

# Primjena različitih tehnika ekstrakcije u obradi nusproizvoda prehrambene industrije

---

**Ervačić, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:109:300343>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**

REPOZITORIJ

**PTF**

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**

**Josipa Ervačić**

**PRIMJENA RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE U OBRADI  
NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2017.



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje

**Tema rada** je prihvaćena na VIII.redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 31. svibnja 2016.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Stela Jokić*

**Komentor:** doc. dr. sc. *Maja Molnar*

## PRIMJENA RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE U OBRADI NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE

*Josipa Ervačić, 337-DI*

**Sažetak:** Svaka industrija pa tako i prehrambena ima cilj proizvesti što kvalitetniji proizvod uz što bolje iskorištenje sirovine tj. uz minimalnu količinu otpada, gdje otpad ne mora nužno biti "otpad" već može predstavljati nusproizvod ili sirovinu u nekom budućem procesu. Danas postoji velik interes u iskorištenju nusproizvoda prehrambene industrije u različite svrhe jer sadrže mnoge potencijalno korisne tvari i zbog toga bi mogli predstavljati značajne sirovine u proizvodnji/razvoju novih proizvoda. U ovom radu proizvedeni su ekstrakti različitih nusproizvoda prehrambene industrije biljnoga podrijetla: unutarne pregrade oraha, kakao ljuska, pljevica kave, sjemenke grožđa Teran i Merlot, kožica grožđa, kora nara, koštice lubenice, koštice i peteljke trešnje, te sjemenke marelice, te je određeno njihovo antioksidacijsko i antibakterijsko djelovanje. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata određena je DPPH metodom. Antibakterijska aktivnost provedena je na četiri soja test bakterija: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, te je određena s obzirom na minimalne koncentracije inhibitora modificiranom metodom mikrodilucije supstrata. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je ekstrakt unutarne pregrade oraha (18,80 mg/mL), a najveću antibakterijsku aktivnost ekstrakti unutarne pregrade oraha i pljevica kave (0,0156 mg/mL - *E. coli*; 0,0156 mg/L - *P. aeruginosa*; 0,0078 mg/mL - *B. subtilis*; 0,0625 mg/mL - *S. aureus*). Nadalje, u radu je ispitan i utjecaj metode ekstrakcije (hladno prešanje i superkritična CO<sub>2</sub> ekstrakcija) na izolaciju ulja iz sjemenki marelice i sjemenki grožđa. U sjemenkama marelice naglasak je dan na udio amigdalina, a u sjemenkama grožđa na udjele polifenola koji su određeni primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Sastav masnih kiselina u dobivenim uljima je određen metodom plinske kromatografije s plamenim detektorom GC/FID. Ovaj rad doprinosi rješenju stvaranja velike količine organskog otpada koji danas predstavlja ogromni ekološki i financijski teret u gotovo svim granama prehrambene industrije.

**Ključne riječi:** nusproizvod, prehrambena industrija, aktivne komponente, ekstrakcija, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 57 stranica  
12 slika  
12 tablica  
0 priloga  
65 literaturne reference

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mate Bilić</i>       | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Maja Molnar</i>       | član-komentor |
| 4. doc. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 14. srpnja 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Process Design and Constructions Materials**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia  
**Graduate program Food Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technological Design

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session VIII. held on May 31st, 2016.

**Supervisor:** *Stela Jokić*, PhD, associate prof.

**Co-supervisor:** *Maja Molnar*, PhD, assistant prof.

### APPLICATION OF DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES IN THE PROCESSING OF FOOD INDUSTRY BY-PRODUCTS

*Josipa Ervačić, 337-DI*

**Summary:** Every industry, including food industry has the goal of obtaining the most quality product with the best possible use of raw materials, with the minimum amount of waste, where waste does not necessarily have to be "waste" but may represent a by-product or raw material in some future process. Nowadays, a tendency for reducing food industry waste is becoming more prominent due to a growing interest for utilization of food industry by-products for various purposes. These by-products contain many potentially useful substances and they could become significant raw materials in the production/development of new products. In this research, extracts of various food industry by-products of the plant origin have been produced: walnut partitions, cocoa bean shells, coffee parchment, Teran and Merlot grape seeds, grape skin, cherry seeds, watermelon seeds, apricot kernels, and their antioxidative and antibacterial activity is determined. Antioxidant activity of extracts was determined by DPPH method. Antibacterial activity was conducted against four test bacteria strains: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in terms of minimum inhibitory concentrations by a modified broth microdilution method. The highest antioxidant activity was determined in the extract of the walnut partitions (18.80 mg/mL), and the extracts of walnut partitions and coffee parchment (0.0156 mg/mL - *E. coli*, 0.0156 mg/mL - *P. aeruginosa*, 0.0078 mg/mL - *B. subtilis*, 0.0625 mg/mL - *S. aureus*) showed the highest antibacterial activity. Furthermore, the effect of the extraction method (cold pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction) on the isolation of apricot and grape seed oil was tested. In apricot seeds, emphasis is given to the content of amygdalin, and in grape seeds on polyphenols that are determined by the high performance liquid chromatography (HPLC). The fatty acid composition in the obtained oils was determined by the gas chromatographic method with the flame detector GC/FID. This paper offers a potential solution against generation of large amounts of organic waste, which represents a huge ecological and financial burden in almost all branches of food industry.

**Key words:** By-products, food industry, active components, extraction, antioxidant activity

**Thesis contains:** 57 pages  
12 figures  
12 tables  
0 supplements  
65 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Mate Bilić</i> , PhD, full prof.             | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, associate prof.       | supervisor   |
| 3. <i>Maja Molnar</i> , PhD, assistant prof.       | member       |
| 4. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, assistant prof. | stand-in     |

**Defense date:** July 14th, 2017

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

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Steli Jokić na stručnoj pomoći, mnogobrojnim savjetima, vodstvu, ukazanom povjerenju, razumijevanju i velikoj podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se komentorici doc. dr.sc. Maji Molnar na velikoj pomoći i svim savjetima pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim dragim prijateljima na vjeri u mene, nesebičnoj pomoći i podršci u svim trenutcima posebice kada mi je to najviše i trebalo.

Posebno hvala mojim roditeljima i sestrama na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, najvećoj podršci, vječnoj vjeri u mene i razumijevanju bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.



## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. NUSPROIZVODI PREHRAMBENE INDUSTRIJE .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Unutarnje pregrade oraha .....	6
2.1.2. Kakao ljuska .....	7
2.1.3. Komina grožđa .....	7
2.1.4. Sjemenke marelice .....	9
2.1.5. Pljevica kave .....	9
2.1.6. Koštice trešnje .....	10
2.1.7. Peteljke trešnje.....	10
2.1.8. Kora nara .....	11
2.1.9. Koštice lubenice.....	11
<b>2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE BILNOG MATERIJALA .....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Ekstrakcija organskim otapalima .....	12
2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima .....	13
2.2.3. Superkritični ugljikov dioksid .....	16
<b>2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....</b>	<b>18</b>
2.3.1. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	19
<b>4. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. ZADATAK .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. MATERIJALI .....</b>	<b>23</b>
4.2.1. Nusproizvodi .....	23
4.2.2. Reagensi.....	26
4.2.3. Uređaji .....	27



<b>4.3. METODE</b> .....	<b>27</b>
4.3.1. Hladno prešanje.....	27
4.3.2. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu .....	28
4.3.3. Proizvodnja ekstrakata postupkom maceracije .....	29
4.3.4. Ekstrakcija superkričnim CO <sub>2</sub> .....	30
4.3.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata .....	32
4.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata .....	32
4.3.7. Određivanje sastava masnih kiselina u ulju sjemenki marelice plinskom kromatografijom .....	33
4.3.8. Određivanje amigdalina u uzorcima sjemenki marelice HPLC metodom .....	34
4.3.9. Određivanje polifenola u uzorcima sjemenki grožđa HPLC metodom .....	35
<b>5. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>37</b>
5.1. REZULTATI .....	38
5.2. RASPRAVA.....	42
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>47</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>51</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

CO <sub>2</sub>	ugljičkov dioksid
$D$	koeficijent difuzije ili difuzivnost ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
$m$	masa uzorka (g)
SFE	ekstrakcija superkričnim fluidima ( <i>engl.</i> Supercritical fluid extraction)
$T$	temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
$T_c$	krična temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
$P$	tlak (bar)
$P_c$	krični tlak (bar)
NaOH	natrijev hidroksid
$F$	frekvencija okretaja pužnice (Hz)
$N$	veličina otvora preše (mm)
AMKC	amikacin sulfat

## 1. UVOD

Svjedoci smo kako se u zadnjih nekoliko desetljeća sve više pažnje pridaje zaštiti okoliša, što uključuje i iskorištavanje svega onoga što se dosad smatralo otpadom nastalim u svim granama industrije. Problemi poput porasta cijena mnogih sirovina i energije, te konstantno povećanje svjetske populacije dovode do sve većeg iskorištavanja nusproizvoda prehrambene industrije koji su se prijašnjih godina zbrinjavali kao otpad ili eventualno koristili kao hrana za stoku. Pozitivna strana toga je što su nusproizvodi jako dobar izvor funkcionalnih komponenti što je od velikog značaja i za proizvodnju funkcionalne hrane koja također sve više dobiva na važnosti. Porast potrebe za preradom nusproizvoda prehrambene industrije je utjecao i na sve veće zanimanje za nove tehnologije i usavršavanje dosadašnjih tehnologija kako bi sama prerada bila što učinkovitija. Samim time se počinju i koristiti razne tehnike ekstrakcije za izdvajanje bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda (Wijngaard i sur., 2012). Klasične tehnike ekstrakcije pri kojima se kao otapala većinom koriste voda, etil-acetat, etanol i metanol, su se do sada pokazale učinkovitima u izdvajanju određenih bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala, pri čemu polarnost otapala ima velik utjecaj na selektivnost samog procesa ekstrakcije. Naime, ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. *Supercritical fluid extraction-SFE*) predstavlja dobru alternativu dosadašnjem klasičnom tipu ekstrakcije sa organskim otapalima. Glavne prednosti su što ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) koji se koristi u procesu superkritične ekstrakcije zamjenjuje toksična organska otapala, te nije štetan za okoliš niti procesom ekstrakcije nastaju ekološki neprihvatljivi sekundarni produkti (Jokić, 2011). Nusproizvodi prehrambene industrije sadrže određene bioaktivne komponente koje su pri visokim temperaturama nestabilne i razgrađuju se. Primjena ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> predstavlja veliku prednost zbog vrlo blage temperature koja se primjenjuje prilikom procesa. Očuvanje bioaktivnih komponenti je izuzetno bitno jer upravo te komponente pokazuju vrlo dobra antioksidacijska i antimikrobna svojstva (Bail i sur., 2008).

Cilj provedenog istraživanja je bio primijeniti različite tehnike ekstrakcije u obradi odabranih nusproizvoda prehrambene industrije (unutarnje pregrade oraha, kakao ljuska, komina grožđa, sjemenke marelice, pljevica kave, koštice trešnje, peteljke trešnje, kora nara, koštice lubenice). U dobivenim ekstraktima se ispitala njihova antioksidacijska i antimikrobna aktivnost. Naglasak je bio na što većoj iskoristivosti nusproizvoda i očuvanju njihovih

bioaktivnih komponenti odnosno cilj je bio preraditi tzv. "otpad" u visoko profitabilne krajnje proizvode.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. NUSPROIZVODI PREHRAMBENE INDUSTRIJE

U nusproizvode se ubraja sav materijal, odnosno produkti koji zaostaju pri preradi sirovina biljnoga ili životinjskog podrijetla. Ovaj rad obuhvaća neke od nusproizvoda koji su isključivo biljnoga podrijetla i zaostaju nakon prerade voća ili povrća u industrijama. Svi nusproizvodi predstavljaju organski materijal koji je također vrlo iskoristiv i dalje primjenjiv, ali mu se do prije nekoliko godina nije davalo na važnosti. Godišnje nastaju velike količine krutog (ljuske, kora, sjemenke, lišće) i tekućeg otpada (otpadna voda) tijekom procesiranja biljnih sirovina u prehrambenoj industriji, a njihovo skladištenje, prerada ili zbrinjavanje predstavljaju ozbiljan ekološki i ekonomski problem. Velike količine nusproizvoda koji svakodnevno nastaju u većini slučajeva rješavaju se kroz odlagališta ili ishranu stoke. Stoga svaka industrija, pa tako i prehrambena ima cilj maksimalnog iskorištenja sirovine prilikom proizvodnje uz minimalnu količinu otpada, gdje otpad nije nužno „otpad“ već nusproizvod ili sirovina u nekom budućem procesu. Danas postoji veliki interes u korištenju nusproizvoda prehrambene industrije u različite svrhe jer sadrže mnoge potencijalno korisne tvari i zbog toga bi mogli predstavljati značajne sirovine u proizvodnji/razvoju novih proizvoda (Schieber i sur., 2001; O'Shea i sur., 2012). Upotreba nusproizvoda prehrambene industrije postala je izuzetno zanimljiva budući da predstavlja jeftinu i nutritivno vrijednu sirovinu, a samim time se utječe i na smanjenje otpada.

#### 2.1.1. Unutarnje pregrade oraha

Jezgra oraha ima visoku nutritivnu vrijednost, a nakon prerade oraha zaostaje nekoliko nusprodukata, unutarnje pregrade oraha, ljuska oraha, lišće i sl. koji su bogat izvor bioaktivnih komponenata poput fenolnih spojeva koji također imaju antioksidacijsko djelovanje (Popovici, 2013). Dok se ljuske oraha zbog svoje čvrste strukture koriste većinom u obradi otpadnih voda, unutarnje pregrade oraha nemaju široku primjenu, a njihovi ekstrakti bi se mogli koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao prirodni izvori antioksidanasa. Najzastupljeniji polifenoli u ljusci unutarnjim pregradama oraha su tanini. Polifenoli se iz prirodnih biljnih materijala većinom ekstrahiraju uz pomoć vode kao otapala pri temperaturama 40-90°C. Iako se voda najčešće koristi kao otapalo, mogu se koristiti još i vodene otopine etil-acetata, acetona, etanola, te metanola (Gironi i sur., 2010).



### 2.1.2. Kakao ljuska

Svjetska proizvodnja kakaa (*Theobroma Cacao*) u prosjeku godišnje iznosi oko 4,05 milijuna tona. Zemlje u Zapadnoj i Središnjoj Africi zauzimaju 71,4% od ukupne proizvodnje, te nakon prerade zrna kakaa dobiju 6,7 milijuna ukupnih nusproizvoda (kakao mahune, kakao ljuska, pogača i sl.) što je puno više u odnosu na masu finalnog proizvoda (Adamafio, 2013). Količina nusproizvoda je dosta velika, a ne može se koristiti u ishrani životinja, kao što se koristi većina drugih nusproizvoda biljnoga podrijetla, jer sadrži velik udio teobromina. Zrno kakaa, zajedno sa ljuskom, je prekriveno ljepljivim celuloznim slojem koji sadrži oko 10% reducirajućih šećera i 0,7% limunske kiseline. Takva zrna prolaze kroz proces fermentacije gdje sadržaj vlage zrna pada ispod 8%. Tijekom procesa fermentacije dolazi do stvaranja specifične tamno smeđe boje zbog oksidacije tanina. Kakao ljuska je bogat izvor tanina i teobromina, te vitamina D, odnosno prekursora vitamina D do čije aktivacije dolazi sušenjem kakao zrna na Sunčevoj svjetlosti (Knapp i Coward, 1935).

### 2.1.3. Komina grožđa

Grožđe je jedno od vrsta voća koje se uzgaja u skoro svim dijelovima svijeta i 46% od ukupnog uzgoja se koristi za proizvodnju vina (Annonymous, 1999). Pri proizvodnji vina nastaje velika količina nusproizvoda poput peteljki grožđa i komine koja uključuje 20-26% sjemenki grožđa. Komina grožđa predstavlja veliki problem zbog količine i svojih svojstava, prvenstveno zaostalih kiselina koje otežavaju postupak obrade, najčešće kompostiranja. Ukoliko se komina ne tretira propisno, može predstavljati veliki rizik za okoliš, počevši od površinskih i dubinskih zagađenja pa do neugodnih mirisa koji se razvijaju tijekom njezina stajanja. Naime, velike nakupine komine privlače štetočine i muhe te mogu dovesti do pojave i širenja raznih bolesti. Otopina tanina i ostalih komponenti vinske komine, koja se tijekom stajanja izdvaja, može prouzročiti smanjenje udjela kisika u tlu, ali može i prodrijeti u tlo i podzemne vode (Voća, 2010). Ukoliko se komina koristi kao gnojivo u vinogradima s vremenom bi dolazilo do zakiseljavanja tla vinograda, što opet predstavlja problem. Stoga se sve više pažnje posvećuje obradi otpada odnosno nusproizvoda vinarija koji se sastoji uglavnom od čvrstih bioprodukata (kožica, peteljki i sjemenki) koji čine prosječno 20-30 % mase prerađenog grožđa, a 15 % krutog otpada čine sjemenke grožđa. Njezina upotreba u

prehrambenoj industriji može pridonijeti smanjenju troškova proizvodnje kao i za razvoj novih proizvoda.

### 2.1.3.1 Sjemenke grožđa

Sjemenke grožđa imaju visok udio proteina te 10-20% ulja s visokim sadržajem vitamina E koji ima važan utjecaj na ljudsko zdravlje. Ulje sjemenki grožđa se uglavnom sastoji od triglicerida koji su bogati nezasićenim masnim kiselinama, točnije oleinskom u udjelu od 17,8 do 26,5% i linolnom od 60,1 do 70,1% koje su ujedno i esencijalne za ljudski metabolizam (**Tablica 1**) (Gokturk i Akkurt, 2001). Prilično visok udio tokoferola također pridonosi kvaliteti ulja jer sprječava oksidaciju ulja. Od ukupnih tokoferola najdominantniji je  $\gamma$ -tokorienol. Preostali udio tokoferola zauzimaju  $\gamma$ -tokoferol i  $\alpha$ -tokoferol (Balbino i sur., 2008).

**Tablica 1** Kemijski sastav sjemenke grožđa (Ribéreau – Gayon i Peynaud, 1986)

Sastojak	Udio (%)
Voda	25-45
Ugljikohidrati	34-36
Ulja	13-20
Tanini	4-6
Spojevi s dušikom	4-6,5
Minerali	2-4
Masne kiseline	1

### 2.1.3.2 Kožica grožđa

Kožica grožđa predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji od 6 do 10 slojeva stanica. Na vanjskom su dijelu stanice manje, a prema unutrašnjosti veće dok su im pregrade vrlo tanke. Zahvaljujući elastičnosti staničnih stjenki u toku porasta i sazrijevanja bobice, kožica povećava svoj volumen. Po kemijskom sastavu kožica je siromašna šećerima (0,7 –3,0 g/1000 bobica) a bogata je celulozom (1/4 do 1/5 suhe tvari) i netopljivim pektinima i proteinima (10 – 15%). U zelenoj kožici ima puno jabučne kiseline, koja se u periodu dozrijevanja smanjuje i onda ostaje dosta ujednačena. Kožica je bogata fenolima (kod crnih sorata duplo više u

odnosu na bijele), ali još uvijek količina je znatno manja nego u peteljci. Sadrži i taninske spojeve, čiju količinu u velikoj mjeri može smanjiti pojava plijesni na grožđu (Radovanović, 1986).

### 2.1.4. Sjemenke marelice

Plod marelice se u prehrambenoj industriji koristi u proizvodnji sokova, džemova, marmelada, voćnih kompoti te rakija, a koštica marelice zaostaje kao nusproizvod u svim navedenim procesima prerade. Sjemenka iz koštice marelice sadrži čak do 50% ulja (Zhang i sur., 2009). Znanstvena istraživanja pokazuju da je sjemenka marelice i ulje koje se dobije njenim prešanjem bogato bioaktivnim komponentama kao što su tokoferoli i fenolni spojevi (Turan i sur., 2007). Zbog vrlo visokog sadržaja polifenola ima jako antioksidacijsko djelovanje. Ulje dobiveno iz sjemenki marelica je bogato mononezasićenim i polinezasićenim kiselinama sa naglaskom na oleinsku kiselinu s prosječnim udjelom od 70-83% i linolnu kiselinu u prosjeku od 21,96%. Od ostalih masnih kiselina, palmitinska i stearinska zauzimaju mali udio od ukupnog sadržaja masnih kiselina (Erdogan-Orhan i Kartar, 2010). Također je utvrđena i prisutnost karotenoida od čega veći dio zauzima  $\beta$ -karoten i  $\gamma$ -karoten (Dragović-Uzelac i sur., 2007). Iako bogata brojnim bioaktivnim komponentama, konzumiranje sjemenki marelice može dovesti do kroničnog trovanja kod ljudi ili životinja ako se prekomjerno konzumira jer sadrži velike količine amigdalina (Silem i sur., 2006). Udio amigdalina u sjemenkama marelice je oko 3-4% te može porasti čak do 8%. Ako dođe do oštećenja sjemenke marelice, vrlo lako može doći i do enzimske razgradnje amigdalina što dovodi do stvaranja cijanida (Frohne i Pfander, 2005).

### 2.1.5. Pljevica kave

Brazil je vodeći proizvođač kave čija proizvodnja zauzima oko 30% ukupnog svjetskog tržišta. Kava je jedna od namirnica koja se konzumira u najvećim količinama u svijetu i naravno da s tim dolaze i velike količine nusproizvoda te industrije. Pljevica kave je tanka sjemena opna oko vanjskog sloja zelenih zrna kave, a glavni je nusproizvod koji nastaje u procesu prženja zrna kave. Ekstrakti pljevice kave dobar su izvor antioksidanasa poput različitih polifenola (Narita i Inouye, 2012). Ekstrakcija superkritičnim fluidima zbog svoje selektivnosti ima važnu

ulogu u obradi pljevice kave jer je, osim bioaktivnih komponenata, fitosterola, značajnih količina linolne kiseline, vlakana i polifenola, utvrđen i sadržaj ohratoksina A (OTA) te POP's-a (engl. *persistant organic pollutant*) koji pripada skupini organoklornih pesticida i imaju toksično djelovanje na ljudski i životinjski organizam (Toschi i sur., 2014). Ukupni antioksidacijski kapacitet je sličan vrijednostima drugih izvora antioksidanasa poput tamne čokolade, bilja i začina (Bresciani i sur., 2014).

### 2.1.6. Koštice trešnje

Godišnje se preradi oko 1,2 milijuna tona trešanja, većinom za proizvodnju raznih sokova, džemova, marmelada i sličnih proizvoda (FAOSTAT, 2014). Koštice trešanja predstavljaju nusproizvod koji ima visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina, posebice linolne i oleinske. Osim masnih kiselina kojima se većinom pridodaje sva važnost i od kojih su 45-47% polinezasićene masne kiseline, u sastav koštica trešnje ulaze i karotenoidi, fitosteroli te vrlo važan endogeni antioksidans skvalen. Svi od navedenih spojeva imaju mogućnost velike iskoristivosti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Gornas i sur., 2016). Prema nekim istraživanjima koja su do sada provedena, utvrđeno je da su u sastavu koštica trešnje zastupljeni još ugljikohidrati u najvećoj mjeri, te tokoferoli i vlakna. Također je utvrđen velik antioksidacijski potencijal i visoka koncentracija fenolnih spojeva (Santos i sur., 2014).

### 2.1.7. Peteljke trešnje

Nusproizvod koji zaostaje nakon prerade trešanja u sokove, marmelade, džemove i slične proizvode su, osim koštica, i peteljke trešanja. Peteljke trešanja također imaju visoki sadržaj antioksidacijskih spojeva, posebice flavonoida i tanina. U sastav peteljki još ulaze i tokoferoli, razne kiseline u malim udjelima, poput galne i askorbinske (Bursal i sur., 2013). Neka od istraživanja upućuju i na antimikrobna svojstva ekstrakta peteljki trešnje. Ekstrakti dobiveni primjenom etil-acetata kao otapala pokazuju znatno veće antimikrobno djelovanje u odnosu na ekstrakte koji su dobiveni pomoću nekih drugih otapala (Radovanović i sur., 2013). Budući da ekstrakti peteljki trešanja imaju antimikrobna svojstva i antioksidacijsko

djelovanje, pogodni su za uporabu u mnogim industrijama, poput prehrambene, kozmetičke i farmaceutske (Piccirillo i sur., 2013).

### 2.1.8. Kora nara

Nar je jedan od davnina poznatih plodova voća koji, u usporedbi sa ostalim sličnim voćem, sadrži najveću koncentraciju ukupnih polifenola. Tijekom industrijske prerade nara dobiju se velike količine nusproizvoda, kora i sjemenke i njihovo zbrinjavanje predstavlja problem za okoliš te se počinju razvijati različite metode prerade tih nusproizvoda. Dokazano je da ekstrakti nara posjeduju izuzetno antioksidacijsko, antibakterijsko i protuupalno djelovanje (Li i sur., 2014; Goula i Lazarides, 2015). Kora nara predstavlja najveći udio (40%) u nusproizvodima prerade nara i sadrži brojne bioaktivne komponente, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi (Singh i sur., 2002). Neka od istraživanja su pokazala da kora nara ima čak veći antioksidacijski potencijal od samoga soka (Li i sur., 2006).

### 2.1.9. Koštice lubenice

Koštice lubenice su jedan od nedovoljno iskorištenih nusproizvoda prerade povrća. Samo se vrlo mali dio koštica iskoristi, dok se veliki dio baca. Proteini i masti čine 3/4 ukupne mase koštice lubenice. Sadržaj ulja je 50-51%, a proteina 32-37%, ostatak čine umjerene količine minerala, željeza i cinka (Jyothi Lakshmi i Kaul, 2011). Ulje koštica lubenice sadrži visoko nezasićene masne kiseline (77-82%) zbog prisutnosti linolne kiseline (59-67,5%) i oleinske kiseline (14-18,1%) (Rai i sur., 2015). Ekstrakti koštica lubenice su bogatimikro i makronutrijenatima te mogu naći primjenu u mnogim prehrambenim proizvodima (Jyothi Lakshmi i Kaul, 2011).

## 2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE BILNOG MATERIJALA

Za brojne grane prehrambene industrije ekstrakcija predstavlja glavni separacijski proces, a podrazumijeva izdvajanje neke tvari iz krute ili tekuće smjese odabranim otapalom u kojemu je tvar koju izdvajamo topiva ili ima bolju topivost od ostalih sastojaka smjese. Razlikujemo

dva tipa ekstrakcije: kruto-tekuća i tekuće-tekuće, s obzirom na agregatno stanje obje faze. Ekstrakcija se temelji na molekularnoj difuziji odnosno izjednačavanju koncentracije otopljenih tvari koji u sustavu dođu u međusobni dodir. Princip ekstrakcije je opisan prvim zakonom A. Ficka (1):

$$N = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

gdje  $N$  (kg/s ili kmol/s) označava količinu i brzinu prijelaza mase,  $D$  (m<sup>2</sup>/s) koeficijent difuzije ili difuzivnost,  $c$  (kg/m<sup>3</sup> ili kmol/m<sup>3</sup>) masenu ili molnu koncentraciju, a  $x$  (m) udaljenost.

Proces ekstrakcije se može provesti kontinuirano ili diskontinuirano (šaržno) te polukontinuirano, dok se danas najčešće koristi kontinuirani tip procesa i najzastupljeniji je u industrijama proizvodnje šećera i ulja (Lovrić, 2003).

### 2.2.1. Ekstrakcija organskim otapalima

Ovaj tip ekstrakcije je jedna od najraširenijih tehnika pripreme uzoraka. Podrazumijeva otapanje cijelog ili dijela uzorka odgovarajućim otapalom te na taj način dolazi do odjeljivanja smjese tvari koje imaju različitu topljivost u otapalima koja se koriste u procesu ekstrakcije (Raynie, 2000).

Faze procesa ekstrakcije organskim otapalom:

- namakanje biljnog materijala u otapalu što dovodi do otapanja ekstraktibilnih tvari s površine razorenih stanica,
- prodiranje otapala u nerazorene stanice i otapanje tvari istovremeno,
- difuzija ekstraktibilnih tvari iz unutarnjeg dijela stanica na površinu i zatim sa površine čestica biljnog materijala u otapalo.

Nakon toga se provodi odvajanje faza, odnosno otapala sa ciljanom komponentom od uzorka tj. matice procesima filtracije, dekantiranja, centrifugiranja ili taloženja. Posljednji korak u procesu je uklanjanje otapala koje se provodi postupcima destilacije, uparavanja ili kristalizacije (Wiley, 2003).

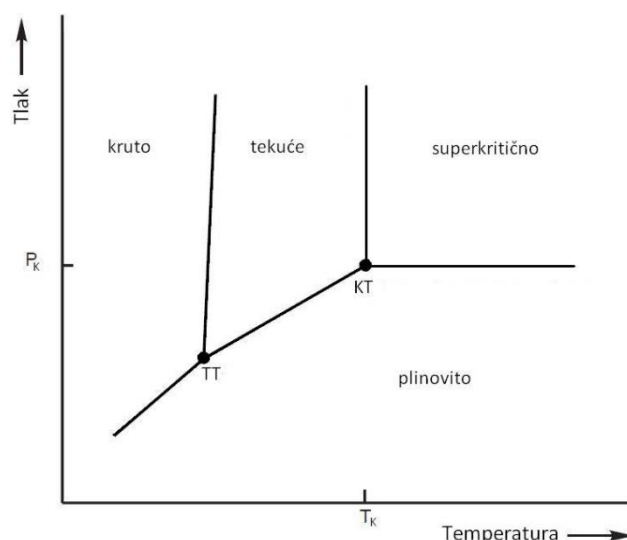
Ciljana komponenta koja se otapa mora imati veći afinitet prema otapalu nego prema matici iz koje se ekstrahira, zato je pravilan izbor otapala iznimno važan za ovaj proces i ovisi o karakteristikama komponente koja se podvrgava procesu ekstrakcije (Raynie, 2000).

Uvjeti pri izboru otapala:

- selektivnost,
- polarnost otapala,
- vrelište otapala bi trebalo biti što niže,
- stabilnost otapala, ne bi trebalo reagirati sa materijalom iz kojega se određene komponente ekstrahiraju,
- mala viskoznost,
- nezapaljivost,
- netoksičnost,
- cijena,
- mogućnost ponovne uporabe.

### 2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima ili SFE (engl. *Supercritical Fluid Extraction*) je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (**Slika 1**) (Aladić, 2015). Pojedini plinovi poput ugljikovog dioksida, propana, butana i sl. imaju veću sposobnost otapanja kada su komprimirani iznad kritične točke tlaka ili zagrijani iznad kritične temperature. Postupkom zagrijavanja ili komprimiranja iznad kritične točke plinovi se dovode u superkritično stanje u kojemu se ne nalaze niti u agregatnom stanju plina niti u stanju tekućine, ali imaju svojstva i plina i tekućine (Brunner, 2005).



**Slika 1** Fazni dijagram (tlak – temperatura) (Aladić, 2015)

U superkričnom stanju plin ima gustoću približno kao kapljevina iako se ne nalazi u tekućem stanju, koeficijent difuzije je dva reda veličine veći nego kod tipičnih tekućina i viskoznost je približna viskoznosti normalnih plinova (**Tablica 2**) (Brunner, 2005; Lovrić, 2003).

**Tablica 2** Fizikalno-kemijska svojstva za plinovito, tekuće i superkrično stanje fluida (Jokić, 2011)

<i>STANJE FLUIDA</i>	<i>Plin</i>	<i>Tekućina</i>	<i>Superkrični fluid</i>
Gustoća ( $\text{kgm}^{-3}$ )	1	300 – 900	1000
Koeficijent difuzije ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ )	$10^{-1}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$10^{-5}$
Viskoznost (Pa·s)	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$

Glavna prednost SFE u odnosu na klasične tipove ekstrakcije je mogućnost separacije temperaturno osjetljivih komponenti ili komponenti koje su slabo hlapive jer se proces provodi na umjerenim temperaturama (Skala i sur., 2002). Ostale prednosti SFE u odnosu na druge tipove ekstrakcije su sljedeće:



- superkritični fluidi kao i organska otapala imaju sposobnost otapanja, ali uz bolju difuziju, nižu viskoznost i manju površinsku napetost,
- separacija ekstrakta od otapala je brza i laka zbog mogućnosti regulacije topljivosti komponenata promjenom tlaka ili temperature,
- ekstrahiranje komponenti kojima je visoka temperatura vrelišta na nižim temperaturama,
- otapala koja se koriste za ekstrakciju superkritičnim fluidima su jeftina i sigurna za okoliš te je posebno u industrijskim procesima moguće i poželjno recikliranje otapala,
- bolja ekstrakcija termolabilnih komponenti uz minimalne deformacije komponenti,
- primjenjiva je na sustave različitih kapaciteta od analitičkih, preparativnih, poluindustrijskih do velikih industrijskih postrojenja (Jokić, 2011).

Proces SFE se odvija u nekoliko faza:

- difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje,
- prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala,
- kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari,
- difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice,
- difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida (Jokić, 2011).

SFE se temelji na direktnoj korelaciji topljivosti i gustoće koji su utvrđeni istraživanjima za superkritične fluide. Povećanjem tlaka dolazi do velike promjene gustoće plina i time se osigurava selektivnost pri procesu, a čim je faza otapanja završena, fluid se iz superkritičnog stanja prevodi u stanje tlaka nižeg od superkritičnog čime i gubi moć otapanja (Wakao i Kaguei, 1982).

Čimbenici koji utječu na proces SFE su:

- tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije i protok otapala,
- gustoća, viskozitet te difuzivnost otapala i supstance koja se ekstrahira,
- interakcije između molekula otapala, topljive supstance i netopljivog dijela krutog materijala u kome se nalazi topljiva supstanca, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije,
- dodatak različitih kootapala,
- oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica i poroznost sloja (Jokić, 2011).

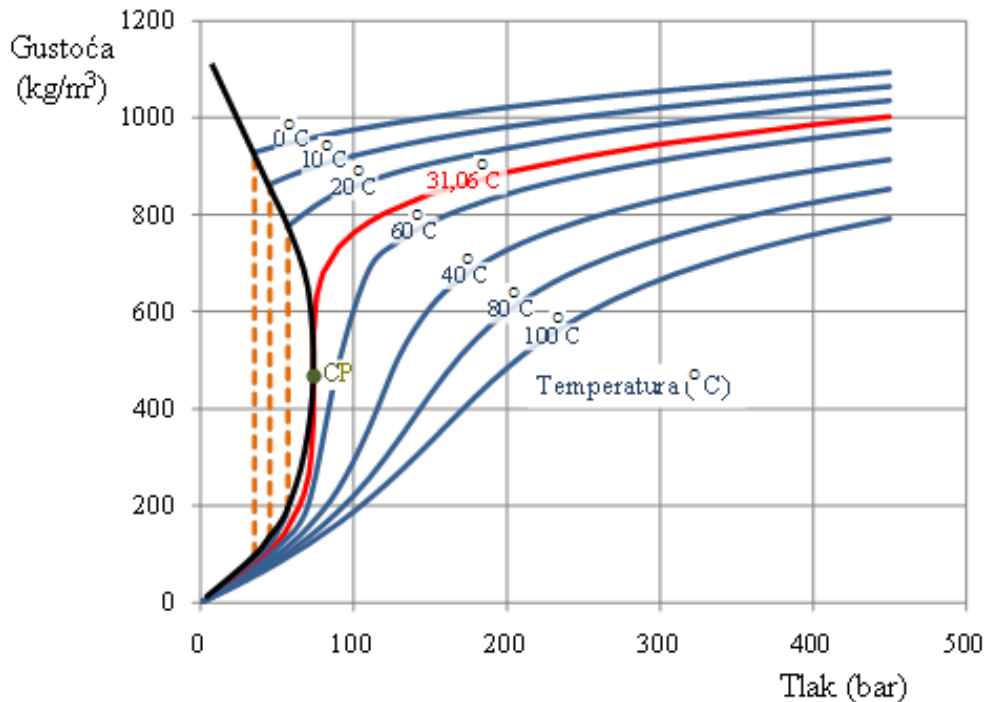
### 2.2.3. Superkritični ugljikov dioksid

Ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) se pokazao kao najpoželjnije otapalo za procese superkritične ekstrakcije jer zadovoljava sve uvjete na koje se treba obratiti pozornost pri izboru otapala, odnosno nije zapaljiv, bez okusa i mirisa, nije otrovan, ekološki je prihvatljiv, jeftin i lako dostupan u velikim količinama te ima nisku kritičnu temperaturu (31,3 °C pri kritičnom tlaku 72,9 bara). Osim CO<sub>2</sub> koriste se još etan, propan, butan i neki halogeni ugljikovodici (**Tablica 3**) (Aladić, 2015; Jokić, 2011; Lovrić, 2003).

**Tablica 3** Fizikalno-kemijska svojstva pojedinih superkritičnih fluida (Jokić, 2011)

OTAPALO	T <sub>c</sub> (K)	P <sub>c</sub> (MPa)	ρ <sub>c</sub> (gcm <sup>-3</sup> )
Metan	191	4,06	0,162
Etilen	282	5,03	0,218
Ugljikov dioksid	304	7,38	0,468
Dietil-eter	467	3,64	0,265
Heksan	507	3,05	0,23
Aceton	508	4,7	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Amonijak	405	11,3	0,225
Voda	647	22	0,322

Sposobnost otapanja CO<sub>2</sub> se mijenja promjenom temperature i tlaka u superkritičnom stanju, što utječe na promjenu u gustoći, a upravo promjena gustoće utječe na sposobnost otapanja (**Slika 2**) (Jokić, 2011).



**Slika 2** Ovisnost gustoće CO<sub>2</sub> o tlaku i temperaturi (Jokić, 2011)

Primjena SFE, posebice sa CO<sub>2</sub> kao otapalom, omogućuje dobivanje eteričnih ulja, biljnih ulja, eteričnih komponenti i komponenti sa antioksidacijskim i antimikrobnim djelovanjem (Aladić, 2015).

Ekstraktibilnost spojeva sa superkritičnim CO<sub>2</sub> ovisi o funkcionalnim skupinama koje se nalaze u tim spojevima te njihovoj molekularnoj masi i polarnosti. Najbolja učinkovitost korištenjem CO<sub>2</sub> kao otapala je pri ekstrakciji spojeva koji su nepolarni ili slabo polarni imale molekularne mase.

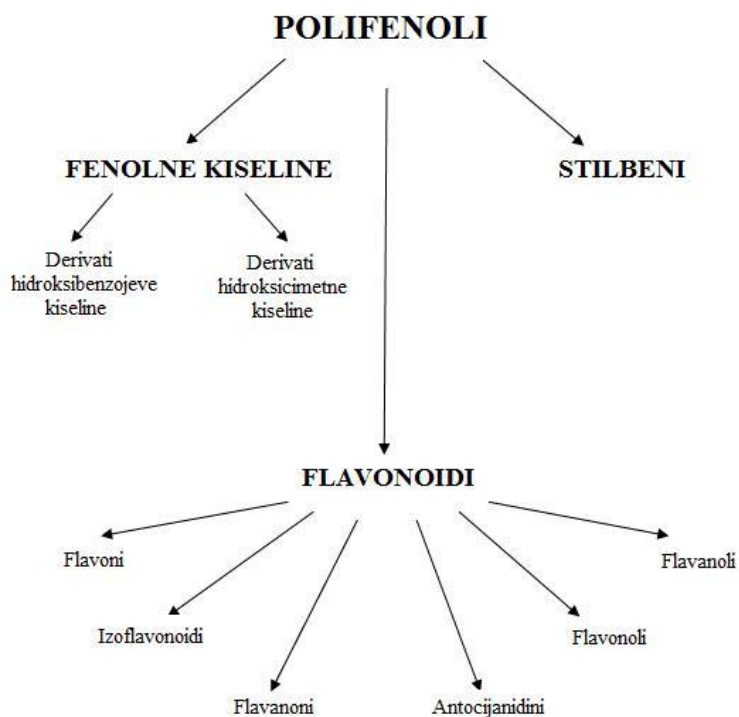
Pravila za snagu otapanja komponenti u superkritičnom CO<sub>2</sub>su sljedeća:

- otapa nepolarne ili blago polarne spojeve,
- velika snaga otapanja za spojeve male molekularne mase, koja se smanjuje povećanjem molekularne mase,
- kisikovi organski spojevi s niskom ili srednjom molekularnom masom su vrlo topljivi,

- proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli, voćne kiseline i glikozidi su netopljivi,
- superkritični CO<sub>2</sub> ima sposobnost odvajanja spojeva koji su manje isparljivi, imaju veću molekularnu masu i/ili su više polarni, s porastom tlaka,
- pigmenti su slabo topljivi,
- voda ima slabu topljivost (<0,5 % m/m) na temperaturama ispod 100 °C (Jokić, 2011; Brunner, 2005).

### 2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali. Slobodni radikali su podložni reakcijama s brojnim molekulama jer su energetski nestabilni i samim time vrlo reaktivni. Specifični su po tome što stvaraju lančane reakcije tj. jedan slobodni radikal potiče stvaranje drugog i ti novonastali spojevi također imaju karakteristike slobodnih radikala (Ghodbane i sur., 2013). Antioksidansi su pak tvari koje štite organizam od prooksidansa na način da ih uklanjaju uz stvaranje produkata koji nisu toksični i ne oštećuju stanice. Antioksidansi sprječavaju prooksidativno djelovanje na više načina: smanjenjem oksidativne sposobnosti prooksidansa, inhibicijom oksidativnih enzima i sl. (Segundo i sur., 2007). Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale i time štite stanice od njihovog toksičnog djelovanja što utječe i na sprječavanje negativnih učinaka oksidativnog stresa. Aktivnost antioksidansa ovisi o mnogim faktorima među kojima su najvažniji biodostupnost, oksidativni potencijal, brzina reakcije sa slobodnim radikalom te stabilnost i mala reaktivnost nastalog derivata antioksidans-slobodni radikal (Bisby i sur., 2008). Voće i povrće su veliki izvor prirodnih antioksidansa poput polifenola, karotenoida, vitamina i minerala. Današnjom prehranom većina ljudi ne unosi dovoljno voća i povrća i samim time antioksidansa u organizam pa se često poseže za suplementima koji sve više dobivaju na važnosti. Antioksidansi iz hrane imaju različite učinke i aktivnost te različiti afinitet prema određenim tvarima (Wotton-Beard i Ryan, 2011). Antioksidansi prirodnog podrijetla mogu biti: fenoli (flavonoidi, fenolne kiseline i tanini), tvari koje sadrže dušik (alkaloidi, derivati ciklopropila, aminokiseline, peptidi), karotenoidi, tokoferoli, vitamin C i njegovi derivati (**Slika 3**) (Shahidi, 2000).



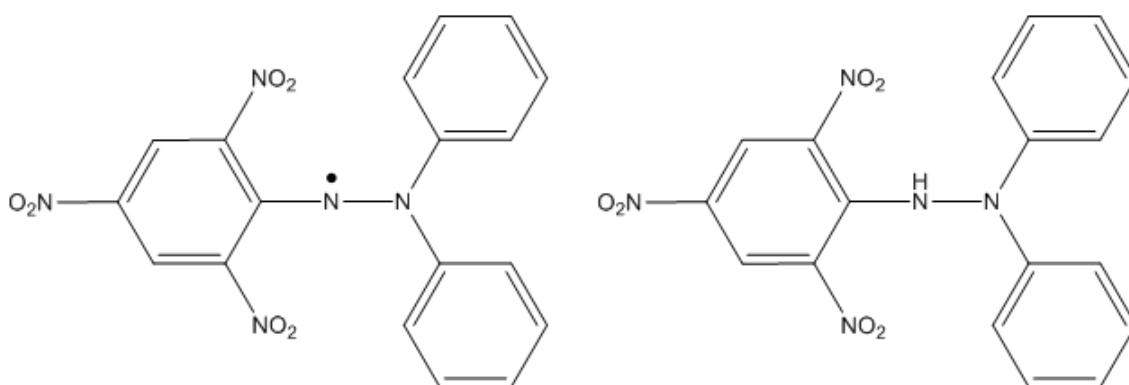
Slika 3 Opća podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2088)

### 2.3.1. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se različite metode, DPPH metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), TEAC metoda (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ABTS<sup>+</sup> metoda [radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)], FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) te u novije vrijeme i Briggs-Rauscher-ova (BR) metoda (Bečić i Polović; 2013). Najčešće primjenjivana metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti je DPPH metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i ona se temelji na određivanju reducirajuće sposobnosti antioksidansa prema DPPH radikalu. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala se određuje mjerenjem pada apsorbanije pri 515 – 528 nm ili elektronskom paramagnetskom rezonancijom. DPPH radikal je tamno ljubičaste boje i jedan je od rijetkih dušikovih radikala koji je stabilan zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu (De Magalhães, 2007). Ova metoda ovisi o otapalu, pH vrijednosti otapala i strukturi antioksidansa te može reagirati s fenolnim

spojevima putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona ovisno o polarnosti otapala. U polarnim otapalima poput etanola i metanola DPPH radikal preferira prijenos elektrona, a u nepolarnim otapalima oduzimanje vodika (Bondet i sur., 1997; Brand-Williams i sur., 1995).

Dodatkom antioksidansa otopini DPPH radikala dolazi do gubitka tamnoljubičaste boje, uslijed čega iz slobodnog radikala nastaje reducirani oblik odnosno difenilpikrilhidrazin koji je žute boje (**Slika 4**) (Molyneux, 2004).



**Slika 4** Struktura difenilpikrilhidrazila (lijevo) i difenilpikrilhidrazina (desno) (Molyneux, 2004)

Metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH radikala je izuzetno pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i posebice biljnim proizvodima. Provodi se na sobnoj temperaturi što je dodatna prednost ove metode jer ne dolazi do termalne degradacije molekula u uzorcima koji se ispituju (Bondet i sur., 1997).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale te na Katedri za kemiju i ekologiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

#### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- izvršiti ekstrakciju odabranih nusproizvoda (pregrade oraha, kakao ljuska, sjemenke grožđa Merlot i Teran, kožica grožđa Merlot, sjemenke marelice, pljevica kave, koštica trešnje, peteljke trešnje, kora nara, koštice lubenice) primjenom 50%-tne vodene otopine etanola kao otapala
- izvršiti ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa i sjemenki marelica pomoću superkritičnog CO<sub>2</sub> na laboratorijskom uređaju za SFE
- izvršiti ekstrakciju ulja iz sjemenki marelice hladnim prešanjem na pužnoj preši
- odrediti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ulja i ekstrakata koristeći DPPH metodu
- odrediti antibakterijsko djelovanje dobivenih ekstrakata na *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*
- odrediti udio amigdalina u uljima i ekstraktu sjemenki marelice tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography)
- odrediti udio polifenola u sjemenkama, ulju i ekstraktu grožđa Teran primjenom HPLC
- identificirati i kvantificirati masne kiseline u dobivenim uljima iz sjemenki grožđa i sjemenki marelice metodom plinske kromatografije s plamenim detektorom GC/FID (engl. Gas Chromatography with Flame Ionization Detector)



## 3.2. MATERIJALI





### 3.2.1. Nusproizvodi

Popis svih uzoraka nusproizvoda, sa informacijama o lokacijama sa kojih su prikupljeni, prikazan je u **Tablici 4**.





**Tablica 4** Popis nusproizvoda korištenih u radu


Uzorak	Lokacije/tvrtke sa kojih su uzeti uzorci	Slika uzorka
Unutarnje pregrade oraha	Vejinac- Velika Kladuša, BiH	
Kakao ljuska	Kandit d.o.o., Osijek	

### 3. Eksperimentalni dio

<p>Sjemenke grožđa (Teran)</p>	<p>Veleučilište u Poreču</p>	
<p>Sjemenke grožđa (Merlot)</p>	<p>Veleučilište u Poreču</p>	
<p>Kožica grožđa (Merlot)</p>	<p>Veleučilište u Poreču</p>	
<p>Sjemenke marelice</p>	<p>Pokusno polje- Velika Gorica</p>	

### 3. Eksperimentalni dio

<p>Pljevica kave</p>	<p>"Caffe-Monte" d.o.o., Žminj, Istra</p>	
<p>Koštica trešnje</p>	<p>Kaldir, Istra</p>	
<p>Kora nara</p>	<p>Metković</p>	
<p>Peteljke trešnje</p>	<p>Kaldir, Istra</p>	

Koštice lubenice	Trgovački centar Billa, Osijek (sjemenke su izvađene iz lubenice i osušene na Suncu)	
------------------	--	---

#### 3.2.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi, otapala i dr. materijali:

- Destilirana voda,
- *n*-heksan (J.T. Baker, Milano, Italija),
- CO<sub>2</sub> čistoće 99,97 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska),
- Kalijev hidroksid (Sigma-Aldrich, SAD),
- DPPH (Sigma-Aldrich, SAD),
- Etil-acetat (Sigma-Aldrich, SAD),
- Amigdalinal standard (Sigma-Aldrich, SAD),
- Supelco™ 37 Component FAME Mix (Bellefonte, Pennsylvania, SAD; engl. FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*),
- standardi polifenola (Sigma-Aldrich, SAD),
- Metanol p.a. (J.T. Baker, Milano, Italija),
- Etanol p.a. (J.T. Baker, Milano, Italija),
- TTC (2,3,5-trifeniltrazolium klorid),
- DMSO (dimetilsulfoksid),
- sojevi gram pozitivnih i gram negativnih bakterija su osigurani iz Zavoda za javno zdravstvo, Osijek.

#### 3.2.3. Uređaji

Korišteni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga (Denver instruments, Njemačka),
- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),
- Mlin (Janke & Kunkel, IKA labortechnik, Njemačka),
- Pužna preša (SPU 20, Senta, Srbija),
- SOXTHERM (Gerhart, Njemačka),
- Centrifuga (Sigma 2-16, Njemačka);
- Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO<sub>2</sub> (Osijek, Hrvatska),
- UV visible spektrofotometar Helios  $\gamma$ , (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).
- Plinski kromatograf 7890B (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
- HPLC (Agilent 1100-Series)
- Rotavapor (Buchi, R-210)
- Tresilica (HS260 control, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka)

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Hladno prešanje

Postupak hladnog prešanja koristio se samo u slučaju proizvodnje ulja iz sjemenki marelica zbog visokog sadržaja ulja u polaznoj sirovini. Hladno prešanje je provedeno na laboratorijskoj pužnoj preši tipa SPU 20 (ElektroMotor-Šimon d.o.o., Senta, Srbija). Uvjeti prešanja su bili sljedeći: frekvencija elektromotora je bila 20 Hz, veličina otvora glave preše 8mm i temperatura zagrijavanja glave preše 60 °C.



**Slika 5** Pužna preša tipa SPU 20 (Aladić, 2015)

Pužna preša (**Slika 5**) se sastoji od dozirnog lijevka, komore za prešanje (koja se sastoji od glave preše s promjenjivim otvorima za pogaču različitih promjera i to 6, 8, 9, 10 i 12 mm), puža preše, elektromotorom pogonjen reduktorski mehanizam s automatskom kontrolom broja okretaja, te grijač glave preše s automatskom kontrolom temperature grijanja. Sjemenke je u početku potrebno dodavati postupno kako bi se izbjeglo začepljenje glave preše. Kapacitet preše je promjenjiv i iznosi, ovisno o vrsti materijala koji se preša, te o stanju i udjelu vlage u materijalu koji se preša, između  $20\text{-}25\text{ kg h}^{-1}$ , prema navodima proizvođača.

#### 3.3.2. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu

Udio ulja u sjemenkama marelice i grožđa određen je metodom po Soxhlet-u u automatskom sustavu za ekstrakciju SOX THERM s *n*-heksanom (**Slika 6**).



**Slika 6** Soxhtherm ekstrakcijski uređaj za određivanje masti i ulja (Aladić, 2015)

Čaše za ekstrakciju su prethodno osušene ( $103 \pm 2$  °C) i izvagane s točnošću odvage 0,001 g te su u njih postavljeni tuljci u koje je odvagano uzorak ( $5 \pm 0,001$  g). U čaše je preko tuljaka uliveno 120 mL *n*-heksana. Vrijeme ekstrakcije iznosilo je 2 h i 45 min. Nakon ekstrakcije čaše su osušene na  $103 \pm 2$  °C kroz 1 h i potom izvagane. Sve analize su provedene u dva ponavljanja. Udio ulja izračunat je prema jednadžbi (2):

$$Udio\ ulja = \frac{m_3 - m_4}{m_5} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je:

$m_3$  – masa tikvice sa uljem (g),

$m_4$  – masa prazne tikvice (g),

$m_5$  – masa ispitivanog uzorka (g).

#### 3.3.3. Proizvodnja ekstrakata postupkom maceracije

Postupak je proveden prema Europskoj Farmakopeji (Ph. Eur. 5.0.) što podrazumijeva jednokratnu ekstrakciju propisano usitnjenog uzorka s propisanim otapalom pri sobnoj temperaturi tako što se uzorak samo prelije otapalom osim ako nije drugačije propisano. Potom se u dobro zatvorenoj posudi zaštićenoj od direktne sunčeve svjetlosti macerira pet dana uz mućkanje ili miješanje najmanje dvaput dnevno. Nakon toga se macerat odvoji od biljne sirovine filtriranjem. Uzorci (peteljke trešnje, sjemenke marelice, unutarnje pregrade oraha, sjemenke i kožica grožđa, pljevica kave, kakao ljska, kora nara i koštice lubenice) su samljeveni te je odvagano 20g svakog uzorka. Tih 20g svakog uzorka pojedinačno je zatim preliveno sa 100ml 50%-tne vodene otopine etanola (maseni omjer 1:5). Uzorci su ostavljeni na tamnom mjestu pet dana uz povremeno mućkanje nakon čega su filtrirani. Filtrati uzoraka su upareni pod vakuumom (**Slika 7**) pri čemu su dobiveni ekstrakti za koje je određena antioksidacijska i antibakterijska aktivnost.

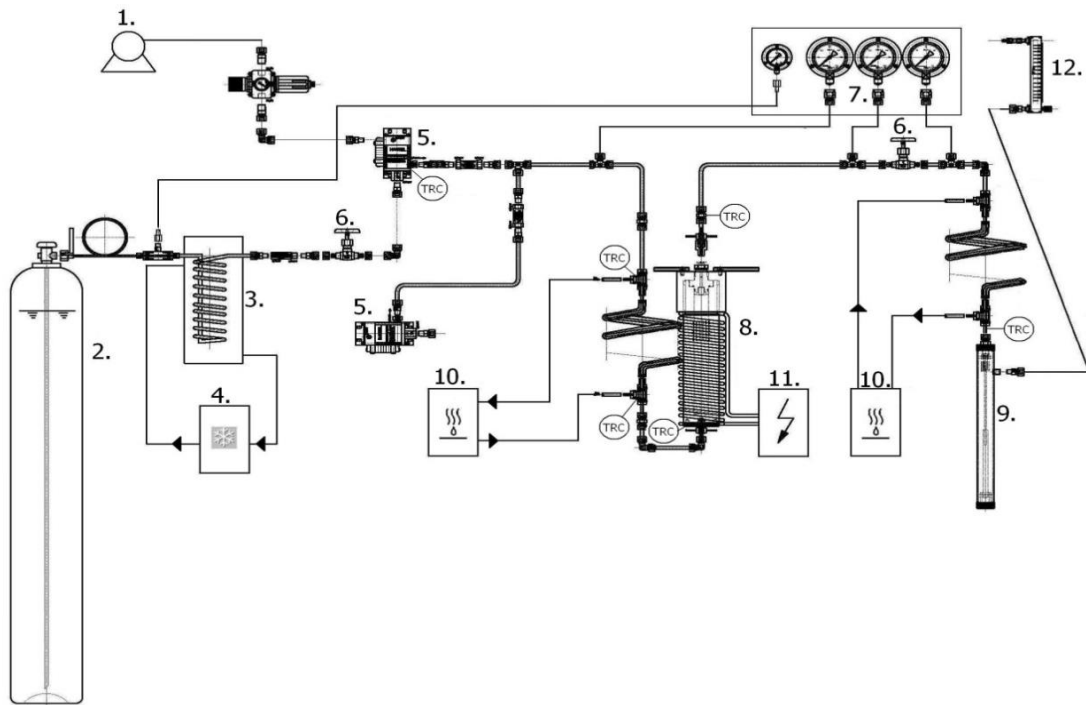


**Slika 7** Rotacijski vakuumski uparivač (Izvor: autor)

#### **3.3.4. Ekstrakcija superkričnim CO<sub>2</sub>**

Na odabrana dva uzorka nusproizvoda prehrambene industrije (sjemenke grožđa sorte Teran i sjemenke marelice) je provedena ekstrakcija ulja pomoću superkričnog CO<sub>2</sub>. Ekstrakcija je provedena u sustavu za SFE (**Slika 8i9**). Projektiranje, konstrukcija i izrada uređaja opisana je detaljnije u drugoj literaturi (Aladić, 2015; Jokić i sur., 2014). Uzorci su prvo samljeveni na laboratorijskom mlinu IKA A11 i od svakog uzorka je odvagano 100g te stavljeno u ekstrakcijsku kolonu. Proces ekstrakcije je trajao 90 minuta kod oba uzorka. Uvjeti u separatoru su bili 15 bara i 25 °C. SFE je provedena pri tlaku od 300bar i temperaturi od 40°C pri protoku CO<sub>2</sub> od 2 kg h<sup>-1</sup>. Ulje je skupljeno u prethodno izvagane staklene epruvete u separatoru. Izvagana je masa dobivenih ekstrakata/ulja nakon određenog vremena ekstrakcije korištenjem vage preciznosti ± 0,0001 g.





**Slika 8** Procesna shema uređaja za ekstrakciju superkričnim CO<sub>2</sub> (Aladić, 2015)

Kompresor, 2. CO<sub>2</sub> spremnik, 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika, 4. Rashladna kupelj, 5. Zrakom pognjena pumpa Haskel MS-71, 6. Ventili (B-HV), 7. Manometri, 8. Ekstraktor, 9. Separator, 10. Vodena kupelj, 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana, 12. Mjerač protoka



**Slika 9** Uređaj za superkričnu ekstrakciju (Aladić, 2015)

#### 3.3.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata

Antibakterijska aktivnost se procijenila u odnosu na minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) modificiranom mikrodilucijskom metodom prema Gui Wang (2010). Upareni ekstrakti su otopljeni u dimetilsulfoksidu (DMSO) u serijskim dvostrukim razrjeđenjima svakog ekstrakta (50 mL) i pripremljeni u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U svaku jažicu je dodana jednaka količina suspenzije ispitivanog mikroorganizma u Martin bujonu ( $\sim 10^5$  kolonija (CFU)/mL), radi postizanja konačne koncentracije u rasponu od 250 do 0,45  $\mu\text{g/ml}$ . Kao pozitivna kontrola ispitivan je amikacin sulfat, dok je DMSO korišten kao negativna kontrola. Tako priređena pločica inkubirana je na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacijskog perioda u svaku jažicu je dodano 50  $\mu\text{L}$  trifeniltetrazolijklorida. TTC (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride) reagens je korišten kao indikator reducirajućih tvari u podlozi što je vidljivo prema promjeni boje medija. Korišten je TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji 0,5 mg/mL. Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitane su nakon dodavanja TTC reagensa i dodatne inkubacije u trajanju tri sata na 37 °C. Rezultati su očitani golim okom. Naime, promjena boje uz pojavu zamućenja ili taloga na dnu mikrotitar pločice znak su rasta bakterija. Pojava taloga i promjena boje dodatno su uspoređene s kontrolnim jažicama. Najveće razrjeđenje uzorka pri kojem je došlo do pojave zamućenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog uzorka.

#### 3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost uzoraka ulja iz sjemenki grožđa i sjemenki marelice dobivenih SFE metodom i ekstrakata svih nusproizvoda dobivenih ekstrakcijom organskim otapalima te ulja koštica marelica dobivenog hladnim prešanjem određena je pomoću DPPH metode. Uzorci su otopljeni u metanolu ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a 1,20 mL otopljenog uzorka pomiješalo se s 0,5 mL 0,3 mM otopinom DPPH radikala u metanolu. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja. Nakon inkubacije 30 min na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija pri  $\lambda = 517 \text{ nm}$  i određena vezajuća aktivnost DPPH, prema izrazu (3):

$$\% \text{ DPPHaktivnost} = \frac{(A_{\text{DPPH}} + A_b) - A_s}{A_{\text{DPPH}}} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje su  $A_{DPPH}$  – apsorbancija kontrole (umjesto uzorka, dodan je metanol),  $A_b$  – apsorbancija uzorka, gdje je umjesto DPPH dodan metanol,  $A_s$  – apsorbancija uzorka pomiješanog s otopinom DPPH.

Na osnovi rezultata za %DPPH aktivnost za uzorke koji su pokazali %DPPH aktivnost iznad 50% je određen  $IC_{50}$ . Postupak je isti kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH, samo se za svaki uzorak bila pripravljena razrjeđenja različitih koncentracija. Vrijednost  $IC_{50}$  predstavlja koncentraciju ekstrakta koja je potrebna za inhibiranje 50% DPPH radikala.

#### **3.3.7. Određivanje sastava masnih kiselina u ulju sjemenki marelice plinskom kromatografijom**

Priprema metilnih estera masnih kiselina provedena je prema normi HRN EN ISO 5509:2000. Odvagano je 100 mg ekstrahiranog uzorka masti, dodano 10 mL heksana i mućkano je u tresilici dok se sva mast nije otopila. Za pripravu metilnih estera masnih kiselina, dodano je 200  $\mu$ L 2M metanolne otopine kalij hidroksida (bazno katalizirana transesterifikacija). Uzorci su mućkani 30 s, a nakon toga centrifugirani 15 min na 3000 rpm i temperaturi od 15°C. Prije injektiranja u plinski kromatograf, 200  $\mu$ L uzorka je filtrirano kroz PTFE filter. Pripravljene metilni esteri masnih kiselina analizirani su plinskom kromatografijom prema normi HRN EN ISO 5508:1995. Korišten je plinski kromatograf 7890B po temperaturnom programu prikazanom u **Tablici 5**.

Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja (engl. *retention time*) 37 metil estera masnih kiselina standardne smjese analizirane pri istim uvjetima. Uz uzorke i standard, pri svakoj analizi korišten je i certificirani referentni materijal, pripremljen i analiziran na isti način kao i uzorci. Rezultat je izražen kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline. Granica detekcije metode je bila 0,1%. Vrijednosti utvrđene u validacijskom postupku za parametar istinitosti su uspoređivane sa kriterijem definiranim Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i

tumačenju rezultata (NN 2/2005), koji za dokazivanje istinitosti pri udjelu mase >10 µg/kg može odstupati od -20 % do +10 % u odnosu na certificiranu vrijednost.

**Tablica 5** GC/FID uvjeti za određivanje sastava masnih kiselina

Kolona:	Kapilarna kolona HP88 100 x 0,25 mm x 0,20 µm (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
Detektor:	FID detektor
Autoinjektor:	Agilent 7683 A
Temperatura injektora:	250 °C
Volumen injektiranja:	1 µl
Split / splitless mod:	Split 1:50
Plin nosač i protok:	Helij 5.0; 2 ml/min
Temperaturni program:	120 °C, 1 min; 10 °C/min do 175 °C zadržavanje 10 min; 5 °C / min do 210 °C zadržavanje 5 min; 5 °C/min do 230 °C zadržavanje 5 min
FID parametri:	Helij 40 ml/min; Zrak 450 ml/min; Dušik 30 ml/min
Vrijeme uravnoteženja kolone između analiza:	2 minute na 120 °C

### 3.3.8. Određivanje amigdalina u uzorcima sjemenki marelice HPLC metodom

Postupak je proveden s (Agilent 1100-Series HPLC sustavom koji se sastoji od UV detektora) Agilent Technologies 1290 Infinity HPLC s DAD detektorom s mogućnošću podešavanja valnih duljina i automatskog uzimanja uzoraka. Detektor je podešen na 210 nm, a površine pikova su automatski integrirane pomoću računalnog programa za analizu podataka, Agilent HPLC Data Analysis. Separacija je provedena pri sobnoj temperaturi pomoću kolone Agilent Eclipse XDB-C18 5µm; 4,6 X 250mm (Supleco Analytical HS-C18 kolone (4,6 x 250 nm, 5µm)). Svi izračuni koji se odnose na kvantitativnu analizu provedeni su vanjskom standardizacijom mjerenjem pikova. Uvjeti pri kojima je provedena kromatografija: RP-HPLC analiza je

provedena izokratskim ispiranjem sa brzinom protoka od  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , mobilnu fazu su činile voda:acetonitril (25:75 v/v).

#### **3.3.9. Određivanje polifenola u uzorcima sjemenki grožđa HPLC metodom**

Postupak je također proveden s (Agilent 1100-Series HPLC sustavom koji se sastoji od UV detektora) Agilent Technologies 1290 Infinity HPLC s DAD detektorom s mogućnošću podešavanja valnih duljina i automatskog uzimanja uzoraka. Površine pikova su automatski integrirane pomoću računalnog programa za analizu podataka, Agilent HPLC Data Analysis. Priprema uzoraka je provedena na način da je otopljeno 100 mg uzorka u 1 ml izopropanola te je dodan 1 ml mobilne faze. Dobivena mutna otopina je filtrirana kroz  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  filter. Mobilna faza: 85%  $\text{H}_2\text{O}$ , 15% acetonitril  $0,1 \text{ ml H}_3\text{PO}_4$ . Stacionarna faza: Phenomenex, C18, Luna,  $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ , 100 Å. Standardi ne pokazuju tendenciju da se apsorbiraju.



#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. REZULTATI

**Tablica 6** Dobivene vrijednosti %DPPH ekstrakata odabranih nusproizvoda dobivenih ekstrakcijom 50%-tnom otopinom etanola i ulja dobivenih SFE i hladnim prešanjem

Uzorak	%DPPH	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Unutarnje pregrade oraha	93,1	18,8
Kakao ljuska	12,4	-
Sjemenke grožđa (Merlot)	93,4	*NO
Sjemenke marelice	0	-
Kožica grožđa (Merlot)	95,3	*NO
Pljevica kave	28,8	-
Košnice trešnje	0	-
Sjemenke grožđa (Teran)	94,2	14,8
Peteljke trešnje	93,4	7,1
Kora nara	95,2	12,96
Košnice lubenice	16,1	-
Ulje sjemenki grožđa Teran (SFE)	0,5	-
Ulje sjemenki marelice (SFE)	2,4	-
Ulje sjemenki marelice (hladno prešano)	0	-

\*NO - nije određeno

**Tablica 7** Antibakterijska aktivnost ekstrakata odabranih nusproizvoda dobivenih ekstrakcijom 50%-tnom vodenom otopinom etanola

MIC/ mg/ml	G-				G+			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
AMKC (amikacin sulfat)	0,0002 4	0,0002 44	0,00097 65	0,00097 65	0,0009 765	0,0009 765	0,0009 765	0,0009 765
Unutarnje pregrade oraha	0,0156	0,0156	0,0156	0,0156	0,0078	0,0078	0,0625	0,0625
Kakao	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313	0,0078	0,0078

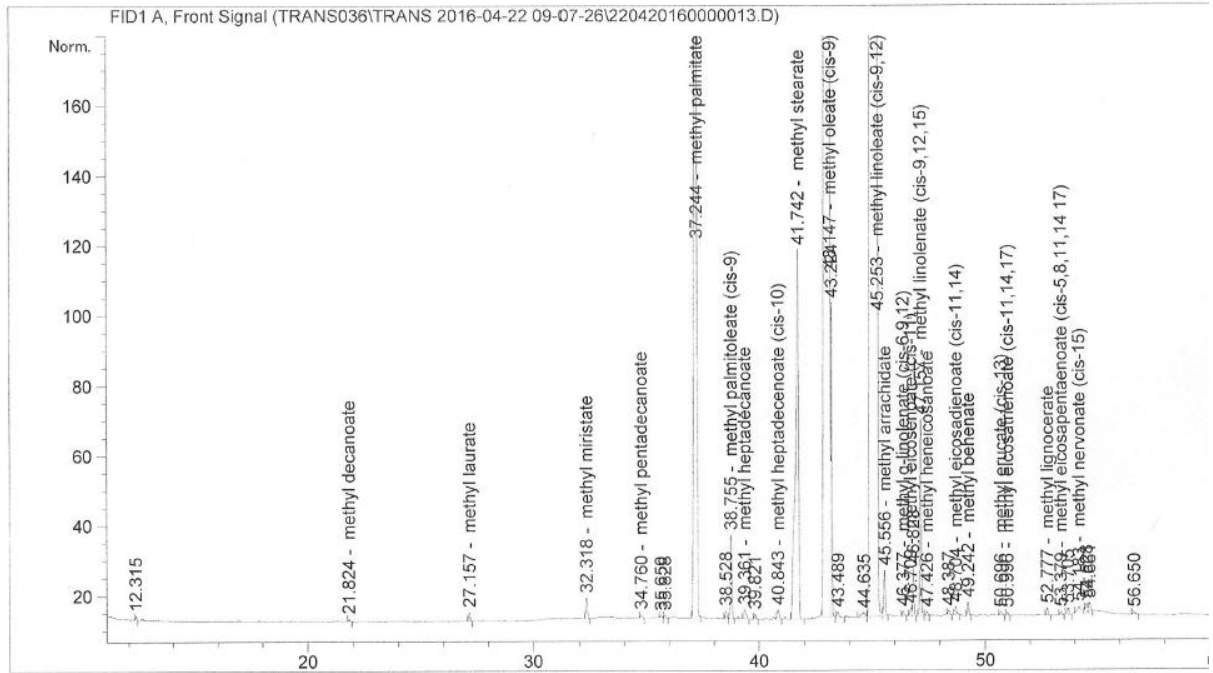


#### 4. Rezultati i rasprava

Ijuska								
Sjemenke grožđa (Mrelot)	0,2500	0,2500	0,1250	0,1250	0,0078	0,0078	0,0156	0,0156
Sjemenke marelice	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313
Kožica grožđa (Merlot)	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313
Pljevica kave	0,0156	0,0156	0,0313	0,0313	0,0156	0,0156	0,0625	0,0625
Košnice trešnje	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
Sjemenke grožđa (Teran)	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313
Peteljke trešnje	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
Kora nara	0,0313	0,0313	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0078	0,0078
Košnice lubenice	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313	0,0625	0,0625	0,0313	0,0313

**Tablica 8** Udio ulja iz odabranih uzoraka dobiven različitim tehnikama ekstrakcije

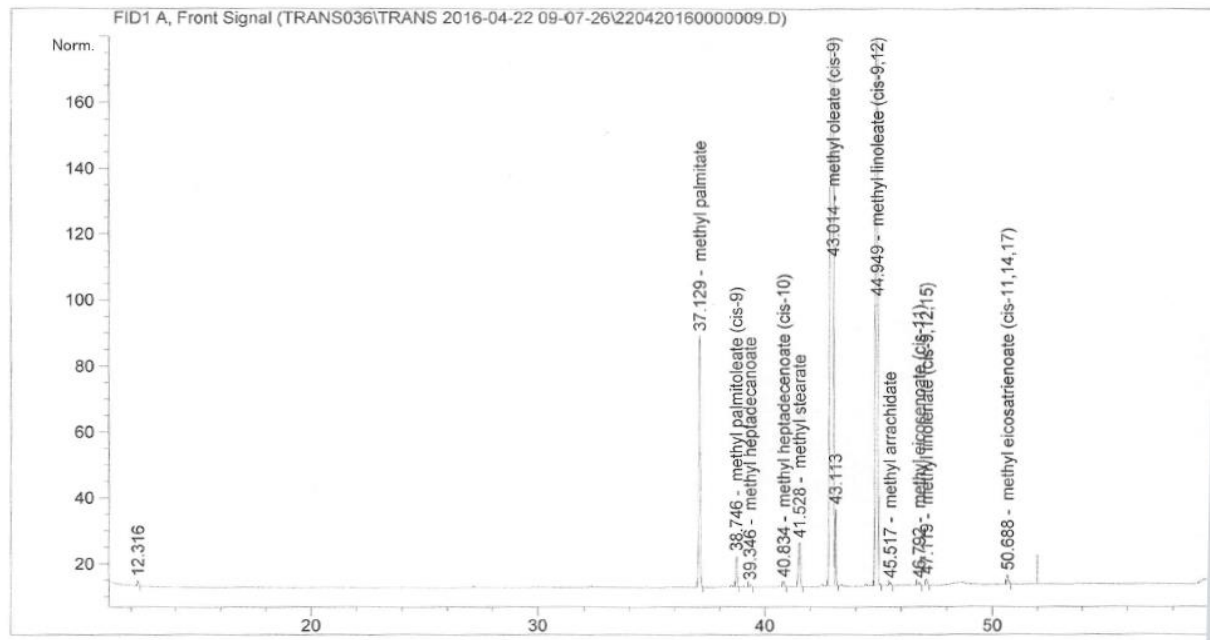
Uzorak	Tip ekstrakcije	Udio ulja
Sjemenke marelice	Soxhlet ekstrakcija	43,49%
	hladno prešanje	34,72%
	SFE	43,06%
Sjemenke grožđa Teran	Soxhlet ekstrakcija	13,91%
	SFE	13,36%



Slika 10 Kromatogram masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa Teran dobivenog SFE



Slika 11 Kromatogram masnih kiselina u ulju sjemenki marelice dobivenog hladnim prešanjem



Slika 12 Kromatogram masnih kiselina u ulju sjemenki marelice dobivenog SFE

Tablica 9 Sastav masnih kiselina u ulju sjemenki marelice

Naziv	Ulje dobiveno hladnim prešanjem	Ulje dobiveno SFE
Palmitinska kiselina	4,98%	5,82%
Stearinska kiselina	1,41%	1,29%
Oleinska kiselina	63,35%	60,80%
Linolna kiselina	29,16%	30,72%

Tablica 10 Sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa sorte Teran dobivenog SFE

Naziv	Ulje dobiveno SFE
Palmitinska kiselina	8,26%
Stearinska kiselina	3,01%
Oleinska kiselina	26,56%

Linolna kiselina	60,30%
------------------	--------

**Tablica 11** Rezultati HPLC analiza amigdalina u ekstraktu i ulju sjemenki marelice dobivenog različitim tehnikama ekstrakcije

Tip ekstrakcije	Udio amigdalina
Ekstrakcija 50%-tnom vodenom otopinom etanola	5,0 mg/g ekstrakta
Hladno prešanje	0,40 mg/g ulja
SFE	0,20 mg/g ulja

**Tablica 12** Rezultati HPLC analiza polifenola za ulje i dobiveni ekstrakt iz sjemenki grožđa Teran

	Galna kiselina (mg/L)	Katehin (mg/L)	Procianidin B (mg/L)	Epikatehin (mg/L)
Teran (SFE ulje)	8,1	0	0	0
Teran (ekstrakt)	235,6	271,82	141,77	105,50

## 4.2. RASPRAVA

U ovom radu su proizvedeni ekstrakti različitih nusproizvoda prehrambene industrije te je određeno njihovo antioksidacijsko i antibakterijsko djelovanje.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih primjenom 50%-tne vodene otopine etanola iz svih nusproizvoda prehrambene industrije (unutarnje pregrade oraha, kakao ljuska, pljevica kave, sjemenke grožđa Teran i Merlot, kožica grožđa, kora nara, koštice lubenice, koštice i peteljke trešnje, te sjemenke marelice), hladno prešanog ulja sjemenki marelice i ulja dobivena superkričnom CO<sub>2</sub> ekstrakcijom iz sjemenki marelice i sjemenki grožđa odabrane sorte Teran je određena pomoću DPPH metode te je iz **Tablice 6** vidljivo da dobiveni ekstrakti pokazuju znatno bolje vrijednosti (12,4-95,3%) za antioksidacijsko

djelovanje od ulja iz istih polaznih sirovina (npr. sjemenke grožđa, sjemenke marelice) kod kojih su te vrijednosti izrazito niske (0-2,4%). Najbolja antioksidacijska svojstva su pokazali ekstrakti unutarnjih pregrada oraha, sjemenki grožđa Teran, kožice grožđa, peteljki trešnje i kore nara te je za te uzorke još dodatno odrađen  $IC_{50}$  kako bi im se odredila koncentracija koja je potrebna za inhibiranje 50% DPPH radikala što znači da je antioksidacijska aktivnost viša što je niža vrijednost  $IC_{50}$  analiziranog uzorka. Rezultati se kreću u intervalu 7,1-18,8 mg/mL. Kod drugih autora vrijednost  $IC_{50}$  iznosi 2,89  $\mu$ g/mL (Hao i sur., 2009) u uzorcima sjemenki grožđa što je približno rezultatu od 14,8 mg/mL koji je dobiven u ovom radu za ekstrakte sjemenki grožđa Teran. Uzorci kožice i sjemenki grožđa Merlot pokazali su velika odstupanja tj. pokazali su veliki %DPPH (95,3% i 93,4%) dok  $IC_{50}$  nije određen (**Tablica 6**), te iz toga proizlazi mogućnost da s vremenom ili pod utjecajem sunčeve svjetlosti gube antioksidacijsku aktivnost, tj. smanjuje im se antioksidacijski kapacitet. Yilmaz (2004) također upućuje na smanjenu antioksidacijsku aktivnost sjemenki i kožice grožđa Merlot u odnosu na antioksidacijsku aktivnost vina i soka od istog.

Iz **Tablice 7** je vidljivo da uzorci ekstrakata unutarnjih pregrada oraha i pljevice kave pokazuju vrlo dobru antimikrobnu aktivnost prema svim ispitivanim bakterijama, Gram pozitivnima i Gram negativnima, točnije najbolju antimikrobnu aktivnost pokazuju ekstrakti unutarnjih pregrada oraha (0,0156 mg/ml - *E. coli*; 0,0156 mg/ml - *P. aeruginosa*; 0,0078 mg/ml - *B. subtilis*; 0,0625 mg/ml - *S. aureus*). Ostali uzorci nisu pokazali toliko značajnu antimikrobnu aktivnost za sve ispitivane bakterije, iako su neki od uzoraka imali visoke vrijednosti antimikrobne aktivnosti prema određenim bakterijama, kao što su npr. sjemenke grožđa (Merlot) za *Bacillus subtilis* (0,0313 mg/mL) ili peteljke trešnje za *Staphylococcus aureus* (0,0625 mg/mL). Rezultati su slični rezultatima koje su dobili Pereira i sur. (2007) gdje su ekstrakti unutarnjih pregrada oraha također pokazali veliku antibakterijsku aktivnost, posebice prema Gram negativnim bakterijama.

U daljnjem istraživanju željelo se utvrditi kako pojedina tehnika ekstrakcije utječe na iskorištenje ulja pa je shodno navedenom, primjerice u sjemenkama marelice ispitano tri metode ekstrakcije (ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu, ekstrakcija hladnim prešanjem, SFE).

Pomoću *n*-heksana, koji je organsko otapalo, u aparaturi po Soxhletu je dobiveno 43,49% ulja dok je primjenom hladnog prešanja dobiveno 34,72% ulja (**Tablica 8**). Postupkom

superkritične CO<sub>2</sub> ekstrakcije vidljivo je gotovo potpuno iskorištenje ulja iz polazne sirovine (udio ekstrahiranog ulja je iznosio 43,06%). Iz svega navedenog može se zaključiti da suvremene tehnike ekstrakcije pomoću CO<sub>2</sub> kao zelenog i netoksičnog otapala omogućavaju visoka iskorištenja, ali i dobru kvalitetu ulja. Dobivena količina ulja iz sjemenki marelice u aparaturi po Soxhletu, točnije 43,49% je slična onoj drugih autora koji navode da količina ulja koja se može dobiti iz sjemenki marelice doseže vrijednosti 48-50% (Kaya i sur., 2008) te 50% (Zhang i sur., 2009). Također, Matthaus i Ozcan (2015) navode da je dobiveni udio ulja primjenom Soxhlet metode bio 45,2%.

Sastav i udio pojedinih masnih kiselina (**Tablica 9**) u sjemenkama marelice je očekivan, odnosno najzastupljenija je oleinska (63,35%) te potom linolna (29,16%), palmitinska (4,98%) i stearinska (1,41%), te do približno istih rezultata dolaze i drugi autori (Lazos, 1991). Iz **Tablice 9** je također vidljivo da se u ulju dobivenom SFE dobiju nešto veći udjeli pojedinih masnih kiselina u odnosu na ulje dobiveno hladnim prešanjem.

Postupkom hladnog prešanja se na navedenom modelu pužne preše zbog relativno malog udjela ulja u polaznoj sirovini (sjemenkama grožđa sorte Teran) nije moglo dobiti ulje te je na ovom uzorku provedena samo SFE ekstrakcija. Najzastupljenije masne kiseline u ulju dobivenom SFE ekstrakcijom su linolna (60,30%), oleinska (25,56%) i palmitinska (8,26%) (**Tablica 10**). Udio ekstrahiranog ulja pomoću SFE iznosi 13,36%, a u radu Bijuk (2015) također je pokazano gotovo potpuno iskorištenje ulja primjenom SFE (14,96% za sjemenke grožđa sorte Cabernet Franc).

HPLC metodom je određen udio amigdalina u ulju sjemenki marelice dobivenog pomoću superkritičnog CO<sub>2</sub> i hladnim prešanjem te u ekstraktu sjemenki marelice koji je dobiven ekstrakcijom sa 50%-tnom vodenom otopinom etanola kako bi se utvrdilo koliko amigdalina prelazi iz same sjemenke u ulje. Rezultati mjerenja (**Tablica 12**) ukazuju na to da je udio amigdalina najveći u ekstraktu dobivenom sa ekstrakcijom s 50%-tnom vodenom otopinom etanola (5,0 mg/g ekstrakta). Prema drugim autorima (Frohne i Pfander, 2005) udio amigdalina u sjemenkama marelice iznosi 3-4%, a s porastom veličine i mase sjemenki može doseći i 8%. Prema tome, vrijednosti dobivene u ovom radu su sukladne vrijednostima drugih autora budući da je dobiveni udio amigdalina iznosio 0,20 mg/g u ulju dobivenog pomoću superkritičnog CO<sub>2</sub> pa do 5,0 mg/g u samim sjemenkama. Ulje sjemenki marelice je

bogato amigdalinom (Silem i sur., 2006) koji je i najzastupljenija aktivna komponenta u navedenom ulju. Iako se tvrdi da amigdalin (vitamin B17) ima vrlo povoljna djelovanja na naš organizam, neka od istraživanja tvrde da u većim količinama može biti vrlo opasan za zdravlje budući da enzimatskom razgradnjom amigdalina dolazi do stvaranja cijanida (Frohne i Pfander, 2005).

Također, tradicionalnim metodama, poput metode hladnog prešanja (**Tablica 8**) ulja iz sjemenki marelice se dobije manji udio ulja (34,72%) i nizak udio amigdalina (0,40 mg/g ulja) (**Tablica 11**) u odnosu na druge metode (Katea i sur., 2014). Metodom u aparaturi po Soxhletu se dobije 43,49%, a SFE metodom 43,06% ulja što ukazuje na gotovo potpuno iskorištenje ulja primjenom suvremene zelene tehnike ekstrakcije pomoću CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju.

Količine polifenola u ulju i ekstraktu iz sjemenki grožđa Teran su određene HPLC analizom (**Tablica 12**). Od polifenola, u ulju dobivenim SFE je određena tj. detektirana jedino galna kiselina (8,1mg/L) dok su u ekstraktu određene galna kiselina (235,6 mg/L), katehin (271,82 mg/L), procianidin B (141,77 mg/L) i epikatehin (105,50 mg/L). Lisica (2016) je primjenom HPLC dobio 10,98 mg/100g s.t. za galnu kiselinu, 93,13 mg/100g s.t. za katehin, 17,65mg/100g s.t. za procianidin B i 41,00 mg/100g s.t. za epikatehin. Razlog u različitim rezultatima između autora može biti drugačije vrijeme ekstrakcije kao i temperatura prilikom ekstrakcije budući da oni imaju utjecaj na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva. Povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije, jer dolazi do povećanja topljivosti komponenata u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije (Spigno i De Faveri, 2007), dakle, predugo vrijeme trajanja ekstrakcije i visoka temperatura pospješuju oksidaciju fenolnih spojeva što dovodi do smanjenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu.

Ovim istraživanjem se pokazala odlična mogućnost korištenja SFE u proizvodnji ulja iz nusproizvoda biljnoga podrijetla prehrambene industrije. Uzevši u obzir nastojanje da se poveća iskoristivost velike većine procesa u ovim prehrambenim industrijama te samim time i poveća isplativost cjelokupnog procesa, SFE predstavlja ekonomski povoljan i učinkovit proces obrade nusproizvoda.





## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Ekstrakti unutarnjih pregrada oraha i pljevice kave su pokazali najbolju antimikrobnu aktivnost prema svim ispitivanim bakterijama, dok su neki uzorci pokazali u prosjeku manju antimikrobnu aktivnost, ali opet izrazito visoku za određene bakterije poput sjemenke grožđa (Merlot) za *Bacillus subtilis* ili kora nara i peteljke trešnje za *Staphylococcus aureus*.
2. Najbolja antioksidacijska svojstva su pokazali ekstrakti unutarnjih pregrada oraha, sjemenki grožđa (Merlot i Teran), kožice grožđa, peteljki trešnje i kore nara za koje je provedena DPPH metoda. Zatim je određena koncentracija potrebna za inhibiranje 50% DPPH radikala i pri tome je uočeno da se ekstraktima kožice i sjemenki grožđa sorte Merlot znatno smanjila antioksidacijska aktivnost s vremenom ili pod utjecajem sunčeve svjetlosti.
3. Postupkom superkritične CO<sub>2</sub> ekstrakcije vidljivo je gotovo potpuno iskorištenje ulja iz sjemenki marelice (udio ekstrahiranog ulja je iznosio 43,06%) te se kod istog postupka dobivanja ulja iz sjemenki grožđa dobilo iskorištenje od 13,36%.
4. Sastav i udio pojedinih masnih kiselina u ulju sjemenki marelica dobivenom hladnim prešanjem je sljedeći: oleinska (63,35%) te potom linolna (29,16%), palmitinska (4,98%) i stearinska (1,41%). Također u ulju dobivenom SFE dobiju se nešto veći udjeli pojedinih masnih kiselina u odnosu na ulje dobiveno hladnim prešanjem.
5. Udio amigdalina u sjemenkama marelice iznosi 5,0 mg/g, dok je njegova konverzija u ulje vrlo mala (0,20 mg/g u ulju dobivenog pomoću superkritičnog CO<sub>2</sub> i 0,40 mg/g u ulju dobivenog hladnim prešanjem).
6. Od ukupnih polifenola u ulju dobivenim SFE iz sjemenki grožđa je određena jedino galna kiselina (8,1mg/L) dok su u ekstraktu određene galna kiselina (235,6 mg/L), katehin (271,82 mg/L), procianidin B (141,77 mg/L) i epikatehin (105,50 mg/L) što upućuje na zaključak da se fenolni spojevi koji su polarne komponente nisu ekstrahirale pomoću CO<sub>2</sub> tj. nisu prisutni u ulju (osim malog udjela galne kiseline) jer je on nepolarno otapalo i najvećim dijelom ekstrahira nepolarne komponente.







- Adamafia NA: Theobromine Toxicity and Remediation of Cocoa By-products: An Overview. *Journal of Biological Sciences* 13 (7): 507-576, 2013.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkritičnim CO<sub>2</sub> iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Anonymous: Food and Agriculture Organization Cooperations. [www.fao.org](http://www.fao.org), 1999.
- Arthur W Knapp, Katharine H Coward: The vitamin D activity of cacao shell (The effect of the fermenting and drying of cacao on the vitamin D potency of cacao shell). CCCXXV., 1935.
- Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G: Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 108:1122-1132, 2008.
- Balbino S, Jokić S, Šubarić D, Bursać Kovačević D, Pedisić S, Zorić Z, Dragović-Uzelac V: Tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina, RC 2.2.08/0058, 2008.
- Bečić I, Polović I: Utjecaj područja uzgoja i termina berbe na koncentraciju antocijana, elaginske kiseline i derivata te antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost sjemenki nara (*Punica granatum* L.). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2013.
- Berend S, Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 59, 205-212, 2008.
- Bijuk M: Optimizacija procesa ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO<sub>2</sub> primjenom metode odzivnih površina. Diplomski rad, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, 2015.
- Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S: Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chem*, 108, 1003-1007, 2008.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH\* free radical method. *LWT – Food Science and Technology* 30:609-615, 1997.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 28:25-30, 1995.

- Bresciani L, Calani L, Bruni R, Brighenti F, Del Rio D: Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, vol.61, 196-201, 2014.
- Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67:21-33, 2005.
- Bursal E, Koksal E, Gulcin I, Bilsel G, Goren AC: Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium L.*) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*, vol. 51, 66-74, 2013.
- De Magalhães LMA: Development of automatic methods based on flow techniques for evaluation of antioxidant capacity in pharmaceutical and food products. *Degree of PhD*. Faculdade de Farmacia, Porto, 2007.
- Dragović-Uzelac V, Levaj B, Mrkić V, Bursać D, Boras M: The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* 102, 2007.
- Erdogan-Orhan I, Kartal M: Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca L.* (apricot). *Food Research International* 44, 2010.
- Frohne D, Pfander HJ: Poisonous plants — A handbook for doctors, pharmacists, toxicologists, biologists, and veterinarians (pp. 338), (2nd Edition). London: Manson Publishing Ltd., 2005.
- Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek H. Bioeffects of Static Magnetic Fields: Oxidative Stress, Genotoxic Effects, and Cancer Studies. *BioMed Res Int*, 602987, 12, 2013.
- Gironi F, Piemonte V, Capparucci C: Equilibrium and Extraction Kinetics of Tannins from Chestnut Tree Wood in Water Solutions, *Asia-Pacific J.Chem. Eng.*, Published online, DOI:10.1002/apj.455., 2010.
- Gokturk Baydar N, Akkurt Murat: Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turk J Agric for* 25, 163-168, 2001.
- Górnas Paweł, Rudzinska Magdalena, Raczyk Marianna, Mišina Inga, Soliven Arianne, Seglina Dalija: Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus L.*) by-products: Impact of the cultivar on potential applications. *Industrial Crops and Products* 82, 44–50, 2016.

- Goula A & Lazarides HN: Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The case of olive mill and pomegranate wastes, *Journal of Food Engineering*, 167, 45-50, 2015.
- Gu W; Wang, SF: Synthesis and antimicrobial activities of novel 1H-dibenzo[a,c]carbazoles from dehydroabietic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 4692–4696, 2010.
- Hao G J, Li L, Wolf M, Xu M, Brinsko B, Yanik M, Chen S, Binzer L, Green S, Hitz C, Yu L: *Antioxidant Properties and Phenolic Components of Grape Seeds*. Global Science Book, 2009.
- Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO<sub>2</sub>. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Jokić S, Vidović S, Adalić K: Supercritical Fluid Extraction of Edible Oils. U *Supercritical Fluids: Fundamentals, Properties and Applications*, str. 205-228. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2014.
- Jyothi Lakshmi A, Kaul P: Nutritional potential, bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) seed. *LWT-Food Science and Technology*, 44; 1821-1826, 2011.
- Katea AE, Lohanib UC, Pandeyc JP, Shahid NC, Sarkar A: Traditional and mechanical method of the oil extraction from wild apricot kernel: a comparative study. *Res J. Chem. Environ. Sci. Vol 2 [2] April: 54-60*, 2014.
- Kaya Cemal, Osman Kola, Mehmet Sertac Ozer, and Ali Altan, 2008, *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 20, No. 4, 2597-2602, 2008.
- Lazos ES: Composition and oil characteristics of apricot, peach and cherry kernel. Vol. 42 *Fase. 2*, 127-131, 1991.
- Li J: Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis for Quality Control of Polyphenols Extracted from Pomegranate Peel by HPLC. *Food Chemistry*, 176, 7-11, 2014.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S: Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 96, 254–260, 2006.
- Lisica P: Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina. Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb. 2016.



- Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus, Zagreb, str. 299, 2003.
- Luterotti S: Uvod u kemijsku analizu. 6. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.
- Matthaus B., Ozcan M. M.: Oil Content, Fatty Acid Composition and Distributions of Vitamin-E-Active Compounds of Some Fruit Seed Oils. *Antioxidants*, 4, 124-133, 2015.
- Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 26:211-219, 2004.
- Murga R, Ruiz R, Beltran S, Cabezas JL: Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3408-3412, 2001.
- Narita Y, Inouye K: High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chem*, 135(3):943-9, 2012.
- O'Shea N, Arendt EK, Gallagher E: Dietary fibre and phytochemical characteristic of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Inovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, pp. 1-10, 2012.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L: Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, vol 45, issue 1, Nov., pages 2287-2295, 2007.,
- Popovici C: Soxhlet extraction and characterisation of natural compounds from walnut (*Juglans regia* L.) by-products. *Ukrainian Food Journal. Volume 328 2. Issue 3*, 2013.
- Radovanović V: Tehnologija vina. IRO Građevinska knjiga, Beograd, 1986.
- Radovanović B, Anđelković MA, Radovanović A, Anđelković M: Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (5), 2013.
- Rai Amit, Mohanty Bikash, Bhargava Ravindra: Modeling and response surface analysis of supercritical extraction of watermelon seed oil using carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 141, 354-365, 2015.
- Raynie DE: Extraction, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press, str. 118, 2000.

Santos DN, de Souza LL, Ferreira NJ, de Oliveira AL: STUDY OF SUPERCRITICAL EXTRACTION FROM BRAZILIAN CHERRY SEEDS (*Eugenia uniflora* L.) WITH BIOACTIVE COMPOUNDS. *Food and Bioproducts Processing*, 2014.

Schieber A, Stintzing FC: By-products of plant food processing as a source of functional compounds- Recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12(11), pp. 401-413, 2001.

Segundo M, Magalheas L, Reis S. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.*, 613, 1-19., 2007.

Shahidi F: Antioxidants in food and food antioxidants. *Mol Nutr Food Res*, 44, 158-163., 2000.

Silem A, Günter HO, Einfeldt J, Boualia A: The occurrence of mass transport processes during the leaching of amygdalin from bitter apricot kernels: detoxification and flavour improvement. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 2006.

Singh RP, Murthy KNC, Jayaprakasha GK: Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 81–86, 2002.

Skala D, Žižović I, Gavrančić S, Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji. *Hemijska industrija* 56, 179-190., 2002.

Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM: Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81, 200–208., 2007.

Toschi TG, Cardenia V, Bonaga G, Mandrioli M, Rodriguez-Estrada MT: Coffee silverskin-characterization, possible uses, and safety aspects. *J. Agric Food Chem*, 62(44):10836-44, 2014.

Turan S, Topcu A, Karabulut I, Vural H, Hayaloglu AA: Fatty acid, triacylglycerol, phytosterol, and tocopherol variations in kernel oil of malatya apricots from Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2007.

Voća N: Proizvodnja toplinske energije iz vinske komine. Završno izvješće VIP projekta. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2010.

Wakao N, Kaguei S: Heat and Mass transfer in Packed Beds. Gordon and Breach, New York, str. 156, 1982.

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

Wiley John: *Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry*. published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 75-79, 2003.

Wootton-Beard PC, Ryan L: Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res Int*, 44, 3135-3136., 2011.

Yilmaz Y: Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *J Agric Food Chem*. Jan 28, 52(2):255-60, 2004.

Zhang QA, Zhang ZQ, Yue XF, Fan XH, Li T, Chen SF: Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chem*. 116, 2009.



