

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kora mandarine primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Bogadi, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:109:931720>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

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**

Dora Bogadi

**EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KORA MANDARINE
PRIMJENOM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Projektiranje uređaja u procesnoj industriji**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 29. travnja 2021. godine.**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić***Pomoć pri izradi:** *Silvija Šafranko*, mag. chem.; *Marija Banožić*, mag. ing. preh.**Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kora mandarine primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja***Dora Bogadi, 0113141309***Sažetak:**

Cilj ovog rada je istražiti mogućnost primjene visokonaponskog električnog pražnjenja za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kora mandarine, sorte *Okitsu*, koje nastaju kao nusproizvod tijekom prerade ili konzumacije svježeg ploda. U ovom radu utvrdio se utjecaj procesnih parametara ekstrakcije (vrijeme (5-15 min), frekvencija (40-100 Hz) i omjer tekuće/kruće (200-400 mL/g)) na iskorištenje ekstrakcije, ukupni fenolni sadržaj, fenolni profil te antiradikalnu aktivnost. Antiradikalna aktivnost te ukupni fenolni sadržaj u ekstraktima odredili su se spektrofotometrijskim metodama. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva provela se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). Na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa, a primjenom programa *Design Expert*[®] optimiran je proces ekstrakcije. Cilj ovog rada je valorizirati nusproizvode citrusa, kao vrijednu sirovinu primjenom inovativne ne-termalne metode ekstrakcije sa zelenim otapalom (voda), prikazati teorijske osnove visokonaponskog pražnjenja u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda te usporediti učinak ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem s literaturno dostupnim podacima za iskorištenje, udio ekstrahiranih fenolnih spojeva i podacima za antiradikalnu aktivnost.

Ključne riječi: Visokonaponsko električno pražnjenje, ekstrakcija, kora mandarine, bioaktivne komponente**Rad sadrži:** 62 stranica
18 slika
11 tablica
63 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | član |
| 4. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 14. srpnja, 2021.

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 Process Engineering
Sub-department of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Device design in the process industry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII held on April 29, 2021.

Mentor: *Stela Jokić*, PhD, full prof.

Technical assistance: *Silvija Šafranko*, MSc, *Marija Banožić*, MSc

High Voltage Electrical Discharges Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Citrus Peel

Dora Bogadi, 0113141309

Summary:

The aim of this study was to investigate the possibility of applying high-voltage electric discharge technique for the extraction of phenolic compounds from mandarin peel (*Okitsu* variety), formed as by-products during the growth and fresh fruit processing. In this work, the influence of the extraction process parameters (time (5-15 min), frequency (40-100 Hz) and liquid/solid ratio (200-400 mL/g)) were investigated on the extraction yield, bioflavonoid content, total phenolic content, and antiradical activity. The antiradical activity and the total phenolic content of the extracts were determined by spectrophotometric methods. The identification and quantification of individual phenolic compounds in the extracts were determined by using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). Based on the experimental data obtained according to the Box-Behnken experimental design, the extraction process was optimized using the Design Expert® program. The primary aim of this study is citrus by-products valorization as a valuable raw material using an innovative non-thermal extraction method with green solvent (water). A comparison of the obtained results of high-voltage discharge process for the extraction of bioactive components from by-products exhibiting significant antiradical activity with literature reported had been made.

Key words: High voltage electric discharge, extraction, mandarin peel, bioactive compounds

Thesis contains: 62 pages
18 figures
11 tables
63 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: July 14, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Najprije se želim zahvaliti svojoj obitelji. Posebno roditeljima Spomenki i Franji koji su neprestano bili uz mene u svim teškim trenucima moga obrazovanja, koji su mi davali iznimnu snagu i potporu te koji su vodili iznimnu brigu za moje dobro. Također, zahvaljujem se svojem bratu Viktoriu i sestrama Veroniki i Evi jer su vjerovali u mene i poticali me ka uspjehu.

Najiskrenije se želim zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić koja je svojim iskustvom i stručnošću omogućila izvedbu moga diplomskog rada i koja je ukazala povjerenje u mene.

Zahvaljujem se asistenticama Silviji Šafranko, mag. chem. i Mariji Banožić, mag. ing. preh. koje su mi pružile potporu, pomoć i savjete prilikom izrade rada.

Želim se zahvaliti svim prijateljima i kolegama koji su mi pružili ohrabrenje i pomoć tijekom studiranja.



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. MANDARINA – SORTA OKITSU.....	6
2.1.1. Prerada mandarina	6
2.1.2. Građa mandarine.....	7
2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE.....	8
2.2.1. Fenolni spojevi.....	8
2.2.2. Ostali spojevi prisutni u kori mandarine.....	11
2.3. ZELENE TEHNIKE EKSTRAKCIJE	13
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem.....	15
2.4. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE.....	19
2.4.1. Box – Behnken eksperimentalni dizajn.....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. ZADATAK.....	24
3.2. MATERIJALI I METODE	24
3.2.1. Priprema uzorka za ekstrakciju	25
3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kore mandarine primjenom VNEP-a	27
3.2.3. Određivanje flavonoida primjenom HPLC-DAD tehnikom.....	29
3.2.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti.....	31
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola	31
3.2.6. Optimiranje procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	35
4.1. ISKORIŠTENJE EKSTRAKCIJE I UDIO BIOFLAVONOIDA U DOBIVENIM EKSTRAKTIMA PRIMJENOM VNEP METODE.....	36
4.2. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA I OPTIMIRANJE PROCESA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA	41
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	55

Popis oznaka, kratica i simbola

ANOVA - Analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

BBD - Box – Behnkenov plan pokusa (engl. *Box – Behnken design*)

D - Željena funkcija (engl. *Desirability function*)

df - Stupnjevi slobode (engl. *Degrees of freedom*)

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

GAE – Ekvivalent galne kiseline

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD - Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (engl. *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*)

IR – Infracrveno zračenje (engl. *Infrared radiation*)

LOD – Limit detekcije (engl. *Limit of Detection*)

LOQ – Limit kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*)

MS - Varijanca (engl. *Mean square*)

Na₂CO₃ – Natrijev karbonat

RSM - Metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*)

TPC - Ukupni fenoli (engl. *Total Phenol Content*)

UV – Ultraljubičasto zračenje (engl. *Ultraviolet radiation*)

VNEP - Visokonaponsko električno pražnjenje (engl. *High-Voltage Electric Discharge, HVED*)

1. UVOD

Globalnim rastom ljudske populacije javlja se potreba za rapidnim razvojem industrijske proizvodnje, dok problem predstavlja okolišni čimbenik zagađivanja i veća potrošnja prirodnih izvora. Takav način industrijske proizvodnje u pravilu nije održiv te se zbog toga pokušavaju pronaći novija i kvalitetnija rješenja. Jedno od takvih rješenja pronađeno je u zelenoj kemiji (Kudlak i sur., 2015). Zadaća zelene kemije je dizajnirati ili kreirati procese i produkte kojima se smanjuje primjena štetnih tvari po ljudsko zdravlje i okoliš te se istodobno povećava iskorištenje ekstrakcijskih procesa (Chemat i sur., 2012). Također, raste svijest o tome kako je važno zaštititi okoliš te se iz tog razloga javljaju nove tehnologije kojima se iskorištavaju sirovine koje su se dosada smatrale otpadom. Otpad, odnosno nusproizvodi iz svih grana industrije predstavljaju izvor funkcionalnih i poželjnih spojeva čime potencijalno raste i proizvodnja funkcionalne hrane (Wijngaard i sur., 2012). Prerada nusproizvoda prehrambene industrije utječe na otkrivanje novih tehnologija ili na poboljšanje postojećih tehnologija prerade koje potom omogućuju što efikasniju proizvodnju. Iz tog razloga krenule su se upotrebljavati razne metode ekstrakcije kojima se mogu dobiti ciljani kemijski spojevi, a danas se poseban naglasak stavlja na zelene tehnike ekstrakcije zbog iznimne učinkovitosti u dobivanju ciljanih komponenti, s ciljem očuvanja okoliša (Wijngaard i sur., 2012).

Citrusno voće pripada u najvažnije prehrambene proizvode širom svijeta, a stvaranje otpada citrusnog voća pridonosi onečišćenju okoliša. Uobičajeno, takav otpad se spaljuje ili upotrebljava kao sirovina za proizvodnju stočne hrane, ali sve se veća pažnja pridodaje iskorištenju nusproizvoda ekološki-prihvatljivim postupcima kako bi se dobili visokovrijedni proizvodi. U nusproizvod citrusnog voća ubrajamo pulpu, sjemenke i kora. Sjemenke i kora izvor su mnogih korisnih bioaktivnih spojeva, antioksidansa od kojih je najvažnije spomenuti flavonoide (Moulehi i sur., 2012). Također, citrusno voće poznato je po svojim pozitivnim i blagotvornim učincima po ljudsko zdravlje koje pridonose vitamin C, fenolne i organske kiseline, pektini te flavonoidi (Sharma i sur., 2018). Najveći dio nusproizvoda agruma zauzima kora. Kora predstavlja resurs bioaktivnih spojeva te se u njoj nalazi veća koncentracija flavonoida u odnosu na sjemenke (Lachos-Perez i sur., 2018). Uvelike je važno pronaći odgovarajuću i najefikasniju metodu ekstrakcije pojedinih bioaktivnih spojeva te optimirati proces kako bi se omogućila proizvodnja na industrijskoj razini (Jokić i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je ekstrakcija bioaktivnih spojeva primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja (VNEP) iz kore mandarine (*Citrus unshiu* Marc.) sorte *Okitsu* pri različitim procesnim

uvjetima: omjer tekuće/kruto, frekvencija, vrijeme. Provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza dobivenih ekstrakata. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva odnosno flavonoida koji se nalaze u pripremljenim uzorcima provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) te se u ovom radu spektrofotometrijskim metodama određivao ukupni udio fenola i antiradikalna aktivnost u nastalim ekstraktima. Optimiranje ekstrakcijskog procesa primijenjeno je metodom odzivnih površina (RSM). Naglasak ovog eksperimentalnog rada je stavljen na dobivanje ekstrakata bogatih bioaktivnim komponentama (bioflavonoida) iz nusproizvoda kore mandarine koje se dalje mogu primijeniti u proizvodnji vrijednih i nutritivno bogatih prehrambenih i drugih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MANDARINA – SORTA *OKITSU*

Mandarina je biljka koja pripada rodu *Citrus* iz porodice Rutaceae. Uzgaja se u mediteranskim zemljama, Japanu, Brazilu, SAD-u i mnogim drugim zemljama koje imaju blage zime te umjerena ljeta (Batinović, 2011). Plod mandarine poznat je po svježoj i okrepljujućoj aromi te značajnoj količini vitamina C. Međutim, uz bogatstvo vitamina C, plod mandarine sadrži i mnoge druge poželjne komponente poput flavonoida, fenolnih kiselina, pigmenata, pektinskih tvari, šećera i lipida (Ledesma-Escobar i sur., 2019). U Republici Hrvatskoj mandarina se uzgaja u dolini Neretve gdje prevladavaju pogodni uvjeti za plantažno uzgajanje agruma. Ukupno 80 % proizvodnje mandarine nalazi se u donjem toku rijeke Neretve. Mandarina sorte *Okitsu* pripada u skupinu ranih sorti te dozrijeva u listopadu. Plod ove sorte mandarine je velik, plosnat, bez fizičkih nedostataka što je od iznimne važnosti za krajnjeg kupca. Kora ove sorte mandarine je vrlo glatka, a meso je sočno, bez sjemenki i narančasto-žute boje. Neke od najzastupljenijih sorta mandarina na području Republike Hrvatske su: *Wakiyama*, *Chahara*, *Okitsu*, *Kawano*, *Wase*, *Owari*, *Zorica*, *Kuno*, *Seto*, *Saigon* i *Ichumare* (Popović i Vego, 2010).

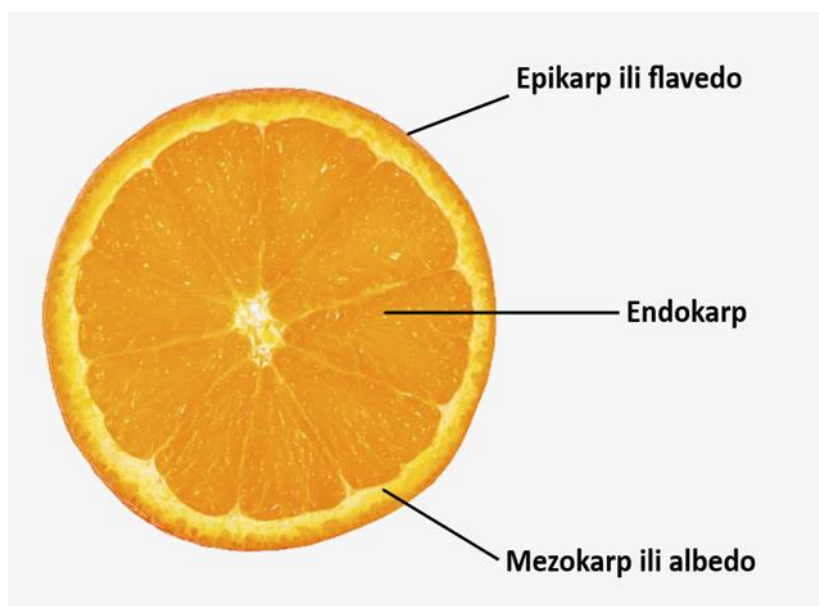
2.1.1. Prerada mandarina

Mandarina je zapravo izrazito popularno citrusno voće čija se proizvodnja neprestano povećava u cijelom svijetu te agrumi pripadaju među najznačajnije plodove prehrambene industrije (Kolarević, 2020). Mandarine se u prehrambenoj industriji najviše koriste za preradu u svježi sok ili kao dodaci arome. Također, sok mandarine može se koristiti kao pojačivač boje soka od naranče (Marti i sur., 2011). Ne čudi zapravo da se tijekom prerade citrusnog voća stvara golema količina nusproizvoda jer je prinos dobivenog soka niži od polovine ukupne mase voća. Kao nusproizvod zaostaju kora, pulpa, sjemenke i vlaknaste membrane te se oni bacaju kao otpad ili se koriste kao materijal za životinjsku hranu, proizvodnju goriva i slično (Cheigh i sur., 2012). Tradicionalno, nastali otpad se spaljuje, ali to uzrokuje povišenje koncentracije ugljikova dioksida (CO₂) i drugih stakleničkih plinova u atmosferi. No, danas su razvijeni mnogi drugi ekološki prihvatljivi postupci za dobivanje novih proizvoda. Prerodom citrusnog voća zaostaje više vrsti otpada: otpad koji je nastao prilikom proizvodnje sokova, voće odbačeno zbog komercijalnih razloga (oštećeno voće) i voće odbačeno radi regulacija određenih proizvodnjom (Kose i Bayraktar, 2018). Kora agruma bogata je vitaminima, polifenolima, flavonoidima, šećerima, eteričnim uljima i organskim kiselinama. Najznačajniji

bioaktivni spojevi su polifenoli zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Sharma i sur.,2017). Kora čini najveću količinu nusproizvoda citrusa, a ona se može koristiti u različite svrhe zbog velikog sadržaja bioaktivnih spojeva. Iz otpadne kore agruma proizvode se mnogi proizvodi dobiveni iz flaveda (epikarpa) u koje se ubrajaju mirisne svijeće, aromatična ulja, osvježivači zraka i higijenski proizvodi (šamponi i sapuni) te proizvodi dobiveni od albeda (mezokarpa) u koje ubrajamo kekse, biskvite, pektine, čokolade, marmelade, ocat i razne dodatke u prehrani (Mahato i sur., 2019). Poznata je i primjena fenolnih spojeva (flavonoida i fenolnih kiselina) u farmaceutskoj industriji zbog svojih protuupalnih, antialergijskih, antikancerogenih i antioksidacijskih svojstva te se provode brojna istraživanja vezana za njihovu primjenu u proizvodnji lijekova (Mahato i sur., 2019).

2.1.2. Građa mandarine

Sve vrste citrusnog voća imaju podjednaku opću građu i izgled, te **Slika 1** prikazuje građu citrusnog voća.



Slika 1 Prikaz građe citrusnog voća (Izvor: Jašić, 2010)

Citrusno voće obavijeno je kutikulom koja sadrži prirodne voskove i polimerizirane materijale. Taj gornji sloj služi kao zaštita od insekata i mikroorganizama. Također, zaslužna je za regulaciju plinova (izmjena kisika i ugljikova dioksida) te smanjuje gubitak vode. Vanjski dio kore naziva se epikarp ili flavedo. Flavedo sadrži pigmente kore i eterična ulja (Berk, 2016). Boja kore mijenja se ovisno o stupnju zrelosti ploda. Eterična ulja nalaze se u uljnim žlijezdama te služe

kao zaštita od pregrijavanja kada je plod izložen suncu i zaslužna su za prepoznatljiv miris (Ferenčić i sur., 2016). Ispod epikarpa nalazi se mezokarp ili albedo. Albedo predstavlja mekano, bijelo tkivo čija debljina oscilira ovisno o vrsti agruma. Mezokarp je bogat pektinskim tvarima te zauzima većinski dio kore agruma. Najzastupljeniji dio voća citrusa zauzima endokarp. To je sočno meso koje se nalazi ispod kore (Berk, 2016). Mesnati dio sastoji se od 9 do 14 kriški, karakteristične je narančasto-žute boje te se unutar mesnatog dijela mogu naći sjemenke (Ferenčić i sur., 2016).

2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE

Različit kemijski sastav citrusnog voća ukazuje na raznolikost pojedinih vrsta agruma. Također, kemijski sastav pojedinih komponenti ukazuje genetsko podrijetlo i vrijeme branja voća. Prema sastavu flavonoida moguće je odrediti pojedine karakteristike svake vrste agruma. Hesperidin predstavlja glavni funkcionalni i najzastupljeniji bioflavonoid u citrusnom voću. Brojna istraživanja pokazala su kako hesperidin posjeduje antioksidacijsko, antialergensko i protuupalno djelovanje te inhibicijsko djelovanje na stanice raka kod ljudi. Kora agruma predstavlja nusproizvod bogat šećerima, vlaknima, organskim kiselinama, mineralima, eteričnim uljima, lipidima, vitaminima i polifenolima (Mahato i sur., 2019). Kemijski sastav varira u pojedinim dijelovima agruma. U albedu se nalazi oko 70 do 80 % vode te on sadrži spojeve poput celuloze, škroba, pektinskih tvari, šećera, kiselina i flavonoida. Flavedo predstavlja bogat izvor eteričnih ulja i pigmenata. U endokarpu se nalazi sok koji predstavlja glavni proizvod agruma. Sok agruma bogat je vodom i brojnim otopljenim tvarima poput ugljikohidrata, kiselina, dušičnih spojeva, lipida, minerala, glikozida, vitamina i topljivih pigmenata (Berk, 2016).

2.2.1. Fenolni spojevi

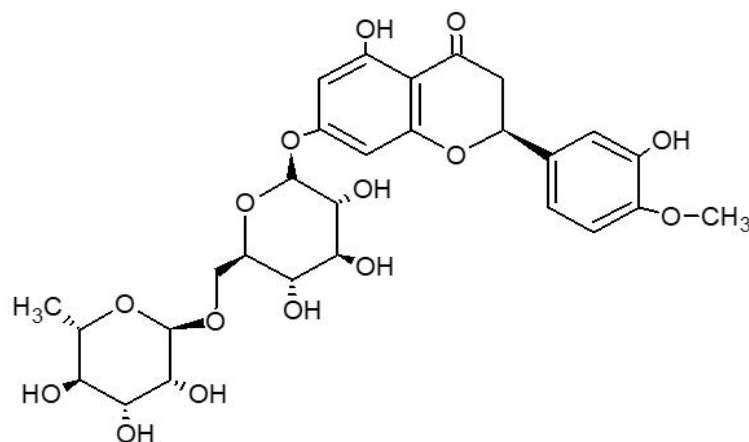
Mandarina, kao i ostalo citrusno voće, ima iznimnu nutritivnu važnost zbog svojeg kemijskog sastava. Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu fenolnih spojeva te je moguće pronaći brojne flavonoide u samoj pulpi i kori citrusnog voća. No, najznačajnije količine fenolnih spojeva pojavljuju se u kori koja zaostaje kao nusproizvod. Vanjski dio kore ili epikarp bogat je fenolnim spojevima, ali moguće ih je pronaći i u mezokarpu kore (Ledesma-Escobar i sur., 2019). Također, fenolni spojevi služe za zaštitu unutarnjeg sočnog tkiva od mikrobnih infekcija te negativnog UV i IR zračenja (Mahato i sur., 2019). Prisutni su razni načini klasifikacije

fenolnih spojeva. Fenolne spojeve možemo klasificirati prema strukturi, biološkoj aktivnosti ili na temelju broja ugljikovih atoma prisutnih u njihovoj strukturi. Prema strukturi fenolni se spojevi dijele na dvije skupine:

1. Flavonoidi (flavon, izoflavon, flavonol, flavonon, flavanol i antocijan)
2. Neflavonoidi (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina – fenolne kiseline, lignan, tanin, stilben).

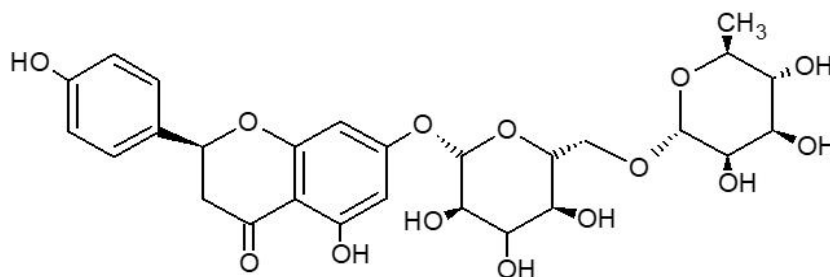
Ovisno o dijelu biljke, razlikuju se udjeli fenolnih spojeva (Martić i Oguić, 2018). Citrusno voće sadrži mnogo raznih flavonoida, drugim riječima glikozida. Kod citrusnih glikozida, funkcionalna skupina je OH skupina te je glikozidna veza esterska i ona nastaje između anomernog ugljika šećera i funkcionalne skupine na aglikonu. Molekula glikozida podijeljena je na dva dijela. Prvi dio molekule pripada šećerima koji mogu biti monosaharidi, disaharidi ili oligosaharidi. Šećerni dio molekule naziva glikon, ali ukoliko molekula sadrži šećer glukozu tada se glikozid zove glukozid. Drugi dio molekule može sadržavati alkohole, amine ili fenole te se drugi dio molekule naziva se aglikon. Glikozidi su zastupljeni u nižim količinama. No, predstavljaju spojeve od iznimnog financijskog i istraživačkog interesa (Berk, 2016). Flavonoidi posjeduju antioksidacijsko i antikancerogeno svojstvo te posjeduju protuupalnu aktivnost i sposobnost antiperoksidacije lipida (Mahato i sur., 2019). Antioksidacijsko svojstvo povezano je uz mogućnost fenolnih spojeva da vežu slobodne radikale i prekidaju lančane reakcije radikala (Nayak i sur., 2015). U ljudskom tijelu odvijaju se brojni oksidacijski procesi te je oksidativni stres zaslužan za proces starenja, razvoj bolesti i uništenje stanica. Prehrambeni antioksidansi predstavljaju sastojke hrane koji imaju mogućnost zaustavljanja oštećenja stanica uzrokovanih oksidativnim reakcijama. Ključni flavonoidi u kori mandarine su hesperidin, narirutin, naringin i eriocitrin. Manje zastupljeniji flavonoidi su: apigenin, naringenin, hesperitin i luteolin (Mahato i sur., 2019). Hesperidin pripada u skupinu flavonskih glikozida, a građen je od flavanonskog aglikona povezanog s rutinozom. Glikozidni dio hesperidina izgrađen je od disaharida koji sadrži ramnozu i glukozu. Glukoza se veže za aglikonski dio, dok se rutinoza veže na glukozni dio molekule (Garg i sur., 2001). Na **Slici 2** prikazana je kemijska struktura hesperidina. Njega je moguće detektirati u agrumima poput naranči, limuna i mandarina. Ubraja se u jedne od najvažnijih bioflavonoida koji se pronalaze u biljkama roda *Citrus*. Brojna istraživanja potvrdila su kako hesperidin posjeduje protuupalna i antioksidativna svojstva, ali novija istraživanja usmjerena su prema njegovom

antikancerogenom djelovanju (Roohbakhsh i sur., 2015). Hesperidin nastaje reakcijom alkalne hidrolize floroglucinola i hesperetinske kiseline (Devi i sur., 2015).



Slika 2 Kemijska struktura hesperidina (Izvor: Autor)

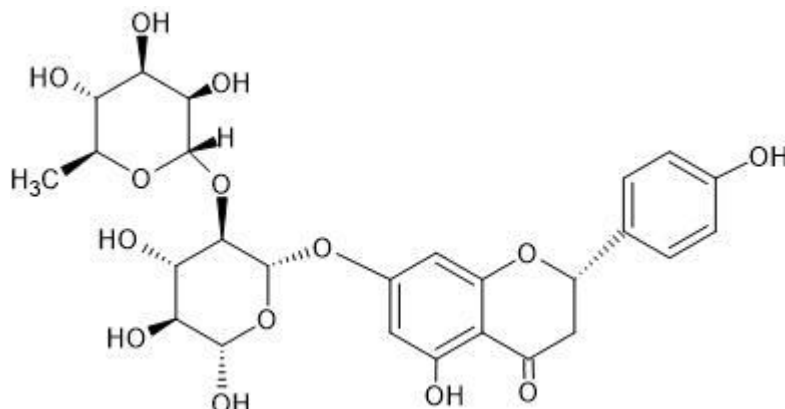
Flavonoid narirutin (naringenin-7-*O*-rutinozid) je glikozid koji se sastoji od flavona naringenina i disaharida rutinoze. Narirutin posjeduje brojna pozitivna svojstva. Najistaknutija su protuupalna, antialergijska i antioksidacijska svojstva. Također, istražuje se djelovanje narirutina u liječenju protiv bronhijalne astme te njegova primjena u ublaživanju oštećenja jetre nastalog zbog konzumacije alkohola. Najviše koncentracije narirutina pronalaze se u soku naranče, ali ostalo citrusno voće sadrži značajne koncentracije narirutina u svom kemijskom sastavu. Na **Slici 3** prikazana je kemijska struktura narirutina.



Slika 3 Kemijska struktura narirutina (Izvor: Autor)

Naringin pripada u flavonoide gorkog okusa te se koncentracija naringina smanjuje dozrijevanjem citrusog voća. Na **Slici 4** prikazana je kemijska struktura naringina. Aglikon naringina je naringenin te je neohesperidoza njegov glikon. Enzimskom hidrolizom naringina moguće je ukloniti njegov gorak okus (Berk, 2016). Sve veća pažnja pridodaje se djelovanju

naringina u liječenju dijabetesa, odnosno na njegovo antihiperглиkemijsko djelovanje, dok su zabilježena i dobra antioksidacijska i protuupalna svojstva.



Slika 4 Kemijska struktura naringina (Izvor: Autor)

U proizvodima citrusnog voća također su prisutne značajne količine fenolnih kiselina koje predstavljaju aromatske, sekundarne biljne metabolite. U kori citrusa nalaze se sljedeće fenolne kiseline: kofeinska, sinapinska, *p*-kumarinska, *p*-cimentna, hidroksicimetna, vanilinska, ferulinska, klorogenska kiselina i mnoge druge (Mahato i sur., 2019). Fenolne kiseline javljaju se u vezanom obliku. One su vezane pomoću esterskih veza za celulozu, proteine, lignine i ostale druge strukturne biljne komponente (Mahato i sur., 2019). Također, vežu se i na flavonoide, manje organske spojeve ili terpene. Manji dio fenolnih kiselina javlja se kao slobodne kiseline. Fenolne kiseline važne su u zaštiti od oksidativnih razaranja i u zaštiti od bolesti (Mahato i sur., 2019).

2.2.2. Ostali spojevi prisutni u kori mandarine

Citrusno voće puno je različitih pigmenata, a specifična žuto-narančasta boja soka i endokarpa dolazi iz karotenoida, najviše β -karotena i ksantofila (Mahato i sur., 2019). Najznačajniji pigmenti su: klorofil (zelena boja), ksantofil (žuta i narančasta boja), karoten (narančasta boja) i likopen (crvena boja). Pigmenti se nalaze u plastidima, klorofil se nalazi u kloroplastima, a ostali pigmenti u kromoplastima. Nezrelo voće zelene je boje, ali dozrijevanjem koncentracija klorofila se smanjuje, kloroplasti prelaze u kromoplaste te zatim kora citrusnog voća poprima svoju karakterističnu boju (Berk, 2016).

Askorbinska kiselina ili vitamin C prisutan je u svježem voću i povrću te predstavlja jedan od najispitivanih i najznačajnijih vitamina. Također, vitamin C pripada među najdjelotvornije antioksidanse i sudjeluje u brojnim biološkim procesima (Drake, 2009). Vitamin C važan je za oporavak tkiva i jačanje imunološkog sustava. Citrusno voće sadrži velike količine vitamina C i niže količine pro-vitamina A i B kompleksa (Mahato i sur., 2019). Topiv je u vodi pa se može konzumirati oralno kao dodatak prehrani, a važan je i u sprječavanju bolesti koje uključuju mehanizme biološke oksidacije, poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Berk, 2016).

Nusproizvod citrusnog voća bogat je dijetalnim vlaknima koja se dijele na topiva i netopiva. U topiva vlakna ubraja se pektin, a u netopiva ubrajaju se celuloza, lignin i hemiceluloza. Od pektinskih tvari agruma najistaknutiji su pektinska i pektininska kiselina, pektin te protopektin (Mahato i sur, 2019). Pektinske tvari važne su sastavnice citrusnog voća zato što vežu stanice albeda i omogućuju rast stanica staničnih stjenki u fiziologiji biljke te služe kao stabilizator citrusnih sokova. Otpadna kora citrusnog voća najznačajniji je materijal za dobivanje pektina koji se kasnije može upotrebljavati u proizvodnji marmelada i džemova. Konzumacijom pektinskih tvari u ljudskoj prehrani smanjuje se razina kolesterola u krvi te je smanjen rizik od nastanka koronarne bolesti (Berk, 2016).

Šećeri u citrusnom voću zaslužni su za sladak okus i nositelji su energije. Na šećere otpada veći dio topljivih krutih tvari agruma. Polovinu ukupnih šećera zauzima saharoza, a ostatak zauzimaju reducirajući šećeri poput glukoze i fruktoze (Berk, 2016). Ukupna količina šećera zastupljenih u citrusnom voću ovisi klimi, temperaturi te sadržaju tla (Mahato i sur., 2019).

Eterična ulja nalaze se u žlijezdama epikarpa kore citrusnog voća. Preciznije, komponente eteričnih ulja sintetiziraju se u epitelnim stanicama epikarpa gdje su okružene uljnim žlijezdama. Kod nezrelog voća agruma broj uljnih žlijezda je malen, ali zrenjem povećava se broj žlijezda. Ona prema kemijskom smislu nisu ulja zato što nisu sastavljena od triglicerida, već predstavljaju smjesu terpena i spojeva sličnih terpenima. Nazivamo ih uljima jer posjeduju hidrofobni/lipofilni karakter. Primarna funkcija eteričnih ulja je zaštita voća od insekata. Također, eterična ulja posjeduju antimikrobna svojstva te se iz tog razloga primjenjuju u farmaceutskoj industriji. Eterična ulja mandarine sadržavaju mnogobrojne različite kemijske spojeve u svom sastavu. Eterična ulja su hlapive komponente, a hlapljive komponente eteričnih ulja kore agruma su terpeni te njihovi derivati (Berk, 2016).

Alkoholi i aldehidi nalaze se u ulju citrusnog voća, ali u niskim udjelima. Radi hidrolize estera nazočni su slobodni alkoholi. Linalool predstavlja jednu od važnijih komponenti arome u kori

citrusa (Berk, 2016). Osim u kori citrusa, linalool doprinosi okusu i aromi mnogih drugih namirnica poput rajčice, grožđu i vinu, mangu, ulju limuna i limete, mrkvi te bosiljku. Također, mnoga istraživanja ukazuju kako je linalool najvažnija komponenta koja pridonosi okusu soka od naranče.

Citrusno voće pripada kiselom voću te je sok citrusnog voća prepun organskim kiselinama. Najznačajnije kiseline su limunska i jabučna, a ostale manje zastupljenije kiseline su mliječna, vinska, benzojeva, oksalna i mravlja (Mahato i sur., 2019).

2.3. ZELENE TEHNIKE EKSTRAKCIJE

Zelena ekstrakcija definirana je kao: „Zelena ekstrakcija temelji se na otkrivanju i osmišljavanju ekstrakcijskih procesa koji će umanjiti uporabu energije, omogućiti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih produkata te da će pružiti siguran, visoko kvalitetan ekstrakt.“ (Chemat i sur., 2012). Tradicionalne metode ekstrakcije su neekonomične zato što zahtijevaju duže vrijeme ekstrakcije, više organskih otapala, što ima negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš (Ramos i sur., 2002). Još jedan nedostatak tradicionalnih metoda ekstrakcije je taj da one koriste manje selektivna otapala za ciljane komponente pa se javlja tendencija za koncentriranjem i pročišćavanjem dobivenih ekstrakata (Mustafa i Turner, 2011). S vremenom su se pokušali reducirati ti problemi koji nastaju primjenom tradicionalnih tehnika ekstrakcije, poput velikog utroška energije i uporaba štetnih otapala uz mali prinos produkta (Mustafa i Turner, 2011). Zadaća zelene kemije je zamjena tradicionalnih metoda ekstrakcije sa zelenim i inovativnim metodama ekstrakcije koje se prikazuje kao potencijalno rješenje u suzbijanju navedenih problema. Opisano je šest principa zelene ekstrakcije prirodnih produkata koji su navedeni u **Tablici 1**. Principi su opisani kao inovativne upute s potencijalnom primjenom na istraživačkoj i industrijskoj razini (Chemat i sur., 2012). Očuvanje biološke raznolikosti je od velike važnosti te se pojavljuju nove tehnologije u uzgoju biljaka poput „plant miling“ tehnologije. To je primjer nove tehnologije koja opisuje proizvodnju i izolaciju željenih tvari iz biljke, a da se pritom biljka ne uništi. Uporaba zelenih otapala, najčešće vode te otapala iz prirodnih izvora, ističe se kao povoljna alternativa štetnog utjecaja organskih otapala na okoliš. Ekstrakcija kemijskih spojeva poput lipida, vitamina, šećera, eteričnih ulja, pigmenata, bjelančevina i sličnih molekula zahtijeva uporabu otapala poput heksana, toluena, acetona, kloroforma i drugih organskih otapala, a upravo su ta otapala svrstana kao otapala štetna po ljudsko zdravlje i okoliš. Također, organska otapala su zapaljiva, hlapljiva ili toksična pa su

često razlog zagađenja okoliša i efekta staklenika. Zbog njihovih nepovoljnih utjecaja, ta otapala zahtijevaju zamjenu zelenim otapalima iz sigurnosnih, ekonomskih i ekoloških aspekata. Prednost zelenih otapala je visoka moć otapanja, netoksičnost, biorazgradivost i nezapaljivost. Tradicionalni postupci ekstrakcije zahtijevaju veliku potrošnju energije pa je nužno pronaći postupke kojima bi se smanjio utrošak energije ili smanjilo vrijeme ekstrakcije. Minimiziranjem potrošnje energije i njezinim ponovnim korištenjem te primjenom inovativnih tehnologija, smanjuje se štetan utjecaj na okoliš, stoga postupak ekstrakcije postaje jeftiniji i sigurniji. Neki načini smanjivanja potrošnje energije su optimizacija postojećih procesa, primjena inovativne tehnologije i ponovna uporaba energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije. Proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada, kako bi se uključila bio- i agro-industrijska prerada, obuhvaća proizvodnju ciljanih produkata iz određenog izvora koji tada imaju mogućnost daljnje prerade. Provođenjem manjeg broja operacija te kontroliranih i sigurnih procesa dovodi do smanjenja troškova. Poznato je kako proces ekstrakcije uključuje lanac procesa te se dokazalo kako uporaba superkritičnih fluida smanjuje broj pojedinačnih koraka u provođenju ekstrakcijskog postupka. Posvećivanje proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez konzervansa odnosi se na ispunjenje određenih propisa i zahtjeva tržišta kako bi se postigao određeni kriterij kvalitete. Ekstrakti moraju biti proizvedeni iz točno deklariranih sirovina kako bi se potvrdila njihovo podrijetlo te ne smiju sadržavati ostatke pesticida, teških metala, mikotoksina i slično (Chemat i sur., 2012).

Tablica 1 Principi zelene ekstrakcije

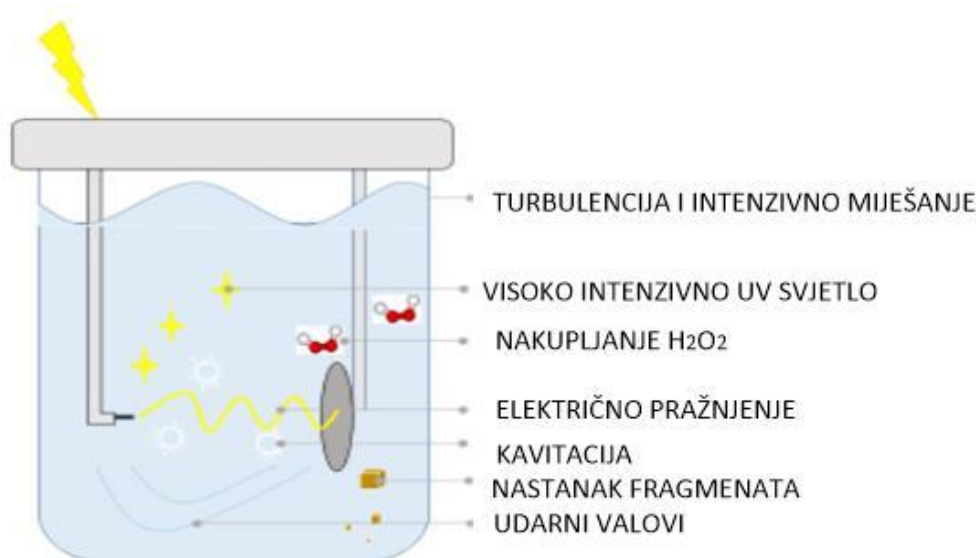
Broj	Princip
1.	Otkrivanje novih izvora biljnih materijala i korištenje obnovljivih izvora.
2.	Korištenje alternativnih otapala, najčešće vode te otapala iz prirodnih izvora.
3.	Minimiziranje potrošnje energije njezinim ponovnim korištenjem i primjena inovativnih tehnologija.
4.	Proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada kako bi se uključila bio- i agro-industrijska prerada.
5.	Provođenje manjeg broja operacija te kontroliranih i sigurnih procesa.
6.	Dobivanje biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez konzervansa.

Zelene tehnike ekstrakcije sigurnije su za čovjeka i okoliš te su učinkovitije od tradicionalnih tehnika ekstrakcije. Suvremene (zelene) tehnike ekstrakcije upotrebljavaju netoksična otapala poput vode, CO₂ i etanola. Neke od tehnika su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction; MAE*), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction; UAE*), ubrzana ekstrakcija otapalima (engl. *Accelerated Solvent Extraction; ASE*), ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SO-CO₂) i ekstrakcija subkritičnom vodom (engl. *Subcritical Water Extraction; SWE*) (Bubalo i sur., 2018), a u nastavku ćemo se dotaknuti one tehnike ekstrakcije koja je korištena u ovom radu

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Visokonaponsko električno pražnjenje (VNEP; engl. *High Voltage Electrical Discharge*) pripada u netermičku metodu koja svoju primjenu pronalazi u procesima kod kojih visoka temperatura nije poželjna (Mandal i sur., 2018). Također, predstavlja inovativnu metodu ekstrakcije bioaktivnih spojeva koja u odnosu na tradicionalne metode ekstrakcije, zahtijeva kraće vrijeme provedbe procesa, doprinosi većem iskorištenju i pridaje kvaliteti nastalih produkata (ekstrakata) te omogućuje kontrolu Maillardovih reakcija koje se odvijaju u produktima (Barišić i sur., 2019). VNEP metoda upotrebljava se za očuvanje mikrobiološke sigurnosti hrane zato što se njenom primjenom osigurava inaktivacija mikroorganizama i enzima te je prikladna za produljenje roka trajanja proizvoda. Također, visokonaponskim električnim pražnjenjem uklanjaju se toksini iz hrane te se primjenjuje za sterilizaciju ambalaže i dezinfekciju vode (Grgić, 2019). VNEP metoda primjenu pronalazi kod pasterizacije voćnih sokova s ciljem očuvanja sadržaja vrijednih bioaktivnih spojeva i održavanja mikrobne sigurnosti. Također, uporabom ovakvog načina ekstrakcije zabilježeno je povećanje koncentracije fenolnih spojeva u nastalim ekstraktima (Herceg i sur., 2016). Zbog svojih dobrih svojstva visokonaponsko električno pražnjenje široko je primjenjivano u prehrambenoj industriji, a njegovo najvažnije svojstvo je mogućnost provedbe procesa na nižim temperaturama te je zbog toga pogodna za provođenje ekstrakcije termolabilnih bioaktivnih komponenti. U sustave za ekstrakciju potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem ubrajamo cirkulirajuće, kontinuirane i diskontinuirane sustave te se ekstrakcija može provoditi u plinovitom ili tekućem mediju (Li i sur., 2019). Kod visokonaponskog električnog pražnjenja energija se razvija između dvije elektrode koje su potopljene u vodenoj otopini. VNEP metoda koja se odvija u vodenim sustavima uključuje dvije faze: fazu pražnjenja električne struje i fazu

pražnjenja električnog luka. Faza pražnjenja električne struje obilježena je razvojem malog broja mjehurića i aktivnih radikala te slabijim udarcima valova, a u fazi pražnjenja električnog luka razvija se veći broj mjehurića i slobodnih, aktivnih radikala te su udarci valova intenzivniji (Zongming i sur., 2019). Ova metoda temelji se na pojavi električnog izboja u vodenoj otopini te se tom pojavom omogućava oštećenje strukture stanica i fragmentacija čestica pri čemu se postiže kvalitetnija ekstrakcija bioaktivnih komponenata unutar stanice (Rajha i sur., 2015). Visokonaponsko električno pražnjenje usmjereno je na djelomično ionizirani plin koji nema termodinamičku ravnotežu između visokoenergetskih elektrona i glavnog dijela atoma plina ili molekula te se kao rezultat njihova djelovanja oslobađa veliki sadržaj kinetičke energije na nižim temperaturama. Odvija se emisija energetski nabijenih čestica - protona i fotona te se zbog toga kidaju kovalentne veze i ubrzavaju kemijske reakcije (Barišić i sur., 2019). Pojavom električnog izboja izaziva se nekoliko sekundarnih fenomena: intenzivno miješanje i turbulencija tekućine, pojava emisije UV svjetla visokog intenziteta, proizvodnja kavitacijskih mjehurića i udarnih valova te razvitak vodikovog peroksida koji su prikazani na **Slici 5** (Boussetta i Vorobiev, 2014).



Slika 5 Visokonaponsko električnompražnjenje između dvije elektrode u otopini (Izvor: Rajha i sur., 2015)

Preciznije, prema Boussetta i Vorobiev (2014) kod visokonaponskog električnog pražnjenja u ionskim otopinama odvija se električno pražnjenje kada su izlazni napon te njegova pulsna frekvencija dovoljno jaki. Električno pražnjenje dešava se između dvije elektrode što za

posljedicu ima stvaranje plazme. Stvaranje plazme izaziva efikasnu raspodjelu fluida, otopine ili suspenzije kojom je okružena čime se stvaraju udarni valovi koji se potom radijalno šire medijem, uzrokuju turbulencije i intenzivno miješanje sadržaja reaktora. Prilikom udara udarnih valova o stijenke reaktora nastaju refrakcijski valovi koji su zaslužni za stvaranje kavitacijskih mjehurića. Također, plazma emitira visoko UV zračenje koje dovodi do fotodisocijacije vode i nastanka hidroksilnih radikala. Svi sekundarni fenomeni uzrokuju razaranje tretiranog materijala na mikroskopskoj razini. Turbulencija ubrzava proces ekstrakcije bioaktivnih molekula iz stanice biološkog materijala, a intenzivno miješanje sadržaja reaktora doprinosi bržem prijenosu mase. Nastanak udarnih i refrakcijskih valova poboljšavaju mehaničko razaranje stanične membrane. UV zračenje djeluje mutageno na stanice tretiranog materijala te hidroksilni radikali izazivaju oksidacijski stres stanica. Parametri ključni za ekstrakciju potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem su: napon, frekvencija i jakost električnog polja, elektroprovodljivost medija, vrijeme, koncentracija otopine (omjer tekuće/kruće), odabir otapala te protok protjecanja otopine (Grgić, 2019). Duže vrijeme trajanja procesa visokonaponskog električnog pražnjenja uzrokuje kvalitetnije razaranje stanica tretiranog materijala i bolju izolaciju spojeva, ali predugo trajanje procesa može imati negativan utjecaj zbog pojave radikala koji nastaju kao posljedica UV zračenja iniciranog električnim pražnjenjem (Rajha i sur., 2015). Također, prilikom dužeg trajanja procesa može doći do migracije metalnih iona iz elektroda bez obzira što su izgrađene od nehrđajućeg čelika. Nastali metalni ioni mogu utjecati na elektroprovodnost otopine, a time mogu prouzročiti pogrešnu pretpostavku o stupnju oštećenja tretiranog biološkog materijala. Veći stupanj oštećenja biološkog materijala omogućuje veći izlazak unutarstaničnih komponenti koje potom mijenjaju ionski sastav otopine i ujedno djeluju na njenu elektroprovodljivost (Boussetta i Vorobiev, 2014). Koncentracija otopine, odnosno omjer tekuće/kruće utječe na način da veća količina tekućeg dijela (otapala) u odnosu na kruti dio (uzorak) osigurava bolju difuziju bioaktivnih komponenti iz tretiranog materijala. Poboljšana je molekularna difuzija između dvije faze, a time je uspješnija ekstrakcija (Xu i sur., 2017). Važan utjecaj na proces ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem ima izbor otapala. Voda predstavlja izvor dobrog, lako dostupnog i ekonomičnog otapala te koja otapa većinu organskih spojeva, ali flavonoidi su slabije topivi u vodi pa se njihova topljivost poboljšava uz dodatak nekog organskog otapala (Cui i sur., 2018). Primjena visokonaponskog električnog pražnjenja, odnosno hladne plazme predstavlja inovativnu,

ekonomski i ekološki prihvatljivu tehnologiju s velikim potencijalom primjene u prehrambenoj industriji (Pankaj i Keener, 2018). U dosadašnjim istraživanjima ova tehnologija upotrebljavala se za ostvarivanje većeg prinosa polifenolnih spojeva u različitim prehrambenim proizvodima te se nije upotrebljavala komercijalno u velikim mjerama, ali svoju uporabu pronalazi u obradi hrane (Thirumdas i sur., 2014). Primjena VNEP metode pokazala je pozitivne učinke u obradi voćnih sokova zbog koje se uspjela zadržati ili poboljšati ukupna kvaliteta tretiranih sokova (Pankaj i Keener, 2018).

Prednosti ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem su sljedeće:

- Zahtjeva manju uporabu otapala u usporedbi s tradicionalnim metodama ekstrakcije.
- Provedba procesa ekstrakcije odvija se na nižim temperaturama uz neprimjetno povišenje temperature suspenzije/otopine nakon ekstrakcije (Parniakov i sur., 2014).
- Tretiranje ispitivanog materijala visokonaponskim električnim pražnjenjem može rezultirati povećanjem prinosa ciljanih komponenti s uporabom kraćeg vremena provedbe procesa ekstrakcije i uz smanjen utrošak energije u usporedbi s tradicionalnim metodama ekstrakcije (Boussetta i Vorobiev, 2014).
- Učinkovitost razaranja stanica je velika i mjeri se pomoću vrijednosti elektroprovodljivosti (z [$\mu\text{S}/\text{cm}$]) koja služi za procjenu stanične dezintegracije (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Nedostaci ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem su:

- Visokonaponsko električno pražnjenje djeluje na stanične zidove i membrane zato što je ova metoda neselektivna te se dešava isticanje raznih unutarstaničnih komponenti (Boussetta, 2009).
- Radi električnog pražnjenja visokog napona nastaje veliki broj slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativno razaranje staničnih membrana i oksidaciju ciljanih komponenti zbog čega je smanjen njihov prinos (Li i sur., 2019).
- Dosadašnja istraživanja provedena su u laboratorijskim mjerilima te pilot postrojenjima, a ne na industrijskoj razini (Boussetta i sur., 2012).

2.4. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE

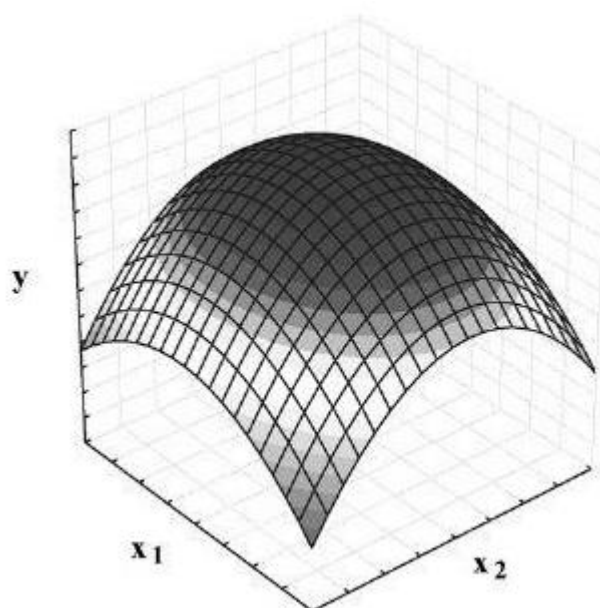
Optimizacija se odnosi na unaprjeđenje sustava ili procesa radi kojeg će se ostvariti maksimalno iskorištenje uz minimalne financijske troškove. Pojam optimizacije često se upotrebljava u analitičkoj kemiji zbog otkrivanja uvjeta u kojima se ostvaruju najbolji mogući prinosi te se optimizacija tradicionalno provodi radi promatranja utjecaja promjene jednog parametra u vremenu na neki eksperimentalni prinos (Aladić, 2015). Također, optimizacija predstavlja neizostavan korak u svakom industrijskom procesu i analitičkim tehnikama, a zahtjeva namještanje procesa preko skupa odabranih parametara i poštivanje svih relativnih procesnih ograničenja kako bi se postigla maksimalna učinkovitost primjenom minimalnog eksperimentalnog i financijskog napora (Banga i Seider, 1996). U industrijskom smislu optimizacija se odnosi na otkrivanje inovativnih procesa ili poboljšanje postojećih kojima će se omogućiti povećanje iskorištenja, smanjenje vremena i ukupnih troškova proizvodnje. Uporaba inovativnih tehnika ekstrakcije ima cilj ostvariti bolju kvalitetu i bolja fizikalno-kemijska svojstva proizvoda te umanjiti energetske potrebe i vrijeme trajanja procesa (Aydar, 2019). Stvarnu sliku o utjecaju procesnih parametara na promatrani proces nije moguće ostvariti promatranjem i mjerenjem samo jednog parametra zato što većina tehnoloških procesa ovisi o velikom broju procesnih parametara. Pristup optimizaciji na takav način zahtijevao bih utrošak velike količine vremena i ogroman broj eksperimenata. No, u današnje vrijeme vrši se optimizacija pomoću multivarijantne statističke tehnike (Liyana-Pathirana, 2005). Metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology – RSM*) pripada u najčešće upotrebljavane postupke statistički planiranih eksperimenata. RSM pripada u skup statističkih i empirijskih tehnika kojima se modeliraju te analiziraju utjecaji nezavisnih varijabli na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja, razvoja i optimiranja procesa (Aladić, 2015). Odnosno, RSM tehnika temelji se na ujednačavanju polinomnih jednadžbi s dobivenim eksperimentalnim podacima iz pomno planiranih eksperimenata te je važno opisati ponašanje skupa podataka kako bi se omogućilo statističko predviđanje (Baş i Boyaci, 2007).

Osnovni koraci za uporabu RSM metode kao tehnike za optimizaciju procesnih uvjeta su:

- Određivanje nezavisnih varijabli s definiranim rasponom ispitivanih parametara koje iznimno utječu na proces,

- Odabir plana i provedba eksperimenta prema predloženoj shemi kombinacije parametara,
- Aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko-statističkih metoda,
- Određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (Bezerra i sur., 2008).

Osnovni cilj primjene ove metode je utvrditi odnos između utjecajnih/nezavisnih varijabli sa zavisnom varijablom (odzivom) te utvrditi na koji način ulazni parametri utječu na odziv. Također, potrebno je odrediti prikladan dizajn eksperimenata pomoću kojeg će se utvrditi eksperimenti koje je nužno izvršiti. Izvršavanjem eksperimenata prema svim mogućim kombinacijama definiranim pomoću dizajna eksperimenata dobiva se kontinuirana ploha koja povezuje visine izmjerenih vrijednosti i naziva se odzivna ploha, prikaz na **Slici 6** (Aladić, 2015).



Slika 6 Trodimenzionalni prikaz odzivne plohe (Izvor: Bezerra i sur., 2008)

Prema Aladić (2015) odabir dizajna eksperimenata ovisi o očekivanoj odzivnoj funkciji. Kada eksperimentalni podaci ne stvaraju krivulje, kada ih je moguće aproksimirati linearnom funkcijom, tada se koristi dizajn eksperimenata za modele prvog reda. Aproksimacijska funkcija za modele prvog reda je (1) :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \dots \beta_i * x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Aproksimacija eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom upotrebljava eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine, dizajn za modele drugog reda (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^l \beta_i * x_i + \sum_{i=1}^l \beta_{ii} * x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{i=2} \beta_{ij} * x_i * x_j + \varepsilon \quad (2)$$

gdje su:

Y – modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$x_{i,j}$ – ispitivane nezavisne varijable

Koeficijenti odzivnog modela (funkcije) utvrđuju se metodom najmanjih kvadrata, a potom se vrši analiza i test adekvatnosti odzivnog modela uporabom analize varijance (ANOVA) ili studentovog t -testa kojima se istaknu faktori koji najznačajnije utječu na proces.

Iznimnu važnost ima odabir plana pokusa koji će najbolje opisati promatranu pojavu te se on određuje prema tome kakva se odzivna funkcija očekuje. Za modele prvog reda koristi se plan pokusa samo kada se eksperimentalne vrijednosti međusobno zavisnih varijabli mogu aproksimirati linearnom funkcijom (Myers i Montgomery, 1995). No, za aproksimaciju nelinearnih eksperimentalnih podataka upotrebljava se plan pokusa za modele drugog reda:

- centralno kompozitni plan pokusa
- trofaktorijalni plan pokusa na tri razine
- Box-Behnkenov plan pokusa (Bezerra i sur, 2008).

2.4.1. Box – Behnken eksperimentalni dizajn

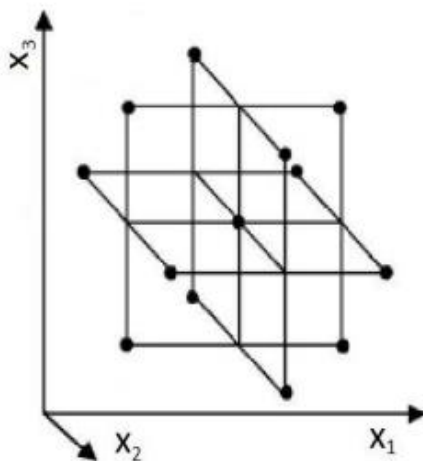
Box – Behnkenov plan pokusa (engl. *Box – Behnken design – BBD*) jedan je od najčešće upotrebljavanih planova pokusa u prehrambenoj industriji (Aydar, 2019). On propisuje kako odabrati točke eksperimenata u slučaju ispitivanja nekoliko faktora, parametra procesa na tri razine te je njime omogućeno ispitivanje većeg broja varijabli uz vrlo preciznu procjenu koeficijenata matematičkih modela drugog i prvog reda (Ferreira i sur., 2007). Ovakav eksperimentalni dizajn uobičajeno se sastoji od 17 provedenih eksperimenata, uključujući 3 do 5 ponavljanja u centralnoj točki koja koriste za procjenu statističke pogreške (Aydar, 2019). Grafički prikaz Box - Behnkenova eksperimentalnog dizajna nalazi se na **Slici 7**. Broj potrebnih eksperimenata za razvoj Box – Behnekenova eksperimentalnog dizajna definira se izrazom (3):

$$N = 2^k(k - 1) + C_0 \quad (3)$$

gdje je:

k - broj faktora, nezavisnih varijabli

C_0 – broj centralnih točaka



Slika 7 Box-Behnken plan pokusa (Izvor: Bezzera i sur., 2008)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak diplomskog rada odvijao se u sljedećih nekoliko koraka:

- Ekstrakcija bioaktivnih spojeva primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja iz kore mandarine (*Citrus unshiu* Marc.) sorte *Okitsu* pri različitim procesnim uvjetima: omjeru tekuće/kruto (1:200, 1:300, 1:400 mL/g), frekvenciji (40, 70, 100 Hz) i vremenu ekstrakcije (5, 10, 15 min);
- Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva i flavonoida koji su prisutni u dobivenim ekstraktima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD);
- Matematičko modeliranje i optimizacija procesa pomoću metode odzivnih površina (RSM) za prinos ekstrakcije i dva najzastupljenija bioflavonoida u ekstraktima;
- Određivanje ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti u dobivenim ekstraktima primjenom spektrofotometrijskih metoda;
- Primjenom programa *Design-Expert*[®] provesti statističku analizu varijance (ANOVA) i numeričku optimizaciju o utjecaju procesnih parametara na proces ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem.

3.2. MATERIJALI I METODE

Za ovo istraživanje prikupljene su kore mandarine, sorte *Okitsu* s obiteljske farme Dalibor Ujević (Opuzen, Hrvatska). Uzorci su prikupljeni u listopadu 2020. godine. Prije sušenja, uzorci kora mandarina su oprane vodovodnom vodom te su naknadno tri puta isprane u destiliranoj vodi.

Popis kemikalija korištenih u radu:

- Milli-Q voda (provodnost $\leq 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$);
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka);
- Otopina Na_2CO_3 (20%-tna; Merck, Njemačka);
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH^{*}; TCI, Japan).

- Standardi: hesperidin, narirutin, naringin, kaempferol-3-*O*-rutinozid, klorogenska kiselina, kriptoklorogenska, neoklorogenska kiselina (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Njemačka);
- Otopala visoke čistoće: metanol (J. T. Baker, Poljska).

Popis uređaja korištenih u radu:

- Uređaj za ultra-duboko smrzavanje (Thermo Fisher Scientific; TSE400VGP-ULTS, SAD);
- Liofilizator (Christ, Alpha LSCplus, Njemačka);
- Univerzalni mlin (IKA M 20 univerzalni mlin, Njemačka);
- Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje (VNEP, SFE Systems Ltd., Osijek, Hrvatska);
- Spektrofotometar (Spectronic Helios Gamma UV-Vis spektrofotometar; Thermo Fisher Scientific, SAD);
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (Agilent 1260 Infinity II; Analytical Instruments, CA, SAD).

3.2.1. Priprema uzorka za ekstrakciju

Oprane svježe kore mandarina sorte *Okitsu* su zamrznute u uređaju za ultra-duboko smrzavanje (**Slika 8**) na -80 °C kroz 24 sata.



Slika 8 Uređaj za ultra duboko smrzavanje (Thermo scientific; TSE400VGP-ULTS)
(Izvor: Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021.)

Naknadno, tako zamrznute podvrgnute su sušenju zamrzavanjem (proces liofilizacije) u uređaju prikazanom na **Slici 9**. Temperatura u kondenzatoru za vrijeme procesa sublimacije iznosila je oko $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok je tlak u komori iznosio $0,25\text{ mbar}$. Tijekom procesa desorpcije, maksimalna temperatura u komori bila je $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proces sušenja ukupno je trajao 36 h. Na **Slici 10** prikazani su uzorci kore mandarine nakon procesa sušenja.



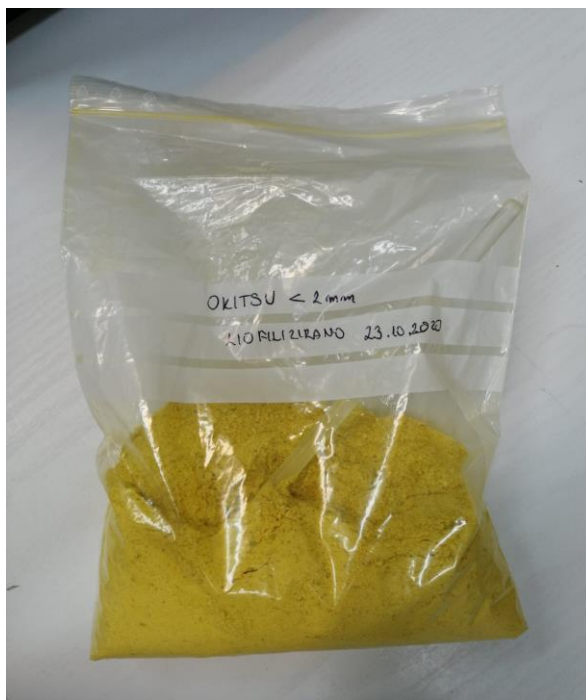
Slika 9 Liofilizator (Christ, Alpha LSCplus, Njemačka)

(Izvor: Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021.)



Slika 10 Prikaz postupka liofilizacije kora mandarina te uzorakanakon sušenja (Izvor: Autor)

Nakon sušenja, uzorci su stavljeni u eksikator, zatim samljeveni u mlinu (IKA M 20 univerzalni mlin) te prosijani kroz sito veličine otvora od 2 mm . Prikaz uzorka nakon mljevenja nalazi se na **Slici 11**.



Slika 11 Prikaz uzorka nakon mljevenja u univerzalnom mlinu (IKA M 20 univerzalni mlin)
(Izvor: autor)

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kore mandarine primjenom VNEP-a

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz kore mandarine sorte *Okitsu* primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja izvedena je na uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje (SFE Systems Ltd., Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; **Slika 12**). Uređaj se sastoji od:

- Visokonaponskog generatora (on predstavlja izvor visokog napona istosmjerne struje od 30 kV i maksimalan iznos struje je 10 mA, a maksimalna snaga generatora iznosi 120 W)
- Spremnika energije/kondenzatora (u njemu se skladišti energija koja se prazni u obliku izboja)
- Visokonaponske sklopke (ona osigurava pražnjenje spremnika energije u određenim intervalima, te frekvencija može graničiti od 10 Hz do 100 Hz)
- Komore s magnetnom miješalicom (u kojoj se uzorak tretira te su u njega uronjene elektrode na razmaku od 1 cm)

- Upravljačkog sklopa, automatike (kojom se osigurava rad na uređaju bez nadzora i ručnog upravljanja)
- Upravljača (koji osigurava upravljanje uređajem sa sigurne udaljenosti te se na njemu nalaze tipke za pokretanje/zaustavljanje, namještanje frekvencije i vremena trajanja ekstrakcije)



Slika 12 Uređaj za VNEP (SFE Systems Ltd., lijevo) te prikaz električnog pražnjenja u vidu izboja (desno) (Izvor: Autor)

Proces ekstrakcije provodio se na način da je odvagano sveukupno 1 g uzorka usitnjene kore mandarine sorte *Okitsu* te je na suhi materijal dodan različit omjer Milli-Q vode kako bi se dobile suspenzije različitih koncentracija. Tako pripremljeni uzorci tretirani su u VNEP uređaju u kojemu se provodila ekstrakcija pri zadanim uvjetima prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu kako je prikazano u **Tablici 2**. Nakon procesa ekstrakcije uzorci su filtrirani i čuvani na temperaturi od 4°C za daljnje analize.

Tablica 2 Procesni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih spojeva visokonaponskim električnim pražnjenjem prema Box – Behnken eksperimentalnom dizajnu

Rb.	Omjer tekuće/kruto [mL/g]	Frekvencija [Hz]	Vrijeme [min]
1.	200	40	10
2.	200	70	5
3.	400	40	10
4.	300	70	10
5.	300	70	10
6.	300	100	5
7.	400	70	5
8.	300	40	5
9.	300	70	10
10.	300	70	10
11.	200	70	15
12.	400	100	10
13.	200	100	10
14.	300	40	15
15.	300	100	15
16.	300	70	10
17.	400	70	15

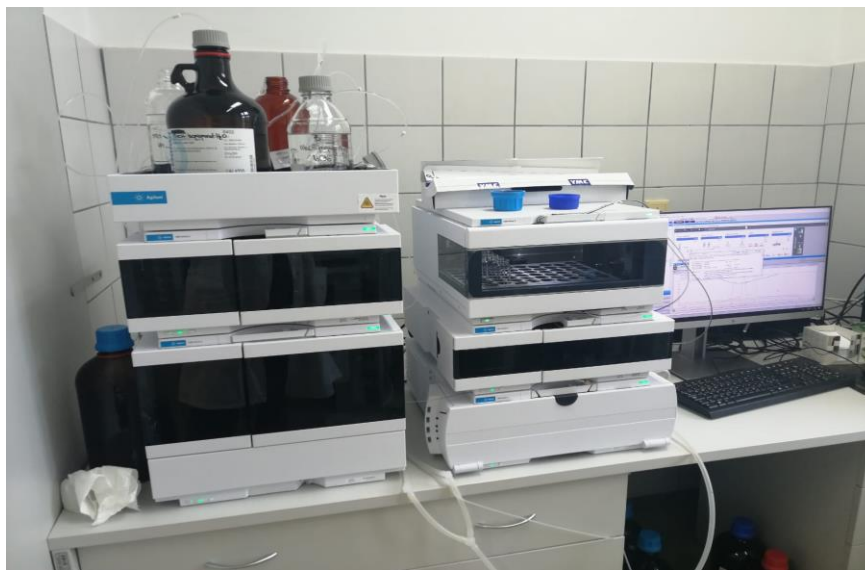
3.2.3. Određivanje flavonoida primjenom HPLC-DAD tehnikom

Identifikacija te kvantitativna i kvalitativna analiza flavonoida u ekstraktima uzorka provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) pri sljedećim uvjetima:

- Mobilna faza: A – 1% CH₃COOH (octena kiselina), B – metanol
- Kolona: COSMOSIL 5C18-MS-11 (4,6 x 250 mm, 5 μm)
- Eluiranje: 0-5 min, 20 % B; 5-15 min, 40-60 % B; 15-35 min, 80 % B; 35-40 min, 60 % B; 40-50 min, 20 % B at 25±0.8 °C kroz 50 min
- Injektivni volumen: 20 μL
- Brzina protoka: 1 ml/min
- Vrijeme analize: 60 min
- Valna duljina detektora: 210, 230, 250, 275, 300, 320, 360 nm

Sustav uređaja za semipreparativnu tekućinsku kromatografiju (HPLC) sastoji se od kvartarne pumpe G7111B, pećnice G7116A (temperaturni raspon od 10 do 85 °C), DAD detektora G7115A, autosamplera G7129A (kapacitet 36 viala) i sakupljača frakcija G1364E. Upravljanje

sustavom i obrada podataka vrši se pomoću računalnog programa ChemStation. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti prikazan je na **Slici 13**.



Slika 13 Fotografija uređaja HPLC-DAD (Izvor: Autor)

Kvalitativna analiza provedena je komparacijom retencijskog vremena (vrijeme između injektiranja uzorka i nastanka odziva na detektoru) fenolnih spojeva u uzorku s retencijskim vremenom poslije injektiranja standarda specifičnog fenolnog spoja poznate koncentracije. Kvantitativna analiza pojedinih komponenti u uzorcima provedena je mjerenjem površine ispod pikova na osnovi ranije konstruirane kalibracijske krivulje za svaki fenolni spoj koji je analiziran. Rezultati dobiveni HPLC analizom, radi jednostavnosti, izraženi su kao mg komponente po gramu materijala, odnosno mg/g.

Pripremljene su otopine standarda sljedećih fenolnih spojeva: klorogenska kiselina (10-1000 $\mu\text{g/mL}$), narirutin (10-150 $\mu\text{g/mL}$), hesperidin (1-1500 $\mu\text{g/mL}$), rutin (10-500 $\mu\text{g/mL}$), kaempferol 3-*O*-rutinozid (10-1000 $\mu\text{g/mL}$), pri koncentracijama navedenima za svaku komponentu. Uz navedene komponente, pripremljeni su standardi kriptoklorogenske (10-1000 $\mu\text{g/mL}$) i neoklorogenske kiseline (10-100 $\mu\text{g/mL}$).

Linearnom regresijom dobivenih jednadžbi pravca za svaku komponentu izračunat je koeficijent determinacije koji iznosi za klorogensku kiselinu ($R^2=0,99912$), narirutin ($R^2=0,99888$), hesperidin ($R^2=0,99720$), rutin ($R^2=0,99842$), kaempferol-3-*O*-rutinozid ($R^2=0,99996$), kriptoklorogensku ($R^2=0,99954$) i neoklorogensku kiselinu ($R^2=0,99887$) pri

koncentracijama navedenima za svaku komponentu. R^2 viši od vrijednosti 0,995 potvrđuje da je metoda linearna u cijelom području ispitivanih koncentracija.

Odgovarajuća retencijska vremena za ispitane komponente utvrđena su: klorogenska kiselina (12,333 min), narirutin (18,363 min), hesperidin (18,838 min), rutin (19,034 min), kaempferol-3-O-rutinozid (20,324 min), kriptoklorogenska (12,800 min) i neoklorogensku kiselinu (6,052 min).

3.2.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Za određivanje antiradikalne aktivnosti primijenjena je DPPH metoda. U 1,2 ml razrijeđenog ekstrakta koncentracije 1 mg/ml dodalo se 0,5 ml svježe pripremljene otopine DPPH koncentracije 0,2 mM. Tako pripremljeni uzorci ostaju se u mraku 30 minuta, a nakon isteka vremena mjerena je apsorbancija pri vajnoj duljini od $\lambda=517$ nm. Mjerenja su provedena u tri paralele te su rezultati izraženi kao % aktivnosti vezanja DPPH (% DPPH). Moć vezanja slobodnih radikala izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH u koju nije dodan uzorak, prema jednadžbi (4):

$$\%DPPH \text{ activity} = \frac{(A_{DPPH} + A_B) - A_S}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (4)$$

gdje su:

A_{DPPH} – kontrola apsorbancije, predstavlja apsorbanciju pripremljene otopine DPPH

A_B – apsorbancija uzorka

A_S – apsorbancija uzorka pomiješanog s DPPH otopinom

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni udio fenola (engl. *Total Phenol Content; TPC*) u dobivenim ekstraktima određen je metodom po Folin-Ciocalteu spektrofotometrijski na spektrofotometru prikazanom na **Slici 14**. U Eppendorf epruvete dodano je 20 μ L uzorka koji je razrijeđen na 10 mg/ml i 100 μ L Folin-Ciocalteu reagensa, zatim se dodalo 300 μ L 20%-tne otopine natrijeva karbonata i 1580 μ L Milli-Q vode. Slijepa proba priprema se tako da se dodalo 100 μ L Folin-Ciocalteu reagensa, 300 μ L 20%-tne otopine natrijeva karbonata i 1600 μ L Milli-Q vode. Zatim se termostatiralo uzorke 30 minuta na temperaturi od 40 °C te je nakon mjerena apsorbancija spektrofotometrom na

valnoj duljini od $\lambda=765$ nm u tri paralele. Rezultati su izračunati prema kalibracijskoj krivulji masenog udjela galne kiseline i odgovarajućih absorbancija te su isti izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu biljnoga materijala. Radi jednostavnosti, dalje će se u tekstu rezultati izražavati skraćeno kao mg GAE/g.



Slika 14 Spektrofotometar (Spectronic Helios Gamma UV-Vis spektrofotometar; Thermo Fisher Scientific) (Izvor: autor)

3.2.6. Optimiranje procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine

Proces ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine provodio se primjenom VNEP-a kojim se omogućilo kvalitetnije iskorištenje kore mandarine koja u industriji zaostaje kao otpad i predstavlja ekonomski trošak. Modeliranje i optimizacija procesa ekstrakcije potpomognute VNEP-om provedena je uporabom metode odzivnih površina te je upotrebljavan Box-Behnkenov plan pokusa za procjenu utjecaja procesnih parametara tijekom ekstrakcije primjenom VNEP metode na kvalitetu nastalih ekstrakata, to jest na udio hesperidina, narirutina, udio ukupnih fenola i antiradikalnu aktivnost. Također, promatran je utjecaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije. U procesu ekstrakcije VNEP metodom odabrane su tri različite nezavisne varijable: omjer tekuće/kruto (X_1 , mL/g), frekvencija (X_2 , Hz) i vrijeme ekstrakcije (X_3 , min). Provedeno je 17 eksperimenata prema Box-Behnken eksperimentalnom planu pokusa te su dobiveni rezultati eksperimenata aproksimirani matematičkim modelima odzivnih površina, odnosno polinomom drugog reda. Pomoću tih podataka pokazuje se adekvatnost modela za pojedini proces i kreiraju 3D prikazi utjecaja određenih procesnih parametara na proces ekstrakcije primjenom VNEP-a. Statistička analiza varijance (ANOVA) i

numerička optimizacija o utjecaju procesnih parametara na ekstrakcijski proces provedena je primjenom programskog paketa *Design Expert*[®].

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ISKORIŠTENJE EKSTRAKCIJE I UDIO BIOFLAVONOIDA U DOBIVENIM EKSTRAKTIMA PRIMJENOM VNEP METODE

U ovom radu provedeno je istraživanje o utjecaju VNEP metoda ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz kore mandarine sorte *Okitsu*. Promatrao se utjecaj promjene procesnih parametara ekstrakcije VNEP, primarno omjera tekuće/kruto (1:200, 1:300, 1:400 mL/g), frekvencije (40, 70, 100 Hz) i vremena ekstrakcije (5, 10, 15 min), na iskorištenje ekstrakcije i na ekstraktibilnost fenolnih komponenti. Zanimljivo je napomenuti da je proces liofilizacije (dehidratacija s prethodnim zamrzavanjem) za sušenje svježe kore mandarine primijenjen za što bolje očuvanje fenolnih spojeva pod blažim uvjetima procesiranja namirnica. Liofilizacija pripada u nedestruktivne metode sušenja namirnica. To je jedinstveni postupak sušenja namirnica u zamrznutom stanju koji se sastoji od nekoliko značajnih koraka koji objedinjuju procese zamrzavanja i dehidratacije (Lovrić, 2003).

Tablica 3 Iskorištenje (izraženo kao mg/g liofiliziranih kora mandarina) u dobivenim ekstraktima pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije primjenom VNEP iz kore mandarine sorte *Okitsu*

Rb.	Omjer tekuće/kruto (mL/g)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (mg/g)
1	200	40	10	416,80
2	200	70	5	430,00
3	400	40	10	389,00
4	300	70	10	453,00
5	300	70	10	432,00
6	300	100	5	427,20
7	400	70	5	391,50
8	300	40	5	426,10
9	300	70	10	432,31
10	300	70	10	424,80
11	200	70	15	441,20
12	400	100	10	359,50
13	200	100	10	418,40
14	300	40	15	456,00
15	300	100	15	463,20
16	300	70	10	422,40
17	400	70	15	424,01

Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 3**, uočava se kako se prinosekstrakcije kreće u rasponu od 463,20 do 359,50 mg/g liofiliziranih kora mandarina. Najveće iskorištenje ostvareno je u

eksperimentu broj 15, dok je najmanje iskorištenje ostvareno u eksperimentu broj 12. Proces ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja u eksperimentu broj 15 odvijao se pri procesnim uvjetima: omjeru tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvenciji 100 Hz i vremenu od 15 minuta. Ekstrakcija u eksperimentu broj 12 provedena je pri procesnim uvjetima: omjeru tekuće/kruto 1:400 mL/g, frekvenciji 100 Hz i vremenu od 10 minuta.

Tablica 4 Sadržaj hesperidina, narirutina, rutina, kriptoklorogenske kiseline, kaemferol-3-rutinozida i neoklorogenske kiseline identificiran u dobivenim ekstraktima pri različitim procesnim parametrima ekstrakcije primjenom VNEP iz kore mandarine sorte *Okitsu*

Rb.	Hesperidin (mg/g)	Narirutin (mg/g)	Rutin (mg/g)	Kriptoklorogenska kiselina (mg/g)	Kaemferol-3-O-rutinozid (mg/g)	Neoklorogenska kiselina (mg/g)
1	58,51	12,77	2,49	1,05	0,59	0,68
2	59,96	13,55	2,25	0,98	0,59	0,68
3	64,74	13,72	4,35	0,75	0,56	0,53
4	59,46	13,95	4,33	0,93	0,66	0,72
5	67,07	14,20	4,62	0,79	0,61	0,64
6	70,62	14,53	2,55	0,81	0,57	0,64
7	69,76	14,74	2,66	0,84	0,36	0,60
8	55,88	7,47	1,37	0,43	0,23	0,33
9	59,16	12,87	4,19	0,39	0,60	0,54
10	67,08	14,67	4,78	0,85	0,63	0,68
11	59,22	17,39	5,10	1,10	0,90	1,10
12	72,91	12,19	5,25	0,86	0,44	0,66
13	50,52	13,51	4,00	0,85	0,72	0,62
14	62,90	14,40	5,05	0,76	0,51	0,72
15	58,71	13,76	4,56	0,69	0,49	0,71
16	64,50	14,54	4,92	0,65	0,89	0,68
17	68,32	14,58	5,13	0,67	0,61	0,61

U **Tablici 4** prikazane su vrijednosti pojedinih bioflavonoida koji su ekstrahirani iz kore mandarine primjenom tehnike VNEP. Identifikacija i kvantitativna analiza flavonoida u ekstraktima uzorka provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). Detektirana je prisutnost hesperidina, narirutina, rutina, kriptoklorogenske kiseline, kaemferol-3-rutinozida i neoklorogenske kiseline čiji su rezultati izraženi kao mg/g .

Uočeno je kako je dominantna komponenta u dobivenim VNEP ekstraktima hesperidin. Koncentracija hesperidina određena je u rasponu od 50,52 mg/g do 72,91 mg/g. Najveća

koncentracija određena je u eksperimentu broj 12 (primijenjeni procesni parametri: omjer tekuće/kruto 1:400 mL/g, frekvencija 100 Hz i u vremenu od 10 minuta), dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 13 (primijenjeni procesni parametri: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 100 Hz i vrijeme od 10 minuta).

Koncentracija narirutina određena je u rasponu od 7,47 mg/g do 17,39 mg/g predstavljajući drugu najzastupljeniju komponentu ekstrahiranu primjenom VNEP iz kore mandarine sorte *Okitsu*. Najviša koncentracija uočena je u eksperimentu broj 11 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 15 minuta), dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 8 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme od 5 minuta).

Koncentracija rutina određena je u rasponu od 1,37 mg/g do 5,25 mg/g. Najviša koncentracija zabilježena je u eksperimentu broj 12 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:400 mL/g, frekvencija 100 Hz i vrijeme od 10 minuta), dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 8 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme od 5 minuta).

U ekstraktima je također potvrđena i prisutnost kriptoklorogenske kiseline u rasponu od 0,39 mg/g do 1,10 mg/g. Najviša koncentracija zabilježena je u eksperimentu broj 11 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 15 minuta), dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 9 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 10 minuta). Neoklorogenska kiselina je također detektirana u rasponu od 0,33 mg/g do 1,10 mg/g. Najviša koncentracija zabilježena je u eksperimentu broj 11 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 15 minuta) dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 8 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme od 5 minuta).

Koncentracija kaemferol-3-rutinozida određena je u rasponu od 0,23 mg/g do 0,90 mg/g. Najviša koncentracija zabilježena je u eksperimentu broj 11 (ekstrakcija provedena pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 15 minuta) dok je najniža koncentracija zabilježena u eksperimentu broj 8 (ekstrakcija provedena

pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme od 5 minuta).

U **Tablici 5** prikazani su dobiveni rezultati ukupnih fenola (mg GAE/g biljnog materijala) i antiradikalne aktivnosti (izraženih kao % DPPH) primjenom VNEP tehnike iz kore mandarine sorte *Okitsu* pri različitim procesnim parametrima ekstrakcije. Udio ukupnih fenola određivao se metodom po Folin-Ciocalteu, dok se antiradikalna aktivnost mjerila DPPH metodom. Obje metode se temelje na spektrofotometrijskim mjerenjima. Metoda po Folin-Ciocalteu zasniva se na oksidaciji fenolnih grupa iz uzorka dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa uslijed čega nastaje obojani produkt. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fofomolibdene kiseline prema kemijskom sastavu. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona pomoću molibdenofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju što rezultira plavim obojenjem. Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje, a reducirani je plave boje. Mjerenjem apsorbancije kod 765 nm određuje se intenzitet obojenja u odnosu na slijepu probu te se mjerenje vrši pomoću spektrofotometra u tri paralele (Blainski i sur., 2013). DPPH metoda smatra se najboljom, standardnom i jednostavnom metodom za određivanje antiradikalne aktivnosti čistih spojeva. Metoda je temeljena na redukciji iona DPPH iz DPPH• radikala u DPPH₂ prilikom hvatanja protona (H) iz antioksidansa, čime ljubičasto obojenje prelazi u žuto. Promjena intenziteta boje praćena je spektrofotometrijski gdje se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od $\lambda=517$ nm (Mishra i sur., 2012). Ova metoda može se upotrebljavati za određivanje antioksidansa u voću, povrću, žitaricama, vinima te uljima. Reakcija uzorka s DPPH može se provoditi u vodi ili metanolu čime je olakšana ekstrakcija spojeva nositelja antiradikalne aktivnosti (Kedare i Singh, 2011). Jedna od prednosti ove metode je da ukoliko se izdvoji dovoljno vremena, DPPH će reagirati sa cijelim uzorkom. No, treba uzeti u obzir da DPPH reagira sporo čak i sa slabim antioksidansima (Prakash, 2001). Antioksidans (AH) u reakciji s radikalom donira jedan atom vodika te kao produkt nastane DPPH-H i stabilni fenoksi radikal (A•). Ukoliko DPPH radikal reagira sa spojem koji donira atom vodika javlja se gubitak ljubičaste boje otopine zato što se stvara reducirani oblik difenilpikrilhidrazin koji je žute boje (Kedare i Singh, 2011).

Tablica 5 Izmjerene vrijednosti ukupnih fenola (mg GAE/g) i antiradikalna aktivnost (izražena kao % DPPH) u dobivenim ekstraktima pri različitim procesnim parametara ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja iz kore mandarine sorte *Okitsu*

Rb.	Ukupni fenoli (mg GAE/g biljnog materijala)	DPPH (%)
1	134,44	92,22
2	166,23	91,97
3	176,49	94,93
4	173,15	92,68
5	179,31	92,30
6	170,59	92,09
7	275,46	92,85
8	274,18	91,80
9	176,23	92,50
10	161,36	90,99
11	96,23	93,91
12	270,85	91,75
13	138,28	92,30
14	115,21	87,06
15	193,92	91,97
16	204,95	92,18
17	232,13	92,90

Uočeno je kako je najviša antiradikalna aktivnost zabilježena u eksperimentu broj 3 s uvjetima ekstrakcije: omjer tekuće/kruto 1:400 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme 10 minuta. Pri navedenim uvjetima antiradikalna aktivnost je iznosila 94,93 %. Najniža antiradikalna aktivnost zabilježena je u eksperimentu broj 14 s procesnim uvjetima ekstrakcije: omjer tekuće/kruto 1:300 mL/g, frekvencija 40 Hz i vrijeme 15 minuta te je iznosila 87,06 %.

Najveći udio ukupnih fenola dobiven u eksperimentu broj 7 kod kojeg se ekstrakcija bioaktivnih spojeva primjenom VNEP provodila pri sljedećim uvjetima: omjer tekuće/kruto 1:400 mL/g, frekvencija 70 Hz i vremenu od 5 minuta, a udio fenola je određen s vrijednosti od 275,46 mg GAE/g. Najmanji udio ukupnih fenolnih tvari dobiven je u eksperimentu broj 11 (uvjeti ekstrakcije: omjer tekuće/kruto 1:200 mL/g, frekvencija 70 Hz i vrijeme od 15 minuta) te je određen udio fenola od 96,23 mg GAE/g.

4.2. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA I OPTIMIRANJE PROCESA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

Optimiranje procesa ekstrakcije i ispitivanje utjecaja procesnih parametara na ekstraktibilnost pojedinih komponenti primjenom VNEP tehnike provedena je metodom odzivnih površina (RSM metoda) te je primijenjen Box-Behnken plan pokusa. Promatran je utjecaj procesnih parametara na iskorištenje procesa ekstrakcije primjenom VNEP metode te na udio dva najzastupljenija bioflavonoida u analiziranoj kori mandarine, hesperidina i narirutina, koje ujedno predstavljaju zavisne varijable. U procesu ekstrakcije primjenom VNEP izabrane su tri nezavisne varijable: omjer tekuće/kruto (X_1 , mL/g), frekvencija (X_2 , Hz) i vrijeme ekstrakcije (X_3 , min). Provedeno je 17 eksperimenata prema Box-Behnken eksperimentalnom planu pokusa te su dobiveni rezultati eksperimenata aproksimirani matematičkim modelima odzivnih površina. Pomoću tih podataka se pokazuje adekvatnost modela za pojedini proces i kreiraju 3D prikazi utjecaja određenih procesnih parametara na proces ekstrakcije primjenom VNEP-a. Statistička analiza varijance (ANOVA) i numerička optimizacija o utjecaju procesnih parametara na ekstrakcijski proces provedena je primjenom programskog paketa *Design Expert*[®]. Analizom svakog pojedinog modela za zadane zavisne varijable uočeno je kako su svi modeli opisani kvadratnom funkcijom bez dodatnih matematičkih transformacija te su opisani u **Tablicama 6, 7, 8**. Također, dobiveni rezultati ukazuju na značajnost i primjenjivost predloženog matematičkog modela za ovaj ekstrakcijski postupak.

Značajnost procesnih parametara određuje se pomoću p -vrijednosti te p -vrijednosti manje od 0,05 upućuju na značajnost statističkih podataka. Takve vrijednosti ukazuju na značajnu vezu između nezavisnih i zavisnih (odziva) varijabli.

p -vrijednost:

- vrlo značajan podatak: $p < 0,01$
- značajan podatak: $0,01 < p < 0,05$
- neznačajan podatak: $p > 0,05$

Koeficijent determinacije R^2 indikator je povezanosti eksperimentalnih i predviđenih podataka uporabom Box-Behnken modela. Model je prihvatljiv ako koeficijent determinacije iznosi više od 0,80 (Joglekar i May, 1987).

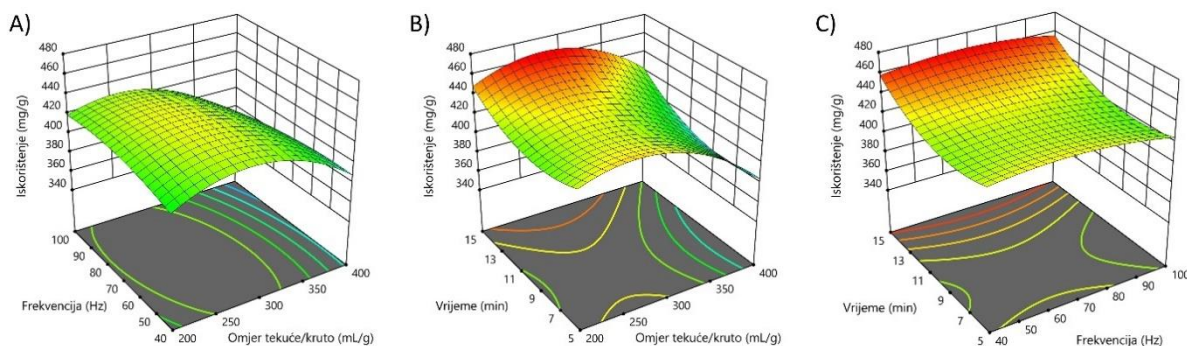
Prema **Tablici 6** uočeno je kako na iskorištenje procesa ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja najviše utječu i imaju statistički značaj procesni parametri omjer tekuće/kruto (X_1) čija p -vrijednost iznosi 0,0033 te vrijeme (X_3) čija p -vrijednost iznosi 0,012. Također, uočeno je kako su kvadratne vrijednosti omjera tekuće/kruto (iznos p -vrijednosti X_1^2 : 0,0012) i vremena (iznos p -vrijednosti X_3^2 : 0,015) statistički značajni podaci. Frekvencija (X_2) nema statistički značajan utjecaj na iskorištenje procesa ekstrakcije. Koeficijent determinacije za promatrani odziv iznosi $R^2=0,9110$ što ukazuje na prihvatljivost modela i odgovara eksperimentalnim i modelom predviđenim podacima.

Tablica 6 Analiza varijance (ANOVA) za iskorištenje procesa ekstrakcije primjenom VNEP

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f -vrijednost	p -vrijednost
Model	9482,48	9	1053,61	7,96	0,0061
X_1 – omjer tekuće/kruto	2534,36	1	2534,36	19,15	0,0033
X_2 - frekvencija	48,02	1	48,02	0,36	0,57
X_3 - vrijeme	1501,79	1	1501,79	11,35	0,012
X_1X_2	241,80	1	241,80	1,83	0,22
X_1X_3	113,53	1	113,53	0,86	0,39
X_2X_3	9,30	1	9,30	0,071	0,79
X_1^2	3593,08	1	3593,08	27,14	0,0012
X_2^2	253,86	1	253,86	1,92	0,21
X_3^2	1362,35	1	1362,35	10,29	0,015
OSTATAK	926,59	7	132,37		
NEDOSTATAK MODELA	345,56	3	115,19	0,79	0,56
POGREŠKA	581,03	4	145,26		
UKUPNO	10409,07	16			
R^2	0,9110				

Na **Slici 15** prikazan je 3D dijagram o utjecaju procesnih parametara X_1 i X_3 na zavisnu varijablu (iskorištenje). Procesni parametar omjera tekuće/kruto (X_1 ; mL/g) djeluje tako da se najbolje iskorištenje (u jedinici mg/g biljnog materijala) postiže u omjeru 1:300 mL/g zato što se omogućuje bolje prodiranje otapala kroz biljni materijal, a ujedno je poboljšan proces ekstrakcije. Povećanjem trajanja ekstrakcije, procesnog parametra vremena (X_3 ; min) omogućeno je bolje razaranje biljnog materijala kroz duže tretiranje uzorka, a ujedno i djeluje na povećanje iskorištenja. Nadalje, veći omjer tekuće/kruto (X_1 , mL/g) znači nižu električnu provodljivost pripremljene suspenzije. S obzirom da se pražnjenja odvijaju pri što nižoj

vodljivosti medija, to bi moglo upućivati da je pri većim omjerima tekuće/kruto bilo više pražnjenja, a samim time da je došlo do većeg oštećenja biljnih stanica i veće efikasnosti ekstrakcije uslijed češćih izboja (Banožić i sur., 2021).



Slika 15 3D dijagrami utjecaja ispitivanih procesnih parametara na odziv iskorištenja ekstrakcijskog procesa (Izvor: Autor)

Primjenom višestruke nelinearne regresijske analize dobivenih podataka dobivene su kvadratne polinomne jednadžbe pomoću kojih se opisuje model i omogućuje istraživanje utjecaja procesnih parametara (nezavisnih varijabli na određeni odziv – zavisne varijable). Poznato je kako apsolutna vrijednost nekog koeficijenta polinoma definira jačinu utjecaja toga koeficijenta na odziv te podatak o negativnom ili pozitivnom predznaku pojedinih koeficijenata upućuje na smanjenje ili povišenje vrijednosti odziva (Xu i sur., 2017).

Jednadžba modela za iskorištenje (5):

$$\begin{aligned} \text{Iskorištenje} = & 432,90 - 17,80X_1 - 2,45X_2 + 13,70X_3 - 7,78X_1X_2 + 5,33X_1X_3 + \\ & 1,53X_2X_3 - 29,21X_1^2 - 7,76X_2^2 + 17,99X_3^2 \end{aligned} \quad (5)$$

Prema **Tablici 7** uočeno je kako na odziv koncentracije hesperidina ekstrahiranog procesom ekstrakcije primjenom VNEP najviše utječe i ima statistički značaj procesni parametar omjera tekuće/kruto (X_1 , mL/g) čija p -vrijednost iznosi 0,0021. Također, uočeno je kako vrijeme i frekvencija djeluju sinergistički, čime se povećava udio hesperidina te odgovarajući procesni parametar X_2X_3 ima značajan statistički utjecaj (iznos p -vrijednosti za X_2X_3 : 0,032). Koeficijent determinacije za promatrani odziv iznosi $R^2=0,8442$ što ukazuje kako je model adekvatan za postupak ekstrakcije i odgovara eksperimentalnim i modelom predviđenim podacima.

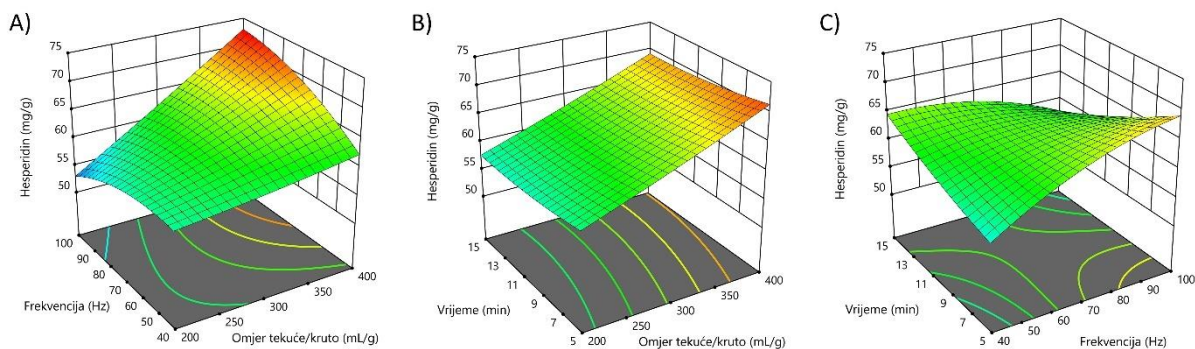
Tablica 7 Analiza varijance (ANOVA) za predviđanje odziva koncentracije hesperidina

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	476,55	9	52,95	4,22	0,036
X_1 – omjer tekuće/kruto	282,33	1	282,33	22,48	0,0021
X_2 - frekvencija	14,37	1	14,37	1,14	0,32
X_3 - vrijeme	6,26	1	6,26	0,50	0,50
X_1X_2	65,18	1	65,18	5,19	0,057
X_1X_3	0,12	1	0,12	0,0098	0,92
X_2X_3	89,63	1	89,63	7,14	0,032
X_1^2	0,27	1	0,27	0,021	0,89
X_2^2	17,46	1	17,46	1,39	0,28
X_3^2	1,56	1	1,56	0,12	0,73
OSTATAK	87,92	7	12,56		
NEDOSTATAK MODELA	26,16	3	8,72	0,56	0,67
POGREŠKA	61,76	4	15,44		
UKUPNO	564,46	16			
R^2	0,8442				

Na **Slici 16** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara na zavisnu varijablu (hesperidin). Procesni parametar omjera tekuće/kruto (X_1 ; mL/g) djeluje tako da se najviši udio hesperidina postiže u omjeru 1:400 ml/g.

Prema radu Šafranko i sur. (2021) ekstrakcija bioaktivnih spojeva, koji zaostaju u pogači nakon SC-CO₂ ekstrakcije, provodila se primjenom ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju te je uočeno kako na koncentraciju hesperidina utječe promjena procesnih parametara ekstrakcije: temperature, vremena i omjer tekuće/kruto. Najviše koncentracije hesperidina dobivene su provedbom ekstrakcije pri temperaturi od 175°C, vremenu od 5 min i omjeru tekuće/kruto 30ml/g. Povećanjem temperature ekstrakcije povećava se topljivost flavonona zato što se istovremeno smanjuje polarnost vode, a time se povećava koncentracija ekstrahiranog hesperidina i narirutina (Lachos-Perez i sur., 2018). No, ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja pripada u netermičku metodu koja svoju primjenu pronalazi u procesima kod kojih visoka temperatura nije poželjna (Mandal i sur., 2018). Također, s povišenjem omjera tekuće/kruto raste koncentracija ekstrahiranog hesperidina. Udio vode jedan od bitnijih faktora koji utječu na njegovu ekstrakciju čime je omogućen bolji prijenos mase i proces ekstrakcije (Bi i sur., 2013). Prema radu Jokić i sur. (2019), ekstrakcija

hesperidina iz različitih sorta mandarine provedena je uporabom eutektičkih otapala. U konačnici, optimalni uvjeti za ekstrakciju hesperidina iz sorte *Okitsu* određeni su u vremenu od 90 min, pri temperaturi od 68,14 °C i udjelu vode od 13,83 % primjenom eutektičnih otapala s udjelom hesperidina od 187,56 mg/g biljnog materijala.



Slika 16 3D dijagrami utjecaja ispitivanih procesnih parametara na odziv hesperidina (Izvor: Autor)

Jednadžba modela za hesperidin (6):

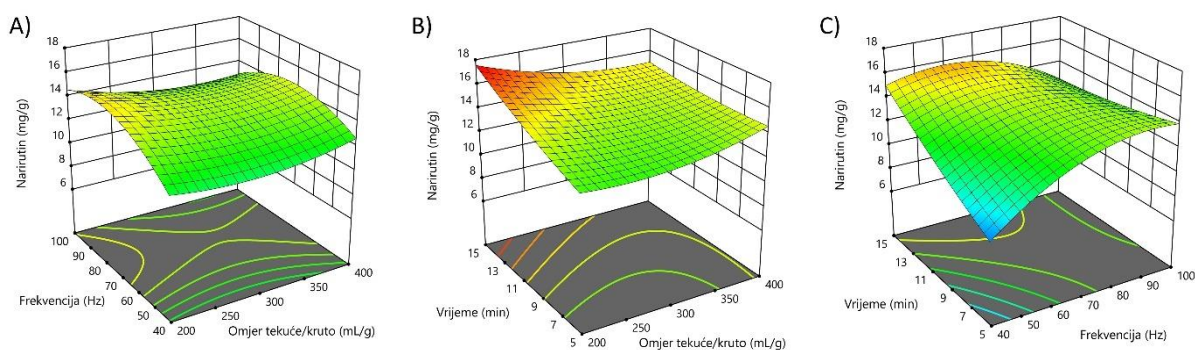
$$\begin{aligned} \text{Hesperidin} = & 63,45 + 5,94X_1 + 1,34X_2 - 0,8847X_3 + 4,04X_1X_2 - 0,175X_1X_3 - \\ & 4,73X_2X_3 + 0,2510X_1^2 - 2,04X_2^2 + 0,5096X_3^2 \end{aligned} \quad (6)$$

Prema **Tablici 8** uočeno je kako na odziv koncentracije narirutina ekstrahiranog procesom ekstrakcije primjenom VNEP najviše utječe i ima statistički značaj procesni parametar vremena (X_3) čija p -vrijednost iznosi 0,021. Također, uočeno je kako vrijeme i frekvencija djeluju sinergistički čime se povećava udio narirutina te procesni parametar X_2X_3 ima značajan statistički utjecaj (iznos p -vrijednosti za X_2X_3 : 0,013). Statistički značajan podatak je i kvadratna vrijednost frekvencije (X_2^2) čija p -vrijednost iznosi 0,017. Koeficijent determinacije za promatrani odziv iznosi $R^2=0,8449$ što ukazuje na adekvatnost modela sa zadovoljavajućim poklapanjem eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka.

Tablica 8 Analiza varijance (ANOVA) za predviđanje odziva koncentracije narirutina

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	51,8	9	5,76	4,24	0,035
X_1 – omjer tekuće/kruto	0,4965	1	0,4965	0,3654	0,565
X_2 - frekvencija	3,96	1	3,96	2,91	0,132
X_3 - vrijeme	12,07	1	12,07	8,89	0,021
X_1X_2	1,29	1	1,29	0,9476	0,363
X_1X_3	4	1	4	2,95	0,13
X_2X_3	14,81	1	14,81	10,9	0,013
X_1^2	2,47	1	2,47	1,82	0,22
X_2^2	13,08	1	13,08	9,63	0,017
X_3^2	0,2809	1	0,2809	0,2067	0,66
OSTATAK	9,51	7	1,36		
NEDOSTATAK MODELA	7,45	3	2,48	4,83	0,081
POGREŠKA	2,06	4	0,5141		
UKUPNO	61,31	16			
R^2	0,8449				

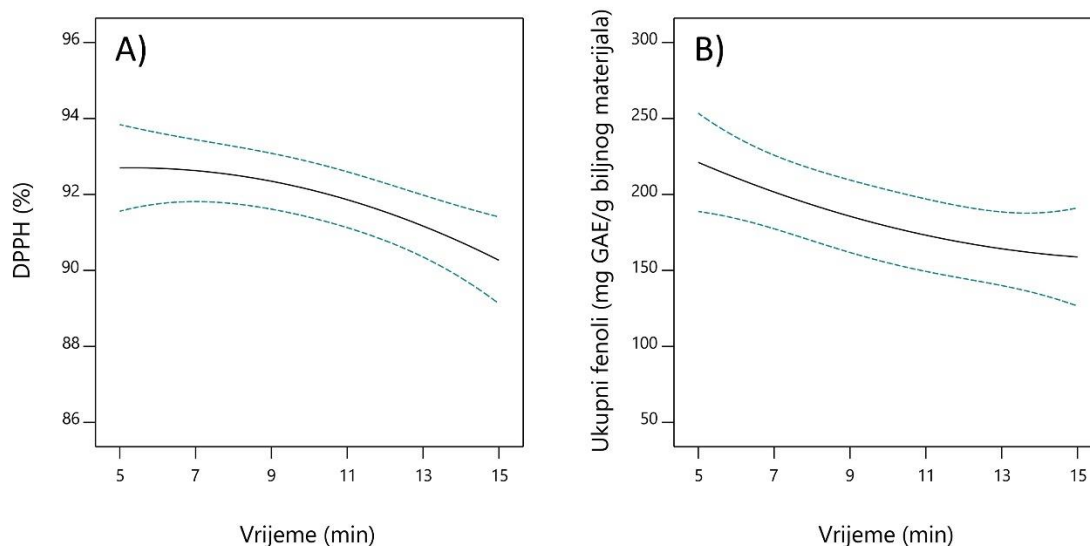
Na **Slici 17** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara na zavisnu varijablu (narirutin). Procesni parametar vremena (X_3 ; min) statistički je značajan i ima pozitivan učinak na ekstrakciju narirutina. Odnosno, uslijed duljeg izlaganja biljnog materijala VNEP dolazi do olakšanijeg razaranja stanične stijenke i lakše ekstrakcije fenolnih komponenti. Prema rezultatima ovog istraživanja, najviši udio narirutina dobiven je provedbom ekstrakcije u zadanim vremenu od maksimalnih 15 min što upućuje na slaganje sa zaključcima i istraživanjima prema radu Banožić i sur. (2021).



Slika 17 3D dijagrami utjecaja ispitivanih procesnih parametara na odziv narirutina (Izvor: autor)

Jednadžba modela za narirutin (7):

$$\begin{aligned} \text{Narirutin} = & 14,04 - 0,2491X_1 + 0,7034X_2 + 1,23X_3 - 0,5674X_1X_2 - 1,00X_1X_3 - \\ & 1,92X_2X_3 + 0,7659X_1^2 - 1,76X_2^2 + 0,2583X_3^2 \end{aligned} \quad (7)$$



Slika 18 Utjecaj procesnog parametra vremena na antiradikalnu aktivnost (A) i ukupne fenole (B) (Izvor: Autor)

Prema **Slici 18** vidljivo je kako utjecaj vremena ima negativan utjecaj na antiradikalnu aktivnost i udio ukupnih fenola u provedenim eksperimentima ekstrakcije potpomognute VNEP. Poznato je kako električno pražnjenje (izboj) pozitivno utječe na ekstrakciju polifenola, ali se električnim pražnjenjem omogućuje stvaranje hidroksilnih radikala prilikom fotodisocijacije vode (otapala) te se također pojavom oksidativnih kemijskih reakcija, javlja i smanjenje udjela ekstrahiranih polifenola (Bogomaz i sur., 1991). Smanjenja aktivnost slobodnih polifenola uzrokovana je reakcijom hidroksilnih radikala s fenolima što rezultira pojavom fenoksilnog radikala koji može nastati izravno djelovanjem UV svjetla generiranog električnim pražnjenjem u tekućini (Chen i sur., 2004).

Optimizacija ekstrakcijskog procesa predstavlja posljednji korak u metodi odzivnih površina. Optimizacija procesa najčešće se provodi uporabom metode koja je utemeljena na principu željene funkcije (engl. *Desirability function* – *D*). Promatrani odzivi (*y*) pretvaraju se u pojedinačne željene funkcije čija vrijednost može biti u rasponu od 0 do 1. Ukoliko je vrijednost pojedine željene funkcije 0, tada ta vrijednost predstavlja vrijednost koja nije odgovarajuća za promatrani odziv. No, ukoliko je vrijednost željene funkcije 1, tada nam ta vrijednost

predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv. Cilj ovog rada bio je istraživanje najboljih i optimalnih procesnih parametara ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem za maksimalni odziv. Promatran je utjecaj procesnih parametara: omjer tekuće/kruto, frekvencije i vremena na ostvarivanje maksimalne koncentracije dva najzastupljenija bioflavonoida – hesperidina i narirutina te maksimalno iskorištenje procesa ekstrakcije.

U **Tablici 9** prikazani su uvjeti ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem kojima se ostvaruje maksimalno iskorištenje procesa i kojom su ispunjeni poželjni uvjeti optimizacije. Optimalno iskorištenje procesa moguće je ostvariti pri procesnim parametrima: omjer tekuće/kruto 285,93 mL/g, frekvenciji od 73,38 Hz i vremenu od 14,84 min te je u tim uvjetima ukupna željena funkcija, D jednaka 1,000 (maksimalno). Pretpostavlja se da će predviđeno maksimalno iskorištenje u tim uvjetima iznositi 463,13 mg/g biljnog materijala.

Tablica 9 Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute VNEP za postizanje maksimalnog iskorištenja procesa

Uvjeti	Rezultat
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	285,93
Frekvencija (Hz)	73,38
Vrijeme ekstrakcije (min)	14,84
Predviđeno iskorištenje (mg/g biljnog materijala)	463,13
Ukupna željena funkcija (D)	1,000
Dobiveno eksperimentom	451,01 ± 24,03

U **Tablici 10** prikazani su uvjeti ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem u kojima se ostvaruje maksimalan udio hesperidina i kojom su ispunjeni poželjni uvjeti optimizacije. Ponovno, optimalni udio hesperidina moguće je ostvariti pri procesnim uvjetima od: omjer tekuće/kruto 366,19 mL/g, frekvenciji od 97,56 Hz i vremenu od 5,10 min željena funkcija jednaka 1,000 (maksimalno). Pretpostavlja se da će predviđeni maksimalni udio hesperidina u tim uvjetima iznositi 75,30 mg/g.

Tablica 10 Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute VNEP za postizanje maksimalnog udjela hesperidina

Uvjeti	Rezultat
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	366,19
Frekvencija (Hz)	97,56
Vrijeme ekstrakcije (min)	5,10
Predviđeni udio hesperidina (mg/g)	75,30
Ukupna željena funkcija (D)	1,000
Dobiveno eksperimentom	73,16 ± 4,73

U konačnici, u **Tablici 11** prikazani su optimalni uvjeti ekstrakcije za VNEP tehniku u kojima se ostvaruje maksimalan udio narirutina i kojom su ispunjeni poželjni uvjeti optimizacije. Pri sljedećim optimalnim procesnim parametrima (omjer tekuće/kruto 200 mL/g, frekvenciji od 70 Hz i vremenu od 15 min), ukupna željena funkcija iznosila je 1,000 (maksimalno). Pri tim uvjetima, predviđeni maksimalni udio narirutina iznosi 17,55 mg/g.

Tablica 11 Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute VNEP za postizanje maksimalnog udjela narirutina

Uvjeti	Rezultat
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	200
Frekvencija (Hz)	70
Vrijeme ekstrakcije (min)	15
Predviđeni udio narirutina (mg/g)	17,55
Ukupna željena funkcija (D)	1,000
Dobiveno eksperimentom	15,15 ± 1,53

Dobivene optimalne vrijednosti predviđene modelima dokazane su i potkrepljene eksperimentalno čime je dokazano kako su modeli prikladni za optimizaciju procesa ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem u rasponu pogreške od $\pm 10\%$ te su dobivene eksperimentalne vrijednosti izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Provedbom ekstrakcije bioaktivnih komponenti pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja (VNEP) iz kore mandarine (*Citrus unshiu* Marc.) sorte *Okitsu* primjenom različitih procesnih parametara (omjeru tekuće/kruto (1:200, 1:300, 1:400 mL/g), frekvenciji (40, 70, 100 Hz) i vremenu ekstrakcije (5, 10, 15 min)) dobiveni su ekstrakti bogati polifenolnim komponentama te se odabrani proces ekstrakcije pokazao adekvatan u provedenom istraživanju.
2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva i flavonoida koji su prisutni u dobivenim ekstraktima provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) te su identificirani polifenoli poput hesperidina, narirutina, rutina, kriptoklorogenske kiseline, kaemferol-3-rutinozida i neoklorogenske kiseline. Najzastupljeniji bioflavonoidi u dobivenim ekstraktima su hesperidin i narirutin. Maksimalan udio hesperidina u dobivenim ekstraktima iznosi 72,91 mg/g biljnog materijala, a maksimalan udio narirutina u dobivenim ekstraktima iznosi 17,39 mg/g biljnog materijala. Također, provedena je analiza određivanja antiradikalne aktivnosti i ukupnih fenola dobivenih ekstrakata spektrofotometrijskim metodama. Maksimalna vrijednost antiradikalne aktivnosti iznosi 94,93 %, a maksimalna vrijednost ukupnih fenola iznosi 275,46 mg GAE/g liofiliziranih kora mandarine.
3. Matematičkim modeliranjem i optimizacijom procesa pomoću metode odzivnih površina (RSM) provedena je analiza utjecaja pojedinih procesnih parametara na prinos ekstrakcije (iskorištenje) i dva najzastupljenija bioflavonoida (hesperidina i narirutina) u dobivenim ekstraktima.
4. RSM metodom određeno da je maksimalno moguće iskorištenje procesa pri danim uvjetima ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem ostvarivo kod procesnih parametara: omjer tekuće/kruto 285,93 mL/g, frekvenciji od 73,38 Hz i u vremenu od 14,84 min. Nadalje, maksimalan udio hesperidina moguće je ekstrahirati iz kore mandarine sorte *Okitsu* pri procesnim uvjetima ekstrakcije: omjer tekuće/kruto 366,19 mL/g, frekvenciji od 97,56 Hz i u vremenu od 5,10 min. Maksimalan udio narirutina moguće je ekstrahirati pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: omjer tekuće/kruto 200 mL/g,

frekvenciji od 70 Hz i u vremenu od 15 min. Predviđeni podaci eksperimentalno su potvrđeni s rasponom pogreške od $\pm 10\%$.

5. RSM metoda pokazala se iznimno učinkovita u optimizaciji procesa ekstrakcije polifenola iz kore mandarine sorte *Okitsu* potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem.

6. LITERATURA

- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa L.*) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2015.
- Aydar A: Statistical Methods in Optimization of Food Materials. *European International Journal of Science and Technology*, 8:33-40, 2019.
- Babić J, Jokić S, Strelec I, Jozinović A: Katalog opreme (Equipment catalouge), Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2021.
- Banga JR, Seider WD: Global optimization of chemical processes using stochastic algorithms. U State of the Art in Global Optimization (563-583), Springer-Verlag New York Inc., New York, 1996.
- Banožić M, Jozinović A, Grgić J, Miličević B, Jokić S: High Voltage Electric Discharge for Recovery of Chlorogenic Acid from Tobacco Waste. *Sustainability*, 13:4481, 2021.
- Barišić V, Flanjak I, Križić I, Jozinović A, Šubarić D, Babić J, Miličević B, Ačkar Đ: Impact of high-voltage electric discharge treatment on cocoa shell phenolic components and methylxanthines. *Journal of Food Process Engineering*, 43:e13057, 2021.
- Baş D, Boyacı İH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836–845, 2007.
- Batinović T: Uzgoj mandarine na području općina Metković i Opuzen. *Završni rad*. Agronomski fakultet, Zagreb, 2011.
- Berk Z: Citrus Fruit Processing. *Academic Press*, 9:261-274, ISBN 9780128031339, 2016.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:65–77, 2008.
- Bi W, Tian M, Row K H: Evaluation of alcohol based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography*, 1285:22-30, 2013.

- Blainski A, Lopes G, Palazzo de Mello J: Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18:6852-6865, 2013.
- Bogomaz AA, Goryachev VL, Remmenui AS, Rutberg PG: Efficiency of pulsed electric discharges in water disinfection. *Lett. J. Theor. Phys*, 17:65–68, 1991.
- Boussetta N, Lebovka N, Vorobiev E, Adenier H, Bedel-Cloutour C, Lanoiselle JL: Electrically assisted extraction of soluble matter from chardonnay grapeskins for polyphenol recovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1491–1497, 2009.
- Boussetta N, Vorobiev E, Reess T, De Ferron A, Pecastain L, Ruscassi R, Lanoiselle JL: Scaleup of high voltage electrical discharges for polyphenol extraction from grape pomace: Effect 6. LITERATURA 55 of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16:129–136, 2012.
- Boussetta N, Vorobiev E: Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: a review. *Comptes Rendus Chimie*, 17:197-203, 2014.
- Cheigh C, Chung E, Chung M: Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110:472-477, 2012.
- Chemat F, Vian M, Cravotto G: Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:8615–8627, 2012.
- Chen Y-S, Zhang X-S, Dai Y-C, Yuan W-K: Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 34:5–12, 2004.
- Cui Q, Liu J-Z, Wang L-T, Kang Y-F, Meng Y, Jiao J, Fu Y-J: Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184:826–835, 2018.

- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109:52-73, 2018.
- Devi KP, Rajavel T, Nabavi SF, Setzer WN, Ahmadi A, Mansouri K, Nabavi SM: Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Industrial Crops & Products*, 76:582-589, 2015.
- Drake VJ: *Vitamin C*. Linus Pauling Institute, Oregon State University, 2009.
<https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-C> [22.06.2021.]
- Ferenčić D, Gluhic D, Dudaš S: Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata Blanco, Citrus nobilis Lour*). *Glasnik zaštite bilja*, 39:46-52, 2016.
- Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandao GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597:179-186, 2007.
- Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A: Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15:655-669, 2001.
- Grgić J: Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2019.
- Herceg Z, Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Režek Jambrak A, Zorić Z, Dragović-Uzelac V: Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190:665-672, 2016.
- Jašić M: *Voće u Bosni i Hercegovini*, Tehnologija voća i povrća, Tehnološki fakultet, Tuzla, 2010.
<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/voce-u-bosni-i-hercegovini>
[18.06.2021.]
- Joglekar AM, May AT: Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32:857-868, 1987.

- Jokić S, Molnar M, Cikoš A, Jakovljević M, Šafranko S, Jerković I: Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO₂ extraction and ultrasound solvent extraction: optimization of limonene and hesperidin content. *Separation Science and Technology*, 55:2799-2811, 2019.
- Kedare S, Singh R: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48:412-422, 2011.
- Kolarević F: Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji hesperidina iz kora mandarina, *diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2020.
- Kose M, Bayraktar O: Valorization of Citrus Peel Waste. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4:10-18, 2018.
- Kudlak B, Owczarek K, Nemiński J: Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review. *Environmental Science Pollution Research*, 22:11975–11992, 2015.
- Lachos-Perez D, Basseggio AM, Mayanga-Torres PC, Marostica Junior MR, Rostagno MA, Martinez J, Forster-Carneiro T: Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138:7-16, 2018.
- Ledesma-Escobar C, Priego-Capote F, Leque de Castro M: Relevance and Analysis of Citrus Flavonoids. Polyphenols in Plants. *Academic Press*, 133-150, ISBN 9780128137697, 2019.
- Li Z, Fan Y, Xi J: Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry*, 277:246-260, 2019.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93:47-56, 2005.
- Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.

- Mahato N, Sinha M, Sharma K, Koteswararao R, Hwan Cho M: Modern Extracition and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods*, 8:523-604, 2019.
- Mandal R, Singh A, Pratap Singh A: Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 80:93-103, 2018.
- Marti N, Saura D, Fuentes E, Lizama V, Garcia E, Mico-Ballester MJ, Lorente J: Fiber from tangarine juice industry. *Industrial Crops and Products*, 33:94-98, 2011.
- Martić I, Oguić A: Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u izolaciji fenolnih spojeva bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i definiranje antioksidacijskog kapaciteta. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2018.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130:1036–1043, 2012.
- Moulehi I, Bourgou S, Ourghemmi I, Saidani Tounsi M: Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 1:74-80, 2012.
- Mustafa A, Turner C: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703:8-18, 2011.
- Myers RH, Montgomery DC: Response Surface Methodology. *Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, New York, NY, 1995.
- Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, Khodir M: Comparasion of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from Citrus Sinensis Peels. *Food Chemistry*, 187:507-516, 2015.
- Pankaj SK, Keener KM: Cold plasma processing of fruit juices. Fruit juices–Extraction, composition, quality and analysis (Rajauria, G., Tiwari, B. K., ured.), Elsevier Inc, Dublin, str. 529-537, 2018.

- Parniakov O, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Vorobiev E: Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high added value compounds from papaya peels. *Food Research International*, 65:337–343, 2014.
- Popović L, Vego D: Sortiment mandarine na području Opuzena. *Pomologia Croatica*, 16:3-4: 89-107, 2010.
- Prakash A: Antioxidant activity. *Med. Lab. Anal. Prog.*, 19:1–6, 2001.
- Rajha HN, Boussetta N, Louka N, Maroun RG, Vorobiev E: Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenolextraction from vine shoots. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31:60–66, 2015.
- Ramos L, Kristenson E M, Brinkman UT: Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975:3-29, 2002.
- Roohbakhsh A, Parhiz A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M: Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperitin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Science*, 124:64-74, 2015.
- Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR: Converting citrus wastes into value added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition*, 34:29-46, 2017.
- Sharma K, Mahato N, Lee YR: Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35:265-284, 2018.
- Šafranko S, Čorković I, Jerković I, Jakovljević M, Aladić K, Šubarić D, Jokić S: Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. *Kuno*): Phytochemical Analysis and Process Optimization. *Foods*, 10:1043, 2021.
- Thirumdas R, Sarangapani C, Annapure US: Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*, 10:1–11, 2014.

Wijngaard H, Hossain Mohammad B, Rai Dilip K, Brunton N: Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46:505–513, 2012.

Xu M, Shao Q, Ye S, Li S, Wu M, Ding M, Li Y: Simultaneous Extraction and Identification of Phenolic Compounds in *Anoectochilus roxburghii* Using Microwave-Assisted Extraction Combined with UPLC-Q-TOF-MS/MS and Their Antioxidant Activities. *Frontiers in Plant Science*, 8:1-11, 2017.

Zongming L, Yang F, Jun X: Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry*, 277:246–260, 2019.