

# Optimizacija uvjeta ekstrakcije glikozaminoglikana iz membrana jaja

---

Rakitovac, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:197733>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Nikolina Rakitovac

**OPTIMIZACIJA UVJETA EKSTRAKCIJE GLIKOZAMINOGLIKANA IZ  
MEMBRANA JAJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, veljača 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Biokemija

**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 22. svibnja 2023.

**Mentor:** *prof. dr. sc. Ivica Strelec*

**Pomoć pri izradi:** -

### Optimizacija uvjeta ekstrakcije glikozaminoglikana iz membrana jaja

Nikolina Rakitovac, 0113143735

#### Sažetak:

Cilj ovoga diplomskog rada bio je odrediti optimalne uvjete kiselinske ekstrakcije glikozaminoglikana i ukupnih šećera iz membrana jaja dobivenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom u odnosu na sirove membrane. U tu svrhu je provedena ekstrakcija tijekom 1, 2, 3, 4, 5, i 6 h pri tri različita omjera mase membrana i volumena 0,5 M otopine sumporne kiseline (6,25, 12,5 i 25 mg/mL) koja je korištena kao ekstrakcijsko otapalo. Analiza prinosa D-glukuronske kiseline pokazala je da se kod sirovih membrana najveći prinosi ostvaruju nakon 5 h ekstrakcije pri omjeru 12,5 mg ESM/mL, dok je u slučaju membrana dobivenih obradom kiselinama najveći prinos postignut nakon 6 h ekstrakcije, pri omjeru 12,5 mg ESM/mL, izuzev membrana dobivenih obradom ljuske jaja *o*-fosfornom kiselinom gdje je najpovoljniji omjer iznosio 6,25 mg ESM/mL. Najveći prinosi ukupnih šećera u slučaju sirovih membrana postignuti su nakon 5 h ekstrakcije pri omjeru od 12,5 mg ESM/mL, dok se omjer od 6,25 mg ESM/mL i 6 h ekstrakcije pokazao kao optimalan za membrane dobivene obradom kloridnom i octenom kiselinom, a 5 h ekstrakcije pri istom omjeru za membrane proizvedene *o*-fosfornom kiselinom. Analizirane membrane razlikuju se u prinosu D-glukuronske kiseline i ukupnih šećera s obzirom na kiselinu primijenjenu tijekom njihove proizvodnje.

**Ključne riječi:** membrane jaja, kiselinska ekstrakcija, glikozaminoglikani, D-glukuronska kiselina, ukupni šećeri

**Rad sadrži:** 35 stranica  
13 slika  
0 tablica  
2 priloga  
45 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Sandra Budžaki        | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. Ivica Strelec         | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron | član          |
| 4. doc. dr. sc. Ivana Tomac            | zamjena člana |

**Datum obrane:** 8. veljače, 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Biochemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 22, 2023.

**Mentor:** *Ivica Strelec, PhD, prof.*

**Technical assistance:** -

### The Optimization of Extraction Conditions of Eggshell Membrane Glycosaminoglycans

Nikolina Rakitovac, 0113143735

#### Summary:

This thesis aimed to determine the optimal acid extraction conditions of glycosaminoglycans and total sugars from eggshell membranes obtained by eggshell waste treatment with 5% hydrochloric, 10% acetic, and 15% *o*-phosphoric acid in comparison to raw eggshell membranes. For this purpose, extraction was carried out for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h at three different ratios of membrane mass and volume of 0.5 M sulfuric acid solution (6.25, 12.5, and 25 mg/mL), used as the extraction solvent. The analysis of the D-glucuronic acid yield showed that in the case of raw membranes, the highest yields were achieved after 5 h of extraction at a ratio of 12.5 mg ESM/mL, while in the case of membranes obtained by acid treatment, the highest yield was achieved after 6 h of extraction at a ratio of 12, 5 mg ESM/mL, except membranes obtained by *o*-phosphoric acid treatment, where the most favourable ratio was 6.25 mg ESM/mL. The highest yields of total sugars for raw membranes were achieved after 5 h of extraction at a ratio of 12.5 mg ESM/mL, while a ratio of 6.25 mg ESM/mL and 6 h of extraction proved to be optimal for membranes obtained by chloride and acetic acid treatment, and 5 h of extraction at the same ratio for membranes produced with *o*-phosphoric acid. In overall, analysed membranes differs in the yield of D-glucuronic acid and total sugars dependent on acid used for their production.

**Key words:** eggshell membranes, acid extraction, glycosaminoglycans, D-glucuronic acid, total sugars

**Thesis contains:** 35 pages  
13 figures  
0 tables  
2 supplements  
45 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| 1. Sandra Budžaki, PhD, prof.        | chair person |
| 2. Ivica Strelec, PhD, prof.         | supervisor   |
| 3. Lidija Jakobek Barron, PhD, prof. | member       |
| 4. Ivana Tomac, assistant prof.      | stand-in     |

**Defense date:** February 8, 2024.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Neizmjerno sam zahvalna mentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu na znanju i stručnom vodstvu pruženom prilikom izrade diplomskog rada.*

*Posebno hvala mojim roditeljima, bratu i Antoniu na potpori, ljubavi i strpljenju tijekom studija.*



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. LJUSKA JAJA .....	4
2.1.1. Struktura i sastav ljuske jaja .....	4
2.2. GLIKOZAMINOGLIKANI .....	6
2.2.1. Ekstrakcija glikozaminoglikana .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
3.1. ZADATAK .....	12
3.2. MATERIJALI I METODE .....	12
3.2.1. Uzorci .....	12
3.2.2. Kemikalije .....	12
3.2.3. Izolacija sirovih membrana .....	13
3.2.4. Ekstrakcija glikozaminoglikana iz membrane ljuske jaja .....	13
3.2.5. Određivanje koncentracije D-glukuronske kiseline .....	13
3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih šećera .....	15
3.2.7. Analiza podataka .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	16
4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA KISELINSKE EKSTRAKCIJE MEMBRANA JAJA NA PRINOS GLIKOZAMINOGLIKANA ..	17
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA KISELINSKE EKSTRAKCIJE MEMBRANA JAJA NA PRINOS UKUPNIH ŠEĆERA .....	21
4.3. UTJECAJ NAČINA PRIPREME MEMBRANA NA PRINOS GLIKOZAMINOGLIKANA I UKUPNIH ŠEĆERA .....	24
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	26
<b>6. LITERATURA</b> .....	28
<b>7. PRILOZI</b> .....	33

### **Popis oznaka, kratica i simbola**

GAG	glikozaminoglikan
D-GlcA	glukuronska kiselina
IdoA	iduronska kiselina



## **1. UVOD**

Kokošja jaja su zahvaljujući svojoj nutritivnoj i tehnološkoj vrijednosti jedna od najvažnijih namirnica današnjice. Osim njihove primjene kao sirovine u proizvodnji različitih namirnica svoju primjenu su pronašle u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji (Miguel i sur., 2005). Međutim, sektori poput valionica, kućanstava i različitih industrija koriste bjelanjak i žumanjak dok ljuska jaja zaostaje kao nejestivi otpad koji sadrži brojne biološki važne spojeve visoke ekonomske vrijednosti, pri čemu se u ljusku jaja ubrajaju: kalcificirani matriks, membrana i prijanjajući sloj bjelanjka (Strelec i sur., 2021; Alparce i sur., 2018).

Ljuska jaja koja zaostaje kao otpad najvećim je dijelom izgrađena od minerala i to 94 % kalcijeva karbonata, 1 % magnezijeva karbonata i 1 % kalcijeva fosfata, dok ostatak od 4 % čini organska tvar koja uključuje spojeve ugrađene u kalcificirani matriks i membranu ljuske jaja (Mittal i sur., 2016). Membrana ljuske jaja je izgrađena od najmanje 60 % proteina, pri čemu se u proteinskoj frakciji nalazi značajna količina kolagena tipa I, V i X. Većina polisaharida prisutnih u membrani nalazi se vezana na proteine i ubraja se u skupinu glikozaminoglikana, a osim hijaluronske kiseline čiji je sadržaj oko 10 %, prisutni su keratan sulfat, kondroitin sulfat i heparan sulfat. Glikozaminoglikani su heteropolisaharidi anionske prirode izgrađeni od izmjenično vezanih molekula heksozamina i uronske kiseline ili galaktoze u slučaju kondroitin sulfata. U ljudskom organizmu imaju brojne uloge te su temeljne komponente vezivnog tkiva (Nakano i sur., 2001).

Zbog brojnih primjena u farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji glikozaminoglikani se uz kolagen smatraju najvrjednijim komponentama membrane ljuske jaja. Budući da je većina istraživanja vezanih uz ekstrakciju glikozaminoglikana bazirana na korištenje fermentacije ili enzimske digestije koje zahtijevaju dugotrajne postupke (Alparce i sur., 2018), ovime diplomskim radom ispitana je mogućnost optimizacije jednostavne i ekonomične metode ekstrakcije pomoću 0,5 M otopine sumporne kiseline pri čemu je istražen utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrane i volumena otapala na prinos glikozaminoglikana, pri čemu je u ekstraktima određen udio D-glukuronske kiseline i ukupnih šećera. Istraživanje je provedeno na sirovim membranama i membranama proizvedenim obradom ljuske kloridnom, octenom i o-fosfornom kiselinom te je analiziran utjecaj kiselina primijenjenih tijekom proizvodnje membrane na udio ekstrahirane D-glukuronske kiseline i ukupnih šećera.

## **2. TEORIJSKI DIO**

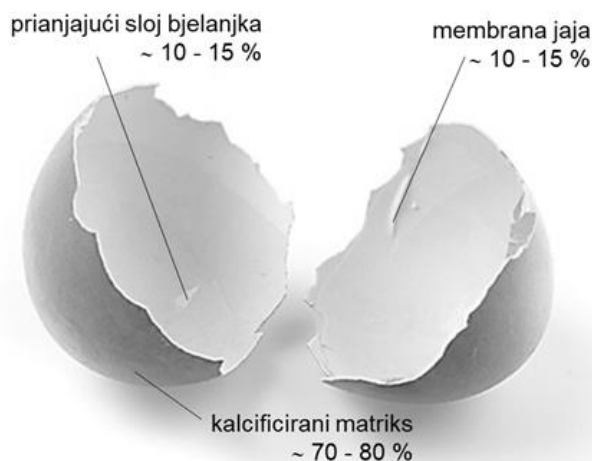
## 2.1. LJUSKA JAJA

Agencija za zaštitu okoliša ljusku jaja stavlja na 15. mjesto liste najvećih onečišćenja prehrambene industrije (Waheed i sur., 2020). Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu o ukupno proizvedenoj količini kokošnjih jaja i činjenici da masa ljuske jaja čini između 10 i 11 % mase jaja procjenjuje se da je 2018. godine na području Europske unije i Velike Britanije nastalo više od 777 000 t ljuske jaja koja se prema propisima Europske unije smatra opasnim otpadom (Ar i sur., 1979; Strelec i sur., 2021). Zbrinjavanje ovog otpada industriji predstavlja financijski i ekološki izazov, pri čemu osim nedostatka prikladnih odlagališta postoji rizik od širenja patogena i neugodnih mirisa te privlačenja insekata i glodavaca neovisno o prethodnoj obradi ljuske (Walton i sur., 1973; Mignardi i sur., 2020). Pogleda li se kemijski sastav ljuske jaja postaje jasna njezina vrijednost kao sirovine za proizvodnju različitih proizvoda dodane vrijednosti, što bi dovelo do smanjenja količine otpada te potencijalno unosnog toka prihoda. Primjenom osnovnih tehnologija prerade ljuska jaja postaje učinkovito gnojivo u poljoprivredi, dodatak hrani za životinje ili digestat u bioplinskim postrojenjima, dok se razvojem novih naprednih tehnologija istražuje njezin potencijal kao sirovine u proizvodnji dodataka prehrani te farmaceutskih i veterinarsko-medicinskih proizvoda poput dodataka kalcija, kolagena i hijaluronske kiseline (Strelec i sur., 2021; Schaafasma i sur., 2000; Nuhu i sur., 2012).

### 2.1.1. Struktura i sastav ljuske jaja

Ljuska jaja je visoko uređena mineralizirana struktura u kojoj se razlikuju tri strukturne komponente: kalcificirani matriks, membrana (tzv. ovojnica) ljuske i prijanjajući sloj bjelanjka koji zaostaje nakon izdvajanja tekućih komponenti: žumanjka i bjelanjka. Kalcificirani matriks čini od 70 do 80 % mase ljuske jaja, dok membrana i prijanjajući sloj bjelanjka svaki čine od 10 do 15 % mase ljuske jaja (**Slika 1**) (Strelec i sur., 2021).

Ljuska jaja, uključujući membranu i prijanjajući sloj bjelanjka, sadrži 78,81-83,51 g suhe tvari na 100 g ljuske jaja (Zajec, 2020), a najvećim se dijelom sastoji od kalcijeva karbonata koji čini 94 % mase ljuske jaja na bazi suhe tvari i 4 % organske tvari u što se ubrajaju polisaharidi i proteini ugrađeni u kalcificirani matriks i membrana ljuske (Ar i sur., 1979).



**Slika 1** Struktura i raspon udjela pojedinih strukturnih komponenti ljuske jaja (Strelec i sur., 2021)

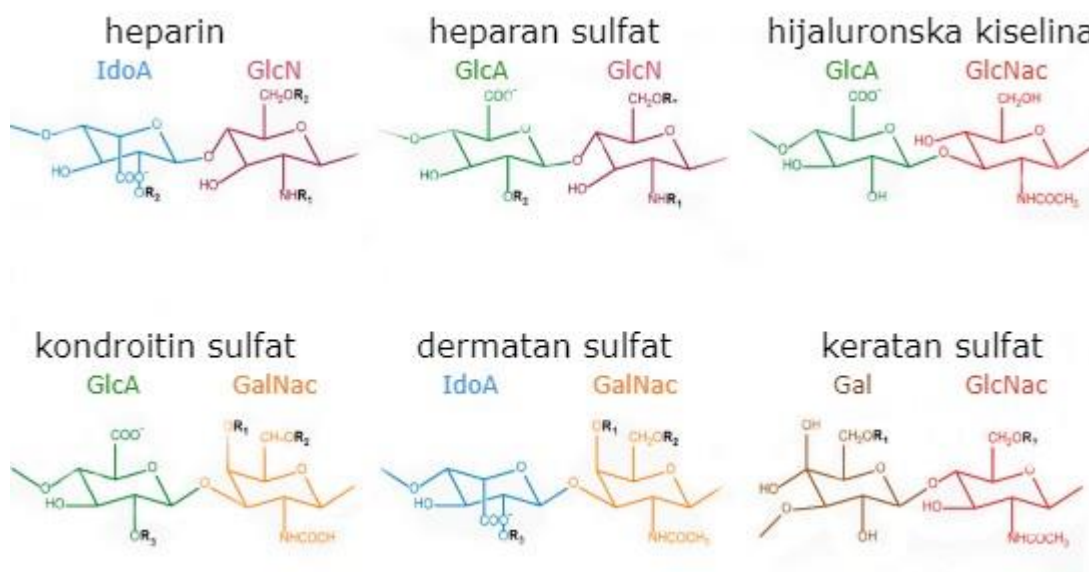
Kalcificirani matriks (tzv. "*prava ljuska jaja*") je prirodna porozna biokeramika koja nastaje spontanom taloženjem kalcijeva karbonata na proteinska vlakna vanjske membrane. U strukturi kalcificiranog matriksa razlikuju se tri sloja: mamilarni sloj, palisadni sloj i prijelazni okomiti kristalni sloj, pri čemu su vlakna vanjske membrane čvrsto vezana u mamilarni sloj kalcificiranog matriksa (Hincke i sur., 2012; Mensah i sur., 2021). Približno 96 % kalcificiranog matriksa čine kalcijev karbonat, magnezijev karbonat i kalcijev fosfat. Kalcit, najstabilniji polimorf kalcijeva karbonata pri sobnoj temperaturi, je najzastupljenija komponenta i čini oko 94 % mase (Mittal i sur., 2016). Navedeni minerali uklopljeni su u okolinu od organskih materijala koji čine oko 4 % kalcificiranog matriksa, pri čemu se ugljikohidratna komponenta primarno nalazi u sklopu glikoproteina i proteoglikana te sadrži uronske i sijalinske kiseline (Nakano i sur., 2003; Mann i Mann, 2015).

Membrana jaja je porozno vlaknasto tkivo smješteno između kalcificiranog matriksa i prijanjajućeg sloja bjelanjka te čini oko 3,3 % mase ljuske jaja na bazi suhe tvari (Zajec, 2020). Strukturno se razlikuju tri sloja čija ukupna debljina iznosi oko 70  $\mu\text{m}$ : vanjska membrana, unutarnja membrana i granična membrana (Yi i sur., 2003.). Vanjska i unutarnja membrana predstavljaju platformu za mineralizaciju ljuske i izgrađene su od slojeva proteinskih vlakana koji tvore polupropusnu trodimenzionalnu mrežu uklopljenu u glikozilirani omotač, dok granična membrana stupa u dodir s bjelanjkom te je nevlaknaste guste strukture (Baláž, 2014; Mensah i sur., 2021). Pogleda li se kemijski sastav membrane jaja podaci u dostupnoj literaturi variraju kako slijedi: prema Mittal i sur. (2016) udio proteina u membrani iznosi 60 %, prema Baláž (2014) proteini i glikozaminoglikani (GAG) čine od 80 do 85 % membrane, dok Lien i sur.

(2022) navode udio proteina od 80 do 90 % koji uključuje značajnu količinu u vodi topljivog kolagena i 472 različita proteina i proteoglikana povezana disulfidnim vezama preko lizinskih ostataka, poput: ovotransferina, lizil oksidaze i lizozima (Gautron i sur., 2001; Akagawa i sur., 1999; Hincke i sur., 2000). Prema Baláž (2014) kolagen čini 10 % ukupnih proteina membrane, dok Mittal i sur. (2016) navode da kolagenska vlakna čine 35 % proteinske frakcije, pri čemu unutarnja membrana sadrži sva tri tipa kolagena (tip I, V i X), dok vanjska membrana sadrži uglavnom kolagen tip I i X (Carrino i sur., 1996). Membrana jaja sadrži najmanje 11 % polisaharida, od kojih većina pripada u skupinu GAG (Alparce i sur., 2018). Prema Mittal i sur. (2016) glukozamin čini 10 %, kondroitin sulfat 9 %, a hijaluronska kiselina 5 % membrane jaja, dok Long i sur. (2005) navode da je udio hijaluronske kiseline do 10 %, a heksozamin i kondroitin sulfat svaki čine oko 5 % membrane jaja. Uz proteine i GAG membrana jaja sadrži oko 2 % šećera (galaktoza, manoza, glukoza i fruktoza) i 3 % lipida te male ali značajne količine uronske i sijalinske kiseline (King'ori, 2011; Nakano i sur. sur., 2003; Han i sur., 2023; Balch i Cooke, 1970).

## 2.2. GLIKOZAMINOGLIKANI

Glikozaminoglikani (mukopolisaharidi) su linearne, negativno nabijene polisaharidne molekule koje se svrstavaju u skupinu glikana. Strukturnu okosnicu molekule GAG čini različit broj ponavljajućih disaharidnih jedinica izgrađenih od izmjeničnih molekula uronske kiseline i heksozamina (Casale i Crane, 2022). Uronske kiseline su D-glukuronska kiselina (D-GlcA) i L-iduronska kiselina (L-IdoA), a heksozamin može biti baziran na glukozi (*N*-acetil-D-glukozamin) ili galaktozi (*N*-acetil- $\beta$ -D-galaktozamin). Iz razlike u vrsti uronske kiseline i vezanog heksozamina u okosnici razlikuju se četiri glavne kategorije GAG: heparin i heparan sulfat, kondroitin sulfat i dermatan sulfat, keratan sulfat i hijaluronska kiselina (Neves i sur., 2020). Na **Slici 2** prikazana je struktura ponavljajuće disaharidne jedinice navedenih GAG.



**Slika 2** Struktura ponavljajuće disaharidne jedinice GAG

Značenje kratica: IdoA - L-iduronska kiselina, GlcA - D-glukuronska kiselina, GlcN- D-glukozamin, GlcNac - N-acetil-D-glukozamin, GalNac - N-acetil-galaktozamin, Gal - galaktoza  
(preuzeto i prilagođeno od Neves i sur., 2020)

Heparin i heparan sulfat su visoko sulfatirani GAG koji u svojoj ponavljajućoj disaharidnoj jedinici sadrže isti heksozamin (D-glukozamin), ali se razlikuju u udjelu vezane uronske kiseline, u heparinu udio L-IdoA je oko 90 %, dok u heparan sulfatu prevladava D-GlcA (Gandhi i Mancera, 2008).

Kondroitin sulfat i dermatan sulfat su galaktozaminoglikani, odnosno sadrže N-acetil- $\beta$ -D-galaktozamin na koji se  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidnom vezom veže D-GlcA u slučaju kondroitin sulfata, odnosno L-IdoA kod dermatan sulfata (Gandhi i Mancera, 2008).

Hijaluronska kiselina pripadnik je skupine glukozaminoglikana, poznata i pod nazivom hijaluronan. Sastoji se od ponavljajućih disaharidnih jedinica izgrađenih od D-glukozamina i D-GlcA spojenih  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnom vezom, pri čemu se disaharidne jedinice u linearnom lancu vežu  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidnom vezom (Gandhi i Mancera, 2008).

Keratan-sulfat je jedini GAG koji ne sadrži uronsku kiselinu već se sastoji od ponavljajućih disaharidnih jedinica D-galaktoze vezane  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnom vezom za N-acetil-D-glukozamin (Caterson i Melrose, 2018).

Osim prema vrsti jedinice heksozamina, heksoze ili uronske kiseline koju sadrže, ove biološki važne molekule razlikuju i prema geometriji glikozidne veze između tih jedinica te stupnju i mjestu sulfatacije. Sulfatirani GAG uključuju kondroitin sulfat, dermatan sulfat, keratan sulfat, heparin i heparan sulfat dok nesulfatiranim GAG pripada hijaluronska kiselina (Gandhi i Mancera, 2008). Sulfatne i karboksilne skupine GAG daju visoku gustoću negativnog naboja, zbog toga u otopinama ove molekule poprimaju proširenu konformaciju u obliku spiralnog štapića koja pridonosi visokoj viskoznosti i niskoj kompresibilnosti otopine (Gandhi i Mancera, 2008). Tako, otopine kondroitin sulfata pokazuju svojstva viskozne tekućine, dok otopine hijaluronske kiseline zbog veće molekularne mase pokazuju svojstva viskoelastičnih polimera gdje povećanje brzine smicanja dovodi do niže viskoznosti i veće elastičnosti (Horkay i sur., 2021).

U organizmu GAG se prvenstveno nalaze kovalentno vezani za specifične proteine tvoreći proteoglikane i glikoproteine (Liu i sur., 2014; Horkay i sur., 2021), a iznimka je hijaluronska kiselina koja je pomoću specifičnih veznih domena sposobna ostvariti interakciju s drugim molekulama (Neves i sur., 2020). Biološka funkcija GAG određena je njihovom molekularnom masom i stupnjem sulfatacije (Kjellen i Lindahl, 1992), a ovisno o proteinu na koji su vezani sudjeluju u različitim biološkim procesima poput obrane od patogena, koagulaciji i staničnoj adheziji (Gottschalk i Elling, 2021). Biološke funkcije hijaluronske kiseline podrazumijevaju održavanje viskoelastičnosti sinovijalne tekućine i hrskavice, hidrataciju tkiva i transport vode (Necas i sur., 2008), stoga su razvijeni brojni medicinski pripravci na bazi hijaluronske kiseline koji se koriste u liječenju artritisa i oftamološkoj kirurgiji ili u kozmetičkoj industriji. S druge strane, heparin sulfat, kondroitin sulfat i dermatan sulfat posjeduju antikoagulacijska svojstva, a u medicini se već dugi niz godina primjenjuju antitrombocitni lijekovi na bazi heparin sulfata (Gottschalk i Elling, 2021).

### **2.2.1. Ekstrakcija glikozaminoglikana**

Zbog rastućeg interesa industrije za proizvodnju glikozaminoglikana, a posebno hijaluronske kiseline, na tržištu se stvara potreba za novim izvorom koji će osigurati visoke prinose (Sadhasivam i sur., 2013). Kemijski sastav membrane jaja sličan je sastavu ekstracelularnog matriksa u ljudskom tijelu, stoga ovaj otpad predstavlja vrijednu sirovinu za ekstrakciju GAG i kolagena. Nadalje, u kalcificiranom matriksu i membrani jaja su prisutne sve četiri skupine

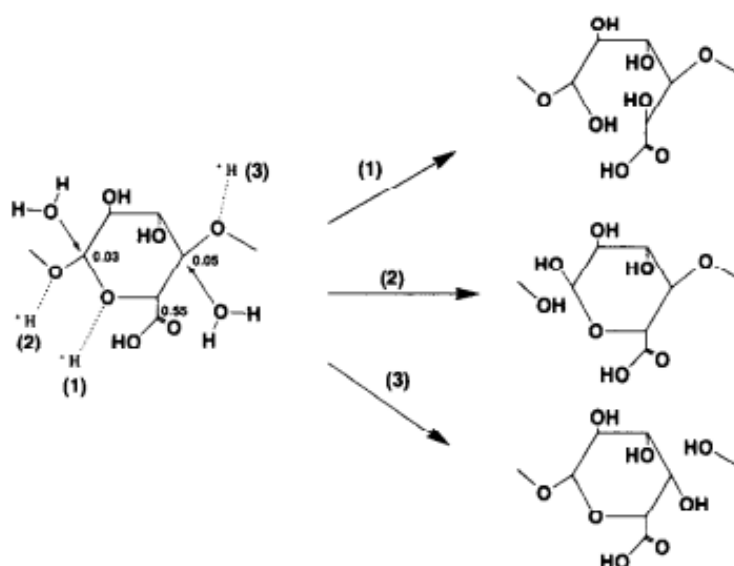


GAG, pri čemu je udio nesulfatiranih GAG znatno veći od udjela sulfatiranih. Hijaluronska kiselina visoke molekularne mase je najzastupljeniji GAG membrane jaja s udjelom do 10 %, a slijede ju kondroitin sulfat, keratan sulfat i heparan sulfat (Liu i sur., 2016; Liu i sur 2014; Long i sur., 2005; Lien i sur., 2022).

Industrijska proizvodnja GAG najčešće podrazumijeva različite tehnike razgradnje i izolacije iz kompleksa prisutnih animalnim tkivima (Gottschalk i Elling, 2021). Ekstrakciju je moguće provesti kemijskom ili enzimskom hidrolizom uz primjenu deterdženata, enzima i otapala. Važno je napomenuti da metoda ekstrakcije može utjecati na stupanj kontaminacije i karakteristike molekula GAG, odnosno njihovu strukturu i stupanj sulfatizacije (Abdallah i sur., 2020).

**Enzimске metode ekstrakcije** uključuju opširne pred-tretmane sirovine kiselinama u svrhu uklanjanja lipida, a nakon enzimске digestije slijedi ispiranje i izdvajanje GAG najčešće pomoću ionoizmjenjivačke kromatografije (Graciela i sur., 2023; Alparce i sur., 2018). Kako bi se izolirale neoštećene molekule GAG, razgradnja tkiva i proteinske frakcije najčešće se provodi hidrolitičkim enzimima poput: papaina, tripsina i pepsina (Abdallaha i sur., 2020).

**Kemijska ekstrakcija** je jednostavna i ekonomična metoda koja podrazumijeva korištenje otapala poput razrijeđenih otopina kiselina ili lužina, otopina soli ili taloženje u otopini alkohola centrifugiranjem (Ogawa, 2021), a temelji se na izolaciji proteoglikana solubilizacijom komponenti staničnog matriksa (Chascalli sur., 1994) i uglavnom se koristi za ekstrakciju hijaluronske kiseline (Abdallaha i sur., 2020). Kratkotrajna obrada hijaluronske kiseline kiselim ili alkalnim otopinama dovodi do postupnog kidanja lanca s reducirajućeg kraja te  $\beta$ -eliminacije karakteristične za polisaharide koji sadrže uronske kiseline (Kiss, 1974). Prema Tokita i Okamoto (1995) hidroliza hijaluronske kiseline u kiselom mediju odvija se nasumičnim cijepanjem lanca i pridržava se kinetike prvog reda. Na **Slici 3** prikazani su mogući mehanizmi kiselinski katalizirane hidrolize hijaluronske kiseline, pri čemu je važno napomenuti da se reakcija prvenstveno odvija na molekuli D-GlcA zbog njezine nukleofilne prirode. Aktivna mjesta hidrolize su C1, C4 i karbonilni ugljik, pri čemu hidroliza na C1 i C4 rezultira kidanjem lanca, a reakcija na C1 atomu može rezultirati i otvaranjem cikličke strukture. Autori naglašavaju da prema rezultatima C-NMR u ovome istraživanju ne dolazi do otvaranja poluacetalne cikličke strukture.



**Slika 3** Mogući mehanizmi hidrolize hijaluronske kiseline u kiselom mediju (Tokita i Okamoto, 1995)

Prema Cifonell (1960) *N*-sulfatne skupine glikozaminoglikana su potpuno hidrolizirane nakon 30 minuta u 0,5 M sumpornoj kiselini pri 100 °C, dok je za potpunu hidrolizu *N*-acetilnih skupina pri istim uvjetima potrebno 4-5 h (Conrad, 1980). Pri navedenim uvjetima potpuna hidroliza glikozidnih veza *N*-acetiliranih amino šećera odvija se za 4 do 6 h, dok se veze uronskih kiselina i *N*-nesupstituiranih amino šećera hidroliziraju znatno sporije (Shively i Conrad, 1970). Odnosno, hidroliza GAG rezultira mješavinom monosaharida i oligosaharida uz povećanje udjela heksozaminskih ostataka koji su *N*-nesupstituirani s produljenjem vremena hidrolize (Conrad, 1980).

S druge strane, alkalna hidroliza hijaluronske kiseline zbog elektrofilnosti molekule započinje na *N*-acetil-D-glukozaminu i cjelokupna reakcija se odvija u dvije faze. Prva faza uključuje cijepanja veze između C1 i C2 atoma, dok u drugoj fazi dolazi do cijepanja glikozidne veze što rezultira kidanjem polisaharidnog lanca (Tokita i Okamoto, 1995).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati mogućnost optimizacije ekstrakcije GAG iz membrana jaja, uz dva različita uvjeta ekstrakcije. Prvi uvjet ekstrakcije uključuje 3 različita odnosa mase membrana jaja i volumena ekstrakcijskog otapala (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 6,25, 12,5 i 25 mg ESM/mL. Drugi uvjet je vrijeme ekstrakcije, pri čemu se ekstrakcija provodila: 1, 2, 3, 4, 5 i 6 h. Količina ekstrahiranih GAG kvantificirana je karbazol metodom uz D-GlcA kao standard za pripremu baždarnih dijagrama, dok je metodom fenol: sulfatna kiselina određen prinos ukupnih šećera. Na osnovi dobivenih rezultata definirani su optimalni uvjeti ekstrakcije GAG iz 4 tipa membrana jaja koje se razlikuju prema metodi odvajanja membrane od ljuske jaja.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Uzorci

Prilikom izrade ovoga rada korištene su membrane proizvedene obradom ljuske jaja razrijeđenim otopinama kloridne kiseline, octene kiseline i *o*-fosforne kiseline (Strelec i sur., 2023a, 2023b), a dobavljene od strane ImoLipWaste projekta. Sirove membrane proizvedene su iz ljuske jaja koja je zaostala kao otpad i skladištena pri - 20° C do postupka izolacije membrane. Svi uzorci pripremljenih membrana skladišteni su na + 4° C do analize.

#### 3.2.2. Kemikalije

Tijekom izrade diplomskog rada za pripremu 0,5 M otopine sumporne kiseline korištene kao ekstrakcijsko otapalo, pripremu 0,025 M otopine natrijev-tetraborat dekahidrata u sumpornoj kiselini za provedbu karbazol metode, te za provedbu metode za određivanje ukupnih šećera (fenol: sumporna kiselina) korištena je sumporna kiselina (95-97 %) od proizvođača KEFO d.o.o. (Slovenija). Za provedbu karbazol metode korišten je natrijev-tetraborat dekahidrat od proizvođača Acros Organics (SAD), karbazol (96 %) od proizvođača Acros Organics (Kina) i apsolutni etanol (99,98 %) od proizvođača Gram-Mol d.o.o. (Republika Hrvatska). Fenol (99 %) korišten za određivanje ukupnih šećera dobavljen je od proizvođača Lachner (Češka Republika).

Prilikom izrade baždarnih dijagrama korištena je D(+)-glukuronska kiselina (99 %) dobavljena od tvrtke Acros Organics (Slovačka).

### 3.2.3. Izolacija sirovih membrana

Po 15 g odmrznutih ljuski jaja odvagano je u šest uskih visokih čaša volumena 600 mL u koje je menzurom dodano po 300 mL destilirane vode te su čaše postavljene na orbitalnu tresilicu Phoenix Instrument RS-OS20 pri 250 okretaja/min, tijekom 10 minuta. Tekućina je odvojena dekantiranjem i odbačena, a ispiranje prijanjajućeg sloja bjelanjka s ljuske jaja je ponovljeno još dva puta. Membrane su potom pomoću pincete odvojene od kalcificiranog matriksa i stavljene na sušenje u termostatski inkubator Heraeus B5090e (Heraeus, Njemačka) tijekom 72 h. Nakon sušenja membrane su usitnjene na Bosch TSM6A013B mlincu za kavu i pohranjene na +4° C do analize.

### 3.2.4. Ekstrakcija glikozaminoglikana iz membrane ljuske jaja

Ekstrakcija GAG iz membrana jaja 0,5 M sumpornom kiselinom provodila se pri tri različita omjera mase uzorka i volumena otapala: 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL i 25 mg/mL. U visoke staklene epruvete sa plastičnim čepom izvagano je 25, 50 i 100 mg uzorka membrana i dodano je po 4 mL 0,5 M sumporne kiseline. Epruvete su postavljene u kipuću vodenu kupelj na određeno vrijeme (1, 2, 3, 4, 5 ili 6 h) uz povremeno miješanje. Nakon završetka vremena ekstrakcije zaostali netopljivi materijal je uklonjen centrifugiranjem (Centric 150, Tehnica, Slovenija) pri 5000 obrtaja/minuti tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, a ekstrakt je odvojen dekantiranjem. U svrhu bistrenja ekstrakta centrifugiranje (Centric 150, Tehnica, Slovenija) je ponovljeno pri 9000 obrtaja/minuti tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi te je ekstrakt GAG odvojen dekantiranjem i korišten za daljnje analize.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije D-glukuronske kiseline

Breen i sur. (1970) kao uspješnu metodu kvantifikacije polisaharida, GAG i proteoglikana nakon procesa ekstrakcije navode karbazol metodu, odnosno Discheovu modifikaciju karbazolovog postupka koji se može provoditi i uz prisutnost borata i/ili sulfamata (Galambos, 1967), pri čemu se provodi kvantifikacija uronske kiseline i heksozamina. Važno je napomenuti da se GAG mogu kvantificirati karbazol metodom samo u slučaju da su potpuno hidrolizirani u nesulfatnu uronsku kiselinu i glikozamin (Frazier i sur., 2008).

Sam postupak kvantifikacije modificiranom karbazol metodom uključuje dva koraka: hidroliza GAG do uronske kiseline pomoću 0,025 M otopine natrijevog tetraborata dekahidrata u

koncentriranoj sumpornoj kiselini i bojenje uronske kiseline 0,0125 % karbazol reagensom u apsolutnom etanolu. Oba koraka zahtijevaju zagrijavanje u vodenoj kupelji pri 100° C (Bitter i Muir; 1962).

Koncentracija D-GlcA u ekstraktima određena je karbazol metodom, a provedena je u 3 paralele za sve uzorke na slijedeći način: u visoke staklene epruvete sa plastičnim čepom otpipetirano je 500 µL ohlađenog ekstrakta ili destilirane vode (slijepa proba) i dodano je 2,5 mL 0,025 M otopine natrijevog tetraborata dekahidrata u koncentriranoj sumpornoj kiselini. Smjesa je dobro promiješana na vortex miješalici i termostatirana 10 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon 10 minuta uzorak je u ledenoj kupelji ohlađen na sobnu temperaturu i dodano je 100 µL 0,0125 % karbazol reagensa. Uzorak je ponovno promiješan na vortex miješalici i termostatiran 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Po isteku termostatiranja uzorci su u ledenoj kupelji ohlađeni na sobnu temperaturu i izmjerena im je apsorbancija pri valnoj duljini 530 nm na Lasany, LI-285 jednozračnom UV/VIS spektrofotometru.

Za izradu baždarnog dijagrama pripravljena je otopina D-GlcA u destiliranoj vodi koncentracije 0,1 mg/mL iz koje su pripravljena razrjeđenja koncentracija 20, 40, 60, 80 i 100 µg/mL. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije dobivena je jednadžba baždarnog pravca (**Prilog 1**):

$$y = 0,0128x$$

Gdje je:

Y – intenzitet apsorbancije pri 530 nm

X – koncentracija glukuronske kiseline u µg/mL

### 3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih šećera

Određivanje koncentracije ukupnih šećera provedeno je kolorimetrijskom fenol: sulfatna kiselina metodom, pri čemu koncentrirana sumporna kiselina razgrađuje polisaharide, oligosaharide i disaharide do monosaharida. Nadalje, u prisutnosti koncentrirane sumporne kiseline i topline nastale dodatkom kiseline u vodeni medij ugljikohidratima se uklanja -OH skupina pri čemu nastaju derivati furana koji reagiraju s fenolom, a nastali spojevi daju stabilno zlatno-žuto obojenje (Nielsen, 2010).

Postupak određivanja ukupnih šećera je proveden na slijedeći način: u staklene epruvete s čepom je otpipetirano 50 µL ekstrakta, 500 µL 4 %-tne otopine fenola i 2,5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Uzorak je kratko promiješan na vortex miješalici te je izmjeren intenzitet apsorbancije pri 490 nm na Lasany, LI-285 jednozračnom UV/VIS spektrofotometru uz slijepu probu za čiju pripremu se umjesto uzorka dodalo otapalo korišteno u ekstrakciji, odnosno 0,5 M sumporna kiselina. Mjerenja koncentracije ukupnih šećera provedena su u tri paralele za sve uzorke, a intenzitet apsorbancije je preračunat u masenu koncentraciju na temelju baždarnog dijagrama pripremljenog s poznatim koncentracijama D-GlcA kao standarda.

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljena je otopina D-GlcA koncentracije 10 mg/mL. Iz pripremljene otopine napravljena su razrjeđenja koncentracija 100, 200, 300, 400 i 500 µg/mL te je postupak proveden prema gore navedenom protokolu (**Prilog 2**). Jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$y = 0,0024x$$

Gdje je:

y – apsorbancija pri 490 nm

x – koncentracija D-GlcA (µg/mL)

### 3.2.7. Analiza podataka

Za izračun srednjih vrijednosti i standardne devijacije te izradu grafova korišten je program Excel (Microsoft, SAD). Provedena je i statistička analiza podataka usporedbom prosječnog prinosa D-GlcA i ukupnih šećera između različitih membrana, primjenom t-testa za zavisne uzorke sa statističkom značajnosti ( $p < 0,05$ ) u programu Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., USA).

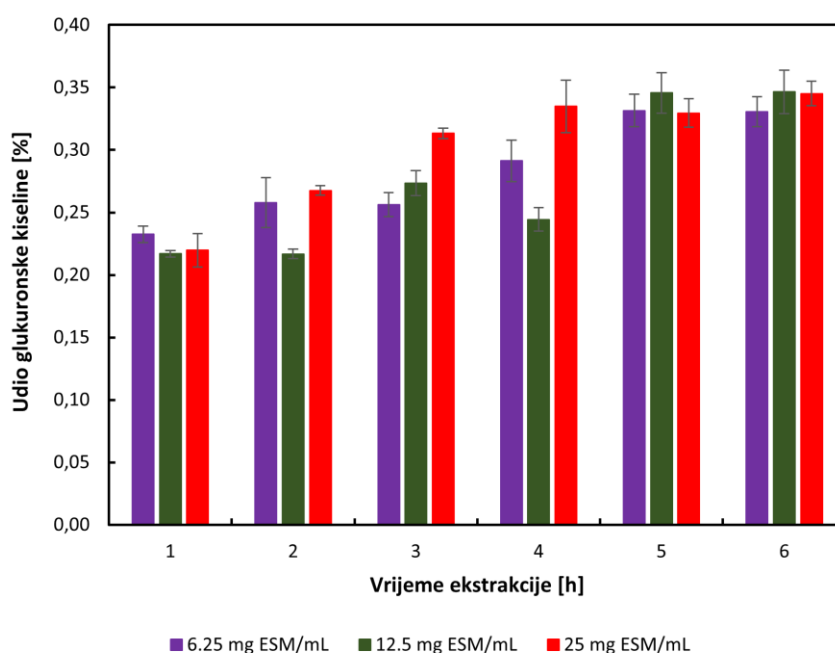
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



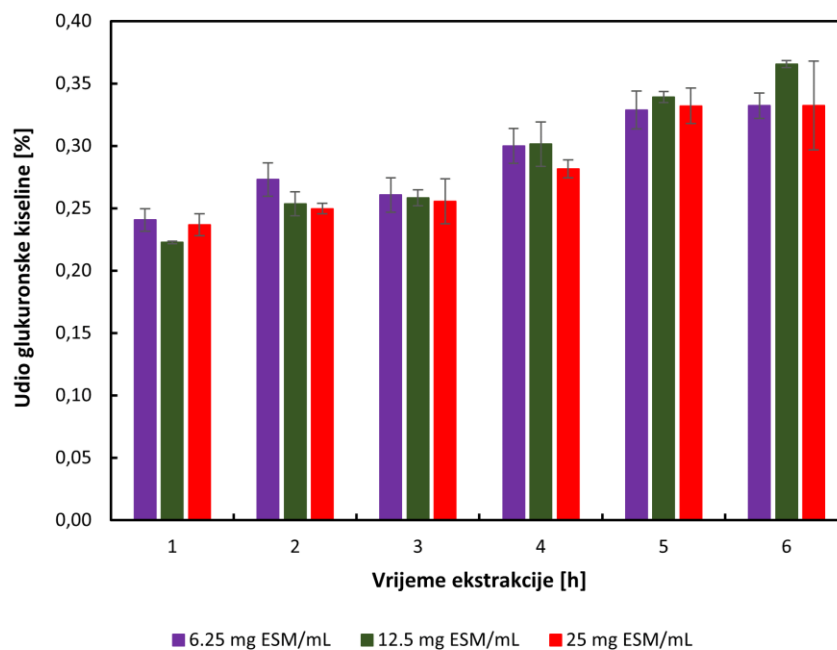
Optimizacija jeftinih i jednostavnih metoda ekstrakcije GAG ključna je za osiguranje ekonomski isplative i učinkovite uporabe membrane ljuske jaja. U okviru ovog diplomskog rada provedena je ekstrakcija GAG otopinom sumporne kiseline iz četiri tipa membrana jaja koji su na **Slikama 4 - 13** ovisno o načinu izolacije označene kao: ESM-sirove, ESM-HCl, ESM-HAc i ESM-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Cilj istraživanja bio je: a) odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije i omjer mase membrane i volumena otapala, i potom pri određenim optimalnim uvjetima ekstrakcije b) analizirati utjecaj 5 % kloridne, 10 % octene i 15 % *o*-fosforne kiseline korištenih tijekom pripreme membrana na prinos D-GlcA i ukupnih šećera.

#### 4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA KISELINSKE EKSTRAKCIJE MEMBRANA JAJA NA PRINOS GLUKURONSKE KISELINE

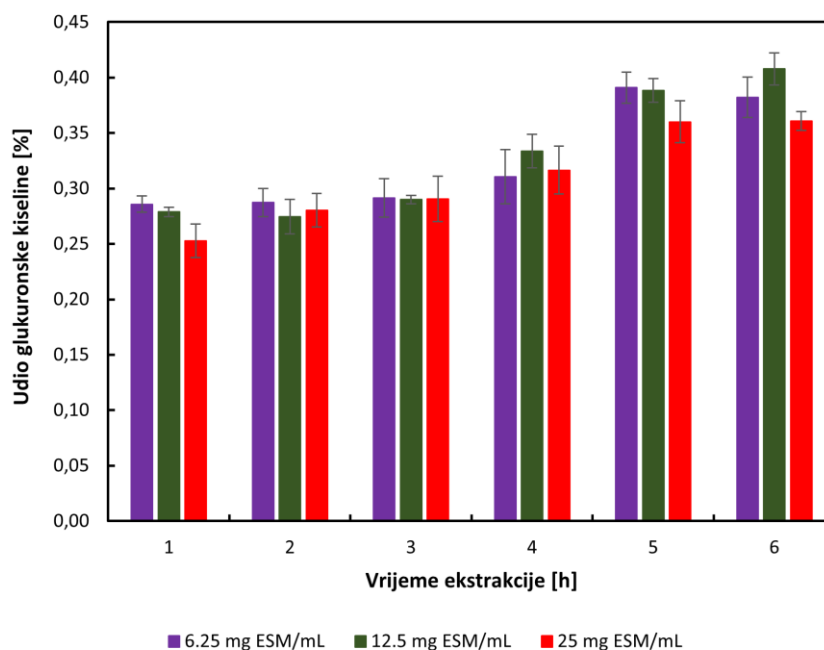
Glikozaminoglikani su ravnolančani polisaharidi izgrađeni od izmjenično vezanih molekula uronskih kiselina (D-GlcA i IdoA) i heksozamina, stoga se određivanjem koncentracije D-GlcA može dobiti uvid u koncentraciju GAG prisutnih u dobivenom ekstraktu (Balch i Cooke, 1970; Nakano i sur., 2003).



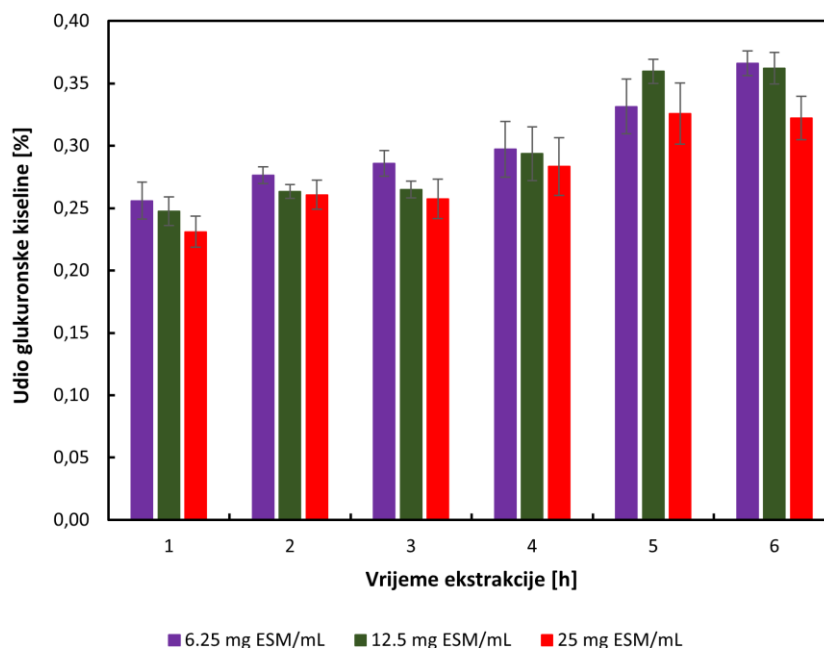
**Slika 4** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase sirovih membrana i volumena otapala na udio ekstrahirane D-GlcA (%)



**Slika 5** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrana i volumena otapala na udio ekstrahirane GlcA (%) iz membrana dobivenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom kiselinom



**Slika 6** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrana i volumena otapala na udio ekstrahirane GlcA (%) iz membrana dobivenih obradom ljuske jaja 10 % octenom kiselinom



**Slika 7** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrana i volumena otapala na udio ekstrahirane GlcA (%) iz membrana dobivenih obradom ljuske jaja 15 % *o*-fosfornom kiselinom

Rezultati istraživanja pokazuju da se najveći prinosi D-GlcA u slučaju sirovih membrana postižu nakon 5 ili 6 h ekstrakcije pri omjeru 12,5 ili 25 mg ESM/mL (**Slika 4**). S druge strane, u slučaju membrana proizvedenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom (**Slika 5**), 10 % octenom (**Slika 6**) i 15 % *o*-fosfornom (**Slika 7**) kiselinom najveći se prinosi postižu nakon 6 h ekstrakcije, pri čemu se kao najbolji omjer mase membrane i volumena otapala za membrane dobivene obradom ljuske jaja kloridnom i octenom kiselinom pokazao omjer od 12,5 mg ESM/mL, a za membrane dobivene obradom *o*-fosfornom kiselinom od 6,25 mg ESM/mL. Prosječni prinosi D-GlcA zabilježeni u ovome radu pri optimalnim uvjetima iznose  $0,327 \pm 0,012$  % za sirove membrane i  $0,331 \pm 0,017$  %,  $0,388 \pm 0,011$  % i  $0,326 \pm 0,025$  % za membrane dobivene obradom kloridnom, octenom i fosfornom kiselinom.

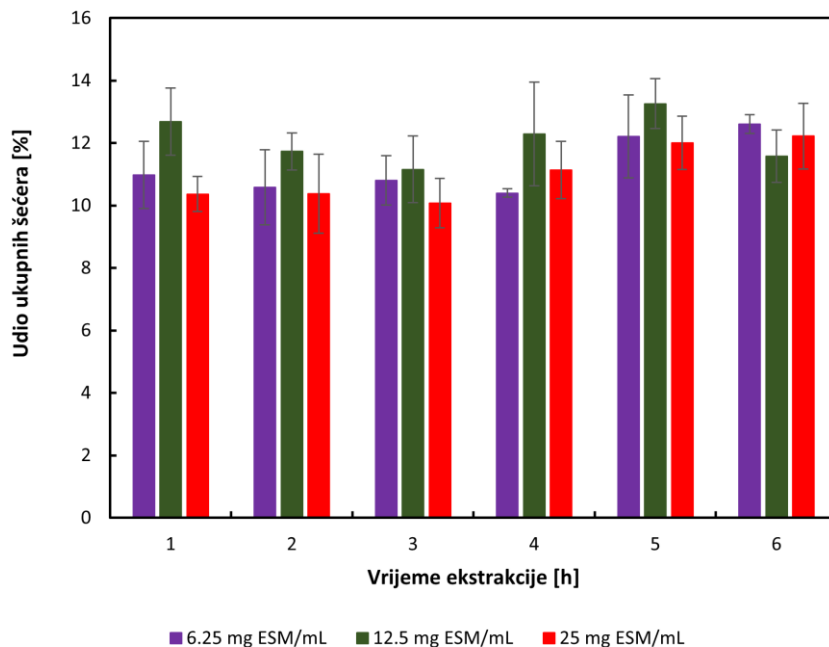
Udio uronskih kiselina u ekstraktu dobivenom nakon 3 h ekstrakcije membrana jaja uz 0,5 M sumpornu kiselinu kao otapalo odredili su Baker i Balch (1962) i Balch i Cooke (1970) pri čemu navode da membrane jaja ne sadrže uronske kiseline ili je njihov udio neznatan. S druge strane, Nakano i sur. (2003) navode da membrana sadrži mali ali značajan udio uronskih kiselina, a nakon proteolize vanjske i unutarnje membrane papainom njihov prinos je iznosio  $0,13 \pm 0,1$  % i  $0,115 \pm 0,18$  %, što je niže od količine određene u ovom diplomskom radu. Niže

koncentracije uronskih kiselina moguće je odrediti ukoliko GAG nisu u potpunosti hidrolizirani ili ukoliko je uronska kiselina dekarboksilirana.

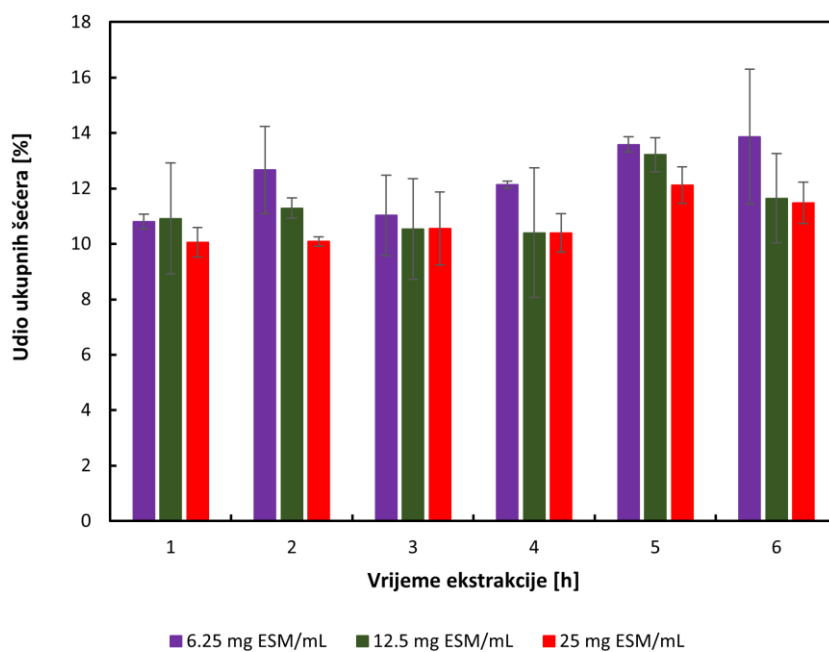
Međutim, znatno veći prinosi GAG od postignutih u ovome diplomskom radu zabilježeni su u ekstraktima dobivenih enzimskom hidrolizom membrane pomoću keratinaze, pepsina, papaina i tripsina. Najveći prinosi GAG i sulfatiranih GAG postignuti su uz primjenu keratinaze i iznose 6,4 % i 0,7 % (Lien i sur, 2022), dok je nakon tretmana pepsinom (Arsal Coculova, 2018) papainom i tripsinom (Úrgeová i Vulganová, 2016) prinos nešto manji i iznosi 5 %, 3,9 % i 4,5 %. Niži prinosi D-GlcA zabilježeni u ovom diplomskom radu i prinosi uronske kiseline koji navode Nakano i sur. (2003) ukazuju da ekstrakcija GAG bez primjene enzima poput keratinaze, pepsina, papaina i tripsina dovodi do smanjenog prinosa tijekom ekstrakcije, odnosno da ekstrakcija GAG sumpornom kiselinom bez primjene enzimske obrade možda nije dovoljna za cjelokupnu ekstrakciju uronske kiseline. Ovi rezultati su dijelom u skladu s Alparce i sur. (2018) koji izvještavaju da su prinosi hijaluronske kiseline zabilježeni nakon digestije membrane jaja papainom pri 60 °C veći od prinosa dobivenih istih ekstrakcijom pomoću otopine natrijeva klorida pri optimalnim uvjetima.

Osim omjera mase membrana i volumena otapala na udio ekstrahirane GlcA (%) iz membrana jaja, na **Slikama 4-7** može se uočiti i značajan utjecaj vremena ekstrakcije na prinos GAG. Značajniji porast prinosa D-GlcA zabilježen je između 4 i 5 h ekstrakcije kod membrana proizvedenih obradom ljuske jaja kloridnom, octenom i o-fosfornom kiselinom pri svim omjerima mase membrane i volumena otapala, međutim pri omjerima 6,25 mg ESM/mL i 25 mg ESM/mL nakon 5 h nije ustanovljen značajan porast prinosa. Prema dobivenim rezultatima vrijeme ekstrakcije je utjecalo na udio ekstrahirane D-GlcA u svim uzorcima membrana, pri čemu se s produljenjem vremena ekstrakcije povećava prinos što je u skladu s istraživanjem Khanmohammadi i sur. (2014), koji su ekstrahirali hijaluronsku kiselinu iz ljuske jaja otopinom octene kiseline, gdje navode da vrijeme ekstrakcije značajno utječe na prinos D-GlcA, dok temperatura nema značajni utjecaj na prinos.

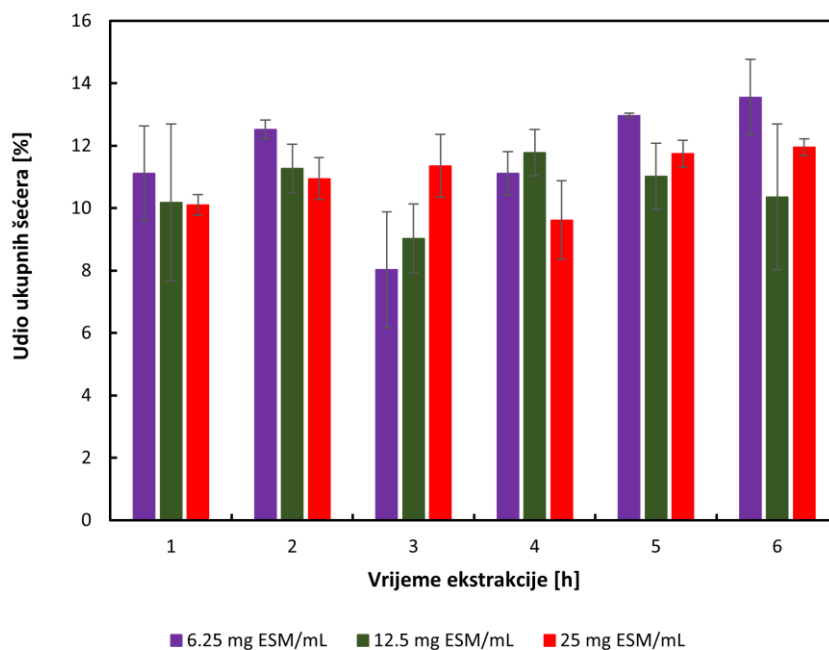
## 4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA KISELINSKE EKSTRAKCIJE MEMBRANA JAJA NA PRINOS UKUPNIH ŠEĆERA



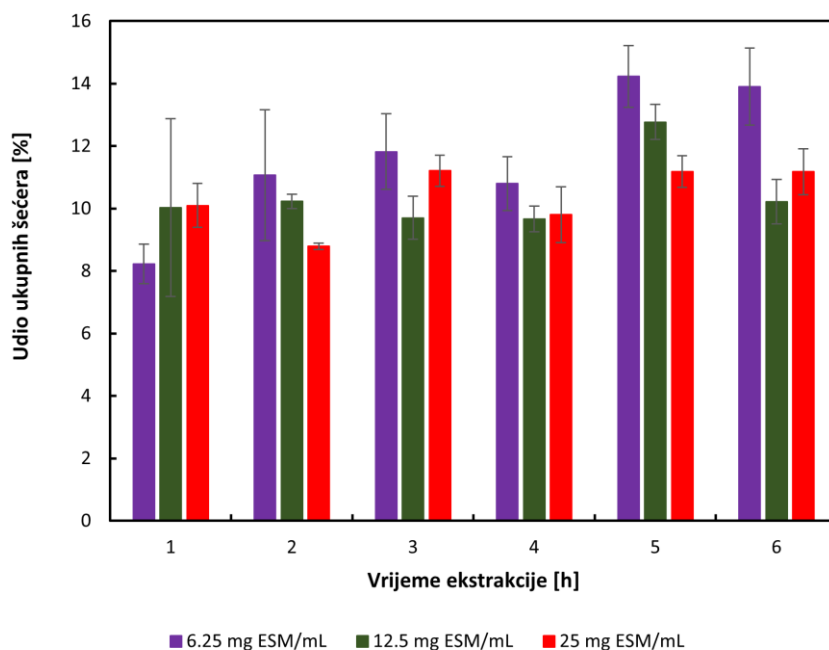
**Slika 8** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase sirovih membrana i volumena otapala na prinos ukupnih šećera (%)



**Slika 9** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrane i volumena otapala na prinos ukupnih šećera (%) iz membrana dobivenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom kiselinom



**Slika 10** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrane i volumena otapala na prinos ukupnih šećera (%) iz membrana dobivenih obradom ljuske jaja 10 % octenom kiselinom



**Slika 11** Utjecaj vremena ekstrakcije i omjera mase membrane i volumena otapala na prinos ukupnih šećera (%) iz membrana dobivenih ljuske jaja 15 %  $\alpha$ -fosforom kiselinom

Najveći prinos ukupnih šećera u ekstraktu sirovih membrana zabilježen je nakon 5 h kiselinske ekstrakcije pri omjeru mase membrana i volumena otapala od 12,5 mg ESM/mL (**Slika 8**), u ekstraktima membrana dobivenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom (**Slika 9**) i 10 % octenom (**Slika 10**) kiselinom nakon 6 h ekstrakcije pri omjeru 6,25 mg/mL, dok je kod membrana

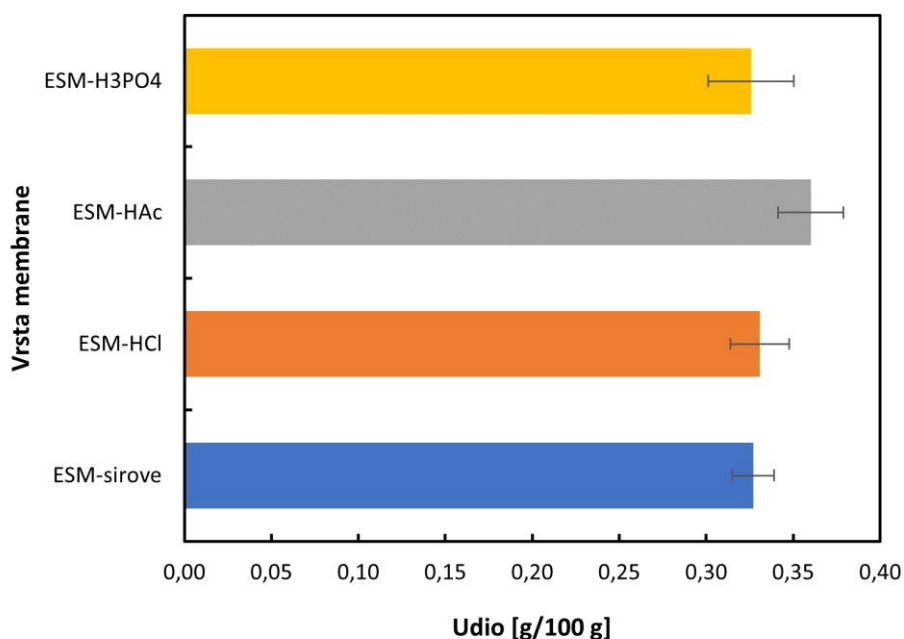
dobivenih obradom ljuske jaja 15 % *o*-fosforom kiselinom (**Slika 11**) pri istom omjeru najveći prinos ukupnih šećera zabilježen nakon 5 h ekstrakcije. Prosječne vrijednosti prinosa ukupnih šećera pri optimalnim uvjetima iznose  $12,011 \pm 0,856$  % za sirove membrane,  $12,122 \pm 0,017$  %,  $11,746 \pm 0,432$  % i  $11,186 \pm 0,508$  % za membrane dobivene obradom kloridnom, octenom i *o*-fosforom kiselinom. Dobiveni rezultati su djelomično u skladu s navodima Balch i Cooke (1970) koji navode da je optimalno vrijeme ekstrakcije ukupnih neutralnih šećera uz 0,5 M sumpornu kiselinu kao otapalo 6 h, a šećeri čine manje od 4 % membrane jaja pri čemu većina pripada neutralnim šećerima. Nasuprot tomu prinosi dobiveni u ovome istraživanju su znatno viši i u skladu s istraživanjem koje su proveli Nys i Gautron (2007) gdje navode da polisaharidi čine najmanje 11 % membrane jaja.

Vrijeme ekstrakcije utjecalo je na udio ekstrahiranih ukupnih šećera kod membrana dobivenih obradom ljuske jaja kloridnom, octenom i *o*-fosforom kiselinom pri čemu udio ekstrahiranih šećera raste s vremenom ekstrakcije, dok u slučaju sirovih membrana vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na udio ekstrahiranih šećera.

Kod membrana dobivenih obradom ljuske jaja octenom, kloridnom i *o*-fosforom kiselinom najveći prinosi ukupnih šećera zabilježeni su u ekstraktima dobivenim pri omjeru mase membrane i volumene otapala 6,25 mg ESM/mL, dok su kod sirovih membrana najveće vrijednosti zabilježene pri omjeru 12,5 mg ESM/mL. Dobiveni rezultati ukazuju da smanjenje omjera mase membrane i volumena otapala dovodi do porasta prinosa ukupnih šećera u slučaju membrana dobivenih obradom ljuske jaja octenom, kloridnom i *o*-fosforom kiselinom, ali ne i kod sirovih membrana.

### 4.3. UTJECAJ NAČINA PRIPREME MEMBRANA NA PRINOS GLIKOZAMINOGLIKANA I UKUPNIH ŠEĆERA

Obradom ljuske jaja razrijeđenim otopinama kiselina poput octene, kloride, etilendiamintetraoctene, sumporne i *o*-fosforne kiseline kalcijev karbonat ljuske jaja se otapa i prevodi u odgovarajuće kalcijeve soli, a po cjelokupnom otapanju kalcijeva karbonata zaostaju membrane jaja. Unatoč visokim prinosima tijekom procesa proizvodnje membrana jaja kiselinama može doći do promjene njihova kemijskog sastava, odnosno do promjene udjela organske komponente (Lien i sur., 2022; Liu i sur., 2014). Stoga je u ovome diplomskom radu provedena usporedba prosječnih vrijednosti prinosa D-GlcA (**Slika 12**) i ukupnih šećera (**Slika 13**) dobivenih kiselinskom ekstrakcijom sirovih membrana i membrana dobivenih obradom ljuske jaja pomoću 5 % kloridne, 10 % octene i 15 % *o*-fosfornom kiselinom i to nakon 5 h kiselinske ekstrakcije pri čemu je omjer mase membrana i volumena otapala iznosio 25 mg/mL.

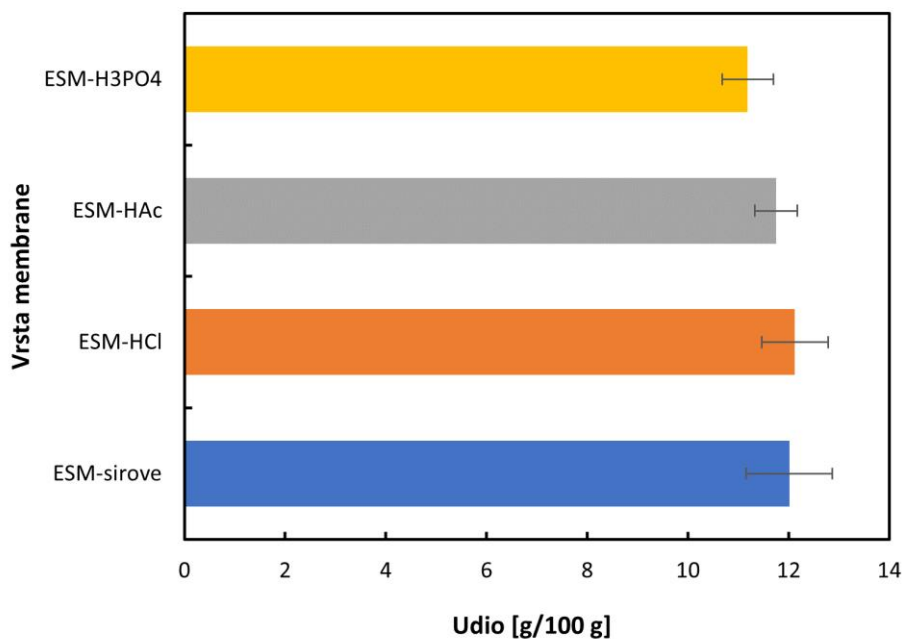


**Slika 12** Usporedba udjela D-GlcA u membranama jaja pripremljenih različitim načinima obrade ljuske jaja

Analiza udjela GlcA u membranama ekstrahiranim pri optimalnim uvjetima (**Slika 12**) pokazala je da su prinosi u slučaju sirovih membrana, kao i onih pripremljenih kiselinskom obradom ljuske jaja 5 % kloridnom kiselinom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom podjednaki, te iznose  $0,327 \pm 0,012$ ,  $0,331 \pm 0,017$  i  $0,326 \pm 0,025$  g na 100 g membrana ( $p < 0,05$ ), dok se u slučaju



membrana pripremljenih kiselinom obradom ljuske jaja 10 % octenom kiselinom može zamijetiti nešto viši prinos D-GlcA ( $p < 0,05$ ) u iznosu  $0,388 \pm 0,011$  g na 100 g membrane.



**Slika 13** Usporedba udjela ukupnih šećera u membranama jaja pripremljenih različitim načinima obrade ljuske jaja

Usporedi li se količina ukupno ekstrahiranih šećera iz membrana jaja pri optimalnim uvjetima (**Slika 13**), tada se može zamijetiti da je najniži prinos ukupnih šećera dobiven u ekstraktu membrana dobivenih obradom ljuske jaja 15 % *o*-fosfornom kiselinom i iznosi  $11,186 \pm 0,508$  g na 100 g membrane, dok između uzoraka sirovih membrana i membrana dobivenih obradom ljuske jaja 5 % kloridnom i 10 % octenom kiselinom nema statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) pri čemu udio ukupno ekstrahiranih šećera iznosi  $12,011 \pm 0,856$ ,  $12,122 \pm 0,017$  i  $11,746 \pm 0,432$  g na 100 g membrane.

Iako u dostupnoj literaturi nema podataka o utjecaju obrade ljuske jaja različitim kiselinama na udio GAG i ukupnih šećera u membranama jaja dobiveni rezultati su djelomično u skladu sa Zajec (2020) i Torres-Mansilla i Delgado-Mejia (2017) koji navode da obrada ljuske jaja kiselinama tijekom izolacije membrana jaja može dovesti do promjene u udjelu organske tvari u membranama. Nadalje, Zajec (2020) navodi da obrada membrana jaja 15 % *o*-fosfornom kiselinom ima veći utjecaj na promjenu organskog sastava od 5 % kloridne i 10 % octene kiseline što je u skladu s rezultatima dobivenim tijekom kvantifikacije ekstrahiranih ukupnih šećera u ovome diplomskom radu.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom diplomskom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Optimalni uvjeti kiselinske ekstrakcije glikozaminoglikana iz membrana jaja su 5 h pri omjeru 12,5 mg ESM/mL za sirove membrane, 6 h pri omjeru 12,5 mg ESM/mL za membrane proizvedene obradom ljuske jaja 5 % kloridnom i 10 % octenom kiselinom te 6,5 mg ESM/mL za membrane dobivene obradom 15 % *o*-fosfornom kiselinom.
2. Optimalni uvjeti kiselinske ekstrakcije ukupnih šećera iz membrana jaja su 5 h pri omjeru 12,5 mg ESM/mL u slučaju sirovih membrana, 6 h pri omjeru 6,25 mg ESM/mL za membrane proizvedene obradom 5 % kloridnom i 10 % octenom kiselinom te 5 h ekstrakcije pri istome omjeru za membrane proizvedene obradom ljuske jaja 15 % *o*-fosfornom kiselinom.
3. Obrada ljuske jaja kiselinama tijekom proizvodnje membrana utječe na prinos D-GlcA pri čemu u odnosu na sirove membrane obrada 5 % kloridnom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom ima manji utjecaj od 10 % octene kiseline čijom se primjenom postiže nešto veći prinos na D-GlcA.
4. Obrada ljuske jaja kiselinama tijekom proizvodnje membrana utječe na prinos ukupnih šećera pri čemu u odnosu na sirove membrane obrada 15 % *o*-fosfornom kiselinom dovodi do smanjenja prinosa na ukupnim šećerima, dok 5 % kloridna i 10 % octena kiselina imaju neznatan utjecaj.

## **6. LITERATURA**

- Abdallah MM, Fernández N, Matias AA, Bronze MDR: Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *Carbohydrate Polymers* 243:116441, 2020.
- Akagawa M, Wako Y, Suyama K: Lysyl oxidase coupled with catalase in egg shell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1434:151–160, 1999.
- Alparce NK, Noomhorm A, Anal AK: Sequential Extraction of Hyaluronic Acid and Collagen from Chicken Eggshell Membrane, U The 1st International Conference on “Innovations in Food Ingredients & Food Safety (IFIFS 2018)”, str. 13-28, Asian Institute of Technology, Tajland, 2018.
- Ar A, Rahn H, Paganelli VC: The avian egg: mass and strength. *The Condor* 81(4):331–337, 1979.
- Arsal Cocuľová HK: Isolation of the hyaluronic acid from the eggshell membranes. *International Journal of Science Arts and Commerce* 3:68–76, 2018.
- Balch DA, Cooke AS: Studies of membrane, mammary cores and cuticle of the hen egg shell. *British Poultry Science* 11(3):345-352, 1970.
- Caterson B, Melrose J: Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology* 28(4):182-206, 2018.
- Chascall V, Calabro A, Midura RJ, Yanagishita M: Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods in Enzymology* 230:390–417, 1994.
- Conrad HE: The acid lability of the glycosidic bonds of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycans. *The Biochemical journal* 191:355-63, 1980.
- Gandhi NS, Mancera RL: The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology & Drug Design* 72(6):455-482, 2008.
- Gautron J, Hincke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz MJ, Boldicke T, Nys V: Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connective Tissue Research* 42:255–267, 2001.
- Gottschalk J, Elling L: Current state on the enzymatic synthesis of glycosaminoglycans. *Current Opinion in Chemical Biology* 61:71-80, 2021.
- Graciela CQ, José Juan EC, Gieraldin CL, Xóchitl Alejandra PM, Gabriel AÁ: Hyaluronic Acid—Extraction Methods, Sources and Applications. *Polymers* 15(16):3473, 2023.
- Han C, Chen Y, Shi L, Chen H, Li L, Ning Z, Zeng D and Wang D: Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. *Frontiers in Veterinary Science* 10:1116126, 2023.
- Hincke MT, Gautron J, Nys Yves, Rodriguez-navaro AB: The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17:1266-1280, 2012.

- Hincke MT, Gautron J, Panheleux M, Garcia-Ruiz J, McKee MD, Nys Y: Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology* 19:443–453, 2000.
- Horkay F, Douglas JF, Raghavan SR: Rheological Properties of Cartilage Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Macromolecules* 54(5):2316-2324, 2021.
- Khanmohammadi M, Khoshfetrat AB, Eskandarnezhad S, Sani NF, Ebrahimi S: Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(6): 4371–4376, 2014.
- Kiss J:  $\beta$ -Eliminative degradation of carbohydrates containing uronic acid residues. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 29:229–303, 1974.
- Kjellén L, Lindahl U: Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry* 60:443-475, 1992.
- Lien YC, Lai SJ, Lin CY: High-efficiency decomposition of eggshell membrane by a keratinase from *Meiothermus taiwanensis*. *Scientific Reports* 12:14684, 2022.
- Liu Z, Sun X, Cai C, He W, Zhang F, Linhardt RJ: Characteristics of Glycosaminoglycans in Chicken Eggshells and the Influence of Disaccharide Composition on Eggshell Properties. *Poultry Science* 95:2879–2888, 2016.
- Liu Z, Zhang F, Li L, Li G, He W, Linhardt RJ: Compositional Analysis and Structural Elucidation of Glycosaminoglycans in Chicken Eggs. *Glycoconjugate Journal* 31(8):593–602, 2014
- Mann K, Mann M: Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. *Proteome Science* 13:22, 2015.
- Mensah RA, Jo SB, Kim H, Park SM, Patel KD, Cho KJ, Cook MT, Kirton SB, Hutter V, Sidney LE, Alves-Lima D, Lin H, Lee JH, Kim HW, Chau DYS: The eggshell membrane: A potential biomaterial for corneal wound healing. *Journal of Biomaterials Applications* 36(5):912-929, 2021.
- Mignardi S, Archilletti L, Medeghini L, DeVito C: Valorization of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Scientific Reports* 10:2436, 2020.
- Nakano T, Ikawa NI, Ozimek L: Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science* 82(3):510-514, 2003.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 53:397-411, 2008.
- Neves MI, Araújo M, Moroni L, da Silva RMP, Barrias CC: Glycosaminoglycan-Inspired Biomaterials for the Development of Bioactive Hydrogel Networks. *Molecules*. 25(4):978, 2020

- Nuhu AA, Basheer C, Shaikh AA, Al-arfaj AR: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using Nanoporous Material Prepared from Waste Avian Egg Shell. *Journal of Nanomaterials*, 2012:305691, 2012.
- Nys Y, Gautron J: Structure and Formation of the Eggshell. U *Bioactive Egg Compounds*, str. 99-102. Springer, Berlin, 2007.
- Sadhasivam G, Muthuvel A, Pachaiyappan A, Thangavel B: Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. *International Journal of Biological Macromolecules* 54(1):84-89, 2013.
- Schaafsma A, Pakan I, Hofstede GJ, Muskiet FA, Van Der Veer E, De Vries PJ: Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poultry Science* 79(12):1833-1838, 2000.
- Slíva J, Minárik J: Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitných reakcií. *New EU Magazine* 2(1): 75-79, 2009.
- Strelec I, Ostojčić M, Brekalo M, Hajra S, Kim H, Stanojev J, Maravić N, Budžaki S: Transformation of eggshell waste to egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membrane powder. *Green Processing and Synthesis* 12(1):20228151, 2023.
- Strelec I, Ostojčić M, Budžaki S: Transformacija ljuske kokošnjih jaja u proizvode dodane vrijednosti. U *Neke Mogućnosti Iskorištenja Nusproizvoda Prehrambene Industrije—Knjiga 3; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki Fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi: Osijek, Croatia*, str. 303–327, 2021
- Strelec I, Tomičić K, Zajec M, Ostojčić M, Budžaki S: Eggshell-Waste-Derived Calcium Acetate, Calcium Hydrogen Phosphate and Corresponding Eggshell Membranes. *Applied Sciences* 13:7372, 2023.
- Tokita Y, Okamoto A: Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability* 48:269-273, 1995.
- Tommeraaas K, Melander C: Kinetics of hyaluronan hydrolysis in acidic solution at various pH values. *Biomacromolecules* 9(6):1535-1540, 2008.
- Torres-Mansilla AC, Delgado-Mejia E: Influence of Separation Techniques with Acid Solutions on the Composition of Eggshell Membrane. *International Journal of Poultry Science* 16:451-456, 2017.
- Úrgeová E, Vulganová K: Comparison of enzymatic hydrolysis of polysaccharides from eggshells membranes. *Nova Biotechnologica et Chimica* 15:133–141, 2016.
- Waheed M, Butt MS, Shehzad A, Mohd Adzahan N, Asim Shabbir M, Rasul Suleria HA, Aadil RA: Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science & Technology* 91:219-230, 2019.

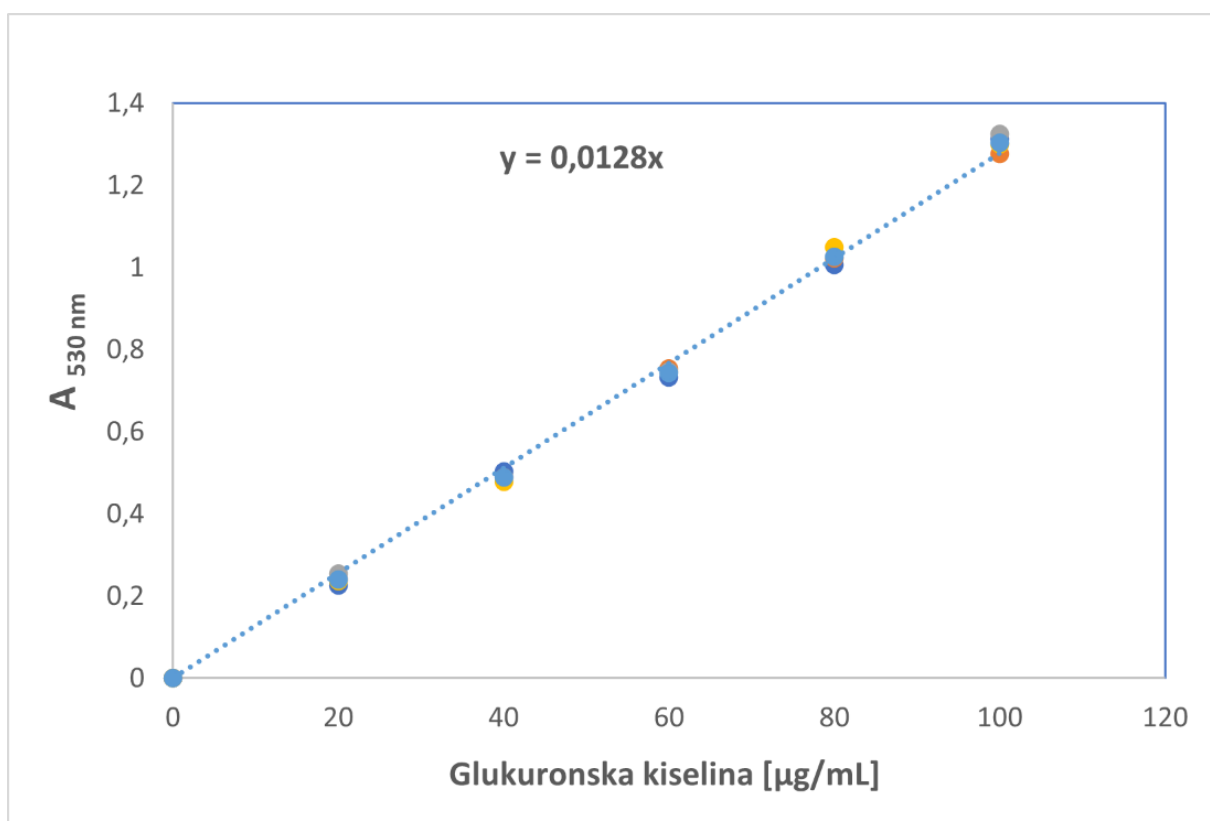
Walton HV, Coterill OJ, Vandepopuliere JM: Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants. *Poultry Science* 52:1836-1841, 1973.

Yi F, Yu J, Guo ZX, Zhang LX, Li Q: Natural bioactive material: a preparation of soluble eggshell membrane protein. *Macromolecular Bioscience* 3:234–237, 2003

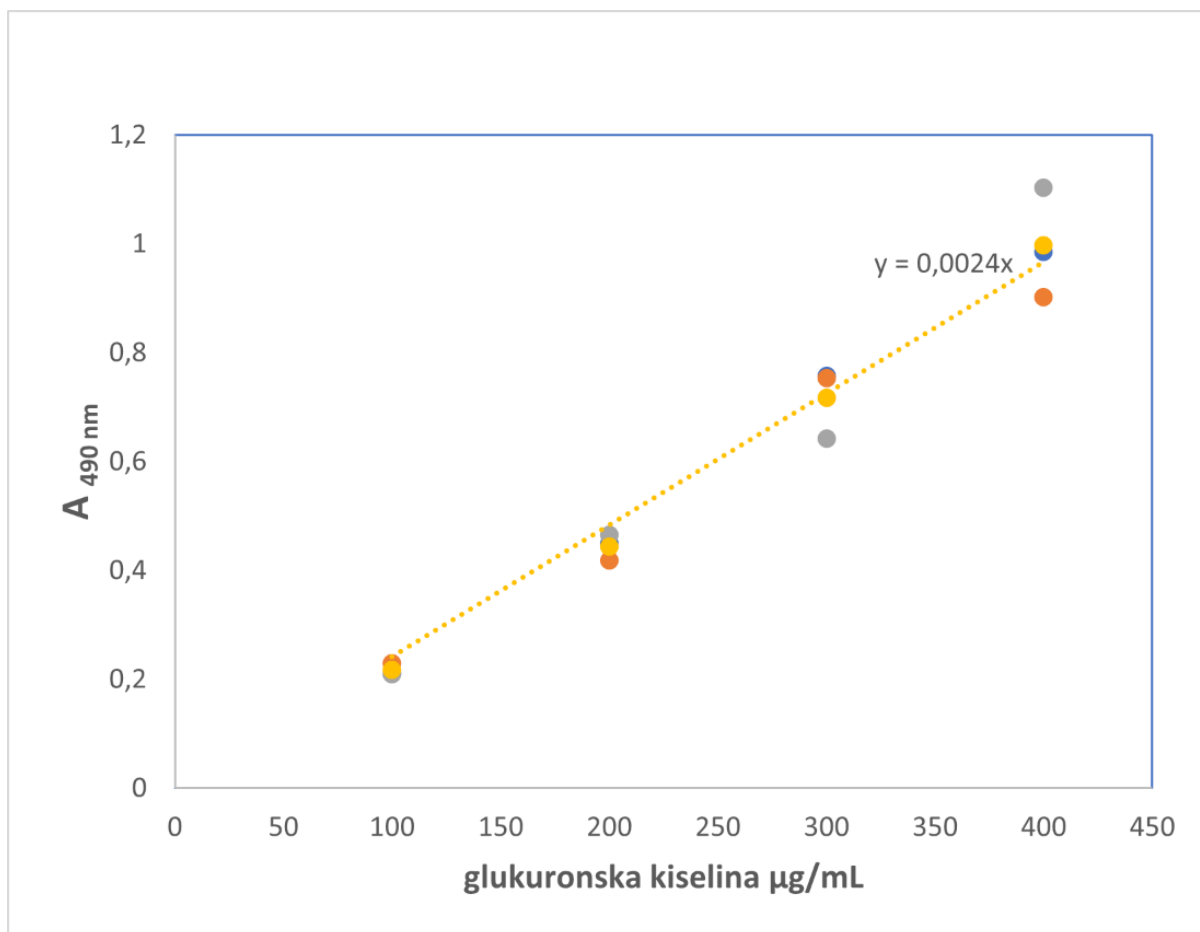
Zajec M: Izolacija proteina i membrana ljuske jaja. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.



## **7. PRILOZI**



**Prilog 1** Ovisnost intenziteta apsorbancije ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) o koncentraciji D-glukuronske kiseline (baždarni dijagram za određivanje D-GlcA)



**Prilog 2** Ovisnost intenziteta apsorbancije ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ ) o koncentraciji D-glukuronske kiseline (baždarni dijagram za određivanje ukupnih šećera)