

# Sekvencijalna ekstrakcija proteina i polifenola iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom ultrazvuka i ekstrakcije u subkritičnim uvjetima

---

Jelušić, Marija Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:542996>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



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

**Marija Magdalena Jelušić**

**SEKVENCIJALNA EKSTRAKCIJA PROTEINA I POLIFENOLA IZ TALOGA  
KAVE I LJUSKE CRVENOG LUKA PRIMJENOM ULTRAZVUKA I  
EKSTRAKCIJE U SUBKRITIČNIM UVJETIMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2023.

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

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Biokemija**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 27. svibnja 2022.**Mentor:** prof. dr. sc. *Ivica Strelec***Pomoć pri izradi:** *Mirna Brekalo*, mag. ing. techn. aliment.**Sekvencijalna ekstrakcija proteina i polifenola iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom ultrazvuka i ekstrakcije u subkritičnim uvjetima***Marija Magdalena Jelušić*, 0113143158

**Sažetak:** Ovim je diplomskim radom ispitana mogućnost ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom te ekstrakcijom u subkritičnim uvjetima, i to primjenom nekoliko različitih otapala. U prvom koraku je ispitan utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju pomoću 96 %, 75 %, 50 %, 25 % etanola i potom vode. Zatim je provedena stupnjevita ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom istim slijedom otapala, i potom kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija u subkritičnim uvjetima. Rezultati su pokazali da je najpogodnije otapalo za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave 25 % etanol, a iz ljuske crvenog luka 50 % etanol. Primjena sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije rezultirala je znatno većom količinom ekstrahiranih komponenti. Tako je iz taloga kave ekstrahirano duplo više polifenola i proteina, te jedna trećina više flavonoida, a iz ljuske crvenog luka duplo više flavonoida, te trećina više polifenola i proteina. Primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz taloga kave je u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju ekstrahirana veća količina polifenola i flavonoida, dok je količina ekstrahiranih proteina bila gotovo jednaka. S druge strane, primjena kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima ljuske crvenog luka rezultirala je podjednakom količinom ekstrahiranih flavonoida, te manjom količinom polifenola i proteina.

**Ključne riječi:** ljuska crvenog luka, talog kave, polifenoli, fenoli, flavonoidi, ekstrakcija**Rad sadrži:** 42 stranice  
25 slika  
2 tablica  
0 priloga  
51 literaturne reference**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i>        | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>         | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>       | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 14. rujna 2023.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Applied Chemistry and Ecology**  
**Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program of Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Biochemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no.VIII. held on May 27, 2022.

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

**Technical assistance:** *Mirna Brekalo*, mag. ing. techn. aliment.

### **Sequential Extraction of Proteins and Polyphenols from Spent Coffee Grounds and Brown Onion Skins Using Ultrasound-Assisted and Subcritical Extraction**

*Marija Magdalena Jelušić*, 0113143158

**Summary:** The possibility of extraction of polyphenols, flavonoids and proteins from spent coffee grounds (SCG) and brown onion skins (BOS) by ultrasound-assisted extraction (UAE) and extraction under subcritical conditions (SCE), using several solvents was examined. In the first step, the influence of solvent polarity on UAE was examined using 96%, 75%, 50%, 25% ethanol and water. In the next step, continuous UAE using the same solvents and sequential SCE were performed. The obtained results showed that 25% ethanol is the most suitable solvent for UAE of polyphenols, flavonoids and proteins from SCG, and 50% ethanol for BOS. Sequential UAE resulted with significantly higher amount of extracted components, with approximately double amount of polyphenols and proteins, and one third of flavonoids extracted from SCG, and double amount of flavonoids, and one third of polyphenols and proteins extracted from BOS. In comparison with continuous sequential UAE continuous sequential SCE ended with a greater amount of polyphenols and flavonoids extracted from SCG, while the amount of extracted proteins was almost the same. On the other hand, application of continuous sequential SCE of BOS resulted with same amount of extracted flavonoids, and lower amount of polyphenols and proteins.

**Key words:** *brown onion skin, spent coffee grounds, polyphenols, phenolics, flavonoids, extraction*

**Thesis contains:** 42 pages  
25 figures  
2 tables  
0 supplements  
51 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof.        | chair person  |
| 2. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.         | supervisor    |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, prof. | stand-in      |

**Defense date:** September 14, 2023

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

# Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....  | 3  |
| 2.1. Ekstrakcija .....  | 3  |
| 2.1.1. Subkritična ekstrakcija .....  | 4  |
| 2.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija .....  | 7  |
| 2.2. Talog kave .....   | 7  |
| 2.3 Ljuska crvenog luka .....   | 9  |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....   | 11 |
| 3.1 Zadatak.....  | 11 |
| 3.2 Materijali i metode.....  | 11 |
| 3.2.1 Uzorci .....  | 11 |
| 3.2.2 Kemikalije i reagensi .....   | 12 |
| 3.2.3 Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija taloga kave i ljuske crvenog luka .....  | 12 |
| 3.2.4 Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija taloga kave i ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima ....   | 13 |
| 3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola .....  | 13 |
| 3.2.6 Određivanje ukupnih flavonoida .....  | 14 |
| 3.2.7 Određivanje koncentracije proteina .....  | 14 |
| 3.2.8. Statistička obrada podataka .....  | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 16 |
| 4.1 Utjecaj polarosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka .....                            | 16 |
| 4.1.1. Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz taloga kave.....  | 17 |
| 4.1.2. Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju bioaktivnih komponentni iz ljuske crvenog luka .....  | 19 |
| 4.2 Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka .....   | 22 |
| 4.2.1. Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave .....   | 22 |
| 4.2.2. Sekvencijalna ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka .....   | 26 |
| 4.3 Utjecaj polarnosti otapala na kontinuiranu sekvencijalnu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima ..... | 30 |
| 4.3.1. Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave u subkritičnim uvjetima .....   | 30 |
| 4.3.2. Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima .....   | 34 |
| 5. ZAKLJUČCI .....  | 37 |
| 6. LITERATURA .....   | 38 |

# Zahvala

*Veliko hvala mom mentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu, mag. ing.techn.aliment Mirni Brekalo na pomoći i podršci tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pisanja diplomskog rada. Iznimno sam zahvalna za vrijeme koje su uložili, strpljenje, svakom savjetu koji su mi udijelili te prenesenom znanju.*

*Također želim zahvaliti i svojoj obitelji, prijateljima na nesebičnoj i neizmjernoj podršci tijekom cijelog školovanja i izradi ovog rada.*



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

# 1. UVOD

Moderna industrijska proizvodnja progresivno prati trend održivog razvoja sa težnjom na ekonomsko-ekološkoj odgovornosti. Upotreba i transformacija nastalog otpada postaje neizostavan smjer u proizvodnji i zbrinjavanju u prehrambenoj industriji. Među brojim otpadom nastalim u poljoprivredno-prehrambenoj industriji posebice se izdvajaju talog kave i ljuska crvenog luka. Talog kave je čvrsti ostatak koji nastaje nakon pripreme espresso ili turske kave u kućanstvima, kafićima i restoranima, ali isto tako u industriji proizvodnje instant napitaka od kave, pri čemu se se tijekom pripreme 1 L napitka/ektrakta kave producira 2 kg taloga kave kao otpada. Međutim, obzirom na kemijski sastav, talog kave predstavlja predstavlja potencijalnu sirovinu za proizvodnju visokovrijednih komponenti. Iz taloga kave mogu se ekstrahirati značajne količine zaostalih bioaktivnih komponenti među kojima se izdvajaju polifenoli, flavonodi i proteini. Shodno tome ekstrakti taloga kave pokazuju potencijal primjene u proizvodnji prehrambenih proizvoda i funkcionalnih dodataka prehrani, u proizvodnji lijekova i kozmetičkih proizvoda (Granados - Vallejo et al., 2019). S druge strane, ljuska crvenog luka je otpad koji nastaje tijekom kalibracije i pakiranja crvenog luka za prodaju u trgovačkim centrima. Otpadna ljuska crvenog luka ističe se kao visokovrijedna sirovina za daljnje iskorištenje zbog kemijskog sastava, koji uključuje visok udio prehrambenih vlakana, minerala, antioksidanasa, organo-sumpornih spojeva i dominantnog flavonola kvercetina. Prisutni flavonoidi i antocijani u ljusci crvenog luka primjenjuju se kao prirodna bojila pri proizvodnji širokog spektra prehrambenih proizvoda ili kao antioksidansi pri proizvodnji funkcionalne hrane (Sayes i sur., 2014; Kumar i sur., 2022.; Mourtzinis i sur., 2018).

Prilikom valorizacije otpada, nameću se zelene inovativne tehnologije poput ultrazvučne i subkritične ekstrakcije, čiji se procesi razlikuju ovisno o polaznoj matrici uzorka, parametrima i uvjetima ekstrakcije. U izolaciji bioaktivnih spojeva najčešće se koristi ultrazvučna ekstrakcija kao predtretman u inicijalnoj obradi uzorka, povećavajući krajnji prinos ekstrakcije i osiguravajući minimalnu potrebu za procesiranjem hrane (Vilkhu i sur., 2008). S druge strane, subkritična ekstrakcija kao tehnologija u nastajanju, nailazi na široku primjenu u prehrambenoj, biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji budući se njome mogu izolirati bioaktivni funkcionalni spojevi (Khajenoori i sur., 2009). Navedene se ekstrakcije sve češće



primjenjuju i na matricama taloga kave i ljuske crvenoga luka kao nusproizvoda poljoprivredno-prehrambene industrije.

Ovim je diplomskim radom provedeno istraživanje kojem je cilj bio ispitati mogućnosti i primjenu ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka ultrazvučnom i kontinuiranom subkritičnom sekvencijalnom ekstrakcijom, uz istovremenu primjenu nekoliko različitih otapala.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od osnovnih metoda koja se koristi za izolaciju spojeva iz krute smjese ili suspenzije. Uključuje postupak u kojem se djelomično ili potpuno razdvajaju komponente smjese tvari različite topivosti, tijekom kojeg se željena komponenta ekstrahira otapalom selektivnim za tu tvar (Tomas i sur. 2013).

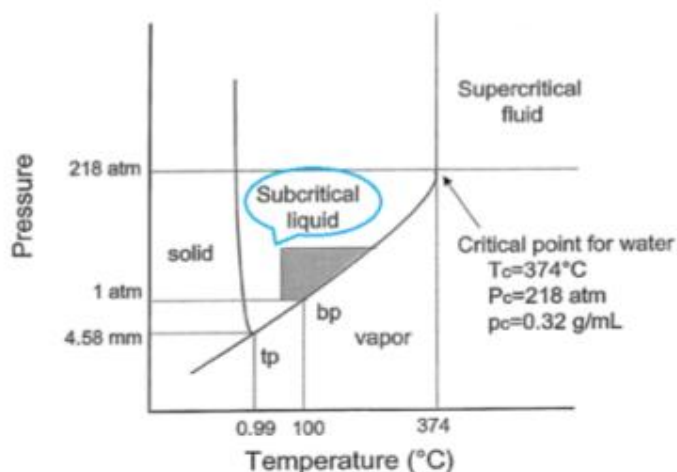
U ovisnosti od polazne faze razlikuju se dva tipa ekstrakcije:

1. **Ekstrakcija kruto – tekuće** (ekstrakcija otapalom, izluživanje) – prijenos tvari odvija se iz krute u tekuću fazu. Najčešća primjena kruto-tekuće ekstrakcije je u izolaciji bioaktivnih tvari, primjerice iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije prilikom izolacije fenolnih i ostalih antioksidativnih produkata (Bucić-Kojić, 2008), hidrometalurškoj industriji pri izluživanju metala iz ruda (Hoda i sur., 2009) i farmaceutske industriji pri ekstrakciji eteričnih ulja (Kosir, 2017).
2. **Ekstrakcija tekuće – tekuće (ekstrakcija u užem smislu)** - prijenos tvari provodi se iz tekuće u tekuću fazu. Ova vrsta ekstrakcije ima široku primjenu te se u laboratorijskim uvjetima provodi u lijevcima za odjeljivanje. U industrijskom mjerilu metoda se provodi u kolonama koje su napunjene prokapnim tijelima sa širokim porama u kojima se ciljana tvar ekstrahira iz tekuće smjese pomoću određenog otapala s kojim čini disperzni sustav. Unutar disperznog sustava, raspodijeljena tvar se naziva disperzna tvar, a faza u kojoj se vrši dispergiranje kontinuirana faza. Cilj ove vrste ekstrakcije je razdvojiti nastali disperzni sustav, što se postiže razlikom u gustoći faza (Mujić i Jokić, 2018).

Karakterističan proces ekstrakcije direktno ovisi o sastavu i pripremi polaznog materijala iz kojeg se ekstrahira određena komponenta. Parametri procesa ekstrakcije koji određuju učinkovitost su: temperatura, veličina čestica, tlak, protok, vrijeme provedbe ekstrakcije te omjer krute i tekuće faze (Bucić-Kojić, 2008).

### 2.1.1. Subkritična ekstrakcija

Metoda ekstrakcije koju karakterizira subkritično termodinamičko područje djelovanja vode i ostalih otapala odnoseći se na „skoro kritično“ ili „kritično područje“ naziva se subkritična ekstrakcija. Za razliku od konvencionalnih metoda ekstrakcije subkritična je ekstrakcija brža i jeftinija metoda ekstrakcije, kojom se koriste manje opasna otapala i koja daje manje krajnjih nusprodukata (Khajenoori i sur., 2009). Subkritičnu ekstrakciju vodom karakterizira temperatura između 100 °C (vrelisšte vode) i 374 °C na kojoj je kritična točka vode uz tlak dovoljno visoka za održavanja vode u tekućoj fazi (1 – 221,1 MPa) što je prikazano **Slikom 1**. Povećanjem temperature se smanjuje dielektrična konstantna, povećava brzina difuzije, uz istovremenu smanjenje viskoznosti i površinske napetosti (Smith i sur., 2006).



**Slika 1** Fazni dijagram vode u ovisnosti o temperaturi i tlaku (Haghighi i sur. 2013)

Na **slici 1**. prikazan je fazni dijagram vode kao funkcija temperature i tlaka, predstavljajući teorijsku osnovu subkritične vodene ekstrakcije. Jedinstveno svojstvo vode je da je polarno otapalo pri atmosferskim uvjetima jer posjeduje veliku kohezijsku silu te preko atoma kisika ima četiri spojna mjesta. Shodno navedenom, voda kroz vodikove veze i dipolne interakcije može otopiti polarne analite u okolišnim uvjetima (Chakraborty i sur., 2020). Povećanjem temperature vode slabe vodikove veze uslijed čega se smanjuje dielektrična konstantna vode, što posljedično poboljšava prijenos mase. Pri sobnoj temperaturi dielektrična konstanta vode iznosi 80, dok pri 250 °C dielektrična konstanta vode iznosi 27 što je približno jednako dielektričnoj konstanti etanola pri sobnoj temperaturi (Zhang i sur., 2020, Shahid i sur., 2018). Isto tako, povećanjem temperature vode smanjuje se polaritet, što dovodi do povećanja

topljivosti hidrofobnih organskih spojeva u vodi (Yulianto i sur., 2020, Mao i sur., 2020). Ekstrakcija u subkritičnim uvjetima slijedi pravilo da se slično otapa u sličnom, tj. manje polaran analit zahtijeva veće temperature ekstrakcije (Yulianto i sur., 2020, Vladić i sur., 2020). Subkritična tekućina nalikuje plinu, poprima oblik spremnika u kojem se nalazi, pri čemu je gustoća i moć otapanja veća od klasične jer se tekućina komprimira više od svog kritičnog tlaka (Mao i sur., 2020). Povećanje tlaka djeluje na smanjenje entropije u molekuli, a povećanje temperature na povećanje entropije u istoj. Zbog navedenog, tijekom subkritične ekstrakcije dolazi do manipulacije gustoćom, difuzijom i topljivosti otapala (Shitu i sur., 2015). Smanjanjem viskoznosti i površinske napetosti povećava se difuzivnost olakšavajući bolje otapanje analita (Kataoka i sur., 2008).

Subkritična ekstrakcija uključuje 6 koraka koji se provode navedenim slijedom, a najsporiji korak određuje brzinu ekstrakcije:

1. Prijelaz otopljene tvari iz krute u tekuću fazu kroz granicu čvrsto-tekuće,
2. Desorpcija otopljenih tvari s aktivnih mjesta na matrici,
3. Difuzija otopljenih tvari kroz organski spoj,
4. Difuzija otopljenih tvari kroz statički fluid u poroznim materijalima
5. Difuzija otopljenih tvari kroz sloj ustajale tekućine vanjske čestice
6. Eluiranje otopljenih tvari volumenom tekućine (Haghighi i sur., 2013).

Ključni čimbenici koji utječu na subkritičnu ekstrakciju su: temperatura, vrsta otapala, veličina čestica, brzina protoka otapala, te vrijeme ekstrakcije.

Temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija jedan je od ključnih parametara pri provedbi ekstrakcije. Uslijed povećanja temperature pospješuje se ekstrakcija direktnim smanjenjem viskoznosti otapala i propusnosti staničnih membrana. Posljedičnim povećanjem topljivosti većine tvari dolazi i zbog boljeg prijenosa tvari iz otopine (difuzija) (Bucić-Kojić, 2008). Primjerice, voda kao otapalo promjenom temperature mijenja fizikalno-kemijske karakteristike (Zhang i sur., 2020). Pri tome se treba naglasiti da zbog termoosjetljive prirode bioaktivnih spojeva može doći do gubitaka biološke aktivnosti analita od interesa, te je potrebna optimizacija temperature na način da učinkovitost procesa bude maksimalna, a gubitak biološke aktivnosti analita minimalan (Rot, 2015). Štoviše, povećanjem temperature iznad optimalne, pospješuje se mogućnost degradacije vrijednih komponenata (Khajenoori i sur., 2009).

Odabir otapala jedan je od presudnih koraka za učinkovitu ekstrakciju. Otapalo treba biti selektivno za tvar koja se ekstrahira. Primjenjuje se pravilo "slično se otapa u sličnom" gdje su polarne tvari topljive u polarnim otapalima, a nepolarne u nepolarnim otapalima. Zbog navedenog, iznimno je bitno poznavati kemijski sastav tvari koje se ekstrahiraju. Poželjno je da je otapalo stabilno i inertno tijekom ekstrakcije i da ima nižu točku vrelišta, koja osigurava lakše i brže isparavanje tijekom naknadnog koncentriranja ekstrakta (Mujić i Jokić, 2018).

Veličina čestica bitna je zbog ekonomičnosti procesa ekstrakcije, stoga je neophodno odrediti optimalnu veličinu čestica inicijalnog uzorka prije ekstrakcije. Idealan ekstrakcijski materijal mora biti usitnjen do ujednačene granulacije. Mala veličina čestica povećava prinos i kontakt s otapalom, dok velike čestice uzrokuju nizak prinos, manju gustoću, veću poroznost i produženo vrijeme ekstrakcije. S obzirom da usitnjavanje zahtijeva određenu količinu energije, potrebno je pronaći kompromis u pogledu ekonomičnosti procesa. Usitnjavanje na ujednačenu granulaciju koristi se i u obradi nusproizvoda prehrambene industrije koji su često djelomično usitnjeni ili neusitnjeni (Bucić-Kojić, 2008; Chakraborty i sur., 2020).

Vrijeme ekstrakcije jedan je od parametara koji može utjecati na kvalitetu krajnjeg željenog produkta ekstrakcije. Naime, postoji mogućnost da se bioaktivne komponente tijekom dugog vremena izlaganja visokoj temperaturi razgrade i/ili denaturiraju. Vrijeme ekstrakcije ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi, dodirnoj površini komponente i viskoznosti otapala (Drmić, 2010).

Protok otapala pri kojem se provodi ekstrakcija, ukoliko se poveća, ne podrazumijeva nužno i povećanje prinosa ekstrakcije. Povećanim prodiranjem otapala u matricu dolazi do pojačane difuzije otopljene tvari u otapalo, što za posljedicu ima prisilni konvektivni prijenos mase u medij (Haghighi i Khajenoori, 2013, Zhang i sur., 2020). Povećanjem protoka povećava se brži prijenos mase i površinske brzine, što povećava volumen ekstrakta. Takav način zahtjeva i dodatno koncentriranje ekstrakta (Chakraborty i sur., 2020).

Uz sve gore navedeno, potrebno je i napomenuti da tlak nema značajan učinak na efikasnost i prinos ekstrakcije. Uloga optimalnog tlaka u procesu ekstrakcije je održavanje otapala u tekućem stanju (Cheng i sur., 2021). Tlak od 15 bara pri 200 °C i tlak od 85 bara pri 300 °C optimalni su tlakovi za održavanje tekućeg stanja vode kao otapala (Zhang i sur., 2020, Getachew i sur., 2018).

### **2.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvuk posjeduje iznimnu snagu ekstrakcije zbog kavitacije na staničnu stijenkku materijala omogućavajući bolje prodiranje otapala u materijal i posljedično povećanje prijenosa mase. Izravni kontakt se ostvaruje prilikom puknuća stanične stijenke što ima za posljedicu poboljšanje procesa ekstrakcije i njeno ubrzavanje (Vinatoru, 2001). Primjena ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UAE; eng. *Ultrasound-Assisted Extraction*) je sve učestalija u industriji jer omogućava povećan prinos ekstrahiranih tvari ukoliko se ultrazvuk koristi kao predtretman. Općenito gledano sa stajališta industrije, UAE se često primjenjuje u procesima koji zahtjevaju minimalno procesiranje i primjenu u vodenoj sredini, koja omogućava da se organska otapala zamjene sa otapalima koja su priznata kao sigurna (GRAS). Na taj se način smanjuje upotreba količina otapala potencijalno štetnog za ljude i okoliš te redukcija vremena potrebnog za provođenje ekstrakcije čime proces ekstrakcije postaje ekonomičniji. Djelovanje ultrazvuka na staničnu stijenkku biljke mehanički je proces koji dovodi do njenog oštećenja, poboljšavajući prijenos mase, istovremeno olakšavajući pristup otapala staničnom sadržaju biljke. Prema mnogobrojnim istraživanjima dokazano je da je ultrazvuk učinkovitiji prilikom uporabe nižih frekvencija, konkretno od 18-40 kHz. Isto tako, dokazano je da je njegova učinkovitost zanemariva u rasponu od 400-800 kHz, jer pri nižim frekvencijama dolazi do povećane kavitacije koja se očituje u obliku turbulencije i strujanja tekućine (Vilkhu i sur., 2008).

### **2.2. Talog kave**

Kava, jedan je od napitaka čija je konzumacija široko rasprostranjena zbog izrazito stimulativnog i osvježavajućeg učinka (Mussatto i sur, 2011). Pripada porodici *Coffeae*, a od stotina vrsta samo su dvije vrste agroekonomski važne: *Coffea arabica* i *Coffea canephora* (Batista i sur, 2020). Vlažni talog kave (Slika 1) je najzastupljeniji nusprodukt (45 %) prilikom pripreme napitaka od kave, a nastaje preljevanjem mljevenih zrna kave s vrućom vodom ili vodenom parom prilikom pripreme instant kave (Murthy i Naidu, 2012.). Prema studiji Murthy i Naidu (2012) za svaki 1 kg zrna kave koji se koriste za proizvodnju napitka, dobije se oko 2 kg mokrog taloga kave. Međutim, mnogobrojni autori napominju da količina otpada može varirati ovisno o vrsti kave, načinu proizvodnje i drugim čimbenicima. Tako Mussatto i suradnici (2011) navode da se tijekom procesa proizvodnje kave može generirati 45 – 60 % otpada u odnosu na masu sirove kave.



**Slika 2** Talog kave

Talog kave se i u današnje vrijeme još uvijek zbrinjava kao komunalni ili biootpad. Međutim, zbrinjavanje na odlagalištima, dovodi do zagađenja okoliša i financijskog opterećenja industrije. Stoga postoji potreba za njegovim iskorištenjem. Jedan od najjednostavnijih načina je korištenje taloga kave za kompostiranje. U ovom se slučaju talog kave miješa sa organskim otpadom, stvarajući hranjivo tlo za biljke zbog iznimnih udjela dušika, kalija i fosfora u sastavu (Karemee, 2018; Campos-Vega i sur., 2015).

Međutim, uzme li se u obzir kemijski sastav taloga kave (**Tablica 1**), tada je uočljivo da isti predstavlja izvor čitavog niza visokovrijednih bioaktivnih komponenti.

**Tablica 1** Kemijski sastav taloga kave (ImoLipWaste, 2023)

| Parametar                                    | Talog kave   |
|--|--------------|
| <b>Suha tvar [g/100 g]</b>                   | 39,88 ± 0,75 |
| <b>Ukupni proteini [g/100 g s.t.]</b>        | 16,68 ± 0,06 |
| <b>Ukupne masti [g/100 g s.t.]</b>           | 10,58 ± 1,63 |
| <b>Sirova vlakna [g/100 g s.t.]</b>          | 29,86 ± 3,13 |
| <b>Sirova vlakna (NDF) [g/100 g s.t.]</b>    | 58,73 ± 1,31 |
| <i>Celuloza (ADF-ADL) [g/100 g s.t.]</i>     | 23,59 ± 0,15 |
| <i>Hemiceluloza (NDF-ADF) [g/100 g s.t.]</i> | 23,35 ± 1,51 |
| <i>Lignin (ADL) [g/100 g s.t.]</i>           | 11,79 ± 0,35 |
| <b>Ukupni polifenoli [g/100 g s.t.]</b>      | 2,88 ± 0,40  |
| <b>Ukupni flavonoidi [g/100 g s.t.]</b>      | 1,98 ± 0,13  |
| <b>Pepeo [g/100 g s.t.]</b>                  | 1,80 ± 0,03  |

Iako kemijski sastav taloga kave ovisi o sorti, načinu pripreme i ostalim čimbenicima, za talog kave je karakterističan visok udio bioaktivnih tvari poput kofeina, antioksidanasa, vlakana, proteina i hlapljivih kiselina među kojim je kofein glavna komponenta. Zbog visokog udjela bioaktivnih spojeva moguće ga je iskoristiti u proizvodnji funkcionalnih dodataka prehrani i prehrambenih proizvoda, lijekova te brojnih kozmetičkih proizvoda (Granados - Vallejo i sur., 2019). S druge strane, talog kave se može iskoristiti za proizvodnju biogoriva (Uddin i sur., 2019).

### 2.3 Ljuska crvenog luka

Luk (*Allium Cepa L.*) često je korištena namirnica čijom preradom nastaju nusproizvodi koji nakon proizvodnje i industrijske prerade završavaju na otpadu, značajno ekološki opterećujući industriju i okoliš. Pri tome tijekom prerade luka nastaju otpadna biomasa i ljuska crvenoga luka. Otpadna biomasa luka koja nastaje tijekom prerade luka predstavlja problem prilikom konvencionalnog zbrinjavanja kao biootpad, zbog prisutnog specifičnog mirisa i moguće toksičnosti uzrokovane nastalim fitopatogenima. Stoga se ne može koristiti kao stočna hrana. Sekundarni način odlaganja, kompostiranjem, nije prihvatljiv budući postoji velika vjerojatnost nastanka bijele truleži obzirom na visok sadržaja sumpora u luku. Stoga trenutno odlaganje biomase luka spaljivanjem, predstavlja veliki energetska i ekonomski trošak u industriji (Jaime i sur., 2002; Benítez i sur., 2011).

Sukladno tome, inovativne tehnike obrade i iscrpljivanja otpadne biomase luka dobivaju sve više na važnosti, pri čemu se proizvodi s dodanom vrijednošću izvorno izolirani iz biomase luka mogu koristiti kao izvor funkcionalnih komponenti. U prilog tome govore i brojni literaturni navodi (Stjepanović i sur., 2022; Mitra i sur., 2012; El- Din i sur., 2014). Tako se otpadna biomasa luka ističe kao visokovrijedna sirovina za daljnje iskorištenje budući sadrži visok udio prehrambenih vlakana, minerala, antioksidanasa, organo-sumpornih spojeva i dominantnog flavonola kvercetina. S druge strane, ljuska crvenoga luka (**Slika 3**), sadrži korisne spojeve poput flavonoida, antocijana i polifenola, koji pridonose antioksidacijskim, antibakterijskim i protuupalnim svojstvima, što čini ljusku crvenog luka vrijednom sirovinom u industrijama kao što su prehrambena, kozmetička i farmaceutska industrija. Pri tome se flavonoidi i antocijani prisutni u ljusci crvenog luka mogu koristiti kao prirodna bojila i antioksidansi pri proizvodnji raznih prehrambenih proizvoda i proizvodnji funkcionalne hrane (El-Din i sur., 2014; Kumar i



sur., 2022.; Mourtzinou i sur., 2018). U prilog tomu govore i podaci istraživanja provedenih u sklopu ImoLipWaste projekta (Tablica 2).



Slika 3 Ljuska crvenog luka

Tablica 2 Kemijski sastav ljuske crvenog luka (ImoLipWaste, 2023)

| Parametar                                    | Ljuska crvenog luka |
|--|---------------------|
| Suha tvar [g/100 g]                          | 82,08 ± 0,16        |
| Ukupni proteini [g/100 g s.t.]               | 2,82 ± 0,03         |
| Ukupne masti [g/100 g s.t.]                  | 1,26 ± 0,30         |
| Sirova vlakna [g/100 g s.t.]                 | 34,41 ± 1,50        |
| Sirova vlakna (NDF) [g/100 g s.t.]           | 41,63 ± 1,84        |
| <i>Celuloza (ADF-ADL) [g/100 g s.t.]</i>     | 37,48 ± 0,34        |
| <i>Hemiceluloza (NDF-ADF) [g/100 g s.t.]</i> | 2,53 ± 1,46         |
| <i>Lignin (ADL) [g/100 g s.t.]</i>           | 1,62 ± 0,03         |
| Ukupni polifenoli [g/100 g s.t.]             | 5,59 ± 0,26         |
| Ukupni flavonoidi [g/100 g s.t.]             | 4,34 ± 0,35         |
| Pepeo [g/100 g s.t.]                         | 9,98 ± 0,51         |

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati mogućnost ekstrakcije proteina, polifenola i flavonoida iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom dvije (2) različite ekstrakcijske tehnike: ultrazvukom potpomognute ekstrakcije te ekstrakcije u subkritičnim uvjetima primjenom nekoliko različitih otapala slijedeći trend „od manje ka više polarnom“. U prvom koraku su talog kave i ljuska crvenog luka podvrgnuti ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji pomoću 96 %, 75 %, 50 % i 25 % etanola ili vode kako bi se dobio uvid u kojem se od navedenih otapala postiže maksimalna ekstrakcija polifenola, flavonoida i proteina. U drugom koraku su talog kave i ljuska crvenog luka podvrgnuti sekvencijalnoj (*stupnjevitaj*) ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom pomoću gore navedenih otapala kako bi se dobio uvid u količinu ekstrahiranih polifenola, flavonoida i proteina. Na temelju dobivenih rezultata jednostruke i sekvencijalne ekstrakcije potpomognute ultrazvukom odabrana su otapala za sekvencijalnu ekstrakciju u subkritičnim uvjetima, te je na talogu kave i ljuski crvenog luka provedena kontinuirana ekstrakcija u subkritičnim uvjetima. Na temelju analize udjela proteina, polifenola i flavonoida prisutnih u ekstraktima nakon sekvencijalne ultrazvukom potpomognute ekstrakcije te sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima ustanovljeno je koja je od ekstrakcijskih tehnika pogodnija za ekstrakciju proteina, a koja za ekstrakciju polifenola i flavonoida.

### 3.2 Materijali i metode

#### 3.2.1 Uzorci

Talog kave zaostao nakon pripreme espresso kave dobavljen iz lokalnog kafića s područja grada Osijeka, sušen 24 h pri 60 °C je odmašćen *n*-heksanom (SoxROC Extractor, Opsis Liquidline, Švedska) i nakon sušenja 3 h pri 60 °C korišten je za ekstrakciju.

Ljuska crvenog luka iz proizvodnje pakiranog i svježeg luka dobavljena je od tvrtke Enna Fruit d.o.o. Hrvatska. Nakon mljevenja na veličinu čestica 2-5 cm (Albrigi Luigi, s.r.l., Italija), usitnjena ljuska crvenog luka je isprana s vodovodnom vodom u svrhu uklanjanja nečistoća i potom sušena u tankom sloju pri 60 °C tijekom 24 h. Osušena ljuska crvenog luka potom je

mljevena na veličinu čestica od 0,5 mm laboratorijskim mlinom IKA MF 10.1 (IKA, Njemačka) i tako usitnjena korištena za ekstrakcije.

### **3.2.2 Kemikalije i reagensi**

U ovom radu su korištene sljedeće kemikalije i reagensi: 96 % etanol tvrtke Kefo (Slovenija) Folin-Ciocalteu reagens tvrtke CPA chem (Bugarska), Bradford reagens proizvođača Bio-Rad (Njemačka), galna kiselina tvrtka Aldrich (SAD), BSA tvrtke Merck (Njemačka), natrijev nitrit i natrijev hidroksid tvrtke Kemika (Zagreb), natrijev karbonat tvrtke Gram mol (Hrvatska), te kvercetin i aluminijski klorid dobavljen od Acros Organics (Belgija).

### **3.2.3 Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija taloga kave i ljuske crvenog luka**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je provođena na dva načina. U prvom načinu je ispitan utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka pri čemu su se kao ekstrakcijska otapala koristili 96 %, 75 %, 50 % i 25 % etanol i voda, slijedeći trend od manje ka više polarnom. U drugom slučaju je ispitan utjecaj sekvencijalne (stupnjevite) ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na izdvajanje bioaktivnih komponenti taloga kave i ljuske crvenog luka, pri čemu je slijed otapala u stupnjevitoj ekstrakciji bio isti gore navedenom.

Postupak ekstrakcije baziran na utjecaju polarnosti otapala provođen je kako slijedi. Masi od 0,5 g odmašćene kave ili mljevene ljuske crvenog luka granulacije 0,5 mm u plastičnoj epruveti konusnog dna volumena 50 mL sa navojnim čepom dodano je 20 mL otapala (96 %, 75 %, 50 % i 25 % etanol i voda), smjesa je kratko homogenizirana vorteksiranjem 30 sekundi i potom postavljena na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju u vodenu kupelj Bandelin Sonorex (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Njemačka) pri 25 °C tijekom 20 minuta uz povremenu homogenizaciju suspenzije svake 2,5 minute inverzijom. Po isteku vremena ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem u centrifugi Sigma 2-5 (Sigma, Njemačka) tijekom 10 minuta pri 3900 obrtaja/min, bistrom ekstraktu odvojenom dekantiranjem je izmjeren volumen da bi potom bistri ekstrakt bio korišten za određivanje koncentracije ekstrahiranih polifenola, flavonoida i proteina.

Postupak sekvencijalne ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave provođen je na sličan način, ali uz slijednu ekstrakciju istog uzorka otapalom slijedeći pravilo od manje ka više polarnom (96 % etanol; 75 % etanol; 50 % etanol; 25 % etanol, voda). U prvom koraku

masi od 0,5 g odmašćenog taloga kave ili mljevene ljuske crvenog luka dodano je 20 mL 96 % etanola, smjesa je kratko homogenizirana vorteksiranjem 30 sekundi i potom postavljena na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju u vodenu kupelj Bandelin Sonorex pri 25 °C tijekom 20 minuta uz povremenu homogenizaciju suspenzije svake 2,5 minute inverzijom. Po isteku vremena ekstrakt je izbistren centrifugiranjem u centrifugi Sigma 2-5 (Sigma, Njemačka) tijekom 10 minuta pri 3900 obrtaja/min, odekantiran, izmjeren mu je volumen, te je korišten za analizu polifenola, flavonoida i proteina, dok je talogu u plastičnoj epruveti dodano sljedeće otapalo i gore opisani postupak ekstrakcije i izdvajanja ekstrakata proveden na isti način.

### **3.2.4 Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija taloga kave i ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima**

Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija taloga kave i ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima provedena je primjenom tri otapala sljedeći pravilo od manje ka više polarnom. Pri tome su kao otapala u slijedu korišteni: 96 % etanol, 50 % etanol i na kraju voda, a uvjeti subkritične ekstrakcije su bili: a) omjer mase uzorka i volumena otapala 1:20, b) temperatura ekstrakcije 100 °C, te c) protok otapala od 40 mL/min.

Sam postupak ekstrakcije proveden je kako slijedi. U cilindar uređaja za subkritičnu ekstrakciju postavljeno je između 130-140 g taloga kave ili mljevene ljuske crvenog luka jednoliko raspoređenih u filter vrećice za čaj Profissimo (DM-drogerie markt d.o.o., Hrvatska), cilindar je hermetički zatvoren, postavljen u termostatiranu komoru i potom je u cilindar s donje strane uvedeno prethodno zagrijano otapalo pod tlakom od 100 bara, te je proces ekstrakcije otapalom proveden uz protok od 40 mL/min sve dok nije potrošen sav volumen željenog otapala. Nakon toga je kroz cilindar sa uzorkom provedeno sljedeće otapalo u nizu, pri čemu je zadnje otapalo u nizu bila voda.

Ekstraktima prikupljenim subkritičnom ekstrakcijom izmjereni su volumeni, i potom su ekstrakti korišteni su za određivanje koncentracije polifenola, flavonoida i proteina.

### **3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola**

Određivanje ukupnih polifenola u ekstraktima provedeno je metodom prema Matić i sur. (2017). Postupak je proveden u 3 paralele za svaki ekstrakt. Ukratko, u staklene epruvete je pipetirano 20 µL ekstrakta, 1580 µL destilirane vode, 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa te 300 µL natrijeva karbonata (200 g/L). Smjesa je homogenizirana miješanjem na vortex mješalici, te

postavljena u vodenu kupelj Memmert (Memmert, Njemačka) u svrhu razvoja boje tijekom 30 minuta pri 40 °C. Intenzitet razvijene boje mjereno je pri 765 nm na spektrofotometru Lasany LI-285 (Lasany International, Indija) uz slijepu probu koja je umjesto ekstrakta sadržavala jednaki volumen destilirane vode. Intenzitet apsorbancije preračunat je u koncentraciju polifenola na osnovi baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama galne kiseline.

### **3.2.6 Određivanje ukupnih flavonoida**

Ukupni flavonoidi određeni su metodom po Matić i sur. (2017) gdje je uz glavne probe analizirane u 3 paralele, određivana i kontrola ekstrakta. Ukratko, u epruvete glavnih probi je dodano 200 µL ekstrakta, 800 µL vode i 60 µL 5 % natrijeva nitrita, nakon čega je uslijedilo homogeniziranje smjese vorteksiranjem, te inkubacija 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom je u epruvete s glavnim probama dodano 60 µL 10 % aluminijske klorida, smjesa je homogenizirana vorteksiranjem i ostavljena stajati 6 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena u epruvete je dodano 400 µL 1 M natrijeva hidroksida i 480 µL destilirane vode, te je nakon vorteksiranja provedeno mjerenje intenziteta apsorbancije otopina pri 510 nm na spektrofotometru Lasany LI-285 (Lasany International, Indija) uz slijepu probu koja je umjesto ekstrakta sadržavala jednaki volumen destilirane vode. U slučaju kontrole ekstrakata postupak određivanja je bio isti, ali su u tom slučaju volumeni natrijeva nitrita i aluminijske klorida zamijenjeni destiliranom vodom. Intenzitet apsorbancije glavnih probi korigiran za intenzitet apsorbancije kontrole ekstrakata, preračunat je u koncentraciju flavonoida na temelju baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama kvercetina.

### **3.2.7 Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina u pripremljenim ekstraktima određena je metodom po Bradfordici (1976) u tri paralele. U PMMA semi-mikro kivete (Brand, Njemačka) dodano je 100 µL ekstrakta i potom 2 mL Bradford reagensa, te je smjesa ostavljena stajati 5 minuta u svrhu razvoja boje. Intenzitet razvijene boje mjereno je pri 595 nm na spektrofotometru Lasany LI-285 (Lasany International, Indija) uz slijepu probu koja je umjesto ekstrakta sadržavala jednaki volumen destilirane vode. Intenzitet apsorbancije preračunat je u koncentraciju proteina na osnovi baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama goveđeg serumskog albumina (BSA).

### **3.2.8. Statistička obrada podataka**

Srednje vrijednosti i standardne devijacije paralelnih i neovisnih mjerenja su izračunate primjenom programa Excel (Microsoft, Sjedinjene Američke Države).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati mogućnost ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom dvije različite ekstrakcijske tehnike: ultrazvukom potpomognute ekstrakcije te kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima, primjenom nekoliko različitih otapala. Prvo je ispitan utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju gdje je ekstrakcija provedena od manje ka više polarnom otapalu što je uključivalo 96 %, 75 %, 50 %, 25 % etanol i potom vodu. Zatim je provedena stupnjevita ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom taloga kave i ljuske crvenog luka istim slijedom otapala. Na osnovi kombinacije rezultata ova dva tipa ultrazvučne ekstrakcije, odabrano je 3 ili 4 otapala za kontinuiranu sekvencijalnu ekstrakciju u subkritičnim uvjetima koja je isto tako provedena slijedom od manje ka više polarnom otapalu (96 % etanol, 50 % etanol, voda).

Na temelju analize rezultata provedenih ekstrakcija ustanovljeno je koji je tip ekstrakcije pogodniji za ekstrakciju pojedine bioaktivne komponente taloga kave i ljuske crvenog luka.

### **4.1 Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka**

Jedan od ključnih čimbenika kod ultrazvučne ekstrakcije je očuvanje komponenata koje se ekstrahiraju, a upravo metoda ultrazvukom potpomognute ekstrakcije pokazuje odlične rezultate u očuvanju svojstava ekstrahiranih komponenti, veliku učinkovitost i smanjenje upotrebe kemikalija. Osim toga, bolji je prijenos mase i veće prodiranje otapala u uzorak (Vinatoru, 2001.).

Razni autori (Mussato i sur., 2011; Šušić, 2020; Bravo i sur., 2013; Viera i sur., 2017) su zasebno ekstrahirali jednu do dvije komponente iz taloga kave ili ljuske crvenog luka, no za daljnja istraživanja mogućnosti iskorištenja taloga kave i ljuske luka te ekstrakciju niza bioaktivnih komponenata iz istih bitno je pravilno odabrati najpogodnije/a otapalo/a.

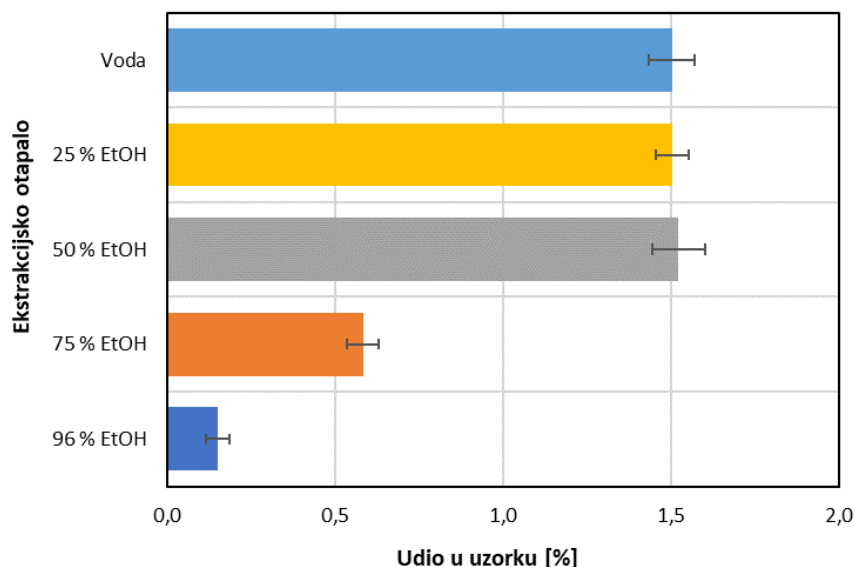
Prilikom provedbe ultrazvukom potpomognute ekstrakcije bitno je prilagoditi različite parametre: frekvenciju i intenzitet ultrazvučnog zračenja, trajanje ultrazvučne ekstrakcije,

temperaturu, vrstu (polarnost) te udio otapala (Shirsath i sur., 2012.). Od navedenih parametara koji mogu imati učinak na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju u ovom je diplomskom radu istražen utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz taloga kave i ljuske crvenog luka, slijedeći trend od manje ka više polarnom otapalu.

#### 4.1.1. Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz taloga kave

Bioaktivne komponente iz taloga kave ekstrahirane su sljedećim otapalima: 96 % etanol, 75 % etanol, 50 % etanol, 25 % etanol i voda, a rezultati ekstrakcije prikazani su **Slikama 4-6**.

Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju polifenola iz taloga kave prikazan je na **Slici 4**. Iz slike je vidljivo da je najmanje polifenola ekstrahirano 96 % etanolom. Korištenjem 50 % etanola postiže se maksimum ekstrakcije pri čemu se iz taloga kave ekstrahira 1,5 % od ukupne mase uzorka, koji se održava konstantnim i pri nižim udjelima etanola kao i korištenjem vode kao ekstrakcijskog otapala.



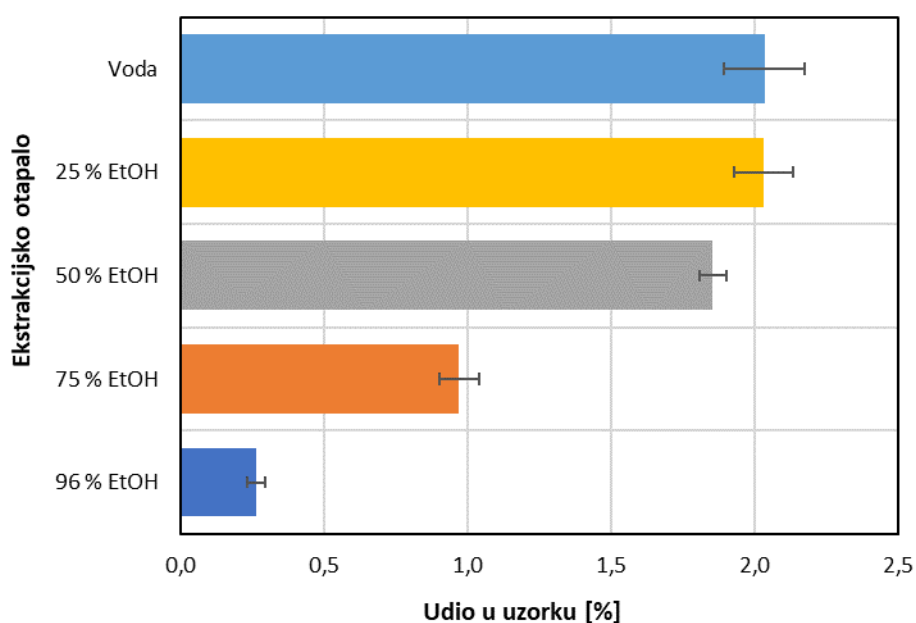
**Slika 4** Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju polifenola iz taloga kave

Mussato i sur. (2011) su ekstrahirali polifenole iz taloga kave metanolom i dobili najveći udio ekstrahiranih polifenola (10,7 mg galne kiseline/1 g taloga kave) koristeći 60 % metanol, što je približno slično rezultatima ovog istraživanja dobivenim sa 50 % etanolom (7,61 mg galne kiseline/1 g taloga kave). Razlike u %-tku otapala kojim se ostvaruje maksimalna ekstrakcija polifenola iz taloga kave u ovom istraživanju (50 % EtOH) i onom od Mussato i sur. (2011) (60 %



MeOH) mogu se pripisati činjenici da je metanol polarniji od etanola (Reichardt i Welton, 2010.).

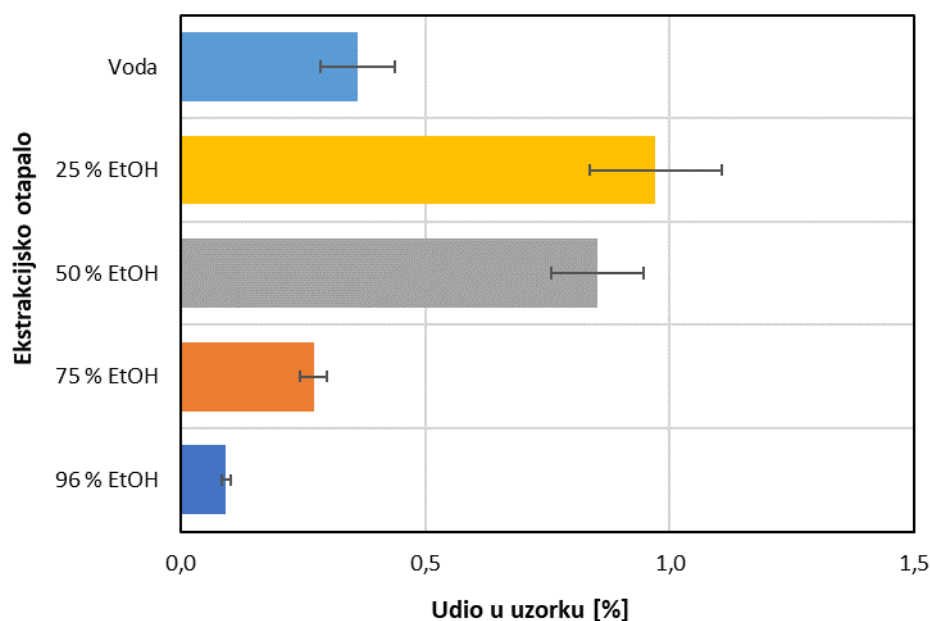
Na **Slici 5** prikazan je utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju flavonoida iz taloga kave. Vidljivo je da je najviše flavonoida iz taloga kave ekstrahirano sa 25 % etanolom (2,3 % od ukupne mase uzorka) te da se podjednaka količina flavonoida ekstrahira vodom kao ekstrakcijskim otapalom, dok se povećanjem udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu smanjuje količina ekstrahiranih flavonoida. Ovi rezultati su drugačiji od Šušić (2020) koja je pronašla da se više flavonoida iz taloga kave ekstrahira u 70 %-nom (7,11 % flavonoida od ukupne mase uzorka), nego u 50 %-tom etanolu (6,91 % od ukupne mase uzorka). Međutim, bitno je napomenuti da je Šušić (2020) provodila ekstrakciju taloga kave primjenom Soxhlet ekstrakcije.



**Slika 5** Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju flavonoida iz taloga kave

Na **Slici 6** prikazan je utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju proteina iz taloga kave. Vidljivo je da je najmanje proteina ekstrahirano korištenjem 96 % etanola, te da udio ekstrahiranih proteina raste smanjenjem udjela etanola, ali da se najveći postiže korištenjem 25 % etanola (0,97 % od ukupne mase uzorka). Samsalee i Sothornvit (2021) koristili su ultrazvučnu ekstrakciju proteina iz taloga kave kao predtretman za konvencionalnu ekstrakciju, ali su dobili podjednako ekstrahiranih proteina iz taloga kave sa i bez predtretmana ultrazvučnom ekstrakcijom. No bitno je napomenuti kako navedeni autori nisu koristili etanol kao otapalo

nego vodenu otopinu taloga kave podešenu na pH 11 dodatkom određene količine 0,7 M tri-natrijeva fosfata ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).



**Slika 6** Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju proteina iz taloga kave

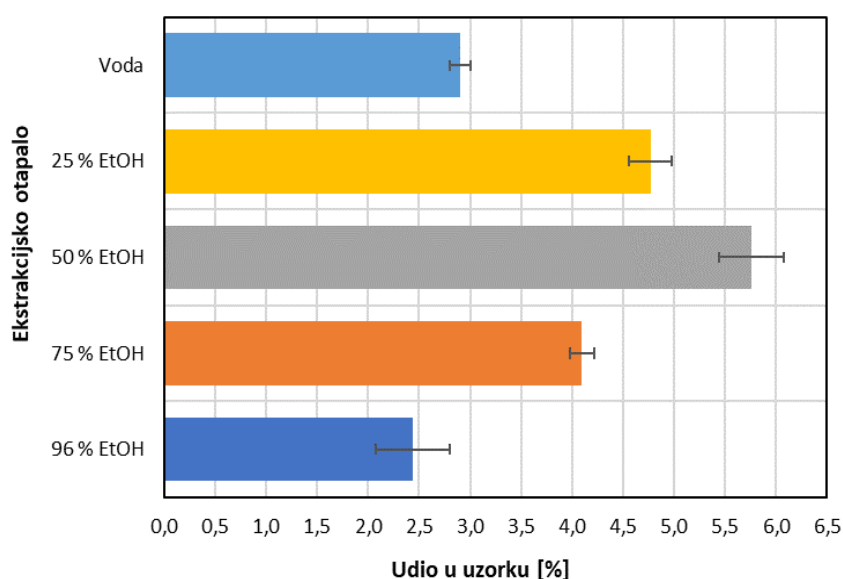
Na temelju svega gore navedenog, može se zaključiti da polarnost otapala ima značajan utjecaj na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave. Tako se najveća količina polifenola iz taloga kave ekstrahira primjenom 50 % etanola, a najveća količina flavonoida i proteina primjenom 25 % etanola. Međutim, uzme li se u obzir i činjenica da se podjednaka količina polifenola ekstrahira sa 25 % etanolom i vodom, tada se može zaključiti da je najpogodnije otapalo za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave 25 % etanol.

#### **4.1.2. Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju bioaktivnih komponentni iz ljuske crvenog luka**

Bioaktivne komponente iz ljuske crvenog luka ekstrahirane su sljedećim otapalima: 96 % etanol, 75 % etanol, 50 % etanol, 25 % etanol i voda, a rezultati ultrazvukom potpomognute ekstrakcije prikazani su **Slikama 7-9**.

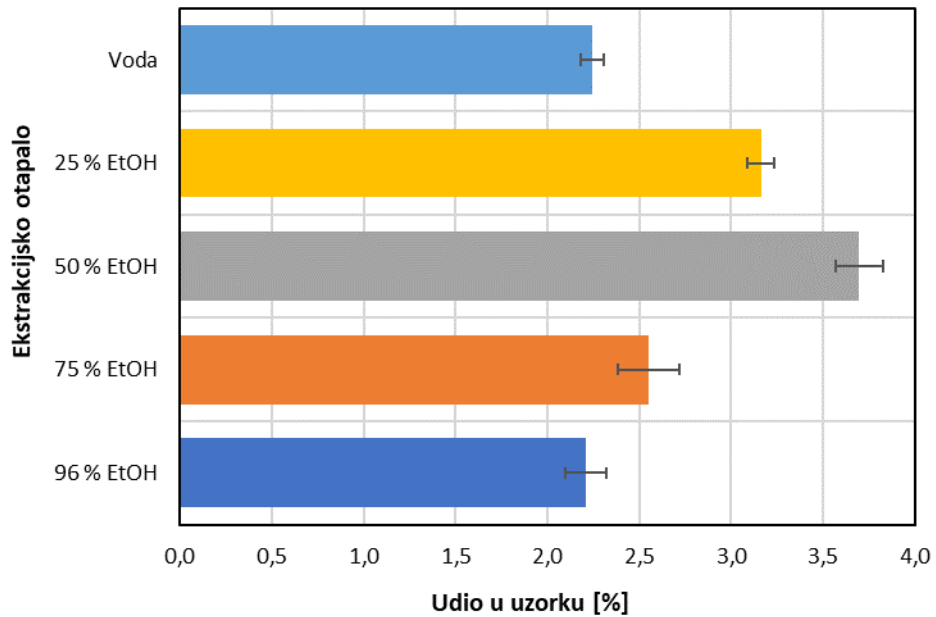
Na **Slici 7** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju polifenola iz ljuske crvenog luka te je vidljivo kako je najviše polifenola ekstrahirano korištenjem 50 % etanola (5,76 % od ukupne mase uzorka). Viera i sur. (2017) su najveći udio ekstrahiranih polifenola iz ljuske crvenog luka dobili

primjenom 80 % etanola nakon 60 minuta (649,5 mg galne kiseline/1 g ljuske crvenog luka) konvencionalne ekstrakcije miješanjem, što je skoro 25 više od količine dobivene u ovom istraživanju (28,8 mg galne kiseline/1 g ljuske crvenog luka). S druge strane, Milea i sur. (2019) su iz ljuske crvenog luka, ultrazvučnom ekstrakcijom sa 70 % etanolom ekstrahirali 97,28 mg polifenola (mg galne kiseline) po 1 g ljuske crvenog luka, što je opet oko 3 puta više od količine pronađene u ovom diplomskom radu. Međutim, ključno je naglasiti da su navedeni autori ekstrakciju iz istog uzorka provodili 5 puta zaredom, što u ovom istraživanju nije provedeno.



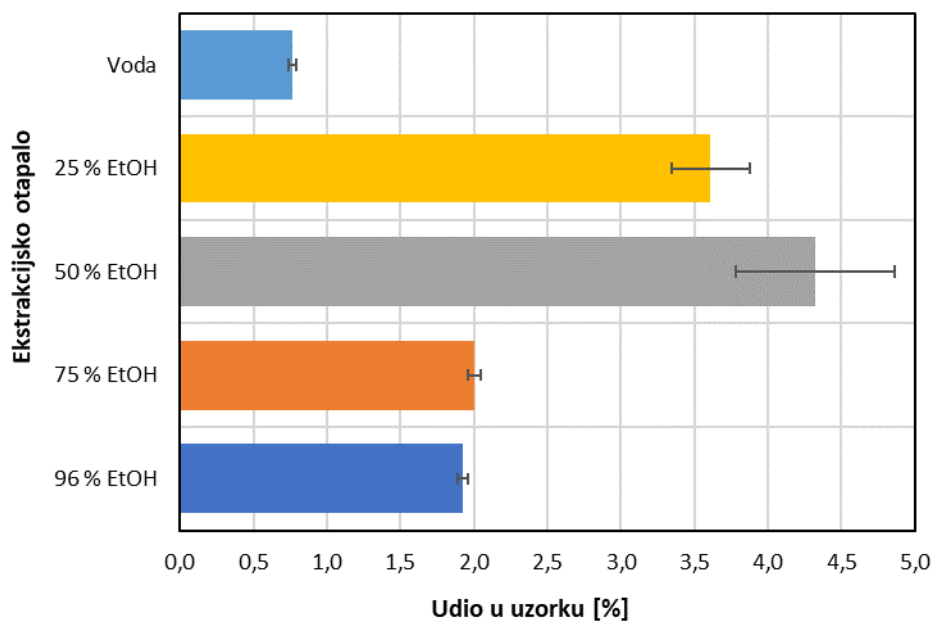
**Slika 7** Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola iz ljuske crvenog luka

Na **Slici 8** prikazan je utjecaj otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju flavonoida iz ljuske crvenog luka. Najviše ekstrahiranih flavonoida dobije se primjenom 50 % etanola (3,70 % od ukupne mase uzorka; 18,48 mg kvercetina/1 g ljuske crvenog luka). Benito-Román i sur. (2021) su za ekstrakciju flavonoida iz ljuske crvenog luka koristili 70 % etanol i iz osušene ljuske crvenog luka ultrazvučnom ekstrakcijom tijekom 1 h ekstrakcije dobili 20,7 mg kvercetina/1 g ljuske crvenog luka, što je vrlo slično rezultatu dobivenom u ovom diplomskom radu. S druge strane, Milea i sur. (2019) su iz 1 grama ljuske crvenog luka primjenom višestruke ultrazvučne ekstrakcije sa 70 % etanolom 5 × 30 min dobili 55,27 kvercetina/1 g ljuske crvenog luka.



**Slika 8** Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju flavonoida iz ljuske crvenog luka

Utjecaj otapala na ekstrakciju proteina iz ljuske crvenog luka prikazan je **Slikom 9**. Iz slike je vidljivo kako je najbolji učinak ekstrakcije proteina postignut primjenom 50 % etanola (4,32 % od ukupne mase uzorka). Takav rezultat može se pripisati tome da su proteini sadržani u ljuski crvenog luka manje polarni, tj. više hidrofobni.



**Slika 9** Utjecaj polarnosti otapala na ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju proteina iz ljuske crvenog luka

Na temelju gore navedenih podataka može se zaključiti kako na ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka ultrazvučnom ekstrakcijom velik utjecaj ima izbor otapala. Tako se najveća količina polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka ekstrahira primjenom 50 % etanola te se može zaključiti kako je optimalno otapalo za ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka primjenom ultrazvučne ekstrakcije upravo 50 % etanol.

## **4.2 Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka**

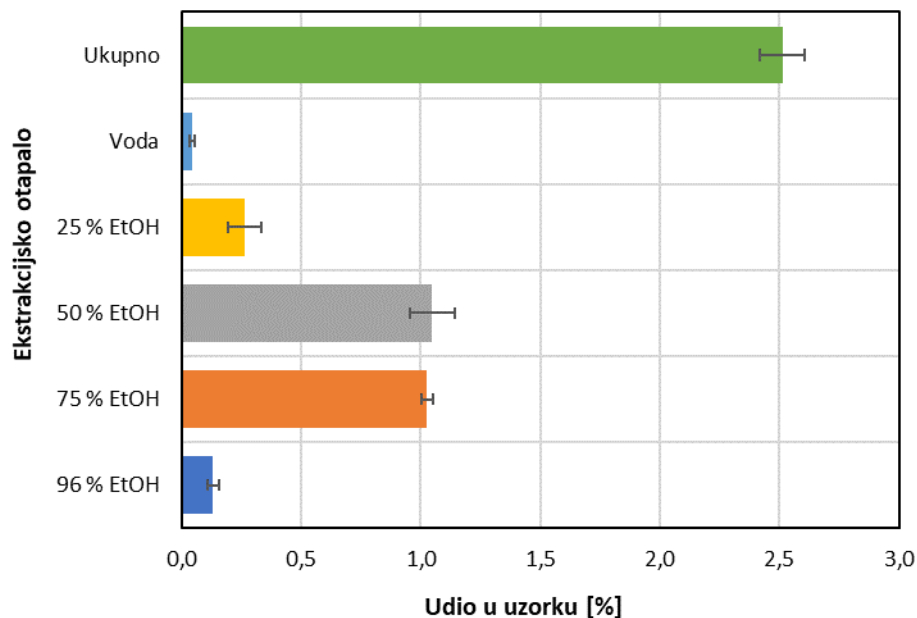
U sekvencijalnim ekstrakcijama se primjenom odgovarajućih otapala rastuće ekstrakcijske moći, a u ovom diplomskom radu polarnosti, mogu selektivno i postepeno ekstrahirati određene komponente iz uzorka. Na efikasnost sekvencijalne ekstrakcije utječu vrijeme trajanja sekvencijalne ekstrakcije, temperatura pri kojoj se izvodi sekvencijalna ekstrakcija, te intenzitet miješanja uzorka. Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija koristi se kako bi se optimizirao proces ekstrakcije, tj. najefikasnije dobilo najviše ekstrahirane komponente (Gajić, 2017).

### **4.2.1. Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave**

Sekvencijalna ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave provedena je koristeći sljedeća otapala: 96 % etanol, 75 % etanol, 50 % etanol, 25 % etanol i vodu. Rezultati su prikazani **Slikama 10-12**, dok je na **Slici 14** prikazana usporedba ultrazvučne i sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave.

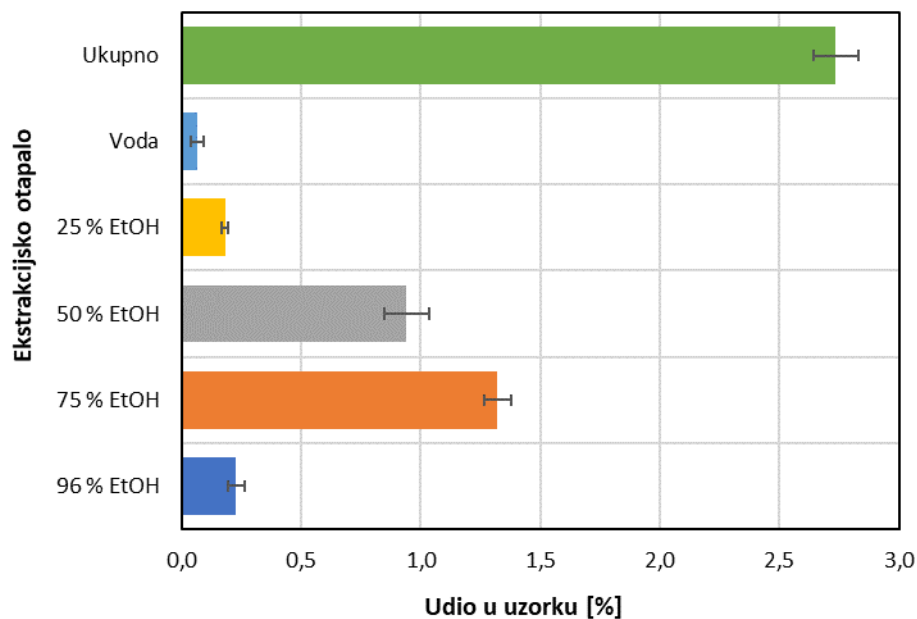
Na **Slici 10** prikazana je količina polifenola ekstrahiranih iz taloga kave primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Vidljivo je kako se vrlo mala količina polifenola ekstrahira iz taloga kave 96 % etanolom (0,13 % od ukupne mase uzorka), dok se slijednom ekstrakcijom pomoću 75 i 50 % etanola iz taloga kave ekstrahiraju gotovo podjednake količine (1,03 i 1,05 % ukupne mase uzorka). Zaostali polifenoli slijedno se ekstrahiraju u malim količinama 25 % etanolom i vodom (0,26 i 0,04 % od ukupne mase uzorka). Shodno tome, primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz taloga kave se ukupno ekstrahira 2,5 % polifenola od ukupne mase taloga kave. Kada se ovi podaci usporede sa najvećom količinom polifenola ekstrahiranih iz taloga kave najpogodnijim otapalom (**Slika 4**),

tada se može uočiti da se ultrazvukom potpomognutom sekvencijalnom ekstrakcijom iz taloga kave ukupno ekstrahira gotovo duplo veća količina polifenola, nego najpogodnijim otapalom, što se dodatno može uočiti na **Slici 13**.



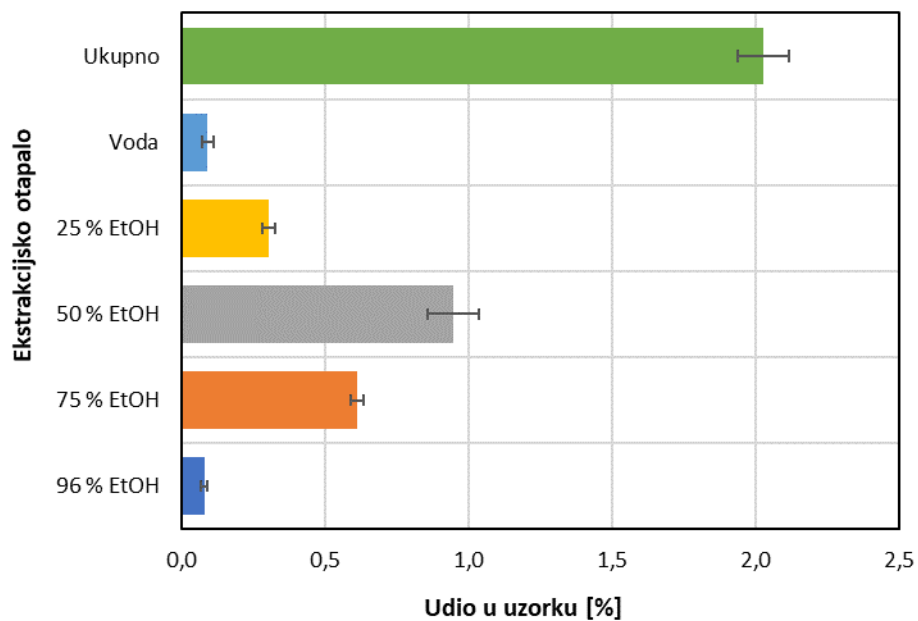
**Slika 10** Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija polifenola iz taloga kave

Na **Slici 11** prikazana je količina flavonoida ekstrahiranih iz taloga kave primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Vidljivo je kako se vrlo mala količina flavonoida ekstrahira iz taloga kave 96 % etanolom (0,23 % od ukupne mase uzorka), dok se slijednom ekstrakcijom pomoću 75 % etanola ekstrahira glavina flavonoida iz taloga kave (1,32 % od ukupne mase uzorka). Zaostali flavonoidi se slijedno ekstrahiraju sa 50 i 25 % etanolom te vodom u sve manjim količinama (0,94, 0,18 i 0,07 % od ukupne mase uzorka.) Shodno tome, primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz taloga kave ukupno se ekstrahira 2,74 % flavonoida od ukupne mase taloga kave (**Slika 10**). Usporedbom dobivenih podataka sa najvećom količinom flavonoida ekstrahiranih iz taloga kave najpogodnijim otapalom (**Slika 5**) uočavamo kako se ultrazvukom potpomognutoj sekvencijalnom ekstrakcijom iz taloga kave ekstrahira gotovo trećina više flavonoida iz taloga kave nego pri ekstrakciji flavonoida iz taloga kave najpogodnijim otapalom, što se može dodatno uočiti na **Slici 13**.

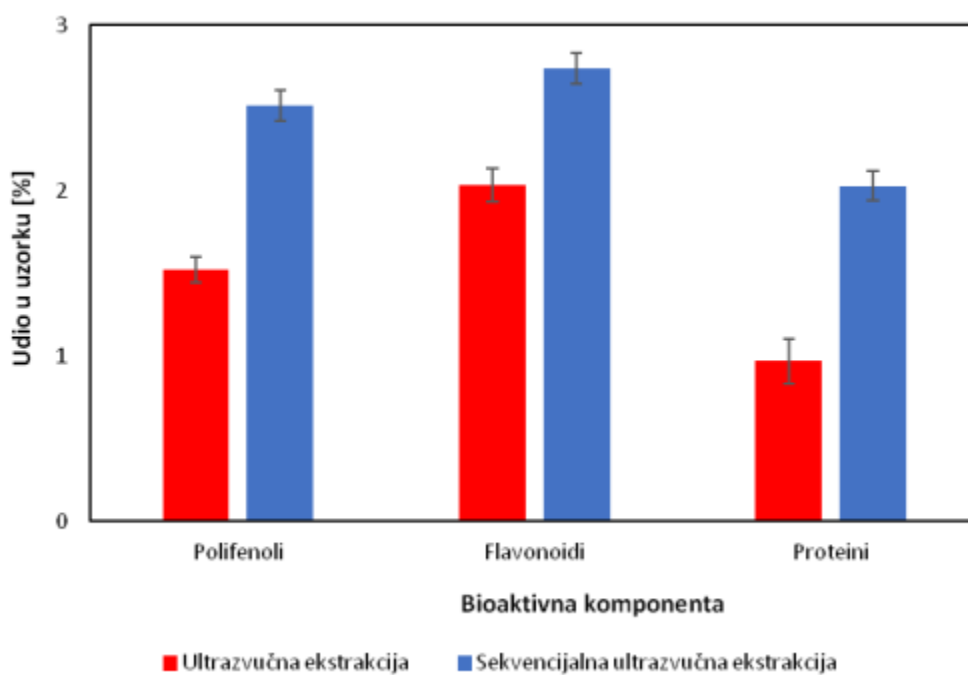


**Slika 11** Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija flavonoida iz taloga kave

Na **Slici 12** prikazana je količina proteina ekstrahiranih iz taloga kave primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Na slici je vidljivo kako je vrlo mala količina proteina ekstrahirana iz taloga kave 96 % etanolom (0,08 % od ukupne mase uzorka), dok se slijednom ekstrakcijom pomoću 75 i 50 % etanola iz taloga kave ekstrahiraju proteini u većim količinama (0,61 i 0,94 % ukupne mase uzorka). Zaostali proteini iz taloga kave se slijedno ekstrahiraju u manjim količinama 25 % etanolom i vodom (0,30 i 0,09 % od ukupne mase uzorka). Shodno gore navedenom, primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz taloga kave ukupno se ekstrahira 2,03 % proteina od ukupne mase taloga (**Slika 12**). Kada se ovi podaci usporede sa najvećom količinom proteina ekstrahiranih iz taloga kave najpogodnijim otapalom (**Slika 6**), uočava se da se ultrazvukom potpomognutom sekvencijalnom ekstrakcijom iz taloga kave ekstrahira gotovo duplo veća količina proteina, nego najpogodnijim otapalom, što se dodatno može uočiti na **Slici 13**.



**Slika 12** Ultrazvukom potpomognuta sekvencijalna ekstrakcija proteina iz taloga kave



**Slika 13** Usporedba ultrazvučne i sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave

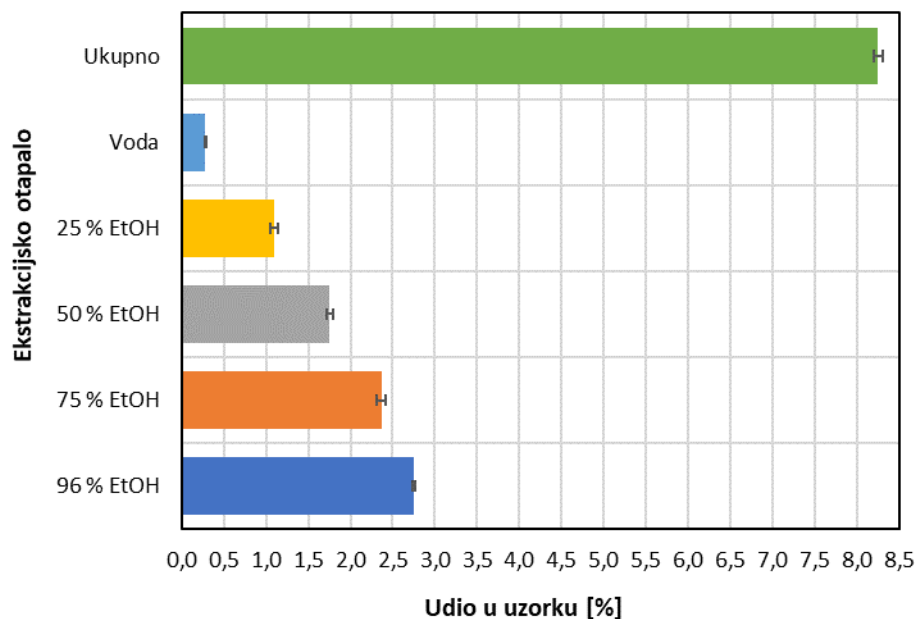


Na temelju svih gore navedenih podataka može se zaključiti kako se više polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave ekstrahira primjenom sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju uz najpovoljnije otapalo. Sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom iz taloga kave se ekstrahira duplo više polifenola i proteina, te jedna trećina više flavonoida.

#### **4.2.2. Sekvencijalna ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka**

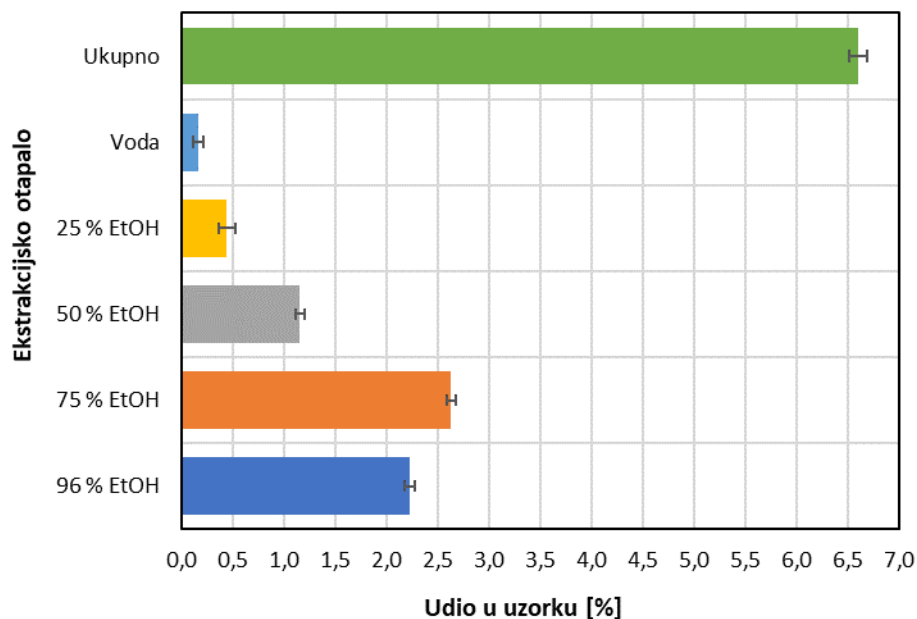
Sekvencijalna ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka provedena je koristeći sljedeća otapala: 96 % etanol, 75 % etanol, 50 % etanol, 25 % etanol i vodu. Rezultati su prikazani **Slikama 14-16**, a na **Slici 17** prikazana je usporedba ultrazvučne i sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka.

Na **Slici 14** prikazana je količina polifenola ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Vidljivo je kako se gotovo podjednaka količina polifenola ekstrahira iz ljuske crvenog luka 96 i 75 % etanolom (2,75 i 2,37 % od ukupne mase uzorka), dok se slijednom ekstrakcijom pomoću 50 i 25 % etanola i vode iz ljuske luka ekstrahiraju manje količine polifenola (1,76, 1,10 i 0,28 % od ukupne mase uzorka). Shodno tome, primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz ljuske crvenog luka ukupno se ekstrahira 8,25 % polifenola od ukupne mase uzorka. Kada se ovi podaci usporede sa najvećom količinom polifenola ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka najpogodnijim otapalom (**Slika 7**), uočava se da se ultrazvukom potpomognutom sekvencijalnom ekstrakcijom iz ljuske crvenog luka ekstrahira gotovo trećina više polifenola, što se dodatno može uočiti na **Slici 17**.



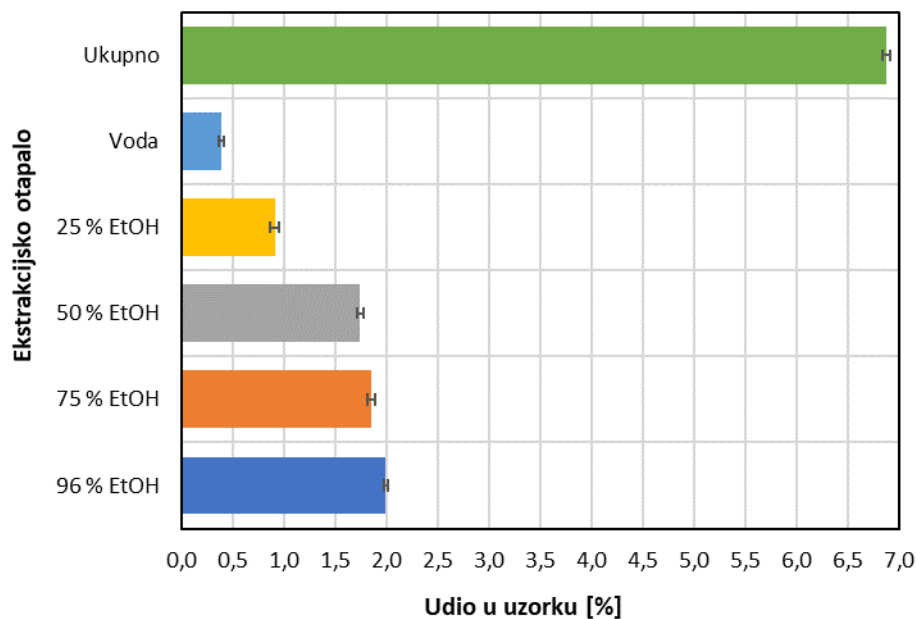
**Slika 14** Utjecaj polarosti otapala na ekstrakciju polifenola iz ljuske luka

Na **Slici 15** prikazana je količina flavonoida ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Iz slike je vidljivo kako je podjednaka količina flavonoida ekstrahirana iz ljuske crvenog luka 96 i 75 % etanolom (2,23 i 2,63 % od ukupne mase uzorka), dok se slijednom ekstrakcijom pomoću 50 i 25 % etanola te vodom iz ljuske crvenog luka ekstrahiraju zaostali flavonoidi u postupno manjim količinama (1,15, 0,44 i 0,16 % ukupne mase uzorka). Shodno tome, primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz ljuske crvenog luka ukupno se ekstrahira 6,60 % flavonoida od ukupne mase uzorka. Kada se ovi podaci usporede sa najvećom količinom flavonoida ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka najpogodnijim otapalom (**Slika 8**), uočava se da se ultrazvukom potpomognutom sekvencijalnom ekstrakcijom iz ljuske crvenog luka ekstrahira gotovo duplo veća količina flavonoida (**Slika 17**), nego najpogodnijim otapalom.

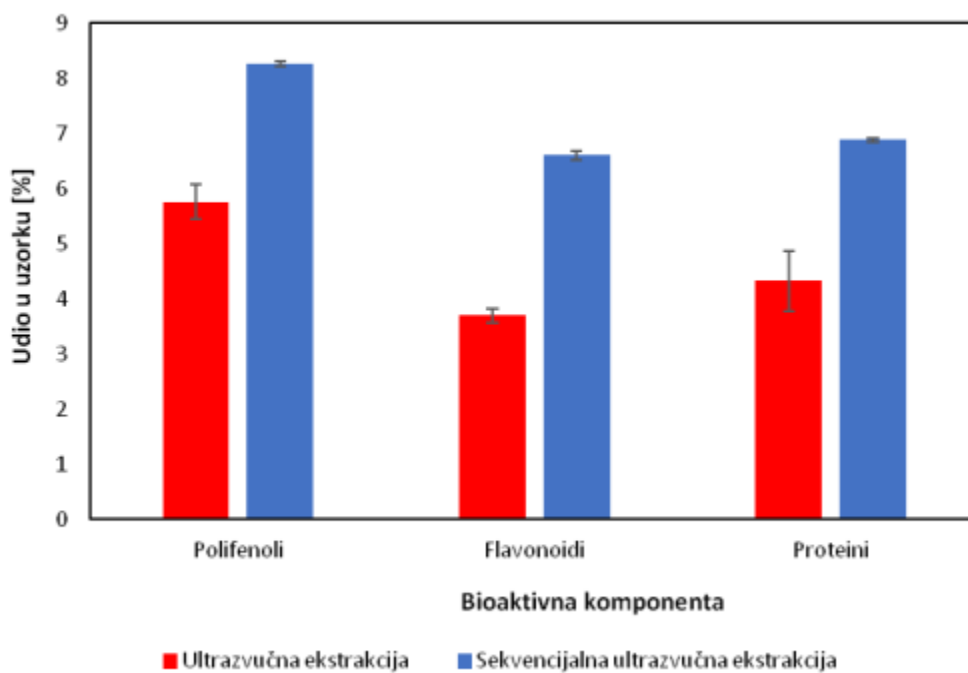


**Slika 15** Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju flavonoida iz ljuske luka

Na **Slici 16** prikazana je količina proteina ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije. Na slici je vidljivo kako se gotovo jednake količine proteina ekstrahiraju iz ljuske crvenog luka 96, 75 i 50 % etanolom (1,99, 1,85 i 1,74 % od ukupne mase uzorka). Zaostali proteina iz ljuske crvenog luka se slijedno ekstrahiraju u manjim količinama 25 % etanolom i vodom (0,90 i 0,39 % od ukupne mase uzorka). Primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije iz ljuske crvenog luka ukupno se ekstrahira 6,88 % proteina od ukupne mase uzorka. Kada se ovi podaci usporede sa najvećom količinom proteina ekstrahiranih iz ljuske crvenog luka najpogodnijim otapalom (**Slika 9**), uočava se da se ultrazvukom potpomognutom sekvencijalnom ekstrakcijom iz ljuske crvenog luka ekstrahira gotovo trećina više proteina (**Slika 17**), nego najpogodnijim otapalom 50 % etanolom.



**Slika 16** Utjecaj polarosti otapala na ekstrakciju proteina iz ljuske luka



**Slika 17** Usporedba ultrazvučne i sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka

Na temelju gore navedenih podataka može se zaključiti kako se više polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske luka ekstrahira primjenom sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije nego primjenom ultrazvučne ekstrakcije uz najpovoljnije otapalo. Primjenom sekvencijalne

ultrazvučne ekstrakcije ekstrahira se duplo više flavonoida, te trećina više polifenola i proteina iz ljuske crvenog luka.

### **4.3 Utjecaj polarnosti otapala na kontinuiranu sekvencijalnu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave i ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima**

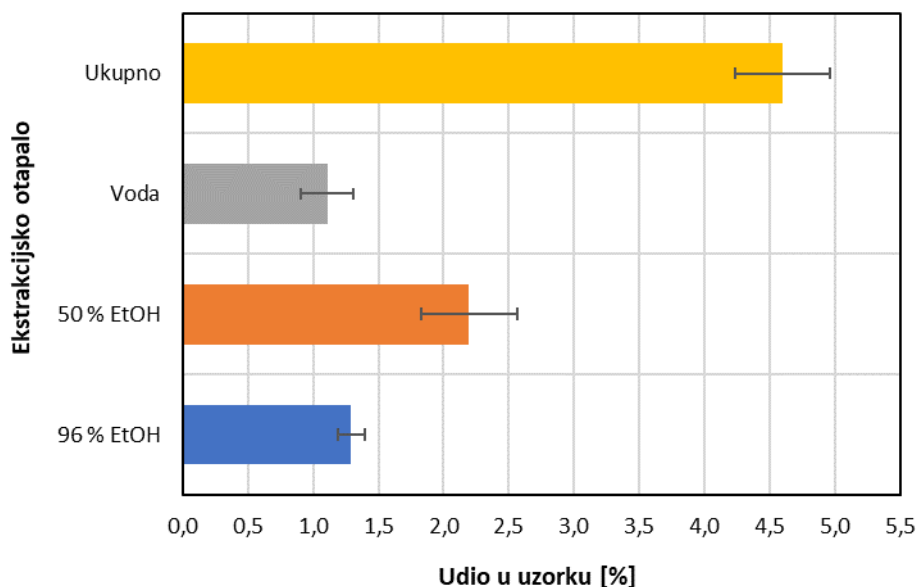
Koncept „ekoloških otapala“ i „zelene kemije“ gotovo uvijek podrazumijeva korištenje vode i etanola kao otapala. Voda i etanol kao otapala su jeftini, neotrovni, lako dostupni te stvaraju malo otpada te se subkritična ekstrakcija pomoću vode i etanola, u raznim omjerima, često koristi za ekstrakciju raznih, visokovrijednih spojeva iz raznih uzoraka (Marcus, 2017). Za subkritičnu ekstrakciju vodom potrebna je temperatura od 100 do 371 °C te povišeni tlak, ta metoda ne zagađuje okoliš te je često učinkovitija od konvencionalnih metoda ekstrakcije. Smjesa etanola i vode se često koristi zato što nije toksična te je dozvoljena i u prehrambenoj industriji, a daje usporedivo dobre rezultate kao i druga, toksična otapala (Mufari i sur., 2020). Promjenom temperature, mijenja se dielektrična konstantna vode što mijenja polarnost vode te tako vodu možemo modificirati ovisno o tome kakvo otapalo nam je potrebno (Herrero i sur., 2006).

#### **4.3.1. Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave u subkritičnim uvjetima**

Bioaktivne komponente iz taloga kave ekstrahirane su koristeći otapala 96 i 50 % etanol te vodu, a uvjeti subkritične ekstrakcije bili su a) omjer mase uzorka i volumena otapala 1:20, b) temperatura ekstrakcije 100 °C, te c) protok otapala od 40 mL/min. Rezultati su prikazani na **Slikama 18-20**. Kompletna usporedba sekvencijalne ultrazvučne i kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave prikazana je na **Slici 21**.

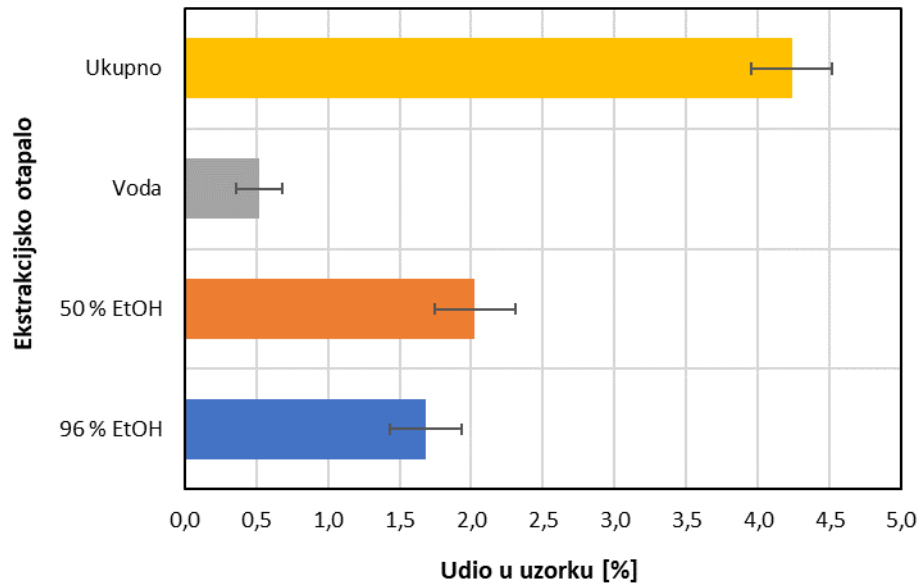
Na **Slici 18** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju polifenola iz taloga kave primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo kako je najviše polifenola ekstrahirano 96 i 50 % etanolom (1,29 i 2,20 % od ukupne mase uzorka), nakon čega se količina ekstrahiranih preostalih polifenola koristeći vodu smanjuje na 1,11 % od ukupne mase uzorka. Shodno tome, primjenom sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim

uvjetima iz taloga kave se ukupno ekstrahira 4,60 % polifenola od ukupne mase uzorka, što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 21**) gotovo duplo više. Getachew i sur. (2018) su iz taloga kave primjenom subkritične ekstrakcije vodom dobili između 33,1 i 51,2 mg galne kiseline/ 1 g taloga kave ovisno o predtretmanu kojim je talog kave tretiran, što je slično ukupnoj količini polifenola dobivenih sekvencijalnom ekstrakcijom u subkritičnih uvjetima u ovom radu (46,39 mg galne kiseline/g taloga kave).



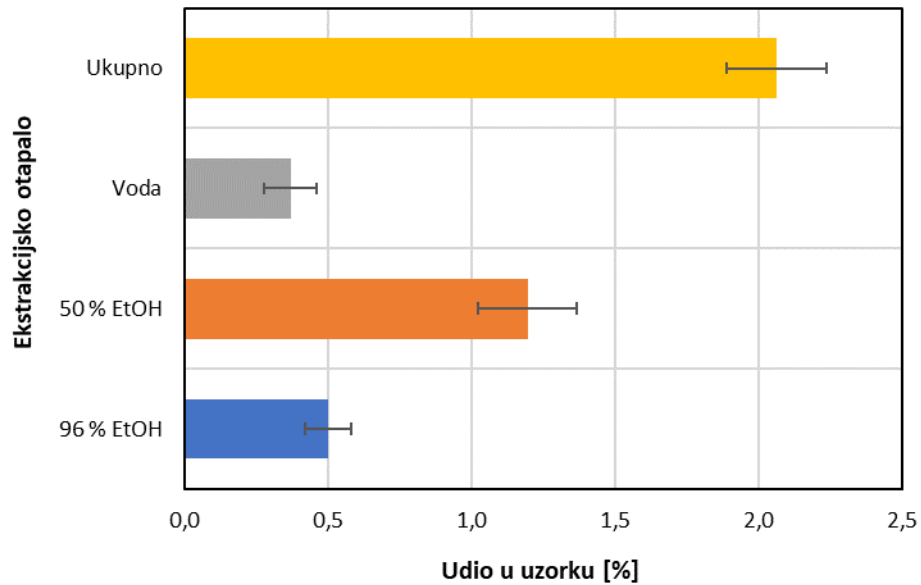
**Slika 18** Utjecaj otapala na ekstrakciju polifenola iz taloga kave

Na **Slici 19** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju flavonoida iz taloga kave primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo kako je najviše flavonoida ekstrahirano 96 i 50 % etanolom (1,69 i 2,03 % od ukupne mase uzorka), nakon čega se količina ekstrahiranih zaostalih flavonoida koristeći vodu smanjuje (0,52 % od ukupne mase uzorka). Primjenom ultrazvukom potpomognute sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz taloga kave ukupno se ekstrahira 4,23 % flavonoida od ukupne mase uzorka što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 21**) trećina više flavonoida. Getachew i sur. (2018) su iz taloga kave primjenom subkritične ekstrakcije vodom dobili između 15,13 i 25,51 mg kvercetina/1 g taloga kave ovisno o predtretmanu kojim je uzorak tretiran, dok su Xu i sur. (2015) dobili 47,25 mg kvercetina/1 g taloga kave primjenom subkritične ekstrakcije vodom pri 170°C i oba se istraživanja slažu s rezultatima ovog istraživanja u kojem ukupna količina flavonoida iznosi 42,34 mg kvercetina/1 g taloga kave primjenom sekvencijalne subkritične ekstrakcije.



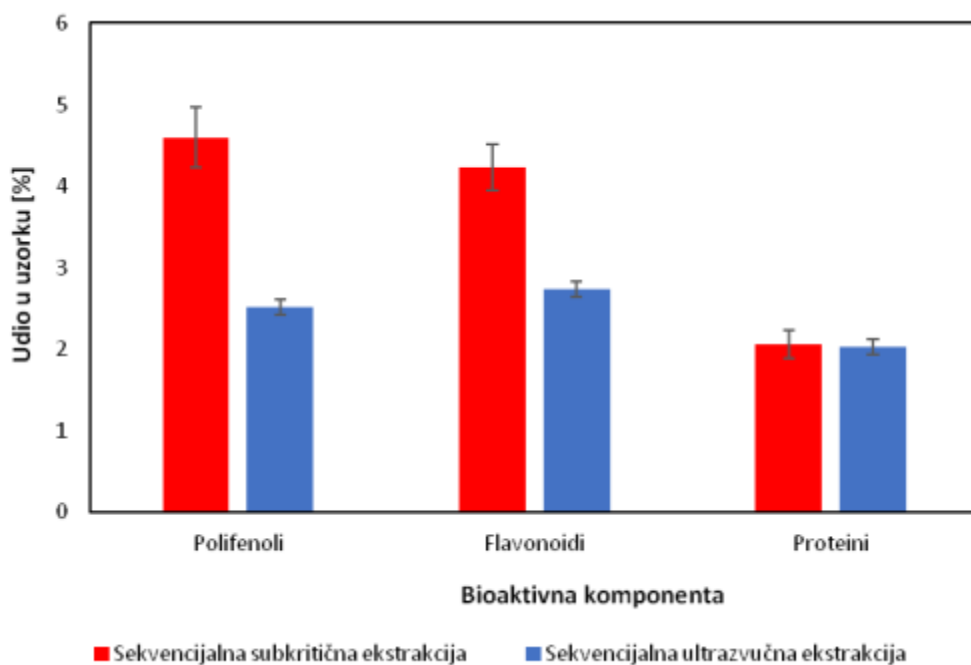
**Slika 19** Utjecaj otapala na ekstrakciju flavonoida iz taloga kave

Na **Slici 20** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju proteina iz taloga kave primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo kako je gotovo podjednaka količina proteina ekstrahirana primjenom 96 % etanola i vode (0,50 i 0,37 % od ukupne mase uzorka), dok se najveća količina proteina ekstrahira sa 50 % etanolom (1,20 % od ukupne mase uzorka). Primjenom sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz taloga kave se ukupno ekstrahira 2,06 % proteina od ukupne mase uzorka što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 21**) gotovo podjednaka količina proteina. Getachew i sur. (2018) su iz taloga kave primjenom subkritične ekstrakcije vodom dobili između 20,05 i 47,58 mg proteina/1 g taloga kave ovisno o predtretmanu i temperaturi pri kojoj je ekstrakcija provedena. Najviše proteina su ekstrahirali između 180 i 220 °C, dok se količina ekstrahiranih proteina pri 240 °C smanjuje. Ovi podatci su djelomično u skladu sa ukupnom količinom proteina ekstrahiranih primjenom sekvencijalne subkritične ekstrakcije provedenom u ovom radu, gdje ukupna količina proteina iznosi 20,62 mg/1 g taloga kave.



**Slika 20** Utjecaj otapala na ekstrakciju proteina iz ekstrakta taloga kave

Na temelju gore navedenih podataka može se zaključiti kako se više polifenola i flavonoida iz taloga kave ekstrahira primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima nego primjenom sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije, dok je količina ekstrahiranih proteina gotovo jednaka.



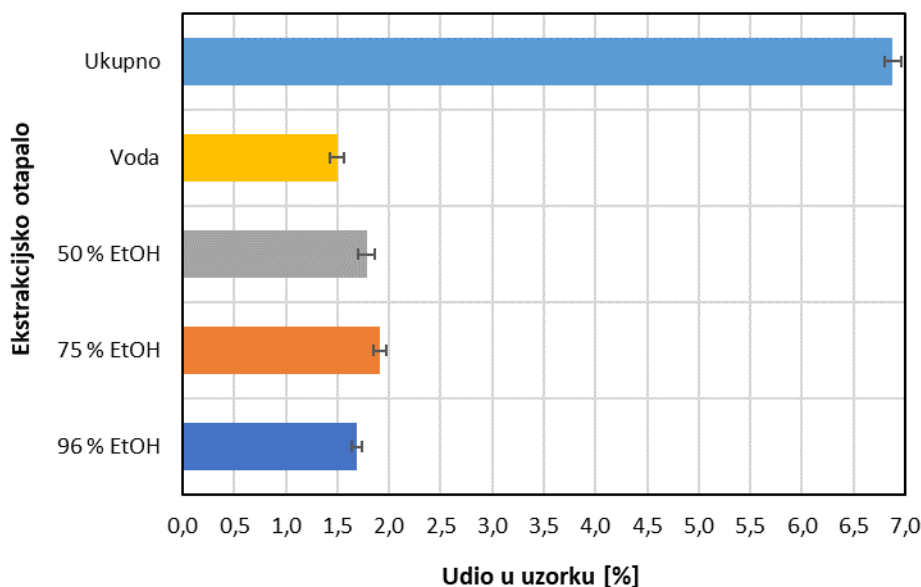
**Slika 21** Usporedba sekvencijalne ultrazvučne i kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave



### 4.3.2. Kontinuirana sekvencijalna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka u subkritičnim uvjetima

Bioaktivne komponente iz ljuske crvenog luka ekstrahirane su koristeći 96, 75 i 50 % etanol te vodu, a uvjeti subkritične ekstrakcije bili su a) omjer mase uzorka i volumena otapala 1:20, b) temperatura ekstrakcije 100 °C, te c) protok otapala od 40 mL/min.

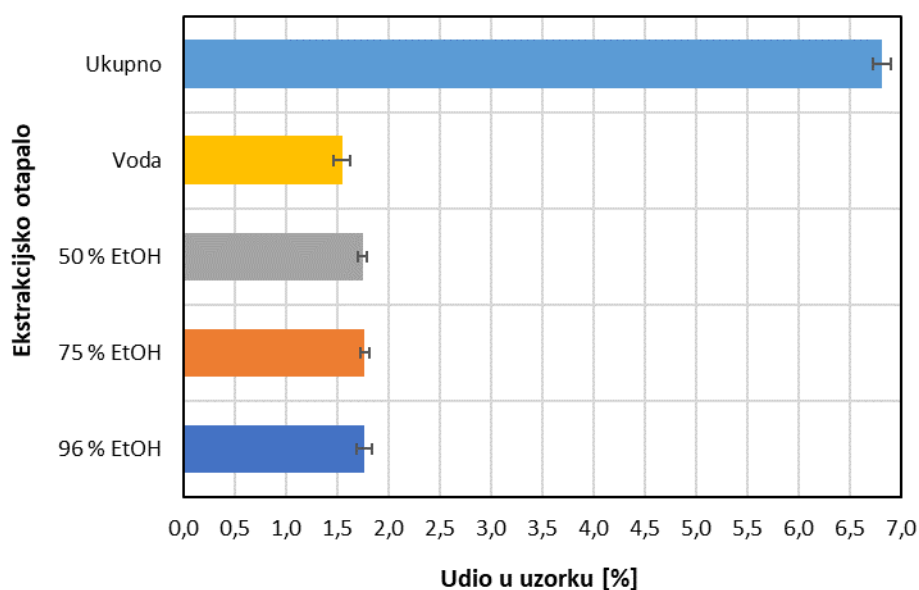
Na **Slici 22** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju polifenola iz ljuske crvenog luka primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo kako se gotovo podjednaka količina polifenola ekstrahira primjenom 96, 75 i 50 % etanola i vode (1,69, 1,91, 1,78 i 1,50 % od ukupne mase uzorka). Primjenom sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz ljuske luka se ukupno ekstrahira 6,88 % polifenola od ukupne mase uzorka što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 25**) za četvrtinu manje. Benito Román i sur. (2020) su iz ljuske luka ekstrahirali polifenole vodenom ekstrakcijom, a količinu dobivenih polifenola ispitivali su na dobivenom ekstraktu bez i sa ispiranja 60 % etanolom te su veću količinu ekstrahiranih polifenola dobili nakadnom primjenom 60 % etanola (94,7 mg galne kiseline/1 g uzorka) što je veći rezultat nego u ovom istraživanju.



**Slika 22** Utjecaj otapala na ekstrakciju polifenola iz ljuske luka

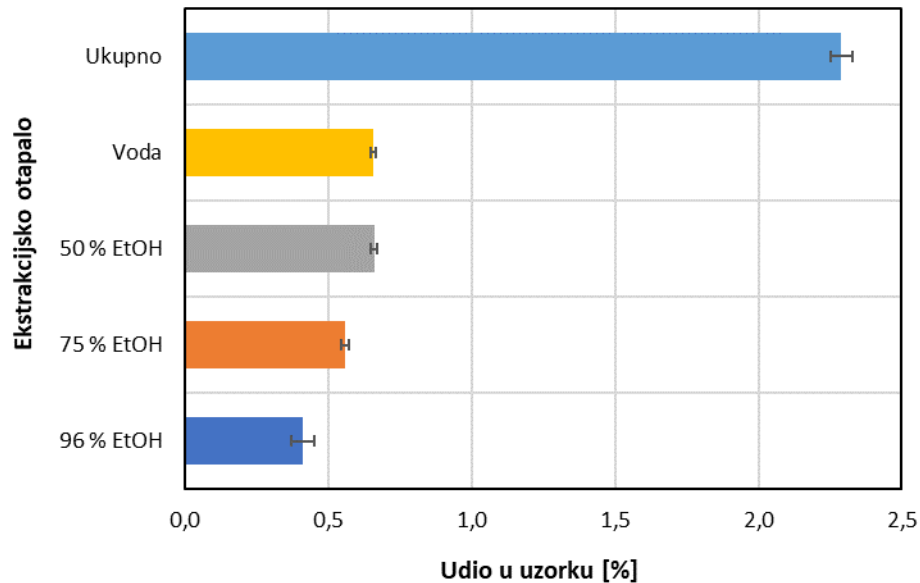
Na **Slici 23** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju flavonoida iz ljuske crvenog luka primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo

kako se gotovo podjednaka količina flavonoida ekstrahira primjenom 96, 75 i 50 % etanola i vode (1,76, 1,77, 1,75 i 1,54 % od ukupne mase uzorka). Primjenom sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz ljuske luka se ukupno ekstrahira 6,82 % flavonoida od ukupne mase uzorka što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 25**) gotovo jednaka količina flavonoida. Benito Román i sur. (2020) su su iz ljuske luka ekstrahirali polifenole vodenom ekstrakcijom te naknadno tretirali ekstrakt 60 % etanolom i maksimalan rezultat koji su dobili je 21,2 mg kvercetina/ 1 g uzorka što je manje nego u ovom istraživanju.



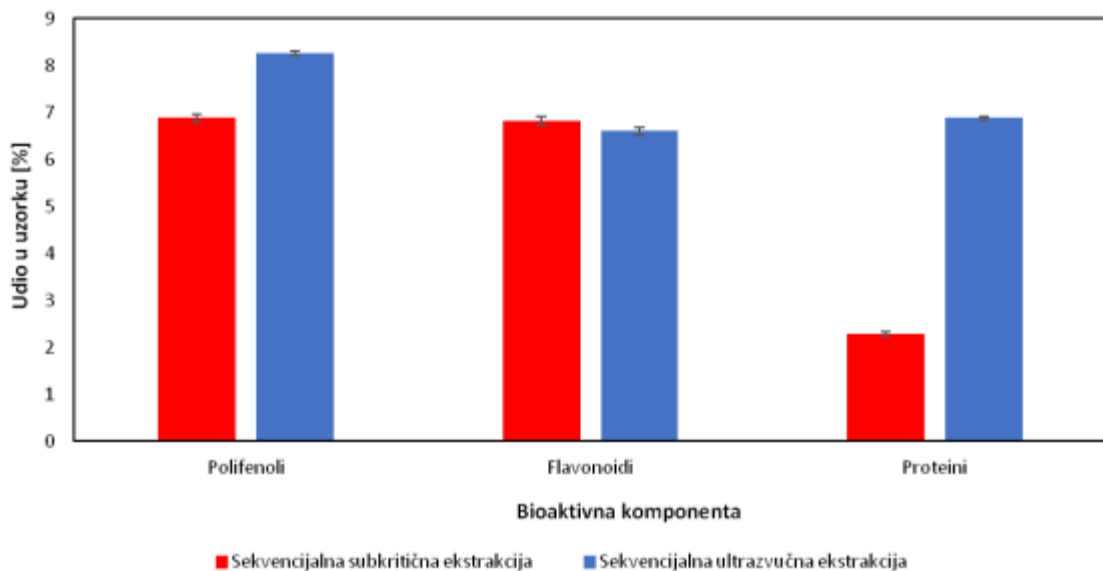
**Slika 23** Utjecaj otapala na ekstrakciju flavonoida iz ljuske crvenog luka

Na **Slici 24** prikazan je utjecaj otapala na ekstrakciju proteina iz ljuske crvenog luka primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima. Na slici je vidljivo kako je podjednaka količina proteina ekstrahirana primjenom 96, 75 i 50 % etanola i vode (0,41, 0,56, 0,66 i 0,66 % od ukupne mase uzorka). Primjenom sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima iz ljuske luka se ukupno ekstrahira 2,29 % proteina od ukupne mase uzorka što je u usporedbi sa sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom (**Slika 25**) samo trećina ekstrahiranih proteina.



**Slika 24** Utjecaj otapala na ekstrakciju proteina iz ekstrakta ljuske crvenog luka

Na temelju navedenih podataka može se zaključiti kako se manje polifenola i proteina ekstrahira primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima nego primjenom ultrazvučne sekvencijalne ekstrakcije. Količina flavonoida ekstrahiranih kontinuiranom sekvencijalnom ekstrakcijom u subkritičnim uvjetima je gotovo jednaka kao količina flavonoida ekstrahiranih ultrazvučnom sekvencijalnom ekstrakcijom.



**Slika 25** Usporedba sekvencijalne ultrazvučne i kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Najpogodnije otapalo za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz taloga kave je 25 % etanol.
- Najpogodnije otapalo za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju polifenola, flavonoida i proteina iz ljuske crvenog luka je 50 % etanol.
- Sekvencijalnom ultrazvučnom ekstrakcijom iz taloga kave se ekstrahira duplo više polifenola i proteina, te jedna trećina više flavonoida nego ultrazvučnom ekstrakcijom.
- Primjenom sekvencijalne ultrazvučne ekstrakcije ekstrahira se duplo više flavonoida, te trećina više polifenola i proteina iz ljuske crvenog luka.
- Više polifenola i flavonoida iz taloga kave ekstrahira se primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima nego primjenom sekvencijane ultrazvučne ekstrakcije, dok je količina ekstrahiranih proteina gotovo jednaka.
- Manje polifenola i proteina ekstrahira se iz ljuske crvenog luka primjenom kontinuirane sekvencijalne ekstrakcije u subkritičnim uvjetima nego primjenom ultrazvučne sekvencijalne ekstrakcije, dok je količina ekstrahiranih flavonoida gotovo jednaka.

## 6. LITERATURA

Battista F, Barampouti EM, Mai S, Bolzonella D, Malamis D, Moustakas K, Loizidou M: Added-Value Molecules Recovery and Biofuels Production from Spent Coffee Grounds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 131:110007, 2020.

Benítez V, Mollá E, Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, López-Andréu FJ, Cools K, Terry LA, Esteban RM: Characterization of Industrial Onion Wastes (*Allium cepa* L.): Dietary Fibre and Bioactive Compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* 66:48–57, 2011.

Benito-Román Ó, Blanco B, Sanz MT, Beltrán S: Freeze-dried extract from onion (*Allium cepa* cv. Horcal) skin wastes: Extraction intensification and flavonoids identification. *Food and Bioproducts Processing* 130:92-105, 2021.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.

Bravo J, Monente C, Juárez I, Peña MPD, Cid C: Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International* 50:610-616, 2013.

Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Disertacija*. Prehrambeno-tehološki fakultet, Osijek, 2008.

Campos-Vega R, Loarca-Pina G, Vergara-Castaneda HA, Oomah BD: Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* 45:24-36, 2015.

Chakraborty S, Shaik L, Gokhale JS: Subcritical Water: An Innovative Processing Technology. U *Innovative Food Processing Technologies* str. 552–566, Elsevier, 2020.

Cheng Y, Xue F, Yu S, Du S, Yang Y: Subcritical Water Extraction of Natural Products. *Molecules* 26:1-38, 2021.

Drmić H., Ježek-Jambrak A: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* 2:22-33, 2010.

El-Din SHS: Pharmacological and Antioxidant Actions of Garlic and - Or Onion in Non Alcoholic Fatty Liver Disease (Nafld) in Rats. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 44:295-308, 2014.

Gajić S: Određivanje mineralnog sastava gljiva *Lactarius deliciosus* i *Lactarius semisanguifluus*. *Master rad*. Prirodno-matematički fakultet, Niš, 2017.

Getachew AT, Cho YJ, Chun BS: Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water. *International Journal of Biological Macromolecules* 109:711–719, 2018.

Granados-Vallejo M, Andrews EH, Morales GMG, Solis HE, Guevara AE: Oxidative Stability of Green Coffee Oil (*Coffea arabica*) Microencapsulated by Spray Drying. *Processes* 7:734, 2019.

Haghighi A., Khajenoori M: Subcritical Water Extraction. U *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modelin* str. 459-487. InTechOpen, 2013.

Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez E: Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chemistry* 98:136-148, 2006.

Hoda S, Rashani S, Berisha K: Istraživanje oplemenjivanja magnezitne rude. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* 58:581-588, 2009.

Jaime L, Mollá E, Fernández A, Martín-Cabrejas MA, López-Andréu J, Esteban RM: Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:121-128, 2002.

Kataoka M, Wiboonsirikul J, Kimura Y, Adachi S: Properties of Extracts from Wheat Bran by Subcritical Water Treatment. *Food Science and Technology Research* 14:553–556, 2008.

Khajenoori M, Haghighi Asl A, Hormozi F, Eikani MH, Noori Bidgoli H: Subcritical water extraction of essential oils from *Zataria Multiflora boiss*. *Journal of Food Process Engineering* 32:804-816, 2009.

Kosir, D: Ekstrakcija eteričnog ulja i koncentrata iz smilja. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.

Kumar M, Barbhai MD, Hasan M, Punia S, Dhumal S, Radha, Rais N, Chandran D, Pandiselvam

R, Kothakota A, Tomar M, Satankar V, Senpathy M, Anitha T, Dey A, Sayed AAS, Gadallah FM, Amarowicz R, Mekhemar M: Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146:112498, 2022.

Mao Y, Gao Y, Dong W, Wu H, Song Z, Zhao X, Sun J, Wang W: Hydrogen production via a two-step water splitting thermochemical cycle based on metal oxide – A review. *Applied Energy* 267: 114860, 2020.

Marcus Y: Unconventional Deep Eutectic Solvents: Aqueous Salt Hydrates. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 5:11780-11787, 2017.

Matić P, Sabljic M, Jakobek L: Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *Journal of AOAC International* 100:1795-1803, 2017.

Milea SA, Aprodu I, Vasile AM, Barbu V, Răpeanu G, Bahrim GE, Stănciuc N: Widen the functionality of flavonoids from yellow onion skins through extraction and microencapsulation in whey proteins hydrolysates and different polymers. *Journal of Food Engineering* 251:29-35, 2019.

Mitra J, Shrivastava SL, Rao PS: Onion dehydration: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49:267-277, 2012.

Mourtzinou I, Prodromidis P, Grigorakis S, Makris DP, Biliaderis CG, Moschakis T: Natural food colourants derived from onion wastes: application in a yoghurt product. *Electrophoresis* 39:1975-1983, 2018.

Mufari JR, Gorostegui HA, Villa MPP, Bergesse AE, Calandri EL: Oxidative Stability and Characterization of Quinoa Oil Extracted from Wholemeal and Germ Flours. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 97:57-66, 2020.

Mujić I, Jokić S: Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina. Studio HS internet, Osijek, 2018.

Murthy PS, Madhava Naidu, M: Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review, *Resources, Conservation and Recycling* 66:45-58, 2012.

Mussatto SI, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA: Production, Composition and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* 4:661-672, 2011.

Reichardt C, Welton T: *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Wiley, 2010.

Rot T: Optimizacija procesa proizvodnje lješnjakovog ulja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Samsalee N, Sothornvit R: Physicochemical, functional properties and antioxidant activity of protein extract from spent coffee grounds using ultrasonic-assisted extraction. *AIMS Agriculture and Food* 6:864-878, 2021.

Sayes HS, Hassan NMM, El khalek MHA: The Effect of Using Onion Skin Powder as a Source of Dietary Fiber and Antioxidants on Properties of Dried and Fried Noodles. *Current Science International* 3:468-475, 2014.

Shahid M, Niazi NK, Dumat C, Naidu R, Khalid S, Rahman MM, Bibi I: A meta-analysis of the distribution, sources and health risks of arsenic-contaminated groundwater in Pakistan. *Environmental Pollution* 242:307-319, 2018.

Shirsath SR, Sonawanea SH, Gogate PR: Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53:10-23, 2012.

Shitu A, Izhar S, Tahir TM: Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: A review of recent work. *Global Journal of Environmental Science and Management* 1:255-264, 2015.

Smith JA, Ackerman AS, Jensen EJ, Toon OB: Role of deep convection in establishing the isotopic composition of water vapor in the tropical transition layer. *Geophysical Research Letters* 33:4-7, 2006.

Stjepanović M, Budžaki S, Velić N, Ostojčić M, Šereš Z, Maravić N, Brekalo M, Strelec I: Valorizacija i karakterizacija otpadne biomase crvenog luka. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije* str. 349-363. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2022.

Šušić I: Kemijski sastav "Karoma" kave i njenih nusproizvoda. *Diplomski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2020.

Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: *Jedinične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.



Uddin MN, Techato K, Rasul MG, Hassan NMS, Mofijur M: Waste coffee oil: A promising source for biodiesel production. *Energy Procedia* 160:677-682, 2019.

Viera VB, Piovesan N., Rodrigues JB, Mello RO, Prestes RC, Santos RCV, Vaucher RA, Hautrive TP, Kubota EH: Extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antimicrobial capacity of red onion skin (*Allium cepa* L.). *International Food Research Journal* 24:990-999, 2017.

Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D: Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:161 – 169, 2008.

Vinatoru, M: An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry* 8:303-313, 2001.

Vladić J, Janković T, Živković J, Tomić M, Zdunić G, Šavikin K, Vidović S: Comparative study of subcritical water and microwave-assisted extraction techniques impact on the phenolic compounds and 5-hydroxymethylfurfural content in pomegranate peel. *Plant Foods for Human Nutrition* 75:553-560, 2020.

Xu H, Wang W, Liu X, Yuan F, Gao Y: Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products* 76:946-954, 2015.

Yulianto ME, Amalia R, Paramita V, Hartati I, Nisa QAK: Mass Transfer Coefficient Study of Shogaol Extraction in Ginger Using Subcritical Water. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 771: 012039, 2020.

Zhang, Jixian, Chaoting Wen, Haihui Zhang, Yuqing Duan, and Haile Ma. Recent Advances in the Extraction of Bioactive Compounds with Subcritical Water: A Review. *Trends in Food Science and Technology* 95:183–195, 2020.