Na viskoznost pektinskih polisaharida je veći uticaj imao izbor enzima primenjenih za ekstrakciju, nego to da li je u te svrhe korišćena kiselina; najveću viskoznost je imao pektinski polisaharid za čiju ekstrakciju je korišćena amilaza. S druge strane, rastvorljivost pektinskih polisaharida je bila najveća kod svih uzoraka kod kojih su u enzimskom koraku ekstrakcije korišćene ksilanaza i celulaza (više od 77%).

Pektinski polisaharidi izdvojeni u različitim ekstrakcionim postupcima podvrgnuti su modifikacijama endo-poligalakturonazom i pektin-metilesterazom (individualno ili združeno) u cilju dobijanja pektinskih polisaharida i oligosaharida izmenjenih karakteristika i svojstava. Određivanjem Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze, utvrđeno je da je ovaj enzim pokazao najveći afinitet ka pektinskim polisaharidima za čije je dobijanje korišćena kiselina; najveći afinitet je endo-poligalakturonaza pokazala ka uzorku dobijenom u amilazom potpomognutoj kiseljoj ekstrakciji ( $K_M = 13,3 \text{ mg/mL}$ ), što je bilo u skladu i sa najvećim smanjenjem Mw i viskoznosti kod uzoraka ekstrahovanih na ovaj način. Modifikacija endo-poligalakturonazom je imala pozitivan efekat na povećanje *in vitro* antioksidativne i Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti.

Modifikacija pektin-metilesterazom je dovela do deesterifikacije svih pektinskih polisaharida; stepen metoksilacije je kod većine uzoraka smanjen u proseku 3,5 puta. Nakon modifikacije ovim enzimom, molarna masa i viskoznost su povećane kod većine uzoraka, a najveći intenzitet ovih promena primećen je kod uzoraka za čiju ekstrakciju nije korišćena kiselina. *In vitro* antioksidativne aktivnosti pektin-metilesterazom modifikovanih pektinskih polisaharida su bile veće od odgovarajućih nemodifikovanih uzoraka, pri čemu je ova aktivnost duplo povećana kod uzorka ekstrahovanog konvencionalnim kiselim postupkom.

Nakon ispitivanja efekta združenog dejstva endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze na pektinske polisaharide muskatne tikve, zaključeno je da su intenziteti smanjenja molekulske mase i viskoznosti bili skoro duplo veći nego kod smanjenja ovih osobina nakon modifikacije samostalnom endo-poligalakturonazom. Modifikacija združenim enzimima je dovela do dvostruko većeg povećanja ABTS i gvožđe(II)-helirajuće aktivnosti kod svih ispitivanih pektinskih polisaharida nego što je bio slučaj nakon modifikacije samostalnom endo-poligalakturonazom. Najveće povećanje je primećeno nakon modifikacije kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida; 4,2 i 44 puta su povećane antioksidativna, i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost, redom.

	<p>Pored toga, ispitan je i potencijal kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida muskatne tikve za pripremu kompleksnih koacervata sa ovalbuminom i želatinom. Prinos koacervacije je bio veći sa želatinom nego sa ovalbuminom. Koacervati sa želatinom su imali do 3 puta veću mehaničku stabilnost od koacervata sa ovalbuminom, ali je njihova stabilnost u simuliranim gastrointestinalnim uslovima bila dva puta manja od stabilnosti koacervata sa ovalbuminom.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	26. decembar 2019.
Datum odbrane:	
Članovi komisije (titula, ime, prezime, zvanje, institucija):	<p>Predsednik: dr Marina Šćiban, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu;  Član/mentor: dr Mirjana Antov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu;  Član: dr Jaroslav Katona, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu;  Član: dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu;  Član: dr Dejan Bezbradica, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.</p>
Napomena:	





KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Maja Milošević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution):	Dr. Mirjana Antov, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad
Thesis title:	Isolation, characterisation and enzymatic modification of pectic polysaccharide from butternut squash ( <i>Cucurbita moschata</i> )
Language of text (script):	Serbian language (Latin script)
Physical description:	Pages: 121 Chapters: 7 References: 159 Tables: 16 Illustrations: 36 Appendices: 13
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology (Biomolecules and enzymatic modifications)
Subject, Key words:	Pectin, enzymatic extractions, enzymatic modifications, complex coacervation, butternut squash
Abstract in English language:	<p>This doctoral dissertation investigated the possibility of using butternut squash (<i>Cucurbita moschata</i>) to obtain highly valuable pectic polysaccharides. Pectic polysaccharides were obtained by conventional acid extraction, enzyme-assisted acid extractions and enzymatic extractions, and subsequently characterized. In general, the yield of pectic polysaccharide, compared to conventional acid extraction (60.6 mg/g<sub>DM</sub>), was increased when the acid step was preceded by enzymatic treatment. On the other hand, yields of enzymatic extractions were similar or lower compared to the acid extraction. The highest extraction yield (104.4 mg/g<sub>DM</sub>) was obtained after acid extraction assisted by xylanase, cellulase and amylase.</p> <p>With the use of enzymes for the extraction of butternut squash pectic polysaccharides, it was possible to obtain up to 3 times higher galacturonic acid content than in conventional acid extraction; the highest galacturonic acid content was determined in the sample obtained in amylase-assisted acid extraction (84.4 g/100 g). The same was true for the content of homogalacturonan, and the opposite for rhamnogalacturonan-I. After the degree of methoxylation was</p>

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5b – Statement on the authority,

5v – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and permission to publish personal data,

5g – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

determined, all pectic polysaccharides, except the acid-extracted one, were classified as low methoxylated pectins. The application of acid in the extraction of pectic polysaccharides from butternut squash had a negative effect on the content of total phenols, antioxidant and iron(II)-chelating activities. The highest content of total phenols was determined in the sample extracted with cellulase and xylanase (1.16 mg FK/g). *In-vitro* antioxidant activity was the highest in the sample extracted with cellulase, xylanase and amylase (2.42 mM TE/100 g), and the highest Fe<sup>2+</sup>-chelating activity in the sample extracted with amylase (2.13 mM EDTA/100 g). By measuring the molar mass, it was determined that the acid-extracted pectic polysaccharides were more prone to aggregation in their solution and that the enzymatically extracted samples on average had lower molar mass than the acid extracted samples. The viscosity of pectic polysaccharides was more affected by the type of enzyme used for extraction than whether acid was used for that purpose; the highest viscosity was measured in samples obtained with the help of amylase. The solubility of pectic polysaccharides was the highest among all pectic polysaccharides where xylanase and cellulase were used in the enzymatic extraction step (more than 77%).

Additionally, pectic polysaccharides isolated by different extraction techniques were subjected to modifications with endo-polygalacturonase and pectin-methylesterase (individually or combined) to obtain pectic polysaccharides and oligosaccharides with changed characteristics and properties. Determination of the Michaelis-Menten constant of endo-polygalacturonase showed that this enzyme had the highest affinity for the samples extracted with the use of acid; endo-polygalacturonase showed the highest affinity for the pectic polysaccharide obtained in amylase-assisted acid extraction ( $K_M = 13.3$  mg/mL), which was in accordance with the greatest decrease in Mw and viscosity of samples extracted in this way. Modification by endo-polygalacturonase had a positive effect on increasing antioxidant and Fe<sup>2+</sup>-chelating activity.

Modification with pectin-methylesterase led to de-esterification of all pectic polysaccharides; the degree of methoxylation in most samples was reduced 3.5 times on average. After modification with this enzyme, molar mass and viscosity increased in most samples, and the greatest intensity of these changes was observed in samples obtained without the use of acid. The antioxidant activities of pectin-methylesterase-modified pectic polysaccharides were higher than those of the corresponding unmodified samples, with the greatest change in the sample extracted in conventional acid extraction where this activity doubled.

After examining the effect of the combined action of endo-polygalacturonase and pectin-methylesterase on pectic polysaccharides from butternut squash, it was concluded that the intensity of reduction in molar mass and viscosity was almost twice as high as the reduction of these properties after modification with endo-polygalacturonase alone. Modification with combined enzymes led to two-fold increases in ABTS and iron(II)-chelating activities of all modified pectic polysaccharides than the increases observed after modification with endo-polygalacturonase alone. The greatest increase was observed after the modification of acid-extracted pectic

	<p>polysaccharide; antioxidant and Fe<sup>2+</sup>-chelating activity increased 4.2 and 44 times, respectively.</p> <p>Furthermore, the potential of acid-extracted pectic polysaccharide from butternut squash to be used for the preparation of complex coacervates with ovalbumin and gelatin was also investigated. The yield of coacervation was higher with gelatin than with ovalbumin. Also, coacervates with gelatin had up to 3 times greater mechanical stability than coacervates with ovalbumin, but their stability in simulated gastrointestinal conditions was two times lower than the stability of coacervates with ovalbumin.</p>
Accepted on Scientific Board on:	26 December 2019
Defended:	
Thesis Defend Board (title, first name, last name, position, institution):	<p>President: Dr. Marina Šćiban, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad,</p> <p>Member/supervisor: Dr. Mirjana Antov, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad,</p> <p>Member: Dr. Jaroslav Katona, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad,</p> <p>Member: Dr. Zorica Knežević-Jugović, Full Professor, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade,</p> <p>Member: Dr. Dejan Bezbradica, Full Professor, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.</p>
Note:	



# Sadržaj

Rezime	I
Summary	III
Spisak skraćenica i oznaka	V
1. Uvod	1
2. Teorijski deo	5
2.1. Pektin	5
2.1.1. Struktura pektina	5
2.1.1.1. Homogalakturonan	5
2.1.1.2. Ksilogalakturonan	6
2.1.1.3. Ramnogalakturonan-I	6
2.1.1.4. Ramnogalakturonan-II	7
2.1.2. Mesto i uloga pektina u ćelijskom zidu biljaka	7
2.1.3. Primena pektina i njegov uticaj na zdravlje	8
2.2. Pektinski polisaharidi muskatne tikve	8
2.2.1. Hemijski sastav pulpe muskatne tikve	9
2.2.2. Prinosi i karakteristike pektinskih polisaharida muskatne tikve	9
2.2.3. Svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve	11
2.2.3.1. Hidratantna svojstva	11
2.2.3.2. Reološka svojstva	12
2.2.3.3. Biološka svojstva	12
2.3. Ekstrakcija pektina	13
2.3.1. Kisela ekstrakcija pektina	13
2.3.2. Enzimaska ekstrakcija pektina	13
2.3.3. Enzimski potpomognuta kisela ekstrakcija	14
2.4. Enzimaska modifikacija pektina	14
2.4.1. Pektinolitički enzimi	15
2.4.1.1. Endo-poligalakturonaza	16
2.4.1.2. Pektin-metilesteraza	16
2.5. Kompleksna koacervacija	17
2.5.1. Mehanizam kompleksne koacervacije	17
2.5.2. Kompleksni koacervati pektina	18
2.5.2.1. Funkcionalna svojstva kompleksnih koacervata pektina	19
2.5.2.2. Primena kompleksnih koacervata pektina	19
3. Materijal i metodi	23
3.1. Sirovina	23
3.2. Enzimi i njihova aktivnost	23

3.3.	Ekstrakcija pektinskih polisaharida muskatne tikve	24
3.3.1.	Enzimski tretman pulpe muskatne tikve	24
3.3.2.	Kisela ekstrakcija	24
3.3.3.	Enzimska ekstrakcija	24
3.3.4.	Enzimski potpomognuta kisela ekstrakcija	25
3.3.5.	Izolovanje pektinskih polisaharida muskatne tikve	25
3.4.	Enzimске modifikacije ekstrahovanih pektinskih polisaharida	25
3.5.	Priprema kompleksnih koacervata	26
3.6.	Analitički metodi	26
3.6.1.	Određivanje hemijskog sastava	26
3.6.2.	Određivanje neutralnih šećera	27
3.6.3.	Određivanje molarne mase	27
3.6.4.	<i>In-vitro</i> biološka aktivnost i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost	27
3.6.5.	Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode	27
3.6.6.	Određivanje Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze	28
3.6.7.	Određivanje zeta potencijala	28
3.6.8.	Turbidimetrija	28
3.6.9.	Reološka merenja	28
3.6.10.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom	28
3.6.11.	Stabilnost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	28
3.6.12.	Statistička analiza	29
4.	Rezultati i diskusija	31
4.1.	Karakterizacija mezokarpa muskatne tikve	31
4.2.	Izolovanje pektinskog polisaharida muskatne tikve	32
4.2.1.	Enzimski tretmani pulpe muskatne tikve	32
4.2.1.1.	Tretman celulazom i/ili ksilanazom	32
4.2.1.2.	Tretman amilazom	32
4.2.2.	Prinosi ekstrakcija pektinskog polisaharida muskatne tikve	33
4.3.	Karakteristike i svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve	34
4.3.1.	Pektinski polisaharidi dobijeni kiselim ekstrakcijama	34
4.3.1.1.	Hemijski sastav pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	34
4.3.1.2.	Monosaharidni profil pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	35
4.3.1.3.	Molarne mase pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	37
4.3.1.4.	Naelektrisanje pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	39
4.3.1.5.	Sadržaj ukupnih fenola, <i>in-vitro</i> antioksidativna aktivnost i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	40
4.3.1.6.	Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	41
4.3.1.7.	Viskoznost pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	42
4.3.1.8.	FTIR spektri pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama	42

4.3.2.	Pektinski polisaharidi dobijeni enzimskim ekstrakcijama	44
4.3.2.1.	Hemijski sastav pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	44
4.3.2.2.	Monosaharidni profili pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	45
4.3.2.3.	Molarne mase pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	47
4.3.2.4.	Naelektrisanje pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	48
4.3.2.5.	Sadržaj ukupnih fenola, <i>in-vitro</i> antioksidativna aktivnost i metal helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	49
4.3.2.6.	Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	50
4.3.2.7.	Viskoznost pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	51
4.3.2.8.	FTIR spektri pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama	52
4.3.3.	Poređenje karakteristika i svojstava pektinskih polisaharida dobijenih u kiselim i enzimskim ekstrakcijama	53
4.3.3.1.	Hemijski sastav	53
4.3.3.2.	Molarne mase	54
4.3.3.3.	Ukupni fenoli, antioksidativna i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost	55
4.3.3.4.	Naelektrisanje, rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode	55
4.3.3.5.	Viskoznost	56
4.4.	Enzimске modifikacije pektinskih polisaharida muskatne tikve	56
4.4.1.	Enzimска modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve dejstvom endo-poligalakturonaze	56
4.4.1.1.	Mihaelis-Mentenina konstanta endo-poligalakturonaze za pektinske polisaharide muskatne tikve	56
4.4.1.2.	Modifikacija endo-poligalakturonazom	57
4.4.1.3.	Molarna masa pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom	58
4.4.1.4.	Viskoznost pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom	61
4.4.1.5.	<i>In-vitro</i> antioksidativna aktivnost i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom	62
4.4.2.	Enzimска modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve dejstvom pektin-metilesteraze	64
4.4.2.1.	Stepen metoksilacije pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom	64
4.4.2.2.	Molarna masa pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom	65
4.4.2.3.	Viskoznost pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom	68
4.4.2.4.	<i>In-vitro</i> antioksidativna aktivnost i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom	70



4.4.3.	Enzimaska modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve zduženim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze	72
4.4.3.1.	Molarna masa pektinskih polisaharida modifikovanih zduženim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze	72
4.4.3.2.	Viskoznost pektinskih polisaharida modifikovanih zduženim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze	74
4.4.3.3.	<i>In-vitro</i> antioksidativna aktivnost i Fe <sup>2+</sup> -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih zduženim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze	76
4.4.4.	Poređenje uticaja različitih enzimskih tretmana na osobine i svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve	78
4.5.	Kompleksna koacervacija kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida muskatne tikve	79
4.5.1.	Zeta potencijal i замуćenje suspenzije koacervata	80
4.5.2.	Prinos koacervacije	81
4.5.3.	FTIR spektri koacervata	82
4.5.4.	Reološka merenja koacervata	83
4.5.5.	Stabilnost koacervata u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	84
5.	Zaključak	87
6.	Literatura	91
7.	Prilog	105
	Plan tretmana podataka	119









## Rezime

Interesovanje za pronalaženje novih, alternativnih izvora pektinskih polisaharida kontinualno raste kao posledica sve veće potražnje za ovim biopolimerom na tržištu. Komercijalno dostupni pektini su gotovo isključivo ekstrahovani iz kore citrusa, jabučnog tropa i izluženih rezanca šećerne repe. U isto vreme, sa porastom svesti o održivosti i ekološkoj prihvatljivosti, raste i potreba za češćom i rasprostranjenijom primenom „zelenih” tehnika u industriji. S obzirom da se pektinski polisaharidi konvencionalno dobijaju kiselim ekstrakcijama koje generišu velike količine toksičnih efluenata, poželjno je zameniti ovaj korak ekološki prihvatljivijim alternativama. Ova doktorska disertacija ima za cilj dobijanje i karakterizaciju visokovrednih pektinskih polisaharida iz muskatne tikve (*Cucurbita moschata*) koja predstavlja njihov manje istražen izvor. Pored konvencionalne kisele ekstrakcije, pektinski polisaharidi su dobijeni i pomoću enzima, ekološki prihvatljivijih agenasa za ekstrakciju, koji su korišćeni samostalno ili kao pretretman koji je pratila kisela ekstrakcija. U ekstrakcijama su korišćene celulaza, ksilanaza, amilaza i proteaza.

Dobijeni rezultati su pokazali da je bilo moguće povećati prinos pektinskog polisaharida kada kiseloj ekstrakciji prethodi enzimski tretman ili čak dobiti sličan prinos kada se za ekstrakciju koriste ksilanaza i celulaza bez naknadnog koraka ekstrakcije kiselinom. Različite tehnike ekstrakcije su rezultirale različitim hemijskim sastavima pektinskih polisaharida. Upotrebom enzima za ekstrakciju pektinskih polisaharida muskatne tikve je bilo moguće dobiti i do 3 puta veći sadržaj galakturonske kiseline nego konvencionalnom kiselom ekstrakcijom, a samim tim je i sadržaj homogalakturonana kod uzoraka dobijenih enzimski potpomognutim ekstrakcijama bio veći. Takođe, svi enzimski ekstrahovani pektinski polisaharidi su se, za razliku od kiselu ekstrahovanog, mogli uvrstiti u visokometoksilovane pektine. Primena enzima u ekstrakciji je uticala i na molarne mase pektinskih polisaharida; molarne mase prvih molekulskih frakcija enzimski ekstrahovanih uzoraka, eluiranih sa kolone za gel-permeacionu hromatografiju visokih performansi, su bile veće nego kod onih ekstrahovanih pomoću kiseline, dok su kiselu ekstrahovani pektinski polisaharidi u svojim rastvorima imali više agregata. Određivanjem sadržaja ukupnih fenola, antioksidativne i gvožđe(II)-helirajuće aktivnosti je utvrđeno da je primena enzima u ekstrakciji imala pozitivan uticaj na ove osobine, pri čemu su najveće vrednosti pokazali enzimski ekstrahovani uzorci. Na viskoznost i rastvorljivost pektinskih polisaharida su veći uticaj imali enzimi primenjeni za ekstrakciju, nego to da li je u te

svrhe korišćena kiselina. Veća viskoznost je izmerena kod pektinskih polisaharida za čije je dobijanje korišćena amilaza, dok je rastvorljivost pektinskih polisaharida bila veća kod svih pektinskih polisaharida kod kojih su u enzimskom koraku ekstrakcije korišćene ksilanaza i celulaza.

U isto vreme, dostupna literatura ukazuje na sve veće napore koji se ulažu u modifikaciju pektina u cilju dobijanja pektinskih polisaharida i oligosaharida drugačijih, odnosno poboljšanih karakteristika i svojstava u odnosu na nemodifikovane uzorke. U ovoj disertaciji, pektinolitički enzimi endo-poligalakturonaza i pektin-metilesteraza su korišćeni samostalno ili združeno za modifikaciju pektinskih polisaharida muskatne tikve uz praćenje karakteristika i svojstava novonastalih modifikovanih produkata relevantnih za njihovu primenu. Endo-poligalakturonaza je pokazala najveći afinitet ka uzorcima dobijenim u enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama. U skladu sa tim su i smanjenja molarne mase i viskoznosti bila najveća kod ovih pektinskih polisaharida. Modifikacija endo-poligalakturonazom je takođe uticala na povećanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti i Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti u odnosu na ove aktivnosti kod nemodifikovanih pektinskih polisaharida. Antioksidativna aktivnost je najviše povećana kod modifikovanih uzoraka koji su bili ekstrahovani enzimski potpomognutim kiselim postupkom, dok je sposobnost heliranja jona gvožđa u najvećoj meri poboljšana nakon modifikacije kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida. Modifikacija pektin-metilesterazom je dovela do deesterifikacije svih pektinskih polisaharida; najmanje smanjenje stepena metoksilacije je primećeno kod kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida, dok je kod svih ostalih uzoraka ovo smanjenje bilo podjednakih iznosa. Nakon modifikacije pektin-metilesterazom, došlo je do povećanja molarne mase i viskoznosti svih modifikovanih pektinskih polisaharida, ali je intenzitet ovih promena bio najveći kod enzimski ekstrahovanih uzoraka. *In vitro* antioksidativna aktivnost pektin-metilesterazom modifikovanih pektinskih polisaharida je bila veća od ove aktivnosti odgovarajućih nemodifikovanih uzoraka; najveće povećanje primećeno je kod modifikovanog kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida. Dodatno, združeno dejstvo endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze je u većoj meri uticalo na karakteristike i svojstva svih modifikovanih pektinskih polisaharida nego dejstvo samostalnih enzima. Smanjenja molarne mase i viskoznosti su bila skoro duplo veća nego smanjenja ovih osobina nakon modifikacije samostalnom endo-poligalakturonazom, pri čemu je združeno dejstvo ova dva enzima u najvećoj meri uticalo na smanjenje Mw i viskoznosti kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Takođe, povećanja antioksidativne i gvožđe (II)-helirajuće aktivnosti su bila veća kod svih pektinskih polisaharida modifikovanih združenim dejstvom ova dva enzima, nego kada su oni korišćeni samostalno. Najveće promene ovih osobina su primećene kod modifikovanog kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida.

Pored svega navedenog, treba istaći da se fokus istraživanja u poslednje vreme sve više usmerava ka pektinskim polisaharidima kao gradivnim komponentama u kompleksnim koacervatima sa proteinima, ponajviše zbog veoma široke potencijalne primene ovakvih kompleksa. Ova disertacija je ispitala potencijal kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida muskatne tikve da zajedno sa ovalbuminom ili želatinom gradi kompleksne koacervate. Prinos koacervacije je bio veći kada je kao polikatjonska komponenta korišćen želatin, nego ovalbumin, a takođe su koacervati pripremljeni sa želatinom pokazali i veću mehaničku stabilnost. Velika mehanička stabilnost nije značila i veliku stabilnost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Koacervati kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina su pokazali veću stabilnost u ovim simuliranim uslovima od koacervata sa želatinom. Ovi rezultati ukazuju na veliki potencijal pektinskog polisaharida muskatne tikve za pripremu kompleksnih koacervata sa potencijalnom primenom u ciljanoj dostavi aktivnih supstanci.

## Summary

Interest in finding new alternative sources of pectic polysaccharides continually increases due to the growing market demand for this biopolymer. Commercially available pectins are almost exclusively extracted from citrus peels, apple pomace and sugar beet pulp. At the same time, the need for more frequent and widespread application of “green” technics in industry grows along with increasing awareness of sustainability and environmental acceptability. Given that pectic polysaccharides are conventionally obtained in acid extractions that generate large amounts of toxic effluents, replacing this step with more environmentally friendly alternatives is preferable. This doctoral dissertation aims to obtain and characterize high-value pectic polysaccharides from butternut squash (*Cucurbita moschata*), a less explored pectin source. In addition to conventional acid extraction, pectic polysaccharides were also obtained using enzymes, more environmentally friendly extraction agents, which were applied alone or as a pre-treatment followed by acid extraction. Cellulase, xylanase, amylase and protease were used in the extractions.

The obtained results showed that it was possible to increase the yield of pectic polysaccharides when acid extraction is preceded by enzymatic treatment or even obtain similar yield when xylanase and cellulase are used for extraction without a subsequent acid extraction step. Different extraction techniques resulted in different chemical compositions of pectic polysaccharides. By using enzymes for the extraction of pectic polysaccharides from butternut squash, it was possible to obtain up to 3 times higher galacturonic acid content than with conventional acid extraction, and therefore the content of homogalacturonan in samples obtained by enzyme-assisted extractions was also higher. All enzymatically extracted pectic polysaccharides, unlike the acid-extracted one, could be classified as highly methoxylated pectins. The use of enzymes in the extraction also affected the molar mass of pectic polysaccharides;  $M_w$  of the first molecular fractions of enzymatically extracted samples, eluted from gel-permeation chromatography column, was higher than of those extracted with acid, while acid-extracted pectic polysaccharides had more aggregates in their solutions. By determining the total phenols content, antioxidant and iron(II)-chelating activity, it was observed that the application of enzymes for the extraction had a positive effect on these properties, with the highest values achieved in the enzymatically extracted samples. The viscosity and solubility of pectic polysaccharides were more influenced by the enzymes used for extraction than whether acid was used for those purposes.

Higher viscosity was measured in pectic polysaccharides obtained with the help of amylase, while the solubility of pectic polysaccharides was higher in all samples in which xylanase and cellulase were used in the enzymatic extraction step.

The available literature also indicates increasing efforts being made in pectin modification in order to obtain pectic polysaccharides and oligosaccharides with different, namely improved characteristics and properties compared to unmodified samples. In this dissertation, the pectinolytic enzymes endo-polygalacturonase and pectin-methylesterase were used individually or together for the modification of butternut squash pectic polysaccharides, while monitoring the characteristics and properties of newly created modified products relevant to their application. Endo-polygalacturonase showed the highest affinity for samples obtained in enzyme-assisted acid extractions. Accordingly, the reductions in molar mass and viscosity were the greatest for those pectic polysaccharides. Modification with endo-polygalacturonase also increased *in-vitro* antioxidant activity and Fe<sup>2+</sup>-chelating activity compared to these activities of unmodified pectic polysaccharides. The antioxidant activity increased the most in modified samples extracted by an enzyme-assisted acid process, while the iron chelating activity was improved to the greatest extent after the modification of the acid-extracted pectic polysaccharide. Modification with pectin-methylesterase led to de-esterification of all pectic polysaccharides; the smallest decrease in the degree of methoxylation was observed in acid-extracted pectic polysaccharide, while in all other samples this decrease was the same. After pectin-methylesterase modification, there was an increase in the molar mass and viscosity of all modified pectic polysaccharides, but the intensity of these changes was the highest in enzymatically extracted samples. *In vitro* antioxidant activities of pectin-methylesterase-modified pectic polysaccharides were higher than the corresponding unmodified samples; the highest increase was observed in modified acid-extracted pectic polysaccharide. Additionally, the joint action of endo-polygalacturonase and pectin-methylesterase had a greater effect on the characteristics and properties of all modified pectic polysaccharides than the action of individual enzymes. The reductions in molar mass and viscosity were almost double the reduction in these properties after modification with endo-polygalacturonase alone; the joint action of these two enzymes had the greatest effect on the reduction of Mw and viscosity in enzymatically extracted pectic polysaccharides. Also, increases in antioxidant and iron(II)-chelating activities were greater for all pectic polysaccharides modified by the combined action of these two enzymes, than when they were used individually. The biggest changes in these properties were observed in case of the modified acid-extracted pectic polysaccharide.

In addition to all that has been stated, it should be pointed out that the focus of research is recently increasingly directed towards pectic polysaccharides as building components in complex coacervates with proteins, precisely because of the very wide potential application of such complexes. This dissertation investigates the potential of acid-extracted pectic polysaccharide from butternut squash to form complex coacervates with ovalbumin or gelatin. The yield of coacervation was higher when gelatin was used as a polycationic component than when ovalbumin was used, and coacervates prepared with gelatin also showed greater mechanical stability. High mechanical stability did not equal high stability in simulated gastrointestinal conditions. Coacervates of acid-extracted pectic polysaccharide and ovalbumin showed greater stability under these simulated conditions than coacervates with gelatin. These results indicate a great potential of the pectic polysaccharide from butternut squash for the preparation of complex coacervates with potential application in the targeted delivery of active substances.

## Spisak skraćenica i oznaka

A	Pektinski polisaharid dobijen u ekstrakciji amilazom
A+K	Pektinski polisaharid dobijen u amilazom potpomognutoj kiseljoj ekstrakciji
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
AceA	Acerna kiselina
AG-I	Arabinogalaktan-I
AG-II	Arabinogalaktan-II
Api	Apijoza
Ara	Arabinoza
AXC	Pektinski polisaharid dobijen u ekstrakciji celulazom, ksilanazom i amilazom
AXC+K	Pektinski polisaharid dobijen u celulazom, ksilanazom i amilazom potpomognutoj kiseljoj ekstrakciji
B50	Pektinski polisaharid dobijen ekstrakcijom u fosfatnom puferu na 50 °C
B80	Pektinski polisaharid dobijen ekstrakcijom u fosfatnom puferu na 80 °C
BSA	Albumin iz goveđeg seruma
DA	Stepen acetilacije
DHA	3-dezoksi-likso-2-heptulozarna kiselina
DM	Stepen metoksilacije
DNS	3,5-dinitrosalicilna kiselina
Đ	Disperznost molarne mase
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
ePG	Endo-poligalakturonaza
FK	Ferulna kiselina
Gal	Galaktoza
GalA	Galakturonska kiselina
GIT	Gastrointestinalni trakt
Glc	Glukoza
GP-HPLC	Gel-permeaciona hromatografija visokih performansi
HG	Homogalakturonan
IEX-HPLC	Hromatografija visokih performansi sa izmenom jona
K	Pektinski polisaharid dobijen u kiseljoj ekstrakciji
KDO	3-dezoksi-mano-2-oktulozonska kiselina
$K_M$	Mihaelis-Mentenina konstanta
LVE	Linearni viskoelastični region
Man	Manoza
Mn	Srednja molarna masa po brojnoj zastupljenosti



Mp	Molarna masa pika
Mw	Srednja molarna masa po masenoj zastupljenosti
NMP	Niskometoksilovan pektin
pI	Izoelektrična tačka
PME	Pektin-metilesteraza
RG-I	Ramnogalakturonan-I
RG-II	Ramnogalakturonan-II
Rha	Ramnoza
RP-HPLC	Hromatografija visokih performansi na obrnutim fazama
SM	Suva materija
SSC	Simulirani sok creva
SŽS	Simulirani želudačni sok
TE	Troloks ekvivalenti
VMP	Visokometoksilovan pektin
XC	Pektinski polisaharid dobijen u ekstrakciji celulazom i ksilanazom
XC+K	Pektinski polisaharid dobijen u celulazom i ksilanazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji
XCP	Pektinski polisaharid dobijen u ekstrakciji celulazom, ksilanazom i proteazom
XG	Ksilogalakturonan
Xyl	Ksiloza









# 1. Uvod

Pektinski polisaharidi predstavljaju veoma kompleksnu grupu biomolekula, prisutnu u ćelijskom zidu i srednjoj lameli biljaka. Prepoznatljivi su po visokom sadržaju galakturonske kiseline koja vezana u lanac čini jedan od njegovih glavnih strukturnih domena (homogalakturonan). U ostalim strukturnim domenima su, osim galakturonske kiseline, prisutne ksiloza (ksilogalakturonan), ramnoza, arabinoza i galaktoza (ramnogalakturonan-I), kao i neki retki monosaharidi (ramnogalakturonan-II). Pektinski polisaharidi se mogu podeliti na visokometoksilovane i niskometoksilovane prema sadržaju metoksilovanih karboksilnih grupa galakturonske kiseline.

Pektinski polisaharidi se nalaze u primarnom ćelijskom zidu i srednjoj lameli biljaka gde imaju gradivnu ulogu, pri čemu istovremeno utiču i na poroznost i naelektrisanje ćelijskog zida. Pektinski oligosaharidi imaju sposobnost da aktiviraju odbrambene mehanizme biljke, indukuju lignifikaciju i akumulaciju proteaza inhibitora u biljnom tkivu. Sa druge strane, pektinski polisaharidi su, kako pokazuju brojna istraživanja, posebno značajna grupa makromolekula s aspekta korisnih efekata na ljudsko zdravlje; imaju antioksidativna svojstva, preporučuju se dijabetičarima jer smanjuju glikemijski odgovor, snižavaju nivo holesterola u krvi, mogu za sebe da vezuju jone teških metala, stabilizuju krvni pritisak, imaju imunoregulatorno delovanje, uspostavljaju normalnu funkciju intestinalnog trakta, itd. Pored pozitivnog uticaja na zdravlje, pektinski polisaharidi svojim prisustvom u prehranbenim proizvodima poboljšavaju njihova svojstva, izražavajući svoje funkcionalne osobine. Pektinski polisaharidi se dodaju hrani da promene njenu konzistenciju, teksturu, reologiju, kao i senzorske karakteristike. Osim toga, pektinski polisaharidi imaju i velik ekonomski značaj jer svetska potražnja iz godine u godinu raste, pa je neophodno definisati nove, manje istražene sirovine za dobijanje ovog polisaharida.

Komercijalno, pektinski polisaharidi se dobijaju iz jabuke, citrusa i šećerne repe, dok muskatna tikva (*Cucurbita moschata*) predstavlja nekonvencionalan i manje istražen izvor ovog biomolekula. Muskatna tikva, često uzgajana sorta, bi mogla da pruži odgovor na porast potražnje za pektinom sa obzirom na njen jednostavan uzgoj, brz rast i razvoj biljke, kao i otpornost i toleranciju na štetočine i bolesti. Konvencionalno se za ekstrakciju pektina koriste kiseline, ali ovaj tip ekstrakcije ima brojne nedostatke, prvenstveno u pogledu ekološke prihvatljivosti i ekstremnih uslova postupka. Za razliku od konvencionalne, enzimaska ekstrakcija predstavlja ekološki prihvatljivu tehniku kako zbog netoksičnosti korišćenih enzima, tako i zbog blagih uslova ekstrakcije.

Zbog izražene kompleksnosti u sastavu i strukturi, u molekulima pektinskih polisaharida postoje brojna mesta na kojima različiti enzimi mogu da ispolje svoje delovanje. Rezultati ovih enzimskih modifikacija će zavisi od primenjenog enzima ali i od karakteristika polaznog, nemodifikovanog molekula. Kako su njihova svojstva u vezi sa molekulskom strukturom, na ovaj način je moguće dobiti proizvode izmenjenih funkcionalnih i bioloških osobina. Enzimi za modifikaciju pektinskih polisaharida se mogu podeliti na one koji depolimerizuju molekul, kao i na one koji katalizuju deesterifikaciju. Enzimi kao što je poligalakturonaza razgrađuju glavni niz pektinskog polisaharida, oslobađajući pri tome duže ili kraće lance koji imaju značajno promenjene osobine u odnosu na nemodifikovane pektinske polisaharide. S druge strane, pektin-metilesteraza deesterifikuje karboksilne grupe galakturonske kiseline, menjajući na ovaj način svojstva pektinskih polisaharida i utičući na osetljivost pektinskih polisaharida na različite jone. Enzimске modifikacije pektinskih polisaharida muskatne tikve do sada nisu izučavane.

U isto vreme, interesovanje za pektinskim polisaharidima kao komponentama u kompleksima sa proteinima sve više raste, na šta ukazuje sve veći broj objavljenih naučnih radova. Ovi polisaharidi sa proteinima mogu da grade komplekse, prvenstveno usled elektrostatičkih interakcija. Formirani kompleksi su pronašli široku primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i u medicini jer mogu da služe kao nosači za različite bioaktivne molekule ili da poboljšavaju svojstva proizvoda u koje se dodaju. Primena pektinskog polisaharida muskatne tikve u pripremi kompleksnih koacervata do sada nije navođena u literaturi.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje potencijala pektinskog polisaharida izdvojenog iz muskatne tikve za dobijanje visokovrednih proizvoda. Pektinski polisaharidi su ekstrahovani različitim tehnikama iz muskatne tikve - konvencionalnom kiselom ekstrakcijom, enzimskim ekstrakcijama, kao i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama. Dobijeni pektinski polisaharidi različitog sastava i strukture su okarakterisani u pogledu hemijskih, fizičko-hemijskih i strukturnih karakteristika, a određena su im i funkcionalna i biološka svojstva.

Pektinski polisaharidi izdvojeni različitim ekstrakcionim tehnikama podvrgnuti su modifikacijama endo-poligalakturonazom i pektin-metilesterazom, u protokolima koji su podrazumevali njihovo individualno ili sinergističko delovanje. Dobijeni enzimski modifikovani pektinski polisaharidi su okarakterisani s aspekta sagledavanja razlika u ishodu primenjenih modifikacija, kao i unapređenja njihovih svojstava u odnosu na odgovarajuće nemodifikovane biomolekule.

Pored toga, ispitan je i potencijal pektinskog polisaharida muskatne tikve za pripremu kompleksnih koacervata sa proteinima. U tom smislu su određene interakcije između polisaharida i proteina, kao i svojstva formiranih kompleksa.









## 2. Teorijski deo

### 2.1. Pektin

Pektin je važna strukturna komponenta ćelijskog zida biljaka i verovatno najkompleksniji makromolekul u prirodi [1]. Termin pektin je donekle obmanjujuć jer implicira da je reč o samo jednoj vrsti molekula. Zapravo, pektin je zbirno ime za kompleksnu grupu oligosaharida i polisaharida koji imaju zajednička svojstva ali su ekstremno raznoliki u pogledu strukture i mogu se sastojati od čak 17 različitih monosaharida spojenih sa više od 20 tipova veza. Ipak, ono što im je zajedničko jeste to da u njihov sastav ulazi velika količina galakturonske kiseline (GalA) [2,3].

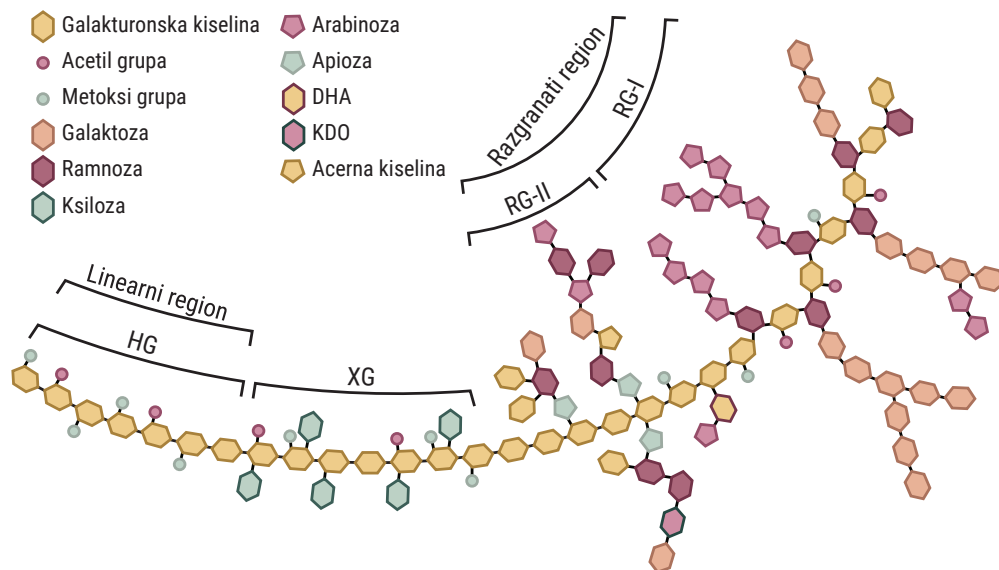
#### 2.1.1. Struktura pektina

Pektini predstavljaju heterogenu grupu oligo- i polisaharida sačinjenih od galakturonske kiseline kao glavne gradivne jedinice; prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO), pektin koji se koristi u prehrambenoj industriji mora da ima najmanje 65% GalA [4]. U zavisnosti od porekla i zrelosti biljnog tkiva, hemijska struktura pektina može značajno da varira. Njegovi glavni strukturni domeni su homogalakturonan (HG), ksilogalakturonan (XG), ramnogalakturonan-I (RG-I) i ramnogalakturonan-II (RG-II). U ostale gradivne elemente pektina koji ulaze u sastav glavnih strukturnih domena spadaju i arabinan, arabinogalaktan-I (AG-I) i arabinogalaktan-II (AG-II) [2,5] (slika 1).

##### 2.1.1.1. Homogalakturonan

Homogalakturonan, koji se naziva još i „glatki” region, predstavlja linearni kostur molekula pektina. Molekuli galakturonske kiseline su u ovom domenu pektina vezani  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama [7]. GalA može biti metoksilovan na C-6 atomu ili acetilovan na O-2 i/ili O-3 poziciji [2]. Odnos metil esterifikovanih i neesterifikovanih GalA predstavlja stepen metoksilacije (DM) pektina, dok odnos acetilovanih i neacetilovanih GalA daje stepen acetilacije (DA). Na osnovu stepena metoksilacije, pektini se mogu podeliti na visokometoksilovane (VMP, DM > 50%) i niskometoksilovane pektine (NMP, DM < 50%). Metil esterifikacija pektina ima veliki uticaj na fizička svojstva pektina; na primer, manji DM povećava osetljivost pektina na umrežavanje sa jonima  $Ca^{2+}$  [8].





Slika 1. Šematski prikaz strukture pektina (modifikovano prema Zdunek et al. [6])

### 2.1.1.2. Ksilogalakturonan

Kada su za lanac homogalakturonana  $\beta$ -1,3-glikozidnom vezom vezani pojedinačni molekuli ksiloze (Xyl), onda se takav lanac naziva ksilogalakturonan i on se najčešće pronalazi u plodu i semenkama biljaka. GalA u XG može biti i metoksilovan i acetilovan, kako na nesupstituisanim molekulima, tako i na GalA supstituisanim sa Xyl [2,5].

### 2.1.1.3. Ramnogalakturonan-I

Ramnogalakturonan-I zajedno sa ramnogalakturonanom-II čini razgranati („čupavi“) region molekula pektina. RG-I sačinjavaju naizmenični molekuli galakturonske kiseline i ramnoze (Rha). Na O-4 poziciji u molekulu ramnoze mogu biti vezani različiti neutralni šećeri [1]. Ovi bočni lanci su najčešće sačinjeni od galaktoze (Gal) i/ili arabinoze (Ara), koje se tu pronalaze i kao monomeri ali i kao oligomeri i polimeri (arabinogalaktan i arabinan). Smatra se da GalA jedinice u RG-I mogu biti metil esterifikovane, ali su u većoj meri acetilovane [2].

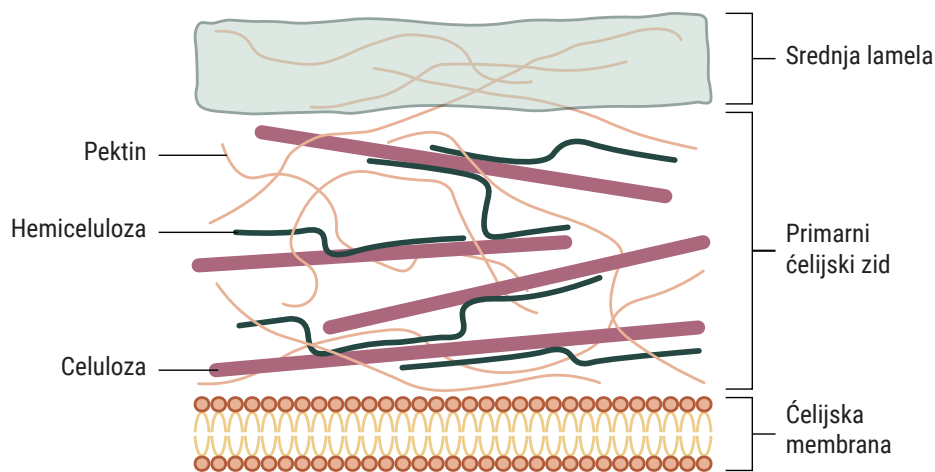
Arabinan se sastoji od molekula arabinoze vezanih  $\alpha$ -1,5-glikozidnim vezama u glavnom lancu koji je veoma supstituisan molekulima arabinoze vezanim  $\alpha$ -1,2- i  $\alpha$ -1,3-glikozidnim vezama. Arabinogalaktan-I čini glavni lanac  $\beta$ -1,4 vezane galaktoze sa molekulima Ara supstituisanim na O-3 pozicijama i sa molekulima Gal supstituisanim na O-6 pozicijama. Osnovni lanac arabinogalaktana-II čine molekuli Gal vezani  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama sa bočim lancima sačinjenih od naizmeničnih molekula Gal i Ara. Za AG-II je često vezana i određena količina proteina koja se ko-ekstrahuje zajedno sa pektinom i koju je teško odvojiti od AG-II domena [1,2].

#### 2.1.1.4. Ramnogalakturonan-II

Iako nosi ime ramnogalakturonan-II, osnovni lanac ovog domena molekula pektina je HG sa kompleksnim bočnim lancima u čiji sastav, između ostalog, ulaze i ovi retki monosaharidi: apioza (Api), acerna kiselina (AceA), 3-dezoksi-likso-2-heptulozarna kiselina (DHA) i 3-dezoksi-mano-2-oktulozonska kiselina (KDO). Rha ne ulazi u sastav glavnog lanca RG-II, već se može pronaći samo u bočnim lancima [1]. GalA u RG-II može biti metoksilovan [2,3].

#### 2.1.2. Mesto i uloga pektina u ćelijskom zidu biljaka

Pektin se nalazi u srednjoj lameli i primarnom ćelijskom zidu mnogih biljaka, gde se deponuje u ranim fazama ćelijskog rasta. Njegova koncentracija je značajno veća u srednjoj lameli sa postepenim opadanjem koncentracije od primarnog ćelijskog zida ka membrani citoplazme [9]. HG domen se može pronaći i u srednjoj lameli i u primarnom ćelijskom zidu, dok su RG-I i RG-II prisutni samo u primarnom ćelijskom zidu [1]. Na slici 2 je dat šematski prikaz strukture ćelijskog zida biljaka. Pektin se u ćelijskom zidu nalazi vezan za druge gradivne komponente (celuloza, hemiceluloza i protein) i takav *in situ* pektinski polisaharid se naziva protopektin [10,11]. Smatra se da ćelijski zid sačinjava osnovna struktura od celuloze i hemiceluloze ugrađena u matricu međusobno prepletenih pektina [1].



Slika 2. Šematski prikaz strukture ćelijskog zida viših biljaka

Uloga pektina u biljci je veoma raznolika. Primarno, on učestvuje u izgradnji ćelijskog zida koji daje snagu i potporu biljkama a istovremeno omogućava ćelijskom zidu potrebnu dinamičnost. Takođe, pektin utiče i na svojstva ćelijskog zida, kao što su poroznost, površinsko naelektrisanje i pH, pa je zato važan za transport jona u ćelijskom zidu. Pektinski oligosaharidi imaju sposobnost da aktiviraju odbrambene odgovore biljke, što izaziva akumulaciju fitoaleksina koji ima širok spektar antimikrobne aktivnosti, kao i da indukuju lignifikaciju i akumulaciju proteaza-inhibitora u biljnom tkivu [2]. Pektin u biljnom ćelijskom zidu ima i važnu ulogu tokom sazrevanja ploda, a značajno utiče i na teksturu i kvalitet voća i povrća tokom njihovog skladištenja [3].

### 2.1.3. Primena pektina i njegov uticaj na zdravlje

Pektin se često koristi kao sastojak u mnogim prehrambenim proizvodima (u evropskoj listi aditiva nosi oznaku E440). Njegova uloga u prehrambenim proizvodima je raznolika: služi kao sredstvo za geliranje, zgušnjavanje, emulgovanje i stabilizaciju džemova, konditorskih proizvoda, fermentisanih mlečnih proizvoda i sladoleda [3,12]. Poslednjih godina, dosta se radilo na razvoju jestivih filmova ili omotača koje imaju ulogu pakovanja hrane. Pektin se pokazao kao dobra komponenta ovakvih filmova/ omotača zbog čega se sve češće ispituje za ove svrhe [12]. Dodatno, pektin je pronašao primenu i u farmaceutskoj industriji kao komponenta u nosačima sa ciljanom dostavom lekova ili bioaktivnih supstanci [13]. Takođe se pektin može ubrojati u polisaharide koji unapređuju ljudsko zdravlje. On spada u dijetetska i prebiotska vlakna, pokazuje imunoregulatorno, antiinflamatorno, antibakterijsko, antitumorsko, antidijabetsko, hipoglikemijsko, hipolipemijsko i antioksidativno dejstvo te je sve češće komponenta funkcionalne hrane [14].

### 2.2. Pektinski polisaharidi muskatne tikve

Uobičajeni i najčešće korišćeni izvori komercijalnog pektina su kore citrusa, jabučni trop i izluženi rezanci šećerne repe u kojima je on prisutan u velikim količinama [9,15]. Globalna godišnja potrošnja pektina je 2003. godine iznosila oko 45000 t [3], a 2018. čak 74000 t [16]. Sa projektovanim porastom u potražnji na tržištu od 6,5% na godišnjem nivou [17], potrebno je prepoznati i bolje iskoristiti nove izvore pektina koji bi potencijalno zadovoljili ovu rastuću potražnju. Poslednjih godina, ispitivani su mnogi nekonvencionalni izvori ovog polisaharida, kao što su kora banane, ljuske kakao ploda, kora lubenice, koren cikorije, plod bundeve, itd. [15,18]. Pored navedenih izvora, muskatna tikva (*Cucurbita moschata*, slika 3), česta sorta tikve koja se uzgaja širom sveta, predstavlja još jedan alternativni izvor pektina. Godišnja svetska produkcija tikvi i bundeva je za 2020. godinu iznosila skoro 28 t, od čega je 4,9 t uzgojeno u Evropi [19]. Muskatna tikva bi mogla da bude odgovor na povećanu potražnju za pektinom sa obzirom na njen relativno jednostavan uzgoj, brz rast i razvoj biljke, kao i otpornost i toleranciju na štetočine i bolesti [20,21].



Slika 3. Muskatna tikva (*Cucurbita moschata*) [22]

### 2.2.1. Hemijski sastav pulpe muskatne tikve

Hemijski sastav mezokarpa muskatne tikve je dat u tabeli 1. U pulpi muskatne tikve je u najvećoj meri prisutna voda (79% do 93%) [23]. Dodatno, pulpa muskatne tikve je bogata vlaknima (više nerastvorljivih nego rastvorljivih vlakana), skrobom i proteinima, dok je sadržaj lipida u njoj relativno nizak. Iako je dijetetska vlakna moguće podeliti na više načina, u literaturi je najčešća podela prema njihovoj rastvorljivosti u vodi. U nerastvorljiva dijetetska vlakna ubrajaju se celuloza, hemiceluloza, lignin, dok su rastvorljiva vlakna pektin,  $\beta$ -D-galaktan, galakto- i glukomanani [24,25]. Pored toga što se najčešće ubraja u rastvorljiva dijetetska vlakna, pektin može sadržati i određenu količinu u vodi nerastvorljivih pektinskih supstanci, te se stoga jedan njegov deo može uvrstiti i u nerastvorljiva dijetetska vlakna [24]. Sadržaj pektina u pulpi muskatne tikve se kreće od 7,3% do 10% (u odnosu na suhu materiju (SM)) [21,26]. Dodatno, visok sadržaj (računato u odnosu na SM) celuloze (7,2 do 16,3%) i hemiceluloze (4,5 do 29,2%) je takođe izmeren u različitim sortama bundeve (*Cucurbita maxima*) [27]. Muskatna tikva je takođe bogata različitim nutritivnim i bioaktivnim jedinjenjima kao što su fenolna jedinjenja, flavonoidi, vitamini (uključujući vitamine A, B<sub>2</sub>, C i E), karotenoidi i minerali [21].

Tabela 1. Literaturni podaci o sadržaju vlage, dijetetskih vlakana (ukupna, rastvorljiva i nerastvorljiva), skroba, proteina, masti i pepela u mezokarpu muskatne tikve

	Sadržaj* (%)	Referenca
<b>Vlaga</b>	79,0 – 93,0	[23]
<b>Ukupna dijetetska vlakna</b>	19,1 – 30,0	[20,21,28]
<b>Rastvorljiva dijetetska vlakna</b>	4,0	[21]
<b>Nerastvorljiva dijetetska vlakna</b>	15,6	[21]
<b>Skrob</b>	14,8 – 22,5	[20]
<b>Proteini</b>	7,2 – 17,3	[20,28]
<b>Lipidi</b>	0,8 – 2,0	[20,21]
<b>Pepeo</b>	8,9 – 15,6	[20,21,28]

\* sadržaj vlage je izražen u odnosu na vlažnu materiju, a svi ostali parametri u odnosu na suhu materiju

### 2.2.2. Prinos i karakteristike pektinskih polisaharida muskatne tikve

Prinosi pektinskih polisaharida ekstrahovanih iz muskatne tikve koji su dostupni u literaturi su prikazani u tabeli 2. Literaturne vrednosti prinosa se kreću u opsegu od 21 do 71 mg/g<sub>SM</sub> i u velikoj meri zavise od primenjenog tipa ekstrakcije [29–32].

Tabela 2. Literaturni podaci o prinosu pektinskog polisaharida muskatne tikve

Tip ekstrakcije	Prinos (mg/g <sub>SM</sub> )	Referenca
Kisela	21 - 69	[29,30]
Enzimski	43 - 71	[31,32]
Pufer pH 5,2	30	[31]

Karakteristike pektinskih polisaharida ekstrahovanih na različite načine iz muskatne tikve koje su dostupne u literaturi su prikazane u tabeli 3. Sadržaj galakturonske kiseline u ekstrahovanim pektinskim polisaharidima veoma varira i kreće se između 23% i 78,1% [30–32]. *Fissore et al.* [30] su ekstrahovali pektinske polisaharide sa visokim sadržajem skroba (12,4 – 37,4%), a sadržaj proteina

se prema literaturi kreće od 2,2% do 7,5% [30–32]. Sadržaj neutralnih šećera se kreće od 4,9% do 59,6%, pri čemu pektinski polisaharidi muskatne tikve u svom sastavu generalno imaju više ramnoze, galaktoze, glukoze (Glc) i arabinoze nego manoze (Man) i ksiloze [30–33]. Kod pektinskih polisaharida muskatne tikve, utvrđeno je i prisustvo ferulne kiseline (FK) 0,1% [34]. Po stepenu metoksilacije, neki autori su ovaj polisaharid uvrstili u visokometoksilovane pektinske polisaharide sa DM većim od 50% (50 – 83,1%) [31,35], dok su dostupni i podaci zbog kojih ga je moguće ubrojati i u niskometoksilovane pektinske polisaharide (DM 16,8 - 39,3%) [30]. Generalno, stepen acetilacije pektinskih polisaharida muskatne tikve je nizak (1,7 - 16,9%) [30,31].

*Tabela 3. Literaturni podaci o sadržaju galakturonske kiseline, skroba, proteina, neutralnih šećera, stepenima metoksilacije i acetilacije i molarnim masama pektinskih polisaharida muskatne tikve*

	<b>Tip ekstrakcije</b>	<b>Vrednost</b>	<b>Referenca</b>
<b>GalA*</b>	Kisela	23,0 - 41,0	[30]
	Enzimaska	39,0 - 78,1	[31,32]
	Pufer pH 5,2	75,3	[31]
<b>Skrob*</b>	Kisela	12,4 - 37,4	[30]
	Kisela	2,2 - 3,4	[30]
	Enzimaska	3,3 - 7,5	[31,32]
<b>Protein*</b>	Pufer pH 5,2	3,2	[31]
	Kisela	22,3 - 59,6	[30,33]
	Enzimaska	10,8 - 49,0	[31,32]
<b>Neutralni šećeri*</b>	Pufer pH 5,2	4,9	[31]
	Kisela	16,8 - 39,3	[30,33]
	Enzimaska	54,2 - 83,1	[31,32]
<b>DM**</b>	Pufer pH 5,2	50,0	[31]
	Kisela	1,7 - 3,1	[30]
	Enzimaska	12,5 - 16,9	[31]
<b>DA**</b>	Pufer pH 5,2	13,2	[31]
	Kisela	950	[29]
	Enzimaska	19 - 793	[32,34]

\* izraženo kao % (m/m)

\*\* izraženo kao %, (n/n, mol metoksi (DM) ili acetil (DA) grupa u 100 mol GalA)

\*\*\* izraženo u kDa

Molarne mase pektinskih polisaharida muskatne tikve u literaturi znatno variraju. *De Souza et al.* [29] su pokazali da je pektinski polisaharid imao samo jednu molekulsku frakciju i da je njena molarna masa 950 kDa, dok su *Fissore et al.* [32] detektovali više frakcija različitih molarnih masa u opsegu od 19 kDa do 793 kDa.

*Fissore et al.* [32] su pokazali da velika većina GalA (više od 90%) prisutnog u enzimski ekstrahovanom pektinskom polisaharidu muskatne tikve ulazi u sastav homogalakturonana. Takođe je, i u kiselo i u enzimski ekstrahovanom pektinskom polisaharidu muskatne tikve, prisutan

i ramnogalakturonan-I sa arabinanom i arabinogalaktanom u bočnim nizovima [30,32]. Pored ovih struktura koje uobičajeno ulaze u sastav pektinskih polisaharida, prisutne su i neke količine galaktomanana i skroba koji se ekstrahuju zajedno sa pektinom [30].

Naelektrisanje molekula pektina zavisi od sadržaja galakturonske kiseline koja u svom sastavu ima negativno naelektrisane karboksilne grupe i od stepena esterifikacije tih grupa. Ova osobina znatno utiče na jonske interakcije naelektrisanih molekula koje imaju uticaj na njihovo ponašanje u rastvorima, kao i na fizičko-hemijska svojstva [36]. Dodatno, zbog ove osobine, pektini mogu lako da stupaju u interakcije sa suprotno naelektrisanim jonima i makromolekulima [37,38]. Upravo zbog prisutnih neesterifikovanih karboksilnih grupa, bundevin (*C. maxima*) pektin predstavlja anjonski polielektrolit i ponaša se kao slaba kiselina [36,39].

Razlike u karakteristikama koje se pronalaze u literaturi mogu biti posledica različitih tehnika ekstrakcije, zrelosti ploda i uslova kultivacije [12,40].

### 2.2.3. Svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve

Svojstva pektinskih polisaharida su važna jer se direktno odražavaju na njihovu primenu. Zbog svojih funkcionalnih osobina, pektinski polisaharidi u hrani menjaju njenu teksturu, konzistenciju, reologiju, kao i senzorske karakteristike. Osim toga, biološka svojstva pektinskih polisaharida doprinose i povećanju nutritivne vrednosti prehrambenih proizvoda u kojima se nalaze [31]. Različita svojstva pektinskih polisaharida su u daljem tekstu grupisana u tri celine: hidratantna, reološka i biološka svojstva.

#### 2.2.3.1. Hidratantna svojstva

Hidratantna svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve su u direktnoj vezi sa njihovim funkcionalnim osobinama i nutritivnom vrednošću, te su stoga često ispitivana u literaturi [41]. U hidratantna svojstva se, između ostalog, ubrajaju rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode.

Na osnovu rastvorljivosti, dijetetska vlakna se dele na rastvorljiva i nerastvorljiva, a pektin se zbog svoje dobre rastvorljivosti ubraja u rastvorljiva vlakna. Ovakva vlakna, koja su odmah spremna za fermentaciju u gastrointestinalnom traktu (GIT), pospešuju rast intestinalne mikroflore. Pektinski polisaharidi muskatne tikve su veoma rastvorljivi u vodi, pri čemu je ova njihova osobina ranije samo opisno okarakterisana [32,35].

Kapacitet zadržavanja vode predstavlja sposobnost pektinskih polisaharida da za sebe vezuju određenu količinu vode slabim vezama, bez primene spoljašnje pokretačke sile. Količina vode koju je pektin sposoban da veže zavisi od njegovih hemijskih, fizičkih i strukturnih karakteristika. Ovo je važno svojstvo za ishranu ljudi jer utiče na intestinalnu peristaltiku i povećanje zapremine stolice, a ukazuje i na potencijalnu primenu ovih polisaharida kao sredstava za zgušnjavanje i povećanje zapremine u prehrambenoj industriji [41,42]. Kapacitet zadržavanja vode pektina ekstrahovanog iz bundeve (*C. maxima*) je relativno nizak bez obzira da li je pektin poticao iz pulpe (2,5 g vode po g pektina) ili iz kore bundeve (2,3 – 2,7 g/g) [43].

### 2.2.3.2. Reološka svojstva

Reološka svojstva polimera su važna za njihovu primenu u prehrambenim proizvodima i formulacijama. Ove osobine u velikoj meri zavise od karakteristika polimera, kao što su molarna masa, naelektrisanje, veličina i oblik molekula, ali i od spoljašnjih faktora, kao što su pH, koncentracija, temperatura, prisustvo šećera i soli [44–46]. Poseban značaj za prehrambenu industriju imaju viskoznost, sposobnosti zgušnjavanja, geliranja i umrežavanja.

Viskoznost je mera opiranja nekog fluida proticanju i ova osobina je veoma važna kod pektinskih polisaharida jer utiče na njihovo ponašanje i primenu u industriji. Oni se zbog svoje velike viskoznosti često koriste u različitim prehrambenim proizvodima za poboljšavanje teksture i karakteristika proticanja [45].

Geliranje podrazumeva formiranje trodimenzionalne mreže sačinjene od molekula polimera sa rastvaračem koji je fizički zarobljen unutar ove strukture. Gel se održava u ovom stanju pomoću brojnih slabih veza, kao što su elektrostatičke interakcije i vodonične veze. Mehanizam geliranja pektinskih polisaharida u najvećoj meri zavisi od njihovog stepena metoksilacije. Gelovi NMP se formiraju između karboksilnih grupa dva različita lanca pri čemu oni stupaju u jonske veze sa divalentnim jonima, najčešće  $\text{Ca}^{2+}$ . Ovakvi gelovi imaju veliku mehaničku stabilnost i izraženu pseudoplastičnost. VMP formiraju gelove na niskim pH u prisustvu velike koncentracije šećera. Gelovi VMP su stabilni usled prisustva vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija među metil estrima i potrebna je veća sila da bi se narušila struktura ovih nego NMP gelova [37]. Sa druge strane, pektini su sposobni i da se umrežavaju formiranjem uronil estara unutar svojih HG domena [1,2] ili formiranjem feruloil estara [2,9].

Rastvori pektinskih polisaharida muskatne tikve pokazuju smanjenje viskoznosti sa porastom primenjene sile smicanja, što je karakteristično za pseudoplastične fluide [29,31,32]. Ovakvi fluidi su posebno značajni za kvalitet i teksturu tečnih i polutečnih prehrambenih proizvoda [35]. *Fissore et al.* [35] su zaključili da pektinski polisaharidi ekstrahovani iz muskatne tikve pokazuju zadovoljavajući kapacitet zgušnjavanja koji bi mogao biti koristan u različitim prehrambenim formulacijama. Takođe, nemetoksilovane karboksilne grupe niskometoksilovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve ostvaruju veze sa jonima  $\text{Ca}^{2+}$  i formiraju gelove [29], dok kod visokometoksilovanih pektinskih polisaharida u prisustvu saharoze dolazi do povećanja viskoznosti, ali ne i do formiranja gelova [34].

### 2.2.3.3. Biološka svojstva

Pektinski polisaharidi su biološki veoma aktivna jedinjenja što se ogleda u njihovim raznovrsnim svojstvima (antioksidativno, imunoregulatorno, antiinflamatorno, hipoglikemijsko, antibakterijsko, antitumorsko, itd.) [14].

Antioksidativna aktivnost predstavlja sposobnost uklanjanja slobodnih radikala koji predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi. Slobodni radikali u normalnim okolnostima upravljaju rastom ćelija i potiskuju bakterije i viruse, ali u velikim količinama izazivaju oštećenje ćelija [47]. Zbog svoje izražene antioksidativne aktivnosti, pektinski polisaharidi su pogodni za uključivanje u funkcionalnu hranu i lekove kao antioksidansi [14]. Bundevin (*C. maxima*) pektin ispoljava izuzetnu antioksidativnu aktivnost određenu i u *in vitro* i u *in vivo* eksperimentima [39,48,49].

Dodatno, pektinski polisaharidi imaju sposobnost heliranja divalentnih jona metala što je od velikog značaja za terapiju u slučaju trovanja teškim metalima [50,51]. Reakcija heliranja podrazumeva

vezivanje jona metala kao centralnog liganda u kompleksu koji nastaje sa pektinom. Divalentno gvožđe predstavlja odličan primer metala kojem su ljudi svakodnevno izloženi. Iako je ljudskom telu potrebna određena količina gvožđa, višak ovog metala može biti veoma toksičan. Antioksidansi, kao što je i sam pektin, imaju sposobnost heliranja  $Fe^{2+}$  zbog prisustva funkcionalnih grupa koje mogu da vezuju metale [51]. Znatna gvožđe(II)-helirajuća aktivnost je određena kod pektina iz bundeve (*C. maxima*) [48].

### 2.3. Ekstrakcija pektina

Ekstrakcija pektina iz biljnog materijala podrazumeva dva koraka; prvo je potrebno hidrolizovati ćelijski zid i protopektin (korak hidrolize) a zatim se tako oslobođen pektin solubilizuje u ekstrakcioni medijum (korak solubilizacije) [10]. Konvencionalno se kao agens za razgradnju ćelijskog zida i oslobađanje pektina koriste kiseline, ali kisela ekstrakcija ima i svoje nedostatke, prvenstveno u pogledu ekološke prihvatljivosti. Zbog toga se za hidrolizu ćelijskog zida sve češće primenjuju nove „zelene” ekstrakcione tehnike kao što su enzimske ekstrakcije ili ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili mikrotalasima [15,52].

#### 2.3.1. Kisela ekstrakcija pektina

Kiseline su efikasni agensi za ekstrakciju pektina jer razgrađuju veze kojima je pektin vezan za ćelijski matriks biljnog materijala pri čemu najčešće rezultiraju veoma visokim prinosima. Prisustvo velike koncentracije vodonikovih jona stimuliše hidrolizu ćelijskog zida i protopektina pri tome oslobađajući pektin [52]. Na prinos, karakteristike i svojstva kiselo ekstrahovanog pektina utiče i izbor i jačina korišćene kiseline. Najčešće se za ekstrakciju pektina koriste hlorovodonična, sumporna, azotna, fosforna (neorganske), kao i sirćetna i limunska kiselina (organske) [52,53]. Od navedenih, hlorovodonična kiselina se izdvaja kao ekstragens koji daje najveći prinos [15,52]. Sa druge strane, konvencionalna kisela ekstrakcija ima i svoje nedostatke, kao što su gubitak lako isparljivih jedinjenja, povećanje troškova proizvodnje zbog neophodnih koraka tretmana otpadnih tokova kako bi se zadovoljili ekološki zahtevi, zatim degradacija pektina u ekstremnim uslovima ekstrakcije, itd. [15].

Tabele 2 i 3 prikazuju podatke o prinosu i karakteristikama pektinskih polisaharida muskatne tikve ekstrahovanih primenom kiselina. Prinos ovako ekstrahovanog pektina je varirao od 21 do 69 mg/g<sub>SM</sub> sa malim sadržajem GalA (23 – 41%), a velikim sadržajem neutralnih šećera (22,3 – 59,6%) i skroba (12,4 – 37,4%) [29,30,33]. Takođe, kiselo ekstrahovani pektini muskatne tikve su imali niske stepene metoksilacije i acetilacije [30,33].

#### 2.3.2. Enzimska ekstrakcija pektina

Kisela ekstrakcija generiše velike količine otpadnih tokova koje je neophodno adekvatno tretirati pre ispuštanja u životnu sredinu. Za razliku od ovog, konvencionalnog, tipa ekstrakcije, enzimska ekstrakcija je ekološki prihvatljivija tehnika kako zbog netoksičnosti korišćenih enzima, tako i zbog blagih uslova postupka [32,54,55]. Dodatno, odgovarajućim izborom enzima moguće je ekstrahovati pektin bez njegove degradacije, kao i eliminisati koroziju opreme do koje dolazi usled ekstremnih uslova konvencionalne ekstrakcije [15]. Uloga enzima u koraku ekstrakcije pektinskog polisaharida iz biljnog materijala može biti višestruka. Prvenstveno, odgovarajući enzimi hidrolizuju komponente ćelijskog zida (celuloza, hemiceluloza, protein) i na taj način omogućavaju ekstrakciju pektina [11,32]. Sa druge strane, ciljanim izborom enzima moguće je dobiti pektin koji je prečišćeniji od pratećih



jedinjenja koja se mogu ekstrahovati zajedno sa pektinskim polisaharidima (skrob) [56,57]. I konačno, primenom pektinolitičkih enzima koji već u koraku ekstrakcije modifikuju pektin, moguće je dobiti pektine željenih karakteristika [11,58]. Najveći nedostaci ovog tipa ekstrakcije pektina jesu visoka cena enzima, kao i potencijalne poteškoće pri prenošenju enzimskog procesa sa laboratorijskog na industrijski nivo [15].

Enzimi koji u literaturi često pronalaze primenu u ekstrakciji pektinskih polisaharida su celulaze, ksilanaze i hemicelulaze, proteaze i amilaze [15]. Ksilanaze katalizuju hidrolizu ksilana i na ovaj način dovode do razgradnje hemiceluloze koja čini jednu od glavnih komponenti ćelijskog zida biljaka. Celulaze su enzimi koji katalizuju hidrolizu celuloze. Celulaze, ksilanaze i hemicelulaze su korišćene za enzimsku ekstrakciju pektina muskatne tikve [31,32,35]. Proteaze su velika grupa enzima koji katalizuju proteolizu hidrolizom peptidnih veza i korišćene su za ekstrakciju pektina iz korena cikoriije [11]. Amilaze, koje katalizuju hidrolizu skroba, su korišćene za ekstrakciju pektina iz zimske tikve (*Cucurbita mixta*) [56] i krompira [57].

Prinos i karakteristike enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve dostupni u literaturi su dati u tabelama 2 i 3. Pektinski polisaharidi su ekstrahovani dejstvom enzima u podjednakom prinosu kao i u kiselim ekstrakcijama, ali sa većim sadržajem GalA i manjim sadržajem neutralnih šećera [31,32]. Sa DM većim od 50%, enzimski ekstrahovani pektinski polisaharidi muskatne tikve se ubrajaju u VMP, dok im je i DA takođe bio veći nego kod kiselom ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve [31,32]. Molarne mase su bile niže kada su za ekstrakciju korišćeni enzimi nego kada je korišćena kiselina [32,34].

### 2.3.3. Enzimski potpomognuta kisela ekstrakcija

Enzimi se mogu koristiti i u koraku pretretmana biljnog materijala, nakon čega će uslediti korak kisele ekstrakcije pektina. Na ovaj način moguće je povećati ekstrakcioni prinos, kao i smanjiti trajanje same ekstrakcije [15]. Prinos pektina ekstrahovanog iz krompira kiselom ekstrakcijom nakon enzimskog pretretmana je bio veći nego kod samostalne enzimске ili samostalne kisele ekstrakcije [11].

## 2.4. Enzimska modifikacija pektina

Pektinski polisaharidi mogu biti modifikovani fizičkim (ultrazvuk, mikrotalasi, UV zračenje, mikrofluidizacija), hemijskim (kiseline, alkalije, oksidujuća sredstva) ili enzimskim tretmanima u cilju promene njihove strukture, fizičko-hemijskih karakteristika i poboljšanja bioloških svojstava [59–61]. Različiti novi derivati pektina sa ciljano modifikovanim funkcijama privlače veliku pažnju poslednjih godina, prvenstveno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i u biomedicini [60]. Enzimi se često koriste za modifikaciju pektina jer je njihovim dejstvom moguće postići veoma specifične i kontrolisane modifikacije pektinskih polisaharida, što je i njihova najveća prednost u odnosu na fizičke i hemijske tretmane [2,62]. Dodatno, enzimi nisu toksični, koriste se u blagim reakcionim uslovima, mogu imati jako veliku efikasnost u relativno malim koncentracijama i lako je zaustaviti njihovo delovanje inaktivacijom [59].

### 2.4.1. Pektinolitički enzimi

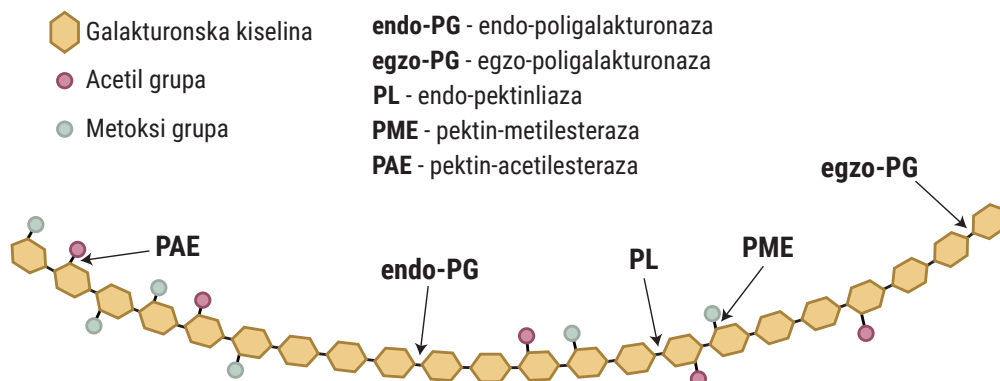
Zbog veoma kompleksne strukture pektina, njegove enzimske modifikacije i degradacije mogu usloviti primenu širokog spektra različitih enzimskih aktivnosti. Pektinolitički enzimi se prema svojoj aktivnosti mogu podeliti na hidrolaze i liaze [63]. U zavisnosti od mesta delovanja u molekulu pektina, pektinolitički enzimi se dele i na one kojima je supstrat homogalakturonan i na one koji deluju na ramnogalakturonan-I. Dodatno, još jedna podela ovih enzima je moguća i na osnovu toga da li katalizuju depolimerizaciju lanaca pektina ili katalizuju deesterifikaciju pektina [64]. Pregled enzima sposobnih da modifikuju pektinske supstance je dat u tabeli 4, a mesto delovanja različitih pektinolitičkih enzima je prikazano na slici 4. Ovi enzimi su široko rasprostranjeni u prirodi, kako u biljkama, tako i u fitopatogenim organizmima [64].

*Tabela 4. Klasifikacija pektinolitičkih enzima (modifikovano prema Bonnin et al. [64])*

Enzimi	EC broj	Supstrat	Proizvod
<b>Depolimerizujuće hidrolaze</b>			
Endo-poligalakturonaza	3.2.1.15	HG – NM pektin	OligoGalA
Egzo-poligalakturonaza	3.2.1.67	HG – NM pektin	GalA
Egzo-poli- $\alpha$ -D-galakturonozidaza	3.2.1.82	HG – NM pektin	GalA2
Ramnogalakturonan-hidrolaza	3.2.1.171	RG	OligoRG
Ramnogalakturonan-ramnohidrolaza	3.2.1.174	RG	Rha
Ramnogalakturonan-galakturonohidrolaza	3.2.1.173	RG	GalA
Arabinogalaktanaza	3.2.1.89	Arabinogalaktan	Oligosaharidi
$\beta$ -galaktozidaza	3.2.1.23	Galakto-oligosaharidi	Galaktoza
Endo-arabinanaza	3.2.1.99	Arabinan	Oligosaharidi
$\alpha$ -L-arabinofuranozidaza	3.2.1.55	Arabino-oligosaharidi	Ara
<b>Liaze</b>			
Endo-pektatliaza	4.2.2.2.	HG	Nezasićen oligoGalA
Egzo-pektatliaza	4.2.2.9	HG	Nezasićen oligoGalA
Endo-petinliaza	4.2.2.10	VMP	Nezasićen oligoGalA
Ramnogalakturonan-liaza	4.2.2.24	RG	Nezasićen oligoRG
<b>Deesterifikujuće hidrolaze</b>			
Pektin-metilesteraza	3.1.1.11	Metoksilovan pektin	Pektin + metanol
Pektin-acetilesteraza	3.1.1.6	Acetilovan pektin	Pektin + sirćetna kiselina
Ramnogalakturonan-acetilesteraza	3.1.1.86	Acetilovan RG	RG + sirćetna kiselina
Feruloil-esteraza	3.1.1.73	Feruloil-oligosaharid	Ferulna kiselina + oligosaharid

Pektinski oligosaharidi dobijeni enzimskim modifikacijama se ističu kao jako dobri prebiotici sa velikim brojem zdravstvenih pogodnosti, uključujući antioksidativna, antiinflamatorna, antibakterijska, antitoksična svojstva, zaštitu krvnih sudova i imunomodulatorno dejstvo [61,65]. Takođe, sa porastom svesti o vezi između zdravlja i izbalansirane ishrane, sve veća pažnja se u prehrambenoj industriji poklanja proizvodnji funkcionalne hrane, sa posebnom pažnjom posvećenom prebionicima [62].

Pektinolitički enzimi se, osim u cilju dobijanja modifikovanih proizvoda poboljšanih svojstava, koriste i za strukturnu karakterizaciju pektinskih polisaharida. Različitim kombinacijama enzima koji depolimerizuju pektin moguće je dobiti monosaharide i oligosaharide koji ga izgrađuju, dok enzimi koji deesterifikuju pektin oslobađaju estarske grupe prisutne u njemu. Na ovaj način dobijene proizvode je moguće kvalitativno i kvantitativno okarakterisati različitim hromatografskim metodima, te na osnovu dobijenih rezultata pretpostaviti strukturni model pektina [66–68].



Slika 4. Mesto delovanja različitih pektinolitičkih enzima na molekulu pektina

#### 2.4.1.1. Endo-poligalakturonaza

Jedan od često korišćenih enzima koji depolimerizuju pektin je endo-poligalakturonaza (ePG) koja katalizuje raskidanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza između molekula GalA u homogalakturonanu. Za razliku od endo-poligalakturonaze, egzo-poligalakturonaza katalizuje raskidanje istih veza, ali je njeno mesto delovanja neredukujući kraj lanca pri čemu dolazi do oslobađanja pojedinačnih molekula GalA. Generalno, ePG ima veći afinitet ka neesterifikovanom supstratu i njegova aktivnost opada sa porastom stepena metoksilacije. Endo-poligalakturonaze napadaju HG lanac nasumično, oslobađajući pri tome oligosaharide različitog stepena polimerizacije [2,69]. Endo-poligalakturonaze su široko rasprostranjene među biljkama, plesnima, kvascima, bakterijama i nekim biljnim parazitima, a najveću primenu su pronašle one fungalnog porekla (*Aspergillus* spp.) [70–72]. U biljnom tkivu, ePG ima ulogu u omekšavanju ploda tokom zrenja [73]. Poligalakturonaze su često korišćene za dobijanje pektinskih oligosaharida manje viskoznosti i manjih molarnih masa, a poboljšanih bioloških svojstava [72,74,75]. ePG je korišćen za degradaciju pektina artičoke, pri čemu su dobijeni pektinski oligosaharidi malih molarnih masa [65]. Pektinski oligosaharidi dobijeni dejstvom ePG iz pektina šećerne repe su imali manju viskoznost i molarnu masu [76], dok su oni dobijeni iz pektina gloga pokazali značajno veću antioksidativnu aktivnost od nemodifikovanih pektina [77].

#### 2.4.1.2. Pektin-metilesteraza

Pektin-metilesteraza (PME) katalizuje hidrolizu estarske veze između GalA i metanola pri čemu ne dolazi do degradacije lanca molekula pektina [78]. Pektin-metilesteraze su prisutne u biljkama, kao i u bakterijama i plesnima koje su biljni patogeni. Mehanizam delovanja PME se razlikuje u zavisnosti od njegovog porekla [70,71]. Biljni PME deesterifikuje pektin u pojedinim delovima polimera, na ovaj način stvarajući segmente lanca koji su demetoksilovani dok drugi segmenti ostaju metoksilovani. Sa druge strane, fungalni PME deluje na nasumična mesta duž lanca pektina [60,69]. Deesterifikujuća

aktivnost PME u biljci učestvuje u metabolizmu ćelijskog zida, uključujući rast ćelija, sazrevanje biljke, starenje i patogenezu [70]. Takođe, ova aktivnost PME ima veliki uticaj na karakteristike deesterifikovanih pektina [78], pa se stoga, između ostalog, koristi za poboljšanje teksture i čvrstoće prehrambenih proizvoda, kao i za bistrenje voćnih sokova [70]. Nakon deesterifikacije dejstvom fungalnog PME, jabučni i citrusni pektini su imali veću viskoznost i formirali su čvršće gelove nego odgovarajući nemodifikovani pektini [79]. Na primeru pektina jabuke i jagode je pokazano da se dejstvom fungalnog PME dobijaju pektini koji imaju poboljšana teksturalna svojstva [80], dok su svojstva zgušnjavanja i emulgovanja komercijalnog citrusnog pektina takođe poboljšana nakon tretmana fungalnim PME [81]. Deesterifikacija glogovog pektina dejstvom PME je rezultirala značajnim povećanjem antioksidativne aktivnosti u odnosu na nemodifikovan pektin [77].

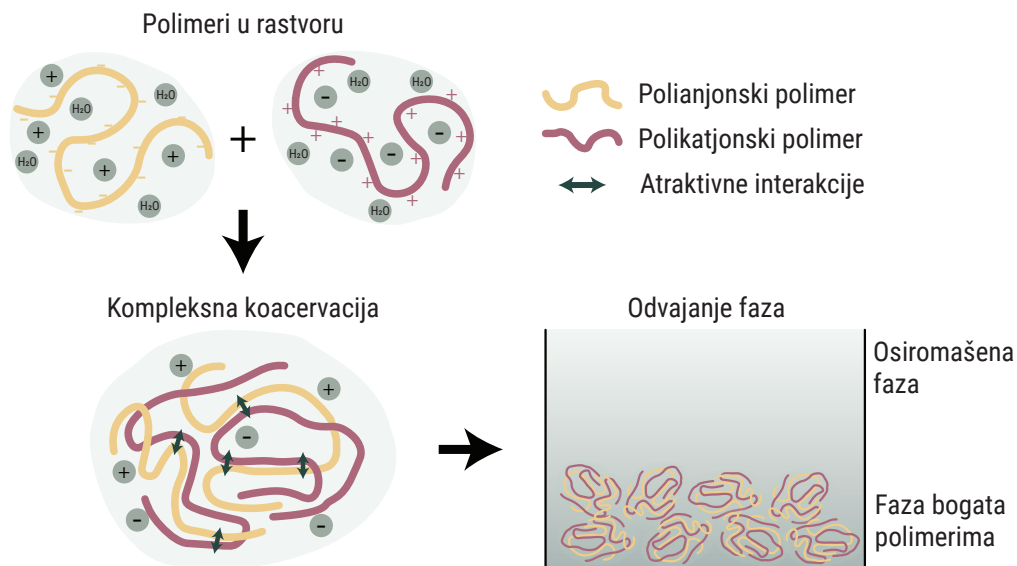
## 2.5. Kompleksna koacervacija

Kompleksni koacervati poslednjih godina izazivaju sve više pažnje kao komponente sposobne da stabilizuju strukturu prehrambenih proizvoda i kao nosači za mikrokapsulaciju, dostavljanje i ciljano otpuštanje različitih (bio)aktivnih jedinjenja (vitamini, prirodne boja, antioksidansi, ulja, probiotici) u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji [9,38,82].

### 2.5.1. Mehanizam kompleksne koacervacije

Prirodni polimeri, polisaharidi i proteini, mogu spontano da stupe u interakcije formirajući na taj način kompleksne višekomponentne i višefazne strukture. Mehanizmi nastajanja ovih kompleksnih struktura su različiti; segregacijom u interakcije stupaju jednako naelektrisani ili neutralni polimeri kada je njihova koncentracija u rastvoru veća od kritične koncentracije tih polimera, dok koacervacijom u interakcije stupaju polimeri (isti ili različiti) usled različitih pokretačkih sila. Kada se u rastvoru nalazi samo jedan polimer i kada dolazi do njegove koacervacije, u pitanju je prosta koacervacija, a kada su u rastvoru prisutni različiti polimeri, reč je o kompleksnoj koacervaciji [38].

Za tipičnu kompleksnu koacervaciju potrebno je prisustvo dva različito naelektrisana polimera: polianjona (nosioci negativnog naelektrisanja) i polikationa (nosioci pozitivnog naelektrisanja), između kojih dolazi do elektrostatičkih interakcija [83,84]. Smatra se da je koacervacija maksimalna kada dolazi do stehiometrijske neutralizacije naelektrisanja [85]. Iako je formiranje kompleksnih koacervata u najvećoj meri posledica elektrostatičkih sila, i druge interakcije mogu biti prisutne, npr. sterne interakcije, vodonične veze, van der Valsove sile i hidrofobne interakcije, koje dodatno definišu fizička svojstva i stabilnost kompleksnih koacervata [38]. Šematski prikaz mehanizma kompleksne koacervacije je dat na slici 5. Uslovi u kojima dolazi do kompleksne koacervacije moraju biti takvi da omogućavaju da se oba polimera u rastvoru nalaze kao suprotno naelektrisani. Inicijalno, struktura formiranih koacervata je oblika sfera koje su jako sklone koalescenciji zbog čega se odvajaju u drugu, težu fazu bogatu polimerima koja je u ravnoteži sa tečnom fazom rastvarača osiromašenog polimerima koja ostaje nakon formiranja koacervata [38,83]. Oba polimera koja ulaze u sastav kompleksnog koacervata su rastvorljiva u korišćenom rastvaraču, ali nakon mešanja njihovih rastvora, vezivanje polimera u veće strukture vodi do formiranja nerastvornih kompleksa i njihovog odvajanja [84]. Tipično je faza koacervata veoma viskozna ili slična gelu iako sadrži i velike količine rastvarača [38].



Slika 5. Šematski prikaz mehanizma kompleksne koacervacije (modifikovano prema Kim et al. [86])

Generalno, proces koacervacije je reverzibilan, i promenom spoljašnjih faktora moguće je disosovati koacervate i vratiti polimere u rastvoreno stanje. Faktori koji utiču na formiranje kompleksnih koacervata zapravo deluju na elektrostatičke interakcije između suprotno naelektrisanih polimera. Kompleksna koacervacija je proces koji zavisi od pH, jonske jačine, hemijskog sastava i molekulske strukture polimera (molarna masa, razgranatost, fleksibilnost, gustina i raspored naelektrisanih grupa), odnosa mešanja polimera, koncentracije polimera i temperature [38,84]. Naelektrisanje grupa prisutnih u molekulu u velikoj meri zavisi od pH; polimeri su pozitivno naelektrisani na pH ispod svoje izoelektrične tačke ( $pI$ ), a negativno naelektrisani na pH iznad  $pI$ . Stoga se promenom pH lako može uticati na formiranje kompleksnih koacervata [83]. Prevelika koncentracija soli može izazvati disocijaciju kompleksnih koacervata do te mere da je pri kritičnoj koncentraciji soli kompleksna koacervacija u potpunosti sprečena [84]. Kada se koacervati pripremaju na visokim temperaturama, hidrofobne interakcije u njima su brojnije, dok se više vodoničnih veza formira na nižim temperaturama [38]. Velike molarne mase korišćenih polimera mogu da stabilizuju oformljene koacervate [84]. Gustina naelektrisanja je takođe bitan faktor jer polimeri sa više naelektrisanih grupa grade brojnije veze sa drugim, suprotno naelektrisanim polimerima [84,85].

### 2.5.2. Kompleksni koacervati pektina

Kao polianjonske komponente kompleksnih koacervata najčešće se koriste polisaharidi, dok su proteini najčešće polikatjonske komponente. Od polisaharida koji se koriste za kompleksnu koacervaciju se u literaturi najčešće izučavaju pektin, alginat, hitozan, skrob, karboksimetil celuloza i guma arabika. Često korišćeni proteini su želatin, ovalbumin, albumin iz goveđeg seruma (BSA), proteini surutke i soje [38].

Pektini se koriste za pripremu kompleksnih koacervata zbog svoje velike strukturne raznolikosti koja utiče na to da se primenom pektina iz različitih izvora mogu dobiti kompleksni koacervati sa različitim karakteristikama i svojstvima [87]. Dodatno, pektini kao dijetetska vlakna povećavaju i nutritivnu vrednost koacervata koji se od njih dobijaju [38]. U tabeli 5 je dat kratak pregled literature

o kompleksnim koacervatima pripremljenim na bazi pektina sa različitim proteinima, kao i njihova svojstva i primene. Najčešće korišćeni pektini za ove svrhe su komercijalni pektini poreklom iz citrusa i jabuke [87].

*Tabela 5. Primeri kompleksnih koacervata pektina, njihova svojstva i primena*

<b>Pektin</b>	<b>Protein</b>	<b>Svojstva/primena</b>	<b>Referenca</b>
Komercijalni citrusni	$\beta$ -laktoglobulin	Povećana viskoznost, struktura slična gelu	[88]
Komercijalni jabučni	Proteinski izolat surutke	Povećana viskoznost, smanjenje viskoznosti sa porastom sile smicanja, struktura slična gelu	[89]
Komercijalni citrusni	Ovalbumin	Struktura slična gelu	[90]
Komercijalni citrusni	BSA	Povećana viskoznost, smanjenje viskoznosti sa porastom sile smicanja, struktura slična gelu	[91]
Komercijalni	Proteinski izolat surutke	Stabilizacija emulzije	[92]
Komercijalni citrusni	Želatin	Inkapsulacija i otpuštanje cinamaldehida	[93]
Komercijalni citrusni	Želatin	Inkapsulacija i otpuštanje antiinflamatornih lekova i antibiotika	[94]
Komercijalni citrusni	Proteinski koncentrat surutke	Inkapsulacija vitamina B <sub>12</sub>	[95]

### 2.5.2.1. Funkcionalna svojstva kompleksnih koacervata pektina

Kompleksni koacervati ispoljavaju poboljšanje nekih funkcionalnih osobina u odnosu na samostalne biopolimere koji ih sačinjavaju [84]. Karakteristično svojstvo kompleksnih koacervata je njihova relativno velika viskoznost i smanjenje viskoznosti sa povećanjem sile smicanja (pseudoplastičnost) [38,84]. Do velike viskoznosti dolazi zbog asocijacije polimera i formiranja većih čestica [84]. Velika viskoznost je izmerena kod koacervata pektina i  $\beta$ -laktoglobulina [88], proteinskih izolata surutke [89] i BSA [91] kao posledica stvaranja kompleksnih struktura. Generalno, kompleksni koacervati se ponašaju kao viskozni fluidi na nižim silama smicanja, dok na višim silama ispoljavaju elastične osobine. Ovo je objašnjeno odvajanjem faza usled primenjene sile smicanja, pri čemu oni prelaze iz homogenog stanja u heterogeni višefazni sistem [84]. Ovakvo ponašanje je zapaženo i kod kompleksnih koacervata pektina i proteinskih izolata surutke [89] i BSA [91]. Kompleksni koacervati mogu da pokazuju viskoznan, viskoelastičan ili elastičan reološki karakter, što u najvećoj meri zavisi od konformacije korišćenog polisaharida [84]. Kompleksni koacervati pektina se sa različitim proteinima ponašaju nalik na gelove (elastičan karakter) [88–91] zbog prisustva relativno linearnih molekula pektina, dok koacervati sa drugim globularnim polisaharidima imaju viskoznan karakter [84].

### 2.5.2.2. Primena kompleksnih koacervata pektina

Zbog svoje specifične strukture, veličine i sastava, kompleksni koacervati imaju niz korisnih funkcionalnih osobina zbog kojih su pronašli primenu u prehrambenoj industriji [84], dok se zbog svoje sposobnosti da inkapsuliraju bioaktivna jedinjenja često koriste u farmaceutskoj industriji [83]. Dodatno, kompleksni koacervati se u poslednjim godinama primenjuju i u biomedicini zbog svoje strukture koja imitira hrskavice, kao nosači za kulture tkiva i kao adhezivi u vlažnim biomedicinskim sredinama [83].

Zbog izmenjenih reoloških svojstava u odnosu na samostalne rastvore polimera koji ih sačinjavaju, kompleksni koacervati se mogu koristiti u prehrambenoj industriji, pri čemu utiču na poboljšanje teksture i stabilizaciju prehrambenih proizvoda [84]. Pokazali su se kao odlični stabilizatori emulzija jer sprečavaju flokulaciju i kaolescenciju kapi [38]. Komercijalni pektin i proteinski izolat surutke su korišćeni za pripremu kompleksnih koacervata koji su pokazali odlično stabilizujuće dejstvo u emulziji, pri čemu je ona bila izuzetno stabilna u kiselim uslovima i otporna na sile smicanja tokom centrifugiranja [92].

Kompleksni koacervati, kao matriksi za inkapsulaciju različitih jedinjenja, su pronašli primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i u medicini [38,83]. Prednosti inkapsulacije se ogledaju u tome da je nju moguće izvesti u rastvoru, u relativno blagim uslovima i da je na ovaj način moguće stabilizovati supstance koje se potom nalaze inkapsulirane u koacervatu. Ovako pripremljeni sistemi su biokompatibilni i mogu se koristiti kao platforma za ciljanu i/ili kontrolisanu dostavu i otpuštanje biološki aktivnih jedinjenja [83]. U prehrambenoj industriji, koacervatima je moguće inkapsulirati i različite arome i ulja, i na ovaj način izbeći probleme nekompatibilnosti sa prehrambenim matriksom, sprečiti neke neželjene interakcije ili stabilizovati labilna jedinjenja. Dodatno, inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja može povećati nutritivnu vrednost prehrambenih proizvoda [38]. Otpuštanje inkapsuliranih supstanci se postiže promenom spoljašnjih uslova, kao što su promene pH, jonske jačine ili dodatak sredstva sposobnog da razgrađuje koacervat (npr. enzimi). Kompleksni koacervati pripremljeni sa pektinom i različitim proteinima su korišćeni za inkapsulaciju i ciljano otpuštanje aroma [93], lekova [94] i vitamina [95].









## 3. Materijal i metodi

### 3.1. Sirovina

Muskatna tikva (*C. moschata*) je kupljena u lokalnoj prodavnici. Tikva je oljuštena i očišćena od semenki, mezokarp je usitnjen i zatim osušen u sušnici na 60 °C do konstantne mase. Tako pripremljen osušen mezokarp muskatne tikve je predstavljao sirovinu za ekstrakcije. Sadržaj vlage u muskatnoj tikvi je određen sušenjem vlažnog, usitnjenog materijala do konstantne mase na 105 °C. Za određivanje ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana u osušenom mezokarpu tikve korišćen je komercijalni komplet za određivanje ukupnih dijetetskih vlakana (*Total dietary fiber kit K-TDFR, Megazyme*) [96].

### 3.2. Enzimi i njihova aktivnost

U enzimskim tretmanima mezokarpa muskatne tikve korišćeni su sledeći komercijalni enzimski preparati: celulaza (*Cellulase complex NS 22086, Cellulosic Ethanol Enzyme Kit, Novozymes*), ksilanaza (NS 22083, *Cellulosic Ethanol Enzyme Kit, Novozymes*), proteaza (*Proteinase K, Qiagen*) i amilaza (*Termamyl SC, Novozymes*). Za enzimске modifikacije ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve korišćene su endo-poligalakturonaza M2 (*Endo-polygalacturonase iz Aspergillus aceleatus, Megazyme*) i pektin-metilesteraza (*NovoShape, Novozymes*).

Celulolitička aktivnost komercijalne celulaze je određena prema opisanoj metodi [97] i iznosila je 340 FPU/mL (3,69 FPU/mg). Aktivnost koja odgovara 1 FPU je definisana kao ona količina enzima koja oslobađa 2 mg redukujućih šećera iz 50 mg filter papira (*Whatman no. 1 filter paper*) za 1 h u standardnim uslovima hidrolize (50 °C, pH 4,8).

Ksilanolitička aktivnost komercijalne ksilanaze je određena kao što je opisano [98] i iznosila je 375 U/mL (3,44 U/mg). Jedna jedinica ksilanolitičke aktivnosti (U) je definisana kao ona količina enzima koja oslobodi 1 mmol ksiloze po 1 minutu u standardnim uslovima hidrolize (50 °C, pH 5,3).

Amilolitička aktivnost komercijalne amilaze prema deklaraciji proizvođača je iznosila 147 KNU/mL. Jedna jedinica amilolitičke aktivnosti (KNU) je definisana kao ona količina enzima koja je potrebna da razgradi 5,26 g skroba za 1 h pri standardnim uslovima (37 °C, pH 7,1).

Proteolitička aktivnost komercijalne proteaze prema deklaraciji proizvođača je iznosila 600 mAU/mL. Aktivnost koja odgovara 1 mAU je definisana kao količina enzima koja može da oslobodi folin-pozitivne amino kiseline i peptide koji odgovaraju 1  $\mu$ mol tirozina po minuti pri standardnim uslovima (37 °C, pH 7,5).

Pektinolitička aktivnost je određena po metodi koju su opisali *Li, Coffman and Ju* [99]. Jedna jedinica pektinolitičke aktivnosti (U) je definisana kao ona količina enzima koja oslobodi 1 mmol galakturonske kiseline iz komercijalnog citrusnog pektina (*Sigma-Aldrich*) po minuti u standardnim uslovima hidrolize (50 °C, pH 5). Pektinolitička aktivnost komercijalne endo-poligalakturonaze je iznosila 5,22 U/mL (71,2 U/mg). Kao sporedna, pektinolitička aktivnost u komercijalnim preparatima celulaze i ksilanaze je iznosila 0,14 U/mL (0,0016 U/mg) i 0,07 U/mL (0,0006 U/mg), redom.

Aktivnost pektin-metilesteraze je određena prema opisanoj metodi [100]. Njena aktivnost u komercijalnom preparatu pektin-metilesteraze je iznosila 1,49 U/mL (0,34 U/mg) dok ova aktivnost nije detektovana kod komercijalne celulaze i ksilanaze. U cilju određivanja prisustva ove aktivnosti u suvoj pulpi muskatne tikve, ona je podvrgnuta koraku ekstrakcije pektin-metilesteraze [101], te je aktivnost određena u sirovom enzimskom ekstraktu. U suvoj pulpi muskatne tikve nije detektovano prisustvo aktivnosti pektin-metilesteraze.

### **3.3. Ekstrakcija pektinskih polisaharida muskatne tikve**

#### **3.3.1. Enzimski tretman pulpe muskatne tikve**

Osušena pulpa muskatne tikve je suspendovana u 0,1 M citratnom puferu pH 5,5 u odnosu 1:20 (m/v) i tretirana komercijalnim enzimima, i to celulazom, ksilanazom i amilazom u cilju određivanja vremenskog toka hidrolize odgovarajućih polisaharida. Primenjene doze enzima i temperature enzimskih tretmana su bile sledeće: celulaza 10 FPU/g i 20 FPU/g suve pulpe na 50 °C, ksilanaza 10 U/g i 20 U/g na 50 °C i amilaza 18 KNU/g i 36 KNU/g na 80 °C. Svi enzimski tretmani su izvedeni u trajanju od 1, 2, 3 i 4 h. Istovremeno, vremenski tok oslobađanja redukujućih šećera je praćen i za eksperiment izveden pod istim uslovima ali bez dodatnih enzima (blanko). Koncentracija redukujućih šećera je određena DNS metodom [102].

#### **3.3.2. Kisela ekstrakcija**

Pektinski polisaharid je ekstrahovan iz sirovine kiselom ekstrakcijom na povišenoj temperaturi - pH destilovane vode je podešen na 1,5 dodatkom HCl i u tom rastvoru je suspendovana osušena pulpa muskatne tikve u odnosu 1:20 (m/v). Ekstrakcija je trajala 2 h u vodenom kupatilu na 80 °C. Pektinski polisaharid dobijen kiselom ekstrakcijom nosio je oznaku K.

#### **3.3.3. Enzimska ekstrakcija**

Osušena pulpa muskatne tikve je prvo suspendovana u 0,1 M citratnom puferu pH 5,5 u odnosu 1:20 (m/v). Zatim je rađen enzimski tretman sirovine sa ciljem enzimске ekstrakcije pektinskih polisaharida u kombinacijama i dozama enzima prikazanim u tabeli 6.

I u tretmanu kombinacijom celulaze i ksilanaze, kao i u kombinaciji ova dva enzima sa proteazom svi enzimi su dodati istovremeno, a enzimska hidroliza je trajala 2 h na 50 °C. U slučaju tretmana kombinacijom celulaze, ksilanaze i amilaze tretman amilazom u trajanju od 2 h na 80 °C je sledio

nakon tretmana ksilanazom i celulazom (2 h, 50 °C), dok je tretman samo amilazom trajao 2 h na 80 °C. Blanko ekstrakcije su izvedene u istom puferu kao enzimske ekstrakcije, u trajanju 2 h i uz isti odnos mešanja suve pulpe i pufera, a na dve različite temperature (50 °C i 80 °C) kako bi se ispratio uticaj samo pufera i zadate temperature na ekstrakciju pektinskih polisaharida bez dodatog enzima. Pektinski polisaharidi dobijeni u blanko ekstrakciji na 50 °C su nosili oznaku B50, a oni ekstrahovani na 80 °C - B80.

Tabela 6. Doze i kombinacije enzima korišćenih u tretmanu muskatne tikve

Enzimski tretman	Enzimi i njihove doze*				Oznaka pektina
	Celulaza 10 FPU/g	Ksilanaza 20 U/g	Proteaza 9 mAU/g	Amilaza 36 KNU/g	
Celulaza i ksilanaza	x	x			XC
Celulaza, ksilanaza i proteaza	x	x	x		XCP
Celulaza, ksilanaza i amilaza	x	x		x	AXC
Amilaza				x	A

\* doze enzima su izražene po g suvog supstrata (pulpa muskatne tikve)

### 3.3.4. Enzimski potpomognuta kisela ekstrakcija

Za izvođenje enzimski potpomognute kisele ekstrakcije, nakon enzimskih procedura opisanih pod poglavljem 3.3.3., pH reakcione smeše je snižen dodatkom HCl do pH 1,5 a kisela ekstrakcija na 80 °C je trajala 2 h. Pektinski polisaharidi dobijeni enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su obeleženi tako što je na oznake enzimski dobijenih pektina dodato +K. Kada je kisela ekstrakcija usledila nakon tretmana celulazom i ksilanazom, pektinski polisaharid je imao oznaku XC+K; nakon tretmana celulazom, ksilanazom i amilazom – AXC+K, i nakon tretman amilazom, oznaka je bila A+K.

### 3.3.5. Izolovanje pektinskih polisaharida muskatne tikve

Nakon ekstrakcije, suspenzija je centrifugirana 10 min na 9000 × g. pH supernatanta je podešen na 3,5 dodatkom NaOH ili HCl. Ekstrakt je taložen tri puta većom zapreminom etanola, a nakon još jednog centrifugiranja, precipitat je rastvoren u destilovanoj vodi i precipitacija etanolom je ponovljena. Precipitat je prvo ispran apsolutnim etanolom i centrifugiran, a zatim dehidriran dietil-etrom. Ovako dehidrirani precipitati su ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi preko noći, i čuvani su u eksikatoru do sledeće primene. Prinos ekstrakcije je izračunat u odnosu na polaznu suhu sirovinu.

## 3.4. Enzimske modifikacije ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Sve enzimske reakcije su izvođene u 0,05 M acetatnom puferu na pH 5 i temperaturi 50 °C. Nakon isteka definisanog vremena, reakcije su prekinute kuvanjem 5 min u ključalom vodenom kupatilu.

Enzimske modifikacije dejstvom endo-poligalakturonaze su izvođenje u 2% rastvoru pektinskog polisaharida u trajanju od 15 i 30 min sa dozom enzima 0,13 U po 1 g supstrata.

Enzimske modifikacije dejstvom pektin-metilesteraze su izvođene u 1% rastvoru pektinskog polisaharida u trajanju od 30 i 60 min, a enzim je doziran u koncentraciji od 0,0125 U po 1 g supstrata.

Za ispitivanje uticaja udruženog dejstva endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze, pektinski polisaharidi su pripremljeni kao 2% rastvori, a enzimi su dodati istovremeno u dozama koje su korišćene u eksperimentima sa pojedinačnim enzimima. Enzimska reakcija je prekinuta nakon 30 minuta.

### 3.5. Priprema kompleksnih koacervata

Kiselo ekstrahovan pektinski polisaharid muskatne tikve, želatin i ovalbumin su rastvoreni u 0,01 M fosfatom puferu pH 7. Koncentracija pektinskog polisaharida u polaznom rastvoru je iznosila 0,5% (m/v) u svim eksperimentima, dok su koncentracije proteina iznosile 0,5%, 1% i 1,5% (m/v). Rastvor pektinskog polisaharida i rastvor proteina su pomešani u jednakim zapreminskim odnosima. Koacervati pripremljeni pri različitim masenim odnosima su obeleženi kao 1:1 (0,5% pektinskog polisaharida i 0,5% proteina), 1:2 (0,5% pektinskog polisaharida i 1,0% proteina) i 1:3 (0,5% pektinskog polisaharida i 1,5% proteina). pH je podešen na optimalnu vrednost za formiranje koacervata dodatkom HCl u kapima uz konstantno mešanje. Kao optimalna vrednost pH je izabrana ona pH gde je zeta potencijal kompleksa jednak nuli. Praćena je zavisnost zeta potencijala od pH i određene su optimalne vrednosti pH za svaki sistem koje su date u tabeli 7. Smeša je ostavljena da se meša u ledenom kupatilu 90 min kako bi se završio proces koacervacije. Nakon toga su koacervati centrifugirani 10 min na  $5000 \times g$  i osušeni na vazduhu. Prinos koacervacije ( $Y_K$ ) je izračunat iz sledeće formule:

$$Y_K (\%) = \frac{m_{SK}}{m_{PP} + m_{protein}} \times 100 \quad (1)$$

gde je  $m_{SK}$  masa suvog koacervata, a  $m_{PP}$  i  $m_{protein}$  mase pektinskog polisaharida i proteina korišćene za pripremu koacervata, redom.

Tabela 7. pH vrednosti na kojima su pripremljeni kompleksni koacervati

Koacervat*	Odnos mešanja*	pH, $\zeta=0^*$	Koacervat**	Odnos mešanja**	pH, $\zeta=0^{**}$
K:Ovalbumin	1:1	2,5	K:Želatin	1:1	3,3
	1:2	3,0		1:2	4,1
	1:3	3,1		1:3	4,4

\* kolone sa koacervatima kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina

\*\* kolone sa koacervatima kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i želatina

### 3.6. Analitički metodi

#### 3.6.1. Određivanje hemijskog sastava

Sadržaj galakturonske kiseline u ekstrahovanim pektinskim polisaharidima je određen metodom sa *m*-hidroksidifenilom [103]. Step en metoksilacije je određen spektrofotometrijski [104] u prethodno deesterifikovanim uzorcima [105]. Step en acetilacije je određen prema ranije opisanom metodu sa gvožđem [106]. Oformljeni mono-, bis- i tris -kompleksi gvožđa (III) su kvantifikovani primenom molarnih ekstinkcionih koeficijenata ( $\epsilon$ ):  $1005 \text{ dm}^3/\text{mol} \times \text{cm}$  (510 nm),  $1650 \text{ dm}^3/\text{mol} \times \text{cm}$  (470 nm) i  $3630 \text{ dm}^3/\text{mol} \times \text{cm}$  (420 nm), redom [107]. Zbir količina sva tri kompleksa je korišćen za izračunavanje stepena acetilacije. Sadržaj proteina je određen metodom po Bradfordu [108] nakon alkalne ekstrakcije proteina iz ispitivanog materijala [109]. Sadržaj skroba je određen pomoću

komercijalnog kompleta za određivanje ukupnog skroba (*Total starch kit K-TSTA, Megazyme*) [110]. Sadržaj fenolnih kiselina vezanih za pektinske polisaharide je određen *Folin-Ciocalteu* reagensom nakon alkalne hidrolize uzoraka pračene ekstrakcijom u dietil-etru [111]. Ferulna kiselina je korišćena kao standard, a rezultati su izraženi kao ekvivalenti ferulne kiseline po 1 g pektinskog polisaharida ( $\mu\text{g FK/g}$ ).

### 3.6.2. Određivanje neutralnih šećera

Neutralni šećeri su određeni nakon dvostruke kisele hidrolize uzoraka [112]. Hidrolizati su analizirani na *Waters* HPLC sistemu (1515 izokraska pumpa i 2414 refraktometrijski detektor, *Waters Corporation*). HPLC tehnika na obrnutim fazama (RP-HPLC) je izvedena na *ZORBAX Carbohydrate Analysis* koloni (*Agilent Technologies*). Protok mobilne faze, smeše acetonitrila i vode (80:20, v/v), je bio podešen na 1 mL/min, a temperatura na 30 °C. Jonoizmenjivačka HPLC tehnika (IEX-HPLC) je izvedena pomoću *Rezex RAM-Carbohydrate Ag+* kolone (*Phenomenex*) sa bidestilovanom vodom kao mobilnom fazom (1 mL/min) i na temperaturi 80 °C. Dobijeni rezultati su obrađeni u *Breeze 2* programu (*Waters Corporation*), a za kalibraciju su korišćeni HPLC standardi monosaharida (L-ramnoza, *Sigma-Aldrich*, D-ksiloz, D-arabinoza, D-manoza, D-glukoza i D-galaktoza, *Supelco Analytical*).

### 3.6.3. Određivanje molarne mase

Molarna masa je određena na *Waters* HPLC sistemu (1515 izokraska pumpa i 2414 refraktometrijski detektor) pomoću gel-permeacione HPLC tehnike (GP-HPLC) na *PL Aquagel-OH mixed M* koloni (*Agilent Technologies*). Temperature kolone i detektora su podešene na 40 °C. Bidestilovana voda je korišćena kao mobilna faza sa protokom 0,8 mL/min. HPLC standardi dekstrana različitih molarnih masa (1, 5, 12, 25, 50, 150, 670 kDa, *Sigma Aldrich*) su korišćeni za kalibraciju, a dobijeni rezultati su obrađeni u programu *Breeze 2* (*Waters Corporation*). Molarne mase su prikazane kao  $M_p$  (molarna masa pika),  $M_w$  (srednja molarna masa po masenoj zastupljenosti) i  $M_n$  (srednja molarna masa po brojnoj zastupljenosti). Disperznost molarne mase ( $\mathcal{D}$ ) je izračunata na sledeći način:

$$\mathcal{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (2)$$

### 3.6.4. *In-vitro* biološka aktivnost i $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuća aktivnost

*In-vitro* antioksidativna aktivnost rastvora pektinskih polisaharida muskatne tikve (5 mg/mL) je određena metodom ABTS testa [113]. Rezultati su predstavljeni kao ekvivalenti troloksa u 100 g pektinskog polisaharida ( $\mu\text{M TE}/100 \text{ g}$ ).

Gvožđe(II)-helirajuća aktivnost je određena prema metodi koju su opisali *Decker and Welch* [114], a rezultati su predstavljeni kao ekvivalenti EDTA u 100 g pektinskog polisaharida ( $\mu\text{M EDTA}/100\text{g}$ ).

### 3.6.5. Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode

Rastvorljivost ekstrahovanih pektinskih polisaharida je određena prema ranije opisanom metodu [115], pri čemu su polisaharid i voda pomešani u odnosu 1:25 (m/v). Kapacitet zadržavanja vode je određen po metodu opisanom u literaturi [115] uz odnos mešanja polisaharida i vode 1:20 (m/v).



### 3.6.6. Određivanje Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze

Za utvrđivanje Mihaelis-Mentenine konstante ( $K_M$ ) endo-poligalakturonaze, koncentracije supstrata (pektinski polisaharidi) su varirane od 1,5 do 30 mg/mL, a enzim je doziran u dve različite koncentracije ( $2,61 \times 10^{-3}$  U/mL i  $6,53 \times 10^{-4}$  U/mL). Enzimska reakcija je trajala 5 min. Koncentracija oslobođene GalA je određena DNS metodom [102].

### 3.6.7. Određivanje zeta potencijala

Zeta potencijal je meren u 0,25% vodenim rastvorima pektinskih polisaharida muskatne tikve kao i u svim formulacijama koacervata koje su pre merenja razblažene 2 puta. Podešavanje pH vrednosti je vršeno dodatkom rastvora NaOH ili HCl u kapima. Za snimanje funkcije zavisnosti zeta potencijala od pH vrednosti na 25 °C korišćen je uređaj *Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments)*. Izoelektične tačke polisaharida su definisane kao one pH vrednosti na kojima je zeta potencijal jednak nuli.

### 3.6.8. Turbidimetrija

Zavisnost zamućenja kompleksa pektinskog polisaharida i proteina od vrednosti pH je određena spektrofotometrijski na 400 nm. Destilovana voda je korišćena kao slepa proba koja odgovara 100% transparentije (T). Mutnoća suspenzije je izražena kao  $100 - \%T$  [116].

### 3.6.9. Reološka merenja

Reološka merenja su vršena na HAAKE *RheoStress 600* instrumentu (*Thermo Electron*) na konstantnoj temperaturi od 25 °C i sa geometrijom pribora  $d = 60$  mm,  $\phi = 1^\circ$ .

Viskoznost rastvora pektinskih polisaharida je određena u 2% vodenim rastvorima, dok su enzimski modifikovani polisaharidi korišćeni bez razblaženja, a krive proticanja su snimljene u opsegu brzine smicanja 10 - 5000 1/s.

Za ispitivanje linearnog viskoelastičnog regiona, merenja su vršena u opsegu od 10 Pa do 1000 Pa, pri konstantnoj brzini smicanja 1 1/s. Suspenzija sa koacervatima je centrifugirana na  $9000 \times g$  u trajanju od 10 min pre merenja i sediment je postavljen direktno na donju ploču reometra.

### 3.6.10. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Strukturna svojstva uzoraka analizirana su na ATR-FTIR uređaju. Svi spektri su snimljeni ALPHA spektrometrom (*Bruker*) u opsegu talasnog broja od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ . Koacervati korišćeni u ovim merenjima su pripremljeni u odnosu 1:1 i osušeni na sobnoj temperaturi.

### 3.6.11. Stabilnost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Stabilnost osušenih koacervata je procenjena u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta u definisanim vremenskim intervalima pod uslovima relevantnim za njihovu potencijalnu primenu. Simulirani želudačni sok (SŽS) je pripremljen od 1,12 g/L KCl, 2 g/L NaCl, 0,11 g/L  $\text{CaCl}_2$  i 0,4 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a pH vrednost mu je podešena na 1,2 dodatkom HCl. Za pripremu simuliranog soka tankog creva (SSC), NaOH je dodan u SŽS rastvor dok nije postignuta pH vrednost 7 [117]. Osušen koacervat i simulirani rastvor su promešani u odnosu 1:50 (m/v). Posle prva 2 h u uslovima želuca, uzorci su dalje podvrgnuti uslovima creva. Eksperimenti su rađeni na laboratorijskoj tresilici (*Thermo-Shaker TS-*

100, Biosan) na 37 °C i 500 o/min. Na svaka 2 h, koacervati su odvojeni od rastvora centrifugiranjem u trajanju od 5 min na 14000 × g i osušeni na sobnoj temperaturi. Masa suvih koacervata je izmerena, a stabilnost koacervata u simuliranim uslovima je izračunata pomoću sledeće formule:

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = \frac{m_0 - m}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

gde je  $m_0$  masa suvog koacervata pre simulacije, a  $m$  masa istog suvog koacervata nakon simulacije. Trajanje simulacije u uslovima želuca je bilo 2 h, dok je simulacija u uslovima creva trajala 8 h.

### 3.6.12. Statistička analiza

Rezultati su statistički obrađeni u *Statistica* programskom paketu (TIBCO Software Inc.). Analiza varijanse (*One-way ANOVA*) je uparena sa *Tukey*-jevim testom (*Tukey's honestly significant difference (HSD) test*) na nivou značajnosti ( $p$ ) < 0,05. Različitim slovima su obeleženi rezultati koji su se prema ovom kriterijumu statistički razlikovali. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja, a svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost sa standardnim odstupanjem.





# 4



## 4. Rezultati i diskusija

Unutar ovog poglavlja biće predstavljeni rezultati ispitivanja različitih protokola ekstrakcije pektinskog polisaharida iz muskatne tikve, kao i potencijala tako izolovanih polisaharida za dobijanje visokovrednih proizvoda. Eksperimenti su koncipirani tako da je prvo okarakterisana sirovina – pulpa muskatne tikve, a zatim su pektinski polisaharidi ekstrahovani različitim tehnikama: kiselom, enzimski potpomognutim kiselim i enzimskim ekstrakcijama. Svi dobijeni pektinski polisaharidi su okarakterisani u pogledu hemijskog sastava, fizičko-hemijskih i strukturnih osobina, kao i funkcionalnih i bioloških svojstava. Zatim su pektinski polisaharidi podvrgnuti enzimskoj modifikaciji u cilju poboljšanja njihovih osobina i svojstava. Konačno, ispitan je potencijal pektinskog polisaharida iz muskatne tikve za pripremu kompleksa sa proteinima uz praćenje interakcija između njih i određivanje svojstava formiranih kompleksa.

### 4.1. Karakterizacija mezokarpa muskatne tikve

Mezokarp muskatne tikve je okarakterisan u pogledu sadržaja vlage, dijetetskih vlakana (ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih), skroba i proteina. Dobijeni rezultati koji su prikazani u tabeli 8 odgovaraju podacima koji se pronalaze u literaturi [20,21,23]. Rastvorljiva dijetetska vlakna čine pektin,  $\beta$ -D-galaktan, glukomanani i galaktomanani, a nerastvorljiva celuloza, hemiceluloza i lignin [24,25]. Iako se ubraja u rastvorljiva vlakna, pektin može sadržati i određenu količinu nerastvorljivih pektinskih supstanci zbog čega se jedan njegov deo može ubrojati u nerastvorljiva dijetetska vlakna [24]. U literaturi se pronalaze podaci o prisustvu celuloze, hemiceluloze, lignina i rastvorljivih glukana u različitim sortama bundeva (*Cucurbita pepo* i *C. maxima*) [27,118,119]. Pektin sa celulozom, hemicelulozom i proteinima gradi kompleksne strukture koje imaju gradivnu ulogu u biljnim tkivima [10,120], dok je skrob rezervna supstanca koja se u tkivu muskatne tikve nalazi u obliku skrobnih granula [121].

Tabela 8. Sadržaj vlage, vlakana, skroba i proteina u mezokarpu muskatne tikve

Vlaga (%, m/m)	Ukupna dijetetska vlakna (mg/g <sub>SM</sub> )	Rastvorljiva dijetetska vlakna (mg/g <sub>SM</sub> )	Nerastvorljiva dijetetska vlakna (mg/g <sub>SM</sub> )	Skrob (mg/g <sub>SM</sub> )	Proteini (mg/g <sub>SM</sub> )
89,2±3,3	279,1±8,4	65,7±12,5	253,6±11,6	84,3±5,8	43,5±1,8

## 4.2. Izolovanje pektinskog polisaharida muskatne tikve

Pektinski polisaharidi su ekstrahovani konvencionalnim metodom kisele ekstrakcije, uz primenu hlorovodonične kiseline za postizanje potrebnog pH, ali i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama, kao i samo enzimskim ekstrakcijama. Enzimi koji su korišćeni za ekstrakciju su bili ksilanaza, celulaza, proteaza i amilaza, a njihov izbor je izvršen na osnovu hemijskog sastava polazne sirovine (tabela 8). Pre primene enzima za ekstrakciju pektinskih polisaharida, praćeno je oslobađanje redukujućih šećera iz pulpe muskatne tikve usled enzimske razgradnje hemijskih struktura u sirovini, radi definisanja optimalne doze enzima i trajanja enzimskog tretmana.

### 4.2.1. Enzimski tretmani pulpe muskatne tikve

Pulpa muskatne tikve je tretirana komercijalnom celulazom, ksilanazom i amilazom u cilju definisanja kombinacije i doza enzima, kao i vremena reakcije koje će omogućiti efikasnu hidrolizu (hemi)celuloze i skroba u muskatnoj tikvi i olakšati ekstrakciju što prečišćenijeg pektinskog polisaharida. Enzimski tretmani su praćeni merenjem oslobođenih redukujućih šećera u definisanim vremenskim intervalima.

#### 4.2.1.1. Tretman celulazom i/ili ksilanazom

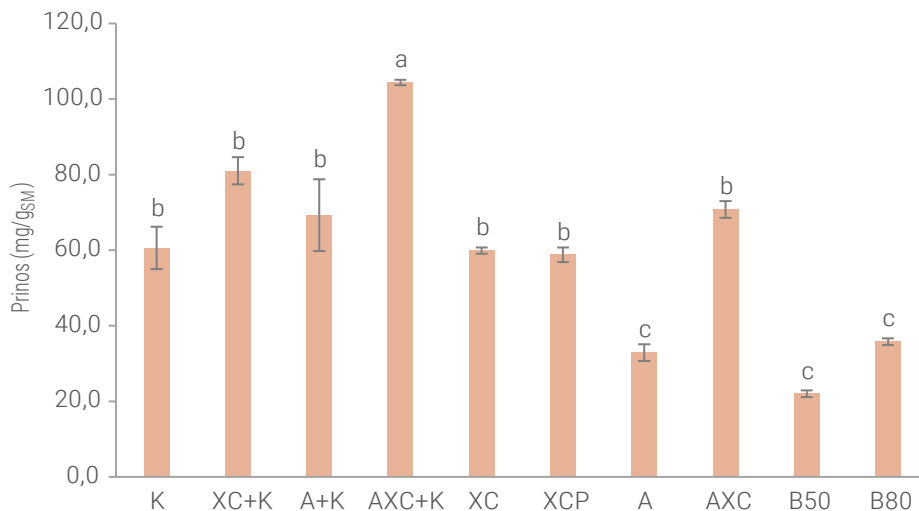
Praćen je uticaj celulaze i ksilanaze na razgradnju (hemi)celuloze u cilju omogućavanja olakšane ekstrakcije pektinskog polisaharida iz muskatne tikve, a enzimi su korišćeni pojedinačno ili u kombinaciji. Vremenski tokovi hidroliza su prikazani na slici P1 (u prilogu). Primenjena individualno, celulaza se generalno pokazala nešto efikasnijom od ksilanaze, oslobađajući veću količinu redukujućih šećera za jednake vremenske intervale. Veću efikasnost enzimskog tretmana celulazom od tretmana hemicelulazom (praćeno merenjem prinosa pektina iz šećerne repe) su dokazali *Abou-Elseoud et al.* [122]. Takođe, kada je primenjena kombinacija oba enzima, dostignuta je najviša koncentracija oslobođenih redukujućih šećera. U literaturi se mogu naći podaci o većoj efikasnosti sinergizma celulaze i ksilanaze nego samostalnih delovanja ovih enzima, određenoj preko prinosa ekstrakcije pektina iz pulpe šećerne repe [122] i opuncije [123]. Iz dobijenih rezultata može se primetiti da nije došlo do promene u koncentraciji oslobođenih šećera nakon 2 h hidrolize mezokarpa muskatne tikve u slučaju simultane akcije dva enzima. Stoga je tretman pulpe muskatne tikve kombinacijom celulaze (10 FPU/g) i ksilanaze (20 U/g) u trajanju od 2 h izabran za enzimima potpomognute kisele i enzimske ekstrakcije sa ciljem eventualnog poboljšanog prinosa pektinskog polisaharida.

#### 4.2.1.2. Tretman amilazom

Pulpa muskatne tikve je tretirana amilazom u cilju razgradnje skroba koji je u značajnoj količini prisutan u njoj (84,3 mg/g<sub>SM</sub>) i može biti ekstrahovan istovremeno sa pektinskim polisaharidom, te može uticati na njegove osobine i svojstva [30]. Amilaza je korišćena u ekstrakcijama pektina iz zimske tikve [56] i krompira [57] za razgradnju skroba prisutnog u ovim sirovinama u cilju dobijanja pektina bez ko-ekstrahovanog skroba. Vremenski tokovi hidroliza su prikazani na slici P2 (u prilogu). Primenjena u dve doze (18 KNU/g i 36 KNU/g), amilaza je oslobađala veću koncentraciju redukujućih šećera za jednake vremenske intervale u većoj dozi. Takođe, uočeno je da nakon prva 2 h hidrolize nije došlo do promena u koncentraciji redukujućih šećera. Na osnovu ovih tokova hidrolize, tretman pulpe muskatne tikve amilazom (36 KNU/g) u trajanju od 2 h je izabran za enzimske i enzimski potpomognute kisele ekstrakcije u cilju dobijanja pektinskih polisaharida muskatne tikve bez istovremene ekstrakcije skroba.

#### 4.2.2. Prinosi ekstrakcija pektinskog polisaharida muskatne tikve

Pektinski polisaharidi su ekstrahovani iz muskatne tikve kiselom ekstrakcijom, enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama i enzimskim ekstrakcijama, te je nakon procedure izdvajanja određen njihov prinos. Dodatno, da bi se sagledao uticaj enzima na prinos, ekstrakcije su izvedene i u puferu bez dodatka enzima. Prinosi ekstrahovanih pektinskih polisaharida su predstavljeni na slici 6.



Slika 6. Prinosi ekstrakcije pektinskog polisaharida iz muskatne tikve

Ekstrahovani pektinski polisaharidi su označeni na sledeći način: kiselom ekstrahovan pektinski polisaharid (K), celulozom i ksilanazom potpomognuto kiselom ekstrahovan (XC+K), amilazom potpomognuto kiselom ekstrahovan (A+K), celulozom, ksilanazom i amilazom potpomognuto kiselom ekstrahovan (AXC+K), celulozom i ksilanazom ekstrahovan (XC), celulozom, ksilanazom i proteazom ekstrahovan (XCP), amilazom ekstrahovan (A), celulozom, ksilanazom i amilazom ekstrahovan (AXC), puferom ekstrahovan na 50 °C (B50) i puferom ekstrahovan na 80 °C (B80) pektinski polisaharid.

Prinos konvencionalne kisele ekstrakcije je iznosio 60,6 mg/g<sub>SM</sub>. Najveći prinos je postignut za AXC+K (104,4 mg/g<sub>SM</sub>), dok je sa druge strane, ekstrakcija amilazom rezultirala najnižim prinosom pektinskog polisaharida (32,9 mg/g<sub>SM</sub>). U dostupnoj literaturi se ne mogu pronaći podaci o kombinovanim enzimskim i kiselim ekstrakcijama pektinskih polisaharida muskatne tikve, ali je na primeru pektina iz krompira i cikorijske dokazano da je moguće dobiti veće prinose pektina kada kiselom ekstrakciji prethodi enzimski tretman celulozom [57], odnosno celulozom i proteazom [11], redom. Generalno, veći uticaj na prinos su imale ksilanaza i celulaza nego amilaza što se ogledalo u većem prinosu XC+K nego A+K i u većim prinosima XC i XCP nego A. Ovo je bilo očekivano s obzirom da ksilanaza i celulaza hidrolizuju polisaharide ćelijskog zida koji su vezani za pektin [120] i na taj način oslobađaju pektinske polisaharide i povećavaju njihov prinos; sa druge strane, amilaza hidrolizuje škrob koji nije vezan za pektin u ćelijskom zidu [121] te stoga samostalan tretman ovim enzimom ne može efikasno da hidrolizuje ćelijski zid i protopektin, već se na ovaj način može ekstrahovati samo lakše dostupan i slabije vezan pektinski polisaharid [124]. Veći prinosi kod AXC+K i AXC u odnosu na XC+K i XC, redom, mogu biti posledica primenjenog protokola za ekstrakciju, a ne dejstva amilaze. Naime, tretman amilazom na 80 °C u trajanju od 2 h je sledio nakon tretmana združenom celulozom i ksilanazom, što bi moglo objasniti povećanje prinosa pektinskog polisaharida usled produženog trajanja ekstrakcije i povišene temperature. Da amilaza ima ulogu samo u razgradnji skroba a ne u povećanju prinosa ekstrahovanog pektina se vidi iz blanko ekstrakcija izvedenih bez prisustva



enzima. B80 je ekstrahovan u većem prinosu nego B50, ukazujući na značaj povišene temperature pri ekstrakciji, što bi isto moglo da objasni i veći prinos A nego B50. Takođe je prinos B80 bio nešto veći (iako ne i statistički značajno) i od prinosa A koji je ekstrahovan u istim uslovima ali uz prisustvo amilaze; ovo bi se moglo objasniti time da usled dejstva amilaze dolazi do razgradnje skroba, te se on ne ekstrahuje zajedno sa pektinom što bi mogao biti slučaj kod B80.

Iz ovih rezultata se može zaključiti da način ekstrakcije ima veliki uticaj na prinos pektinskog polisaharida. Slika 6 pokazuje da je moguće povećati prinos pektinskog polisaharida kada kiseloj ekstrakciji prethodi enzimski tretman ili čak dobiti sličan prinos kada se za ekstrakciju koriste ksilanaza i celulaza (sa dodatkom amilaze ili bez nje) bez naknadnog koraka ekstrakcije sa kiselinom. Na ovaj način je moguće zameniti kiselu ekstrakciju pektina iz muskatne tikve kao ekološki neprihvatljiv proces, enzimskom ekstrakcijom koja predstavlja „zeleniju“ alternativu.

### 4.3. Karakteristike i svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve

Radi lakšeg i jasnijeg sagledavanja rezultata, pektinski polisaharidi su podeljeni u dve grupe prema tome da li je korišćena kiselina pri njihovom izolovanju na: (a) pektinske polisaharide dobijene kiselim ekstrakcijama uključujući i enzimski potpomognute kisele ekstrakcije i (b) pektinske polisaharide dobijene enzimskim ekstrakcijama.

#### 4.3.1. Pektinski polisaharidi dobijeni kiselim ekstrakcijama

Pektinski polisaharidi dobijeni kiselom i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su okarakterisani u pogledu njihovih hemijskih, fizičkih i strukturnih karakteristika, kao i bioloških i funkcionalnih svojstava, u cilju boljeg razumevanja njihove strukture, kao i sagledavanja njihove potencijalne primene.

##### 4.3.1.1. Hemijski sastav pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

Pektinski polisaharidi su okarakterisani u pogledu sadržaja galakturonske kiseline, neutralnih šećera, skroba i proteina, kao i u pogledu njihovog stepena metoksilacije i stepena acetilacije. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Hemijski sastav (g/100 g pektinskog polisaharida), stepen metoksilacije i stepen acetilacije (mol/100 mol GalA) kiselu ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

	K	XC+K	A+K	AXC+K
<b>GalA</b>	29,0±1,4 <sup>c</sup>	68,1±1,1 <sup>b</sup>	84,4±2,9 <sup>a</sup>	78,3±0,6 <sup>a</sup>
<b>Skrob</b>	21,7±0,7 <sup>a</sup>	22,9±1,1 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>
<b>Proteini</b>	8,3±0,5 <sup>a</sup>	2,2±0,1 <sup>bc</sup>	2,8±0,2 <sup>b</sup>	2,0±0,2 <sup>c</sup>
<b>Neutralni šećeri*</b>	57,8±2,4 <sup>a</sup>	32,3±3,1 <sup>b</sup>	17,2±1,0 <sup>c</sup>	23,9±0,4 <sup>bc</sup>
<b>DM</b>	52,0±0,3 <sup>a</sup>	32,6±1,5 <sup>c</sup>	42,4±1,4 <sup>b</sup>	41,1±1,3 <sup>b</sup>
<b>DA</b>	3,9±0,6 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	0,9±0,2 <sup>b</sup>	1,0±0,1 <sup>b</sup>

\* predstavljeni kao zbir pojedinačnih neutralnih šećera (Rha, Xyl, Ara, Man, Glc i Gal) koji su određeni HPLC metodom

Najmanji sadržaj GalA ustanovljen je kod kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida (29 g/100 g) što je u skladu sa podacima koji se pronalaze u literaturi [30]. Značajno veći sadržaj GalA je izmeren u polisaharidima koji su dobijeni enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama, i to najviše kod A+K (84,4 g/100 g). Isto je primećeno i kod pektina iz krompira; naime, sadržaj GalA je bio značajno veći kada je kiseloj ekstrakciji prethodio tretman amilazom nego kod kiselo ekstrahovanog pektina [57]. Dodatno, sadržaj GalA je bio veći i kod pektina iz cikoriije kada je tretman celulazom i proteazom pratila kisela ekstrakcija nego kod kiselo ekstrahovanog pektina [11].

Skrob je bio prisutan u značajnoj količini u K i XC+K (više od 21 g/100 g), što je u skladu sa rezultatima *Fissore et al.* [30] koji su našli da u 100 g kiselo ekstrahovanog pektina muskatne tikve ima 22,9 g skroba. S druge strane, samo 0,2 g skroba/100 g izmereno je u A+K i AXC+K. Ovo je očekivan rezultat, jer je za ekstrakciju uzoraka sa malim sadržajem skroba u enzimskim pretretmanima korišćena amilaza koja razgrađuje skrob prisutan u suvoj pulpi muskatne tikve.

Najveći sadržaj proteina je izmeren u K (8,3 g/100 g) dok je u uzorcima dobijenim enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama izmereno manje od 2,8 g proteina u 100 g polisaharida.

Neutralni šećeri su u značajnoj količini bili prisutni u K (57,8 g/100 g) dok je njihov sadržaj bio najmanji u A+K (17,2 g/100 g). Dobijeni rezultati se slažu sa onima o većem sadržaju neutralnih šećera kod kiselo ekstrahovanog pektina cikoriije nego kod pektina dobijenog iz enzimski potpomognute kisele ekstrakcije, što je objašnjeno mogućom enzimskom hidrolizom bočnih lanaca, sastavljenih uglavnom od neutralnih šećera, tokom ekstrakcije [11].

Najveći stepen metoksilacije je imao K (52 mol/100 mol) što je više od ranije objavljenog stepena metoksilacije (37,3 mol/100 mol) kiselo ekstrahovanog pektinskog vlakna muskatne tikve [30]. Najmanji stepen metoksilacije je primećen kod XC+K (32,6 mol/100 mol). Ovo je u skladu sa manjim stepenom metoksilacije koji su dobili *Panouillé et al.* [11] za pektin koji je ekstrahovan iz cikoriije kada je tretman celulazom i proteazom pratila kisela ekstrakcija nego kada je pektin dobijen samo kiselim ekstrakcijom.

Svi pektinski polisaharidi ekstrahovani različitim protokolima kisele ekstrakcije su imali jako niske stepene acetilacije. Ovi rezultati su u skladu sa niskim vrednostima (3,1 mol/100 mol) koje su objavili *Fissore et al.* [30] za kiselo ekstrahovan pektin iz muskatne tikve.

#### 4.3.1.2. Monosaharidni profil pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

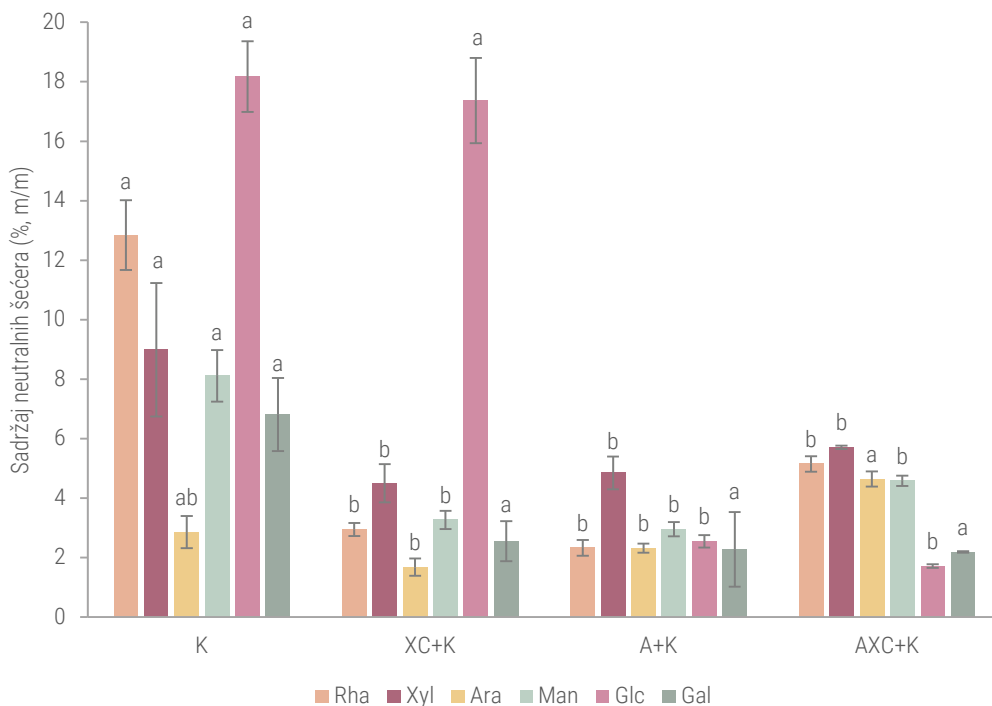
Monosaharidni sastav pektinskih polisaharida je predstavljen na slici 7. Strukturni elementi kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida su dati u tabeli 10 kao sadržaj homogalakturonana, sadržaj ramnogalakturonana-I i procenjena dužina bočnih lanaca na RG-I. Podaci o sastavu neutralnih šećera prisutnih u pektinskim polisaharidima muskatne tikve dostupni u literaturi značajno variraju. Ove razlike se mogu pripisati razlikama u ekstrakcionim metodima, osetljivosti detekcije, zrelosti i uslovima kultivacije biljke [125].

Sadržaj ramnoze se razlikovao među kiselo ekstrahovanim pektinskim polisaharidima. Najviše Rha je određeno kod K dok je ovog monosaharida bilo najmanje u XC+K. Preračunato na strukturne elemente (tabela 10), uzorci sa najvećim sadržajem Rha su očekivano imali i veći udeo RG-I strukturnog domena pri čemu je K imao čak 43,51% RG-I, a tek 14,52% HG, što se slaže i sa rezultatima o niskom sadržaju GalA kod ovog pektinskog polisaharida. Najviše HG (77,93%) i najmanje RG-I (10,44%) je

izračunato u A+K, što je posledica manjeg sadržaja Rha ali i značajno većeg sadržaja GalA. Svi kiselo ekstrahovani pektinski polisaharidi su imali izuzetno kratke bočne lance u RG-I domenu, sa molekulima Rha koji su približno nosili 1 (K, XC+K i AXC+K) ili 2 (A+K) molekula Ara i/ili Gal. Ove vrednosti su nešto niže od dužina bočnih lanaca određenih u kiselo ekstrahovanim pektinima iz različitih sorti bundeve (*C. maxima*), koje su iznosile od 2 do 10 Ara i/ili Gal jedinica [119]. Takođe su dužine bočnih lanaca (izračunate na osnovu podataka u literaturi o sadržaju monosaharida [30]) bile veće i kod kiselo ekstrahovanih pektina iz muskatne tikve; njihova dužina je bila u proseku 2 do 3 jedinice.

Analiza neutralnih šećera je pokazala značajno veći sadržaj glukoze kod polisaharida ekstrahovanih bez primene amilaze, dok je kod polisaharida dobijenih sa amilazom u koraku enzimskog tretmana ovaj monosaharid bio prisutan u manjoj količini. Glukoza je bila prisutna u XC+K i K u iznosima 53,87 g/100 g i 31,49 g/100 g, redom. Ovako visok sadržaj glukoze može biti objašnjen prisustvom velike količine skroba u ovim polisaharidima [30], pošto je već određen sadržaj skroba u njima bio veći od 21%, dok je u ostala dva izolovana polisaharida on bio prisutan u tragovima (0,2%). Ovo bi moglo da ukaže na to da je korak kisele ekstrakcije odgovoran za ko-ekstrakciju skroba koji je prisutan u pulpi muskatne tikve (84,3 mg/g<sub>SM</sub>). Istovremeno izdvajanje pektina i skroba je izbegnuto kada je pri enzimskom tretmanu muskatne tikve korišćena amilaza koja je razgradila skrob, pa je kod A+K i AXC+K sadržaj glukoze bio manji od 14,5 g/100 g iako je nakon ovog tretmana sledila i kisela ekstrakcija.

Niži sadržaji većine monosaharida, osim Glc, kod K i XC+K delimično se mogu dovesti u vezu i sa manjom čistoćom ovih pektinskih polisaharida u odnosu na A+K i AXC+K. Naime, kao što se vidi u tabeli 8, K i XC+K imaju prisutnu veću količinu skroba, a neutralni šećeri su na slici 7 izraženi kao neutralnog šećera u 100 g pektinskog polisaharida (uključujući i skrob u njemu).



Slika 7. Monosaharidni sastav kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Tabela 10. Sadržaj različitih strukturnih domena (%*n*/*n*) u kiselu ekstrahovanim pektinskim polisaharidima i procenjena dužina bočnog lanca u RG-I strukturnom domenu

	K	XC+K	A+K	AXC+K
HG*	14,52	61,82	77,93	67,56
RG-I**	43,51	11,35	10,44	19,19
(Ara+Gal)/Rha***	0,73	1,41	1,98	1,37

\* homogalakturonan = GalA – Rha [126]

\*\* ramnogalakturonan-I = (GalA – HG) + Rha + Ara + Gal [126]

\*\*\* (Ara+Gal)/Rha predstavlja procenu dužine bočnih lanaca na RG-I [119]

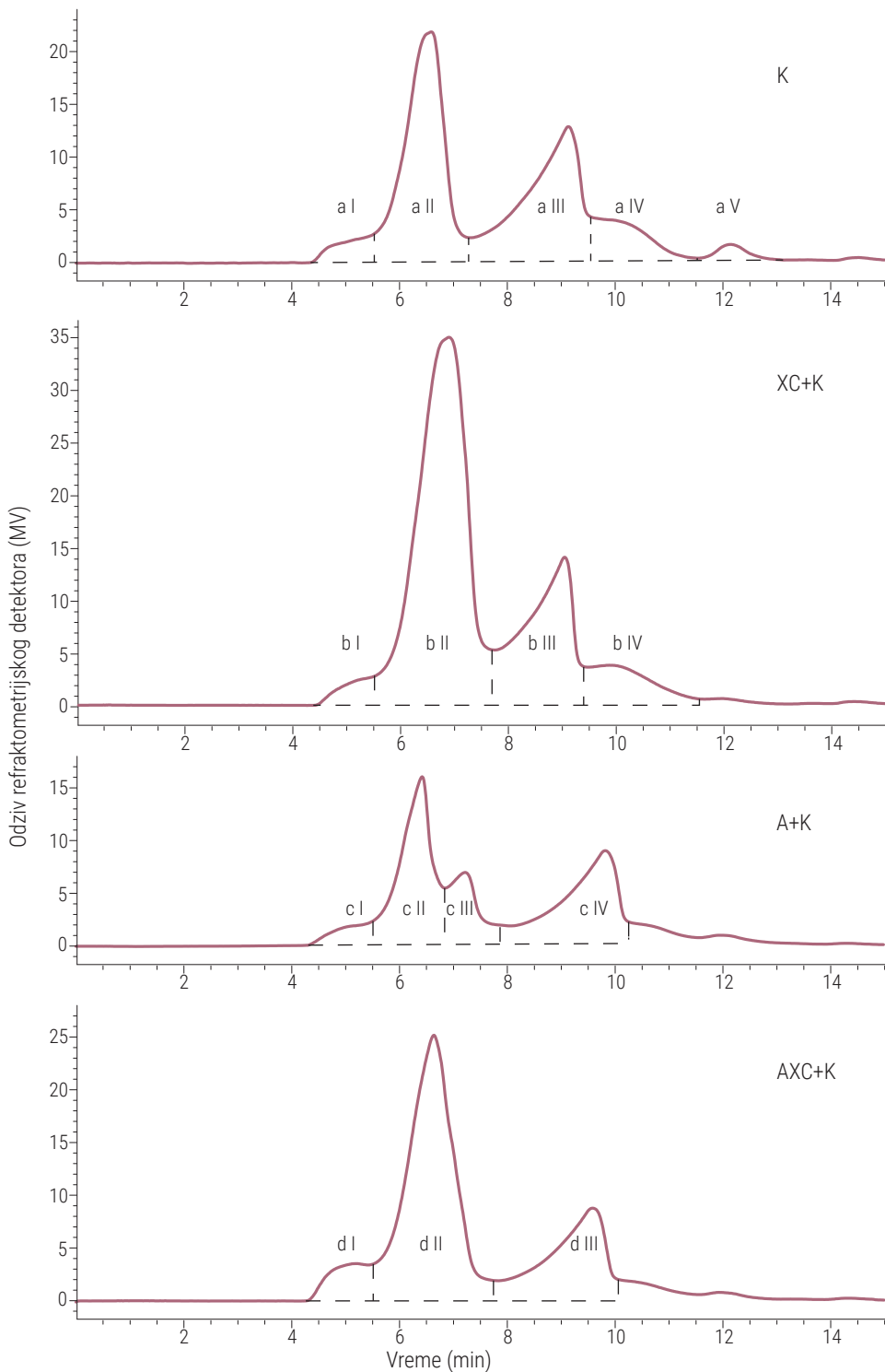
koncentracije neutralnih šećera i GalA su izražene kao broj molova u 100 molova svih šećera (zbir GalA i neutralnih šećera)

#### 4.3.1.3. Molarne mase pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

GP-HPLC hromatogrami pektinskih polisaharida ekstrahovanih kiselom i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su prikazani na slici 8, dok su molarne mase, disperznost i površine identifikovanih frakcija različitih molarnih masa date u tabeli P1 u prilogu.

Svi uzorci su imali ramena na prvom piku (frakcije obeležene sa I na slici 8) sa molarnim masama (Mp) većim od 6000 kDa. Postojanje ovih frakcija izuzetno velike molarne mase je pokazatelj prisustva agregata u uzorcima. Pektinski polisaharidi K i XC+K su imali dve dominantne frakcije - a II i a III, odnosno b II i b III, sa razvlačenjem pika ka nižim molarnim masama (a IV i b IV, redom). XC+K je imao veći udeo frakcije sa velikom molarnom masom (b II) nego K (a II), ali je sama molarna masa frakcije b II bila znatno manja (oko 1500 kDa), u odnosu na onu frakcije a II (oko 2100 kDa). Takođe su i kod AXC+K postojala dva dominantna pika (d II i d III – 1930 kDa i 45 kDa, redom), ali bez značajnog razvlačenja ka manjim molarnim masama, dok je samo kod A+K bilo prisutno rame (c III) molarne mase 558 kDa na piku (c II) molarne mase 2600 kDa. Manje molarne mase frakcija b II (XC+K) i d II (AXC+K) od uporedivih frakcija kod K (a II) i A+K (c II) bi se mogle pripisati sporednoj pektinolitličkoj aktivnosti komercijalne celulaze i ksilanaze (navedeno u poglavlju 3.2) koje su korišćene u koraku enzimskog pretretmana ovih pektinskih polisaharida [11,54]. Kada se uporede hromatogrami A+K i AXC+K sa slike 8, može se primetiti da su retencionna vremena na kojima počinju pikovi c II i d II jednaka (5,5 min), kao i vremena na kojima se završavaju pikovi c III i d II (7,5 min), ali da u istom opsegu postoje 2 definisane frakcije kod A+K, odnosno samo 1 frakcija kod AXC+K. Može se zaključiti da pretretman ksilanazom i celulazom dovodi do ekstrakcije pektinskog polisaharida sa jednom dominantnom frakcijom koja u sebi sadrži polimere visokih molarnih masa i veće disperznosti (1,49 i 1,60 kod XC+K i AXC+K, redom). Sa druge strane, pretretman samo amilazom je za posledicu imao ekstrakciju pektinskog polisaharida sa 2 frakcije manjih disperznosti (oko 1,2) u istom opsegu retencionih vremena. Kod dominantnih frakcija manjih molarnih masa se primećuje trend da je primena amilaze u enzimskom pretretmanu dovela do ekstrakcije pektinskih polisaharida sa manjim molarnim masama u okviru ovih frakcija (31 – 45 kDa) nego što je određeno za K (92,9 kDa) i XC+K (84,8 kDa).

4. Rezultati i diskusija

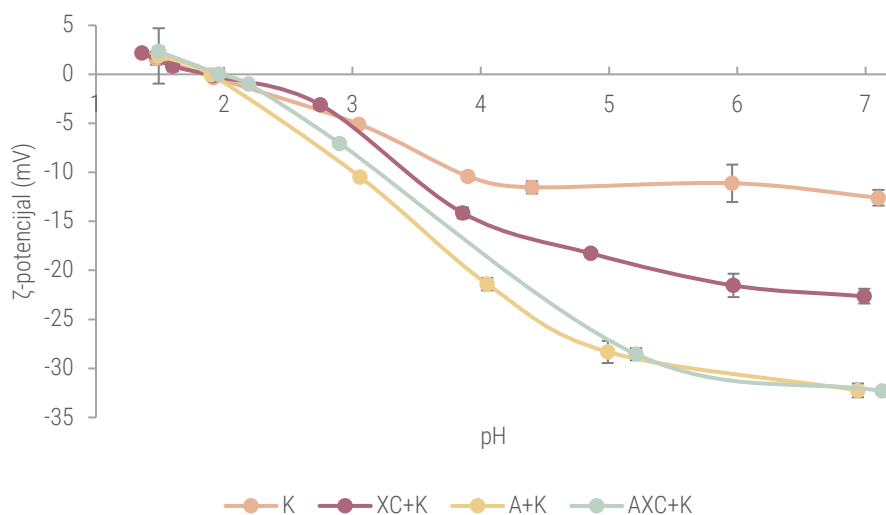


Slika 8. GP-HPLC profili kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Velika molarna masa a II frakcije kod K može biti posledica interakcija ovog pektinskog polisaharida i proteina, što je u skladu sa najvećim sadržajem proteina u ovom uzorku, a razmatrano je od strane *Panouillé et al.* [11]. Sa druge strane, molarne mase pektina zavise i od prostorne konformacije molekula; pektinski molekuli sferičnog oblika imaju prividno manju molarnu masu od molekula koji se u rastvoru nalaze u izduženom, štapićastom obliku. Sferični molekuli u svojoj strukturi imaju više grananja i neutralnih šećera nego štapićasti molekuli većinom sačinjeni od dugačkih linearnih lanaca [127]. Ovo je u skladu sa udelima strukturnih domena HG i RG-I (tabela 10) u XC+K, A+K i AXC+K, gde je A+K sa najviše HG domena (77,93%) u svom sastavu imao i najveću molarnu masu a XC+K sa najmanje HG domena (61,82%) imao i najmanju molekulsku masu od ova 3 pektinska polisaharida. Disperznost frakcija pektinskih polisaharida dobijenih kiselom i enzimski potpomognutim kiselim ekstrahiranjima je bila relativno mala i kretala se u opsegu od 1,2 do 1,9.

#### 4.3.1.4. Naelektrisanje pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrahiranjima

Zeta ( $\zeta$ ) potencijal je izmeren kako bi se odredilo naelektrisanje pektinskih polisaharida i njihova izoelektrična tačka (pI). Zavisnost zeta potencijala od pH je data na slici 9. Svi pektinski polisaharidi su imali negativan zeta potencijal na pH vrednostima većim od 2, sa izoelektričnim tačkama na  $1,78 \pm 0,05$ ,  $1,81 \pm 0,06$ ,  $1,84 \pm 0,04$  i  $1,97 \pm 0,05$  za K, XC+K, A+K i AXC+K, redom. Ove izoelektrične tačke se međusobno statistički nisu razlikovale ( $p > 0,05$ ). Sa druge strane, vrednosti zeta potencijala u ispitivanom opsegu pH se jesu razlikovali. Najveći zeta potencijal su imali A+K i AXC+K, a najmanji K. Ove razlike u zeta potencijalima mogu biti povezane sa razlikama u DM i sadržaju GalA ispitivanih polisaharida. Najniži zeta potencijal je u saglasnosti sa najnižim sadržajem GalA, kao i sa najvećim stepenom metoksilacije kod K. Zeta potencijal je veći ukoliko je u uzorku prisutno više GalA sa što manjim brojem metoksilovanih karboksilnih grupa koje doprinose negativnom naelektrisanju njegovih molekula. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa većim sadržajem GalA i nižim DM kod A+K i AXC+K što je za posledicu imalo veći broj slobodnih karboksilnih grupa koje su nosioci negativnog naelektrisanja.

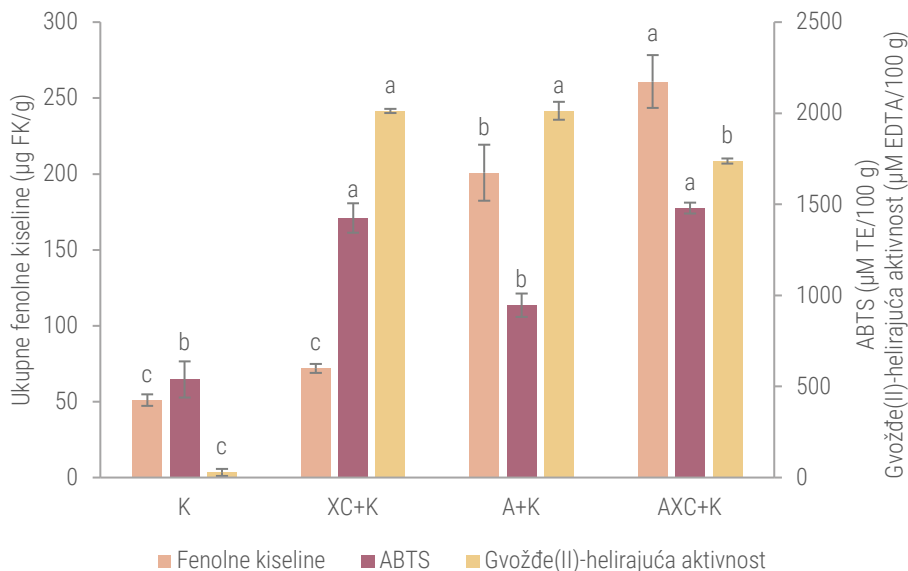


Slika 9. Zeta potencijali kisel ekstrahovanih pektinskih polisaharida



#### 4.3.1.5. Sadržaj ukupnih fenola, *in-vitro* antioksidativna aktivnost i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrahiranjima

Ukupne fenolne kiseline, sposobnost neutralizacije ABTS radikal-katjona i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost kiselom ekstrahiranih pektinskih polisaharida su prikazane na slici 10. Može se zaključiti da je protokol ekstrakcije imao veliki uticaj na sadržaj ukupnih fenola, izraženih kao sadržaj ferulne kiseline, na *in-vitro* antioksidativnu aktivnost i na metal-helirajuću aktivnost pektinskih polisaharida.



Slika 10. Ukupne fenolne kiseline, ABTS i gvožđe(II)-helirajuća aktivnost kiselom ekstrahiranih pektinskih polisaharida

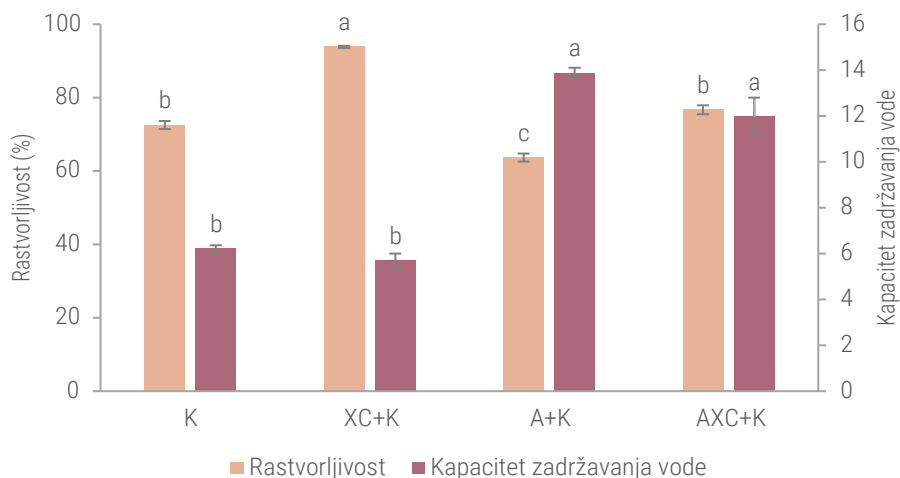
Ferulna kiselina može biti vezana za arabinozu na O-2 poziciji ili za galaktozu na O-6 poziciji u bočnim lancima pektina [2]. Upravo je AXC+K imao najveći sadržaj fenolnih kiselina, što odgovara i najvećem sadržaju Gal i Ara u ovom pektinskom polisaharidu. U skladu sa tim je najniža antioksidativna aktivnost izmjerena kod K u kom je i sadržaj fenolnih kiselina bio najmanji, kao i sadržaj Gal kao potencijalnog mesta za vezivanje fenolnih kiselina. Ovo je u skladu sa podacima u literaturi koji pokazuju da su pektini bogatiji fenolnim kiselinama takođe imali veću antioksidativnu aktivnost [58]. Takođe, visoke antioksidativne aktivnosti su ranije povezane i sa većim sadržajem GalA i nižim DM koji znače da postoji više slobodnih hidroksilnih grupa za neutralizaciju slobodnih radikala [128–130] što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Vezivanje dvovalentnih katjona je uslovljeno sadržajem GalA, DM, kao i dužinom HG lanaca [50]. Naime, više GalA i manji DM znače da u molekulu postoji više neesterifikovanih karboksilnih grupa koje nose negativno naelektrisanje. Ove grupe mogu lako da oforme veze sa pozitivno naelektrisanim dvovalentnim jonima kao što je Fe<sup>2+</sup>. Sa druge strane, što su duži HG lanci u molekulu pektina, veze sa dvovalentnim katjonima su brojnije i jače. Sa slike 10 se vidi da je Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost i te kako zavisila od načina ekstrakcije pektinskog polisaharida. Najmanja aktivnost je primećena kod K, a najveća kod XC+K i A+K, što je u skladu sa njihovim sadržajem GalA i DM. Sa druge strane, najmanji sadržaj HG domena (samo 14,5%) i najmanja helirajuća aktivnost kod K mogu indirektno da ukažu na to da ovaj polisaharid ima i kraće HG lance nego pektinski polisaharidi dobijeni kiselim ekstrahiranjima

nakon enzimskog pretretmana. Naime, pektinski polisaharidi ekstrahovani enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su imali više od 60% HG domena, pri čemu je A+K u svom sastavu imao čak 77% HG domena.

#### 4.3.1.6. Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

Ispitan je uticaj primenjenih protokola kisele ekstrakcije na rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode dobijenih pektinskih polisaharida, a rezultati su prikazani na slici 11. Rastvorljivost je bila najveća kod XC+K (skoro 94%), a najmanja kod A+K (63%). Ovakva rastvorljivost bi se mogla povezati sa molarnim masama dominantne frakcije pektinskih polisaharida (pikovi obeleženi sa II na slici 8). Naime, trend opadanja molarne mase je odgovarao trendu poboljšane rastvorljivosti pektinskih polisaharida, pri čemu je Mw dominantne frakcije bio najveći upravo kod A+K, koji se i najlošije rastvarao, a najmanji kod XC+K, koji je pokazao najbolju rastvorljivost. Prema literaturi, rastvorljivost polisaharida je veća kada je njihova molarna masa manja [131].



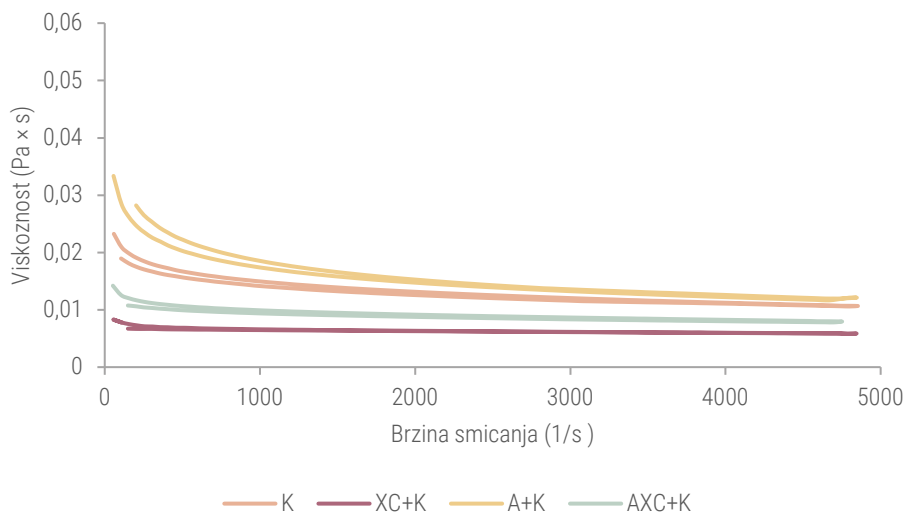
Slika 11. Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode kiselu ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Kapacitet zadržavanja vode definiše količinu vode koja se zadržava u vlaknu bez primene neke spoljašnje sile, osim gravitacione i atmosferskog pritiska, tj. ovaj parametar podrazumeva vodu koja je slabo vezana za vlakno [41]. Pektini koji mogu za sebe da vežu veću količinu vode su značajni u ishrani jer poboljšavaju intestinalnu peristaltiku, a takođe vezuju vlagu u hrani i time sprečavaju isušivanje namirnica i održavaju kvalitet proizvoda [42]. Najveći kapacitet zadržavanja vode je izmeren za A+K, a najmanji za XC+K, što je bilo obrnuto proporcionalno njihovoj rastvorljivosti, a samim tim i molarnim masama njihove dominantne frakcije. Ovo je u skladu sa istraživanjima Huang *et al.* [42]; pektinska vlakna citrusa su pokazala bolje kapacitete zadržavanja vode kada su polimerni molekuli bili veći jer se na njihovoj površini nalazio veći broj dostupnih hidrofilnih grupa sposobnih da vezuju vodu. Dodatno, na istim vlaknima je primećeno da je vezivanje vode bilo u obrnutoj zavisnosti od sadržaja rastvorljive frakcije u njima [42].

#### 4.3.1.7. Viskoznost pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

Reološka svojstva pektinskih polisaharida dobijenih kiselom i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su prikazana na slici 12 kao krive proticanja. Pošto je zavisnost viskoznosti od hemijskog sastava i strukturnih karakteristika veoma kompleksna, nemoguće je povezati je sa samo jednom od karakteristika pektinskih polisaharida. Najveća viskoznost je zapažena kod A+K, dok je kod XC+K viskoznost bila najmanja. Dobijeni trend u viskoznosti se slaže sa trendom koji je zapažen kod molarnih masa - uzorci sa većim molarnim masama su takođe imali veću viskoznost. Direktna veza između molarne mase i viskoznosti je od ranije poznata [46,132]. U slučaju A+K, velika viskoznost bi mogla biti posledica najvećeg sadržaja linearnog HG u ovom pektinskom polisaharidu (77,93%). Poznato je da se polisaharidi lineranih konformacija više opiru proticanju što se ogleda u njihovoj povećanoj viskoznosti [131]. Dodatno, pektini mogu da formiraju komplekse sa proteinima i prisustvo ovakvih kompleksa može da utiče na povećanje viskoznosti [127,133]. Takođe, visok sadržaj RG-I strukturnog domena može za posledicu imati veću viskoznost usled većeg broja međumolekulskih interakcija u ovim strukturama [116,127,133]. Kako je K imao najveći sadržaj proteina i RG-I, moguće je da su za njegovu veliku viskoznost bili odgovorni upravo ovakvi kompleksi. Veća viskoznost kod pektina bogatih RG-I domenom usled brojnih interakcija bočnih lanaca unutar ovog strukturnog domena je primećena i kod pektina iz bamije [134].

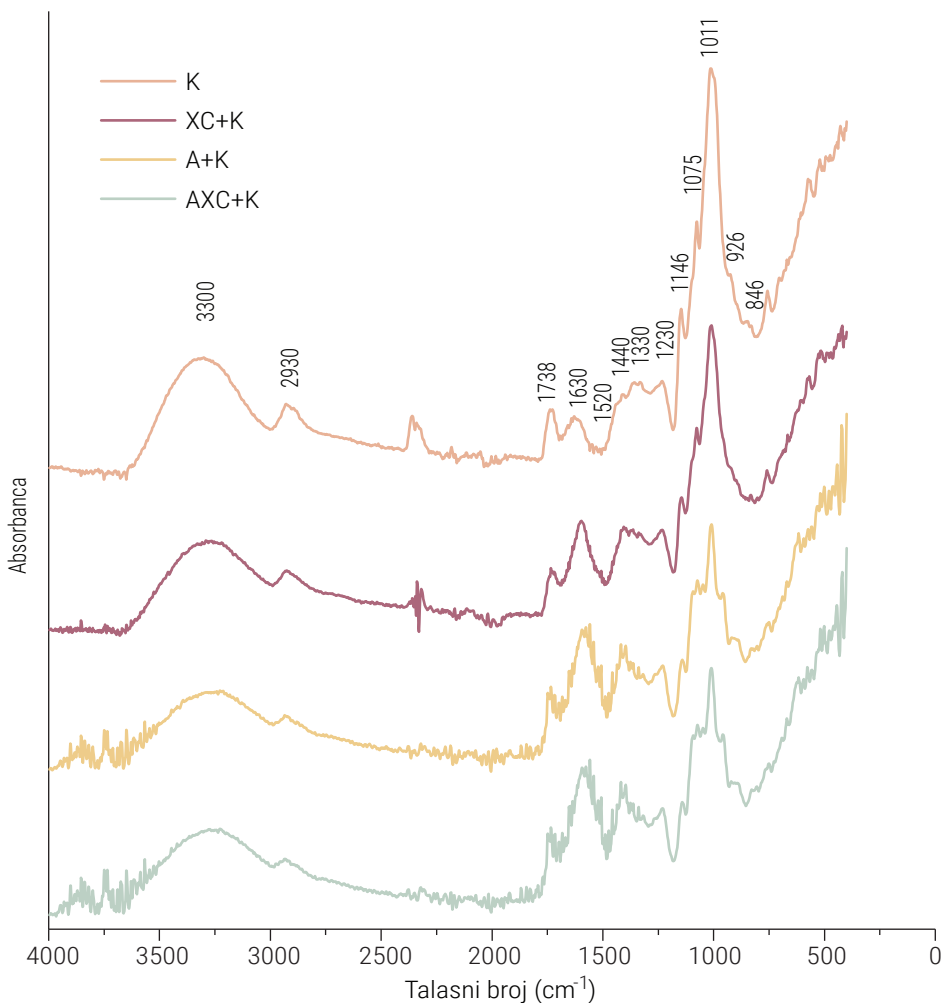
Kod svih kiselu ekstrahovanih polisaharida se zapaža opadanje viskoznosti sa porastom brzine smicanja, što ukazuje na to da su u pitanju pseudoplastični fluidi [135]. Ista osobina je i ranije pripisana kiselu ekstrahovanom pektinu muskatne tikve [30].



Slika 12. Viskoznost kiselu ekstrahovanih pektinskih polisaharida

#### 4.3.1.8. FTIR spektri pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama

FTIR spektroskopija je korišćena kako bi se bolje razumela hemijska struktura ekstrahovanih polisaharida. Analiza spektara (slika 13) je pokazala da se u regionu talasnih brojeva od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $2500\text{ cm}^{-1}$  mogu pronaći dva velika pika prisutna u svim uzorcima. Prvi pik na oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  može poticati od istezanja O-H grupe usled inter- i intramolekulskih vodoničnih veza u skeletu molekula sačinjenog od GalA [34,136]. Drugi pik, na oko  $2930\text{ cm}^{-1}$ , odgovara C-H absorpciji, uključujući savijanje i istezanje u CH, CH<sub>2</sub> i CH<sub>3</sub> grupama [136].



Slika 13. FTIR spektri kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Poznato je da pektinski polisaharidi imaju nekoliko karakterističnih pikova u svojim FTIR spektrima. Kod svih analiziranih uzoraka, pik na  $1740\text{ cm}^{-1}$  se može dovesti u vezu sa istežanjem C=O grupe u metil esterifikovanim kabroksilnim grupama, dok je pik na  $1630\text{ cm}^{-1}$  posledica prisustva neesterifikovanih COO<sup>-</sup> grupa i njihovih vibracija usled istežanja. Iz odnosa intenziteta esterifikovanih i sume esterifikovanih i neesterifikovanih grupa moguće je izračunati stepen metoksilacije pektina [137]. Vrednosti DM izračunate sa FTIR spektara na ovaj način (rezultati nisu prikazani) su odgovarale DM vrednostima određenim pomoću spektrofotometrijske metode (tabela 9). Simetrične vibracije karboksilne grupe u poligalakturonskoj kiselini mogu biti u vezi sa pikom na  $1440\text{ cm}^{-1}$  [137] koji je prisutan kod svih kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Takođe, absorpcioni pik velikog intenziteta na  $1010\text{ cm}^{-1}$ , kao i pik na  $1230\text{ cm}^{-1}$  se povezuju sa visokim sadržajem homogalakturonana u pektinu [138,139], a prisutni su u svim uzorcima. Dodatno, prisustvo pikova u intervalu od  $1200\text{ cm}^{-1}$  do  $1000\text{ cm}^{-1}$  se dovodi u vezu sa istežanjem C-O, C-C i C-O-H, kao i savijanjem C-O-H primećenim na spektrima uzoraka sa dosta skroba u svom sastavu [140]. Stoga, moguće je preklapanje pikova koji vode poreklo od homogalakturonana i skroba, a nalaze se u ovom regionu talasnog broja, što vodi do otežane identifikacije, posebno u slučajevima pektinskog polisaharida koji u svom sastavu imaju

visok sadržaj skroba, kao što su to uzorci K i XC+K. Region talasnog broja ispod  $1500\text{ cm}^{-1}$  predstavlja specifičan region za ugljene hidrate koji je jedinstven za svaki molekul i obično je teško nedvosmisleno ga protumačiti. Pikovi karakteristični za polisaharide se nalaze veoma blizu jedni drugih, često se preklapajući, pri čemu dolazi do problema u identifikaciji [136,139]. Absorpcioni pikovi na  $1330\text{ cm}^{-1}$  i  $1140\text{ cm}^{-1}$  mogu biti pripisani piranoznom prstenu [141] i glikozidnim vezama [139], redom. Sa druge strane, pikovi koji se nalaze u oblasti između  $1045\text{ cm}^{-1}$  i  $1075\text{ cm}^{-1}$  mogu da potiču od neutralnih šećera, kao što su arabinoza, ksiloza i galaktoza [139], dok pikovi na  $926\text{ cm}^{-1}$  i  $846\text{ cm}^{-1}$  mogu biti dodeljeni glukozima i manozima, redom [141]. Navedeni pikovi koji odgovaraju različitim monosaharidima su prisutni kod svih analiziranih pektinskih polisaharida. Pik fenolnih estara na  $1521\text{ cm}^{-1}$  koji odgovara feruloil estaru [34] je prisutan kod A+K i AXC+K. Ovo može da ukazuje na nizak sadržaj fenolnih estara kod K i XC+K, ali visok sadržaj ovih estara kod A+K i AXC+K, što odgovara rezultatima o sadržaju fenolnih kiselina sa slike 10.

#### 4.3.2. Pektinski polisaharidi dobijeni enzimskim ekstrahiranjama

Pektinski polisaharidi dobijeni enzimskim ekstrahiranjama su okarakterisani u pogledu njihovih hemijskih, fizičkih i strukturnih karakteristika, kao i bioloških i funkcionalnih svojstava, u cilju boljeg razumevanja njihove strukture, kao i sagledavanja njihove potencijalne primene.

##### 4.3.2.1. Hemijski sastav pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrahiranjama

Enzimski ekstrahirani pektinski polisaharidi su okarakterisani u pogledu sadržaja galakturonske kiseline, neutralnih šećera, skroba i proteina, kao i u pogledu njihovog stepena metoksilacije i stepena acetilacije. Dobijeni rezultati predstavljani su u tabeli 11.

Tabela 11. Hemijski sastav (g/100 g pektinskog polisaharida), stepen metoksilacije i stepen acetilacije (mol/100 mol GalA) enzimski ekstrahiranih pektinskih polisaharida muskatne tikve

	XC	XCP	A	AXC
<b>GalA</b>	72,2±1,8 <sup>a</sup>	73,4±2,2 <sup>a</sup>	62,9±2,3 <sup>b</sup>	73,5±2,2 <sup>a</sup>
<b>Skrob</b>	0,6±0,0 <sup>b</sup>	1,4±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,1±0,0 <sup>c</sup>
<b>Proteini</b>	4,3±0,0 <sup>a</sup>	2,8±0,1 <sup>c</sup>	3,6±0,1 <sup>b</sup>	2,4±0,1 <sup>d</sup>
<b>Neutralni šećeri*</b>	25,8±1,6 <sup>ab</sup>	23,3±0,6 <sup>b</sup>	33,5±2,6 <sup>a</sup>	27,6±1,0 <sup>ab</sup>
<b>DM</b>	29,2±1,9 <sup>b</sup>	34,4±1,2 <sup>b</sup>	47,3±2,7 <sup>a</sup>	45,7±1,1 <sup>a</sup>
<b>DA</b>	3,1±0,2 <sup>a</sup>	2,5±0,0 <sup>a</sup>	1,0±0,2 <sup>b</sup>	1,3±0,2 <sup>b</sup>

\* predstavljani kao zbir pojedinačnih neutralnih šećera (Rha, Xyl, Ara, Man, Glc i Gal) koji su određeni HPLC metodom

Primena enzima za ekstrakciju pektinskih polisaharida je omogućila ekstrakciju pektinskih polisaharida bogatih GalA. Najviši sadržaj GalA je postignut kada su u ekstrahiranjama korišćene celulaza i ksilanaza (više od 72 g/100 g). Ove vrednosti su bile više od vrednosti koje su prijavili Fissore *et al.* [32] za pektin muskatne tikve ekstrahirani pomoću celulaze (58,8 g/100 g). Pektinski polisaharid A je imao najmanji sadržaj GalA što bi moglo biti objašnjeno time da pri tretmanu pulpe muskatne tikve amilazom ne dolazi do tako efikasne razgradnje ćelijskih struktura, kao što je bio slučaj kod celulaze i ksilanaze, te stoga većina ekstrahiranog A verovatno vodi poreklo iz srednje lamele gde je pektin dostupniji i slabije vezan. Pektini srednje lamele biljaka su sačinjeni većim delom od HG sa određenim udelom RG-I [142]. Amilaza nije hidrolizovala razgranati deo pektinskog polisaharida te je zbog toga A ekstrahirani sa manjim sadržajem GalA, a većim sadržajem neutralnih šećera.

Skrob je u enzimski ekstrahovanim pektinskim vlaknima bio prisutan u izuzetno malim količinama (manje od 1,4 g/100g), a najniže vrednosti su određene kod A i AXC (manje od 0,1 g/100 g), što se može objasniti primenom amilaze pri ekstrakciji ova dva pektinska polisaharida. Nizak sadržaj skroba kod polisaharida ekstrahovanih bez dejstva amilaze bi se možda mogao objasniti uslovima pod kojima su oni ekstrahovani. Naime, relativno niska temperatura (50 °C) verovatno nije bila dovoljna za rastvaranje skroba prisutnog u pulpi muskatne tikve, pa samim tim nije došlo do njegove ko-ekstrakcije, s obzirom da je za bolju rastvorljivost skroba potrebna znatno viša temperatura [143].

Proteini su bili prisutni u enzimski ekstrahovanim polisaharidima u malim količinama. Najmanje proteina je određeno u AXC (2,4 g/100 g), dok je najviše proteina bilo prisutno u XC (4,3 g/100 g). Slične vrednosti (4,5 g/100 g) su objavljene za pektin ekstrahovan iz muskatne tikve dejstvom individualne celulaze [32].

Generalno, sadržaj ukupnih neutralnih šećera je bio viši kada je enzimski tretman podrazumevao upotrebu amilaze. Ovo bi moglo biti posledica ekstrakcije pektinskog polisaharida sa manje hidrolizovanih bočnih lanaca (u slučaju A) ili posledica upotrebe više temperature i dužeg vremena ekstrakcije (kod AXC), što je bilo u skladu sa porastom sadržaja neutralnih šećera u pektinu šećerne repe pri višim temperaturama i dužem trajanju hidrotermalnog tretmana [144]. Dobijene vrednosti kod XC i XCP su odgovarale zbiru ramnoze, arabinoze, ksiloze, manoze, glukoze i galaktoze (22,3 g/100 g) koji su prijavljene za pektin ekstrahovan iz pulpe muskatne tikve pomoću individualne celulaze [32].

Upotreba amilaze za ekstrakciju pektinskih polisaharida je rezultirala višim stepenom metoksilacije (veći od 45 mol/100 mol) nego kod uzoraka kod kojih ovaj enzim nije korišćen (manji od 34 mol/100 mol). DM pektinskih polisaharida dobijenih uz prisustvo amilaze u enzimskoj ekstrakciji je približan vrednosti za pektin dobijen iz zimske tikve (*C. mixta*) nakon dejstva celulaze i amilaze, koji je iznosio 47,3% [56].

Određen stepen acetilacije svih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida je bio veoma nizak. *Fissore et al.* [31] su dobili nešto veće vrednosti DA za pektin iz muskatne tikve ekstrahovan pomoću hemicelulaze ili pomoću celulaze (12,5% i 13,5%, redom), kao i *Cui and Chang* [56] koji su prijavili DA 6,9% za pektin iz tikve (*C. mixta*) ekstrahovan pomoću amilaze i celulaze. Nešto manji DA kod A i AXC, nego kod XC i XCP može biti posledica izloženosti višoj temperaturi pri tretmanu amilazom (80 °C) koja dovodi do deacetilacije, kao što je objašnjeno kod hidrotermalne ekstrakcije pektina iz šećerne repe [144].

#### 4.3.2.2. Monosaharidni profili pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

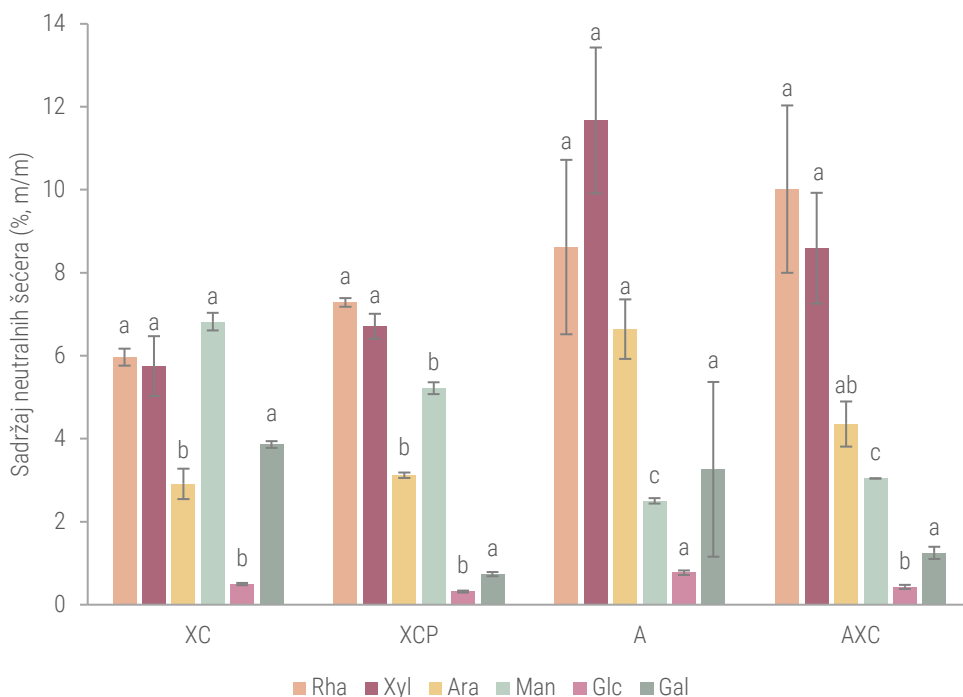
Monosaharidni sastav enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida je određen hromatografski i prikazan na slici 14, dok su strukturni elementi dati u tabeli 12 kao sadržaj homogalakturonana, sadržaj ramnogalakturonana-I i procena dužine bočnih lanaca na RG-I. Sadržaj različitih neutralnih šećera je među ovim uzorcima bio dosta sličan, sa statistički značajnim razlikama u svega par slučajeva.

Sadržaj ramnoze u enzimski ekstrahovanim pektinskim polisaharidima je varirao od 6 do 10%, a prisustvo ovog šećera, prema *Fissore et al.* [32], ukazuje na postojanje RG-I strukturnog domena u ovim uzorcima. Sadržaj ksiloze je bio nešto viši u A za čije dobijanje nije korišćena ksilanaza koja razgrađuje ksilan, te je moguće da je deo ksiloze u ovom uzorku poticao upravo od nehidrolizovanih ksilanskih struktura. Manji sadržaj ksiloze u pektinu iz muskatne tikve su prijavili i *Fissore et al.* [32]



kada je u enzimskoj ekstrakciji korišćena samo hemicelulaza, nego kada je korišćena individualna celulaza. Koncentracije arabinoze su bile nešto veće, a manoze nešto manje kada je u ekstrakciji korišćena amilaza, nego kod XC i XCP. Ovo bi mogla biti posledica primenjene povišene temperature u koraku tretmana sirovine amilazom. Upravo su *Pińkowska et al.* [144] primetili porast koncentracije arabinoze sa povećavanjem temperature pri hidrotermalnoj ekstrakciji pektina iz šećerne repe. Sadržaj glukoze kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida je bio veoma nizak što se može dovesti u vezu sa niskim sadržajem skroba kod njih [30].

XC i XCP su bili gotovo identični u pogledu sadržaja HG (63%), RG-I (21%) i prosečne dužine bočnih lanaca u RG-I domenu. Ovo bi moglo da ukaže na to da primena proteaze u enzimskoj ekstrakciji pektina nema značajan uticaj na samu strukturu pektinskih frakcija ekstrahovanog pektinskog polisaharida. Sa druge strane, postojala je međusobna razlika između A i AXC, pri čemu je A imao više RG-I a manje HG u svojoj strukturi, a oba ova uzorka su se razlikovala od pektinskih polisaharida dobijenih bez primene amilaze. Naime, kada je u ekstrakciji korišćena amilaza, dobijeni pektinski polisaharidi su bili siromašniji HG domenom, a bogatiji RG-I strukturnim domenom. Kod svih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida su bočni lanci vezani za RG-I bili izuzetno kratki; u proseku su se bočni lanci sastojali samo od 1 molekula Ara ili Gal. Ova dužina je malo kraća od prosečnih dužina bočnih lanaca koje se mogu izračunati (na osnovu podataka u literaturi o sadržaju monosaharida [32]) za pektine muskatne tikve ekstrahovane individualnom celulazom (2 molekula Ara i/ili Gal) i individualnom hemicelulazom (4 molekula Ara i/ili Gal).



Slika 14. Monosaharidni sastav enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Tabela 12. Sadržaj različitih strukturnih domena (%*, n/n*) u enzimski ekstrahovanim pektinskim polisaharidima i procenjena dužina bočnog lanca u RG-I strukturnom domenu

	XC	XCP	A	AXC
<b>HG*</b>	63,56	63,84	50,77	57,53
<b>RG-I**</b>	21,49	21,74	31,29	28,61
<b>(Ara+Gal)/Rha***</b>	1,12	0,56	1,19	0,59

\* homogalakturonan = GalA – Rha [126]

\*\* ramnogalakturonan-I = (GalA – HG) + Rha + Ara + Gal [126]

\*\*\* (Ara+Gal)/Rha predstavlja procenu dužine bočnih lanaca [119]

konzentracije neutralnih šećera i GalA su izražene kao broj molova u 100 molova svih šećera (zbir GalA i neutralnih šećera)

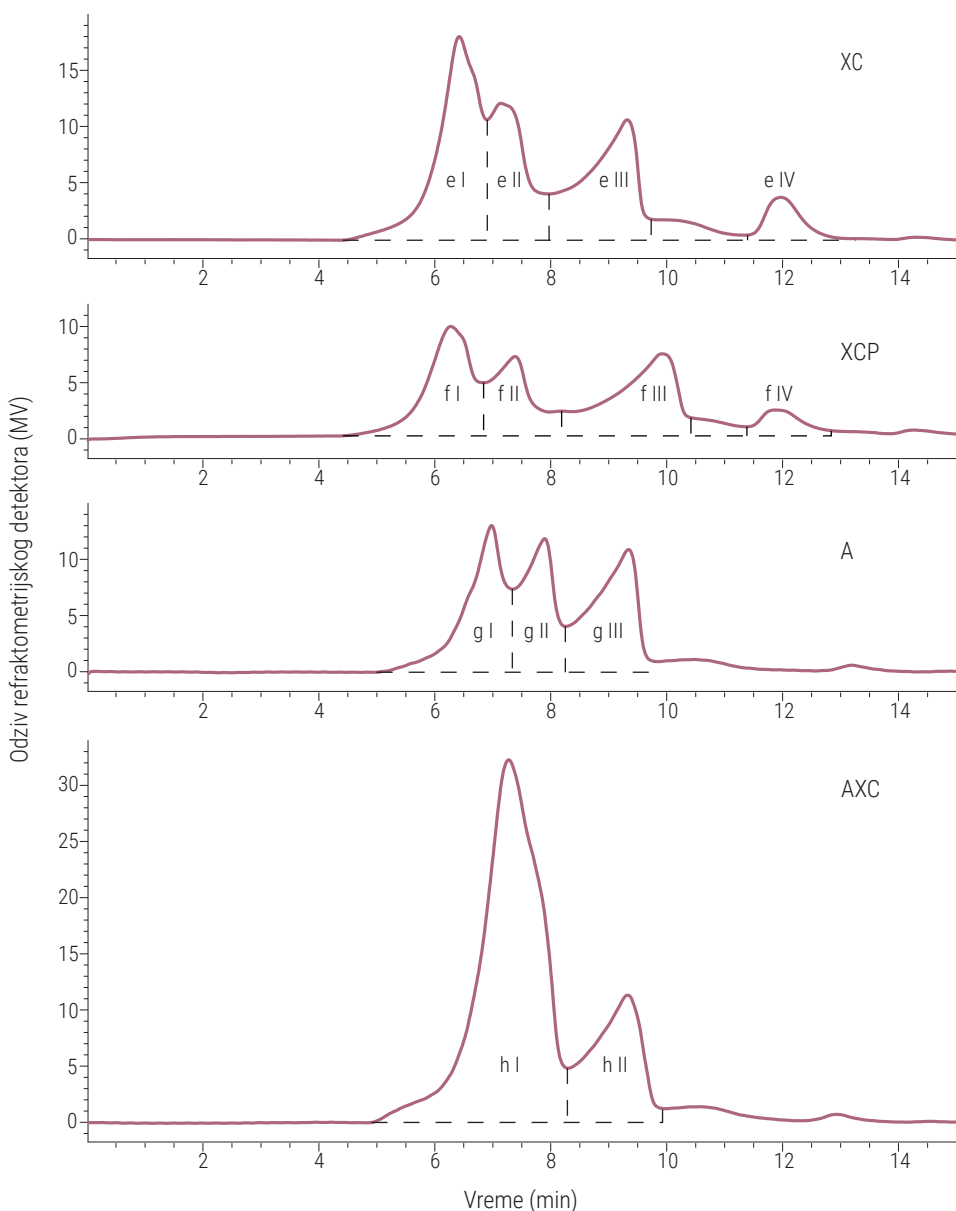
#### 4.3.2.3. Molarne mase pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

GP-HPLC hromatogrami pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama su prikazani na slici 15, dok su molarne mase, disperznost i površine identifikovanih frakcija date u tabeli P2 u prilogu.

Primena različitih enzima u ekstrakciji je dovela do izdvajanja pektinskih polisaharida sa različitim GP-HPLC profilima. Kod XC i XCP su se mogli identifikovati 3 dominantna i četvrti, manji pik koji je odgovarao malim molarnim masama (oko 500 Da što odgovara molarnoj masi disaharida ili trisaharida). Uzorak A je imao 3 pika bez frakcije na jako niskim molarnim masama, dok je profil AXC bio drugačiji od ostalih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, sa samo 2 jasno definisane frakcije.

Najveća molarna masa I pika je određena za XCP (f I: 3080 kDa), dok je nešto manja bila kod XC (e I: 2718 kDa). Molarne mase prvih frakcija kod A i AXC su bile uočljivo niže - 1360 kDa i 894 kDa, redom. Drugi pikovi kod XC i XCP (e II i f II, redom) su imali približne molarne mase (oko 500 kDa), dok je treća frakcija kod XC (e III) imala veću molarnu masu nego uporediva frakcija kod XCP (f III), 60 kDa i 28 kDa, redom. A je imao drugu (g II) i treću (g III) frakciju manjih molarnih masa nego uporedive frakcije kod XC, i to 267 kDa i 45 kDa, redom. Prva frakcija kod AXC (h I) je imala molarnu masu manju od one koju su imale frakcije ostalih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida s kojima se mogla porediti prema redosledu eluiranja, dok je njegova druga frakcija (h II) bila jednaka molarnoj masi treće frakcije A (g III), oko 43 kDa.

Generalno, upotreba amilaze je prouzrokovala ekstrakciju pektinskih polisaharida nižih molarnih masa nego upotreba ksilanaze, celulaze i proteaze. Više molarne mase kod XC i XCP nego kod A i AXC bi se mogle dovesti u vezu sa prostornom geometrijom molekula pektinskih polisaharida. Od ranije je poznato da molekuli sa razgranatom strukturom imaju više sferičan oblik molekula te je njihova molarna masa prividno manja od molekula koji su štapičastog oblika zbog prisustva dužih linearnih lanaca [127]. U skladu sa tim, pošto su XC i XCP imali veći sadržaj HG, a manji sadržaj RG-I u svom sastavu, moglo se očekivati da njihova molarna masa bude (prividno) veća nego kod A i AXC. Vrednosti disperznosti svih molekulskih frakcija enzimski dobijenih pektinskih polisaharida su bile relativno niske (1,1 – 2,0).

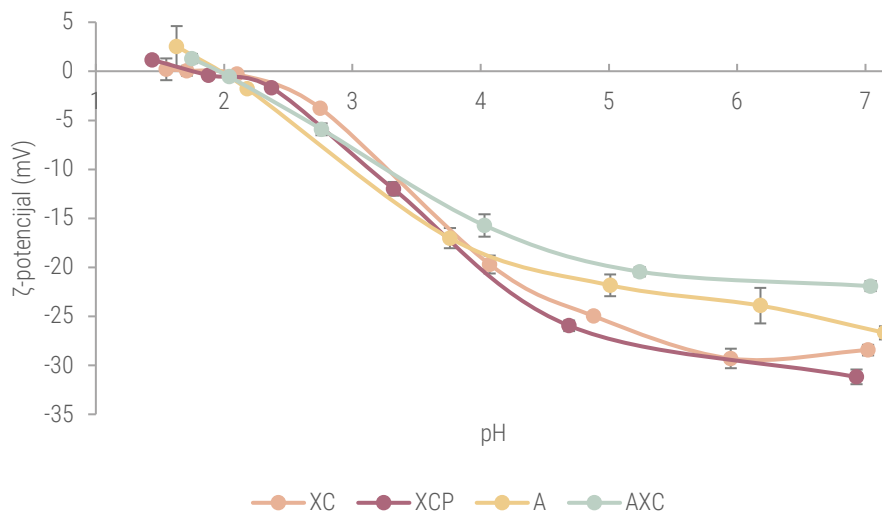


Slika 15. GP-HPLC profili enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

#### 4.3.2.4. Naelektrisanje pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

Izoelektrične tačke i površinsko naelektrisanje enzimski ekstrahovanih polisaharida su određeni merenjem zeta potencijala koji je predstavljen na slici 16 kao zavisnost od pH vrednosti. Svi ispitivani polisaharidi su imali negativan zeta potencijal na pH većim od 2. Između izoelektričnih tačaka nije postojala statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) i one su iznosile  $1,73 \pm 0,04$ ,  $1,77 \pm 0,03$ ,  $1,89 \pm 0,14$  i  $1,95 \pm 0,02$  za XC, XCP, A i AXC, redom. Međutim, razlike između naelektrisanja različitih polisaharida su bile primetne. Najveće negativno naelektrisanje je izmereno kod XC i XCP što je bilo u skladu sa

visokim sadržajem GalA i niskim sadržajem metoksilovanih karboksilnih grupa, odnosno velikim brojem slobodnih grupa koje nose negativno naelektrisanje. Suprotno tome, A i AXC su bili manje negativno naelektrisani usled nižeg sadržaja GalA i većeg DM.



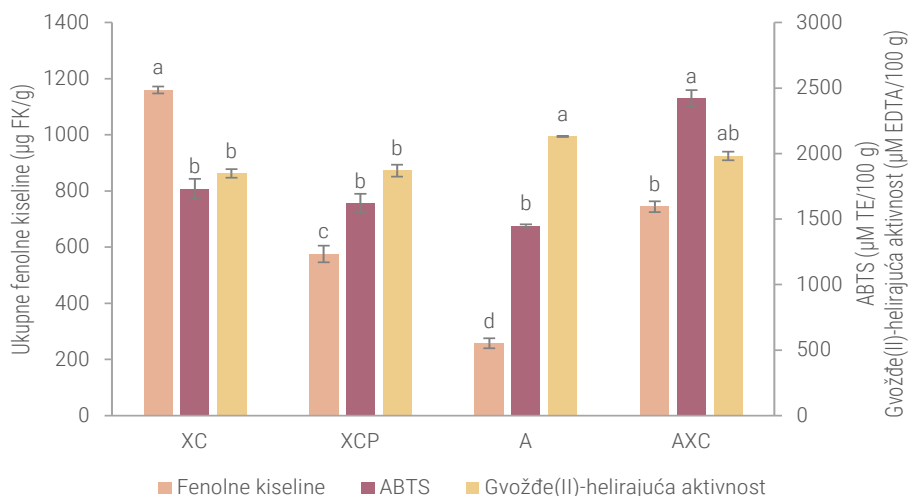
Slika 16. Zeta potencijali enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

#### 4.3.2.5. Sadržaj ukupnih fenola, *in-vitro* antioksidativna aktivnost i metal helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

Na slici 17 su prikazani sadržaj ukupnih fenola, *in-vitro* antioksidativna aktivnost određena ABTS testom i  $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuća aktivnost enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Primena različitih enzima u cilju ekstrakcije ovih polisaharida je rezultirala razlikama u pogledu njihovih navedenih svojstava.

Najviše ukupnih fenolnih jedinjenja, izraženih kao sadržaj ferulne kiseline, je određeno u XC a skoro 5 puta manje u A. U molekulu pektina se ferulna kiselina može pronaći u bočnim lancima vezana za O-2 poziciju na molekulu Ara kao i za O-6 poziciju na molekulu Gal [2]. Iako je A imao najveći zbir ova dva neutralna šećera (9,9%), najmanji sadržaj ukupnih fenola u ovom pektinskom polisaharidu bi upravo mogao biti posledica neefikasne razgradnje ćelijskog zida pri ovom tretmanu, koja se ogledala i u najnižem prinosu (slika 6). Naime, ferulna kiselina se u biljnom materijalu nalazi kao slobodna i kao vezana za polisaharide unutar ćelijskog zida [145], s tim da se značajno veća količina nalazi upravo u vezanom obliku [146,147]. Stoga je moguće da su pri tretmanima celulazom i ksilanazom, usled značajno efikasnije hidrolize ćelijskog zida, dobijeni pektinski polisaharidi bogatiji vezanim ferulnim kiselinama. Sadržaj fenola kod XC, XCP i AXC je bio u skladu sa zbirom Gal i Ara kod njih. Visoke antioksidativne aktivnosti, predstavljene kao ekvivalenti troloksa, su izmerene kod svih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Najveća antioksidativna aktivnost je primećena kod AXC a najmanja kod A. Antioksidativna aktivnost je bila veća kod pektina koji su imali veći sadržaj GalA, manji DM, veći sadržaj fenolnih jedinjenja i manju molaranu masu [55,128–130]. Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima za pektinske polisaharide muskatne tikve dobijene iz enzimskih ekstrakcija u pogledu najvećeg sadržaja GalA, niskog DM i najmanje molarne mase kod AXC, kao i najmanjeg sadržaja GalA, najvećeg DM i najmanjeg sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja kod A.

Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost je bila gotovo podjednaka za sve enzimski ekstrahovane pektinske polisaharide, pri čemu je najveća aktivnost izmerena kod A. Kako je vezivanje divalentnih jona uslovljeno visokim sadržajem GalA i niskim DM, očekivano bi bilo da najveću Fe<sup>2+</sup>-helirajuću aktivnost ima XC, što nije bio slučaj. *Celus et al.* [50] su diskutovali da na vezivanje divalentnih jona, pored očiglednih faktora kao što su sadržaj GalA i DM, utiču i drugi parametri. Neki od njih su fizička raspodela metoksilovanih GalA molekula unutar molekula pektina (da li su grupisani u jednom delu lanca, da li su naizmenični ili nasumični), DA, kao i prisustvo različitih neutralnih šećera u bočnim lancima. Stoga je jasno da je zavisnost Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti od strukture pektinskih polisaharida kompleksna, što bi moglo da bude objašnjenje za rezultate prikazane na slici 17.



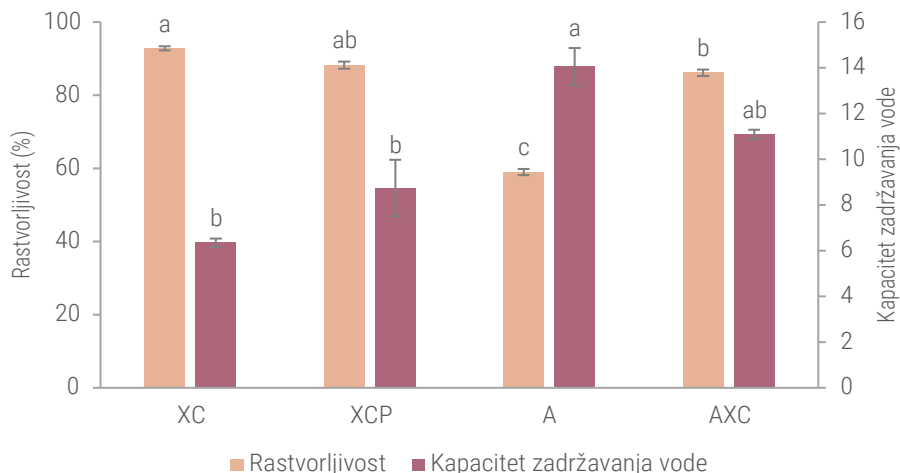
Slika 17. Ukupne fenolne kiseline, ABTS i gvožđe(II)-helirajuća aktivnost enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

#### 4.3.2.6. Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrahiranjima

Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida su prikazani na slici 18. Rastvorljivost je bila najveća kod XC (skoro 93%), a najmanja kod A (oko 59%). Generalno su se bolje rastvarali pektinski polisaharidi kod kojih se u enzimskom tretmanu nije koristila amilaza (XC i XCP), nego oni kod je ovaj enzim primenjen (A i AXC). Ovo nije bilo u skladu sa vrednostima Mw dominantne frakcije; naime, molarna masa pektinskih polisaharida XC i XCP je bila veća od one određene za A i AXC. Ali, sa druge strane, na rastvorljivost pektina u vodi može da utiče i gustina površinskog naelektrisanja, povećavajući rastvorljivost usled prisustva većeg broja naelektrisanih grupa u molekulu koje onemogućavaju stvaranje međumolekulskih veza zbog elektrostatičkog odbijanja istoimenih naelektrisanja [131]. Rastvorljivost prikazana na slici 18 je bila u skladu sa naelektrisanjem procenjenim pomoću merenja zeta potencijala (slika 16). Sa više naelektrisanih grupa u svojim molekulima, XC i XCP su imali bolju rastvorljivost od A i AXC.

Kapacitet zadržavanja vode je značajano merilo sposobnosti pektina da za sebe veže vodu i na taj način poveća svoju zapreminu [41]. Trend opadanja vrednosti kapaciteta zadržavanja vode je odgovarao trendu porasta rastvorljivosti enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida; najveći kapacitet je određen kod A, a najmanji kod XC. Slično je prijavljeno u literaturi za pektinska vlakna citrusa, naime kapacitet zadržavanja vode je bio obrnuto proporcionalan sadržaju rastvorljivih

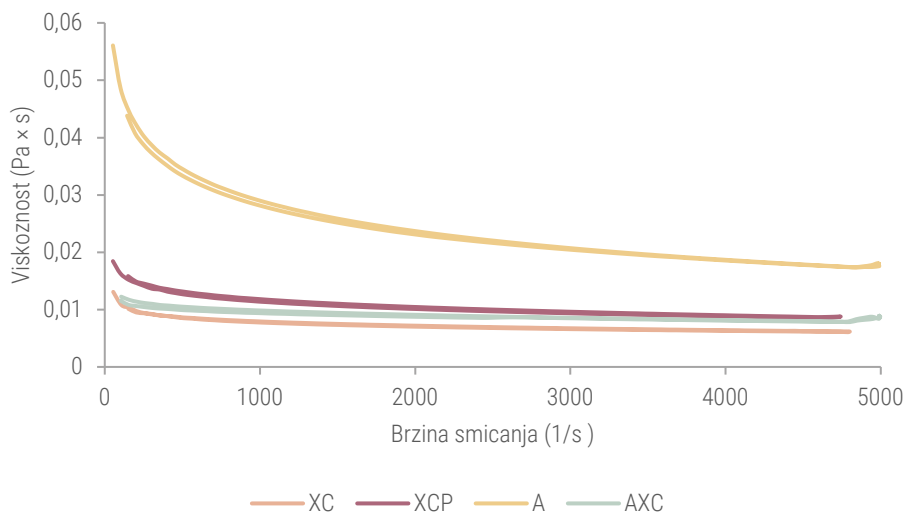
vlakana u uzorcima [42]. Ovaj kapacitet je doveden u vezu sa razgranatošću molekula citrusnog pektinskog vlakna [42] pri čemu su pektini sa više neutralnih šećera, a samim tim i više RG-I, a manje HG struktura, bolje vezivali vodu. Ovo je u skladu sa zavisnošću između sadržaja ovih molekulskih domena (tabela 12) i kapaciteta vezivanja vode kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve.



Slika 18. Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

#### 4.3.2.7. Viskoznost pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

Na slici 19 su prikazane viskoznosti enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida u zavisnosti od brzine smicanja.



Slika 19. Viskoznost enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

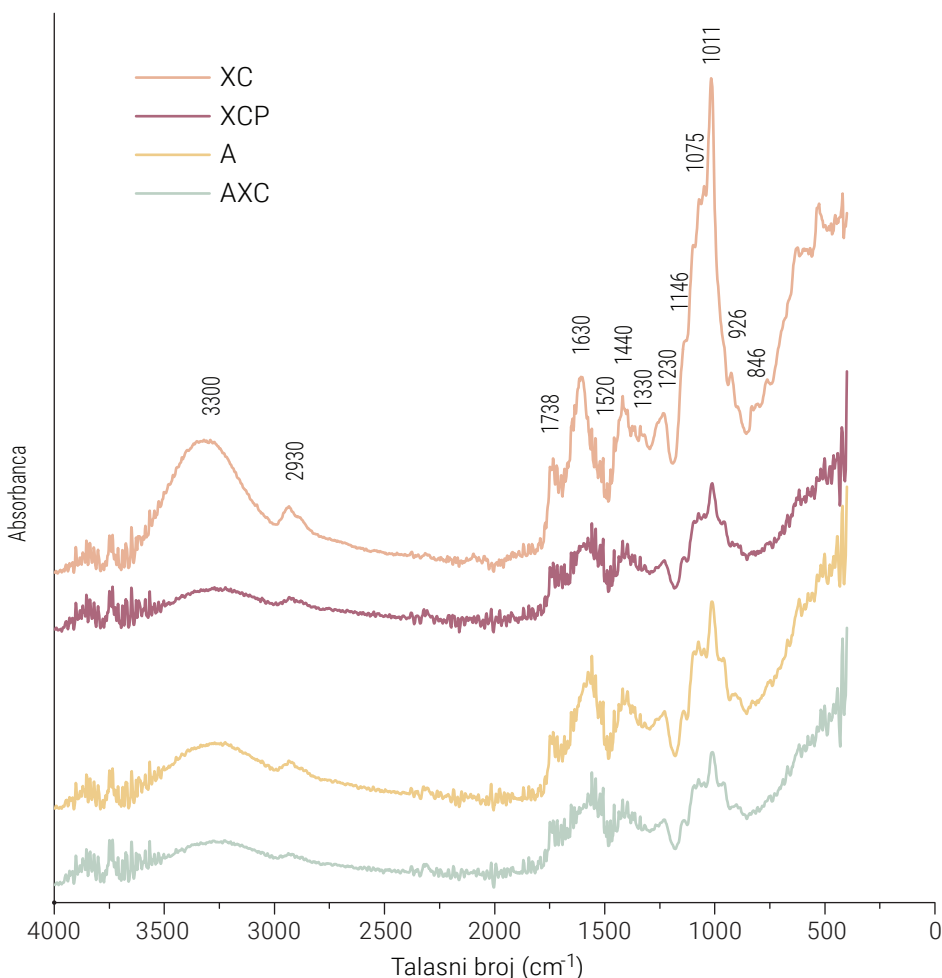
Najveću viskoznost imao je A, dok su viskoznosti polisaharida ekstrahovanih celulazom i ksilanazom bile značajno niže i međusobno veoma bliske. Čini se da u slučaju enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida nije postojala direktna zavisnost viskoznosti od molarne mase. Sa druge

strane, visok udeo RG-I domena i najveća prosečna dužina bočnih lanaca na njemu primećeni kod A (tabela 12) su, moguće je, za posledicu imali i najveću viskoznost. Ovo se može objasniti mogućim međusobnim interakcijama razgranatih delova ove strukture, kao što je ranije predloženo u literaturi [116,127,133].

Na krivama proticanja (slika 19) se može primetiti da je viskoznost enzimski ekstrahovanih polisaharida opadala sa porastom brzine smicanja. Ova karakteristika se može pripisati pseudoplastičnim fluidima [135]. *Fissore et al.* [32] su takođe reološko ponašanje pektina iz muskatne tikve, dobijenih ekstrakcijom celulazom ili hemicelulazom, ocenili kao pseudoplastično.

#### 4.3.2.8. FTIR spektri pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama

FTIR spektri enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, prikazani na slici 20, su dali bolji uvid u hemijsku strukturu ovih molekula. Kao i kod kiselo ekstrahovanih polisaharida, i ovde su bili prisutni pikovi na  $3300\text{ cm}^{-1}$  koji odgovaraju istežanju -OH grupe u lancu poligalakturonske kiseline [34,136] i pikovi na  $2930\text{ cm}^{-1}$  koji su posledica istežanja i savijanja u CH, CH<sub>2</sub> i CH<sub>3</sub> grupama [136].



Slika 20. FTIR spektri enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida



Pikovi na  $1740\text{ cm}^{-1}$  i  $1630\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama usled istežanja metil esterifikovanih i neesterifikovanih  $\text{COO}^-$  grupa, redom, i prisutni su kod svih analiziranih uzoraka. DM vrednosti dobijene spektrofotometrijskim metodom (tabela 11) odgovarale su vrednostima DM izračunatim iz odnosa intenziteta ovih pikova (rezultati nisu prikazani) [137]. Na  $1440\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$  i  $1010\text{ cm}^{-1}$ , kod svih spektara enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, se nalaze pikovi koji odgovaraju simetričnim vibracijama  $-\text{OH}$  grupe u poligalakturonskoj kiselini i prisustvu homogalakturonana u pektinu [137–139]. Ispod  $1500\text{ cm}^{-1}$  nalazi se region koji je specifičan za ugljene hidrate ali ga je zbog kompleksnosti i preklapanja pikova nemoguće sasvim precizno tumačiti [136,139]. Arabinoza, ksiloza i galaktoza se mogu identifikovati u opsegu talasnog broja  $1045$  i  $1075\text{ cm}^{-1}$  [139] a glukoza i manoza na  $926$  i  $846\text{ cm}^{-1}$ , redom [141]. Pikovi koji odgovaraju različitim monosaharidima su bili prisutni na svim spektrima analiziranih uzoraka. Pik na  $1521\text{ cm}^{-1}$  je bio prisutan kod svih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Njegovo prisustvo na spektru ukazuje na postojanje fenolnih estara u uzorku [34] što je u skladu sa rezultatima dobijenim hemijskom analizom sadržaja fenolnih kiselina (slika 17).

### 4.3.3. Poređenje karakteristika i svojstava pektinskih polisaharida dobijenih u kiselim i enzimskim ekstrakcijama

U ovom poglavlju će biti dat kratak pregled karakteristika i svojstava pektinskih polisaharida sa ciljem poređenja rezultata dobijenih za kiselo ekstrahovane i enzimski ekstrahovane pektinske polisaharide. Primenom različitih ekstrakcija su dobijeni pektinski polisaharidi koji su se razlikovali u pogledu hemijskog sastava, molarnih masa, antioksidativne i  $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuće aktivnosti, viskoznosti, naelektrisanja, rastvorljivosti i kapaciteta zadržavanja vode.

#### 4.3.3.1. Hemijski sastav

Različite tehnike ekstrakcije su rezultirale različitim hemijskim sastavima pektinskih polisaharida, čime je dokazano da je primenom različitih agenasa (kiselina i enzimi) moguće uticati na to kakve će karakteristike imati pektinski polisaharid.

Ranije objavljena zapažanja da je primenom enzima za ekstrakciju pektinskih vlakana muskatne tikve moguće dobiti veći sadržaj GalA nego kiselom ekstrakcijom [30,32] su u skladu sa priloženim rezultatima, dok se u dostupnoj literaturi ne mogu pronaći podaci o kombinovanim enzimskim i kiselim ekstrakcijama pektinskih polisaharida ovog biljnog materijala. Veći sadržaj GalA u polisaharidima dobijenim nakon enzimskih tretmana bi mogao biti objašnjen činjenicom da enzimski tretman pulpe muskatne tikve omogućava ekstrakciju pektinskih polisaharida koji su bogatiji u sadržaju galakturonske kiseline, a siromašniji u pogledu neutralnih šećera [11]. Dobijeni sadržaji neutralnih šećera prikazani u tabelama 9 i 11 su u skladu sa navedenim zapažanjem. Više neutralnih šećera se nalazilo u kiselom ekstrahovanom pektinu iz tropa jabuke, nego u enzimski ekstrahovanom pektinu [55]. Stoga, primena enzima, kako u samostalnoj, tako i u kombinovanoj ekstrakciji, omogućava ekstrakciju pektinskih polisaharida sa superiornijim karakteristikama u odnosu na isključivo kiselo ekstrahovan polisaharid u pogledu njihove moguće primene kao aditiva u hrani, uzimajući u obzir da je minimalan sadržaj GalA od 65% neophodan kod pektina koji se koriste u ove svrhe [4,148].

Isključivo enzimskim ekstrakcijama su dobijeni pektinski polisaharidi koji u svom sastavu nisu imali skrob, bez obzira na to da li je u enzimskom preparatu bilo amilolitičke aktivnosti. Sa druge strane, da bi se izbegla ko-ekstrakcija velike količine skroba zajedno sa pektinom u kiselom ekstrakciji,

neophodno je da u enzimski pretretman bude uključena i amilaza. Ovo ukazuje na to da je upravo korak kisele ekstrakcije odgovoran za ko-ekstrakciju skroba koji je svakako prisutan u osušenoj pulpi muskatne tikve.

Količina proteina u uzorcima nije prešla propisane standarde Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO). Prema njihovim preporukama, pektini na tržištu ne smeju imati više od 2,5% azota, što je ekvivalentno 15,6% proteina ( $N \times 6,25$ ) [4]. Generalno, proteina je bilo najviše u kiselu ekstrahovanom pektinskom polisaharidu. *Panouillé et al.* [11] su takođe objavili rezultat o nižem sadržaju proteina u enzimski ekstrahovanom pektinu korena cikoriije, nego u kiselu ekstrahovanom.

Stepeni metoksilacije i acetilacije, osim od uslova ekstrakcije, zavise i od DM i DA pektina u samom ćelijskom zidu biljke, što je uslovljeno zrelošću ploda i dejstvom deesterifikujućih enzima u njemu [31]. Sa DM većim od 50% (tabela 9), samo se kiselu ekstrahovan pektinski polisaharid može svrstati u visokometoksilovane pektine.

Sadržaji neutralnih šećera u pektinskim polisaharidima su prikazani na slikama 7 i 14. Prisustvo ramnoze u svim pektinskim polisaharidima ukazuje na to da naizmenični molekuli GalA i Rha izgrađuju osnovu ramnogalakturonan-I domena kao što su predložili *Ridley et al.* [7]. Sa druge strane, ksiloza koja se nalazi u uzorcima može biti pripisana prisustvu ksilogalakturonanskog domena [2]. Galaktoza i arabinoza prisutne u uzorcima ukazuju na postojanje arabinogalaktanskih bočnih lanaca RG-I domena [7,125]. Generalno, visoki sadržaji manoze i glukoze mogu biti posledica prisustva nekih drugih poli- i oligosaharidnih frakcija, uglavnom manana i glukana; već je ranije pokazano da su ovakvi fragmenti rastvorljivi u uslovima ekstrakcije pektinskih polisaharida i da se kasnije talože u prisustvu etanola, odnosno ko-ekstrahuju sa pektinom [32].

#### 4.3.3.2. Molarne mase

Kada se u obzir uzmu GP-HPLC profili sa slika 8 i 15, može se zaključiti da različite tehnike ekstrakcije imaju veliki uticaj na molarne mase pektinskih polisaharida. Kiselom ekstrakcijom se generalno dobijaju pektinski polisaharidi koji u svojim rastvorima imaju više agregata, što se može zaključiti iz prisustva ramena na pikovima velikih molarnih masa, pri čemu su ta ramena odsutna kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Sa druge strane, molarne mase prvih pikova (pikovi obeleženi sa I na slici 15) enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida su bile najveće kod XC i XCP, a samim tim veće od odgovarajućih pikova (pikovi obeleženi sa II na slici 8) kod svih kiselu ekstrahovanih pektinskih polisaharida. Dodatno, enzimskim ekstrakcijama (XC, XCP i A) je došlo do izdvajanja još jedne frakcije molarnih masa (pikovi obeleženi sa II na slici 15) koja je bila odsutna kod kisele ekstrakcije (K, XC+K i AXC+K). Ovo je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima o molarnim masama pektina ekstrahovanih iz jabučnog tropa, pri čemu je zaključeno da je primena kiseline dovela do ekstrakcije pektina manjih molarnih masa nego što je bio slučaj kod enzimski ekstrahovanih pektina [53,55]. Nasuprot ovim rezultatima, pik male molarne mase kod K (a III na slici 8) je imao veću molarnu masu od uporedivih pikova kod svih ostalih pektinskih polisaharida. Ovo bi moglo biti objašnjeno delimičnom enzimskom degradacijom pektina usled prisustva male sporedne pektinolitiche aktivnosti kod komercijalnih enzimskih preparata [11,54] koja je i izmerena kod ksilanaze i celulaze, kao što je navedeno u Poglavlju 3.2. Dodatno, pikovi najmanjih molarnih masa (oko 500 Da), prisutni kod K, XC i XCP su u skladu sa najvećim sadržajem manoze kod ovih uzoraka i mogu voditi poreklo od oligomanana koji se ko-ekstrahuju sa pektinom [32].

#### 4.3.3.3. Ukupni fenoli, antioksidativna i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost

Primena kiseline u ekstrakcionim koracima je imala veliki uticaj na sadržaj ukupnih fenola u pektinskim polisaharidima, kao i na njihovu sposobnost da neutralizuju ABTS radikale i heliraju Fe<sup>2+</sup> jone.

Poređenjem rezultata prikazanih na slikama 10 i 17 može se zaključiti da je korak kisele ekstrakcije imao veliki uticaj na sadržaj ukupnih fenola koji su predstavljeni kao sadržaj ferulne kiseline, pri čemu su se na taj način ekstrahovali pektinski polisaharidi sa manjim sadržajem fenolnih kiselina. Moguće je da su se estarske veze između fenolnih kiselina i pektinskih polisaharida raskinule u kiselim uslovima ekstrakcije a da dejstvom primenjenih enzima nije došlo do njihove degradacije, kao što je sugerisano u literaturi [55]. Iz ovih rezultata se može zaključiti da je upotrebom enzima za ekstrakciju moguće izolovati pektinske polisaharide bogate fenolnim kiselinama, sa čak do 23 puta više fenolnih kiselina kada se za ekstrakciju koriste ksilanaza i celulaza nego kada je u pitanju konvencionalna kiselna ekstrakcija.

Antioksidativna aktivnost, određena ABTS testom, je generalno bila veća kod enzimski nego kod kiselno ekstrahovanih pektinskih polisaharida, što je u skladu sa sadržajem ukupnih fenolnih kiselina, većim sadržajem GalA i nižim DM kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida [55,129,130]. Antioksidativna aktivnost je bila najmanja kod kiselno ekstrahovanog pektinskog polisaharida (K), dok su antioksidativne aktivnosti bile veće 2 do 3 puta kod pektinskih polisaharida dobijenih enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama i čak 3 do 5 puta veće kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida.

Konačno, Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost je bila izrazito najmanja kod konvencionalne kisele ekstrakcije (K); oko 60 puta manja nego kod svih ostalih pektinskih polisaharida za čiju ekstrakciju su korišćeni komercijalni enzimski preparati. Ovo može biti posledica najmanjeg sadržaja GalA i najvišeg DM u ovom pektinskom polisaharidu, što je onemogućilo vezivanje pozitivnih dvovalentnih jona usled najmanjeg broja slobodnih negativno naelektrisanih karboksilnih grupa [50].

#### 4.3.3.4. Naelektrisanje, rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode

Enzimskim i enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su dobijeni pektinski polisaharidi koji su se međusobno razlikovali u naelektrisanju (slike 9 i 16), rastvorljivosti i kapacitetu zadržavanja vode (slike 11 i 18) u zavisnosti od primenjenih enzimskih tretmana. Dodatno, postojala je i velika razlika između kiselno ekstrahovanog (K) i svih pektinskih polisaharida dobijenih nakon različitih enzimskih tretmana. Može se pretpostaviti da su ova svojstva imala kompleksnu zavisnost od različitih hemijskih i strukturnih karakteristika pektinskih polisaharida.

Velika negativna naelektrisanja pektinskih polisaharida su dovedena u vezu sa visokim sadržajem GalA i niskim DM, usled čega u molekulu postoji veći broj neesterifikovanih karboksilnih grupa koje su nosioci negativnog naelektrisanja. Od svih ispitanih pektinskih polisaharida, najmanje naelektrisanje je imao K, koji ima i najniži sadržaj GalA i najveći DM. Sa druge strane, najveće naelektrisanje je zapaženo kod onih pektinskih polisaharida koji su imali najviše GalA i niži DM (AXC+K, A+K i XCP).

Rastvorljivost i kapacitet zadržavanja vode su kod svih pektinskih polisaharida (slike 11 i 18) bili obrnuto proporcionalni. Veća rastvorljivost je značila i manji kapacitet zadržavanja vode. Čini se da je rastvorljivost više zavisila od enzima koji su korišćeni pri ekstrakciji nego od toga da li je enzimski

tretman pratila kiselak ekstrakcija ili ne. Generalno je bolja rastvorljivost postignuta kod svih pektinskih polisaharida kod kojih su u enzimskom koraku ekstrakcije korišćene ksilanaza i celulaza, nego kada je korišćena samo amilaza.

#### 4.3.3.5. Viskoznost

Sa slika 12 i 19 se može zaključiti da su među uzorcima postojale razlike u viskoznosti. Slično kao i kod rastvorljivosti, ove razlike se ne mogu pripisati tome da li je korišćena kiselina pri ekstrakciji ili nije, ali mogu biti posledica primene različitih enzima tokom enzimskog tretmana muskatne tikve. Veća viskoznost je izmerena kod pektinskih polisaharida za čije je dobijanje korišćena amilaza, nego kod onih koji su ekstrahovani uz tretman ksilanazom i celulazom. Isti trend je zapažen i kod rastvorljivosti pektinskih polisaharida. Ovo bi možda moglo biti objašnjeno prisustvom sporedne pektinolititičke aktivnosti u korišćenoj ksilanazi i celulazi koja može u manjoj meri enzimski da hidrolizuje molekule pektinskih polisaharida [11,54]. Dodatno, kiselo ekstrahovani pektinski polisaharidi su ispoljili izraženiji tiksotropni efekat. Ovaj efekat su primetili i *Mierczyńska et al.* [149] za pektine iz različitih izvora. On predstavlja smanjenje viskoznosti fluida nakon produženog vremena, tj. ovim fluidima je potrebno više vremena do uravnoteženja viskoznosti dok su podvrgnuti promenama u brzini smicanja. Tiksotropija je kompleksna funkcija hemijske strukture, slabih interakcija prisutnih između molekula pektinskih polisaharida, kao i njihove razgranatosti, i ogleđa se u prelasku iz stanja sličnom gelu u koloidno stanje [149].

### 4.4. Enzimске modifikacije pektinskih polisaharida muskatne tikve

U ovom poglavlju biće predstavljeni rezultati enzimskih modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve rađenih u cilju poboljšanja njihovih karakteristika i svojstava. Radi jasnijeg i lakšeg sagledavanja rezultata, oni su grupisani prema enzimima koji su korišćeni za modifikaciju: (a) individualna endo-poligalakturonaza, (b) individualna pektin-metilesteraza i (c) združene endo-poligalakturonaza i pektin-metilesteraza.

#### 4.4.1. Enzimska modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve dejstvom endo-poligalakturonaze

Endo-poligalakturonaza je korišćena u cilju dobijanja modifikovanih pektinskih polisaharida poboljšanih svojstava. Nakon određivanja Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze kao mere afiniteta ka supstratu, ispitani su uslovi enzimске modifikacije pektinskih polisaharida muskatne tikve dejstvom ovog enzima a zatim su enzimске modifikacije izvedene pri dozi enzima i vremenu reakcije koji su određeni kao najpovoljniji. Modifikovanim pektinskim polisaharidima su određene karakteristike i svojstva, i upoređene sa odgovarajućim nemodifikovanim pektinskim polisaharidima.

##### 4.4.1.1. Mihaelis-Mentenina konstanta endo-poligalakturonaze za pektinske polisaharide muskatne tikve

Mihaelis-Mentenina konstanta je mera afiniteta nekog enzima ka supstratu i što je njena vrednost manja za određeni supstrat, afinitet enzima ka njemu je veći.  $K_M$  endo-poligalakturonaze je određen za sve pektinske polisaharide muskatne tikve i dat u tabeli 13. Vrednosti  $K_M$  su izražene u jedinicama masene koncentracije (g/L) i izračunate u jedinicama molarne koncentracije ( $\mu\text{mol/L}$ ; računato pomoću srednjeg  $M_w$  svih frakcija različitih molarnih masa prisutnih u jednom uzorku (tabele P1 i P2)). Afinitet endo-poligalakturonaze ka različito ekstrahovanim pektinskim polisaharidima se veoma razlikovao.

Najveći afinitet je ePG pokazao ka A+K i AXC+K, a najmanji ka A. Vrednosti  $K_M$  prikazane u tabeli su u skladu sa stepenom metoksilacije, sadržajem GalA (tabele 9 i 11) i HG domena (tabele 10 i 12) u ovim uzorcima. Supstrati prema kojima je ePG pokazao najveći afinitet su imali najveći sadržaj GalA i HG, a najmanji DM, dok je obrnuto važno za supstrat ka kom je ovaj enzim ispoljio najmanji afinitet. Naime, više GalA i HG domena u molekulu pektina znači da ima više prisutnog supstrata koji ePG može da hidrolizuje [2]. Sa druge strane, ePG je aktivan samo u neesterifikovanim regionima pektinskog molekula, stoga ovi enzimi pokazuju veći afinitet ka pektinskim polisaharidima manjeg DM [2,69].

Tabela 13. Vrednosti Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze prema pektinskim polisaharidima ekstrahovanim iz muskatne tikve

Pektinski polisaharid*	$K_M$ (g/L)*	$K_M$ ( $\mu$ mol/L)*	Pektinski polisaharid**	$K_M$ (g/L)**	$K_M$ ( $\mu$ mol/L)**
K	33,3	24,9	XC	22,2	17,8
XC+K	20,0	16,1	XCP	37,0	29,9
A+K	13,3	8,4	A	58,8	96,6
AXC+K	15,4	6,9	AXC	41,7	57,8

\* kolone sa kiselo ekstrahovanim pektinskim polisaharidima

\*\* kolone sa enzimski ekstrahovanim pektinskim polisaharidima

#### 4.4.1.2. Modifikacija endo-poligalakturonazom

Različite koncentracije pektinskih polisaharida muskatne tikve su tretirane različitim dozama endo-poligalakturonaze pri različitim vremenima enzimske reakcije u cilju definisanja doze enzima, trajanja reakcije i koncentracije supstrata koji će se koristiti za enzimsku modifikaciju. Enzimski tretmani su praćeni merenjem oslobođenih redukujućih šećera, sa standardom GalA, u definisanim vremenskim intervalima. Vremenski tokovi enzimskih tretmana pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama su prikazani na slici P3 (u prilogu), dok su vremenski tokovi enzimskih tretmana pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama dati na slici P4. U početnoj fazi eksperimenata ispitan je uticaj različitih doza endo-poligalakturonaze (0,0013 U/g, 0,013 U/g i 0,13 U/g) na pektinski polisaharid pri konstantnoj koncentraciji supstrata (1%), a zatim je na različitim koncentracijama supstrata (1%, 2% i 3%) izvedena enzimska reakcija sa odabranom optimalnom dozom enzima (0,13 U/g).

Generalno, primećen je porast koncentracije oslobođenih redukujućih šećera sa porastom primenjene doze enzima kod svih pektinskih polisaharida. Takođe, ova koncentracija je rasla i tokom trajanja enzimske reakcije pri čemu je maksimum dostignut u prvih 15 ili 30 min reakcije, a daljim produženjem reakcije do 60 min u većini slučajeva nije došlo do njenog povećanja. Na osnovu ovih eksperimenata odabrana je najpovoljnija doza endo-poligalakturonaze - 0,13 U/g i trajanje enzimske reakcije - 15 i 30 min. Sa porastom koncentracije pektinskog polisaharida je takođe došlo do povećanja koncentracije oslobođenih redukujućih šećera delovanjem jednake doze enzima. Koncentracija pektinskog polisaharida koja je odabrana za sve enzimске modifikacije endo-poligalakturonazom je bila 2%. Iako je sa koncentracijom supstrata 3% oslobođeno više GalA, ova koncentracija nije izabrana zbog svoje velike viskoznosti (podaci nisu prikazani) što je potencijalno moglo da oteža dalje analitičke metode. Dodatno, odabrana koncentracija pektinskog polisaharida je bila u skladu sa često navođenom koncentracijom u literaturi [65,76,79]. Pri ovako definisanim uslovima, pektinski

polisaharidi muskatne tikve su modifikovani, te poređeni sa odgovarajućim nemodifikovanim pektinskim polisaharidima u cilju praćenja promene u njihovim karakteristikama i svojstvima usled dejstva endo-poligalakturonaze.

Koncentracije oslobođenih redukujućih šećera (merenih kao GalA) iz različitih pektinskih polisaharida kao rezultat aktivnosti ePG su bile u skladu sa afinitetom ovog enzima ka različitim supstratima definisanim vrednostima  $K_M$  (tabela 13). Naime, vrednosti  $K_M$  su ukazale na najveći afinitet ePG ka supstratu A+K što je potvrđeno i najvećom koncentracijom oslobođene GalA u svim postavkama eksperimenta. Nasuprot tome, tokom delovanja ePG na A došlo je do oslobađanja najmanje količine GalA što je dodatno potvrdilo najmanji afinitet enzima ka ovom supstratu.

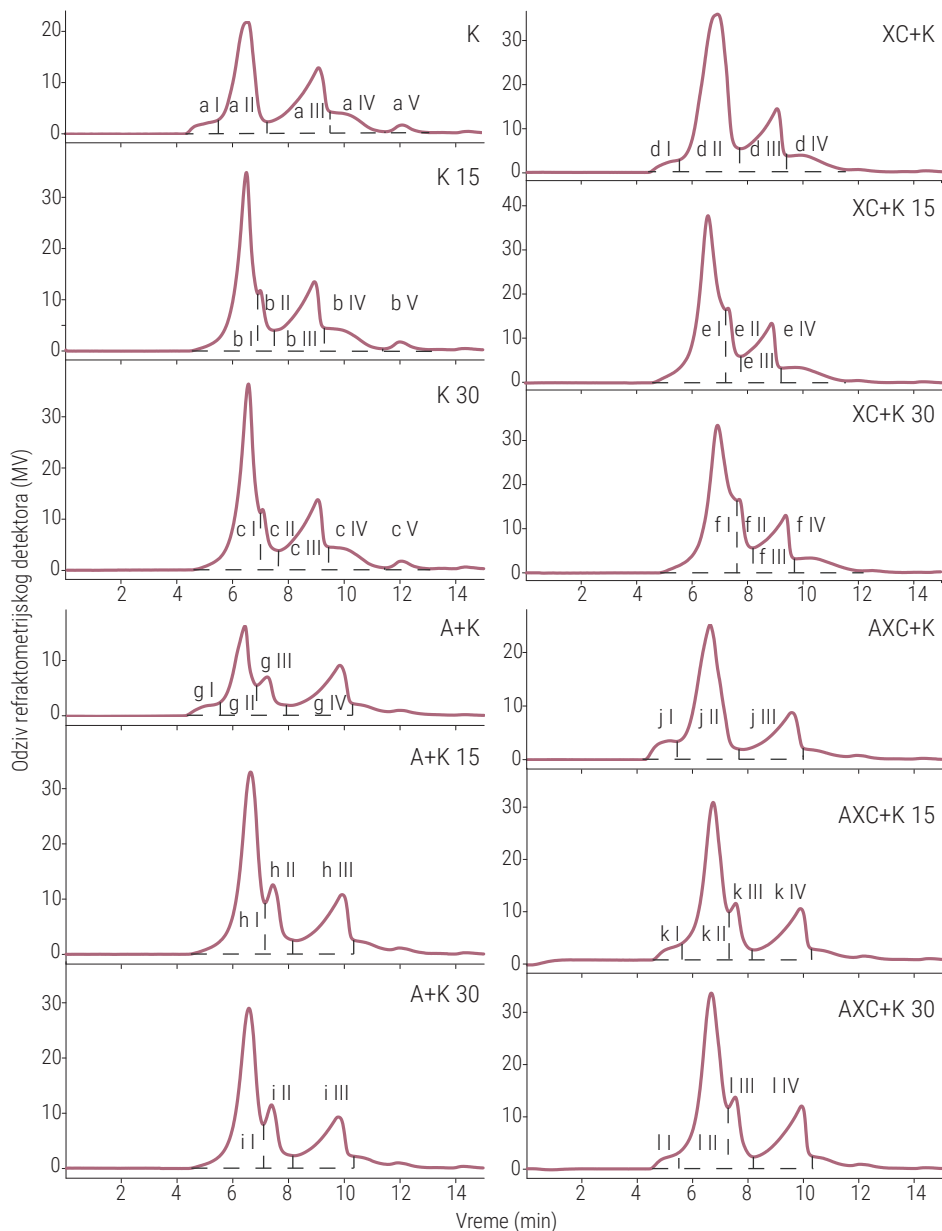
#### 4.4.1.3. Molarna masa pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom

GP-HPLC spektri modifikovanih pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama, kao i onih dobijenih enzimskim ekstrakcijama su prikazani na slikama 21 i 22, redom. Uporedo sa modifikovanim pektinskim polisaharidima su dati i GP-HPLC profili odgovarajućih nemodifikovanih pektinskih polisaharida radi lakšeg uočavanja efekta koji je modifikacija endo-poligalakturonazom imala na ove supstrate. Molarne mase, disperznost i površine frakcija različitih molarnih masa nakon modifikacije su date u tabeli P3 (u prilogu) za pektinske polisaharide dobijene kiselim ekstrakcijama i u tabeli P4 za pektinske polisaharide dobijene u enzimskim ekstrakcijama.

Endo-poligalakturonaza deluje na HG domen pektina tako što nasumično hidrolizuje veze između GalA dovodeći na ovaj način do depolimerizacije molekula [2]. Kod svih kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida, osim AXC+K, je došlo do nestajanja ramena na najvećim molarnim masama (a I, d I i g I), dok je kod AXC+K došlo do postepenog smanjenja površine tog ramena (j I) sa produženjem enzimske reakcije. Kako ova ramena odgovaraju agregatima, može se zaključiti da je jedan od efekata delovanja ePG bilo i smanjenje koncentracije agregata pektinskih molekula u rastvoru. Kod nekih pektinskih polisaharida (K, XC+K, AXC+K i AXC) je nakon modifikacije ePG-om došlo do stvaranja jedne nove frakcije manje molarne mase (frakcije obeležene sa II na spektrima modifikovanih K, XC+K i AXC i frakcije obeležene sa III na spektrima modifikovanih AXC+K) koja se kao rame odvojila od pika velike molarne mase (frakcije obeležene sa I na spektrima modifikovanih K, XC+K i AXC, i sa II na spektrima modifikovanih AXC+K). U tabelama P3 i P4 je moguće videti da je došlo do porasta površine ovih novonastalih pikova na hromatogramima modifikovanih pektinskih polisaharida sa produžetkom reakcije. Formiranje novih frakcija manjih molarnih masa od već postojećih pikova usled dejstva ePG je takođe primećeno i na pektinu gloga [77]. Dodatno, kod pektinskih polisaharida kod kojih nije došlo da stvaranja nove frakcije manjih molarnih masa (A+K, XC, XCP i A) je došlo do pomeranja postojećih frakcija ka većim vremenima retencije, odnosno ka manjim molarnim masama usled dejstva ePG. Ove promene se najbolje mogu videti u tabelama P3 i P4. Do pomeranja pikova i smanjenja molarnih masa dejstvom ePG je došlo i kada je ovaj enzim primenjen za hidrolizu pektina iz šećerne repe [150], što je u skladu sa rezultatima dobijenim enzimskom modifikacijom pektinskih polisaharida muskatne tikve delovanjem endo-poligalakturonaze. Dodatno, ukupne površine pikova modifikovanih A+K, XC, XCP i A su bile veće od ukupne površine pikova odgovarajućeg nemodifikovanog pektinskog polisaharida. Ovde predstavljeni rezultati bi se mogli objasniti izvođenjem iz ravnoteže ravnotežne reakcije asocijacije (i disocijacije) agregata pektinskih polisaharida. Naime, kako se molekuli pektina u rastvoru nalaze u dinamičkoj ravnoteži sa agregiranim pektinskim strukturama [6,151], moguće je

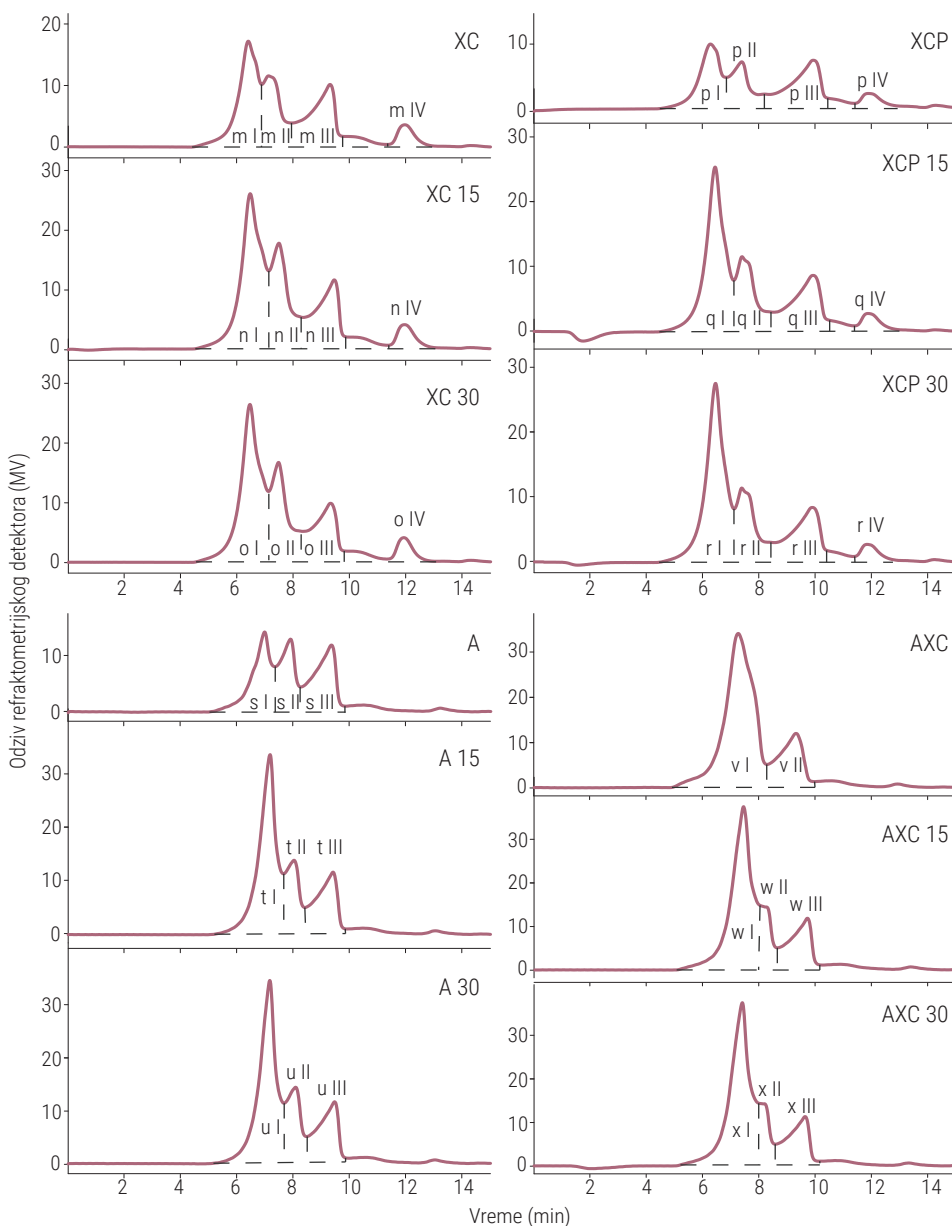


da je dejstvo ePG dovelo do pomeranja ove ravnoteže u korist disocijacije agregata što za posledicu ima povećanje površina frakcija; u isto vreme, došlo je i do nestajanja ramena velikih molarnih masa na GP-HPLC profilima modifikovanih kiselom ekstrahovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve. Disperznost ePG-modifikovanih pektinskih polisaharida je generalno bila za nijansu manja od odgovarajućih nedomodifikovanih supstrata, što je u skladu sa smanjenjem disperznosti dobijenom nakon modifikacije ePG-om pektina gloga [77].



*Slika 21. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrahiranjima modifikovanih dejstvom endo-poligalakturonaze u trajanju od 15 min i 30 minuta (obeleženi sa 15 i 30, redom) i odgovarajućih nedomodifikovanih pektina*

#### 4. Rezultati i diskusija

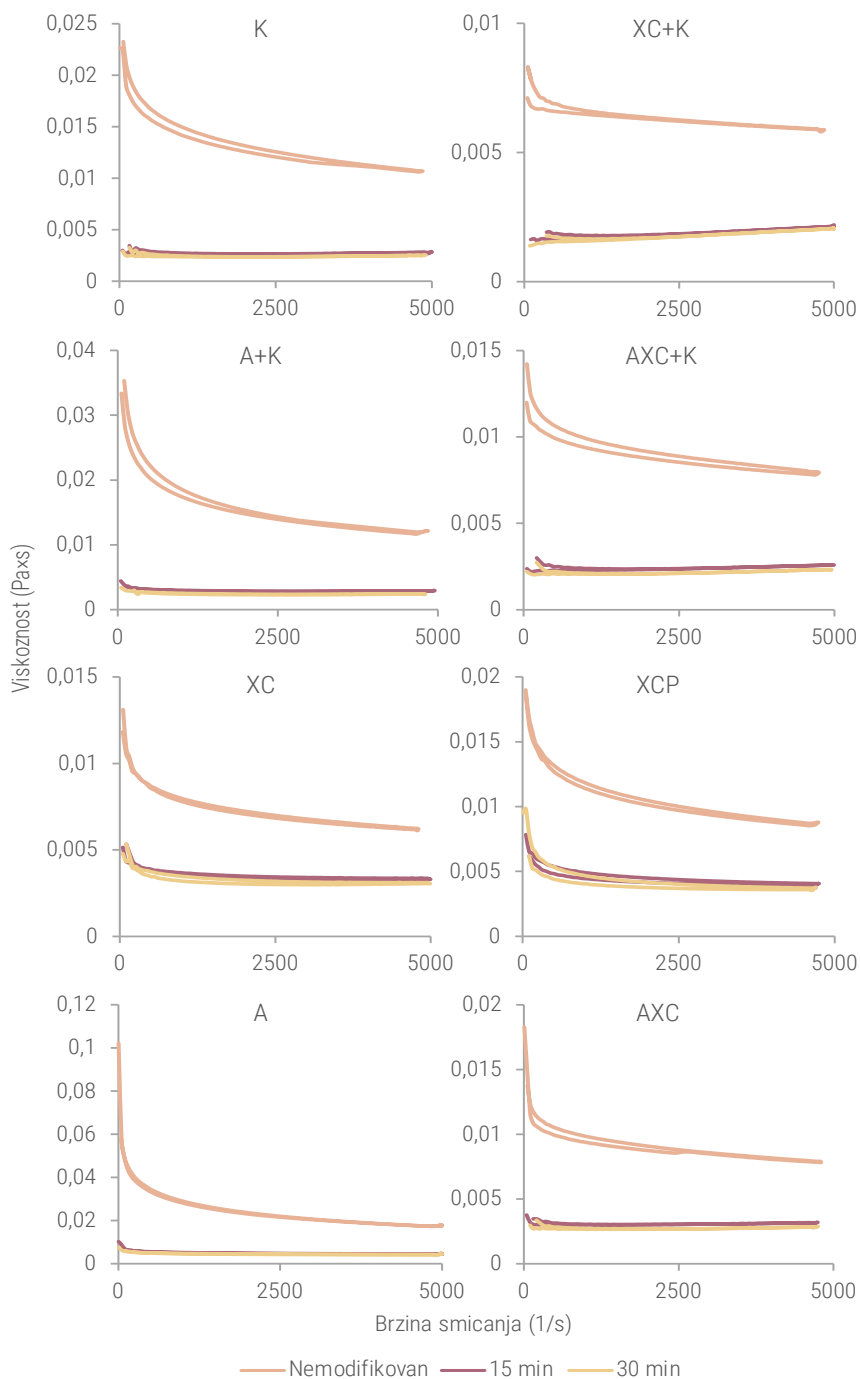


Slika 22. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama modificiranih dejstvom endo-poligalakturonaze u trajanju od 15 min i 30 minuta (obeleženi sa 15 i 30, redom) i odgovarajućih nemodifikovanih pektina

Generalno je veće smanjenje molarnih masa nakon ePG-modifikacije zapaženo kod pektinskih polisaharida dobijenih enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama (XC+K, AK i AXC+K) nego kod modificiranih uporedivih enzimski ekstrahovanih uzoraka (XC, XCP, A i AXC). Ovo je u skladu sa određenim većim afinitetima ePG (niže vrednosti  $K_M$  u tabeli 13) ka supstratima dobijenim enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama, kao i većim sadržajem GalA i homogalakturonana kod njih nego kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida.

#### 4.4.1.4. Viskoznost pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom

Krive proticanja pektinskih polisaharida modifikovanih dejstvom ePG su prikazane kao zavisnost viskoznosti od sile smicanja i date su uporedo sa krivama proticanja nemodifikovanih pektinskih polisaharida kako bi se lakše ispratio uticaj delovanja ovog enzima na njihovu viskoznost (slika 23).



Slika 23. Viskoznost nemodifikovanih i ePG-om modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

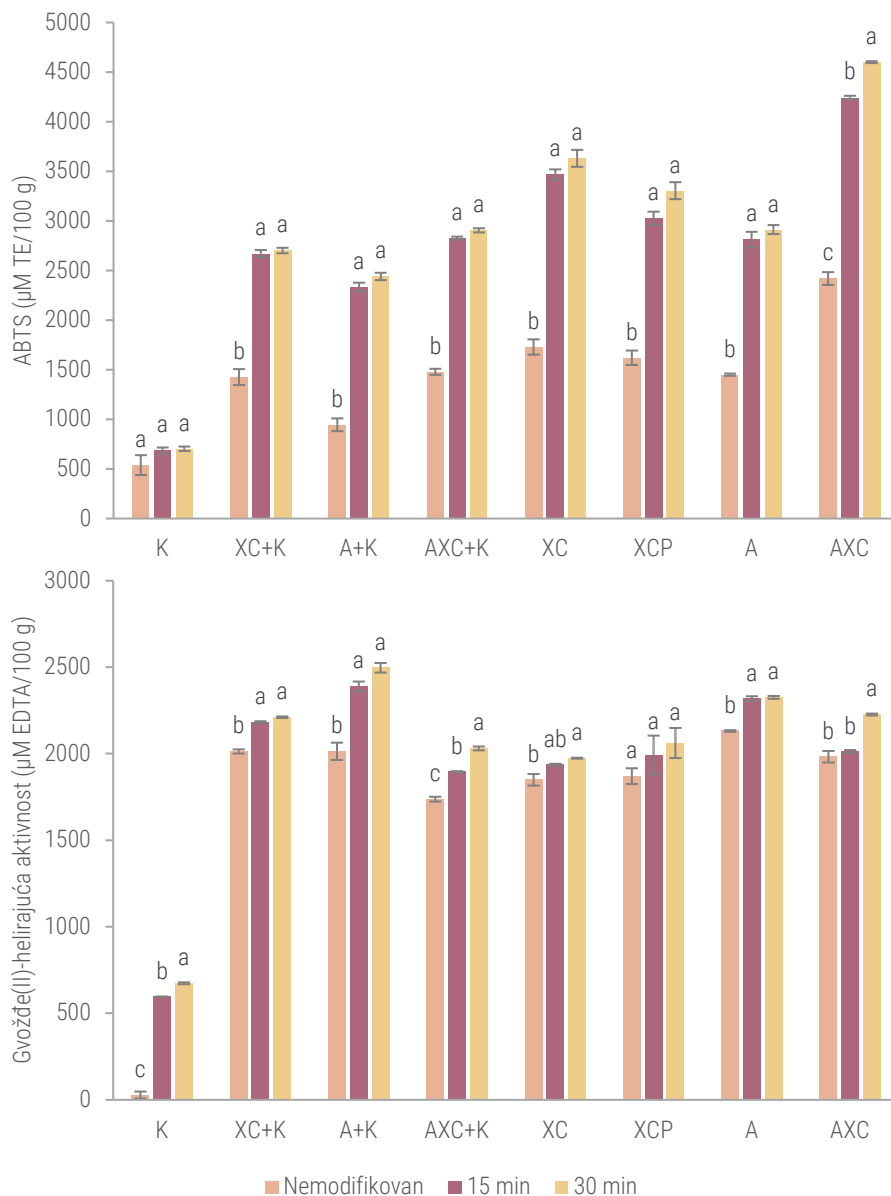
Nakon enzimске modifikacije, došlo je do smanjenja viskoznosti svih pektinskih polisaharida. Trajanje enzimске modifikacije (15 ili 30 minuta) nije imalo veliki uticaj na viskoznost što se može zaključiti po jako malim razlikama u krivama proticanja za ova dva vremena. Manja viskoznost pektinskih polisaharida nakon tretmana ePG-om, kao depolimerizacionim enzimom, se može objasniti smanjenjem njihove molarne mase. Isti zaključak je donesen i za pektine gloga [77] i šećerne repe [76] jer ePG-modifikacija dovodi do stvaranja polisaharida manjih molarnih masa koji ne ometaju proticanje tečnosti, što za posledicu ima manju viskoznost. Ipak, intenzitet smanjenja viskoznosti se razlikovao u zavisnosti od toga koji je pektinski polisaharid modifikovan, odnosno od njegovog sastava i strukturnih karakteristika koji su zavisili od načina ekstrakcije. Najveće smanjenje viskoznosti delovanjem ePG je primećeno kod A+K, pri čemu je viskoznost nakon enzimске modifikacije bila manja čak 6,4 puta od viskoznosti nemodifikovanog A+K. Ovo je bilo u skladu sa određenim najvećim afinitetom ePG ka ovom pektinskom polisaharidu. Najmanja promena u viskoznosti pektinskih polisaharida je zabeležena kod XC i XCP, gde su viskoznosti umanjene 2,2 i 2,5 puta, redom, nakon modifikacije ePG-om. Stoga se može zaključiti da je ePG-modifikacija u većoj meri uticala na smanjenje viskoznosti rastvora pektinskih polisaharida ekstrahovanih enzimski potpomognutim kiselim postupkom nego na smanjenje viskoznosti samo enzimski ekstrahovanih uzoraka. Ovo zapažanje je u skladu sa promenama u molarnoj masi ePG-modifikovanih pektinskih polisaharida, pri čemu je veće smanjenje  $M_w$  primećeno kod istih uzoraka, što potvrđuje direktnu zavisnost viskoznosti od molarne mase.

#### 4.4.1.5. *In-vitro* antioksidativna aktivnost i $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih endo-poligalakturonazom

Na slici 24 su prikazane sposobnost neutralizacije ABTS radikal-katjona i  $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost nakon ePG-modifikacije pektinskih polisaharida muskatne tikve. Dobijene vrednosti za modifikovane pektinske polisaharide su prikazane uporedo sa vrednostima odgovarajućih svojstava nemodifikovanih pektinskih polisaharida.

*In-vitro* antioksidativna aktivnost svih modifikovanih pektinskih polisaharida, osim K, je bila značajno povećana ( $p < 0,05$ ) u odnosu na odgovarajuće nemodifikovane pektinske polisaharide. Ovo ukazuje na pozitivan efekat tretmana endo-poligalakturonazom na sposobnost neutralizacije ABTS radikala pektinskih polisaharida muskatne tikve. Isti efekat je uočen i kod pektina gloga koji je nakon modifikacije ePG-om ispoljio značajno veću antioksidativnu aktivnost nego nemodifikovan pektin [77]. Pektinski polisaharidi nižih molarnih masa sadrže više aktivnih grupa na površini molekula koje mogu doprineti povećanoj neutralizaciji ABTS slobodnih radikala [128]. Najveće antioksidativne aktivnosti, predstavljene kao ekvivalenti troloksa, su izmerene kod pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama kada je modifikacija ePG-om trajala 30 min (više od 2900  $\mu M$  TE/100 g), pri čemu je najveća izmerena vrednost iznosila skoro 4600  $\mu M$  TE/100 g za modifikovani AXC. Od pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama najveću antioksidativnu aktivnost je imao AXC+K nakon modifikacije dejstvom ePG koja je trajala 30 min (2900  $\mu M$  TE/100 g). Najveća izmerena antioksidativna aktivnost nije odgovarala i najvećoj relativnoj promeni ove aktivnosti između nemodifikovanog i odgovarajućeg modifikovanog pektinskog polisaharida. Naime, najveće relativno povećanje je primećeno kod A+K pri čemu se nakon 30 min enzimске modifikacije antioksidativna aktivnost povećala čak 2,6 puta, dok je kod svih ostalih pektinskih polisaharida ovo povećanje bilo duplo. Ova povećanja su veća od povećanja ABTS aktivnosti pektina gloga modifikovanog ePG-om [77]. Najveća promena antioksidativne aktivnosti kod A+K je bila u skladu sa najmanjim  $K_m$  kod ovog pektinskog polisaharida. Jedini pektinski polisaharid kod kojeg nije došlo do statistički značajne

promene ( $p>0,05$ ) u antioksidativnoj aktivnosti je bio K. Ovo bi moglo biti objašnjeno najmanjim sadržajem GalA i najvišim DM u ovom polisaharidu (tabela 9) u odnosu na sve druge pektinske polisaharide muskatne tikve. Antioksidativna aktivnost je u literaturi, osim sa manjom molarnom masom, povezana i sa visokim sadržajem GalA i nižim DM što doprinosi većem sadržaju karboksilnih grupa sposobnih da neutralizuju slobodne radikale [128–130]. Stoga je moguće da delovanje koje je ePG mogao da ispolji na K, s obzirom na mesta u molekulu pektina dostupna za hidrolizu ovim enzimom, bilo takvo da nije dovelo do značajnog povećanja njegove ABTS aktivnosti.



Slika 24. ABTS i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost nemodifikovanih i ePG-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

Gvožđe(II)-helirajuća aktivnost enzimiški modifikovanih pektinskih polisaharida dejstvom ePG nije bila tako značajno povećana kao što je bio slučaj sa ABTS. Najveća razlika između Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti modifikovanog i nemodifikovanog pektinskog polisaharida izmerena je kod K, pri čemu je nakon 30 min ePG-modifikacije ova aktivnost povećana čak 25 puta, mada treba naglasiti da je helirajuća aktivnost nemodifikovanog K bila gotovo zanemarljiva. Povećanje helirajuće aktivnosti ostalih pektinskih polisaharida je kod većine njih iznosilo samo oko 10%, pri čemu bi se mogao izdvojiti A+K kod kojeg je došlo do povećanja Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti za 24%. S obzirom da je ePG hidrolizovao HG domen pektinskih polisaharida čime je doveo do skraćivanja njegove dužine, očekivano je bilo da se Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost smanjuje jer kraći lanci stupaju u malobrojnije i slabije interakcije sa dvovalentnim jonima [50]. Međutim, pošto gvožđe(II)-helirajuća aktivnost zavisi i od mnoštva drugih faktora (sadržaj GalA, DM, DA, dužina lanca polimera, sadržaja različitih neutralnih šećera) moguće je objasniti ovo neočekivano povećanje helirajuće aktivnosti primenjenom enzimiškom modifikacijom upravo brojnošću faktora od kojih zavisi i kompleksnošću njihove povezanosti [50].

Dodatno, intenziteti promena ABTS i Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti nakon ePG-modifikacije se gotovo nisu razlikovali kod pektinskih polisaharida dobijenih u enzimiški potpomognutim kiselim ekstrahiranjima i kod onih dobijenih u enzimiškim ekstrahiranjima. Ovo nije bilo u skladu sa razlikama koje su uočene u efektima koje je ovaj enzim imao na molarne mase i viskoznosti različito ekstrahiranih uzoraka. Sa druge strane, ovo bi moglo biti objašnjeno činjenicom da ove aktivnosti, osim od Mw, zavise i od drugih hemijskih i strukturnih karakteristika uzorka [50,128–130].

#### **4.4.2. Enzimska modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve dejstvom pektin-metilesteraze**

Pektin-metilesteraza je korišćena za modifikaciju pektinskih polisaharida muskatne tikve u cilju dobijanja makromolekula nižeg stepena metoksilacije potencijalno poboljšanih karakteristika i bioloških aktivnosti. Enzimiški modifikovani pektinski polisaharidi dobijeni kiselim i enzimiškim ekstrahiranjima su upoređeni sa odgovarajućim nemodifikovanim pektinskim polisaharidima u pogledu njihovih karakteristika i svojstava. Koncentracija pektinskih polisaharida koja je izabrana za enzimske reakcije je iznosila 1%, što je i koncentracija koja se često pronalazi u literaturi za modifikacije PME-om [59,81,152]. Preliminarni eksperimenti su odrađeni sa dve različite doze enzima (0,0125 U/g i 0,00125 U/g) ali pri manjoj dozi PME nije detektovana deesterifikacija pektinskih polisaharida, stoga je enzim doziran 0,0125 U/g u daljim eksperimentima.

##### **4.4.2.1. Step en metoksilacije pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom**

Pektin-metilesteraza je enzim koji katalizuje uklanjanje metil estara sa C6 atoma u molekulu GalA [78]. Za sve modifikovane pektinske polisaharide određeni su stepeni metoksilacije i dati su zajedno sa DM nemodifikovanih pektinskih polisaharida u tabeli 14. Očekivano, nakon delovanja PME, DM svih pektinskih polisaharida je bio značajno niži ( $p < 0,05$ ). Nakon 30 min enzimiškog tretmana najveće smanjenje DM je izmereno kod A (2,3 puta), a najmanje kod K (1,3 puta). Kod svih ostalih pektinskih polisaharida, DM je smanjen između 1,5 i 1,8 puta. Kada je enzimska reakcija trajala 60 min, kod većine pektinskih polisaharida (XC+K, A+K, AXC+K, XC i XCP) DM je umanjeno oko 3,5 puta, dok je ponovo najmanja promena izmerena kod K (smanjenje 2,3 puta). Razlike u efektu koji je modifikacija PME-om imala na različite pektinske polisaharide je ukazala na različite afinitete ovog enzima ka njima,



pri čemu afinitet nije bio najveći ka K koji je imao najveći DM. *Fraeye et al.* [80] su poredili pektine različitih DM iz jabuke i jagode, i zaključili da je afinitet istog PME koji je primenjen u ovom radu (*NovoShape*) bio veći ka pektinu jagode koji je imao manji DM zbog različito raspoređenih bočnih lanaca koji mogu izazvati sterne smetnje i na taj način zaštititi metil estre od hidrolize PME-om.

Tabela 14. Stepeni metoksilacije (mol/100 mol GalA) nemodifikovanih i PME-modifikovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid*	Trajanje enzimske reakcije (min)*	DM*	Pektinski polisaharid**	Trajanje enzimske reakcije (min)**	DM**
K	0	52,0±0,3 <sup>a</sup>	XC	0	29,2±1,9 <sup>a</sup>
	30	40,9±0,1 <sup>b</sup>		30	16,9±0,0 <sup>b</sup>
	60	23,0±0,7 <sup>c</sup>		60	8,4±0,2 <sup>c</sup>
XC+K	0	32,6±1,5 <sup>a</sup>	XCP	0	34,4±1,2 <sup>a</sup>
	30	20,0±1,2 <sup>b</sup>		30	19,3±0,2 <sup>b</sup>
	60	9,2±0,6 <sup>c</sup>		60	10,0±0,6 <sup>c</sup>
A+K	0	42,4±1,4 <sup>a</sup>	A	0	47,3±2,7 <sup>a</sup>
	30	27,9±4,3 <sup>ab</sup>		30	21,0±2,1 <sup>b</sup>
	60	12,5±0,0 <sup>b</sup>		60	19,5±0,0 <sup>b</sup>
AXC+K	0	41,1±1,3 <sup>a</sup>	AXC	0	45,7±1,1 <sup>a</sup>
	30	23,1±0,2 <sup>b</sup>		30	24,9±0,2 <sup>b</sup>
	60	11,6±0,0 <sup>c</sup>		60	15,0±0,0 <sup>c</sup>

\* kolone sa kiselo ekstrahovanim pektinskim polisaharidima

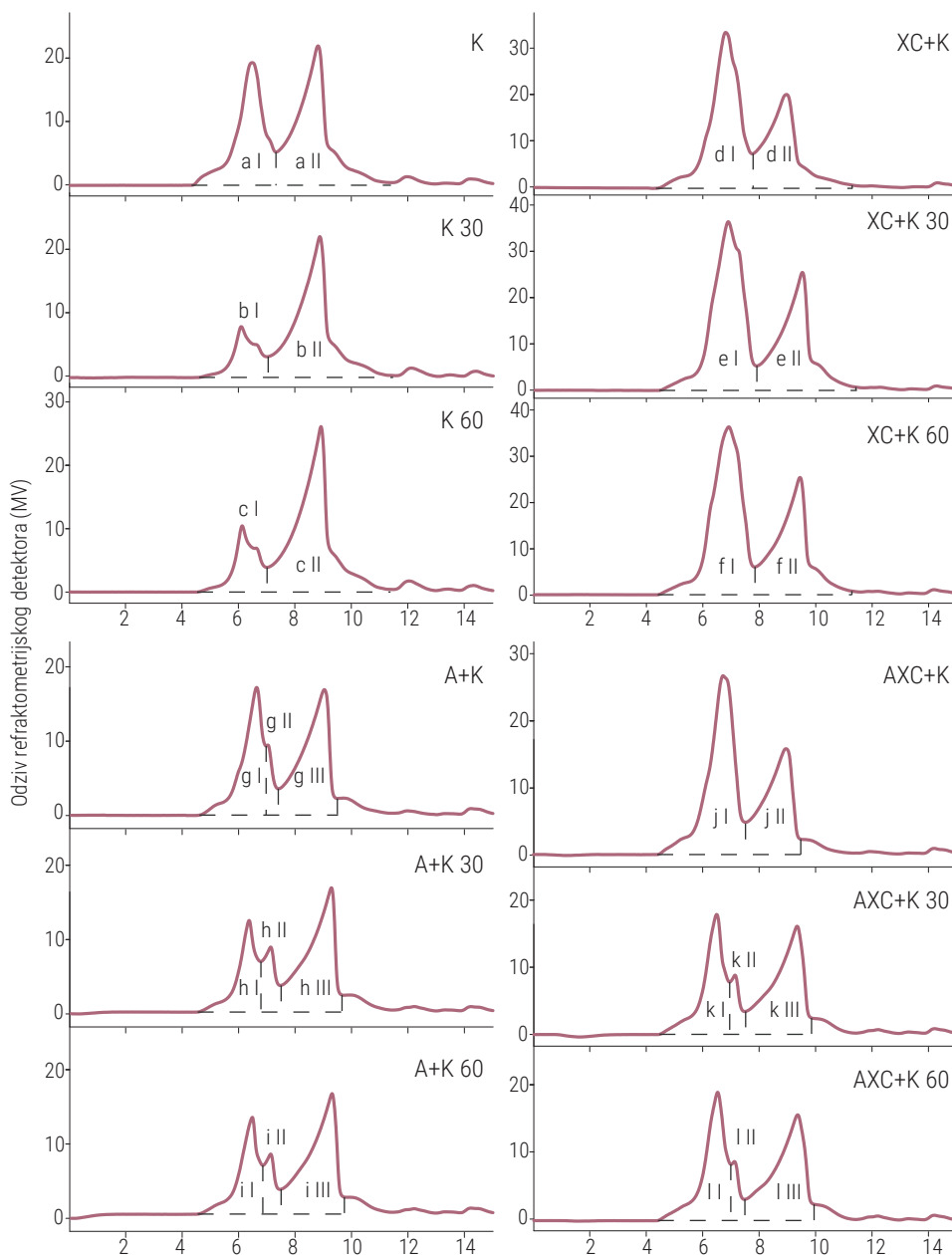
\*\* kolone sa enzimski ekstrahovanim pektinskim polisaharidima

#### 4.4.2.2. Molarna masa pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom

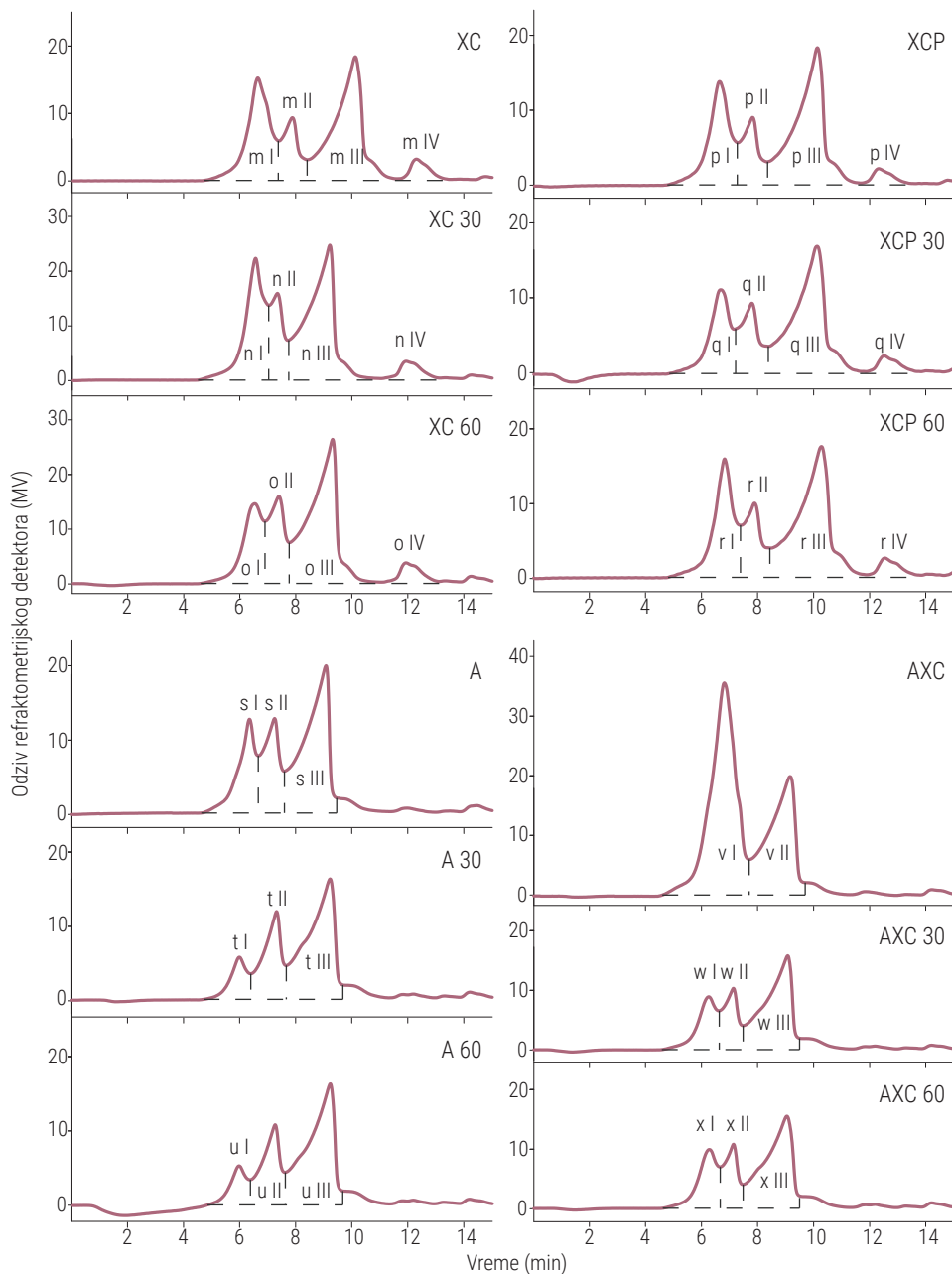
GP-HPLC hromatogrami PME-modifikovanih pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrahiranjima, kao i onih dobijenih enzimskim ekstrahiranjima su prikazani zajedno sa GP-HPLC profilima nemodifikovanih pektinskih polisaharida na slikama 25 i 26, redom, radi lakšeg praćenja promena usled dejstva pektin-metilesteraze. Molarne mase, disperznost i površine frakcija različitih molarnih masa date su u tabeli P5 za modifikovane pektinske polisaharide dobijene kiselim ekstrahiranjima i u tabeli P6 za modifikovane pektinske polisaharide dobijene u enzimskim ekstrahiranjima.

Dejstvom pektin-metilesteraze došlo je do povećanja molekulske mase svih modifikovanih pektinskih polisaharida osim XC+K. Ovaj rezultat se može objasniti činjenicom da je enzim katalizovao deesterifikaciju metoksilovanih karboksilnih grupa, nakon čega je, prema literaturi [2] moglo doći do transesterifikacije između novonastalih slobodnih COO<sup>-</sup> grupa u HG domenima različitih molekula. Ovo je verovatno dovelo do formiranja agregata prividno većih molarnih masa i primećenog otežanog filtriranja uzoraka pre unošenja u hromatografsku kolonu, što je za posledicu moglo imati selektivno uklanjanje velikih agregata i dobijanje nereprezentativnog uzorka. Isti fenomen su primetili i *Hunter and Wicker* [153] kod komercijalnog citrusnog pektina modifikovanog fungalnim PME. Dodatno, smanjenje ukupne površine pikova na hromatogramima nakon modifikacije PME-om (osim kod XC+K) u poređenju sa onom pre nje se može smatrati još jednim elementom za potvrdu ovakvog objašnjenja

dobijenih rezultata. Kako se pektinski molekuli u rastvoru nalaze u dinamičkoj ravnoteži sa svojim agregatima [6,151], moguće je da je dejstvom PME došlo do izvođenja ove reakcije asocijacije (i disocijacije) pektinskih molekula iz ravnoteže, što se ogledalo u smanjenju površina frakcija manjih molarnih masa u korist agregacije u veće molekulske strukture nakon PME-modifikacije.



Slika 25. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama modificiranih dejstvom pektin-metilesteraze u trajanju od 30 min i 60 minuta (obeleženi sa 30 i 60, redom) i odgovarajućih nemodifikovanih pektina



Slika 26. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama modificiranih dejstvom pektin-metilesteraze u trajanju od 30 min i 60 minuta (obeleženi sa 30 i 60, redom) i odgovarajućih nedomodifikovanih pektina

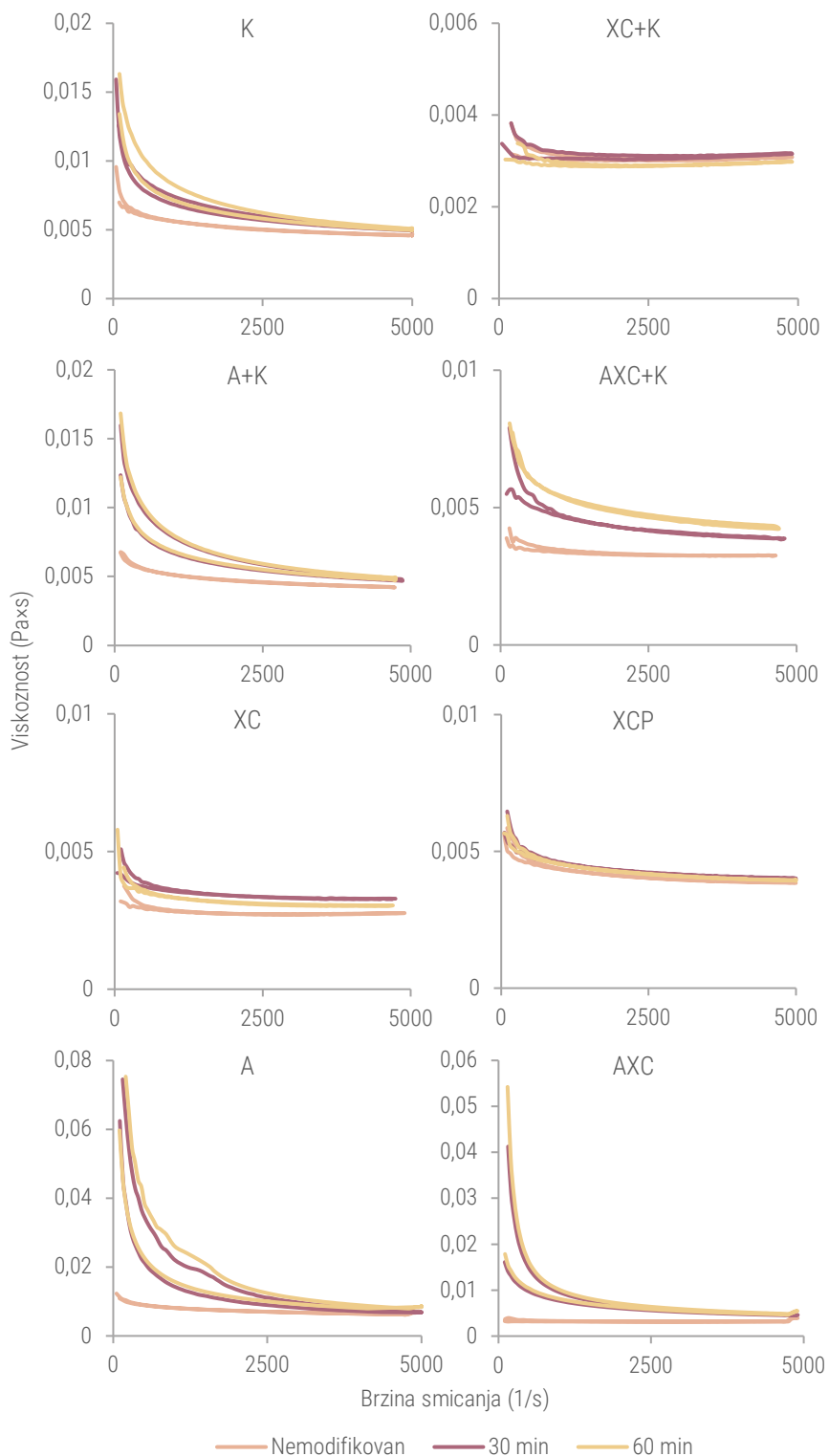
Hromatogrami AXC i AXC+K nakon PME-modifikacije su se razlikovali od hromatograma ostalih modifikovanih pektinskih polisaharida, jer je kod njih došlo do formiranja novog pika (k II i l II kod modifikovanog AXC+K nakon 30 min i 60 min, redom, i w II i x II kod modifikovanog AXC nakon 30 min i 60 min, redom) koji se kao rame izdvojio od pika najveće molarne mase. Kako se ukupna površina frakcija modifikovanih uzoraka (AXC+K i AXC) smanjila u odnosu na površinu pikova nemodifikovanih AXC+K i AXC, moguće je ovu promenu pripisati formiranju agregata usled umrežavanja karboksilnih grupa [2]. Razlika u obliku i broju pikova frakcija različitih molarnih masa nakon PME-modifikacije ovih supstrata je mogla biti prouzrokovana razlikama u njihovoj strukturi, a samim tim i fizičkoj dostupnosti aktivnih mesta za deesterifikaciju AXC+K i AXC ovim enzimom. Disperznosti molarnih masa pektinskih polisaharida nakon PME-modifikacije su ostale približno iste (K, A+K i AXC+K) ili su se povećale (XC, XCP, A i AXC) što je za posledicu imalo širenje pikova molekulskih frakcija usled formiranja agregata većih molarnih masa, kao što je već ranije diskutovano. PME-tretmanom je kod XC+K došlo do smanjenja molarne mase, kao i disperznosti, pri čemu su površine pikova na hromatogramu ostale nepromenjene u odnosu na nemodifikovan supstrat. Smanjenje molarne mase je takođe zapaženo i kod komercijalnog citrusnog pektina nakon tretmana fungalnim PME [81], što je bilo u skladu sa, u ovom slučaju, PME-modifikacijom XC+K.

Generalno, veći intenziteti u promenama molarnih masa nakon modifikacije ovim enzimom su primećeni kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida nego kod onih koji su dobijeni sa dodatnim korakom kisele ekstrakcije. Ovo bi se moglo objasniti razlikama u strukturi i različitom raspodelom bočnih lanaca koji na taj način mogu fizički ometati pristup PME metil esterifikovanim karboksilnim grupama, štiteći ih od njegove aktivnosti [80].

#### 4.4.2.3. Viskoznost pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom

Krive proticanja pektinskih polisaharida modifikovanih dejstvom PME su prikazane kao zavisnost viskoznosti od sile smicanja i date su uporedo sa krivama proticanja nemodifikovanih pektinskih polisaharida kako bi se lakše ispratilo uticaj ovog enzima na viskoznost pektinskih polisaharida (slika 27).

Enzimska modifikacija pektin-metilesterazom je za posledicu imala povećanje viskoznosti modifikovanih pektinskih polisaharida u poređenju sa odgovarajućim nemodifikovanim polisaharidima, kod svih uzoraka osim kod XC+K i XCP gde su promene u viskoznosti bile zanemarljive (promene manje od 5%). Povećanje viskoznosti je bilo u skladu sa rezultatima dobijenim za promenu molarne mase modifikovanih pektinskih polisaharida dobijene na osnovu analize GP-HPLC profila. Naime, kako viskoznost polisaharida direktno zavisi od njihove molarne mase, očekivano je porast u prividnoj molarnoj masi agregata doveo do povećanja viskoznosti PME-modifikovanih pektinskih polisaharida. Do ovog povećanja je moglo doći usled umrežavanja deesterifikovanih karboksilnih grupa kao što su primetili *Canela-Xandri et al.* [59] za jabučni, breskvin i citrusni pektin modifikovan dejstvom *NovoShape* komercijalnog enzimskog preparata. Najveće povećanje u viskoznosti nakon delovanja PME je primećeno kod AXC - 2,2 i 2,3 puta nakon 30 i 60 min tretmana, redom. Dodatno, kod K, A+K, A i AXC je nakon tretmana PME došlo do povećanja tiksotropnih svojstava. Ova pojava se takođe može smatrati indirektnom potvrdom predloženog objašnjenja fenomena nakon modifikacije pektinskih molekula PME-om; naime, deesterifikacija je mogla omogućiti umrežavanje karboksilnih grupa i nastajanje struktura koje su se takom podvrgavanja sili smicanja ponašale slično gelu ali su se nakon duže izloženosti ovoj sili reverzibilno vratile u stanje koloidnog rastvora, u skladu sa objašnjenjem predloženim u literaturi [149].



Slika 27. Viskoznost nemodifikovanih i PME-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

Generalno je PME-modifikacija u većoj meri uticala na povećanje viskoznosti enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida nego na povećanje viskoznosti uzorka dobijenih u enzimski potpomognutim kiselim ekstrahiranjima. Ovo je u skladu sa zapažanjima kod promena molarnih masa uzoraka nakon modifikacije PME-om, gde je, takođe, veći intenzitet u promenama  $M_w$  bio zapažen kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, što je pripisano razlikama u strukturi i raspodeli bočnih lanaca u molekulima.

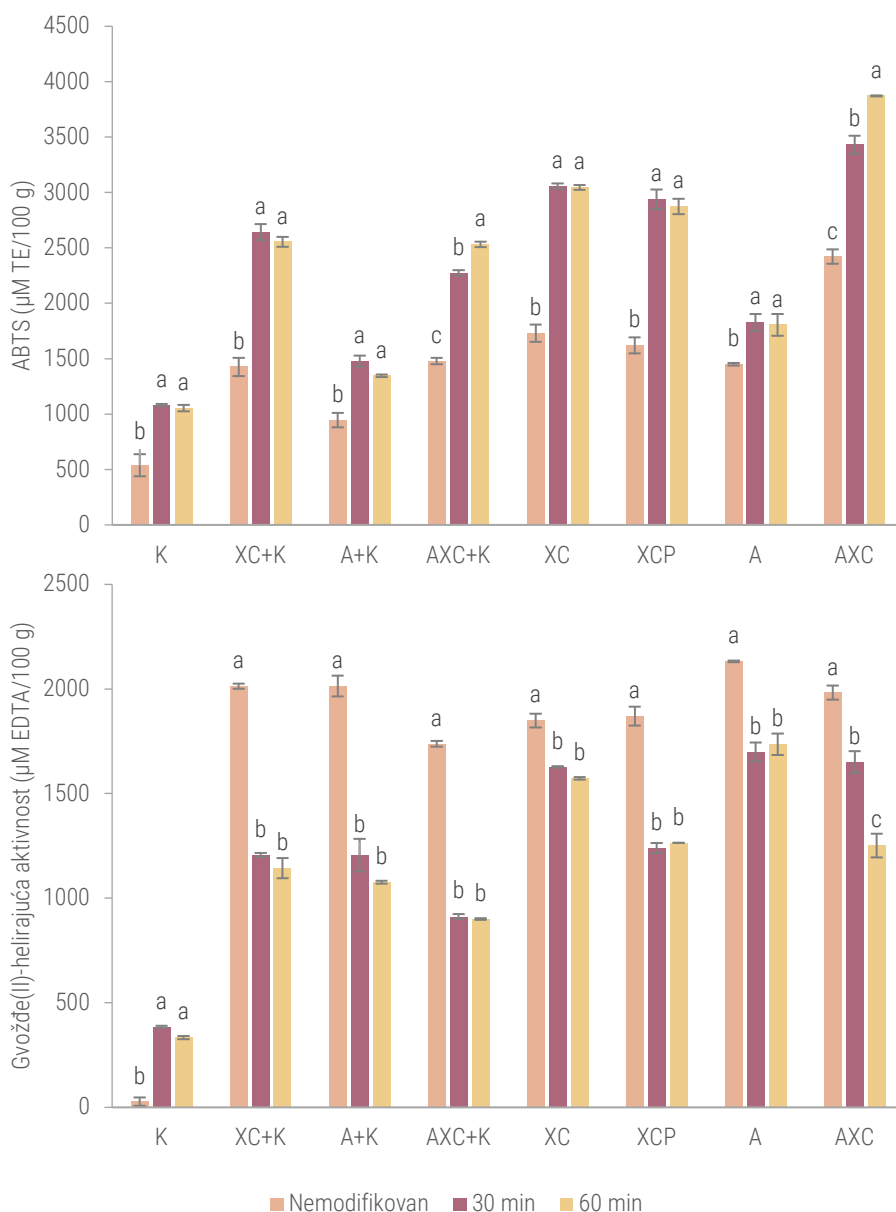
#### 4.4.2.4. *In-vitro* antioksidativna aktivnost i $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida deesterifikovanih pektin-metilesterazom

Na slici 28 su prikazane sposobnost neutralizacije ABTS radikal-katjona i  $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih dejstvom PME. Dobijene vrednosti za modifikovane pektinske polisaharide su prikazane uporedo sa vrednostima antioksidativnih aktivnosti odgovarajućih nemođifikovanih pektinskih polisaharida.

ABTS antioksidativna aktivnost modifikovanih pektinskih polisaharida je bila značajno povećana u odnosu na odgovarajuće nemođifikovane pektinske polisaharide. Ovo pokazuje da je PME-modifikacija imala pozitivan efekat na sposobnost neutralizacije ABTS radikala pektinskih polisaharida muskatne tikve. Isto su uočili i *Zhang et al.* [77] kod pektina gloga koji je bio tretiran PME-om. Antioksidativna svojstva pektinskih polisaharida zavise od njihovih stepena metoksilacije, a kako se dejstvom pektin-metilesteraze DM smanjuje, to znači da postoji više slobodnih hidroksilnih grupa za neutralizaciju ABTS radikala [128,129]. Najveće antioksidativne aktivnosti su izmerene kod AXC nakon 60 min PME-tretmana (skoro 3900  $\mu M$  TE/100 g), dok je među pektinskim polisaharidima dobijenim kiselim ekstrahiranjima najveću aktivnost imao XC+K nakon 30 min delovanja enzima (oko 2600  $\mu M$  TE/100 g). Suprotno tome, najveća relativna promena antioksidativne aktivnosti modifikovanog u odnosu na nemođifikovani pektinski polisaharid je izmerena kod K čija je aktivnost nakon 30 min modifikacije PME-om duplo povećana, iako je kod ovog pektinskog polisaharida došlo do najmanjeg relativnog smanjenja DM. Najmanje povećanje (24%) primećeno je kod A, a kod svih ostalih pektinskih polisaharida je došlo do povećanja ove aktivnosti oko 70%, što je bilo veće od povećanja ABTS aktivnosti kod PME-modifikovanog pektina gloga [77].

Suprotno promenama antioksidativne aktivnosti, izražene preko sposobnosti neutralizacije ABTS radikala, gvožđe(II)-helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih pektin-metilesterazom se smanjila u odnosu na nemođifikovane pektinske polisaharide kod svih osim K. Iako se u literaturi pronalaze podaci o tome da vezivanje dvovalentnih jona uveliko zavisi od DM pektinskih polisaharida [50], to nije bio slučaj sa PME modifikovanim pektinskim polisaharidima muskatne tikve. Dodatno, ako je, s obzirom na pretpostavku *Voragen et al.* [2], dejstvom PME došlo do umrežavanja deesterifikovanih HG domena pektinskih polisaharida, onda je ostalo manje slobodnih  $COO^-$  grupa za heliranje dvovalentnih jona. Takođe, DM nije jedina karakteristika pektinskih polisaharida koja može uticati na njihovu sposobnost heliranja. Veliki uticaj imaju i raspodela metoksilovanih GalA molekula unutar molekula pektina, DA, kao i prisustvo različitih neutralnih šećera u bočnim lancima, što čini zavisnost  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti od strukture pektinskih polisaharida veoma kompleksnom [50].





Slika 28. ABTS i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost nemodifikovanih i PME-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

Intenziteti promena ABTS i Fe<sup>2+</sup>-helirajuće aktivnosti PME-modifikovanih pektinskih polisaharida se gotovo nisu razlikovali između onih dobijenih u enzimski potpomognutim ekstrakcijama i onih dobijenih u enzimskim ekstrakcijama. Ovo nije u skladu sa razlikama koje su uočene u efektima koje je ovaj enzim imao na molarne mase i viskoznosti različito ekstrahovanih uzoraka. S obzirom da ABTS i gvožđe(II)-helirajuća aktivnost zavise ne samo od molarne mase, već i od drugih hemijskih i strukturnih karakteristika, razlike koje su bile prisutne između promena u Mw i promena u antioksidativnoj i helirajućoj aktivnosti bi se mogle pripisati upravo tim razlikama u sastavu i strukturi modificovanih pektinskih polisaharida [50,128–130].

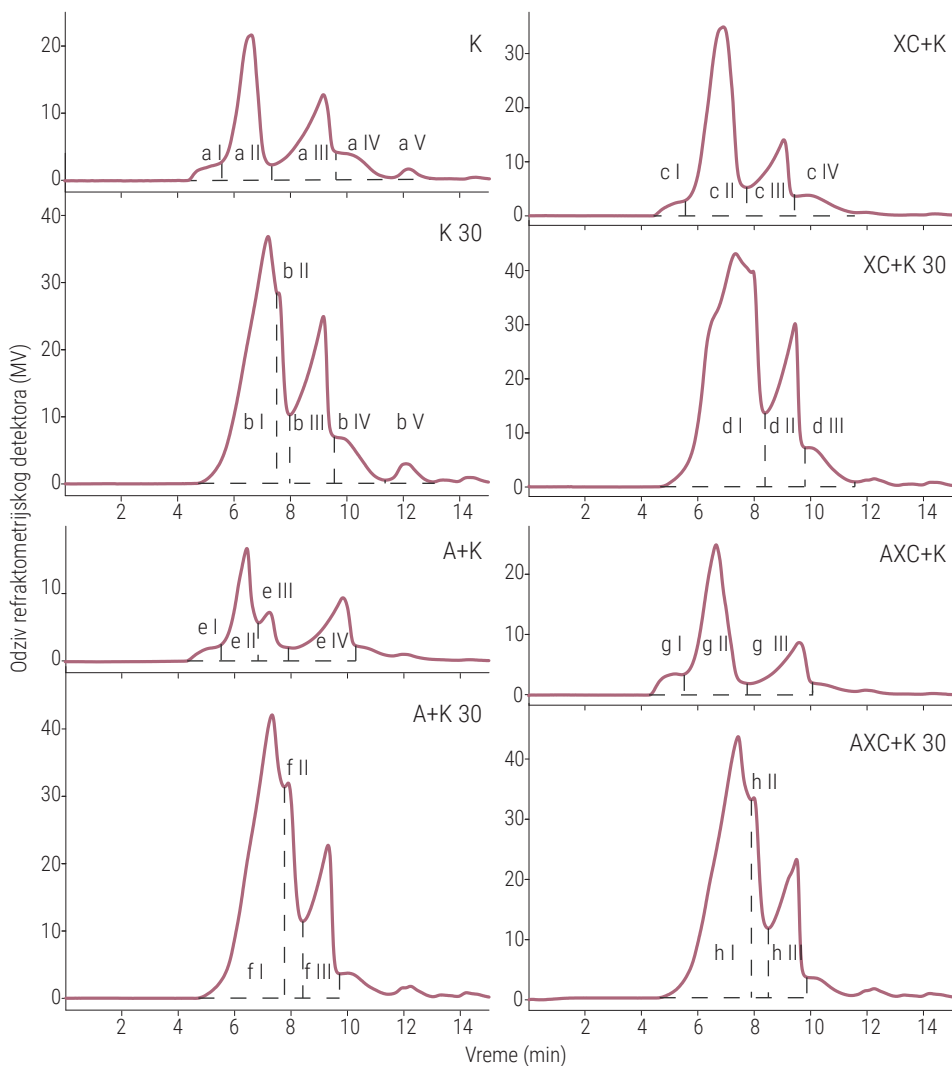
#### **4.4.3. Enzimska modifikacija pektinskih polisaharida muskatne tikve združenim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze**

Združene endo-poligalakturonaza i pektin-metilesteraza su korišćene za enzimsku modifikaciju pektinskih polisaharida muskatne tikve. Karakteristike i svojstva enzimski modifikovanog pektinskog polisaharida su upoređene sa karakteristikama i svojstvima odgovarajućeg nemodifikovanog pektinskog polisaharida u cilju praćenja promena koje je ovakav tretman prouzrokovao. Enzimska modifikacija je izvedena na pektinskim polisaharidima pripremljenim u istoj koncentraciji kao i za modifikaciju samostalnom endo-poligalakturonazom (2%) u trajanju od 30 min, što se pokazalo kao najbolje u prethodnim eksperimentima. Endo-poligalakturonaza i pektin-metilesteraza su dozirane u istim koncentracijama kao i kada su ovi enzimi korišćeni samostalno (0,13 U/g i 0,0125 U/g, redom).

##### **4.4.3.1. Molarna masa pektinskih polisaharida modifikovanih združenim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze**

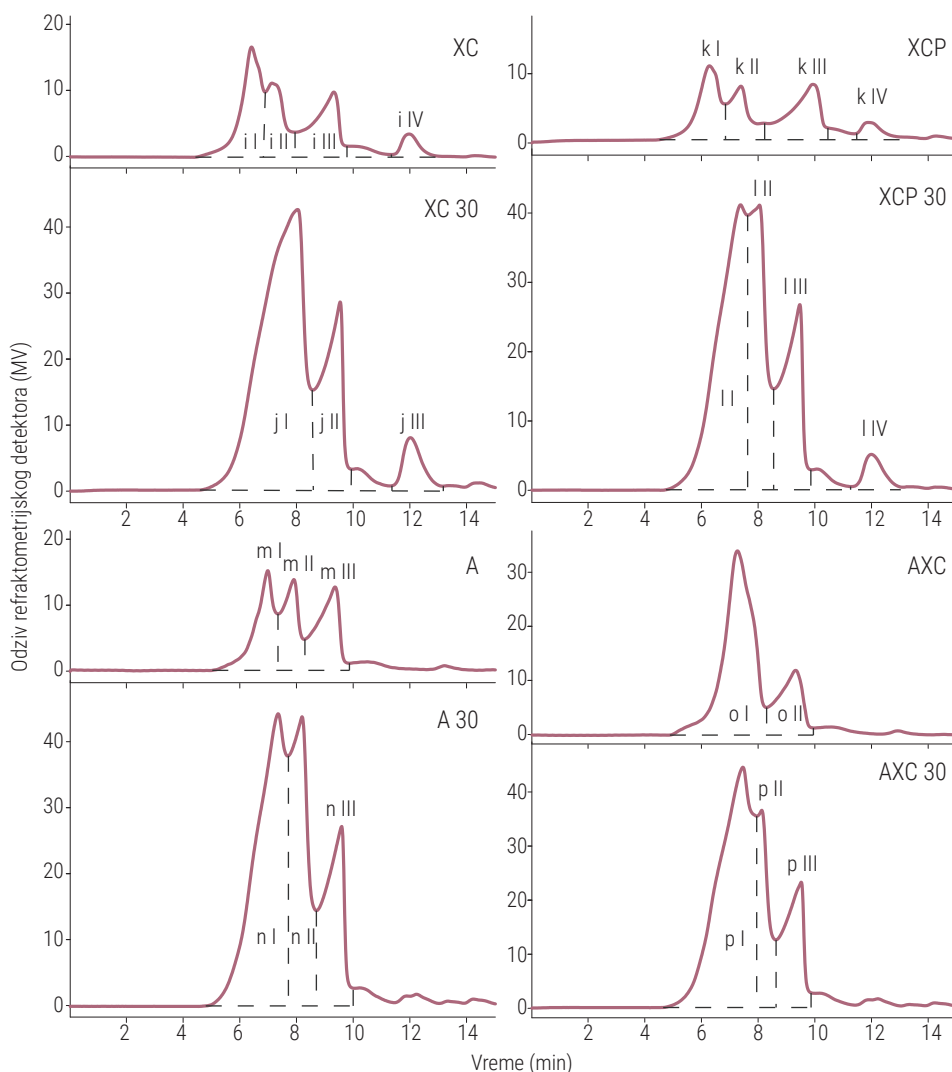
GP-HPLC spektri pektinskih polisaharida modifikovanih združenim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze su prikazani na slici 29 (pektinski polisaharidi dobijeni kiselim ekstrakcijama) i na slici 30 (pektinski polisaharidi dobijeni enzimskim ekstrakcijama). Molarne mase, disperznost i površine frakcija različitih molarnih masa su date u tabeli P7 za modifikovane pektinske polisaharide dobijene kiselim ekstrakcijama i u tabeli P8 za modifikovane pektinske polisaharide dobijene u enzimskim ekstrakcijama, zajedno sa odgovarajućim nemodifikovanim pektinskim polisaharidima radi lakšeg praćenja promena izazvanih dejstvom korišćenih enzima.

Združeno dejstvo ePG i PME je u velikoj meri uticalo na molarnu masu pektinskih polisaharida što se može videti na njihovim GP-HPLC profilima. Generalno, kod svih modifikovanih pektinskih polisaharida je došlo do smanjenja molarne mase i pomeranja pikova ka većim retencionim vremenima. Ramena koja su bila prisutna na pikovima najviših molarnih masa svih nemodifikovanih kiselih ekstrahovanih pektinskih polisaharida (a I, c I, e I i g I) su nestala nakon enzimske modifikacije, najverovatnije zbog disocijacije agregata velikih molarnih masa koji odgovaraju ovim ramenima. Ovo bi moglo biti objašnjeno izvođenjem ravnotežne reakcije asocijacije (i disocijacije) molekula pektina [6,151] iz ravnoteže zbog intenzivne depolimerizacije pektinskih polisaharida, uzrokovano združenim dejstvom ova dva enzima. Najveća smanjenja molarne mase su primećena kod A+K i XC, pri čemu je molarna masa pikova e III i i I smanjena čak 3 puta. Do oko dvostrukog smanjenja molarne mase je došlo kod XC+K (c III), A+K (e II), XC (i III) i XCP (k I i k II), dok je molarna masa svih ostalih pikova smanjena između 1,2 i 1,5 puta. Ova smanjenja molarne mase pektinskih polisaharida se mogu pripisati dejstvu ePG koji katalizuje depolimerizaciju HG domena u molekulu pektina, pri čemu je efikasnost ovog enzima u depolimerizaciji povećana deesterifikacijom metoksilovanih karboksilnih grupa delovanjem PME [2]. Naime, poznato je da je depolimerizacija visokometoksilovanih pektina endo-poligalakturonazom manje efikasna zbog toga što prisustvo metoski grupa ometa prilaz enzima njegovom mestu delovanja [2,69]. Ovo je u skladu sa većim smanjenjem molarnih masa pektinskih polisaharida nakon ePG+PME-modifikacije nego nakon samostalne ePG-modifikacije (poglavlje 4.4.1.3). Disperznost molarnih masa različitih molekulskih frakcija pektinskih polisaharida je primetno smanjena nakon ove enzimske modifikacije u odnosu na nemodifikovane uzorke, ukazujući na uniformniju raspodelu molarnih masa.



Slika 29. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih kiselim ekstrakcijama modifikovanih združenim dejstvom ePG i PME u trajanju od 30 min (obeleženi sa 30) i odgovarajućih nedomodifikovanih pektina

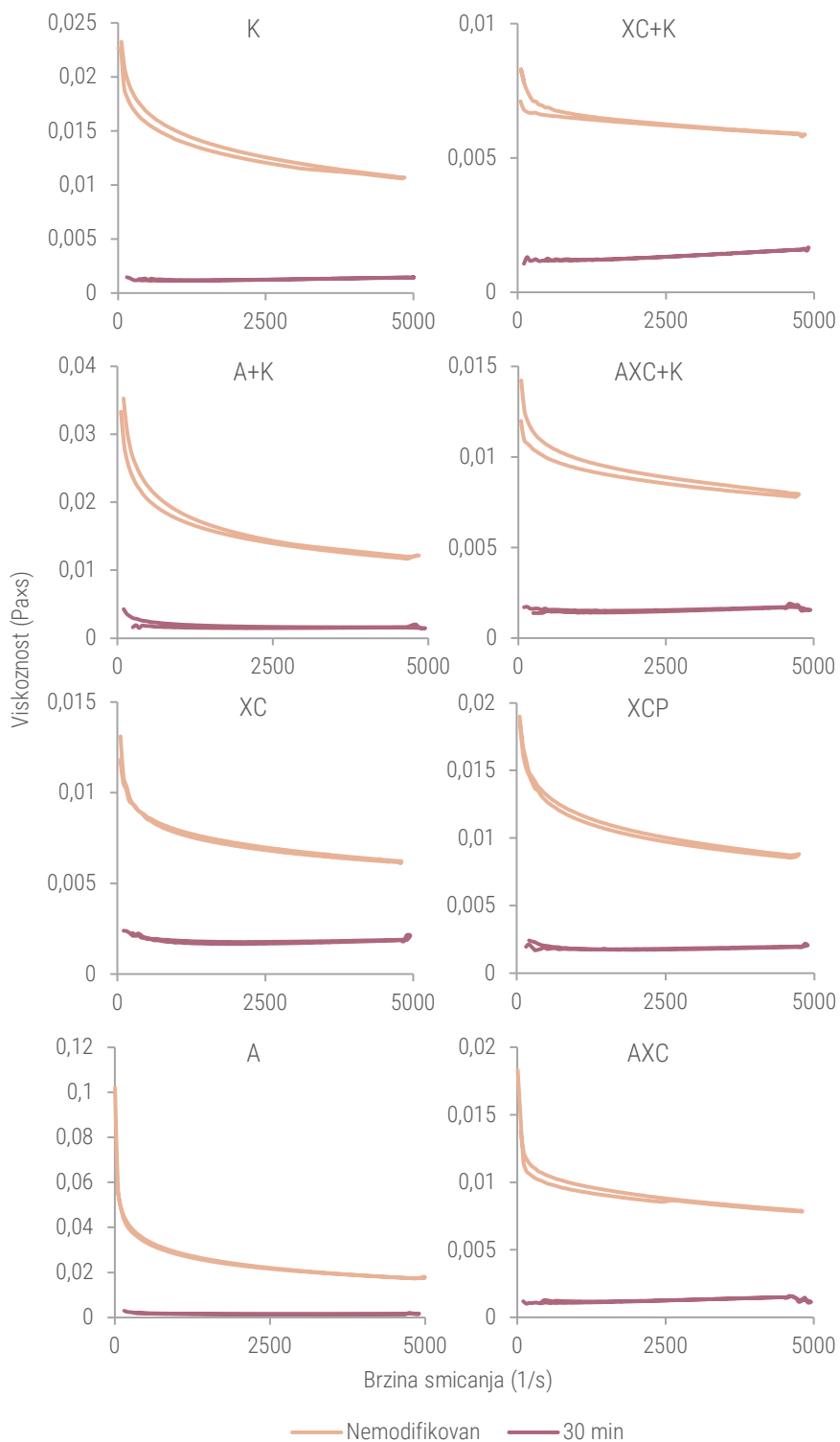
Kada su poređeni intenziteti promena na GP-HPLC profilima (smanjenje  $M_w$  i povećanje površina pikova) nakon ePG+PME-modifikacije, generalno je primećeno da je do većih promena na hromatogramima došlo kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, nego kod onih dobijenih u enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama. Suprotno je primećeno u slučaju promena  $M_w$  nakon ePG-modifikacije, što ukazuje na to da se efekat združenog dejstva ePG i PME ispoljavao u većem intenzitetu na različitim pektinskim polisaharidima u odnosu na efekat samostalnog ePG. Ovo bi moglo biti posledica neuniformne raspodele metil estara u molekulima pektinskih polisaharida, pri čemu je moguće da su nakon dejstva PME deesterifikovani molekuli GalA bili raspoređeni u molekulu na način koji je omogućio olakšan pristup enzima supstratu; naime, poznato je da je intenzitet delovanja ePG izraženiji na deesterifikovanom supstratu sa više uzastopnih neesterifikovanih molekula GalA [2,69].



Slika 30. GP-HPLC profili pektinskih polisaharida dobijenih enzimskim ekstrakcijama modificiranih združenim dejstvom ePG i PME u trajanju od 30 min (obeleženi sa 30) i odgovarajućih nemodificiranih pektina

#### 4.4.3.2. Viskoznost pektinskih polisaharida modificiranih združenim dejstvom endopoligalakturonaze i pektin-metilesteraze

Krive proticanja pektinskih polisaharida modificiranih združenim dejstvom ePG i PME su prikazane kao zavisnost viskoznosti od sile smicanja i date su uporedo sa krivama proticanja nemodificiranih pektinskih polisaharida kako bi se lakše ispratio efekat sinergističkog delovanja enzima (slika 31).



Slika 31. Viskoznost nemodifikovanih i ePG+PME-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

Generalno, sinergističko dejstvo ePG i PME je imalo primetan uticaj na smanjenje viskoznosti svih ispitivanih pektinskih polisaharida. Viskoznost A je nakon enzimskog tretmana bila manja čak 14 puta, dok je viskoznost K umanjena 10 puta u odnosu na odgovarajuće nemodifikovane pektinske polisaharide. Najmanja promena u viskoznosti je zapažena kod XC i XC+K kod kojih je umanjeno bilo 4 i 5 puta, redom. Smanjenja viskoznosti pektinskih polisaharida nakon združene modifikacije ePG-om i PME-om su bila veća od smanjenja viskoznosti nakon modifikacije samostalnim ePG (poglavlje 4.4.1.4), što je u skladu sa činjenicom da ePG ispoljava veći afinitet ka supstratu sa nižim DM, i samim tim u većoj meri depolimerizuje takve pektine [2,69]. Smanjenje viskoznosti modifikovanih pektinskih polisaharida je bilo u skladu i sa smanjenjem molarne mase nakon ovakve enzimske modifikacije, kao što je to i konstatovano analizom njihovih GP-HPLC profila; poznato je, naime, da molekuli manjih molarnih masa pružaju manji otpor u proticanju tečnosti nego što je slučaj sa molekulima velikih molarnih masa [46,132].

Nakon poređenja efekta koje je ePG+PME-modifikacija imala na viskoznost različito ekstrahovanih pektinskih polisaharida, primećeno je da je do većih relativnih smanjenja viskoznosti nakon ove modifikacije došlo kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, nego kod uzorka dobijenih u enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama. Ovo je bilo u skladu sa većim promenama na GP-HPLC profilima enzimski dobijenih supstrata nakon iste modifikacije.

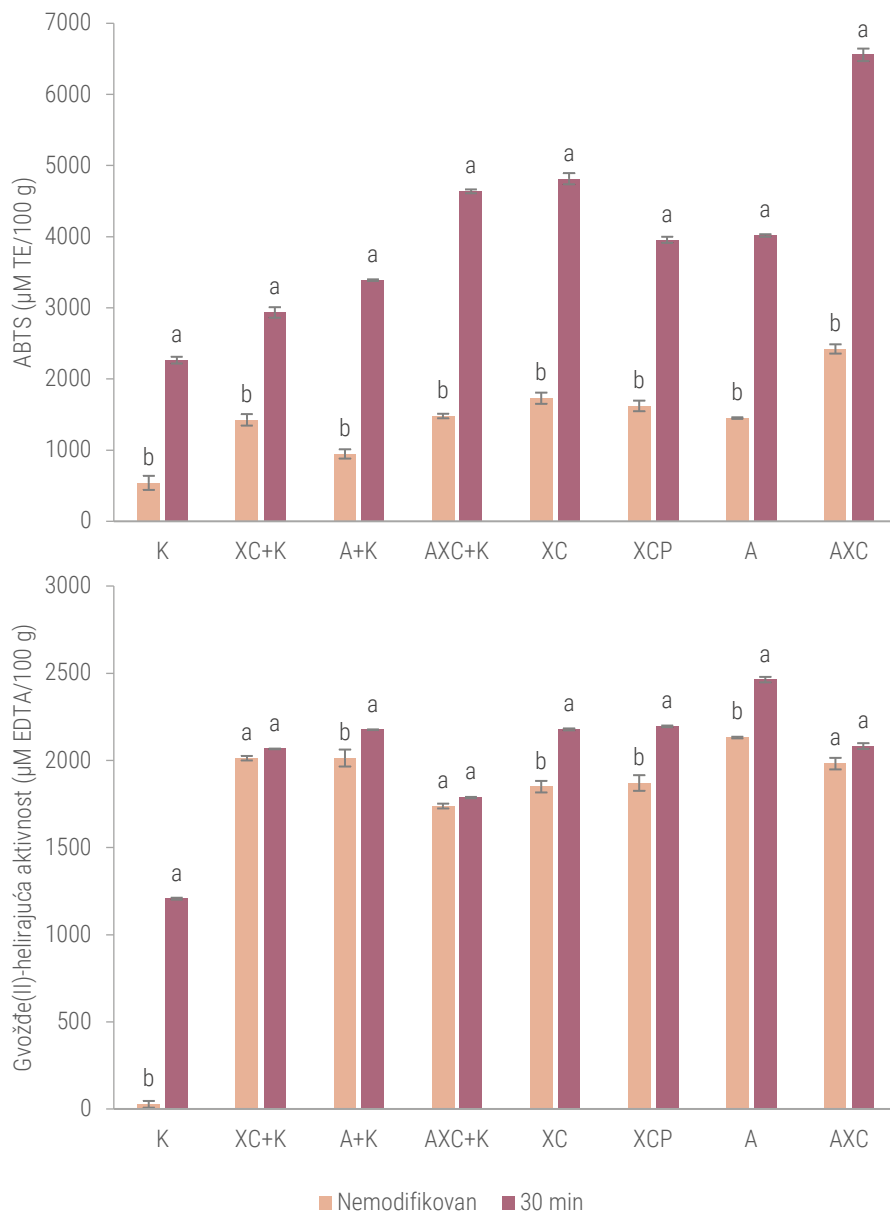
#### **4.4.3.3. *In-vitro* antioksidativna aktivnost i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih združenim dejstvom endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze**

Sposobnost neutralizacije ABTS radikal-katjona i Fe<sup>2+</sup>-helirajuća aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih združenim dejstvom ePG i PME su prikazane na slici 32 za sve pektinske polisaharide muskatne tikve. Dobijene vrednosti za modifikovane pektinske polisaharide su prikazane uporedo sa vrednostima odgovarajućih svojstava nemodifikovanih pektinskih polisaharida u cilju lakšeg praćenja uticaja ove enzimske modifikacije na ovu biološku aktivnost.

ABTS antioksidativna aktivnost pektinskih polisaharida modifikovanih simultanim dejstvom ePG i PME je bila statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećana u odnosu na odgovarajuće nemodifikovane pektinske polisaharide, ukazujući na pozitivan efekat ovakvog tretmana na antioksidativna svojstva pektinskih polisaharida. Ovo je u skladu sa molarnim masama i DM modifikovanih uzoraka; molekuli manjih Mw imaju veći broj dostupnih aktivnih grupa na svojoj površini koje su sposobne da neutralizuju ABTS slobodne radikale [128], dok pektini sa nižim DM imaju više slobodnih karboksilnih grupa koje doprinose neutralizaciji slobodnih radikala [128–130]. Najveća antioksidativna aktivnost među enzimski dobijenim pektinskim polisaharidima je određena kod AXC (6500  $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$ ), a kod kiselo dobijenih pektinskih polisaharida kod AXC+K (4600  $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$ ). Trend najvećih apsolutnih vrednosti sposobnosti neutralizacije ABTS radikala nije odgovarao i najvećim relativnim promenama ovih aktivnosti kao posledice enzimske modifikacije. Najveća promena je primećena združenom enzimskom modifikacijom K nakon koje je došlo do četvorostrukog povećanja antioksidativne aktivnosti, dok je sledeće po iznosu relativno povećanje od 3,6 puta izmereno kod A+K. Svi enzimski dobijeni polisaharidi su imali povećanje antioksidativne aktivnosti od oko 2,5 puta, a najmanja promena je zabeležena kod XC+K (povećanje 2 puta), što je bilo manje od povećanja u antioksidativnoj aktivnosti određenoj istim testom nakon enzimske modifikacije komercijalnog citrusnog pektina združenim endo-poligalakturonazom, pektin-metilesterazom i pektin-liazom [154]. Dodatno,



antioksidativna aktivnost je bila povećana u većem iznosu nakon ove ePG+PME-modifikacije, nego kada su pektinski polisaharidi modifikovani samostalnom endo-poligalakturonazom, što je u skladu sa većim afinitetom ePG ka supstratima sa nižim DM [2,69].



Slika 32. ABTS i  $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost nemodifikovanih i ePG+PME-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve

Promene u vrednostima  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti prouzrokovane združenom enzimskom modifikacijom nisu bile tako izražene kao promene u ABTS aktivnostima. Najveća aktivnost nakon enzimskog tretmana združenim ePG i PME je određena kod A i iznosila je 2400  $\mu\text{M EDTA}/100\text{g}$ , praćena sa A+K, XC i XCP kod kojih je helirajuća aktivnost bila oko 2200  $\mu\text{M EDTA}/100\text{g}$ . Gvožđe(II)-helirajuća

aktivnost se nije značajno ( $p>0,05$ ) promenila nakon enzimske modifikacije kod XC+K, AXC+K i AXC. Jako mala povećanja helirajuće aktivnosti su primećena kod A+K (5%), i XC, XCP i A (oko 15%), dok se najveća promena desila kod K - povećanje čak 44 puta. Suprotno ovome, *Huang et al.* [154] su dobili smanjenje  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti citrusnog pektina nakon tretmana komercijalnim enzimskim preparatom sa aktivnostima endo-poligalakturonaze, pekin-metilesteraze i pektin-liaze, dok je istovremeno došlo do porasta antioksidativne aktivnosti (određena ABTS testom). Oni su zaključili da metal-helirajuća aktivnost nije u direktnoj vezi sa sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala jer je reč o različitim mehanizmima reakcije. Stoga se može pretpostaviti da su dobijene vrednosti efekta združenog delovanja dva korišćena enzima na  $Fe(II)$ -helirajuću aktivnost bile rezultat razlika u sastavu i strukturi ekstrahovanih pektinskih polisaharida, kao i mnoštva parametara koji na ovu aktivnost utiču [50].

Kada su poređeni intenziteti povećanja ABTS aktivnosti ePG+PME-modifikovanih pektinskih polisaharida dobijenih kiselim i enzimskim ekstrakcijama, primećeno je da način ekstrakcije nije imao veliki uticaj na efekat koji su enzimi za modifikaciju imali na ovu aktivnost. Ovo nije bilo u skladu sa većim promenama  $M_w$  i viskoznosti koje su zabeležene kod enzimski ekstrahovanih uzoraka nakon modifikacije združenim ePG-om i PME-om, nego kod onih dobijenih sa dodatnim korakom kisele ekstrakcije. Sa druge strane, povećanje  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti je bilo veće kod enzimski dobijenih pektinskih polisaharida što je u skladu sa zapažanjima o većem smanjenju  $M_w$  i viskoznosti istih supstrata nakon ePG+PME-modifikacije.

#### 4.4.4. Poređenje uticaja različitih enzimskih tretmana na osobine i svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve

U ovom poglavlju će biti dat kratak pregled uticaja koji su različiti enzimski tretmani imali na karakteristike i svojstva pektinskih polisaharida muskatne tikve. Primenom različitih enzima su dobijeni modifikovani pektinski polisaharidi koji su se razlikovali od nemodifikovanih pektinskih polisaharida u pogledu stepena metoksilacije, molarnih masa, viskoznosti, antioksidativne i  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti.

Do smanjenja molarne mase pektinskih polisaharida je došlo onda kada su oni bili tretirani endo-poligalakturonazom zbog njene depolimerizujuće aktivnosti. U slučajevima kada je ovaj enzim korišćen samostalno, molarne mase ( $M_w$ ) su bile umanjene u proseku 1,1 do 1,8 puta. Do većeg smanjenja je došlo kada je ovaj enzim delovao združeno sa pektin-metilesterazom (smanjenje  $M_w$  od 1,2 do 3 puta). Naime, endo-poligalakturonaza svoju aktivnost najbolje ispoljava na deesterifikovanim pektinskim polisaharidima [2], što objašnjava dobijanje pektinskih polisaharida manjih molarnih masa onda kada su u njihovom tretmanu korišćeni ePG i PME, nego kada su oni tretirani samo endo-poligalakturonazom. Isto je primećeno tokom modifikacije komercijalnog citrusnog pektina združenim dejstvom ePG i PME; naime, molarna masa gotovo da nije bila promenjena kada je za modifikaciju korišćen samostalan ePG, dok je ovaj enzim združen sa PME rezultirao dobijanjem citrusnog pektina višestruko umanjene molarne mase [155]. Nasuprot tome, PME nema depolimerizujuću aktivnost već dovodi do raskidanja estarskih veza, oslobađajući pri tome deesterifikovan pektinski polisaharid i metanol. Može se pretpostaviti da je zbog umrežavanja deesterifikovanih pektinskih polisaharida došlo do povećanja molarne mase PME-modifikovanih pektinskih polisaharida muskatne tikve.

Promene u viskoznosti su bile u skladu sa promenama u molarnim masama pektinskih polisaharida nakon enzimskih modifikacija. Dejstvom samostalne endo-poligalakturonaze viskoznost

se smanjila 2,2 do 6,4 puta u odnosu na viskoznost nemodifikovanih pektinskih polisaharida, dok je smanjenje nakon združene modifikacije ePG-om i PME-om bilo višestruko (4,1 do 14,3 puta u odnosu na nemodifikovane pektinske polisaharide). Ovo je bio očekivan rezultat, jer ePG pokazuje veći afinitet ka deesterifikovanom supstratu [2,69] što je rezultiralo većim smanjenjem viskoznosti nakon ePG+PME-modifikacija. Kao i što je prethodno bilo pretpostavljeno da je do povećanja molarnih masa došlo umrežavanjem [2], tretman samostalnom pektin-metilesterazom je doveo do posledično manjeg ili većeg povećanja viskoznosti pektinskih polisaharida.

Antioksidativna aktivnost pektinskih polisaharida je nakon enzimskih modifikacija određena kao sposobnost neutralizacije ABTS slobodnih radikala. Na ovu osobinu utiču molarna masa, sadržaj GalA i stepen metoksilacije. Molekuli manjih  $M_w$  i sa većim sadržajem slobodnih karboksilnih grupa (uslovljeno većim sadržajem GalA i nižim DM) imaju veći broj aktivnih grupa sposobnih da neutralizuju ABTS slobodne radikale [128–130]. Kod svih modifikovanih pektinskih polisaharida je došlo do povećanja antioksidativne aktivnosti u odnosu na nemodifikovane pektinske polisaharide. Najveća promena je zabeležena nakon združene modifikacije ePG-om i PME-om (povećanje 2,1 do 4,2 puta), dok je antioksidativna aktivnost najmanje povećana nakon samostalne PME-modifikacije (1,2 do 2 puta). Ovo je u skladu sa većim afinitetom ePG ka supstratima sa nižim DM [2,69]. Na osnovu ovih rezultata je moguće zaključiti da je modifikacija endo-poligalakturonazom imala veći uticaj na sposobnost neutralizacije ABTS radikala od modifikacije pektin-metilesterazom, ali i da je PME u kombinaciji sa ePG taj uticaj dodatno pospešio. Slično ovom, najveći uticaj na ABTS aktivnost citrusnog pektina je imalo združeno dejstvo ePG, PME i pektin-liaze (povećanje čak 21,5 puta) [154]. Međutim, veći uticaj na povećanje antioksidativne aktivnosti pektina gloga je imao samostalan PME (povećanje 1,2 puta) nego samostalan ePG (povećanje 1,1 put) [77], što je suprotno od rezultata dobijenih za pektinske polisaharide muskatne tikve.

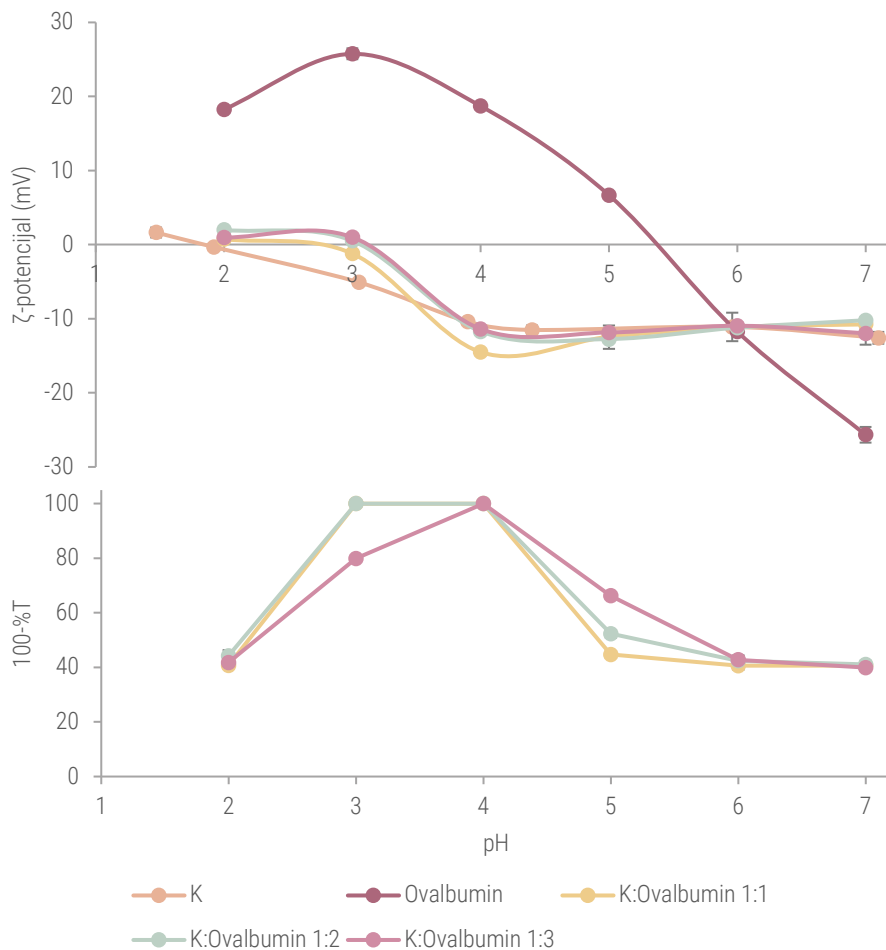
Na povećanje gvožđe(II)-helirajuće aktivnosti su uticaj imali modifikacija ePG-om i združena modifikacija ePG-om i PME-om. Povećanje ove aktivnosti je bilo za nijansu veće kod je korišćena samostalna endo-poligalakturonaza nego kada su enzimi korišćeni u kombinaciji, dok je samostalna pektin-metilesteraza dovela do smanjenja  $Fe^{2+}$ -helirajuće aktivnosti u odnosu na nemodifikovane pektinske polisaharide. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da je modifikacija PME-om imala negativan uticaj na sposobnost pektinskih polisaharida da heliraju divovalentne jone metala zbog pretpostavljenog umrežavanja oslobođenih karboksilnih grupa GalA [2].

#### **4.5. Kompleksna koacervacija kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida muskatne tikve**

U ovom poglavlju biće procenjena sposobnost kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida (K) da formira kompleksne koacervate sa ovalbuminom i želatinom. Ispitane su karakteristike formiranih koacervata u pogledu njihove hemijske strukture, reoloških svojstava i mehaničke stabilnosti, kao i uticaj različitih odnosa mešanja K i proteina na ove osobine. Konačno, sagledana je mogućnost primene ovih koacervata kao nosača pri inkapsulaciji različitih bioaktivnih supstanci u sistemima za oralnu dostavu lekova kroz procenu njihove stabilnosti u simuliranim gastrointestinalnim uslovima.

#### 4.5.1. Zeta potencijal i zamućenje suspenzije koacervata

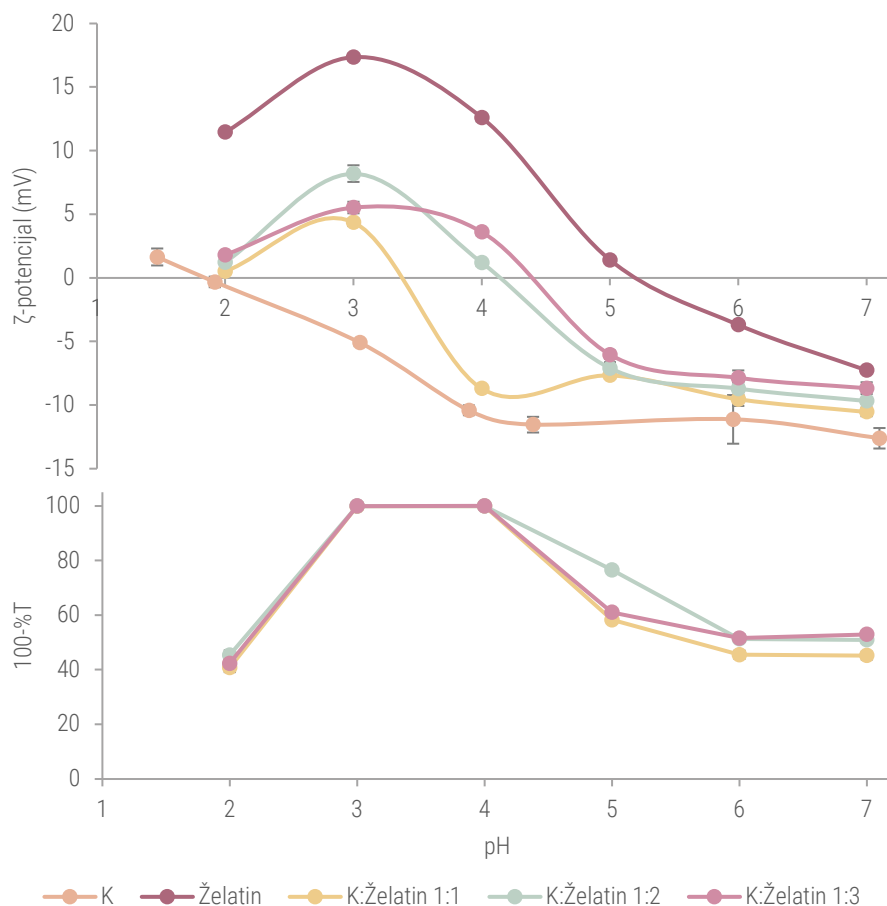
Zeta potencijal je izmeren kako bi se odredila naelektrisanja pektinskog polisaharida muskatne tikve i proteina korišćenih za pripremu kompleksnih koacervata. Takođe su izmereni i zeta potencijali smeša pektinskog polisaharida i proteina pripremljenih u različitim zapreminskih odnosima. Rezultati su prikazani na slikama 33 i 34.



Slika 33. Zeta potencijal i zamućenje (100-%T) rastvora kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina, kao i njihovih smeša pripremljenih pri različitim odnosima mešanja

Primećeno je da se nula zeta potencijala pomerala ka višim vrednostima pH sa porastom dodate količine proteina u smeši. Ovo bi moglo biti objašnjeno saturacijom pektinskog polisaharida usled elektrostatičkih interakcija sa molekulima proteina, kao što je objašnjeno ranije za koacervate pripremljene od pektina šećerne repe i albumina goveđeg seruma [82]. Dodatno, izmerena je i zavisnost zamućenja pripremljenih smeša od pH vrednosti. Rezultati su prikazani na slikama 33 i 34. Merenja zamućenja smeša kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i model proteina u svim ispitivanim odnosima su potvrdila da je formiranje koacervata bio proces koji je zavisio od pH. Zamućenje ovih suspenzija je poraslo sa smanjenjem pH ispod izoelektrične tačke proteina gde su pektinski polisaharid i proteini bili suprotno naelektrisani. Najveće zamućenje je zabeleženo u istom opsegu pH gde je izmerena i nula zeta potencijala, što je potvrdilo ovaj region kao optimalan opseg pH

za formiranje koacervata. Dalje spuštanje pH vrednosti je dovelo do bistrenja smeše usled rastvaranja koacervata, što je ukazalo na to da je koacervacija izazvana promenom pH u ispitivanim smešama bila reverzibilan proces. Koacervati koji su korišćeni u daljim eksperimentima su pripremljeni na odgovarajućoj pH za svaki par pektinskog polisaharida i proteina, odnosno na onoj pH na kojoj je zeta potencijal smeše bio jednak nuli (tabela 7).



Slika 34. Zeta potencijal i zamućenje (100-%T) rastvora kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i želatina, kao i njihovih smeša pripremljenih pri različitim odnosima mešanja

#### 4.5.2. Prinos koacervacije

Prinos koacervacije je izračunat za različite odnose mešanja pektinskog polisaharida i komercijalnih proteina na pH vrednosti koja je odgovarala nuli zeta potencijala i najvećem izmerenom zamućenju. Vrednosti prinosa koacervacije su prikazani u tabeli 15. Koacervati pripremljeni sa želatinom kao polikatjonskom komponentom su imali veći prinos nego koacervati pripremljeni sa ovalbuminom. Ovo bi moglo biti objašnjeno različitim svojstvima ovih proteina. Želatin je linearan i fleksibilan molekul koji lako prilagođava svoju konformaciju prilikom izgradnje kompleksa, dok je sa druge strane ovalbumin globularan molekul [156]. Dodatno, koacervati su pripremljeni sa finalnim korakom hlađenja u cilju poboljšanja vezivanja biopolimera, a poznato je da želatin formira gelove na niskim temperaturama [157]. Veća fleksibilnost molekula i želiranje izazvano hlađenjem bi mogli biti

uzroci većeg prinosa koacervacije u uzorcima za čiju pripremu je korišćen želatin. Sa druge strane, bio je primetan i uticaj odnosa mešanja biopolimera na prinos koacervacije. Prinos koacervacije je generalno bio veći kada je korišćena veća količina proteina pri mešanju biopolimera. Relativno smanjenje prinosa koacervacije kod 1:3 odnosa mešanja (u odnosu na odnos 1:2) može biti povezano sa viškom proteina koji nije mogao da se veže za pektinsko vlakno i zbog toga je ostao u rastvoru u ravnoteži sa formiranim koacervatom.

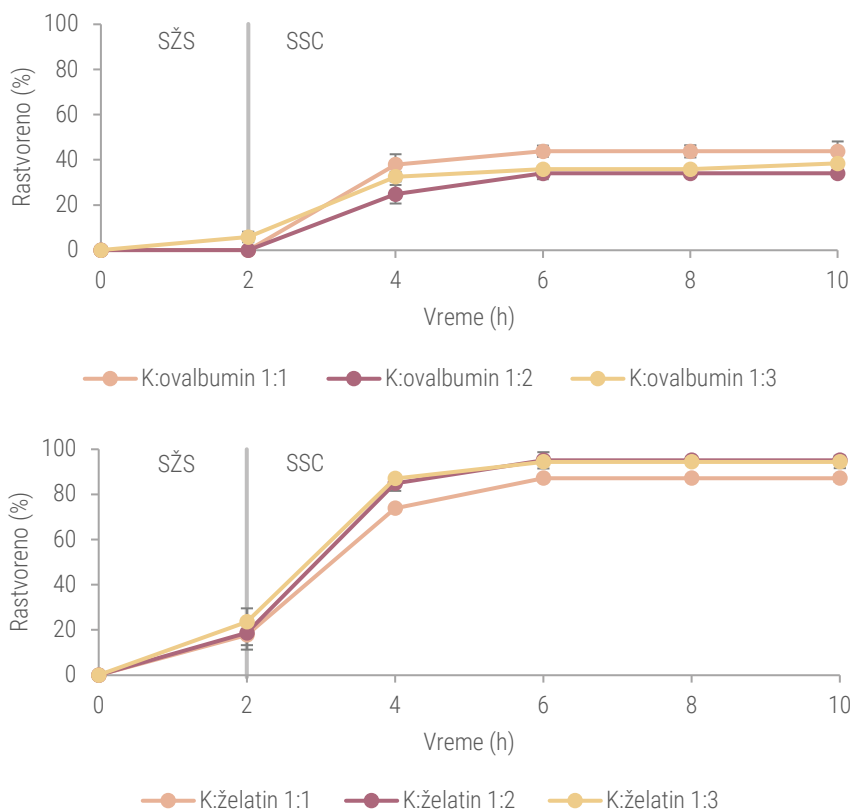
*Tabela 15. Prinosi koacervacije kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida pripremljenog sa ovalbuminom ili želatinom pri različitim odnosima mešanja*

Koacervat	Odnos mešanja	Y <sub>c</sub> (% m/m)
K:ovalbumin	1:1	16,95 ± 2,35 <sup>c</sup>
	1:2	18,04 ± 1,57 <sup>c</sup>
	1:3	17,80 ± 1,98 <sup>c</sup>
K:želatin	1:1	30,10 ± 0,60 <sup>b</sup>
	1:2	45,07 ± 1,35 <sup>a</sup>
	1:3	44,78 ± 1,79 <sup>a</sup>

#### 4.5.3. FTIR spektri koacervata

FTIR je korišćen kako bi se stekao bolji uvid u hemijske interakcije između biopolimera koji su sačinjavali kompleksni koacervat. FTIR spektri K, ovalbumina i želatina su prikazani na slici 35. Specifični pikovi na K spektru su detaljno opisani u poglavlju 4.3.1.8. Kod ovalbumina i želatina je primećeno nekoliko pikova koji su karakteristični za proteinske strukture. Pikovi koji se nalaze na talasnom broju 3270 cm<sup>-1</sup> se mogu dovesti u vezu sa N-H istezanjem amino grupe kod primarnih amina [93,158]. Zatim, pikovi na 1630 cm<sup>-1</sup> vode poreklo od C=O istezanja u primarnom amidu, a pikovi na 1520 cm<sup>-1</sup> potiču od istezanja N-H grupa u sekundarnom amidu [156]. Pikovi koji odgovaraju N-H grupama u proteinskoj strukturi su imali veći intenzitet kod ovalbumina što je u skladu sa većom gustinom naelektrisanja koje je utvrđeno merenjem zeta potencijala ovog proteina (slika 33).

U spektrima koacervata, pikovi koji su se nalazili u oblasti od 3340 cm<sup>-1</sup> do 3270 cm<sup>-1</sup> su imali manji intenzitet nego pikovi u istom opsegu talasnih brojeva u spektrima pojedinačnih proteina i K. Smanjenje intenziteta ovih pikova se može objasniti elektrostatičkim interakcijama između karboksilnih grupa pektinskog polisaharida i amino grupa u molekulima proteina. Pošto su pikovi u ovom regionu pripisani -OH grupi (karboksilna grupa u pektinskom polisaharidu) i -NH<sub>2</sub> grupi (u proteinu), može se pretpostaviti da niži pikovi u spektrima koacervata ukazuju na manji broj slobodnih karboksilnih i slobodnih amino grupa u njihovim strukturama usled formiranja elektrostatičkih veza između dva suprotno naelektrisana molekula. Ovo zapažanje je u saglasnosti sa rezultatima o smanjenju pika u ovom karakterističnom regionu talasnih brojeva kod koacervata želatina i pektina [94]. Stvaranje kompleksa između K i komercijalnih proteina je dodatno potvrđeno pojavom pika karakterističnog za amid (na 1520 cm<sup>-1</sup>) na FTIR spektrima koacervata, dok ovaj pik nije bio prisutan na spektru pektinskog polisaharida K. Ovo se slaže sa rezultatima objavljenim za koacervate citrusnih pektina i želatina [93].



Slika 35. FTIR spektri kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida, ovalbumina, želatina i njihovih koacervata

#### 4.5.4. Reološka merenja koacervata

Mehanička stabilnost formiranih koacervata je izmerena u zavisnosti od napona smicanja primenjenog na sistem (slika P5 u prilogu) pri čemu je sagledan uticaj odnosa mešanja polimera na reološka svojstva koacervata. Vrednosti elastičnog modula ( $G'_{LVE}$ ) i viskoznog modula ( $G''_{LVE}$ ) u linearnom viskoelastičnom regionu, kao i vrednosti tangensa faznog pomaka ( $\tan \delta$ ) su date u tabeli 16.

Tabela 16. Elastični modul ( $G'_{LVE}$ ), viskozni modul ( $G''_{LVE}$ ) i tangens faznog pomaka ( $\tan \delta$ ) koacervata kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina ili želatina

Koacervati	Odnos mešanja	$G'_{LVE}$ (Pa)	$G''_{LVE}$ (Pa)	$\tan \delta$
K:ovalbumin	1:1	629,35±52,52 <sup>a</sup>	473,81±32,74 <sup>a</sup>	0,76±0,02 <sup>a</sup>
	1:2	673,02±42,22 <sup>a</sup>	495,74±16,79 <sup>a</sup>	0,74±0,05 <sup>a</sup>
	1:3	441,56±39,39 <sup>a</sup>	297,73±17,47 <sup>b</sup>	0,69±0,09 <sup>a</sup>
K:želatin	1:1	1882,52±283,09 <sup>a</sup>	390,44±64,74 <sup>a</sup>	0,23±0,12 <sup>a</sup>
	1:2	540,65±92,76 <sup>b</sup>	165,47±26,70 <sup>b</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>
	1:3	808,30±42,76 <sup>b</sup>	181,08±20,91 <sup>b</sup>	0,21±0,02 <sup>a</sup>



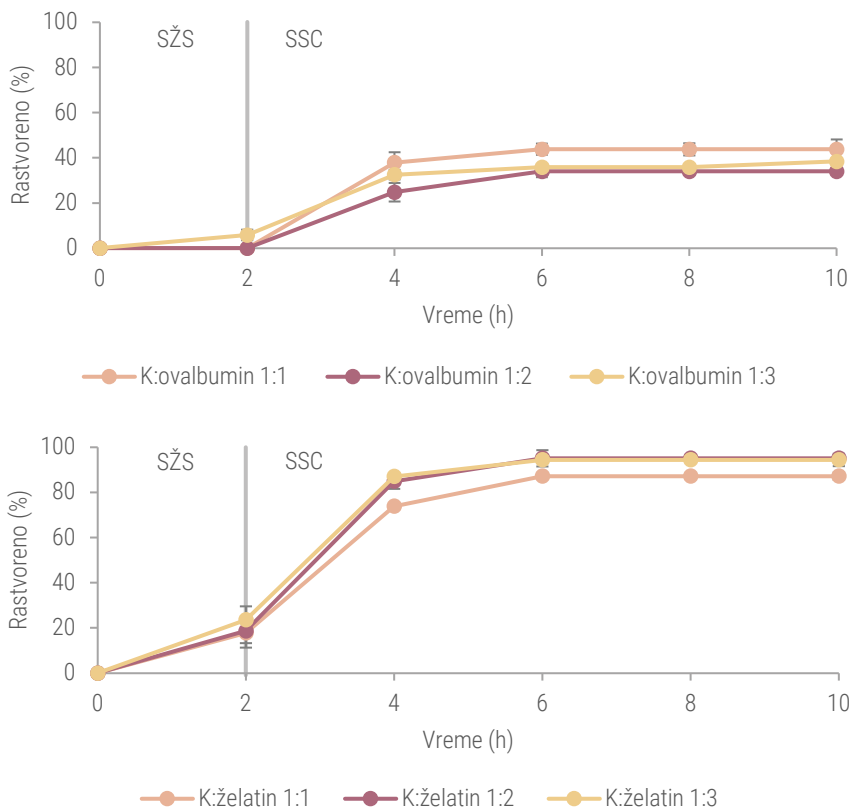
U linearnom viskoelastičnom regionu, elastični modul je bio veći od viskoznog modula ( $G' > G''$ ), što ukazuje na elastičnu strukturu i ponašanje slično gelu u svim koacervatima i u svim odnosima mešanja. Koacervati K:želatin su pokazali veće vrednosti  $G'_{LVE}$  u odnosu na K:ovalbumin, posebno za odnos mešanja 1:1, što znači da je ovaj koacervat imao mehanički najčvršću strukturu. Generalno, niže vrednosti  $G'_{LVE}$  su izmerene kada su pektinski polisaharid i protein bili pomešani u odnosu 1:3. Ovo su potvrdile i vrednosti izračunate za  $\tan \delta$ , ukazujući na mehanički čvršće strukture nalik gelu kada su koacervati pripremljeni sa manje dodatog proteina.

#### 4.5.5. Stabilnost koacervata u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Rastvorljivost koacervata, bitna za njihovu potencijalnu primenu, je određena u simuliranim uslovima želudačnog soka i zatim u simuliranim uslovima creva. Rezultati dobijeni u ovim eksperimentima su predstavljeni na slici 36. Najmanju rastvorljivost, tj. najveću stabilnost, su imali koacervati K:ovalbumin u uslovima želuca u trajanju 2 h. Kada su K i ovalbumin pomešani u odnosima 1:1 i 1:2, formirani koacervati se uopšte nisu rastvorili za to vreme i u tim uslovima, dok je rastvoreno oko 6% koacervata pripremljenog pri odnosu 1:3. Rastvorljivost koacervata K:želatin je bila veća u uslovima želuca - oko 20% za sva tri odnosa mešanja pektinskog polisaharida i želatina. Kada je SŽS zamenjen SCS-om u trajanju od 8 h, svi koacervati su se znatno više rastvarali, sa najvećim skokom u rastvorljivosti u prva 2 h simuliranih uslova creva. Generalno su K:ovalbumin koacervati pokazali manju rastvorljivost u uslovima creva nakon 8 h, pri čemu je najmanja rastvorljivost primećena kod odnosa mešanja 1:2 i 1:3, i to oko 34% i 38%, redom. U istim uslovima je rastvorljivost bila najveća kod K:želatin 1:2 i 1:3 (95% i 94%, redom). Može se zaključiti da su se koacervati pripremljeni sa želatinom kao polikatjonskom komponentom pokazali kao manje stabilni od koacervata pripremljenih sa ovalbuminom. Ovo zapažanje je u skladu sa izmerenim zeta potencijalom koji je pokazao da je želatin imao manje slobodnih katjonskih grupa, nego što je bio slučaj sa ovalbuminom, što za posledicu ima formiranje manje elektrostatičkih veza sa pektinskim polisaharidom i manju stabilnost koacervata u primenjenim simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Koacervati komercijalnog pektina i albumina iz goveđeg seruma su pokazali veću stabilnost u simuliranim uslovima creva (pH 7,4) [159] u odnosu koacervate K i želatina, ali je njihova stabilnost bila manja od stabilnosti koacervata K i ovalbumina u uporedivim uslovima. Dodatno, svi ispitani koacervati kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida sa ovalbuminom i želatinom su imali veću stabilnost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta nego koacervati komercijalnog pektina i proteina surutke u istim uslovima uz prisustvo digestivnih enzima (pepsin i pankreatinin) [117].

Rezultati dobijeni pri ispitivanju stabilnosti koacervata su ukazali na to da njihova hemijska stabilnost nije bila u direktnoj vezi sa njihovom mehaničkom stabilnosti. Naime, K:želatin koacervati koji su pokazali najveću mehaničku stabilnost, su se i u najvećoj meri rastvorili u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta sa oko 90% rastvorljivosti u svim odnosima mešanja. Primećena mehanička stabilnost bi mogla biti posledica želiranja proteina u uslovima hlađenja tokom pripreme koacervata a ne posledica elektrostatičkih interakcija između K i želatina.

Kiselo ekstrahovan pektinski polisaharid muskatne tikve (K) se pokazao kao dobra komponenta kompleksnih koacervata sa mogućom primenom za ciljno dostavljanje aktivnih supstanci. U kombinaciji sa želatinom, pokazao je veliku stabilnost u simuliranim uslovima želuca ali i veliku rastvorljivost u uslovima creva. Ovakvo ponašanje koacervata ukazuje na veliki potencijal primene u nosačima za oralnu dostavu različitih aktivnih supstanci sa ciljanim otpuštanjem u crevima.



Slika 36. Stabilnost koacervata kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina ili želatina u simuliranim uslovima želuca (SŽS) i creva (SSC)





# 5



## 5. Zaključak

Na osnovu izloženih rezultata i diskusije, mogu se doneti sledeći zaključci:

- Ispitivani načini ekstrakcije su imali veliki uticaj na prinos pektinskog polisaharida. Prinos konvencionalne kisele ekstrakcije je iznosio  $60,6 \text{ mg/g}_{\text{SM}}$ . Dobijeni rezultati su pokazali da je bilo moguće povećati prinos pektinskog polisaharida kada kiseloj ekstrakciji prethodi enzimski tretman ili čak dobiti sličan prinos kada se za ekstrakciju koriste ksilanaza i celulaza bez naknadnog koraka ekstrakcije sa kiselinom ( $59,9 \text{ mg/g}_{\text{SM}}$ ). Dodatno, na povećanje prinosa su veći uticaj imale celulaza i ksilanaza nego amilaza i proteaza. Najveći prinos je postignut za enzimski potpomognutu kiselu ekstrakciju čiji je korak enzimskog pretretmana podrazumevao upotrebu celulaze, ksilanaze i amilaze ( $104,4 \text{ mg/g}_{\text{SM}}$ ), dok je sa druge strane, enzimska ekstrakcija samostalnom amilazom rezultirala najnižim prinosom pektinskog polisaharida ( $32,9 \text{ mg/g}_{\text{SM}}$ ).
- Različite tehnike ekstrakcije su rezultirale različitim hemijskim sastavima pektinskih polisaharida. Primenom enzima za ekstrakciju pektinskih polisaharida muskatne tikve je bilo moguće dobiti i do 3 puta veći sadržaj galakturonske kiseline nego konvencionalnom kiselom ekstrakcijom ( $29,0 \text{ g/100 g}$ ). Najveći sadržaj je određen u uzorku dobijenom u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji ( $84,4 \text{ g/100 g}$ ).
- Prema određenom stepenu metoksilacije, svi pektinski polisaharidi, osim onog ekstrahovanog konvencionalnom kiselom ekstrakcijom, su se mogli uvrstiti u niskometoksilovane pektine.
- Nakon određivanja udela različitih strukturnih domena koji ulaze u sastav molekula pektinskih polisaharida, utvrđeno je da je sadržaj homogalakuronana generalno bio veći kod pektinskih polisaharida dobijenih u enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama nego kod onih dobijenih u enzimskim ekstrakcijama. Najveći sadržaj je određen kod uzorka dobijenog u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji ( $77,93\%$ ), a najniži kod kiselu ekstrahovanog pektinskog polisaharida ( $14,5\%$ ). Suprotno je važno za sadržaj ramnogalakuronana-I; najveći sadržaj je određen kod kiselu ekstrahovanog pektinskog polisaharida ( $43,5\%$ ), a najmanji kod uzorka dobijenog u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji ( $10,44\%$ ).
- U kiselim ekstrakcijama su generalno dobijeni pektinski polisaharidi koji su u svojim rastvorima imali više agregata, ali je  $M_w$  bio veći kod prvih molekularskih frakcija enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, eluiranih sa gel-permeacione kolone, nego kod onih

ekstrahovanih kiselinom. Dodatno, postojale su razlike i u izgledu hromatograma različito ekstrahovanih pektinskih polisaharida, pri čemu je kod enzimski ekstrahovanih postojala još jedna molekulska frakcija koja je bila odsutna kod kiselo ekstrahovanih uzoraka.

- Određivanjem ukupnih fenola, antioksidativne i gvožđe(II)-helirajuće aktivnosti je utvrđeno da je primena kiseline u ekstrakciji imala negativan uticaj na ove osobine. Najveći sadržaj fenola određen je kod uzorka ekstrahovanog celulazom i ksilanazom (1159,91  $\mu\text{g FK/g}$ ), najveća ABTS aktivnost kod pektinskog polisaharida ekstrahovanog celulazom, ksilanazom i amilazom (2420,42  $\mu\text{M TE/100 g}$ ), a najveća  $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuća aktivnost kod uzorka ekstrahovanog amilazom (2131,46  $\mu\text{M EDTA/100 g}$ ). Najniže vrednosti ovih parametara su određene kod kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida.
- Na viskoznost pektinskih polisaharida je veći uticaj imao izbor enzima primenjenih za ekstrakciju, nego to da li je u te svrhe korišćena kiselina. Veća viskoznost je izmerena kod pektinskih polisaharida za čije je dobijanje korišćena amilaza, nego kod onih koji su ekstrahovani uz tretman ksilanazom i celulazom. S druge strane, rastvorljivost pektinskih polisaharida je bila veća kod svih pektinskih polisaharida kod kojih su u enzimskom koraku ekstrakcije korišćene ksilanaza i celulaza (više od 77%), nego kada je korišćena samo amilaza (58,9%).
- Određivanjem Mihaelis-Mentenine konstante endo-poligalakturonaze je utvrđeno da je ovaj enzim pokazao najveći afinitet ka pektinskim polisaharidima dobijenim u enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama. Najveći afinitet je endo-poligalakturonaza pokazala ka uzorku dobijenom u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji ( $K_M = 13,3 \text{ mg/mL}$ ), a najmanji ka pektinskom polisaharidu ekstrahovanom samostalnom amilazom ( $K_M = 58,8 \text{ mg/mL}$ ).
- Modifikacija endo-poligalakturonazom je rezultirala smanjenjem molarnih masa i viskoznosti svih ispitanih uzoraka. Kod pektinskih polisaharida dobijenih enzimski potpomognutim kiselim ekstrakcijama su ova smanjenja bila najveća; najveće promene u molarnoj masi i viskoznosti su primećene kod uzorka dobijenog u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji.
- Modifikacija endo-poligalakturonazom je takođe uticala na povećanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti i  $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuće aktivnosti u odnosu na ove aktivnosti kod nemodifikovanih pektinskih polisaharida. Najveće povećanje ABTS aktivnosti (2,6 puta) je zabeleženo kod uzorka dobijenog u amilazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji, a najmanje (1,3 puta) kod kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida. Nasuprot tome,  $\text{Fe}^{2+}$ -helirajuća aktivnost kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida je nakon modifikacije bila najviše povećana (25 puta), dok je do najmanjeg povećanja došlo kod uzorka ekstrahovanog celulazom i amilazom (6%).
- Modifikacija pektin-metilesterazom je dovela do deesterifikacije svih pektinskih polisaharida. Stepent metoksilacije je nakon ove modifikacije u trajanju od 60 min najmanje smanjen kod kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida (2,3 puta), dok je kod većine ostalih uzoraka došlo do smanjenja od 3,5 puta.
- Nakon modifikacije pektin-metilesterazom, došlo je do povećanja molarne mase i viskoznosti svih pektinskih polisaharida, osim kod uzorka dobijenog u celulazom i ksilanazom potpomognutoj kiseloj ekstrakciji. Veći intenzitet ovih promena je primećen kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida nego kod onih koji su dobijeni sa dodatnim korakom kisele ekstrakcije.
- ABTS aktivnosti pektin-metilesterazom modifikovanih pektinskih polisaharida su bile veće od odgovarajućih nemodifikovanih uzoraka. ABTS aktivnost je bila duplo povećana kod modifikovanog kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida, što je ujedno bila i

- najveća promena ove aktivnosti, dok je najmanje povećanje (24%) primećeno kod uzorka ekstrahovanog samostalnom amilazom.
- Nakon ispitivanja efekta združenog dejstva endo-poligalakturonaze i pektin-metilesteraze na pektinske polisaharide muskatne tikve, zaključeno je da su intenziteti smanjenja molarne mase i viskoznosti bili skoro duplo veći nego kod smanjenja ovih osobina nakon modifikacije samostalnom endo-poligalakturonazom. Združeno dejstvo ova dva enzima je u većoj meri uticalo na smanjenje Mw i viskoznosti kod enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida, nego kod onih dobijenih u enzimski potpomognutim kiselim ekstrahiranjima. Mw je najviše smanjen kod pektinskog polisaharida dobijenog u ekstrakciji celulazom i ksilanazom, kao i u ekstrakciji celulazom, ksilanazom i proteazom. Sa druge strane, uzorak ekstrahovan amilazom je nakon ove modifikacije ispoljio najveći intenzitet smanjenja viskoznosti (čak 14 puta) u odnosu na nemodifikovan pektinski polisaharid. Nakon modifikacije združenim enzimima je raspodela molarnih masa modifikovanih pektinskih polisaharida bila uniformnija, što se ogledalo u manjoj disperznosti molarnih masa molekulskih frakcija modifikovanih nego nemodifikovanih uzoraka.
  - Modifikacija združenom endo-poligalakturonazom i pektin-metilesterazom je dovela do povećanja ABTS i gvožđe(II)-helirajuće aktivnosti svih ispitivanih pektinskih polisaharida muskatne tikve. Povećanja u ovim osobinama su bila skoro duplo veća od povećanja dobijenih modifikacijom pektinskih polisaharida samostalnom endo-poligalakturonazom. Najveće povećanje u antioksidativnoj aktivnosti je postignuto kod kiselo ekstrahovanog uzorka (4,2 puta), a najmanje kod pektinskog polisaharida dobijenog u celulazom i ksilanazom potpomognutoj kiseljoj ekstrakciji (2,1 put).  $Fe^{2+}$ -helirajuća aktivnost kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida je nakon modifikacije združenim enzimima povećana čak 44 puta, dok je najmanje povećanje uočeno kod uzorka dobijenog u amilazom potpomognutoj kiseljoj ekstrakciji (5%).
  - Pri ispitivanju mogućnosti primene kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida kao polianjonske komponente za formiranje kompleksnih koacervata sa želatinom i ovalbuminom, merenjem zeta potencijala i zamućenja suspenzija pri različitim odnosima mešanja, utvrđeno je da je najoptimalnija pH za pripremu koacervata odgovarala pH gde je zeta potencijal smeše bio jednak nuli.
  - Prinos koacervacije kiselo ekstrahovanog pektinskog polisaharida sa želatinom je bio veći od prinosa koacervacije kada je polikationjska komponenta bila ovalbumin. Najveći prinos koacervacije je postignut kada su pektin i želatin, pod primenjenim uslovima, pomešani u odnosu 1:2.
  - Reološkim merenjima je utvrđeno da su koacervati sa želatinom imali i do 3 puta mehanički stabilniju strukturu od koacervata sa ovalbuminom. Najstabilniji koacervat je formiran kada su pektin i želatin, pod primenjenim uslovima, pomešani u odnosu 1:1.
  - Stabilnost kompleksnih koacervata u simuliranim gastrointestinalnim uslovima je bila duplo veća kod koacervata pektinskog polisaharida i ovalbumina. Najveću stabilnost su ispoljili koacervati pektina sa ovalbuminom kada su pomešani u odnosima 1:1 i 1:2 u simuliranim uslovima želuca pri čemu nije došlo do rastvaranja ovih koacervata, dok je u simuliranim uslovima creva najstabilniji bio koacervat sa ovalbuminom pripremljen u odnosu 1:2 (rastvorljivost 34%). Najmanja stabilnost je određena kod koacervata pektina i želatina, pri čemu je rastvoreno oko 20% i oko 90% koacervata pripremljenih u svim odnosima mešanja, u simuliranim uslovima želuca i creva, redom.







## 6. Literatura

- [1] J.P. Vincken, H.A. Schols, R.J.F.J. Oomen, M.C. McCann, P. Ulvskov, A.G.J. Voragen, R.G.F. Visser, If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1781–1789. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022350>.
- [2] A.G.J. Voragen, G.J. Coenen, R.P. Verhoef, H.A. Schols, Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls, *Struct. Chem.* 20 (2009) 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>.
- [3] W.G.T. Willats, J.P. Knox, J.D. Mikkelsen, Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>.
- [4] FAO, Compendium of food additive specifications, 2016.
- [5] H.A. Schols, G.J. Coenen, A.G.J. Voragen, Revealing pectin's structure, in: H.A. Schols, R.G.F. Visser, A.G.J. Voragen (Eds.), *Pectins and Pectinases*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2009; pp. 19–34. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-677-9>.
- [6] A. Zdunek, P.M. Pieczywek, J. Cybulska, The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20 (2021) 1101–1117. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>.
- [7] B.L. Ridley, M.A. O'Neill, D. Mohnen, Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry.* 57 (2001) 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3).
- [8] P.J.H. Daas, B. Boxma, A.M.C.P. Hopman, A.G.J. Voragen, H. a Schols, Nonesterified Galacturonic Acid Sequence Homology of Pectins, *Biopolymers.* 58 (2001) 1–8. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200101\)58:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200101)58:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-I).
- [9] C. Lara-Espinoza, E. Carvajal-Millán, R. Balandrán-Quintana, Y. López-Franco, A. Rascón-Chu, Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture, *Molecules.* 23 (2018) 942. <https://doi.org/10.3390/molecules23040942>.
- [10] L.R. Adetunji, A. Adekunle, V. Orsat, V. Raghavan, Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review, *Food Hydrocoll.* 62 (2017) 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.015>.

- [11] M. Panouillé, J.F. Thibault, E. Bonnin, Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8926–8935. <https://doi.org/10.1021/jf0617824>.
- [12] L.H. Reichembach, C.L. de Oliveira Petkowicz, Pectins from alternative sources and uses beyond sweets and jellies: An overview, *Food Hydrocoll.* 118 (2021) 106824. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106824>.
- [13] D.Q. Li, J. Li, H.L. Dong, X. Li, J.Q. Zhang, S. Ramaswamy, F. Xu, Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 185 (2021) 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088>.
- [14] O. Zaitseva, A. Khudyakov, M. Sergushkina, O. Solomina, T. Polezhaeva, Pectins as a universal medicine, *Fitoterapia.* 146 (2020) 104676. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104676>.
- [15] M. Marić, A. Ninčević Grassino, Z. Zhu, F.J. Barba, M. Brnčić, S. Rimac Brnčić, An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction, *Trends Food Sci. Technol.* 76 (2018) 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>.
- [16] L.V. Donchenko, T.N. Doroshenko, E.A. Krasnoselova, E.V. Konuhova, G.F. Petrik, Impact of technological scheme of apple tree cultivation on fractional content of pectin substances, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 488 (2020) 012008. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/488/1/012008>.
- [17] C.G. Nadar, A. Arora, Y. Shastri, Sustainability Challenges and Opportunities in Pectin Extraction from Fruit Waste, *ACS Eng. Au.* 2 (2022) 61–74. <https://doi.org/10.1021/acseengineeringau.1c00025>.
- [18] A. Belkheiri, A. Forouhar, A.V. Ursu, P. Dubessay, G. Pierre, C. Delattre, G. Djelveh, S. Abdelkafi, N. Hamdami, P. Michaud, Extraction, Characterization, and Applications of Pectins from Plant By-Products, *Appl. Sci.* 11 (2021) 6596. <https://doi.org/10.3390/app11146596>.
- [19] FAO, Crops and livestock products data, (2020). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- [20] J. Armesto, G. Rocchetti, B. Senizza, M. Pateiro, F.J. Barba, R. Domínguez, L. Lucini, J.M. Lorenzo, Nutritional characterization of Butternut squash (*Cucurbita moschata* D.): Effect of variety (Ariel vs. Pluto) and farming type (conventional vs. organic), *Food Res. Int.* 132 (2020) 109052. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109052>.
- [21] N. Jacobo-Valenzuela, J.D.J. Zazueta-Morales, J.A. Gallegos-Infante, F. Aguilar-Gutierrez, I.L. Camacho-Hernández, E. Rocha-Guzman, R.F. Gonzalez-Laredo, Chemical and Physicochemical Characterization of Winter Squash (*Cucurbita moschata* D.), *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 39 (2011) 34–40. <https://doi.org/10.15835/nbha3915848>.
- [22] spaxiax, Butternut squash, 67954917. <https://stock.adobe.com>.
- [23] X. Men, S. Il Choi, X. Han, H.Y. Kwon, G.W. Jang, Y.E. Choi, S.M. Park, O.H. Lee, Physicochemical, nutritional and functional properties of *Cucurbita moschata*, *Food Sci. Biotechnol.* 30 (2021) 171–183. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00835-2>.
- [24] F.J. Dai, C.F. Chau, Classification and regulatory perspectives of dietary fiber, *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.09.006>.

- [25] D. Mugdil, The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber, in: R.A. Samaan (Ed.), *Diet. Fiber Prev. Cardiovasc. Dis.*, Elsevier Inc., 2017: pp. 35–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>.
- [26] E. Saralieva, P. Ivanova, N. Petkova, D. Haytova, Phytochemical characterization of the fruits and the resulting purees of two types of pumpkins cultivated in Bulgaria, *Sci. Work. Univ. Food Technol.* 66 (2020) 78–86.
- [27] A. Seroczyńska, A. Antczak, M. Korytowska, K. Kamińska, A. Radomski, A. Korzeniewska, J. Zawadzki, K. Niemirowicz-szczytt, Evaluation of the selected forms of winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) for the content of free sugars and polysaccharides, *Polish J. Agron.* 16 (2014) 69–73.
- [28] N. López-Mejía, H.A. Martínez-Correa, M.M. Andrade-Mahecha, Pancake ready mix enriched with dehydrated squash pulp (*Cucurbita moschata*): formulation and shelf life, *J. Food Sci. Technol.* 56 (2019) 5046–5055. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03977-2>.
- [29] J.R. de Souza, J.S. Maciel, E.S. Brito, N.M. Ricardo, J.P. Feitosa, Pectin from *Cucurbita moschata* pumpkin mesocarp, *Macromol. An Indian J.* 12 (2017) 1–12.
- [30] E.N. Fissore, N.M. Ponce, M. de Escalada Pla, C.A. Stortz, A.M. Rojas, L.N. Gerschenson, Characterization of acid-extracted pectin-enriched products obtained from red beet (*Beta vulgaris* L var. *conditiva*) and butternut (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret), *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3793–3800. <https://doi.org/10.1021/jf903844b>.
- [31] E.N. Fissore, N.M. Ponce, C.A. Stortz, A.M. Rojas, L.N. Gerschenson, Characterisation of Fiber Obtained from Pumpkin (*cucumis moschata* duch.) Mesocarp Through Enzymatic Treatment, *Food Sci. Technol. Int.* 13 (2007) 141–151. <https://doi.org/10.1177/1082013207077914>.
- [32] E.N. Fissore, N.M. Ponce, E.A. Wider, C.A. Stortz, L.N. Gerschenson, A.M. Rojas, Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin-enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret), *J. Food Eng.* 93 (2009) 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.024>.
- [33] T.T.T. Thuy, D.T. Bien, Q.T.M. Thu, D.T.T. Xuan, B. Van Nguyen, N. Van Quang, H.D. Cuong, Extraction and structural determination of pectin from pumpkin *Cucurbita moschata*, *Vietnam J. Chem.* 58 (2020) 592–596. <https://doi.org/10.1002/vjch.201900181>.
- [34] E.N. Fissore, A.M. Rojas, L.N. Gerschenson, P.A. Williams, Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties, *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.012>.
- [35] E.N. Fissore, L. Matkovic, E. Wider, A.M. Rojas, L.N. Gerschenson, Rheological properties of pectin-enriched products isolated from butternut (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret), *LWT - Food Sci. Technol.* 42 (2009) 1413–1421. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.003>.
- [36] S. Baississe, D. Fahloul, Rheological behavior and electrokinetic properties of pectin extracted from pumpkin (*Cucurbita maxima*) pulp and peel using hydrochloric acid solution, *Chem. Pap.* 72 (2018) 2647–2658. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0500-0>.
- [37] S.Y. Chan, W.S. Choo, D.J. Young, X.J. Loh, Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology, *Carbohydr. Polym.* 161 (2017) 118–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>.

- [38] T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 28 (2017) 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>.
- [39] A.A. Torkova, K. V. Lisitskaya, I.S. Filimonov, O.A. Glazunova, G.S. Kachalova, V.N. Golubev, T. V. Fedorova, Physicochemical and functional properties of *Cucurbita maxima* pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation, *PLoS One*. 13 (2018) 0204261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204261>.
- [40] J. Cui, C. Zhao, S. Zhao, G. Tian, F. Wang, C. Li, F. Wang, J. Zheng, Alkali + cellulase-extracted citrus pectins exhibit compact conformation and good fermentation properties, *Food Hydrocoll.* 108 (2020) 106079. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106079>.
- [41] M.F. de Escalada Pla, N.M. Ponce, C.A. Stortz, L.N. Gerschenson, A.M. Rojas, Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret), *LWT - Food Sci. Technol.* 40 (2007) 1176–1185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.006>.
- [42] J.Y. Huang, J.S. Liao, J.R. Qi, W.X. Jiang, X.Q. Yang, Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel, *Food Hydrocoll.* 110 (2021) 106140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106140>.
- [43] A.H. Kareem, E.Z. Naji, Study of the Physical and Functional Properties of Pectin Extracted from Some Plant Residues, *For. Chem. Rev.* (2022) 1271–1282. <https://forestchemicalsreview.com/index.php/JFCR/article/view/1234>.
- [44] X. Hua, K. Wang, R. Yang, J. Kang, J. Zhang, Rheological properties of natural low-methoxyl pectin extracted from sunflower head, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.026>.
- [45] M.A. Masuelli, Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.014>.
- [46] M.Y. Sayah, R. Chabir, H. Benyahia, Y.R. Kandri, F.O. Chahdi, H. Touzani, F. Errachidi, Yield, esterification degree and molecular weight evaluation of pectins isolated from orange and grapefruit peels under different conditions, *PLoS One*. 11 (2016) 0161751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161751>.
- [47] S.T. Minzanova, V.F. Mironov, D.M. Arkhipova, A. V. Khabibullina, L.G. Mironova, Y.M. Zakirova, V.A. Milyukov, Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1407. <https://doi.org/10.3390/polym10121407>.
- [48] B. Kulczyński, A. Gramza-Michałowska, J.B. Królczyk, Optimization of extraction conditions for the antioxidant potential of different pumpkin varieties (*Cucurbita Maxima*), *Sustainability*. 12 (2020) 1305. <https://doi.org/10.3390/su12041305>.
- [49] K. Nara, A. Yamaguchi, N. Maeda, H. Koga, Antioxidative activity of water soluble polysaccharide in pumpkin fruits (*Cucurbita maxima* Duchesne), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 1416–1418. <https://doi.org/10.1271/bbb.80529>.
- [50] M. Celus, C. Kyomugasho, A.M. Van Loey, T. Grauwet, M.E. Hendrickx, Influence of Pectin Structural Properties on Interactions with Divalent Cations and Its Associated Functionalities, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 1576–1594. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12394>.

- [51] Í. Gulcin, S.H. Alwasel, Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method, *Processes*. 10 (2022) 132. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>.
- [52] M.D.J.C. Sandarani, A Review: Different Extraction Techniques of Pectin, *J. Pharmacogn. Nat. Prod.* 3 (2017) 1000143. <https://doi.org/10.4172/2472-0992.1000143>.
- [53] A. Wikiera, M. Mika, M. Grabacka, Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.018>.
- [54] N.M. Ptichkina, O.A. Markina, G.N. Rumyantseva, Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes, *Food Hydrocoll.* 22 (2008) 192–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.002>.
- [55] A. Wikiera, M. Mika, A. Starzyńska-Janiszewska, B. Stodolak, Endo-xylanase and endo-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace, *Carbohydr. Polym.* 142 (2016) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.063>.
- [56] S.W. Cui, Y.H. Chang, Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin, *LWT - Food Sci. Technol.* 58 (2014) 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.012>.
- [57] O. Hrabovska, H. Pastukh, O. Lysyi, V. Miroshnyk, N. Shtangeeva, The use of enzyme preparations for pectin extraction from potato pulp, *Ukr. Food J.* 7 (2018) 215–233. <https://doi.org/10.24263/2304-974x-2018-7-2-5>.
- [58] A. Wikiera, M. Mika, A. Starzyńska-Janiszewska, B. Stodolak, Application of Celluclast 1.5L in apple pectin extraction, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.051>.
- [59] A. Canela-Xandri, M. Balcells, G. Villorbina, M.Á. Cubero, R. Canela-Garayoa, Effect of enzymatic treatments on dietary fruit fibre properties, *Biocatal. Biotransformation*. 36 (2018) 172–179. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1313836>.
- [60] J. Cao, Q. Li, Modification of pectin, in: P. Ferranti, E.M. Berry, J.R. Anderson (Eds.), *Encycl. Food Secur. Sustain.*, Elsevier, 2019: pp. 561–566. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22446-3>.
- [61] B. Gullón, B. Gómez, M. Martínez-Sabajanes, R. Yáñez, J.C. Parajó, J.L. Alonso, Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties, *Trends Food Sci. Technol.* 30 (2013) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.01.006>.
- [62] N. Babbar, W. Dejonghe, M. Gatti, S. Sforza, K. Elst, Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits, *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (2016) 594–606. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.996732>.
- [63] B.S. Gruben, R.P. de Vries, Advances in pectinolytic enzymes, genes and regulation in *Aspergillus*, in: H.A. Schols, R.G.F. Visser, A.G.J. Voragen (Eds.), *Pectins and Pectinases*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2009: pp. 101–113. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-677-9>.
- [64] E. Bonnin, C. Garnier, M.C. Ralet, Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 519–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5388-6>.

- [65] C. Sabater, A. Olano, N. Corzo, A. Montilla, GC–MS characterisation of novel artichoke (*Cynara scolymus*) pectic-oligosaccharides mixtures by the application of machine learning algorithms and competitive fragmentation modelling, *Carbohydr. Polym.* 205 (2019) 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.054>.
- [66] C. Remoroza, S. Broxterman, H. Gruppen, H.A. Schols, Two-step enzymatic fingerprinting of sugar beet pectin, *Carbohydr. Polym.* 108 (2014) 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.052>.
- [67] M. Noguchi, Y. Hasegawa, S. Suzuki, M. Nakazawa, M. Ueda, T. Sakamoto, Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes, *Carbohydr. Polym.* 231 (2020) 115738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115738>.
- [68] É. Jermendi, M. Beukema, M.A. van den Berg, P. de Vos, H.A. Schols, Revealing methyl-esterification patterns of pectins by enzymatic fingerprinting: Beyond the degree of blockiness, *Carbohydr. Polym.* 277 (2022) 118813. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118813>.
- [69] R.A. Prade, P. Ayoubi, D. Zhan, A.J. Mort, Pectins, Pectinases and Plant-Microbe Interactions, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16 (1999) 361–392. <https://doi.org/10.1080/02648725.1999.10647984>.
- [70] R.S. Jayani, S. Saxena, R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: A review, *Process Biochem.* 40 (2005) 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.
- [71] E. Bonnin, M.C. Ralet, J.-F. Thibault, H.A. Schols, Enzymes for the valorisation of fruit- and vegetable-based co-products, in: K.W. Waldron (Ed.), *Handb. Waste Manag. Co-Product Recover. Food Process.*, Woodhead Publishing, Elsevier, 2009: pp. 257–285. <https://doi.org/10.1533/9781845697051.3.257>.
- [72] A.M.M. Combo, M. Aguedo, D. Goffin, B. Wathelet, M. Paquot, Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations, *Food Bioprod. Process.* 90 (2012) 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.09.003>.
- [73] E.M. Yahia, A. Carrillo-López, L.A. Bello-Perez, Carbohydrates, in: E.M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiol. Biochem. Fruits Veg.*, Woodhead Publishing, Elsevier, 2019: pp. 175–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00009-9>.
- [74] J. Chen, W. Liu, C.M. Liu, T. Li, R.H. Liang, S.J. Luo, Pectin Modifications: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55 (2015) 1684–1698. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.718722>.
- [75] M. Khan, E. Nakkeeran, S. Umesh-Kumar, Potential application of pectinase in developing functional foods, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4 (2013) 21–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182525>.
- [76] Y. Zhou, Y. Mei, T. Luo, W. Chen, Q. Zhong, H. Chen, W. Chen, Study on the relationship between emulsion properties and interfacial rheology of sugar beet pectin modified by different enzymes, *Molecules.* 26 (2021) 2829. <https://doi.org/10.3390/molecules26092829>.
- [77] T. Zhang, H. Zhang, M. Wei, C. Zhu, Effects of enzymatic treatment on the physicochemical properties and antioxidant activity of hawthorn pectin, *Mater. Today Commun.* 30 (2022) 103225. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103225>.
- [78] I. Fraeye, T. Duvetter, E. Doungla, A. Van Loey, M. Hendrickx, Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions, *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.001>.



- [79] T. Schmelter, R. Wientjes, R. Vreeker, W. Klaffke, Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00170-9).
- [80] I. Fraeye, T. Duvetter, I. Verlent, D. Ndaka Sila, M. Hendrickx, A. Van Loey, Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8 (2007) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.07.004>.
- [81] L. Wan, Q. Chen, M. Huang, F. Liu, S. Pan, Physicochemical, rheological and emulsifying properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, conventional enzymatic, and alkaline de-esterification: A comparison study, *Food Hydrocoll.* 93 (2019) 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.022>.
- [82] X. Li, Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, X. Yao, Y. Zhang, M. Zhao, K. Zhang, F. Jiang, Complexation of bovine serum albumin and sugar beet pectin: Structural transitions and phase diagram, *Langmuir*. 28 (2012) 10164–10176. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/la302063u>.
- [83] W.C. Blocher, S.L. Perry, Complex coacervate-based materials for biomedicine, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 9 (2017) 1442. <https://doi.org/10.1002/wnan.1442>.
- [84] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>.
- [85] E. Kizilay, A.B. Kayitmazer, P.L. Dubin, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.006>.
- [86] H.J. Kim, B. Yang, T.Y. Park, S. Lim, H.J. Cha, Complex coacervates based on recombinant mussel adhesive proteins: Their characterization and applications, *Soft Matter*. 13 (2017) 7704–7716. <https://doi.org/10.1039/c7sm01735a>.
- [87] H. Salminen, M. Sachs, C. Schmitt, J. Weiss, Complex Coacervation and Precipitation Between Soluble Pea Proteins and Apple Pectin, *Food Biophys.* 17 (2022) 460–471. <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09726-x>.
- [88] X. Wang, J. Lee, Y.W. Wang, Q. Huang, Composition and rheological properties of  $\beta$ -lactoglobulin/pectin coacervates: Effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 992–997. <https://doi.org/10.1021/bm060902d>.
- [89] M. Raei, A. Rafe, F. Shahidi, Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates, *J. Food Eng.* 228 (2018) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.02.007>.
- [90] A.M. Chaux-Gutiérrez, E.J. Pérez-Monterroza, M.A. Mauro, Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures, *Food Hydrocoll.* 92 (2019) 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.025>.
- [91] Q. Ru, Y. Wang, J. Lee, Y. Ding, Q. Huang, Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.019>.
- [92] C.P. Zhu, H.H. Zhang, G.Q. Huang, J.X. Xiao, Whey protein isolate—low methoxyl pectin coacervates as a high internal phase Pickering emulsion stabilizer, *J. Dispers. Sci. Technol.* 42 (2021) 1009–1020. <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1724801>.

- [93] B. Muhoza, S. Xia, J. Cai, X. Zhang, E. Duhoranimana, J. Su, Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability, *Food Hydrocoll.* 87 (2019) 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.051>.
- [94] M. Saravanan, K.P. Rao, Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.036>.
- [95] N. Akbari, E. Assadpour, M.S. Kharazmi, S.M. Jafari, Encapsulation of Vitamin B12 by Complex Coacervation of Whey Protein Concentrate–Pectin; Optimization and Characterization, *Molecules.* 27 (2022) 6130. <https://doi.org/10.3390/molecules27186130>.
- [96] AACC, Method 32-05.01: Total Dietary Fiber, Cereal. Grains Assoc. (1999) 1–4. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-32-05.01>.
- [97] T.K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.
- [98] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *J. Biotechnol.* 23 (1992) 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J).
- [99] Q. Li, A.M. Coffman, L.K. Ju, Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase, *Enzyme Microb. Technol.* 72 (2015) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.006>.
- [100] H. Prabhudev, A.H. Sneharani, Extraction and characterization of pectin methylesterase from muskmelon biowaste for pectin remodeling, *J. Food Biochem.* 44 (2020) 13237. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13237>.
- [101] K. Müller, G. Levesque-Tremblay, S. Bartels, K. Weitbrecht, A. Wormit, B. Usadel, G. Haughn, A.R. Kermode, Demethylesterification of cell wall pectins in Arabidopsis plays a role in seed germination, *Plant Physiol.* 161 (2013) 305–316. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205724>.
- [102] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- [103] L.D. Melton, B.G. Smith, Determination of the Uronic Acid Content Of Plant Cell Walls Using A Colorimetric Assay, in: *Handb. Food Anal. Chem.*, 2005: pp. 735–738. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch17>.
- [104] S. Igarashi, Improved method on the determination of methanol using chromotropic acid, *Japan Anal.* 22 (1973) 444–446. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.22.444>.
- [105] A. Ng, K.W. Waldron, Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues, *J. Sci. Food Agric.* 73 (1997) 503–512. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199704\)73:4<503::AID-JSFA762>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<503::AID-JSFA762>3.0.CO;2-Z).
- [106] S. Aimanant, P.J. Ziemann, Development of spectrophotometric methods for the analysis of functional groups in oxidized organic aerosol, *Aerosol Sci. Technol.* 47 (2013) 581–591. <https://doi.org/10.1080/02786826.2013.773579>.
- [107] F.P.L. Andrieux, C. Boxall, R.J. Taylor, Determination of the constants of formation of complexes of iron(III) and acetohydroxamic acid, in: M. Tadashi (Ed.), *Appl. Thermodyn. to Biol. Mater. Sci.*, InTech, 2011: pp. 441–458. <https://doi.org/10.5772/1763>.

- [108] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [109] H.K. Mæhre, L. Dalheim, G.K. Edvinsen, E.O. Elvevoll, I.-J. Jensen, Protein determination—Method matters, *Foods*. 7 (2018) 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>.
- [110] AACC, Method 76-13.01: Total Starch Assay Procedure (Megazyme Amyloglucosidase/ $\alpha$ -Amylase Method), *Cereal. Grains Assoc.* (1999) 1–6. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-76-13.01>.
- [111] K.H. Kim, R. Tsao, R. Yang, S.W. Cui, Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chem.* 95 (2006) 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>.
- [112] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, 2012. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.
- [113] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [114] E.A. Decker, B. Welch, Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>.
- [115] F. Bouaziz, M. Koubaa, K. Ben Jeddou, F. Kallel, C. Boisset Helbert, A. Khelifa, R. Ellouz Ghorbel, S. Ellouz Chaabouni, Water-soluble polysaccharides and hemicelluloses from almond gum: Functional and prebiotic properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.032>.
- [116] C.J.F. Souza, E.E. Garcia-Rojas, Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes, *Food Hydrocoll.* 47 (2015) 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.010>.
- [117] F.N. Souza, C. Gebara, M.C.E. Ribeiro, K.S. Chaves, M.L. Gigante, C.R.F. Grosso, Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins, *Food Res. Int.* 49 (2012) 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.041>.
- [118] J. Černiauskiene, J. Kulaitiene, H. Danilčenko, E. Jariene, E. Juknevičiene, Pumpkin fruit flour as a source for food enrichment in dietary fiber, *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 42 (2014) 19–23. <https://doi.org/10.15835/nbha4219352>.
- [119] Y. Bai, M. Zhang, S. Chandra Atluri, J. Chen, R.G. Gilbert, Relations between digestibility and structures of pumpkin starches and pectins, *Food Hydrocoll.* 106 (2020) 105894. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105894>.
- [120] A. Zykwincka, J.F. Thibault, M.C. Ralet, Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 1795–1802. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm037>.
- [121] T. Yuan, F. Ye, T. Chen, M. Li, G. Zhao, Structural characteristics and physicochemical properties of starches from winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.), *Food Hydrocoll.* 122 (2022) 107115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107115>.

- [122] W.S. Abou-Elseoud, E.A. Hassan, M.L. Hassan, Extraction of pectin from sugar beet pulp by enzymatic and ultrasound-assisted treatments, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2 (2021) 100042. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100042>.
- [123] N. Bayar, M. Friji, R. Kammoun, Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal, *Food Chem.* 241 (2018) 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.051>.
- [124] M.F. Basanta, N.M.A. Ponce, A.M. Rojas, C.A. Stortz, Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.001>.
- [125] S.I. Jiwani, R.B. Gillis, D. Besong, F. Almutairi, T. Erten, M.S. K ok, S.E. Harding, B.S. Paulsen, G.G. Adams, Isolation and biophysical characterisation of bioactive polysaccharides from *Cucurbita Moschata* (Butternut squash), *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 1650. <https://doi.org/10.3390/polym12081650>.
- [126] C.L.O. Petkowicz, L.C. Vriesmann, P.A. Williams, Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin, *Food Hydrocoll.* 65 (2017) 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.040>.
- [127] S.E. Harding, G. Berth, A. Ball, J.R. Mitchell, J.G. de la Torre, The molecular weight distribution and conformation of citrus pectins in solution studied by hydrodynamics, *Carbohydr. Polym.* 16 (1991) 1–15. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90069-0).
- [128] X. Chen, Y. Qi, C. Zhu, Q. Wang, Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.077>.
- [129] F.O. Ogutu, T.H. Mu, Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity, *Ultrason. Sonochem.* 38 (2017) 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2016.08.014>.
- [130] X. Wang, X. L u, Characterization of pectic polysaccharides extracted from apple pomace by hot-compressed water, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.012>.
- [131] M.Q. Guo, X. Hu, C. Wang, L. Ai, Polysaccharides: Structure and Solubility, in: Z. Xu (Ed.), *Solubility of Polysaccharides*, InTech, 2017: pp. 7–21. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71570>.
- [132] L. Phatak, K.C. Chang, G. Brown, Isolation and Characterization of Pectin in Sugar-Beet Pulp, *J. Food Sci.* 53 (1988) 830–833. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb08964.x>.
- [133] Z. Hrom adkov a, B.S. Paulsen, M. Polovka, Z. Ko st alov a, A. Ebringerov a, Structural features of two heteroxylyan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities, *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.021>.
- [134] Y. Mao, R. Millett, C.S. Lee, G. Yakubov, S.E. Harding, E. Binner, Investigating the influence of pectin content and structure on its functionality in bio-flocculant extracted from okra, *Carbohydr. Polym.* 241 (2020) 116414. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116414>.
- [135] M.T. Pacheco, M. Villamiel, R. Moreno, F.J. Moreno, Structural and rheological properties of pectins extracted from industrial sugar beet by-products, *Molecules*. 24 (2019) 392. <https://doi.org/10.3390/molecules24030392>.

- [136] M. Abid, S. Cheikhrouhou, C.M.G.C. Renard, S. Bureau, G. Cuvelier, H. Attia, M.A. Ayadi, Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties, *Food Chem.* 215 (2017) 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.181>.
- [137] G.D. Manrique, F.M. Lajolo, FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit, *Postharvest Biol. Technol.* 25 (2002) 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00160-0).
- [138] A. Baum, M. Dominiak, S. Vidal-Melgosa, W.G.T. Willats, K.M. Søndergaard, P.W. Hansen, A.S. Meyer, J.D. Mikkelsen, Prediction of Pectin Yield and Quality by FTIR and Carbohydrate Microarray Analysis, *Food Bioprocess Technol.* 10 (2017) 143–154. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1802-2>.
- [139] E.E. Santos, R.C. Amaro, C.C.C. Bustamante, M.H.A. Guerra, L.C. Soares, R.E.S. Froes, Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of FTIR and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification, *Food Hydrocoll.* 107 (2020) 105921. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105921>.
- [140] F.J. Warren, M.J. Gidley, B.M. Flanagan, Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study, *Carbohydr. Polym.* 139 (2016) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.066>.
- [141] W. Wang, X. Ma, P. Jiang, L. Hu, Z. Zhi, J. Chen, T. Ding, X. Ye, D. Liu, Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions, *Food Hydrocoll.* 61 (2016) 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.019>.
- [142] M.S. Zamil, A. Geitmann, The middle lamella - More than a glue, *Phys. Biol.* 14 (2017) 015004. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa5ba5>.
- [143] E. Nuwamanya, Y. Baguma, E. Wembabazi, P. Rubaihayo, Comparative study of the physicochemical properties of starches from root, tuber and cereal crops, *African J. Biotechnol.* 10 (2011) 12018–12030. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2310>.
- [144] H. Pińkowska, P. Wolak, M. Krzywonos, A. Złocińska, Comprehensive Study of Hydrothermal Extraction of Pectin From Sugar Beet Pulp, *Waste and Biomass Valorization.* 12 (2021) 4587–4598. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01317-6>.
- [145] I. Antonopoulou, E. Sapountzaki, U. Rova, P. Christakopoulos, Ferulic Acid From Plant Biomass: A Phytochemical With Promising Antiviral Properties, *Front. Nutr.* 8 (2022) 777576. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.777576>.
- [146] S. Ou, K.C. Kwok, Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>.
- [147] H. Boz, Ferulic acid in cereals - A review, *Czech J. Food Sci.* 33 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.17221/401/2014-CJFS>.
- [148] L. Flutto, Pectin, in: B. Caballero (Ed.), *Encycl. Food Sci. Nutr.*, 2nd ed., Academic Press, 2003: pp. 4440–4456. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00901-9>.
- [149] J. Mierczyńska, J. Cybulska, A. Zdunek, Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid, *Carbohydr. Polym.* 156 (2017) 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.042>.

- [150] T. Funami, M. Nakauma, S. Ishihara, R. Tanaka, T. Inoue, G.O. Phillips, Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.017>.
- [151] K. Alba, R.J. Bingham, P.A. Gunning, P.J. Wilde, V. Kontogiorgos, Pectin Conformation in Solution, *J. Phys. Chem. B.* 122 (2018) 7286–7294. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b04790>.
- [152] L. Wan, Z. Yang, R. Cai, S. Pan, F. Liu, S. Pan, Calcium-induced-gel properties for low methoxyl pectin in the presence of different sugar alcohols, *Food Hydrocoll.* 112 (2021) 106252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106252>.
- [153] J.L. Hunter, L. Wicker, De-esterification of pectin by alkali, plant and fungal pectinmethylesterases and effect on molecular weight, *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 2243–2248. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2221>.
- [154] P.H. Huang, H. Te Lu, Y.T. Wang, M.C. Wu, Antioxidant activity and emulsion-stabilizing effect of pectic enzyme treated pectin in soy protein isolate-stabilized oil/water emulsion, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 9623–9628. <https://doi.org/10.1021/jf202020t>.
- [155] T. Duvetter, I. Fraeye, D.N. Sila, I. Verlent, C. Smout, M. Hendrickx, A. Van Loey, Mode of de-esterification of alkaline and acidic pectin methyl esterases at different pH conditions, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7825–7831. <https://doi.org/10.1021/jf060013h>.
- [156] M.B. Santos, A.R. da Costa, E.E. Garcia-Rojas, Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme: Formation and thermodynamic characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 1323–1329. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.132>.
- [157] A. Hayashi, S.-C. Oh, Gelation of Gelatin Solution, *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 1711–1716.
- [158] E. V. Kudryashova, M.B.J. Meinders, A.J.W.G. Visser, A. Van Hoek, H.H.J. De Jongh, Structure and dynamics of egg white ovalbumin adsorbed at the air/water interface, *Eur. Biophys. J.* 32 (2003) 553–562. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0301-3>.
- [159] L.S. Liu, M.L. Fishman, K.B. Hicks, Pectin in controlled drug delivery - A review, *Cellulose.* 14 (2007) 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10570-006-9095-7>.



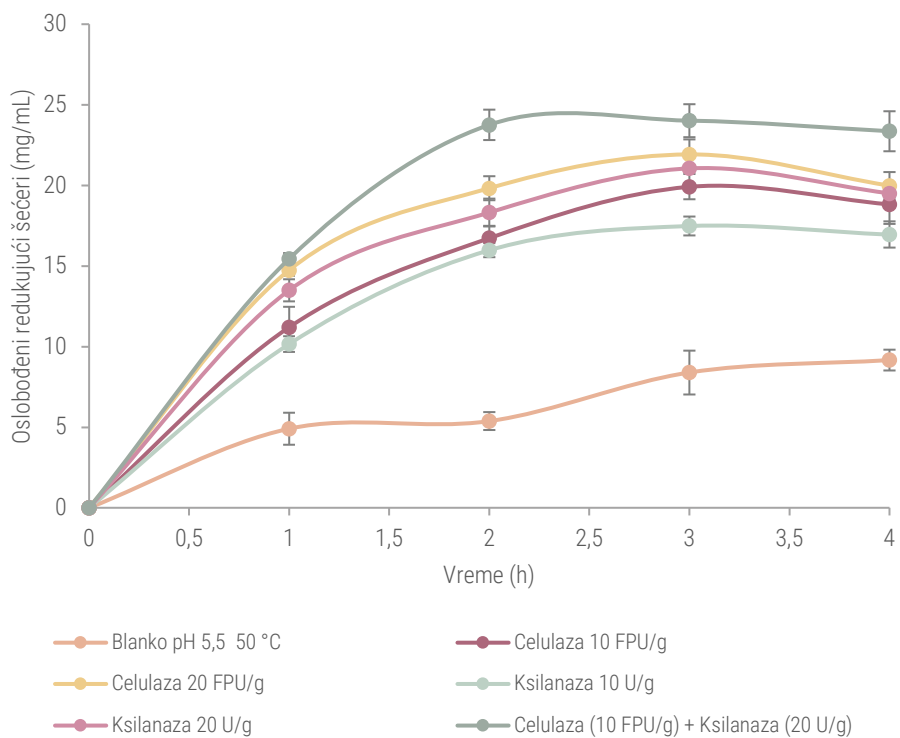




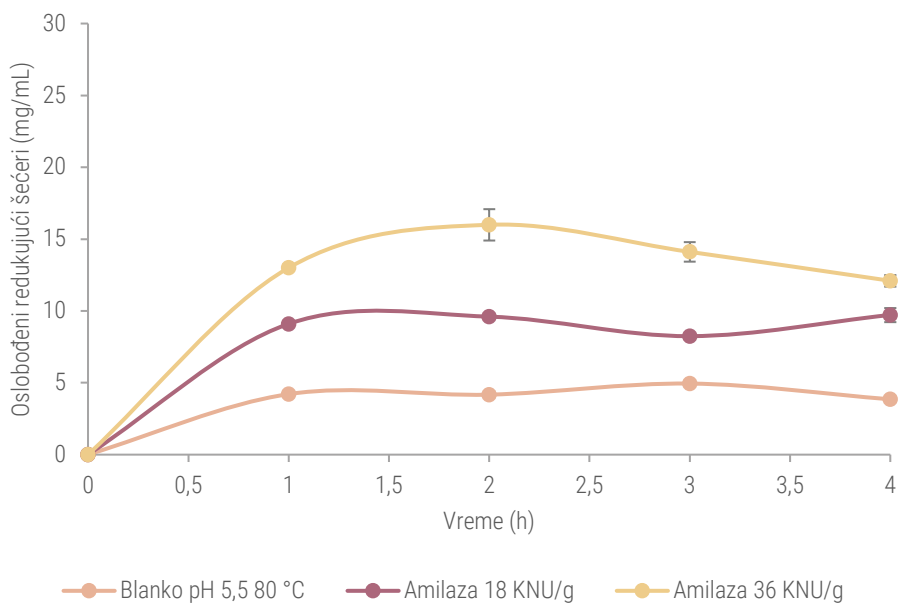




## 7. Prilog



Slika P1. Vremenski tok oslobađanja redukujućih šećera u tretmanu pulpe muskatne tikve ksilanazom i celulazom



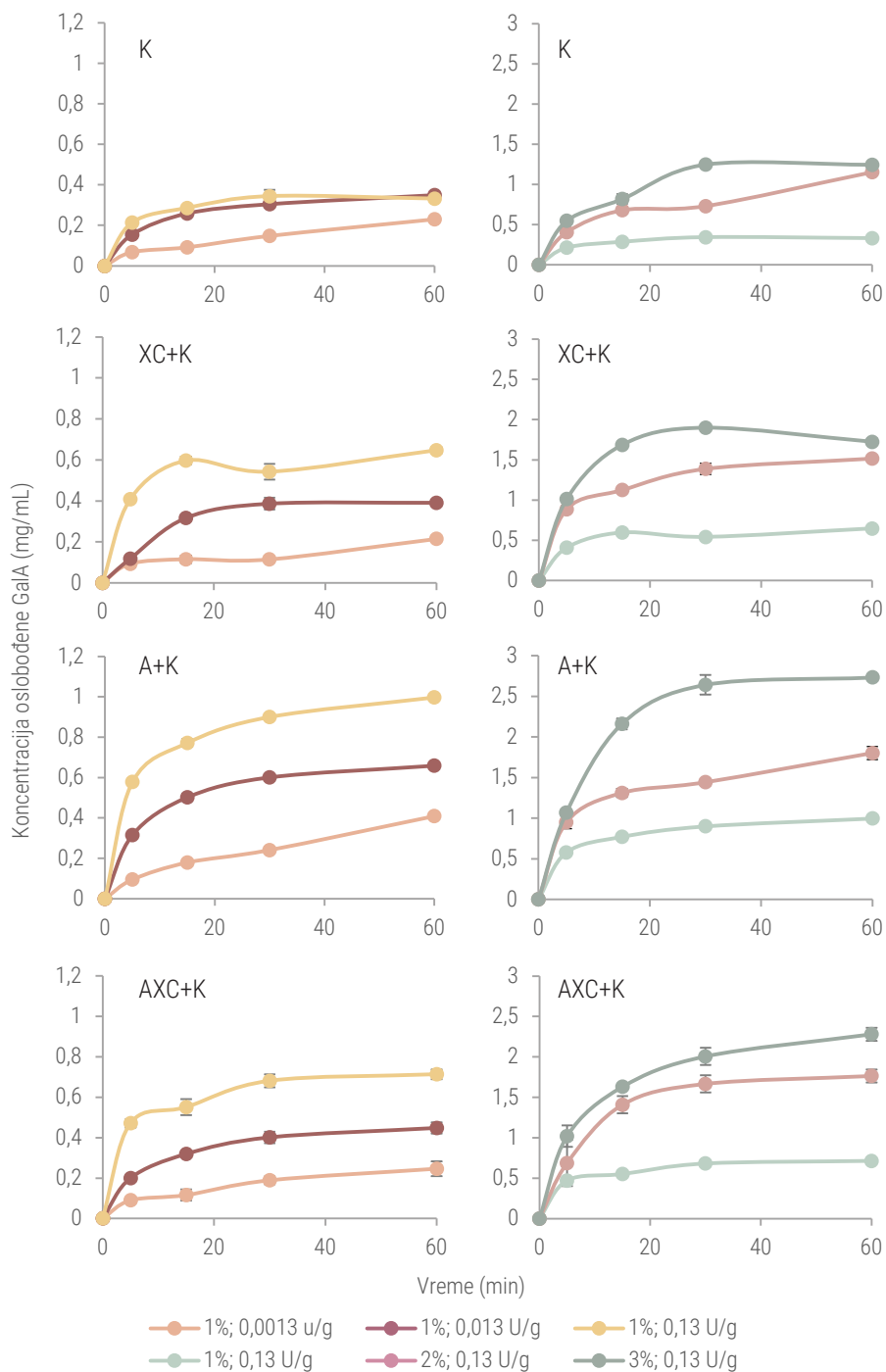
Slika P2. Vremenski tok oslobađanja redukujućih šećera u tretmanu pulpe muskatne tikve amilazom

Tabela P1. Molarne mase, površine frakcija i disperznost kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
K	a I	5,3	6561,0	-	-	-
	a II	45,4	1492,5	2099,4	1605,1	1,31
	a III	35,3	32,7	92,9	49,0	1,89
	a IV	11,4	17,9	8,2	5,3	1,55
	a V	2,5	0,4	0,4	0,3	1,33
XC+K	b I	3,5	6897,4	-	-	-
	b II	65,4	972,4	1492,8	996,7	1,49
	b III	24,1	38,9	84,8	55,9	1,52
	b IV	7,0	11,2	8,7	5,5	1,58
A+K	c I	6,1	7251,0	-	-	-
	c II	39,7	1895,0	2600,0	2125,0	1,22
	c III	17,9	571,4	558,1	441,9	1,26
	c IV	36,3	11,5	31,5	17,0	1,85
AXC+K	d I	7,6	12256,0	-	-	-
	d II	66,1	1371,0	1930,0	1208,0	1,60
	d III	26,3	16,5	45,6	24,3	1,88

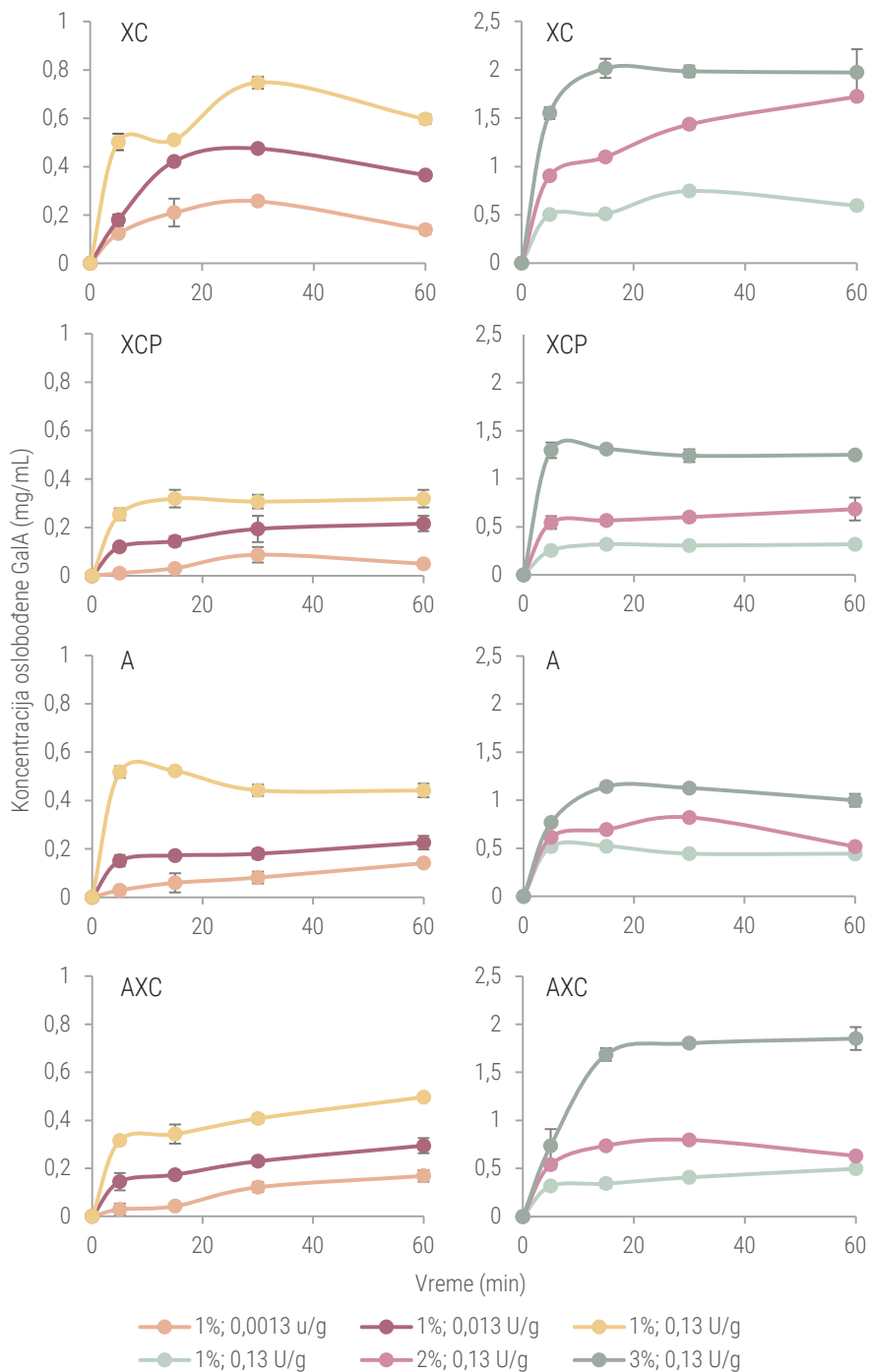
Tabela P2. Molarne mase, površine frakcija i disperznost enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
XC	e I	40,3	1983,0	2718,0	1952,0	1,39
	e II	24,2	670,7	551,2	463,5	1,19
	e III	28,8	25,5	60,1	39,2	1,53
	e IV	6,7	0,5	0,5	0,4	1,25
XCP	f I	36,0	2411,0	3081,0	2277,0	1,35
	f II	23,1	456,3	504,9	387,7	1,30
	f III	34,9	10,1	27,9	14,8	1,88
	f IV	6,0	0,5	0,5	0,4	1,25
A	g I	38,0	837,8	1360,0	965,6	1,41
	g II	28,8	210,7	266,9	236,5	1,13
	g III	33,2	23,9	44,7	34,3	1,30
AXC	h I	79,5	550,4	893,9	437,0	2,05
	h II	20,5	25,2	43,3	32,2	1,34



Slika P3. Vremenski tok oslobađanja redukujućih šećera (određenih kao GalA) u modifikaciji kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida endo-poligalakturonazom





Slika P4. Vremenski tok oslobađanja redukujućih šećera (određenih kao GalA) u modifikaciji enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida endo-poligalakturonazom

Tabela P3. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i ePG-modifikovanih kiseloh ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ	
K	0	a I	5,3	6561,0	-	-	-	
		a II	45,4	1492,5	2099,4	1605,1	1,31	
		a III	35,3	32,7	92,9	49,0	1,89	
		a IV	11,4	17,9	8,2	5,3	1,55	
		a V	2,5	0,4	0,4	0,3	1,33	
	15	b I	48,3	1714,9	2536,1	1903,7	1,33	
		b II	9,0	813,9	689,6	649,4	1,06	
		b III	29,4	43,6	105,6	66,0	1,60	
		b IV	11,3	26,2	11,5	7,0	1,64	
		b V	2,0	0,4	0,4	0,4	1,00	
	30	c I	50,2	1628,3	2404,0	1795,0	1,34	
		c II	9,6	757,8	613,2	561,3	1,09	
		c III	27,8	38,5	86,9	57,7	1,51	
		c IV	10,6	24,3	10,9	7,2	1,51	
		c V	1,8	0,4	0,4	0,3	1,33	
XC+K	0	d I	3,5	6897,4	-	-	-	
		d II	65,4	972,4	1492,8	996,7	1,49	
		d III	24,1	38,9	84,8	55,9	1,52	
		d IV	7,0	11,2	8,7	5,5	1,58	
	15	e I	56,3	1507,0	2157,0	1435,0	1,50	
		e II	12,0	513,2	455,5	428,5	1,06	
		e III	22,0	48,5	97,3	71,7	1,36	
		e IV	9,7	14,0	11,0	5,3	2,07	
	30	f I	55,5	891,8	1315,0	833,4	1,58	
		f II	14,2	361,1	252,4	232,9	1,08	
		f III	22,1	22,1	46,9	34,0	1,38	
		f IV	8,2	5,9	5,5	3,0	1,83	
A+K	0	g I	6,1	7251,0	-	-	-	
		g II	39,7	1895,0	2600,0	2125,0	1,22	
		g III	17,9	571,4	558,1	441,9	1,26	
		g IV	36,3	11,5	31,5	17,0	1,85	
	15	h I	57,3	1527,0	2290,0	1627,0	1,41	
		h II	16,9	452,0	420,7	353,2	1,19	
		h III	25,8	12,2	30,5	17,9	1,70	
	30	i I	56,9	1403,0	2115,0	1480,0	1,43	
		i II	17,3	422,5	383,8	322,5	1,19	
		i III	25,8	10,2	26,5	15,3	1,73	
	AXC+K	0	j I	7,6	12256,0	-	-	-
			j II	66,1	1371,0	1930,0	1208,0	1,60
j III			26,3	16,5	45,6	24,3	1,88	
15		k I	7,1	4389,0	-	-	-	
		k II	55,6	1215,0	1486,0	1178,0	1,26	
		k III	13,0	358,8	377,5	300,2	1,26	
		k IV	24,3	10,6	27,7	16,2	1,71	
30		l I	5,8	5109,0	-	-	-	
		l II	55,5	1339,0	1625,0	1259,0	1,29	
		l III	14,3	367,0	350,9	311,8	1,13	
		l IV	24,4	10,0	28,1	16,3	1,72	

Tabela P4. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i ePG-modifikovanih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ	
XC	0	m I	40,3	1983,0	2718,0	1952,0	1,39	
		m II	24,2	670,7	551,2	463,5	1,19	
		m III	28,8	25,5	60,1	39,2	1,53	
		m IV	6,7	0,5	0,5	0,4	1,25	
	15	n I	46,4	1775,0	2208,0	1517,0	1,46	
		n II	26,4	384,5	357,4	286,2	1,25	
		n III	21,3	20,1	39,8	29,2	1,36	
		n IV	5,9	0,5	0,5	0,4	1,25	
	30	o I	49,6	1840,0	2312,0	1599,0	1,45	
		o II	25,9	401,3	369,0	294,4	1,25	
		o III	19,4	25,0	43,6	33,0	1,32	
		o IV	5,1	0,5	0,5	0,4	1,25	
XCP	0	p I	36,0	2411,0	3081,0	2277,0	1,35	
		p II	23,1	456,3	504,9	387,7	1,30	
		p III	34,9	10,1	27,9	14,8	1,88	
		p IV	6,0	0,5	0,5	0,4	1,25	
	15	q I	49,2	1884,1	2346,0	1700,0	1,38	
		q II	23,0	448,4	354,0	262,9	1,35	
		q III	23,2	10,2	22,0	13,9	1,58	
		q IV	4,6	0,5	0,5	0,4	1,25	
	30	r I	51,9	1850,0	2410,0	1699,0	1,42	
		r II	22,2	453,6	345,3	252,2	1,37	
		r III	21,6	10,5	21,9	14,1	1,55	
		r IV	4,3	0,5	0,5	0,4	1,25	
A	0	s I	38,0	837,8	1360,0	965,6	1,41	
		s II	28,8	210,7	266,9	236,5	1,13	
		s III	33,2	23,9	44,7	34,3	1,30	
	15	t I	58,6	616,4	915,8	674,8	1,36	
		t II	19,3	171,0	192,3	175,9	1,09	
		t III	22,1	21,4	38,6	30,1	1,28	
	30	u I	58,3	624,6	898,3	666,8	1,35	
		u II	23,4	157,3	183,0	166,3	1,10	
		u III	18,3	19,7	36,1	28,3	1,28	
	AXC	0	v I	79,5	550,4	893,9	437,0	2,05
			v II	20,5	25,2	43,3	32,2	1,34
		15	w I	62,9	422,0	768,8	459,8	1,67
w II			16,6	198,2	132,1	121,0	1,09	
w III			20,5	14,0	25,7	19,6	1,31	
30		x I	64,5	443,3	786,5	482,6	1,63	
		x II	15,2	203,2	140,6	131,2	1,07	
		x III	20,3	15,6	29,4	22,3	1,32	

*Tabela P5. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i PME-modifikovanih kiseloh ekstrahovanih pektinskih polisaharida*

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
K	0	a I	44,2	1814,0	2829,0	1650,0	1,71
		a II	55,8	54,6	109,4	32,2	3,39
	30	b I	21,7	3300,0	-	-	-
		b II	78,3	50,3	124,9	31,4	3,98
	60	c I	22,8	3100,0	-	-	-
		c II	77,2	46,8	123,3	31,3	3,94
XC+K	0	d I	60,5	1122,0	1809,0	948,0	1,91
		d II	39,5	44,2	73,2	21,5	3,4
	30	e I	60,0	981,0	1589,0	823,0	1,93
		e II	40,0	19,0	43,3	15,2	2,85
	60	f I	59,7	930,0	1619,0	855,0	1,89
		f II	40,3	21,1	48,5	17,1	2,84
A+K	0	g I	38,9	1469,0	2812,0	1904,0	1,48
		g II	9,2	957,3	732,8	704,1	1,04
		g III	51,9	39,7	105,6	62,0	1,70
	30	h I	28,9	2201,0	3288,0	2368,0	1,39
		h II	14,4	695,8	762,6	705,6	1,08
		h III	56,7	27,3	88,2	47,5	1,86
60	i I	31,8	1860,0	3150,0	2207,0	1,43	
	i II	11,6	696,6	729,7	686,5	1,06	
	i III	56,6	26,4	85,3	44,4	1,92	
AXC+K	0	j I	61,7	1229,0	2069,0	1194,0	1,73
		j II	38,3	43,6	99,6	61,3	1,62
	30	k I	39,7	1769,0	2980,0	1989,0	1,50
		k II	9,3	668,6	648,9	617,5	1,05
		k III	51,0	24,6	76,0	37,5	2,03
	60	l I	42,7	1660,0	2846,0	1864,0	1,53
l II		7,7	681,0	630,0	606,0	1,04	
l III		49,6	23,7	73,4	34,9	2,10	

Tabela P6. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i PME-modifikovanih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ	
XC	0	m I	33,2	1422,0	1924,0	1218,0	1,58	
		m II	14,4	222,0	253,9	217,5	1,17	
		m III	47,0	7,6	18,5	8,8	2,10	
		m IV	5,4	0,4	0,4	0,3	1,33	
	30	n I	32,4	1626,0	2333,0	1625,0	1,44	
		n II	15,0	503,3	521,7	484,7	1,08	
		n III	47,5	30,3	75,7	39,6	1,91	
		n IV	5,1	0,5	0,4	0,3	1,33	
	60	o I	23,0	1704,0	2665,0	1906,1	1,40	
		o II	19,8	465,0	557,0	491,0	1,13	
		o III	51,6	26,1	67,2	35,2	1,91	
		o IV	5,6	0,5	0,4	0,3	1,33	
XCP	0	p I	30,6	1428,0	2065,0	1325,0	1,56	
		p II	15,0	243,0	284,0	243,0	1,17	
		p III	50,4	7,5	19,9	8,9	2,24	
		p IV	4,0	0,4	0,4	0,3	1,33	
	30	q I	25,5	1315,0	2392,0	1441,0	1,66	
		q II	19,0	249,0	309,0	245,0	1,26	
		q III	50,7	7,6	19,7	7,9	2,49	
		q IV	4,8	0,4	0,4	0,3	1,33	
	60	r I	29,9	1056,0	1635,0	1041,0	1,57	
		r II	16,4	212,0	236,0	197,0	1,20	
		r III	49,2	5,9	16,2	6,8	2,38	
		r IV	4,5	0,4	0,4	0,3	1,33	
A	0	s I	24,7	2168,0	3404,0	2539,0	1,34	
		s II	23,0	567,4	723,5	634,0	1,14	
		s III	52,3	36,4	97,5	60,7	1,61	
	30	t I	12,6	3732,0	-	-	-	
		t II	28,9	511,7	787,7	630,7	1,25	
		t III	58,5	29,2	78,9	47,1	1,68	
	60	u I	13,5	3905,0	-	-	-	
		u II	27,8	565,9	857,5	686,2	1,25	
		u III	58,7	29,5	83,6	49,1	1,70	
	AXC	0	v I	64,1	1086,0	1740,0	988,0	1,76
			v II	35,9	32,2	78,1	48,9	1,60
		30	w I	23,4	2511,0	3485,0	2691,0	1,30
w II			21,0	670,4	824,9	738,2	1,12	
w III			55,6	36,7	100,3	59,6	1,68	
60		x I	25,1	2420,0	3351,0	2592,0	1,29	
		x II	19,9	667,6	805,6	727,7	1,11	
		x III	55,0	38,4	98,7	57,9	1,70	

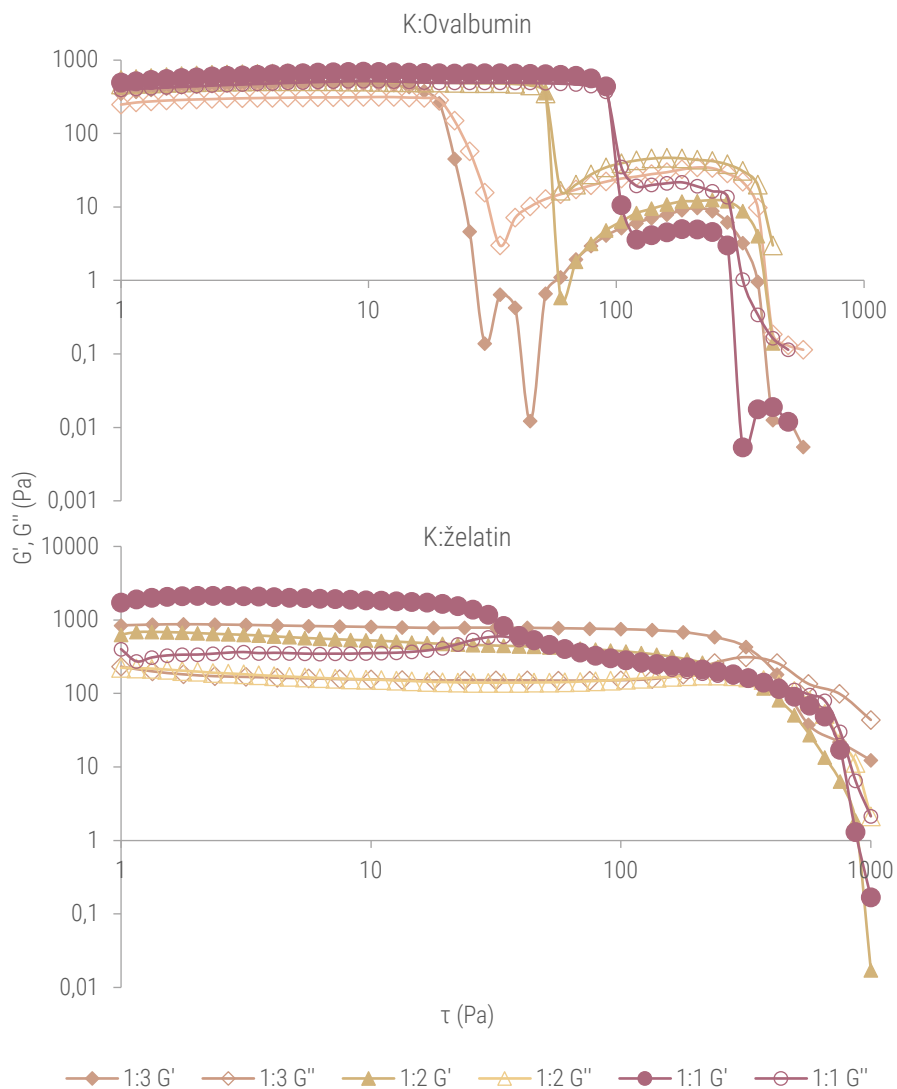
*Tabela P7. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i ePG+PME-modifikovanih kiselo ekstrahovanih pektinskih polisaharida*

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
K	0	a I	5,3	6561,0	-	-	-
		a II	45,4	1492,5	2099,4	1605,1	1,31
		a III	35,3	32,7	92,9	49,0	1,89
		a IV	11,4	17,9	8,2	5,3	1,55
		a V	2,5	0,4	0,4	0,3	1,33
	30	b I	51,4	597,9	1573,0	860,4	1,83
		b II	9,4	343,7	285,7	276,2	1,03
		b III	28,6	31,6	66,5	46,9	1,42
		b IV	8,1	18,4	9,1	6,3	1,44
		b V	2,5	0,4	0,4	0,3	1,33
XC+K	0	c I	3,5	6897,4	-	-	-
		c II	65,4	972,4	1492,8	996,7	1,49
		c III	24,1	38,9	84,8	55,9	1,52
		c IV	7,0	11,2	8,7	5,5	1,58
	30	d I	70,8	495,4	1123,0	419,3	2,68
		d II	23,0	21,7	40,9	30,9	1,32
		d III	6,2	12,7	6,2	4,1	1,51
A+K	0	e I	6,1	7251,0	-	-	-
		e II	39,7	1895,0	2600,0	2125,0	1,22
		e III	17,9	571,4	558,1	441,9	1,26
		e IV	36,3	11,5	31,5	17,0	1,85
	30	f I	61,8	506,4	1293,0	663,5	1,95
		f II	16,8	214,7	184,0	171,5	1,07
		f III	21,4	25,8	43,8	35,2	1,24
AXC+K	0	g I	7,6	12256,0	-	-	-
		g II	66,1	1371,0	1930,0	1208,0	1,60
		g III	26,3	16,5	45,6	24,3	1,88
	30	h I	62,7	433,6	1231,1	587,6	2,09
		h II	15,3	188,3	161,0	150,5	1,07
		h III	22,0	19,5	37,0	29,0	1,28



Tabela P8. Molarne mase, površine frakcija i disperznost nemodifikovanih i ePG+PME-modifikovanih enzimski ekstrahovanih pektinskih polisaharida

Pektinski polisaharid	Trajanje enzimske reakcije (min)	Frakcija	Površina frakcije (%)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
XC	0	i I	40,3	1983,0	2718,0	1952,0	1,39
		i II	24,2	670,7	551,2	463,5	1,19
		i III	28,8	25,5	60,1	39,2	1,53
		i IV	6,7	0,5	0,5	0,4	1,25
	30	j I	72,3	174,9	874,3	303,2	2,79
		j II	22,3	18,4	34,1	27,0	1,26
		j III	5,4	0,4	0,4	0,3	1,33
XCP	0	k I	36,0	2411,0	3081,0	2277,0	1,35
		k II	23,1	456,3	504,9	387,7	1,30
		k III	34,9	10,1	27,9	14,8	1,88
		k IV	6,0	0,5	0,5	0,4	1,25
	30	l I	47,3	463,7	1322,0	724,0	1,83
		l II	28,5	171,3	192,0	168,0	1,14
		l III	20,7	20,3	36,1	29,1	1,24
l IV		3,5	0,5	0,4	0,4	1,00	
A	0	m I	38,0	837,8	1360,0	965,6	1,41
		m II	28,8	210,7	266,9	236,5	1,13
		m III	33,2	23,9	44,7	34,3	1,30
	30	n I	50,4	486,4	1298,0	692,8	1,87
		n II	30,1	137,5	165,0	142,2	1,16
		n III	19,5	17,0	30,0	24,6	1,22
AXC	0	o I	79,5	550,4	893,9	437,0	2,05
		o II	20,5	25,2	43,3	32,2	1,34
		p I	62,7	433,6	1231,0	587,6	2,09
	30	p II	15,3	188,3	161,0	150,5	1,07
		p III	22,0	19,5	37,0	29,0	1,28



Slika P5. Reološka svojstva koacervata kiselog ekstrahovanog pektinskog polisaharida i ovalbumina ili želatina





# Plan tretmana podataka

---

**Naziv projekta/istraživanja**

Izdvajanje, karakterizacija i enzimska modifikacija pektinskog polisaharida muskatne tikve (*Cucurbita moschata*)

---

**Naziv institucije/institucija u okviru kojih se sprovodi istraživanje**

Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

---

**Naziv programa u okviru kog se realizuje istraživanje**

Program Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (451-03-68)

---

**1. Opis podataka****1.1 Vrsta studije**

*Doktorska disertacija*

**1.2 Vrste podataka**

- a)** kvantitativni
- b)** kvalitativni

**1.2.1 Način prikupljanja podataka**

- a)** ankete, upitnici, testovi
- b)** kliničke procene, medicinski zapisi, elektronski zdravstveni zapisi
- c)** genotipovi:
- d)** administrativni podaci:
- e)** uzorci tkiva:
- f)** snimci, fotografije:
- g)** tekst, navesti vrstu: *Naučna literatura*
- h)** mapa:
- i)** ostalo: opisati: *Primena eksperimentalnih analiza, veb sadržaj*

**1.3 Format podataka, upotrebljene skale, količina podataka****1.3.1 Upotrebljeni softver i format datoteke:**

- a)** Excel fajl, datoteka *.xlsx, .xls*
- b)** SPSS fajl, datoteka
- c)** PDF fajl, datoteka *.pdf*
- d)** tekst fajl, datoteka *.docx, .doc*
- e)** JPG fajl, datoteka *.jpeg*
- f)** Ostalo: *Statistica 14 (.sta, .stw), OriginPro 8 (.opj), Adobe Illustrator (.ai, .tif)*

**1.3.2. Broj zapisa (kod kvantitativnih podataka)**

- a)** broj varijabli: *Veliki broj*
- b)** broj merenja (ispitanika, procena, snimaka, i sl.): *Veliki broj*

**1.3.3. Ponovljena merenja**

- a)** da
- b)** ne

Ukoliko je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

- a)** vremenski razmak između ponovljenih merenja je *Između nekoliko minuta i nekoliko dana*
- b)** varijable koje se više puta mere odnose se na *Sve eksperimentalne analize*
- c)** nove verzije fajlova koje sadrže ponovljena merenja su imenovane kao *1, 2, 3...*

Napomene: /

Da li formati i softver omogućavaju deljenje i dugoročnu validnost podataka?

- a)** Da
- b)** Ne

Ako je odgovor ne, obrazložiti.

---

---

## 2. Prikupljanje podataka

---

### 2.1 Metodologija za prikupljanje/generisanje podataka

2.1.1. U okviru kog istraživačkog nacrta, kako su podaci prikupljeni?

- a) eksperiment: *Hemijske i instrumentalne analize*
- b) korelaciono istraživanje
- c) analiza teksta *Pregled dostupne literature iz oblasti, definisanje načina izvođenja istraživanja, diskusija rezultata i poređenje sa literaturnim podacima, izvođenje zaključaka*
- d) ostalo

2.1.2. Navesti vrste mernih instrumenata ili standarde podataka specifičnih za određenu naučnu disciplinu (ako postoje).

*Waters HPLC sistem (1515 izokratska pumpa i 2414 refraktometrijski detektor, Waters Corporation), UniSPEC 2, spektrofotometar (LLG), Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), HAAKE RheoStress 600 (Thermo Electron), ALPHA spektrometar (Bruker)*

### 2.2 Kvalitet podataka i standardi

2.2.1. Tretman nedostajućih podataka

a) Da li matrica sadrži nedostajuće podatke? Da **Ne**

Ako je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

- a) Koliki je broj nedostajućih podataka?
- b) Da li se korisniku matrice preporučuje zamena nedostajućih podataka? Da **Ne**
- c) Ako je odgovor da, navesti sugestije za tretman zamene nedostajućih podataka

2.2.2. Na koji način je kontrolisan kvalitet podataka? Opisati

*Kvalitet podataka je kontrolisan izvođenjem višestrukih merenja i primenom statističkih alata za evaluaciju njihovog kvaliteta.*

2.2.3. Na koji način je izvršena kontrola unosa podataka u matricu?

*Kontrola unosa podataka je izvršena upoređivanjem dobijenih podataka sa literaturnim podacima.*

---

## 3. Tretman podataka i prateće dokumentacija

---

### 3.1. Tretman i čuvanje podataka

3.1.1. Podaci će biti deponovani u *Nacionalnom repozitorijumu disertacija u Srbiji i u repozitorijumu Informacionog sistema naučne delatnosti Univerziteta u Novom Sadu.*

3.1.2. URL adresa *nardus.mpn.gov.rs* i *cris.uns.ac.rs/index.jsf*

3.1.3. DOI

3.1.4. Da li će podaci biti u otvorenom pristupu?

- a) Da
  - b) Da, ali posle embarga koji će trajati do
  - c) Ne
- Ako je odgovor ne, navesti razlog

3.1.5. Podaci neće biti deponovani u repozitorijum, ali će biti čuvani.

Obrazloženje

### 3.2 Metapodaci i dokumentacija podataka

3.2.1. Koji standard za metapodatke će biti primenjen?

3.2.1. Navesti metapodatke na osnovu kojih su podaci deponovani u repozitorijum.

Ako je potrebno, navesti metode koje se koriste za preuzimanje podataka, analitičke i proceduralne informacije, njihovo kodiranje, detaljne opise varijabli, zapisa itd.

### 3.3 Strategija i standardi za čuvanje podataka

---



---

3.3.1. Do kog perioda će podaci biti čuvani u repozitorijumu?

3.3.2. Da li će podaci biti deponovani pod šifrom? Da **Ne**

3.3.3. Da li će šifra biti dostupna određenom krugu istraživača? Da **Ne**

3.3.4. Da li se podaci moraju ukloniti iz otvorenog pristupa posle izvesnog vremena? Da **Ne**

Objasni

---

#### 4. Bezbednost podataka i zaštita poverljivih informacija

---

Ovaj odeljak MORA biti popunjen ako vaši podaci uključuju lične podatke koji se odnose na učesnike u istraživanju. Za druga istraživanja treba takođe razmotriti zaštitu i sigurnost podataka.

4.1 Formalni standardi za sigurnost informacija/podataka

Istraživači koji sprovode ispitivanja s ljudima moraju da se pridržavaju Zakona o zaštiti podataka o ličnosti ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) i odgovarajućeg institucionalnog kodeksa o akademskom integritetu.

4.1.2. Da li je istraživanje odobreno od strane etičke komisije? Da **Ne**

Ako je odgovor da, navesti datum i naziv etičke komisije koja je odobrila istraživanje.

4.1.2. Da li podaci uključuju lične podatke učesnika u istraživanju? Da **Ne**

Ako je odgovor da, navedite na koji način ste osigurali poverljivost i sigurnost informacija vezanih za ispitanike:

- a) Podaci nisu u otvorenom pristupu
- b) Podaci su anonimizirani
- c) Ostalo, navesti šta

---

#### 5. Dostupnost podataka

---

5.1. Podaci će biti

- a) javno dostupni
- b) dostupni samo uskom krugu istraživača u određenoj naučnoj oblasti
- c) zatvoreni

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti pod kojim uslovima mogu da ih koriste:

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti na koji način mogu pristupiti podacima:

5.4. Navesti licencu pod kojom će prikupljeni podaci biti arhivirani.

*Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade*

---

#### 6. Uloge i odgovornost

---

6.1. Navesti ime i prezime i mejl adresu vlasnika (autora) podataka

*Maja Milošević, maja.milosevic@uns.ac.rs*

6.2. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja održava matricu s podacima

*Maja Milošević, maja.milosevic@uns.ac.rs*

6.3. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja omogućuje pristup podacima drugim istraživačima

*Maja Milošević, maja.milosevic@uns.ac.rs*

---