

Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz ječma metodom odzivnih površina

Jakšetić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:028733>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Antonija Jakšetić

**OPTIMIRANJE PROCESA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE FENOLNIH
TVARI IZ JEČMA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološke operacije
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Jedinичne operacije u prehrambenom inženjerstvu
Tema rada je prihvaćena na IV. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. 2. 2013.
Mentor: Ana Bucić-Kojić, izv. prof. dr. sc.
Pomoć pri izradi: Nikolina Pavić, mag. ing.

OPTIMIRANJE PROCESA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI IZ JEČMA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Antonija Jakšetić, 147/DI

Sažetak: U radu je ispitivan utjecaj temperature ekstrakcije (30, 60 i 90 °C), sastava otapala (volumni udio 96%-tnog etanola u vodenoj otopini etanola: 30, 60 i 90%, v/v) i vremena ekstrakcije (10, 40 i 70 minuta) te njihova interakcija na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz brašna cjelovitog zrna ječma. Proučavani uzorci su prikupljeni s različitih lokacija u Hrvatskoj (Nova Gradiška-JNG, Čakovec-JČ i Vinkovci-JV). Nadalje, metodom odzivnih površina određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije u vodenoj kupelji za fenolne tvari: (otapalo 63% etanol, temperatura 90 °C i vrijeme 60 minuta) pri kojima je modelom predviđen maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari kod uzoraka JNG od 4,52 mg_{GAE/g_{s,t}}; JČ 3,94 mg_{GAE/g_{s,t}} te JV 4,52 mg_{GAE/g_{s,t}}. Optimalni uvjeti ekstrakcije za flavonoide su otapalo 90% etanol, temperatura 90 °C i vrijeme 70 min pri kojima je modelom predviđen maksimalni prinos ukupnih flavonoida kod uzoraka JNG od 2,22 mg_{CE/g_{s,t}}; JČ 2,38 mg_{CE/g_{s,t}} te JV 2,42 mg_{CE/g_{s,t}}. Zatim, pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije, ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji radi provjere uspješnosti optimiranja. Također, i na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi-LSV s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo. Ekstrakcijom fenola, u vodenoj kupelji pri optimalnim uvjetima, dobiveni su sljedeći rezultati: 4,50 mg_{GAE/g_{s,t}} za uzorak JNG; 4,07 mg_{GAE/g_{s,t}} za uzorak JČ i 4,52 mg_{GAE/g_{s,t}} za JV. Isto tako, sadržaj flavonoida iznosio je 2,24 mg_{CE/g_{s,t}} za uzorak JNG; 2,67 mg_{CE/g_{s,t}} za JČ i 2,91 mg_{CE/g_{s,t}} za JV. Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi-LSV je provedena standardnom Soxhlet metodom pri čemu je prinos ukupnih fenolnih tvari bio nešto viši (4,83 mg_{GAE/g_{s,t}} za JNG; 4,48 mg_{GAE/g_{s,t}} za JČ i 4,95 mg_{GAE/g_{s,t}} JV). Usporedno, sadržaj flavonoida je bio niži za uzorke JNG i JV (1,85 mg_{CE/g_{s,t}} i 2,71 mg_{CE/g_{s,t}}), a viši za uzorak JČ (2,86 mg_{CE/g_{s,t}}). Analizom rezultata može se pretpostaviti da su neznatne razlike u prinosu fenolnih tvari i flavonoida, posljedica razlika u principu metode kruto-tekuće ekstrakcije, različitom mjerilu i automatiziranosti sustava za ekstrakciju. Za opisivanje kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari, uspješno je korišten kvadratni polinom koji je pokazao dobra slaganja s eksperimentalnim podacima.

Ključne riječi: Ječam, kruto-tekuća ekstrakcija, fenolne tvari, flavonoidi, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: 71 stranica
41 slika
23 tablice
47 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Ivica Strelec, izv. prof. dr. sc. | predsjednik |
| 2. Ana Bucić-Kojić, izv. prof. dr. sc. | član-mentor |
| 3. Srećko Tomas, red. prof. dr. sc. | član |
| 4. Mirela Planinić, izv. prof. dr. sc. | zamjena člana |

Datum obrane: 2. srpnja 2015.

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

Sub department of Unit operations

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Unit operations in food engineering

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IV held on February 25, 2013.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof.

Technical assistance: Nikolina Pavić, mag.ing.

OPTIMIZATION OF SOLID-LIQUID EXTRACTION PROCESS OF THE PHENOLIC COMPOUNDS FROM BARLEY USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Antonija Jakšetić, 147/DI

Summary: This study was aimed to research the influence of extraction temperature (30, 60 and 90°C), solvent ratio (a volume fraction of 96% ethanol in aqueous solution of ethanol: 30, 60 and 90%, v/v) and extraction time (10, 40 and 70 min) as well as their interactions on total phenolic and flavonoid compounds extractability from wholegrain barley flour. Studied samples were collected from different locations in Croatia (Nova Gradiška-JNG, Čakovec-JČ i Vinkovci-JV). Furthermore, the optimal conditions for extraction of the total phenolic compounds were determined by response surface methodology (solvent 63% ethanol, temperature 90 °C and time 60 minutes) at which the model predicted maximum yield of total phenolic compounds in samples JNG 4.52 mg_{GAE/g_{d.b.}}, JČ 3.94 mg_{GAE/g_{d.b.}} and JV 4.52 mg_{GAE/g_{d.b.}}. In addition, optimal conditions for flavonoid compounds (solvent 90% ethanol, temperature 90 °C during 70 min) at which the model predicted maximum yield of total flavonoid substances in samples JNG 2.22 mg_{CE/g_{d.b.}}, JČ 2.38 mg_{CE/g_{d.b.}} and JV 2.42 mg_{CE/g_{d.b.}}. Likewise, under the optimum set of extraction conditions, the extraction is carried out in a water bath in order to check optimization efficiency. Also, at the universal extraction system Büchi-LSV with an aim to convert extraction in a bigger scale. Phenols extraction, in a water bath at optimum conditions, gave the following results: 4.50 mg_{GAE/g_{d.b.}} for sample JNG; 4.07 mg_{GAE/g_{d.b.}} for sample JČ and 4.52 mg_{GAE/g_{d.b.}} for JV. Afterward, the content of flavonoids was 2.24 mg_{CE/g_{d.b.}} for sample JNG; 2.67 mg_{CE/g_{d.b.}} for JČ and 2.91 mg_{CE/g_{d.b.}} for JV. The extraction carried out at the universal extraction system Büchi-LSV, with the standard Soxhlet method, shown slightly higher yield of total phenolic compounds (4.83 mg_{GAE/g_{d.b.}} for JNG; 4.48 mg_{GAE/g_{d.b.}} for JČ and 4.95 mg_{GAE/g_{d.b.}} JV). Comparatively, the content of flavonoids was lower for samples JNG and JV (1.85 mg_{CE/g_{d.b.}} and 2.71 mg_{CE/g_{d.b.}}) and higher for the sample JČ (2.86 mg_{CE/g_{d.b.}}). Nevertheless, the analysis results can be assumed that the slight differences exist due to differences in the solid-liquid extraction principle methods, a different scale and extraction system automation. However, because of the good responsiveness with actual data, a quadratic polynomial model was successfully used for proper description of phenolic extraction.

Key words: Barley, solid-liquid extraction, phenolic compounds, flavonoids, response surface methodology

Thesis contains: 71 pages
41 figures
23 tables
47 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | | |
|----|---------------------------------------|--------------|
| 1. | Ivica Strelec, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. | Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. | Srećko Tomas, PhD, prof. | member |
| 4. | Mirela Planinić, PhD, associate prof. | stand-in |

Defence date: July 2, 2015.

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

Zahvaljujem profesorici Ani Bucić-Kojić na neizmjernoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovoga rada. Zahvaljujem se, također, i asistentici Nikolini Pavić na tehničkoj i informacijskoj pomoći kao i prijateljici Martini Karakaš s kojom sam podijelila sve izazove eksperimentalnog dijela ovog rada.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji, osobito majci i sestri, na strpljenju i moralnoj podršci te svima drugima koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovoga rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KLASIFIKACIJA JEČMA	5
2.2. GRAĐA I NUTRITIVNI SASTAV ZRNA JEČMA.....	6
2.3. ZNAČAJ JEČMA U LJUDSKOJ PREHRANI	8
2.4. PROIZVODNJA I UPOTREBA JEČMA U HRVATSKOJ I SVIJETU	9
2.5. FENOLNI SPOJEVI.....	10
2.5.1. Podjela fenolnih tvari	11
2.5.2. Flavonoidi	12
2.5.3. Povoljna svojstva fenolnih tvari.....	15
2.6. EKSTRAKCIJA	17
2.6.1. Ekstrakcija kruto-tekuće	18
2.6.2. Uvjeti ekstrakcije	20
2.6.3. Prijenos mase u procesu kruto-tekuće ekstrakcije.....	20
2.7. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI	21
2.7.1. Spektrofotometrijske metode određivanja fenolnih tvari	21
2.7.2. Čimbenici mjerenja.....	24
2.8. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	24
2.8.1. Karakteristike metode odzivnih površina	24
2.8.2. Definicije pojmova u metodi odzivnih površina	26
2.8.3. Box-Behnken dizajn	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. ZADATAK.....	29
3.2. MATERIJALI I METODE	29
3.2.1. Materijali	29
3.2.2. Granulometrijska analiza.....	30
3.2.3. Određivanje suhe tvari	31
3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA JEČMA.....	32
3.3.1. Provedba ekstrakcije	32
3.3.2. Priprema ekstrakta za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida	34
3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima ječma	34
3.3.4. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari.....	35
3.3.5. Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari.....	36
3.3.6. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima ječma.....	36
3.3.7. Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju ukupnih flavonoida.....	36
3.3.8. Postupak za određivanje ukupnih flavonoida	37
3.3.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina	37
4. REZULTATI	39
4.1. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA	40
4.2. ODREĐIVANJE SUHE TVARI.....	40

4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI	40
4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA.....	41
4.5. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH TVARI	42
4.6. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA JEČMA TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA.....	43
4.7. MODELIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI	44
4.8. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLA I FLAVONOIDA	54
4.9. EKSTRAKCIJA PRI OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJE ODREĐENIH RSM-OM	56
4.9.1. Ekstrakcija u vodenoj kupelji	56
4.9.2. Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju	57
5. RASPRAVA	59
6. ZAKLJUČCI	64
7. LITERATURA	67

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

OZNAKE:

A - apsorbancija

A - međufazna (kruto-tekuće) površina [m^2]

θ_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

θ_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

θ_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

θ_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

c – masena koncentracija fenolnih tvari [$mg_{GAE(CE)}/mL$]

c' - masena koncentracija otopine (u glavnoj masi otopine) [kg/m^3]

c_{CE} – masena koncentracija otopine (+) – katehina [mg/mL]

c_{GAE} – masena koncentracija otopine galne kiseline [mg/mL]

C_{UFL} - maseni udio ukupnih flavonoida [$mg_{CE}/g_{s.t.}$]

C_{UFT} - maseni udio ukupnih fenolnih tvari [$mg_{GAE}/g_{s.t.}$]

f_r - faktor razrjeđenja ekstrakta za potrebe određivanja fenolnih tvari

m - masa [g]

p – razina signifikantnosti

R – indeks korelacije

t - vrijeme ekstrakcije [min]

T - temperatura ekstrakcije [$^{\circ}C$]

V - volumen ukupno dobivenog ekstrakta [mL]

$w_{s.t.}$ - udio suhe tvari [%]

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable u procesu ekstrakcije (procesni uvjeti)

$Y(Y')_{UFT}$ – modelom predviđen maseni udio ukupnih fenolnih tvari [$mg_{GAE}/g_{s.t.}$]

$Y(Y')_{UFL}$ – modelom predviđen maseni udio ukupnih flavonoida [$mg_{CE}/g_{s.t.}$]

KRATICE:

CE – ekvivalenti (+)-katehina

EtOH – etanol

df - stupnjevi slobode

F vrijednost - faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge

GAE - ekvivalenti galne kiseline

MS - varijanca – prosječno odstupanje varijanata od prosječne vrijednosti uzorka

s.t. – suha tvar

SS –suma kvadrata odstupanja svih varijanata od prosječne vrijednosti

UFT - ukupne fenolne tvari

UFL - ukupni flavonoidi

SIMBOLI:

ε - koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [$\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$]

φ_{ETOH} – volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [%, v/v]

1. UVOD

Žitarice su najrasprostranjenije i najvažnije kultivirane biljke na svijetu te predstavljaju temelj zdrave prehrane (Mandić, 2007). Zbog karakteristika kao što su niska cijena, lako skladištenje, transportiranje, dugotrajnost i otpornost, uzgajaju se u svim dijelovima svijeta te pokrivaju preko 50% svjetskih prehrambenih potreba. U nerazvijenim zemljama (Afrika, središnja Azija, Južna Amerika) taj postotak prelazi i 80%. Stoga je istraživanje nutritivnog sastava ovih namirnica od velikog privrednog i ekonomskog značaja (Ugarčić-Hardi, 2010a). Nutricionističke preporuke upućuju na konzumaciju žitarica tri puta dnevno. Najviše se preporučuju cjelovite žitarice i brašno istih jer se najvažnije nutritivne tvari nalaze upravo u omotaču (Ugarčić-Hardi, 2010a; Mandić, 2010).

Ječam pripada najznačajnijim ratarskim kulturama zauzimajući četvrto mjesto, odmah iza pšenice, riže i kukuruza. U prehrani se koristi od davnina, u pekarskoj industriji, u proizvodnji piva i slada, u industrijskoj preradi te u proizvodnji škroba i alkohola (Leskošek-Čukalović, 2002). Brašno ječma bogat je izvor topivih prehrambenih vlakana, minerala (selena i bakra), vitamina (B kompleks) te fitokemikalija: fenola, flavonoida, karotenoida itd.

Pojam polifenoli obuhvaća složenu skupinu spojeva različitih molekulskih masa i strukture prisutnih u malim količinama (0,1 – 0,3%), ali od velike vrijednosti (Leskošek-Čukalović, 2002; Ugarčić-Hardi, 2010b). Važnost fenolnih spojeva se pripisuje njihovom antioksidacijskom djelovanju koje utječe na smanjenje rizika od srčanih bolesti i raka te se u zadnje vrijeme sve više provodi izolacija fenolnih tvari iz biljnog materijala kao funkcionalnih sastojaka, kako u prehrani tako i u kozmetici (Mandić, 2010; Van Hung, 2014).

Ekstrakcija predstavlja važan proces u izolaciji fenolnih spojeva, a ekstrakcija otapalom ili kruto-tekuća ekstrakcija najčešće je korištena operacija za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala dok odabir otapala predstavlja jedan od najvažnijih koraka same ekstrakcije (Naczki i Shahidi, 2006).

S obzirom na navedeno, cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (otapalo, temperatura, vrijeme) i načina kruto-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom i ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju) na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna cjelovitog zrna ječma te odrediti optimalne uvjete ekstrakcije za navedene spojeve metodom odzivnih površina.

2. TEORIJSKI DIO

Ječam (**Slika 1**) je žitarica koja potječe iz Etiopije i jugoistočne Azije gdje se uzgaja već 10 000 godina i smatra se jednom od najstarijih žitarica na svijetu. Egipćani su upotrebljavali velike količine ječma kako bi pripremili pivo haq. Također, ječam je zauzimao i glavno mjesto u prehrani Sumerana. Drevne civilizacije koristile su ječam za prehranu ljudi i životinja te za proizvodnju alkoholnih napitaka.



Slika 1 Klas višerednog ječma (Komljenović i Todorović, 2009)

Najstariji recept za ječmeno vino iz 2800-te godine prije Krista potječe iz Babilona, a ječmena voda koristi se od pradavnih vremena u medicinske svrhe. U grčkoj i rimskoj kulturi, ječam je cijenjen kao izvor sportske snage, stoga je to namirnica koju su konzumirali atlete i gladijatori. Ječam je bio osobito cijenjen u davnoj Kini kao simbol muške zrelosti.

U srednjem vijeku kada je pšenica bila vrlo skupa, mnogi su Europljani pripremali kruh od ječma i raži. U 16. stoljeću Španjolci su u Južnu Ameriku donijeli ječam dok su Englezi i Nizozemci zaslužni za prenošenje ječma u Sjevernu Ameriku. Na našem području, ječam se uzgajao i prije dolaska Slavena što svjedoče nazivi ove biljke na svim slavenskim jezicima (Ugarčić-Hardi, 2010b).

Ječam ima, među svim žitima, najveći areal rasprostranjenosti zbog velikog polimorfizma. Pod utjecajem različitih uvjeta uzgoja, formirana su tri različita ekološka tipa ječma: sjeverni, srednjo-europski i južni (Komljenović i Todorović, 2009).

2.1. KLASIFIKACIJA JEČMA

Klasifikacija žitarica se temelji na razlikama u botaničkim i morfološkim osobinama te načinu uzgoja. S obzirom na to, ječam pripada u klasifikaciju strnih ili pravih žitarica, odnosno žitarica prve klase zajedno sa pšenicom, raži i zobi. Glavne karakteristike pravih ili strnih žitarica su:

- klijaju s većim brojem korjenčića: pšenica i zob s 3, raž s 4, a ječam s 5 do 8 korjenčića,
- cvat je klas ili metlica (zob),
- zrno ima s trbušne strane izraženu brazdicu,
- postoje jare i ozime vrste,
- otporne su na niske temperature.

Sistematika pripisuje ovu žitaricu u carstvo *Plantae* (carstvo biljaka), red *Poales*, porodicu *Poaceae* (porodica trava), potporodicu *Pooideae*, rod *Hordeum*. Svi oblici ječma pripadaju jednoj vrsti koja se prema broju razvijenih klasića na svakom usjeku vretena klasa dijeli na tri podvrste:

- podvrsta višerednih ječama – *Hordeum sativum* spp. *vulgare* (s tri razvijena klasića),
- podvrsta dvorednih ječama – *Hordeum sativum* ssp. *distichum* (s jednim razvijenim klasićem) (**Slika 2**),
- podvrsta prijelaznih ječama – *Hordeum sativum* ssp. *intermedium* (jedan do tri razvijena klasića, nemaju ekonomski značaj).



Slika 2 Zrno dvorednog ječma (Komljenović i Todorović, 2009)

Kao praroditelj dvorednog ječma smatra se *Hordeum spontanum*, a višerednog ječma *Hordeum ischnatherum*, od koga je umnožavanjem broja klasića nastao višeredni ječam. Pronađen je i divlji višeredni ječam *Hordeum agriochriton* pa se pretpostavlja da je od njega nastao višeredni ječam s pljevičastim zrnom. Goli i prijelazni ječmi nastali su mutacijom i javljaju se kasnije.

Prema tome, svi sada uzgojeni ječmi pripadaju višerednim i dvorednim ječmima koji se međusobno lako razlikuju po različitom broju klasića na koljencima vretena klasa. Dvoredni ječmi imaju simetričan raspored zrna u klasu, a višeredni simetričan i asimetričan u odnosu 40:60% (**Slika 3**) (Komljenović i Todorović, 2009).



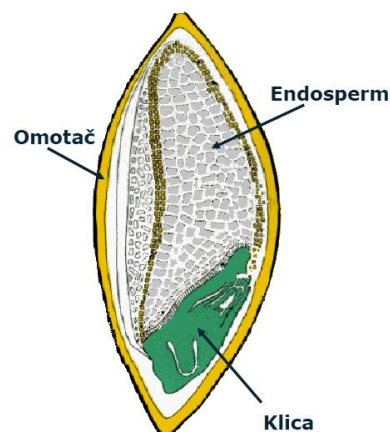
Slika 3 Klas dvorednog i šestorednog ječma (Komljenović i Todorović, 2009)

2.2. GRAĐA I NUTRITIVNI SASTAV ZRNA JEČMA

Nosilac prehrambene vrijednosti je suhi jednosjemeni plod (zrno, pšeno) koji sadrži sve prehrambene sastojke za razvoj i rast klice i mlade biljke.

Plod se sastoji od:

- plodne i sjemene ovojnice (omotač),
- aleuronskog sloja,
- endosperma i
- klice (**Slika 4**).



Slika 4 Dijelovi zrna ječma (Ugarčić-Hardi, 2010b)

Zrno ječma može biti s pljevicom ili bez pljevice. Glavni sastojci pljevice ječma su celuloza i lignin, a ostatak čine pentozani, manani, β -glukani, a znatan je i udio silicija zbog čega pljevica ima abrazivna svojstva. Boja zrna s pljevicom je slamnato žuta ili sivo-zelena dok je samo zrno bez pljevice bijele ili žućkaste boje (**Slika 5**).



Slika 5 A) Zrno ječma s pljevicom



B) Zrno ječma bez pljevice (Ugarčić-Hardi, 2010b)

Osnovni sastojci omotača (ljuske) ječma su celuloza, pentozani, hemiceluloza, lignini i drugi neškrobni i necelulozni polisaharidi, prehrambena vlakna, a udio proteina i lipida je vrlo nizak. Najzastupljeniji minerali u omotaču zrna su fosfor i kalij.

Aleuronski sloj se sastoji od jednog sloja stanica, botanički predstavlja vanjski dio endosperma. Proteini aleuronskog sloja su albumini i globulini te ima veći udio esencijalnih aminokiselina u odnosu na endosperm. Najznačajniji proteini u ječmu su hordein i glutelin. Ovdje se nalaze i minerali i vitamini od kojih su najzastupljeniji vitamini B-skupine (tiamin, niacin, piridoksin, pantotenska kiselina, riboflavin), fitinska kiselina, fitonutrijenti: betain (poboljšava probavljivost proteina, ugljikohidrata, lipida, minerala, vitamina itd.) i polifenolne tvari (antioksidacijska svojstva).

Kemijski sastav klice obuhvaća visoki udio proteina, lipida, minerala i vitamina, iako je udio ugljikohidrata u klici manji nego u drugim dijelovima zrna, klica sadrži najviše oligosaharida (saharoza, rafinoza). Preko 80% proteina su albumini i globulini, aminokiseline (arginin, histidin, metionin, treonin i valin) te su klice izvor nutritivno visoko vrijednih proteina. Klica je relativno bogata mineralima (fosfor, mangan) i vitaminima (B-skupina, A, E).

Osnovni sastojak endosperma je škrob u obliku granula, sadrži manje proteina nego klica i aleuronski sloj, ali kako endosperm čini najveći dio zrna, proteini endosperma ječma su tehnološki i nutritivno značajni. Endosperm je siromašan mastima, vitaminima i mineralnim tvarima. Kemijski sastav endosperma prikazan je u **Tablici 1** (Ugarčić-Hardi, 2010b).

Tablica 1 Prosječni kemijski sastav endosperma zrna ječma (Ugarčić-Hardi, 2010b)

Tvari	Ugljikohidrati	Proteini	Lipidi	Minerali
%	86,5	9,0	1,0	0,7

Kemijski sastav nije jednak u svim dijelovima zrna. Najviše vitamina i minerala nalazi se upravo u pljevici i aleuronskom sloju, a najmanje u endospermu. U procesu prerade žitarica mljevenjem, omotač, aleuronski sloj i klica se, nažalost, uklanjaju. Prosječni udio pojedinog dijela zrna u ukupnoj masi zrna prikazan je u **Tablici 2**.

Tablica 2 Prosječni udio pojedinog dijela zrna ječma u ukupnoj masi zrna (Ugarčić-Hardi, 2010b)

Dijelovi zrna	Pljevica	Ovojnica	Aleuronski sloj	Endosperm	Klica
%	7-17	6,0	12-14	63 -69,5	2,8-5

Ječam je dobar izvor minerala: kalija (13% od RDA na 100 g) te odličan izvor vlakana (69% od RDA na 100 g), proteina (25% od RDA na 100 g), mangana (95% od RDA na 100 g), selena (69% od RDA na 100 g), fosfora (38% od RDA na 100 g), magnezija (36% od RDA na 100 g), cinka (29% od RDA na 100 g), željeza (28% od RDA na 100 g), tiamina (57% od RDA na 100 g), niacina (31% od RDA na 100 g), vitamina B6 (25% od RDA na 100 g) i riboflavina (24% od RDA na 100 g). Energetska vrijednost ječma iznosi 354 kcal na 100 g svježe namirnice (Leskošek-Čukalović, 2002).

2.3. ZNAČAJ JEČMA U LJUDSKOJ PREHRANI

Značaj ječma proizlazi iz njegove raznovrsne upotrebe. Ječam služi kao ljudska hrana na sjeveru i u planinskim regijama. Ipak, kruh od ječma je lošije kvalitete jer je sladunjavog okusa, lošeg mirisa, brzo se suši, ne narasta, puca, nema šupljina, teško je probavljiv i nadima želudac. Zato se rijetko koristi za pravljenje kruha, ali se dosta troši u oljuštenom obliku kao ječmena kaša (Komljenović i Todorović, 2009).

Najveći značaj mu je u proizvodnji slada za pivo, viski, votku itd (Gallegos-Infante i sur., 2010). Pored toga, sladni sirup se koristi u pekarstvu, slastičarstvu, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, u proizvodnji sladnog mlijeka, alkohola, octene kiseline, kvasca. Od ječmenog slada, koji se upotrebljava u proizvodnji piva, dobiva se brašno visoke hranjive vrijednosti, osobito bogato vitaminom B12 koji je rijedak u namirnicama biljnog podrijetla. Važna je i prisutnost vitamina E. Ječmeni slad bogat je enzimima i stoga lako probavljiv, a budući da potiče lučenje želučanih sokova, koristan je u prehrani osoba s bolesnim želucom, rekonvalescenata, djece i starijih osoba. Nizozemski istraživači ustanovili su da ječam sadrži i do 35% nezasićenih masnih kiselina koje smanjuju kolesterol u krvi, što nije slučaj ni s

jednom drugom žitaricom. Ječam ima znatan udio prehrambenih vlakana zbog čega pospješuje probavu i održava povoljnu ravnotežu crijevne mikroflore (Mandić, 2010).

Od oljuštenog zrna ječma se proizvodi griz, ječmene pahuljice i surogat kave (divka). Za ishranu stoke se koristi kao koncentrirana ili kabasta stočna hrana (zelena biljka) i kao suhi ili vlažni pivarski trop. Ječam se danas rijetko može kupiti u izvornom obliku. Za ljudsku prehranu se zrno ječma priprema struganjem zrna pomoću brusnih diskova. Nakon tri brušenja se dobiva ječmeno zrno kojemu su uklonjeni ljuska i posije, a s dva do tri dodatna brušenja ječmena kaša. Ovako dobivena kaša ima umanjene nutritivne vrijednosti, ali taj nedostatak nadoknađuje svojom mekšom strukturom. Unatoč tome, zbog bogatijeg sadržaja hranjivih tvari i povoljnijeg djelovanja na zdravlje, preporučeno je što češće konzumirati ječam kao cjelovitu žitaricu (Komljenović i Todorović, 2009; Ugarčić-Hardi, 2010b).

2.4. PROIZVODNJA I UPOTREBA JEČMA U HRVATSKOJ I SVIJETU

Poljoprivredni marketinški centar resursa (*Agricultural Marketing Resource Center*) objavio je 2013. da je ječam jedna od najatraktivnijih visoko prilagođenih žitarica koja uspijeva u širokom klimatskom podneblju, od subarktičkog do suptropskog. SAD je u svijetu sedmi najveći proizvođač ječma, a najveći svjetski proizvođač s 41% tržišnog udjela je Europska unija-27 (EU-27). Nakon nje slijede Rusija i Ukrajina s 12% i 8% tržišnog udjela (**Tablica 3**) (Taylor i Boland, 2013).

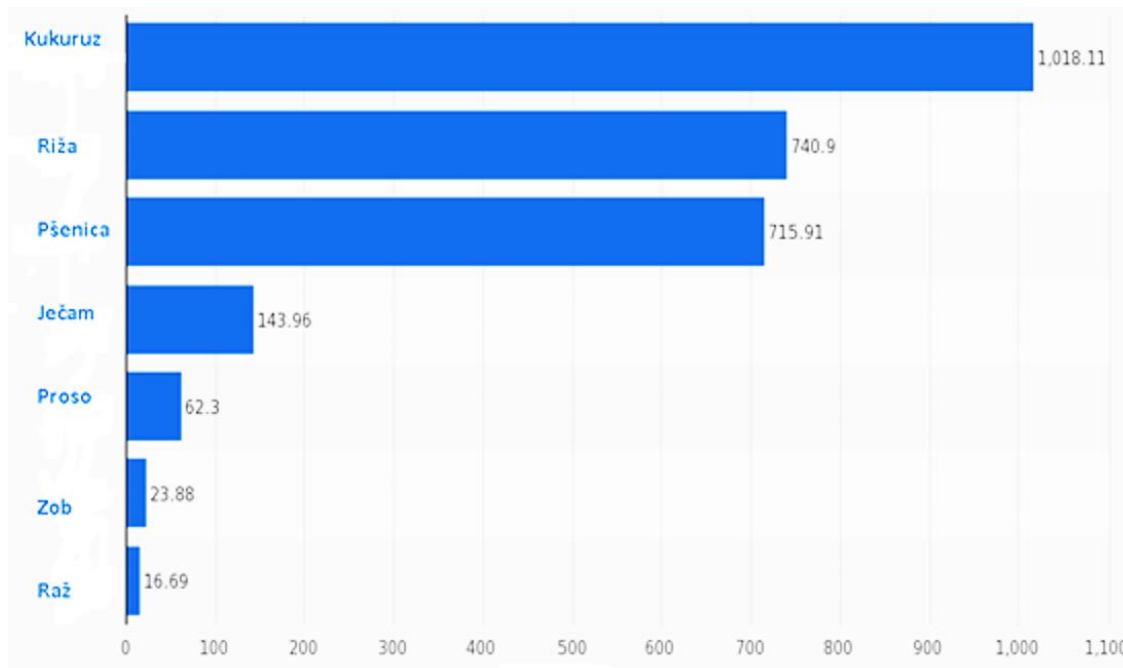
Tablica 3 Svjetska proizvodnja ječma (Taylor i Boland, 2013)

Zemlja	Proizvodnja ječma (tona)
1. Europska Unija	58 680 000
2. Rusija	16 500 000
3. Ostali	9 001 000
4. Australija	8 600 000
5. Kanada	7 700 000
6. Turska	7 000 000
7. Ukrajina	6 200 000
8. SAD	4 311 000
9. Argentina	3 700 000
10. Iran	3 300 000
Ukupno	124 992 000

Od zemalja EU najviše se ističu Francuska, zatim Njemačka pa Španjolska, a najveći izvoznici su Ukrajina i Rusija (FAOSTAT, 2011). Prema statističkom portalu, u svijetu se najviše proizvodi kukuruz, riža i pšenica dok ječam zauzima 4. mjesto sa 143,96 milijuna tona

godišnje (**Slika 6**) (Statista, 2013). U Hrvatskoj ječam zauzima 3. mjesto, iza kukuruza i pšenice s prinosom od 201 339 tona prema Državnom zavodu za statistiku (2014).

Prema enciklopediji hrane i hortikulture, više od 60% svjetskog ječma koristi se za stočnu hranu, ostali dio u proizvodnji slada za pivo, a tek mali dio za ljudsku konzumaciju (Garvin i sur., 2015) što, također, vrijedi i u Hrvatskoj (Komljenović i Todorović, 2009).



Slika 6 Svjetska proizvodnja žitarica (milijuni metričkih tona) (Statista, 2013)

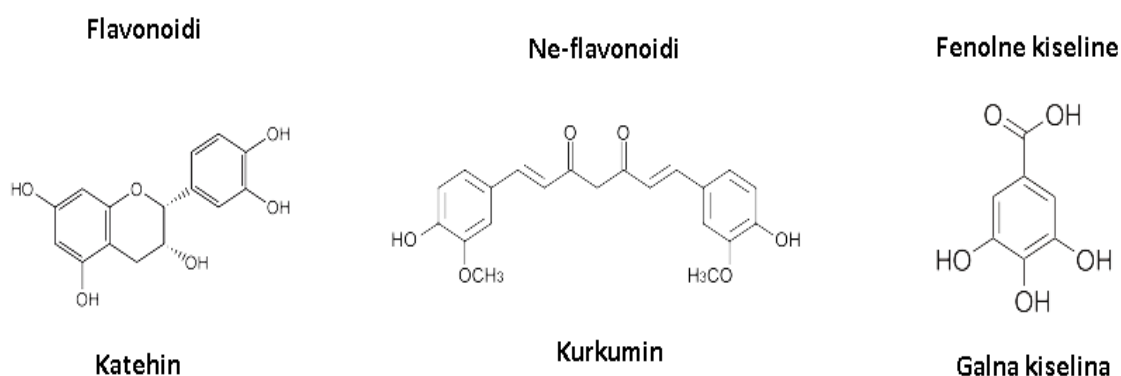
2.5. FENOLNI SPOJEVI

Širok raspon fitokemikalija s antioksidacijskim djelovanjem, prisutan u žitaricama, pokazao je pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi. Ovi spojevi pripadaju kemijskim skupinama kao što su polifenoli, karotenoidi i biljni steroli. Među različitim antioksidansima prisutnih u ječmu, fenolni spojevi imaju velik zdravstveni potencijal (Navas-Lopez i sur., 2014). Fenolni spojevi predstavljaju veliku grupu spojeva s različitim funkcijama i mogu djelovati kao signalne molekule, pigmenti, čimbenici koji pridonose gorčini ili ošttrini (tanini) te mikrobicidi. Fenolni spojevi su bioaktivne komponente biljnih produkta i kao takvi se nalaze u obliku estera ili glikozida, a manje kao slobodni spojevi što je vrlo važno prilikom ekstrakcije istih iz biljnog materijala (Klepacka i sur., 2011). Njihov sadržaj ovisi o mnogim čimbenicima kao što su klimatski i agrotehnološki uvjeti u uzgoju i berbi, zrelost zrna, vrijeme žetve, uvjeti skladištenja, učinak genetskih čimbenika i sorta (Leskošek-Čukalović, 2002).

2.5.1. Podjela fenolnih tvari

Polifenoli su složena grupa spojeva različitih molekulskih masa i strukture (Leskošek-Čukalović, 2002). To su prirodni organski spojevi koje proizvode biljke kao obrambene mehanizme protiv napada patogena, ultraljubičastog zračenja i fizičkog oštećenja dajući biljnim namirnicama i pićima svoj karakterističan gorak okus. Identificirano je preko 8000 polifenolnih spojeva biljnog podrijetla, sastoje se od više fenolnih grupa i mogu se povezati s različitim ugljikohidratima i organskim kiselinama. Polifenoli se mogu podijeliti u tri kategorije:

- flavonoidi,
- ne-flavonoidi i
- fenolne kiseline (**Slika 7**).



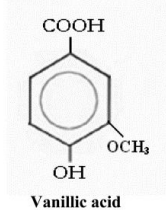
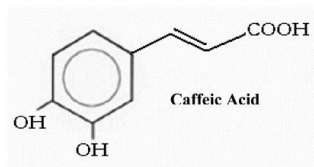
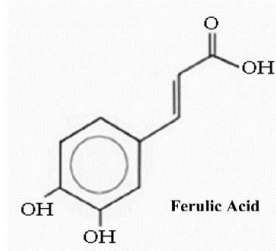
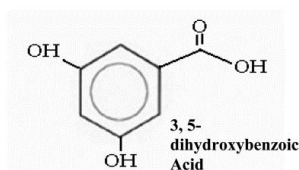
Slika 7 Kategorije fenolnih tvari i primjeri (Gomez-Pinilla i Nguyen, 2012)

Iako pripadaju istoj grupi spojeva, njihove strukture mogu biti veoma raznolike. S prepoznatljivom strukturom, flavonoidi obuhvaćaju najširu polifenolnu skupinu koja se sastoji od brojnih podgrupa, ne-flavonoidi imaju različitu kemijsku strukturu od flavonoida, a obično se nalaze u crvenim vinima. Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog prstena i karboksilne kiseline.

Fenolne kiseline (Slika 8) su najčešći fenolni spojevi u žitaricama te se mogu naći u slobodnom, vezanom i konjugiranom obliku. Većina fenolnih kiselina esterski je vezana za stanične stijenke, a sastoje se od dvije podgrupe: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Klepacka i sur., 2011).

Galna, sirinđična i vanilinska kiselina su hidroksibenzojeve, a ferulična, p-kumarinska i kafeinska hidroksicimetne kiseline. One pripadaju različitim biosintetskim putevima;

hidroksibenzojeve pripadaju aminobenzoatnom putu, a hidroksicimetne kiseline fenilpropanoidnom putu biosinteze zbog čega imaju sličnosti s flavonoidima. Topive fenolne kiseline moguće je izolirati pomoću organskih otapala: metanola, etanola ili acetona dok je za izolaciju vezanih fenolnih kiselina potrebna upotreba enzimskih hidroksilaza. Ako se ne upotrijebe enzimi, ekstrahiraju se samo slobodni spojevi dok vezani spojevi ostaju u izluženom ostatku (Navas-Lopez i sur., 2014). Glavne karakteristike su inhibicija određenih enzimskih sustava (lipidna peroksidaza), a mogu se koristiti kao konzervansi, protuupalni agensi i kao antioksidansi. Također, velika je upotreba bilja koje ih sadrže - kod poremećene funkcije jetre kao holeretici i holagozi te je značajna njihova primjena kao hepatoprotektivnih lijekova (Dragović-Uzelac i sur., 2013).



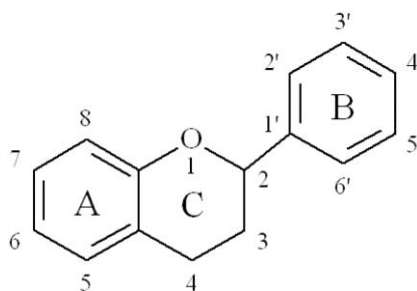
Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je prisutna u mnogim biljkama, kemijske formule $C_6H_2(OH)_3COOH$, nalazi se u prirodi u slobodnom obliku i kao dio u vodi topivih tanina. Soli i esteri galne kiseline se nazivaju galati. Ima antifungalna i antiviralna svojstva, djeluje kao antioksidans i pomaže u zaštiti stanica protiv oksidativnih oštećenja. Utvrđeno je da galna kiselina pokazuje citotoksičnost protiv stanica raka, bez oštećivanja zdravih stanica. Galna kiselina se koristi kao pomoćno sredstvo u slučajevima unutrašnjeg krvarenja te kao tretman albuminurije i dijabetesa (Public Chemistry, 2015).

Galna kiselina se često koristi kao standard za određivanje fenolnog sadržaja u raznim materijama putem Folin-Ciocalteu testa čiji rezultati se navode u ekvivalentima galne kiseline (Waterhouse, 2012).

Slika 8 Fenolne kiseline (Mandal i Dey, 2008)

2.5.2. Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni metaboliti u biljkama te pripadaju širokoj kategoriji polifenola. Flavonoidi se sastoje od difenilpropanskog kostura C_{15} ($C_6-C_3-C_6$); dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) (**Slika 9**). Slično fenolnim hidroksicimetnim kiselinama, flavonoidi se sintetiziraju pomoću fenilpropanoid metaboličkog puta.

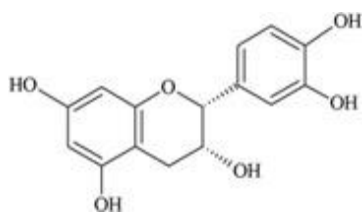


Slika 9 Opća struktura flavonoida

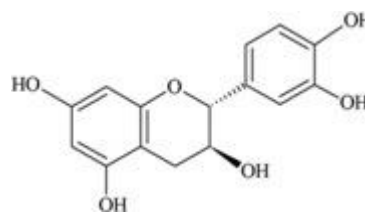
Razlikuju se prema stupnju oksidacije prstena C (osim halkona), stupnju nezasićenosti te broju i položaju -OH skupina i dijele u sljedeće skupine:

- flavan-3-oli (monomerni i kondenzirani tanini),
- flavonoli,
- izoflavoni,
- flavanoni,
- flavoni i
- antocijani.

Flavan-3-oli su monomeri i jedinice za oligomere i polimere koji su poznati kao proantocijanidini ili kondenzirani tanini. Neki primjeri monomernih flavan-3-ola su katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, epigalokatehin galat, procijanidin itd. (**Slika 10**). Katehini i epikatehini se najčešće nalaze u voću (osim citrusa) dok većina drugih monomernih flavan-3-ola se obično nalaze u različitim čajevima (*Camellia sinensis*). Različite vrste bobica, trešnje, grožđe, šljive, marelice, crno vino, čokolada i čaj su dobri izvori ovih spojeva.



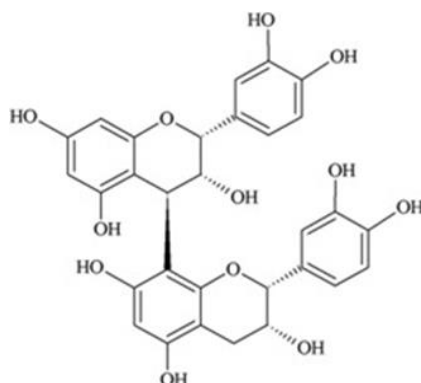
Slika 10 A) Katehin



B) Epikatehin

Proantocijanidini su dimeri, trimeri, oligomeri (4-10 jedinica) ili polimeri (>10 jedinica) monomernih katehina ili epikatehina (**Slika 11**). Iako eksperimentalni dokazi upućuju da proantocijanidini imaju visoku antioksidativnu aktivnost, proantocijanidini manje molekularne mase su bolji "hvatači" superoksidnih i hidroksilnih radikala te inhibitori ksantin

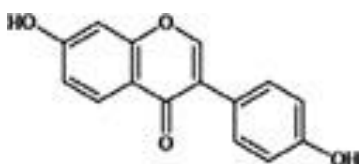
oksidaze. Ovi spojevi se javljaju u izobilju u grožđu, jabukama, raznim bobicama, čaju, vinu, pivu, čokoladi itd. Nezreli plodovi često sadrže više ovih spojeva od zrelih.



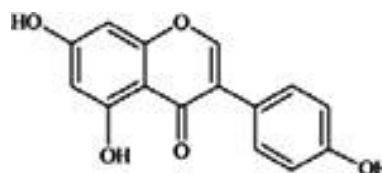
Slika 11 Procijanidin B2 (dimer)

Flavonoli su gotovo sveprisutni u hrani. Neki izvori su jabuke, bobičasto voće, crveno grožđe, luk, vino, čajevi, kelj, poriluk, brokula itd. Neki primjeri flavonolnih spojeva su isorhamnetin, kempferol, miricetin i kvercetin. Flavonoli su prisutni uglavnom u konjugiranim oblicima.

Izoflavoni se prvenstveno nalaze u mahunarkama i soji. Spojevi koji pripadaju ovoj klasi uključuju biokanin A, daidzein, genistein i glicitein (**Slika 12**). Izoflavoni imaju fitoestrogensko djelovanje i mogu se vezati na receptore estrogena.



Slika 12 A) Daidzein

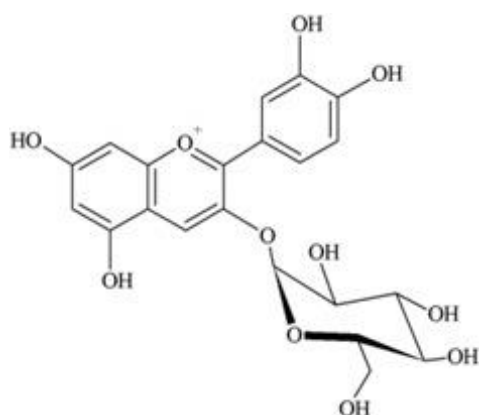


B) Genistein

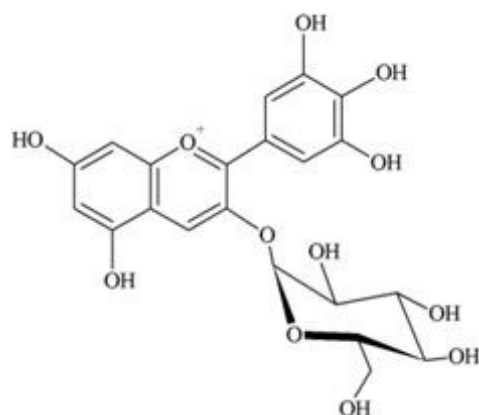
Neki primjeri **flavanona** su eriodiktiol, hesperetin i naringenin. Ovi spojevi obično se nalaze u agrumima, a u manjoj mjeri u rajčicama i menti.

Flavoni su najmanje zastupljeni flavonoidi, a mogu se naći uglavnom u celeru, zelenom lisnatom bilju, poput peršina i kamilice. Apigenin i luteolin su spojevi koji pripadaju ovoj klasi.

Antocijani su prirodni pigmenti u biljkama plave, ljubičaste ili crvene boje. Ovi spojevi su u izobilju u borovnicama, kupinama, jabukama, višnjama, crvenom i ljubičastom grožđu kao i u crvenom vinu i određenom povrću poput kupusa, luka i rotkvice. Najčešći prehrambeni antocijanini su cijanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin (**Slika 13**).



Slika 13 A) Cijanidin-3-O-glukozid



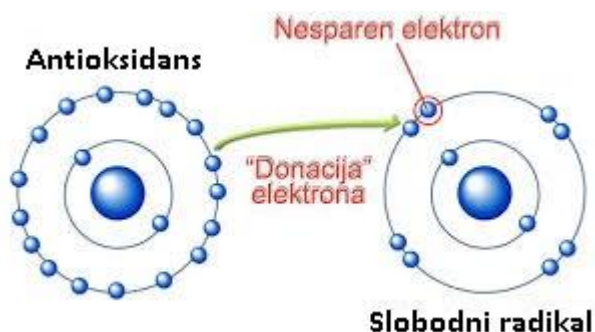
B) Delfinidin-3-O-glukozid

Većina flavonoidnih spojeva osim flavan-3-ola (monomera i proantocijanidina) postoji kao glikozidi. Flavonoidi su supstrati za konjugaciju i hidrolizom enzima u tankom crijevu, jetri i debelom crijevu konjugiraju se do O-glukuronida, sulfatnih estera i O-metil estera. Spojevi koji se ne apsorbiraju u crijevima doći će do debelog crijeva. Aglikoni se mogu dalje katabolizirati u spojeve niske molekularne mase koji se mogu lako apsorbirati.

Unatoč pozitivnim zdravstvenim tvrdnjama, poznata je činjenica da je bioraspoloživost flavonoida općenito niska, a može se i drastično razlikovati između različitih klasa flavonoida kao i pojedinih spojeva u određenoj klasi (Thilakarathna and Vasantha Rupasinghe, 2013).

2.5.3. Povoljna svojstva fenolnih tvari

Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju slobodne radikale bilo primanjem ili otpuštanjem elektrona i/ili protona (**Slika 14**). Kroz reakciju primanja ili otpuštanja elektrona i/ili protona, odnosno neutralizacije radikala, sama molekula antioksidansa postaje slobodni radikal.



Slika 14 Neutralizacija slobodnog radikala antioksidansom (Vurdelja, 2014)

Međutim, molekula antioksidansa kao slobodni radikal je obično znatno manje reaktivna, nego radikal kojeg je neutralizirala. Razlog slabijoj reaktivnosti molekule antioksidansa kao

slobodnog radikala može biti stabilizacija rezonancijskim oblicima, neutralizacija nekim drugim antioksidansom ili neki drugi put neutralizacije ili regeneracije (npr. enzimski) (Klapec i Strelec, 2013).

Veliki broj aromatskog i začinskog bilja, uključujući i žitarice, sadrži fenolne spojeve koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost vežući slobodne radikale. Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (inhibicija oksidacije lipida) (Liu i Yao, 2006; Banjari i sur., 2009).

Temelj za antioksidacijska svojstva polifenolnih tvari počiva na fenolnom prstenu koji može stabilizirati i delokalizirati nesparene elektrone. Sposobnost doniranja elektrona i zaustavljanja lančane reakcije pripisuje se fenolnim i hidroksilnim skupinama, osobito u 3'OH i 4'OH lanca tri ugljika (Goufo i Trindade, 2014).

Interes u istraživanju flavonoida iz hrane postaje sve veći zbog njihove zdravstvene prednosti, uključujući anti-upalna, antioksidantna, antiproliferativna i antikancerogena svojstva, kapaciteta vezanja slobodnih radikala, antihipertenzivnih učinaka, prevencije koronarne bolesti srca i imunodeficijencije anti-humanog virusa (Xiao i sur., 2011). Konzumiranje hrane koja sadrži fitokemikalije s antioksidacijskim djelovanjem ima pozitivan učinak na prevenciju bolesti kao što su karcinomi, ateroskleroza, artritis, dijabetes te procese starenja (Chirinos i sur., 2007). Istraživanja su pokazala da fenolne kiseline imaju veće antioksidacijsko djelovanje od onog u antocijanina, također pokazuju veću snagu redukcije u usporedbi s α -tokoferolom i antioksidacijsku aktivnost i do četiri puta veću od one u α -tokoferola. Osim toga, antioksidacijska svojstva omogućuju polifenolima borbu protiv oksidativnog stresa stanica i potiču aktivaciju sinaptičkih molekula koje nose kognitivne funkcije čime pomažu u održavanju kognitivnog i mentalnog zdravlja kao i oporavku od neurodegenerativnih bolesti (Klepacka i sur., 2011).

Polifenoli se koriste u terapijama različitih oboljenja koja su uvjetovana poremećajem i insuficijencijom krvnih i limfnih žila periferne cirkulacije. Utvrđeno je da djeluju kao diuretici, protuupalno, spazmolitički, antialergijski, kao antioksidansi i citostatici. Inhibiraju enzim fosfodiesterazu i smanjuju agregaciju trombocita pa se koriste u profilaksi i kao dodatna terapija oboljenja povezanih s pojavom tromboze (Dragović-Uzelac i sur., 2013).

2.6. EKSTRAKCIJA

Antioksidansi, kao biljne komponente, postoje u tri oblika: topivom-slobodnom, topivom-vezanom i netopivom. Topivi, ekstraktibilni ili slobodni antioksidansi su uglavnom niske i srednje molekularne mase koji se mogu izolirati korištenjem različitih organskih i organsko-vodenih otapala (primjerice, metanol, etanol). Netopivi, neekstraktibilni ili vezani antioksidansi obuhvaćaju spojeve s visokom molekularnom masom, spojeve vezane u estere ili vezane na različite stanične stijenke makromolekula (arabinoksilane, pektine, celulozu, lignin, proteine) i spojeve zarobljene u jezgri matrice hrane. Netopivi spojevi obično ostaju u ostacima organskih ekstrakata i obično na njih otpada većina antioksidacijskih tvari. Iz ovog razloga, ekstrakcija fenolnih kiselina i flavonoida je veoma složena i nedovoljno razjašnjena s obzirom na to da je teško odrediti vrstu organskog otapala kao i njegovu koncentraciju za otapanje što je više moguće ovih tvari iz biljnog ekstrakta. Za razliku od rafiniranog brašna sorti žitarica, topivih ukupnih polifenolnih tvari je dva do tri puta više od netopivih polifenolnih tvari u mekinjama i cijelom zrnu (Madhujith i Shahidi, 2009). Istraživanja su pokazala da pšenica i ječam sadrže više fenolnih i flavonoidnih tvari, nego druge žitarice tipa kukuruz, zob ili riža.

Ekstrakcija i izluživanje su jedinične operacije izdvajanja pojedine komponente iz smjese tvari (otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese) na osnovi različite topljivosti u nekom otapalu. Određuje ih prijenos topljive tvari iz otopine, krute smjese ili suspenzije u otapalo, a topljiva tvar čini manji dio ukupnog krutog materijala. O izluživanju se govori kada se radi o anorganskim, a o ekstrakciji kada se radi o organskim tvarima. O difuziji (najčešće kristaloida kroz koloide) se govori kod izluživanja topivih tvari iz organskog (životinjskog ili biljnog) materijala pri čemu materijal mora difundirati kroz stijenke stanica u otapalo. Kada je cjelokupni ili gotovo cjelokupni materijal topiv, radi se o operaciji otapanja (Tomas i sur., 2013).

Vrste ekstrakcija:

- ekstrakcija kruto-tekuće, odnosno izluživanje (topljiva tvar je u krutom, a otapalo u tekućem stanju),
- ekstrakcija tekuće-tekuće (i otapalo i topljiva tvar su tekućine) (Jerković i Radonić, 2009).

Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili iz čvrste faze (ekstrakcija čvrsto-tekuće), otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- otapalo mora biti selektivno („slično se otapa u sličnom“);
- otapalo mora biti učinkovito radi utroška što manje količine otapala;
- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima;
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu;
- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo se moraju, što je više moguće, razlikovati u gustoći;
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti;
- otapalo mora imati nižu viskoznost i nižu površinsku napetost otapala u svrhu učinkovitijeg otapanja i većeg iskorištenja;
- otapalo ne smije biti zapaljivo i otrovno;
- otapalo mora biti jeftino i ekološki prihvatljivo (Tomas i sur., 2013).

2.6.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Ekstrakcija kruto-tekuće je operacija prijenosa mase kojom se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog otapala. Dio čvrstog materijala koji se otapa predstavlja ekstraktivne supstance dok se dobivena otopina naziva ekstrakt.

Ekstrakcija kruto-tekuće se najčešće izvodi kao maceracija (hladna ekstrakcija), digestija (topla ekstrakcija) i perkolacija (ekstrakcija u filtracionom aparatu) (**Slika 15**).



Slika 15 A) Perkolacija



B) Maceracija



C) Ekstrakcija po Soxhletu
(Tomas i sur., 2013)

Maceracija se izvodi u suspenziji, kao šaržna operacija, na način da se kruti materijal potapa u otapalo i miješa, a perkolacija polušaržno, na način da kroz nepokretan sloj čvrstog materijala kontinuirano protječe otapalo. Fino usitnjeni materijal, koji se može lako držati suspendiran u otapalu, podvrgava se maceraciji dok se ekstrakcija iz komadnog materijala vrši perkolacijom (Veljković i Milenović, 2001).

Ekstrakcija kruto-tekuće se može provoditi:

- čisto otapalom i
- nezasićenom otopinom topive tvari koja se ekstrahira.

Najčešće korištena otapala u prehrambenoj industriji su:

- voda
- organska otapala (heksan, heptan, cikloheksan, petroleter...)
- superkritični fluidi (ugljičkov dioksid, propan, butan...)

Ekstrakcija superkritičnim fluidima se razmatra kao posebna metoda ekstrakcije (Tomas i sur., 2013).

Ekstrakcija kruto-tekuće u suspenziji odigrava se u dvije faze:

1. faza: otapanje ekstraktivnih tvari koje se nalaze na površini čvrstih čestica (tzv. ispiranje ili brza ekstrakcija),
2. faza: difuzija ekstraktivnih tvari iz unutrašnjosti prema površini čestica i njihov prijenos u glavnu masu otapala (tzv. spora ekstrakcija) (Veljković i Milenović, 2001).

Proces ekstrakcije uključuje:

- miješanje krute tvari i otapala,
- vrijeme kontakta otapala i krute tvari,
- separacija (taloženje, dekantiranje, filtracija, centrifugiranje) (Ježek, 2008).

Slobodni fenolni spojevi se mogu selektivno izdvojiti iz brašna ječma jednostavnom kruto-tekućom ekstrakcijom pomoću različitih smjesa otapala dok se vezani fenolni spojevi mogu dobiti ili pomoću kisele ili alkalne hidrolitičke razgradnje. Međutim, prikupljanje slobodnih i vezanih fenola u jednom postupku ekstrakcije ne čini se moguće obzirom na količinu slobodnih fenola izgubljenih u postupku odmašćivanja potrebnog za uklanjanje lipida tijekom hidrolize. Stoga, u slučaju temeljitog istraživanja potpune fenolne antioksidacijske aktivnosti ječma, i slobodni i vezani fenoli moraju biti ekstrahirani (Bonoli i sur., 2004).

2.6.2. Uvjeti ekstrakcije

Na proces ekstrakcije kruto-tekuće, veliki utjecaj imaju različiti čimbenici o kojima ovisi sama brzina ekstrakcije:

- topljivost krute tvari;
- temperatura ekstrakcije - u većini slučajeva veća temperatura ubrzava proces ekstrakcije jer povećava brzinu otapanja krute tvari kao i brzinu difuzije u volumen otapala, no u nekim slučajevima se aktivne komponente degradiraju porastom temperature;
- veličina čestica - manje čestice imaju veću ukupnu površinu pa je brži prijenos mase i kraći put koji otopljena tvar prijeđe izlazeći iz krutine, zbog toga je poželjno da je kruta tvar usitnjena;
- otapalo - u početku je otapalo relativno čisto, ali kako ekstrakcija napreduje, koncentracija otopljene tvari je sve veća i brzina ekstrakcije se smanjuje. Do smanjenja brzine dolazi prvo zbog povećanja koncentracije otopljene tvari, a drugo zbog povećanja viskoziteta otopine;
- miješanje - uzrokuje povećanje turbulencije čime se povećava prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja oko čestice u glavnu masu otapala što povećava brzinu difuzije otopljene tvari kroz pore krute tvari na površini čestica.

Nakon završene ekstrakcije dobiva se ekstrakcijska otopina koja se sastoji od otapala i otopljene tvari (Ježek, 2008). Zbog nepoznavanja oblika pora kojima se odvija difuzija i specifičnosti pojedinog ekstrakcijskog sustava, brzina prijenosa tvari unutar krutog materijala je teško određiva. Unatoč ovim nedostacima ekstrakcije, njezina najveća primjena je u prehrambenoj industriji (dobivanje šećera, ulja, proteina; izolacija aktivnih komponenata, tvari arome, izdvajanje nepoželjnih tvari), farmaceutskoj industriji (aktivne komponente ljekovitog bilja), kozmetičkoj industriji i kemijskoj industriji (dobivanje organskih boja, metala iz ruda) (Tomas i sur., 2013).

2.6.3. Prijenos mase u procesu kruto-tekuće ekstrakcije

Kada krutu tvar dovedemo u kontakt s nekim otapalom, na površini te tvari vrlo brzo se stvara sloj zasićene otopine kojeg nazivamo granični sloj. U tom sloju koncentracija otopine ima ravnotežnu vrijednost c_s . Ukoliko otopljena tvar ne bi difundirala iz graničnog sloja,

otapanje tvari bi prestalo. Međutim, uslijed razlike koncentracije između graničnog sloja i ostatka otapala, postoji koncentracijski gradijent zbog kojeg topljiva tvar stalno prelazi u ostatak otapala, a taj mehanizam se zbiva na dva načina:

- difuzijom - vrlo spor proces budući da je prijenos mase u molekularnom razmjeru,
- konvekcijom - odvija se u molarnom razmjeru gdje se skupine molekula gibaju s mjesta više na mjesto niže koncentracije.

Brzina prijenosa mase iz krute tvari u otapalo izražava se formulom (1):

$$\frac{dW}{dt} = K \cdot \bar{A} \cdot (c_s - c) \quad (1)$$

gdje:

- w/t - predstavlja brzinu prijenosa mase u otapalo [kg/s];
- $\bar{A}$ - dodirna površina (međufaza) između tekućine i krute čestice [m²];
- c_s - masena koncentracija zasićene otopine (u graničnom sloju) [kg/m³];
- c - masena koncentracija otopine (u glavnoj masi otopine) [kg/m³];
- K - koeficijent prijenosa mase [m/s] (Tomas i sur., 2013).

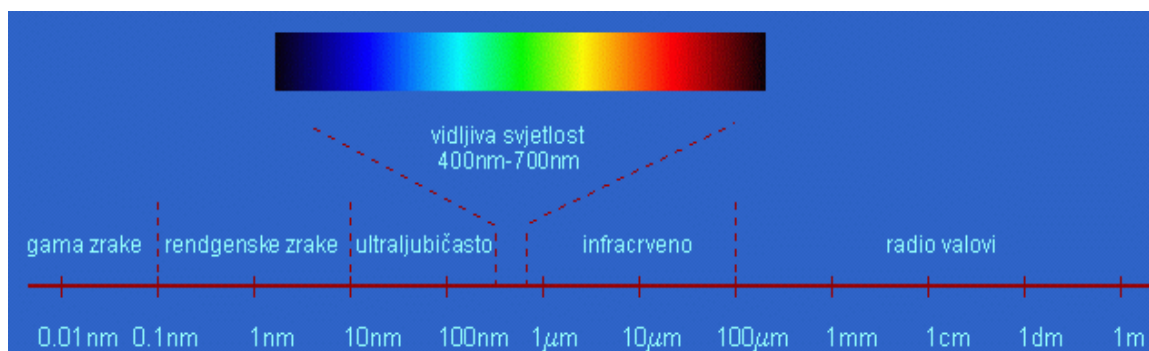
2.7. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do značajnog interesa u kemiji antioksidacijskih spojeva. Kvalitativno i kvantitativno gledano, malo se zna o identitetu fenolnih spojeva te postoji stalna potreba za razvojem analitičkih tehnika (Goufo i Trindade, 2014). Zasad, fenolni spojevi mogu se kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih tehnika kao što su:

- UV/VIS spektrofotometrija,
- HPLC (Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija),
- TLC (Tankoslojna kromatografija),
- Kapilarno-zonska elektroforeza (Dragović-Uzelac i sur., 2009).

2.7.1. Spektrofotometrijske metode određivanja fenolnih tvari

Spektrofotometrija je grana znanosti koja se bavi svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučenom u komponente, valne duljine, koje tvore spektar. Elektromagnetski spektar obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija, a uključuje vidljivo, ultraljubičasto, infracrveno, mikrovalno, radiofrekvencijsko zračenje i X-zrake (**Slika 16**).



Slika 16 Elektromagnetski spektar (Jakobek, 2013)

Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta selektivno prigušuje, smanjuje, intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Apsorpcijske značajke te kemijske vrste opisuju se apsorpcijskim spektrom (Jakobek, 2013). Molekula ili dio molekule koji je odgovoran za apsorpciju u UV-VIS dijelu spektra naziva se kromoforna grupa ili kromofora (grčki: chroma + phoros = nosilac boje). Apsorpcija u vidljivom dijelu spektra zasniva se na Lambert-Beerovom zakonu (2) prema kojem se intenzitet elektromagnetskog zračenja I_0 smanjuje prolazom kroz otopinu koja može apsorbirati zračenje. Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c_a) koja apsorbira zračenje, debljini sloja, svjetlosnom putu kroz uzorak (s), molarnom apsorpcijskom koeficijentu specifičnom za svaku tvar, a mijenja se s valnom duljinom (ϵ):

$$A = \log (I_0/I_p) = \epsilon \cdot s \cdot c_a \quad (2)$$

gdje je: I_0 - intenzitet ulazne svjetlosti

I_p - intenzitet propuštene svjetlosti

A - apsorbancija

Omjer intenziteta ulazne i prolazne svjetlosti, vrijednost I_0/I_p , naziva se transmitancija. Lambert - Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije obojenih otopina ili onih kod kojih u toku reakcije nastaje obojenje na osnovi mjerenja apsorbancije. Apsorpcija svjetlosnog zračenja ovisi o prirodi supstance koja apsorbira svjetlost, valnoj dužini upadne svjetlosti, temperature, debljini sloja supstance, a kod otopina i o koncentraciji supstance u otopini (Šeruga, 1988).

UV-VIS spektri nam omogućuju kvalitativnu analizu, odnosno vrstu supstance i kvantitativnu analizu, odnosno koncentraciju tvari. Apsorpcija u UV i VIS području povezana je s prijelazom elektrona iz nižeg u više energetske stanje. UV područje obuhvaća valne duljine od 100 do

380 nm, a VIS područje 380 do 800 nm. Za mjerenje se koriste kvarcne kivete jer obično staklo apsorbira valne duljine ispod 300 nm i stoga nije prihvatljivo.

Instrumenti za mjerenje apsorbancije u spektrofotometriji su:

- fotometri - koriste filtere koji propuštaju različito područje spektra;
- spektrofotometri - mjerenja se vrše na samo jednoj valnoj duljini (**Slika 17**).



Slika 17 UV/VIS spektrofotometar (Shimadzu, UV – 1700 PharmaSpec) (Babić i sur., 2015)

UV-1700 je dvoznačni spektrofotometar s mogućnošću mjerenja apsorbancije u ultraljubičastom i vidljivom području odnosno u području valnih duljina od 190 do 1100 nm. Brzina skeniranja je varijabilna između 10 i 3000 nm/min. Izvor svjetlosti je halogena (za vidljivo područje) i deuterijska lampa (za ultraljubičasto područje), a detektor zračenja je silikonska fotodioda. Uređaj je opremljen s dva mjerna mjesta, jednim za uzorak te jednim za slijepu probu. Mjerenje se provodi u kvarcnim kivetama s duljinom puta od 1 cm (Babić i sur., 2015).

Najvažniji dijelovi instrumenata u spektrofotometriji:

- izvor energije zračenja: najčešće lampa s volframovim vlaknom,
- selektor valne duljine, monokromator: uske oblasti valnih duljina dobiju se pomoću obojenih filtara, prizmi i razreza, difrakcionih rešetki i razreza,
- instrumenti s filtrima – fotometri,
- instrumenti s rešetkama ili prizmama – spektrofotometri,
- spremnik/ci za uzorke,
- uređaj za mjerenje jačine zračenja (detektor zračenja) i
- procesor signala.

2.7.2. Čimbenici mjerenja

Odabir valne duljine

Ako se izmjeri apsorbancija pri različitim valnim duljinama, dobije se krivulja koja se naziva apsorpcijski spektar. Mjerenje se uglavnom provodi u apsorpcijskom maksimumu. Iako je moguće primijeniti bilo koju valnu duljinu na kojoj spoj apsorbira, najbolje je odabrati valnu duljinu koja daje najstrmiju baždarnu krivulju jer će mjerenja pri toj valnoj duljini biti osjetljivija. Pri odabiru valne duljine treba paziti i na druge faktore kao što su apsorpcijski spektri tvari koje mogu smetati (i druge tvari prisutne u uzorku mogu apsorbirati kod istih valnih duljina). Dakle, odabire se ona valna duljina pri kojoj nema smetnji od drugih tvari.

Mjeri se nekoliko različitih koncentracija tvari, na odabranoj valnoj duljini, a koncentracija se prikaže u ovisnosti o apsorbanciji. Mjerenje uzorka na odabranoj valnoj duljini, računanje koncentracije u uzorku, vrši se pomoću kalibracijske krivulje (Jakobek, 2013).

2.8. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija općenito podrazumijeva poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa (odziva) uz što manje troškove, a može se provesti bilo empirijskim ili statističkim metodama. S obzirom na to da svaki tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre neće dati stvarnu sliku njihovih utjecaja na promatrani proces. Međutim, u novije vrijeme sve se više u optimizaciji procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a jedna od njih je i metoda odzivnih površina, eng. Response surface methodology, RSM (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

2.8.1. Karakteristike metode odzivnih površina

Metodologija odzivnih površina razvijena je od strane Box i suradnika 50-ih godina. RSM se sastoji od skupine matematičkih i statističkih tehnika koje se temelje na slaganju empirijskih modela s eksperimentalnim podacima dobivenih u laboratorijima. Prema tome, linearni ili kvadratni polinomi funkcije opisuju istraživani sustav i, posljedično, istražuju modeliranje i premještanje eksperimentalnih uvjeta do njihove optimizacije.

Neke faze u primjeni RSM kao tehnike optimizacije su kako slijedi:

- (1) izbor nezavisnih varijabli glavnih učinaka na sustav kroz „screening studije“ i razgraničenje eksperimentalne regije u skladu s ciljem studije i iskustvom istraživača;
- (2) izbor eksperimentalnog dizajna i provođenje eksperimenata prema odabranoj eksperimentalnoj matrici;
- (3) matematičko-statistička obrada dobivenih eksperimentalnih podataka kroz slaganje s funkcijom polinoma;
- (4) procjena slaganja modela;
- (5) provjera nužnosti i vjerojatnosti izvođenja pomaka u smjeru optimalnog područja i
- (6) dobivanje optimalne vrijednosti za svaku istraživanu varijablu.

Metoda odzivnih površina obuhvaća skup matematičkih i statističkih metoda koje se temelje na aproksimaciji eksperimentalnih podataka empirijskim modelom (npr. jednadžbom polinoma). Budući da mnogobrojne varijable mogu utjecati na odgovor promatranog sustava, praktički je gotovo nemoguće identificirati i kontrolirati baš svaki i najmanji doprinos sustavu. Prema tome, potrebno je odabrati one varijable s većim učincima što se postiže kroz „screening“ dizajna.

Ipak, matematički model pronađen nakon slaganja funkcije s podacima ponekad ne mora na zadovoljavajući način opisati eksperimentalnu domenu studija. Pouzdaniji način za procjenu kvalitete modela omogućen je primjenom analize varijance (ANOVA). Središnja ideja ANOVA analize je usporediti varijacije modela (promjena u kombinaciji promjenjive razine) i varijacije slučajnih pogrešaka u mjerenjima dobivenih odgovora. Iz ove usporedbe moguće je procijeniti značaj regresije u predviđanju odziva eksperimentalne varijance, a procjena varijacije seta podataka radi se pomoću njihove disperzije. Stoga, analiza ANOVA izračunava neke statističke podatke pomoću kojih je moguće odrediti je li odabrana funkcija i nedostatak modela (eng. lack of fit) značajan te pomoću njih odabrati najprihvatljiviji model koji će najbolje opisati eksperimentalnu domenu.

Najšira primjena ove metode je u slučajevima gdje više varijabli utječe na karakteristike procesa. Prije primjene ove metode potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti iz ispitivanog eksperimentalnog područja. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna ploha. Odzivna funkcija je funkcija koja opisuje odzivnu plohu i ona

prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoj funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i proračunati koeficijente jednadžbe. Odabir dizajna eksperimenta ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom, koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine, odnosno dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom), kao što je Box-Behnken dizajn. Takvi modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te njihovoj interakciji kao i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Navedeni planovi pokusa razlikuju se obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli (Bezerra i sur., 2008).

2.8.2. Definicije pojmova u metodi odzivnih površina

Eksperimentalna domena - predstavlja područje ispitivanja odnosno raspon minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (uvjeta, parametara).

Dizajn eksperimenta (plan pokusa) - predstavlja set eksperimenata određenih matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli.

Faktori ili nezavisne varijable - varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedne od drugih i koje se kontroliraju tijekom procesa (npr. temperatura, vrijeme, protok, itd.)

Razina varijabli - različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperiment provesti (npr. varijabla temperature na tri razine: 30-60-90 °C) da bi se optimizirao neki proces.

Odziv ili zavisne varijable - predstavljaju izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija).

Ostatak (eng. residual) - predstavlja razliku između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka, odnosno onaj dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom.

Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom predstavljena je niskim vrijednostima ostataka (Bezerra i sur., 2008).

2.8.3. Box-Behnken dizajn

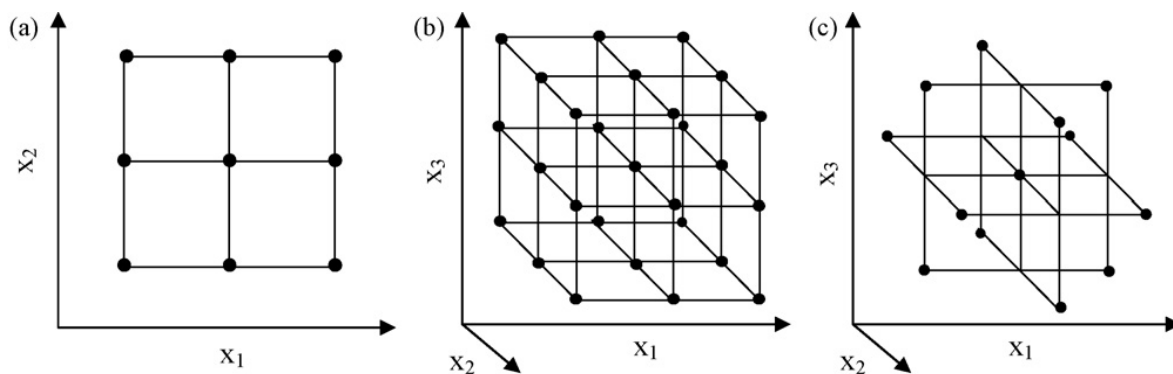
Box i Behnken dizajn (**Slika 18**) predlaže kako odabrati točke eksperimenta kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn je mnogo učinkovitiji i efikasniji od trofaktorijskog dizajna ($3k$) uglavnom zbog mogućnosti ispitivanja više varijabli i to od 3 do 10 dok je trofaktorijski dizajn primjenjiv za ispitivanje do 4 varijable i zahtjeva puno više pokusa. Osnovne karakteristike ovoga dizajna su:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu:

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

gdje je: k broj faktora, a c_p je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- sve razine faktora se moraju svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina (Bezerra i sur., 2008).



Slika 18 Trofaktorijski dizajn za optimizaciju a) dvije varijable b) tri varijable c) Box-Behnken dizajn za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka (Bezerra i sur., 2008)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje utjecaja procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma te određivanje optimalnih procesnih uvjeta ekstrakcije.

U prvom dijelu rada provedeno je ispitivanje utjecaja sastava otapala (volumni udio 96%-tnog etanola u vodenoj otopini: 30, 60 i 90%, v/v), temperature (30, 60 i 90 °C) i vremena ekstrakcije (10, 40 i 70 minuta) te njihove interakcije tijekom ekstrakcije u vodenoj kupelji s tresilicom. Procjena ispitivanih uvjeta na promatrane procese te njihovo optimiranje provedeno je, uz primjenu programa Design Expert 7.1.6., metodom odzivnih površina (eng. Response surface methodology) na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

Nadalje, pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije, ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji radi provjere uspješnosti optimiranja te na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi-LSV s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

U ovom istraživanju korištena su 3 uzorka ječma iz različitih dijelova Hrvatske: Nove Gradiške (JNG), Čakovečkih mlinova (JČ) i Vinkovaca (JV) (**Slika 19**).



Slika 19 Pripremljeni uzorci za analizu

3.2.2. Granulometrijska analiza

Uzorci ječma pažljivo su očišćeni od pljevice i primjesa propuhivanjem i probiranjem, zatim samljeveni na laboratorijskom mlinu. Prije provedbe ekstrakcije, provedena je granulometrijska analiza uzoraka brašna na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200) (**Slika 20**) te je određena prosječna veličina čestica. Na seriju standardnih sita, prethodno izvaganih zajedno s kuglicama koje olakšavaju odjeljivanje čestica, preneseno je 100 grama uzorka. Sita su posložena tako da gornje sito ima najveće otvore, a zadnje sito je tzv. "slijepo sito" (**Tablica 4**). Prosijavanje je provedeno tijekom 5 minuta te je potom ponovno vagano svako pojedino sito s uzorkom na temelju čega je izračunan maseni postotak svake frakcije i srednji promjer veličine čestica.



Tablica 4 Oznaka i veličina otvora sita

Broj sita	Veličina sita [μm]
8	0,710
7	0,560
6	0,400
5	0,280
4	0,150
3	0,125
2	0,100
1	0,050
0	„slijepo sito“

Slika 20 Tresilica za prosijavanje sa standardnom serijom sita Retsch GmbH, AS200 Digit (Babić i sur., 2015.)

Prosječna veličina čestica izračunata je prema jednadžbi:

$$d_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum (W_i \log d_i)}{\sum W_i} \right] \quad (4)$$

Standardna devijacija:

$$S_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum W_i (\log d_i - \log d_{gw})^2}{\sum W_i} \right]^{0,5} \quad (5)$$

Broj čestica/g:

$$\frac{1}{\rho\beta_v} \exp(4,5 \ln^2 S_{gw} - 3 \ln d_{gw}) \quad (6)$$

Površina čestica [cm^2/g]:

$$\frac{\beta_s}{\rho\beta_v} \exp(0,5 \ln^2 S_{gw} - \ln d_{gw}) \quad (7)$$

gdje je: d_{gw} - prosječna veličina čestica

W_i - masa čestica na i-tom situ

d_i - promjer otvora i-tog sita

S_{gw} - standardna devijacija

β_v - faktor oblika za izračun volumena čestica

ρ - specifična masa materijala (Baker i Herrman, 2002).

3.2.3. Određivanje suhe tvari

Određivanje udjela suhe tvari provedeno je pomoću tzv. brzog analizatora vlage, odnosno termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (**Slika 21**). Ispitivani uzorak stavljen je na aluminijsku pliticu (oko 3 g) koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje gdje se sušenje provodi do



Slika 21 Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

konstantne mase. Uvjeti sušenja odabrani su prema preporukama proizvođača uređaja za ječmeno brašno: brza metoda (eng. rapid), temperatura sušenja 180°C i kriterij završetka procesa (eng. switch-off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur., 2003). Sušenje ispitivanih uzoraka brašna se provodilo u dva ponavljanja.

3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA JEČMA

3.3.1. Provedba ekstrakcije

U prvom dijelu eksperimentalnog rada su provedena preliminarna istraživanja kruto-tekuće ekstrakcije pomoću vodene kupelji s tresilicom pri 200 rpm (Julabo SW-23, Njemačka) (**Slika 22 A**) s ciljem određivanja intervala ispitivanih procesnih uvjeta. Za odabir mase uzorka provedena je po jedna ekstrakcija s različitim masama uzoraka i to 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 i 5 grama. Masa uzorka od 1,5 g pokazala je najbolje rezultate i najveći prinos fenolnih tvari. Za odabir otapala korišteno je nekoliko različitih razrjeđenja etanola: 10, 30, 50, 70, 90 i 96% pri čemu su odabrana 30, 60 i 90%. Pri odabiru vremena, ekstrakcije su trajale 20, 40, 60 i 90 minuta pri čemu su odabrane varijable 10, 40 i 70 minuta.

Daljnji postupak ekstrakcije proveden je tako da je u tikvice odvagano 1,5 g uzorka brašna te je dodano 20 mL ekstrakcijskog otapala. Tikvice su začepljene i postavljene u vodenu kupelj s tresilicom (Julabo SW-23) gdje je provedena ekstrakcija uz rotaciju od 200 rpm i podešenu ispitivanu temperaturu i vrijeme. Provedeno je ispitivanje utjecaja otapala, temperature i vremena ekstrakcije. Eksperimenti su provedeni pri različitim kombinacijama ispitivanih uvjeta određenim prema Box-Behnkenovom dizajnu (ukupno 15 pokusa) na osnovi čega su, nakon određivanja prinosa fenolnih tvari u ekstraktima, određeni optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je potom provedena i ekstrakcija u univerzalnom aparatu za ekstrakciju Büchi (B-811 LSV) koji je potpuno automatiziran ekstrakcijski sustav (**Slika 22 B**). Sustav Büchi uključuje četiri ekstrakcijske jedinice s posudama za otapalo volumena 230 mL i ekstrakcijskim čahurama te modul za uvođenje inertnog plina. Sustav ima mogućnost pohrane 50 različitih programa te primjene četiri različite metode ekstrakcije: Standardni Soxhlet, toplu, vruću i kontinuiranu ekstrakciju (Babić i sur., 2015). Izrađen je za laboratorijsku primjenu kruto-tekuće ekstrakcije, a ima mogućnost ekstrakcije s ispiranjem i sušenjem ekstrakta. Postoji mogućnost odabira vremena ekstrakcije i broja ciklusa, ali ne i temperature ekstrakcije jer se ekstrakcija temelji na vrelištu otapala pri čemu otapalo isparava, kondenzira se i prelijeva preko uzorka te se odvija ekstrakcija topljivih tvari u primijenjenom otapalu. Prikladan je za otapala s točkom vrelišta od 30 do 150 °C.



Slika 22 A) Vodena kupelj s trešnjom (Julabo SW-23, Njemačka)

B) Univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi, B-811 LSV)

Princip

Soxhlet standard - otapalo isparava iz posude pri čemu se pare dižu do hladila i kondenziraju. Kondenzirano otapalo se prelijeva preko kondenzacijske cijevi u uzorak koji se nalazi u ekstrakcijskoj čahuri. Stakleni ventil je zatvoren. Ekstrahiraju se tvari topljive u otapalu koje se zadržava u kontaktu s uzorkom sve dok nivo otapala ne dosegne visinu na kojoj je postavljen optički senzor. Kada nivo otapala dosegne visinu na kojoj je postavljen optički senzor, otvara se stakleni ventil i otapalo se s ekstrahiranom tvari ispušta nazad u posudu s otapalom. Ciklus se ponavlja dok ne istekne postavljeno vrijeme ekstrakcije.

Vruća ekstrakcija - otapalo isparava iz posude za otapalo zbog grijanja donjim grijačem, pare se dižu do hladila gdje se kondenziraju i otapalo se preko kondenzacijske cijevi prelijeva preko uzorka, nakuplja se u ekstrakcijskoj komori gdje se odvija ekstrakcija iz uzorka i pri tom se grije gornjim grijačem. Kada nivo otapala dosegne visinu optičkog senzora koji upravlja otvaranjem/zatvaranjem staklenog ventila, u posudu s otapalom vraća se samo nekoliko mililitara otapala, a ostatak ostaje u kontaktu s uzorkom. Na taj način postiže se to da u ekstrakcijsku komoru stalno dolazi svježije otapalo čime se sprječava zasićenje otapala u ekstrakcijskoj komori.

Soxhlet topli - princip rada ove metode je isti kao i za standardni Soxhlet, jedina je razlika to što se aktivira i gornji grijač. Tada se pri ekstrakciji i podizanju nivoa otapala s ekstrahiranom tvari do optičkog senzora dodatno zagrijava taj ekstrakt u ekstrakcijskoj komori prije no što se otvori stakleni ventil i sav ekstrakt otpusti u posudu za otapalo.

Kontinuirana ekstrakcija - metoda kod koje je optički senzor neaktivan, a stakleni ventil stalno otvoren. Otapalo nakon isparavanja i kondenziranja konstantno cirkulira preko uzorka bez zadržavanja u ekstrakcijskoj komori. Ekstrakcija prestaje kada istekne zadano vrijeme trajanja procesa.

Od opisane četiri metode, u laboratorijskim se istraživanjima najviše koristi Standard Soxhlet (Bucić-Kojić, 2008).

Postupak

Odvagano je 7,5 g brašna ječma veličine 0,015 - 0,02 cm u staklene frite koje su potom pričvršćene u ekstrakcijsku komoru. Ekstrakcija je rađena pri optimalnim uvjetima za fenole (otapalo 63% etanol i vrijeme 60 minuta) i flavonoide (otapalo 90% etanol i vrijeme 70 minuta) te su izračunati masenih udjeli istih.

3.3.2. Priprema ekstrakta za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida

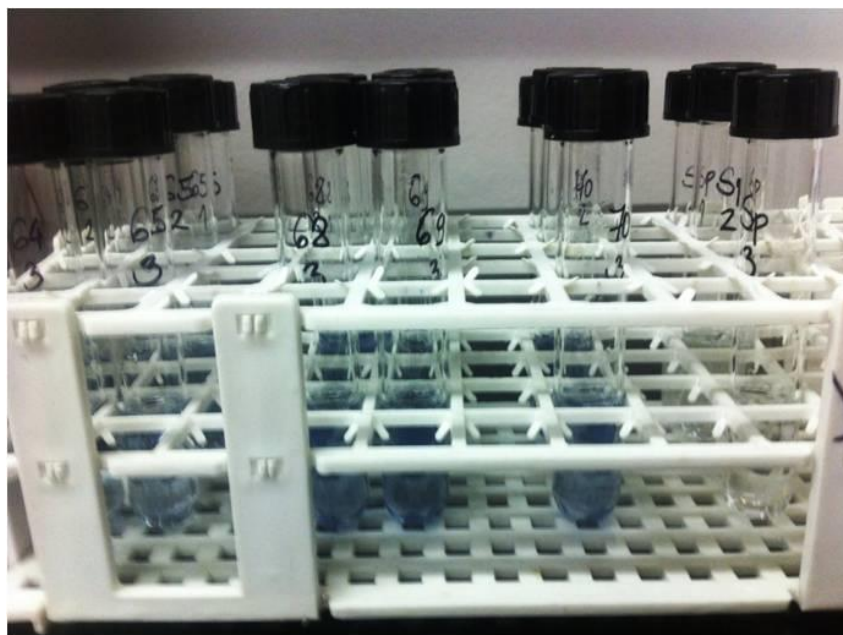
Nakon ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana (Sigma 2-16) pri 15 000 g tijekom 5 minuta. Supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem te je nadopunjen ekstrakcijskim otapalom do poznatog volumena.

Nakon centrifugiranja suspenzije i dekantiranja supernatanta, pripremljeno je odgovarajuće razrjeđenje ekstrakta. Određivanje fenolnih tvari provođeno je isti dan kada i ekstrakcija.

3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima ječma

Ukupne fenolne tvari u ekstraktima brašna ječma određene su spektrofotometrijski mikro Folin-Ciocalteuovom metodom. Folin-Ciocalteuova metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. U alkalnom mediju, u prisustvu Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline), fenolni spojevi se oksidiraju, a navedene kiseline reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid

koji su plavo obojeni, a čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Pavel i sur., 2006), (Slika 23).



Slika 23 Folin-Ciocalteuova metoda određivanja fenolnih tvari

3.3.4. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prije određivanja koncentracije fenolnih tvari u ekstraktima brašna cjelovitog zrna ječma, napravljena je baždarna krivulja galne kiseline koja je korištena kao standard. Temeljna otopina galne kiseline pripremljena je otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Tako pripremljena otopina stabilna je tijekom dva tjedna. Nakon pripreme temeljne standardne otopine galne kiseline pripremljena su različita razrjeđenja (0,05 mg/mL – 1 mg/mL) na način da je u odmjerene tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL, 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima (poglavlje 3.3.5), određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline.

3.3.5. Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

U epruvetu je otpipetirano 40 μL pripremljenog ekstrakta brašna cjelovitog zrna ječma, 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin - Ciocalteu-ovog reagensa te je nakon stajanja između 30 sekundi i 8 minuta u epruvetu dodano 600 μL 20%-tne vodene otopine Na_2CO_3 . Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednaki volumen (40 μL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 minuta na 40 °C da se razvije boja čija je apsorbancija mjerena na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 765 nm.

Iz dobivenih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje, izračunate su koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Zbog lakše usporedivosti dobivenih rezultata, konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih tvari preračunate su na suhu tvar uzorka $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u tri ponavljanja.

3.3.6. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima ječma

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida.

3.3.7. Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju ukupnih flavonoida

Prije određivanja koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma, napravljena je baždarna krivulja (+)-katehina koja je korištena kao standard. Temeljna otopina (+)-katehina pripremljena je otapanjem 0,2 g (+)-katehina u krutom stanju s 10 mL 95%-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Od ovako pripremljene otopine, pripremljena su različita razrjeđenja (0,02 mg/mL - 0,2 mg/mL) na način da je u odmjerene tikvice od 50 ml otpipetirano po 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2 mL; 2,5 ml; 5,0 ml pripremljene otopine (+)-katehina te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine (+)-katehina te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji (+)-katehina.

3.3.8. Postupak za određivanje ukupnih flavonoida

U 4 mL destilirane vode dodano je 1 mL ekstrakta brašna cjelovitog zrna ječma, a potom 0,3 mL 5% natrijevog nitrita te je nakon pet minuta dodano 0,3 mL 10%-tne vodene otopine aluminij(III)-klorida-heksahidrata. Nakon 5-8 minuta dodano je 2 mL 1 M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 10 mL. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (1 mL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

Koncentracija flavonoida u ekstraktima brašna ječma određena je u odnosu na standardnu krivulju (+)-katehina (CE) te preračunata na suhu tvar ječma ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.3.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

Osnovni koraci u primjeni metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta:

- odabir nezavisnih varijabli (parametara, faktora) koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara (odabiru se prema cilju ispitivanja ili na temelju iskustva istraživača);
- izbor dizajna eksperimenta i provođenje eksperimenata prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara (ovisna o primijenjenom dizajnu);
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom) primjenom matematičko-statističkih metoda;
- evaluacija prikladnosti modela;
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli.

Box-Behnken–ov plan pokusa korišten je za procjenu utjecaja glavnih procesnih parametara ekstrakcije (temperatura, vrijeme i sastav otapala: etanol/voda) i njihove interakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz ekstrakata brašna ječma (**Tablica 5**). Ispitivane varijable su prevedene u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{X - \frac{X_{\max} - X_{\min}}{2}}{\frac{X_{\max} - X_{\min}}{2}} \quad (8)$$

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je petnaest eksperimenata ekstrakcije s tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja.

Tablica 5 Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za ekstrakciju fenolnih i flavonoidnih tvari iz ekstrakata brašna ječma

Faktor	Donja razina	Centralna razina	Gornja Razina
Kodirane varijable	-1	0	1
Temperatura (X_1 , °C)	30	60	90
Sastav otapala (X_2 , %, v/v)	30	60	90
Vrijeme (X_3 , min)	10	40	70

Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani matematičkim modelom odzivnih površina, tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (9)$$

gdje su :

- Y - modelom predviđena odzivna funkcija,
- β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,
- $X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti).

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma), konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina. Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 7.1.6. (DE). Prednost ovog programa je što može raditi s kodiranim i nekodiranim varijablama.

4. REZULTATI

Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima. Dizajn eksperimenta kao i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6., a korištena je metoda odzivnih površina.

4.1. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA

Tablica 6 Prosječna veličina čestica, standardna devijacija, površina čestica i broj čestica po gramu

Uzorak	Prosječna veličina čestica [cm]	Standardna devijacija, <i>SD</i>	Površina čestica [cm ² /g]	Broj čestica po gramu
JNG	0,019	1,981	309,240	969146,223
JČ	0,020	1,930	278,475	636853,917
JV	0,015	2,180	399,104	3168063,942

4.2. ODREĐIVANJE SUHE TVARI

Nakon provedenog sušenja različitih uzoraka brašna ječma na uređaju za određivanje vlage Mettler Toledo brzom metodom na 180°C, izračunata je suha tvar svih uzoraka te je izražena kao srednja vrijednost dva određivanja (**Tablica 7**).

Tablica 7 Udio suhe tvari uzoraka ječma (JNG - ječam Nova Gradiška, JČ-ječam Čakovec, JV-ječam Vinkovci)

UZORAK	udio suhe tvari, %
JNG	88,780
JČ	88,440
JV	88,690

4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI

Tablica 8 Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini ($\lambda = 765$ nm) za pripadajuće koncentracije otopine galne kiseline

<i>c</i> [mg _{GAE} /mL]	<i>A</i> _{sr}
0	0,000
0,05	0,038
0,1	0,082
0,15	0,134
0,25	0,232
0,5	0,508
0,75	0,772
1	1,002

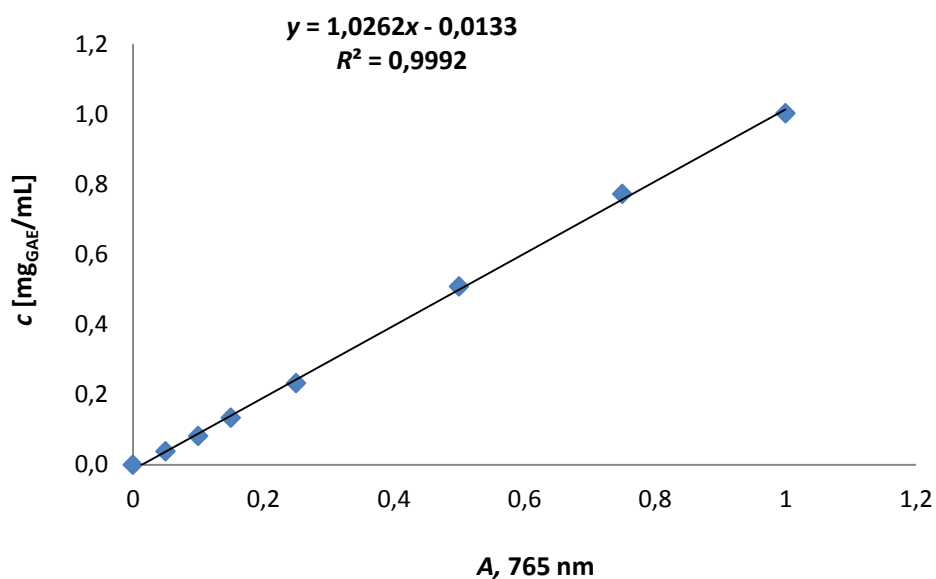
Metodom linearne regresije dobivena je jednačica:

$$y = 1,02262x - 0,0133 \quad (10)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = 1,02262 \cdot A - 0,0133 \text{ [mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}] \quad (11)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbanacija.



Slika 24 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari

4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Tablica 9 Vrijednosti apsorbanacija na valnoj duljini ($\lambda = 510 \text{ nm}$) za pripadajuće koncentracije(+)-katehina

c [mg _{CE} /mL]	A _{sr}
0,000	0,000
0,020	0,066
0,040	0,122
0,060	0,201
0,080	0,254
0,100	0,318
0,200	0,589

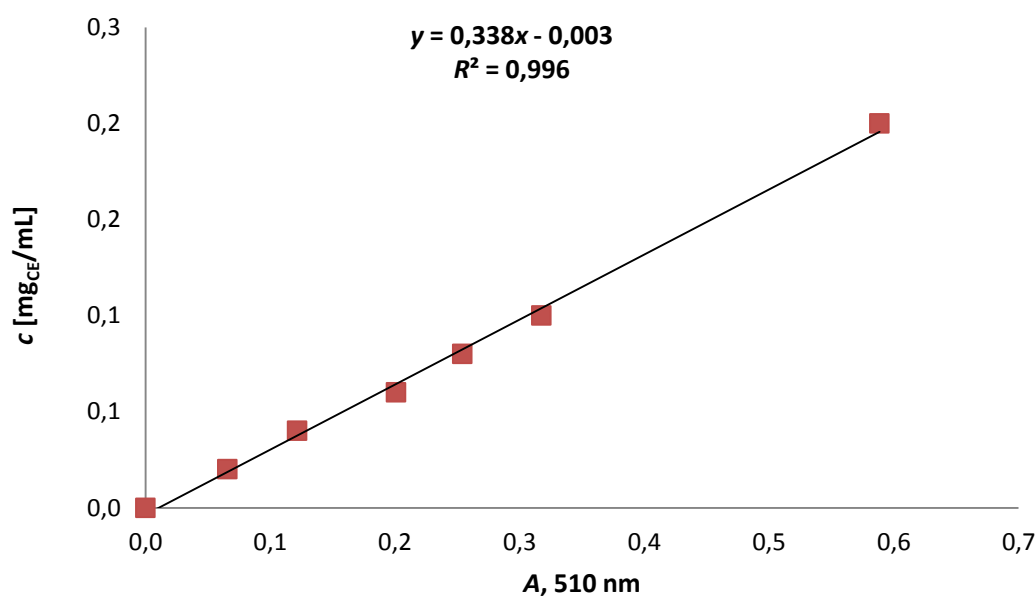
Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 0,3384x - 0,0034 \quad (12)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih flavonoida)} = 0,3384 \cdot A - 0,0034 \text{ [mg}_{\text{CE}}/\text{mL}] \quad (13)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



Slika 25 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih flavonoida

4.5. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH TVARI

Prema jednačbama (11 i 13) izračunate su koncentracije ukupnih fenola [mg_{GAE}/mL] odnosno ukupnih flavonoida [mg_{CE}/mL] koje su preračunate na suhu tvar uzorka na slijedeći način:

$$C = \frac{c \cdot V}{m_{\text{uz}} \cdot w_{\text{s.t.}}} \cdot 100 \text{ [mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{g}_{\text{s.t.}}] \quad (14)$$

gdje je:

- C - maseni udio fenolnih tvari [mg_{GAE(CE)}/g_{s.t.}],
- c - masena koncentracija fenolnih tvari [mg_{GAE(CE)}/mL],
- V - volumen otapala [mL],
- m_{uz} - masa uzorka iz koje su se ekstrahirali fenoli [g],
- $w_{\text{s.t.}}$ - udio suhe tvari [%].

4.6. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI I FLAVONOIDA IZ BRAŠNA JEČMA TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Eksperimentalno je ispitan utjecaj tri procesna uvjeta (faktora) ekstrakcije u tri razine (sastav otapala tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola 30-60-90%, v/v, temperatura 30-60-90°C i vrijeme 10-40-70 minuta na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz brašna cjelovitog zrna ječma. Dizajn eksperimenta, kao i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

Tablica 10 Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima brašna ječma dobivene pri ispitivanju različitih kombinacija procesnih uvjeta (temperatura T , otapalo φ i vrijeme t) definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 , T [°C]	Faktor X_2 , φ [%]	Faktor X_3 , t [min]	$C_{UFT} JNG$ [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	$C_{UFT} JČ$ [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	$C_{UFT} JV$ [mg _{GAE} /g _{s.t.}]
1	90	60	10	3,89	4,13	4,28
2	60	60	40	4,04	3,87	4,45
3	90	30	40	1,77	1,30	1,53
4	60	60	40	4,11	3,80	4,48
5	60	30	70	2,21	2,28	2,26
6	30	30	40	2,03	2,02	1,84
7	60	60	40	4,14	3,86	4,54
8	30	60	10	3,24	3,33	3,36
9	90	60	70	4,68	4,17	4,50
10	60	30	10	2,13	2,60	2,66
11	90	90	40	2,69	2,43	3,11
12	60	90	70	1,31	1,87	1,71
13	30	60	70	3,48	3,66	3,62
14	60	90	10	1,29	1,76	1,53
15	30	90	40	1,17	1,05	1,30

Tablica 11 Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih flavonoida (C_{UFL}) u ekstraktima brašna ječma dobivene pri ispitivanju različitih kombinacija procesnih uvjeta (temperatura T , otapalo φ i vrijeme t) definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 , T [°C]	Faktor X_2 , φ [%]	Faktor X_3 , t [min]	C_{UFL} JNG [mg _{CE} /g _{s.t.}]	C_{UFL} JČ [mg _{CE} /g _{s.t.}]	C_{UFL} JV [mg _{CE} /g _{s.t.}]
1	90	60	10	0,91	1,09	1,03
2	60	60	40	1,00	1,00	1,00
3	90	30	40	0,56	0,51	0,37
4	60	60	40	1,12	1,08	1,08
5	60	30	70	0,58	0,60	0,55
6	30	30	40	0,56	0,56	0,44
7	60	60	40	1,00	1,02	1,00
8	30	60	10	0,92	0,98	0,85
9	90	60	70	1,17	1,00	0,99
10	60	30	10	0,64	0,69	0,64
11	90	90	40	2,26	2,39	2,28
12	60	90	70	1,97	2,21	2,38
13	30	60	70	0,92	1,00	0,87
14	60	90	10	2,22	1,94	2,19
15	30	90	40	1,94	1,96	1,76

4.7. MODELIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (kvadratnim polinomom) prema jednadžbi (9) dobivena je odzivna funkcija odnosno funkcionalna ovisnost sadržaja ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}) i ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) o ispitivanim procesnim uvjetima i o njihovoj interakciji kako slijedi:

JNG:

$$Y_{UFT} = 4,09 + 0,39X_1 - 0,21X_2 + 0,14X_3 + 0,45X_1X_2 + 0,14X_1X_3 - 0,02X_2X_3 - 0,05X_1^2 - 2,13X_2^2 - 0,23X_3^2 \quad (15)$$

$$Y_{UFL} = 1,04 + 0,07X_1 + 0,76X_2 - 0,01X_3 + 0,08X_1X_2 + 0,06X_1X_3 - 0,05X_2X_3 - 0,04X_1^2 + 0,33X_2^2 - 0,02X_3^2 \quad (16)$$

JČ:

$$Y_{UFT} = 3,84 + 0,25X_1 - 0,14X_2 + 0,02X_3 + 0,53X_1X_2 - 0,07X_1X_3 + 0,10X_2X_3 - 0,23X_1^2 - 1,92X_2^2 + 0,20X_3^2 \quad (17)$$

$$Y_{UFL} = 1,03 + 0,06X_1 + 0,77X_2 + 0,01X_3 + 0,12X_1X_2 - 0,03X_1X_3 + 0,09X_2X_3 - 0,01X_1^2 + 0,33X_2^2 - 0,01X_3^2 \quad (18)$$

JV:

$$Y_{\text{UFT}} = 4,49 + 0,41X_1 - 0,08X_2 + 0,03X_3 + 0,53 X_1X_2 - 0,01X_1X_3 + 0,14X_2X_3 - 0,32X_1^2 - 2,22X_2^2 - 0,22X_3^2 \quad (19)$$

$$Y_{\text{UFL}} = 1,02 + 0,09X_1 + 0,83X_2 + 0,01 X_3 + 0,15X_1X_2 - 0,02X_1X_3 + 0,07X_2X_3 - 0,16X_1^2 + 0,35X_2^2 + 0,07X_3^2 \quad (20)$$

gdje su: Y - modelom predviđen maseni udio fenolnih tvari [$\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}$ / $\text{g}_{\text{s.t.}}$],
 X_1 - ispitivana temperatura ekstrakcije [$^{\circ}\text{C}$],
 X_2 - ispitivani volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [% v/v],
 X_3 - ispitivano vrijeme ekstrakcije [min].

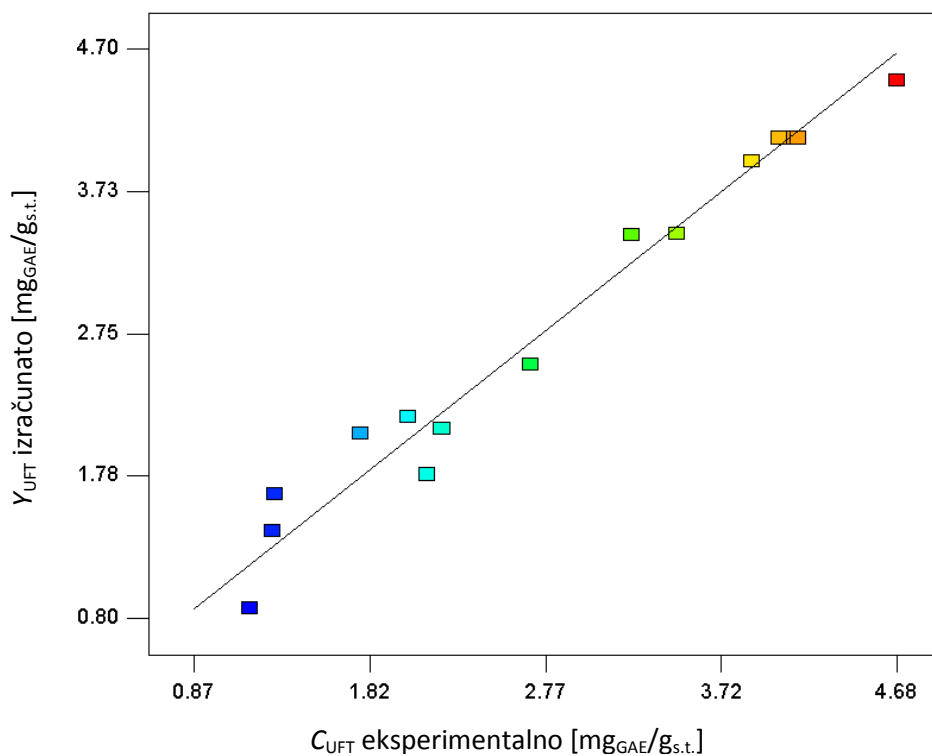
Tablica 12 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna ječma Nova Gradiška (JNG), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob >F (p< 0,05)
Model	19,4796	9	2,1644	19,0624*	0,0023
X_1 -Temperatura	1,2136	1	1,2136	10,6884*	0,0222
X_2 - Otapalo	0,3528	1	0,3528	3,107 ^{ns}	0,1382
X_3 - Vrijeme	0,1589	1	0,1589	1,3997 ^{ns}	0,2900
X_1X_2	0,7960	1	0,7960	7,0104*	0,0456
X_1X_3	0,0731	1	0,0731	0,6441 ^{ns}	0,4587
X_2X_3	0,0009	1	0,0009	0,0082 ^{ns}	0,9313
X_1^2	0,0080	1	0,0080	0,0704 ^{ns}	0,8014
X_2^2	16,8147	1	16,8147	148,0916*	< 0,0001
X_3^2	0,1877	1	0,1877	1,6534 ^{ns}	0,2548
Ostatak	0,5677	5	0,1135		
Nedostatak modela	0,5622	3	0,1874	67,4415*	0,0146
Pogrješka	0,0056	2	0,0028		
Ukupno	20,0473	14			
R	0,9717				

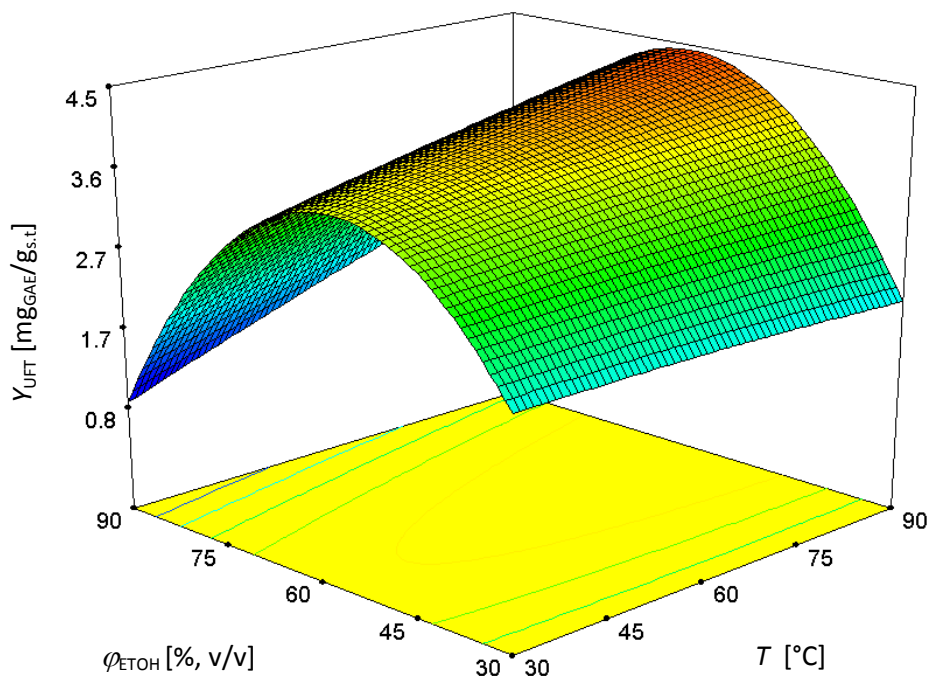
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df -stupnjevi slobode; MS-varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 26 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i izračunatih (Y_{UFT}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Nova Gradiška (JNG)



Slika 27 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Nova Gradiška (JNG) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (ϕ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

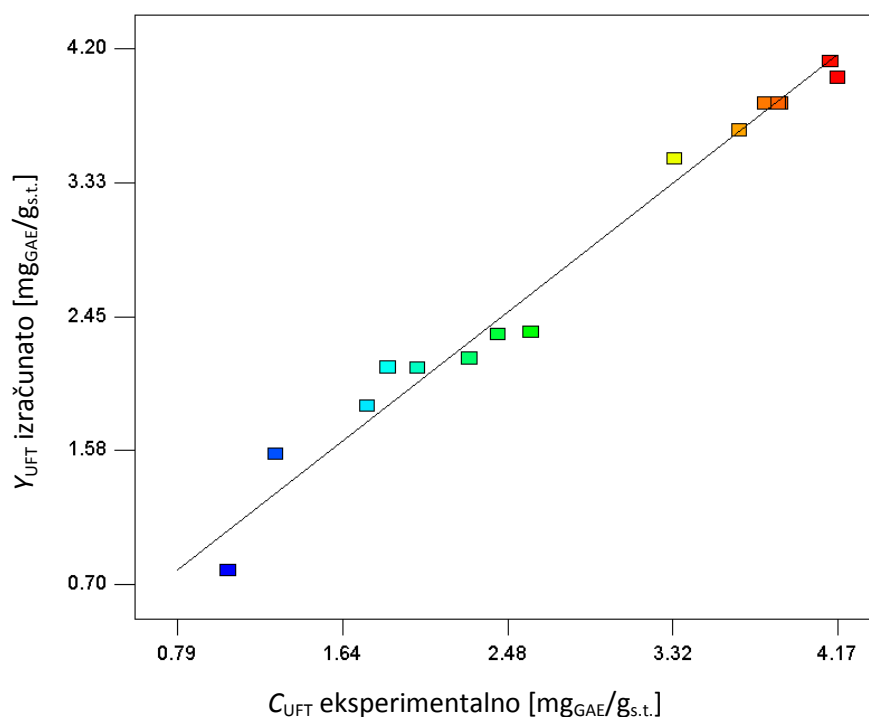
Tablica 13 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna ječma Čakovec (JČ), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob >F (p < 0,05)
Model	15,8985	9	1,7665	25,2321*	0,0012
X ₁ -Temperatura	0,4803	1	0,4803	6,8601*	0,0471
X ₂ - Otapalo	0,1463	1	0,1463	2,0891 ^{ns}	0,2080
X ₃ - Vrijeme	0,0033	1	0,0033	0,0465 ^{ns}	0,8377
X ₁ X ₂	1,1051	1	1,1051	15,7848*	0,0106
X ₁ X ₃	0,0216	1	0,0216	0,3080 ^{ns}	0,6028
X ₂ X ₃	0,0437	1	0,0437	0,6248 ^{ns}	0,4651
X ₁ ²	0,1886	1	0,1886	2,6943 ^{ns}	0,1616
X ₂ ²	13,6012	1	13,6012	194,2744*	< 0,0001
X ₃ ²	0,1525	1	0,1525	2,1778 ^{ns}	0,2000
Ostatak	0,3501	5	0,0700		
Nedostatak modela	0,3466	3	0,1155	67,2725*	0,0147
Pogrješka	0,0034	2	0,0017		
Ukupno	16,2486	14			
R	0,9785				

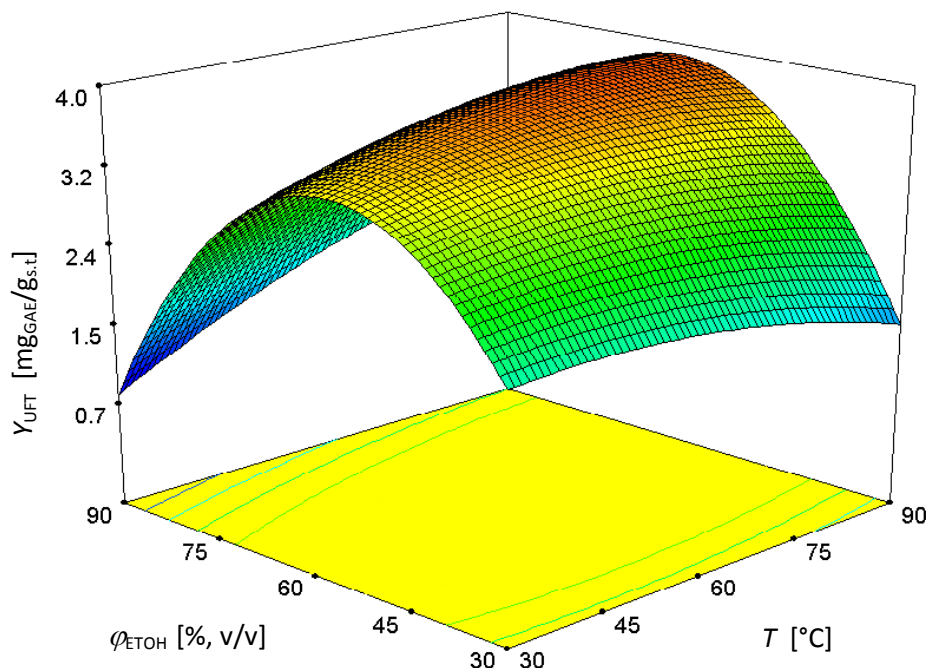
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df -stupnjevi slobode; MS-varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 28 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i izračunatih (Y_{UFT}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Čakovec (JČ)



Slika 29 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Čakovec (JČ) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

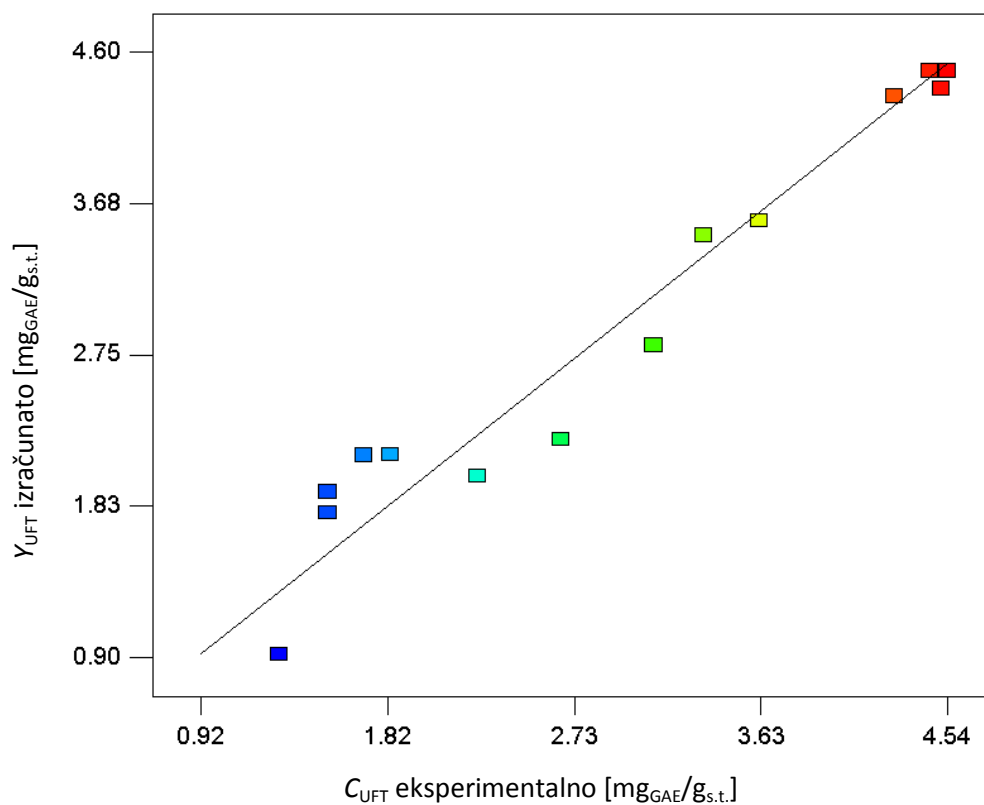
Tablica 14 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna ječma Vinkovci (JV), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob >F ($p < 0,05$)
Model	20,9404	9	2,326711	11,55016*	0,0075
X_1 -Temperatura	1,37565	1	1,37565	6,828947*	0,0475
X_2 - Otapalo	0,051672	1	0,051672	0,25651 ^{ns}	0,6341
X_3 - Vrijeme	0,008601	1	0,008601	0,042696 ^{ns}	0,8444
X_1X_2	1,120511	1	1,120511	5,562396 ^{ns}	0,0649
X_1X_3	0,000455	1	0,000455	0,002256 ^{ns}	0,9640
X_2X_3	0,083358	1	0,083358	0,413802 ^{ns}	0,5484
X_1^2	0,381154	1	0,381154	1,89211 ^{ns}	0,2274
X_2^2	18,20907	1	18,20907	90,39274*	0,0002
X_3^2	0,186635	1	0,186635	0,926485 ^{ns}	0,3800
Ostatak	1,00722	5	0,201444		
Nedostatak modela	1,003134	3	0,334378	163,6978*	0,0061
Pogrješka	0,004085	2	0,002043		
Ukupno	21,94762	14			
R	0,9541				

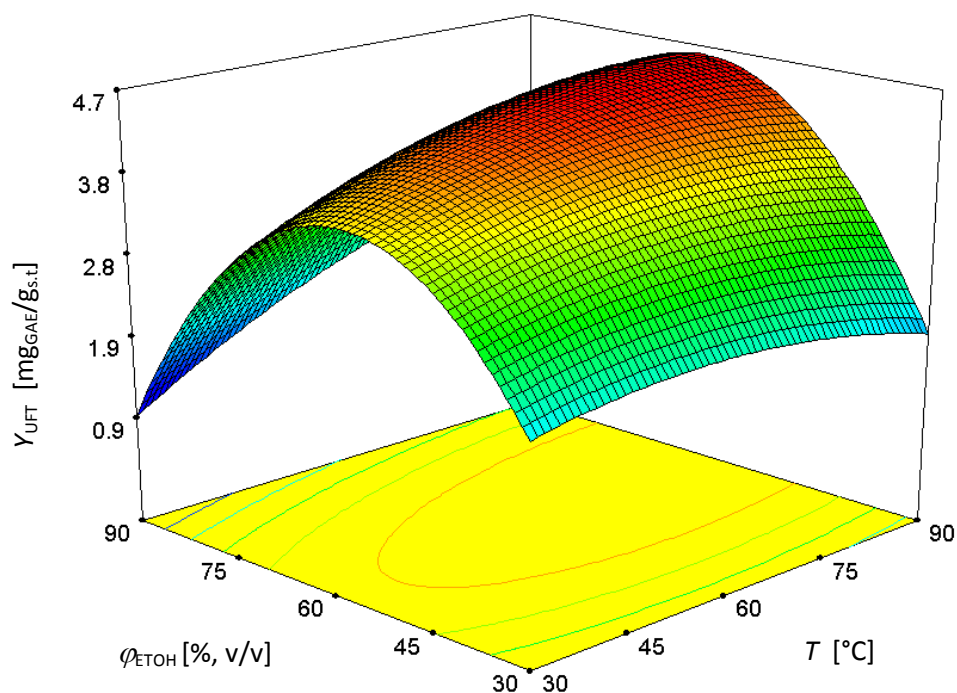
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df -stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 30 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i izračunatih (Y_{UFT}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Vinkovci (JV)



Slika 31 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Vinkovci (JV) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

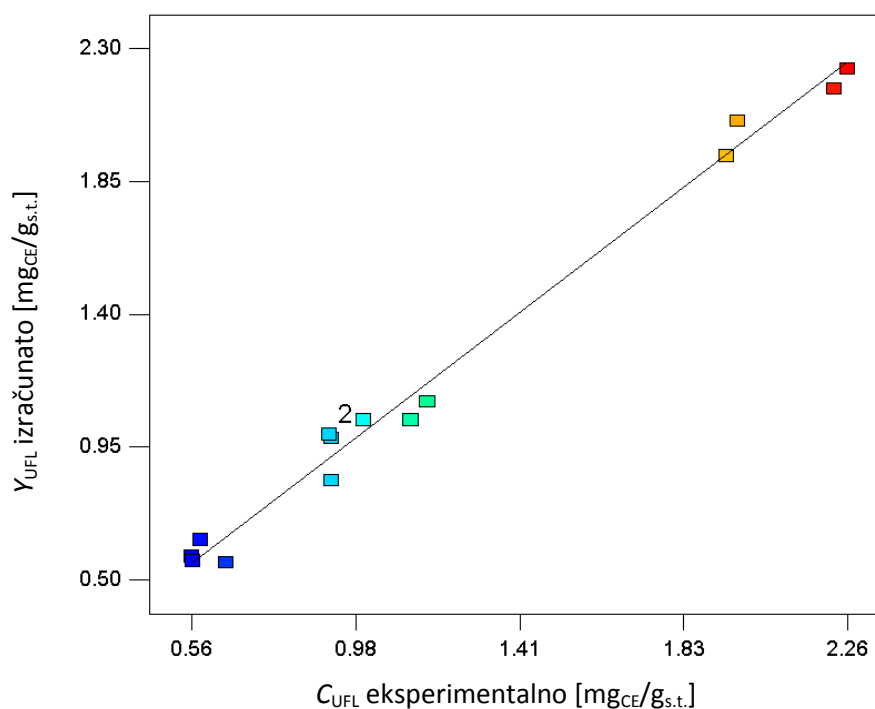
Tablica 15 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma Nova Gradiška (JNG), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	5,0963	9	0,5663	53,5135*	0,0002
X ₁ -Temperatura	0,0393	1	0,0393	3,7114 ^{ns}	0,1120
X ₂ - Otapalo	4,5793	1	4,5793	432,7616*	< 0,0001
X ₃ - Vrijeme	0,0005	1	0,0005	0,0439 ^{ns}	0,8423
X ₁ X ₂	0,0244	1	0,0244	2,3015 ^{ns}	0,1897
X ₁ X ₃	0,0162	1	0,0162	1,5271 ^{ns}	0,2714
X ₂ X ₃	0,0086	1	0,0086	0,8120 ^{ns}	0,4088
X ₁ ²	0,0073	1	0,0073	0,6859 ^{ns}	0,4453
X ₂ ²	0,4043	1	0,4043	38,2058*	0,0016
X ₃ ²	0,0013	1	0,0013	0,1255 ^{ns}	0,7376
Ostatak	0,0529	5	0,0106		
Nedostatak modela	0,0428	3	0,0143	2,8149 ^{ns}	0,2730
Pogrješka	0,0101	2	0,0051		
Ukupno	5,1492	14			
R	0,9897				

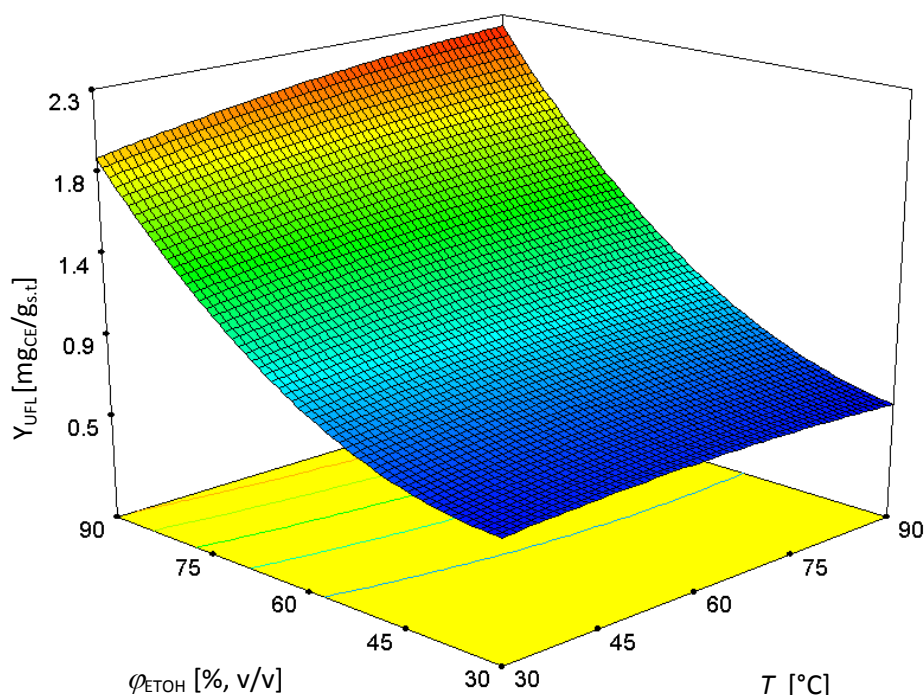
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df -stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz p = 0,05

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 32 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida (C_{UFL}) i izračunatih (Y_{UFL}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Nova Gradiška (JNG)



Slika 33 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Nova Gradiška (JNG) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

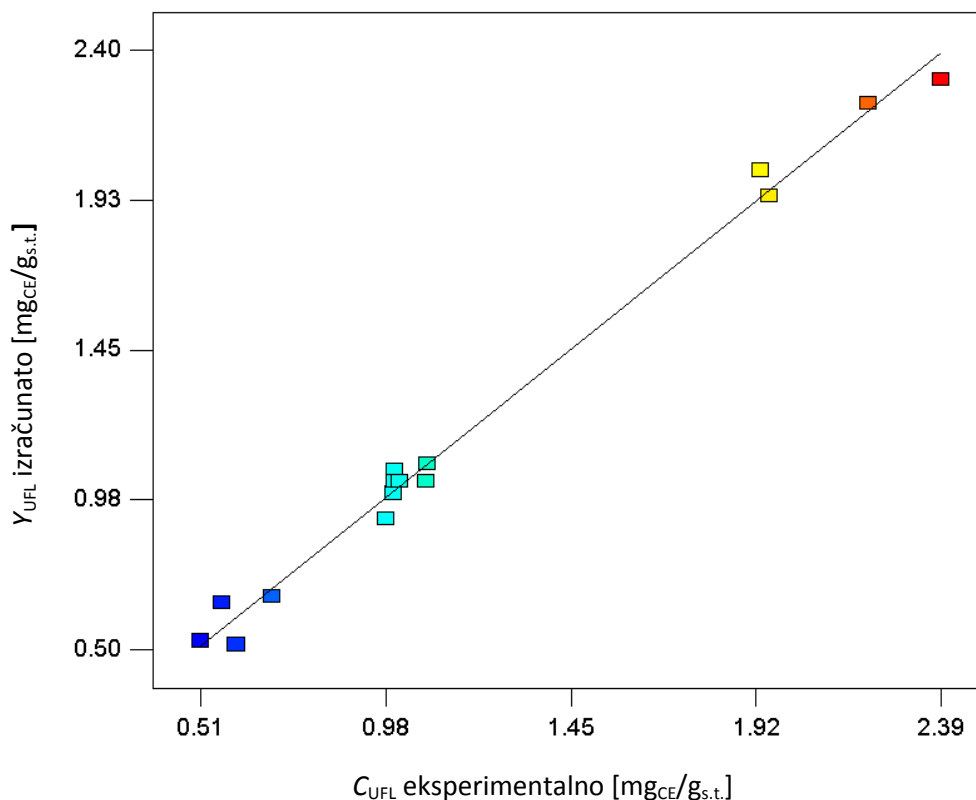
Tablica 16 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma Čakovec (JČ), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F ($p < 0,05$)
Model	5,2480	9	0,5831	67,6671*	0,0001
X_1-Temperatura	0,0308	1	0,0308	3,5732 ^{ns}	0,1173
X_2 - Otapalo	4,7054	1	4,7054	546,0457*	< 0,0001
X_3 - Vrijeme	0,0018	1	0,0018	0,2064 ^{ns}	0,6687
X_1X_2	0,0602	1	0,0602	6,9831*	0,0458
X_1X_3	0,0026	1	0,0026	0,2960 ^{ns}	0,6097
X_2X_3	0,0332	1	0,0332	3,8547 ^{ns}	0,1068
X_1^2	0,0003	1	0,0003	0,0388 ^{ns}	0,8517
X_2^2	0,4062	1	0,4062	47,1416*	0,0010
X_3^2	0,0002	1	0,0002	0,0175 ^{ns}	0,8998
Ostatak	0,0431	5	0,0086		
Nedostatak modela	0,0395	3	0,0132	7,3678 ^{ns}	0,1218
Pogrješka	0,0036	2	0,0018		
Ukupno	5,2910	14			
R	0,9919				

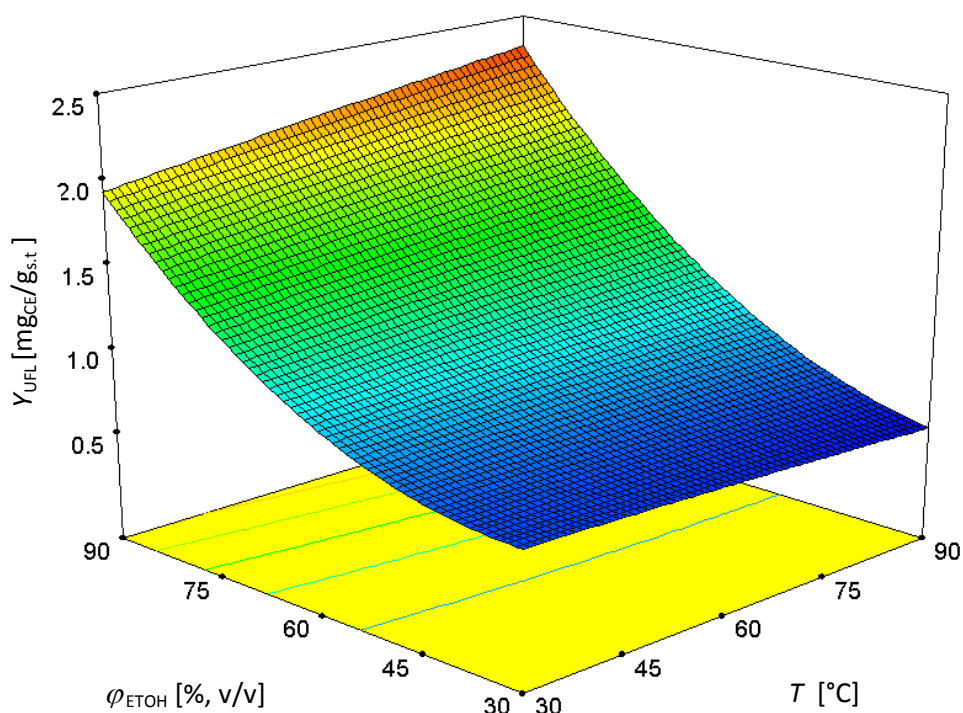
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df -stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 34 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida (C_{UFL}) i izračunatih (Y_{UFL}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Čakovec (JČ)



Slika 35 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Čakovec (JČ) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (ϕ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

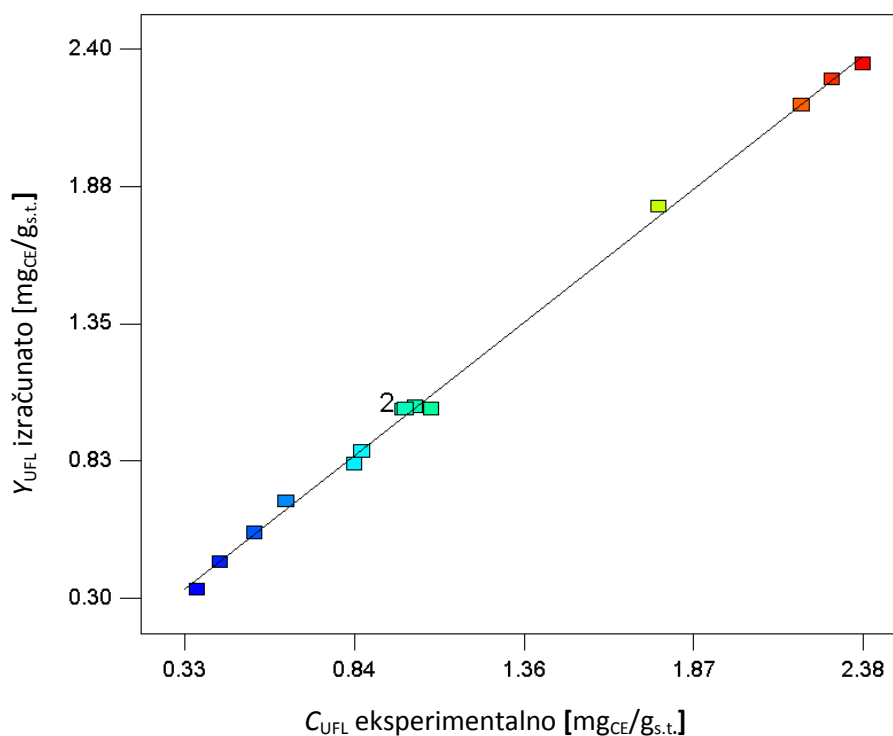
Tablica 17 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma Vinkovci (JV), polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	6,2441	9	0,6938	319,9856*	< 0,0001
X ₁ -Temperatura	0,0722	1	0,0722	33,2967*	0,0022
X ₂ - Otapalo	5,4798	1	5,4798	2527,3347*	< 0,0001
X ₃ - Vrijeme	0,0007	1	0,0007	0,3301 ^{ns}	0,5905
X ₁ X ₂	0,0871	1	0,0871	40,1929*	0,0014
X ₁ X ₃	0,0009	1	0,0009	0,4195 ^{ns}	0,5457
X ₂ X ₃	0,0196	1	0,0196	9,0250*	0,0300
X ₁ ²	0,0919	1	0,0919	42,3925*	0,0013
X ₂ ²	0,4469	1	0,4469	206,1287*	< 0,0001
X ₃ ²	0,0163	1	0,0163	7,5088*	0,0408
Ostatak	0,0108	5	0,0022		
Nedostatak modela	0,0069	3	0,0023	1,1730 ^{ns}	0,4909
Pogrješka	0,0039	2	0,0020		
Ukupno	6,2550	14			
R	0,9983				

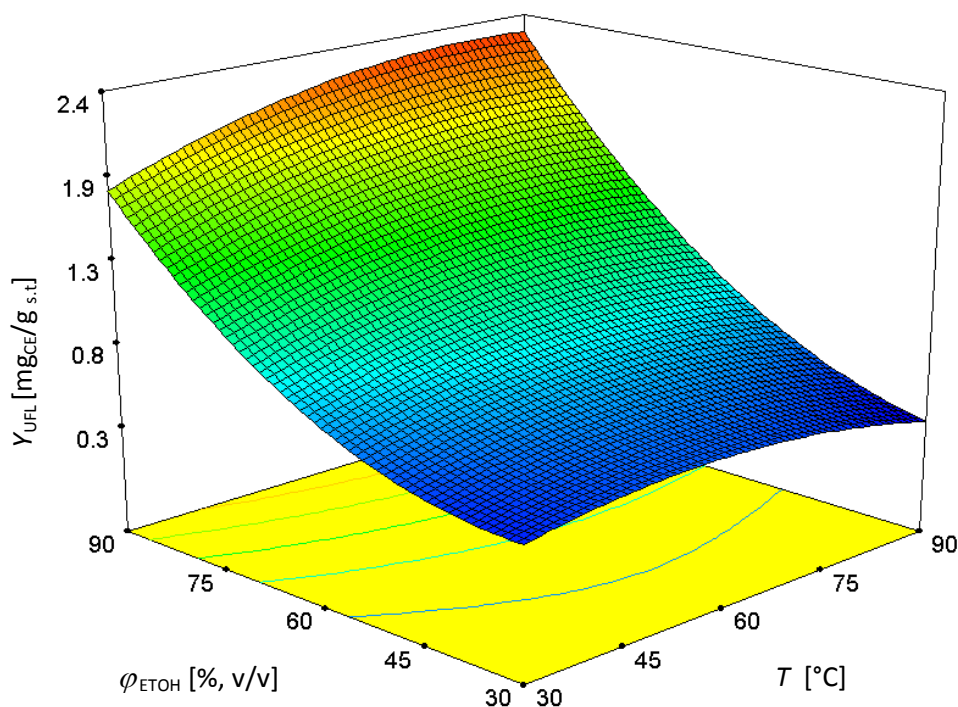
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$

ns utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 36 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida (C_{UFL}) i izračunatih (Y_{UFL}) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna ječma Vinkovci (JV)



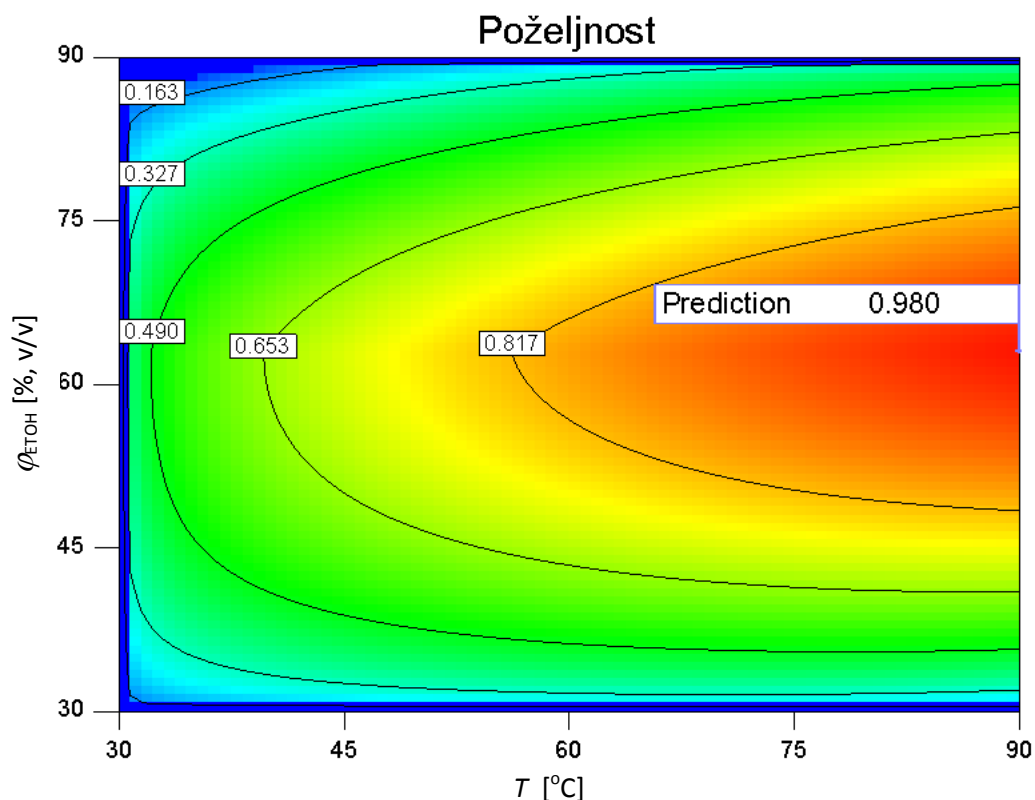
Slika 37 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) ekstrakata brašna cjelovitog zrna ječma Vinkovci (JV) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 40 minuta

4.8. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLA I FLAVONOIDA

Da bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna za ispitivano eksperimentalno područje, provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 7.1.6. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja, odnosno kombinacija ispitivanih varijabli (**Tablica 18**). Međutim, kao najbolje rješenje, odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (eng. Desirability) kao kriterij za optimalno provođenje procesa, što bliže broju 1. Optimalno područje uvjeta ekstrakcije za dobivanje maksimalnog prinosa ukupnih fenolnih tvari uz poželjnost 0,980 prikazano je na **Slici 38**.

Tablica 18 Numerička optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije fenolnih tvari

T [°C]	φ_{ETOH} [% v/v]	t [min]	Y_{JNG} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	$Y_{JČ}$ [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	Y_{JV} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	Poželjnost
90	63	60	4,52	3,94	4,52	0,980



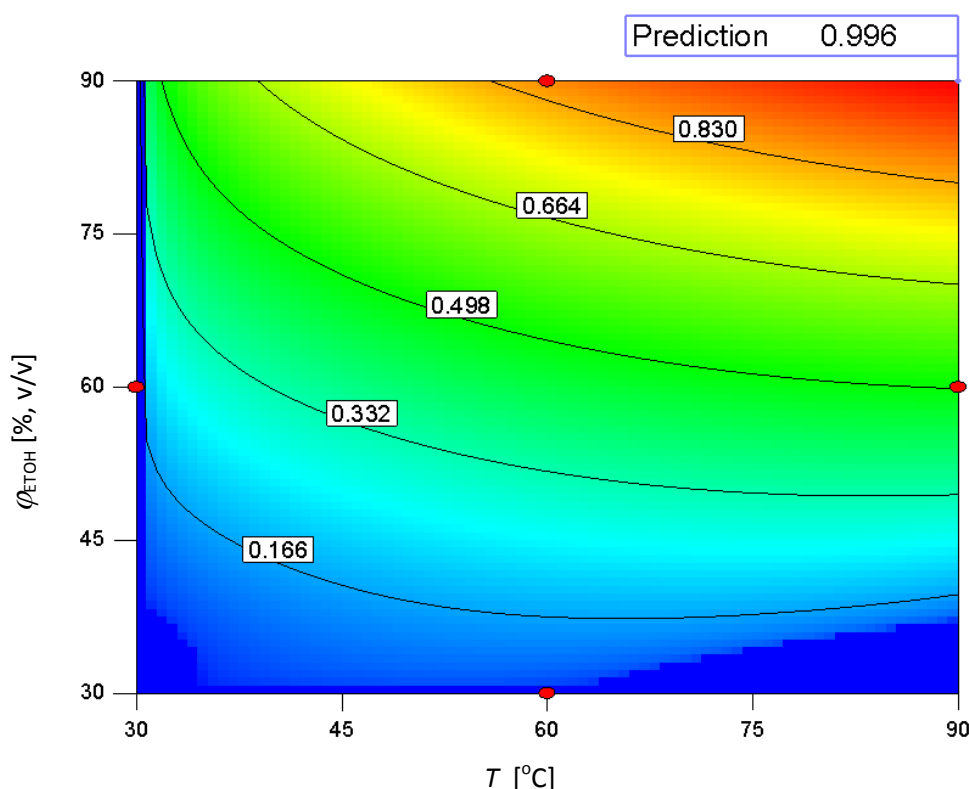
Slika 38 Optimalno područje (crveno obojeno), uz poželjnost od 0,980, ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije (temperatura 90 °C, vrijeme 60 minuta i otapalo etanol/voda 63%) za dobivanje maksimalnog prinosa ukupnih fenolnih tvari u sva tri uzorka ječma

Numerička optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida prikazana je u **Tablici 19**.

Tablica 19 Numerička optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida

T [°C]	φ_{ETOH} [% v/v]	t [min]	Y_{JNG} [mg _{CE} /g _{s.t.}]	$Y_{\text{JČ}}$ [mg _{CE} /g _{s.t.}]	Y_{JV} [mg _{CE} /g _{s.t.}]	Poželjnost
90	90	70	2,22	2,38	2,42	0,996

Optimalno područje uvjeta ekstrakcije za dobivanje maksimalnog prinosa ukupnih flavonoida uz poželjnost 0,996 prikazano je na **Slici 39**.



Slika 39 Optimalno područje (crveno obojeno), uz poželjnost od 0,996, ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije (temperatura 90 °C, vrijeme 70 minuta i otapalo etanol/voda 90%) za dobivanje maksimalnog prinosa ukupnih flavonoida u sva tri uzorka ječma

4.9. EKSTRAKCIJA PRI OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJE ODREĐENIH RSM-om

Ekstrakcija je provedena pomoću vodene kupelji i univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi-LSV, metodom ekstrakcije standard Soxhlet pri izračunatim optimalnim uvjetima, da bi se provjerila uspješnost optimiranja RSM-om.

4.9.1. Ekstrakcija u vodenoj kupelji

Rezultati ekstrakcije u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima, prikazani su u **Tablicama 20** i **21**.

Tablica 20 Maseni udio ukupnih fenolnih tvari, određen ekstrakcijom u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima

Uzorak	m_{uz} [g]	T [°C]	ϕ_{ETOH} [%]	t [min]	C_{sr} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]
JNG	1,50	90	63	60	4,50
JČ	1,50	90	63	60	4,07
JV	1,50	90	63	60	4,52

Tablica 21 Maseni udio ukupnih flavonoida, određen ekstrakcijom u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima

Uzorak	m_{uz} [g]	T [°C]	ϕ_{ETOH} [%]	t [min]	C_{sr} [mg _{CE} /g _{s.t.}]
JNG	1,50	90	90	70	2,24
JČ	1,50	90	90	70	2,67
JV	1,50	90	90	70	2,91

4.9.2. Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju

Rezultati ekstrakcije na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi LSV, metodom standard Soxhlet pri optimalnim uvjetima, prikazani su u **Tablicama 22 i 23**:

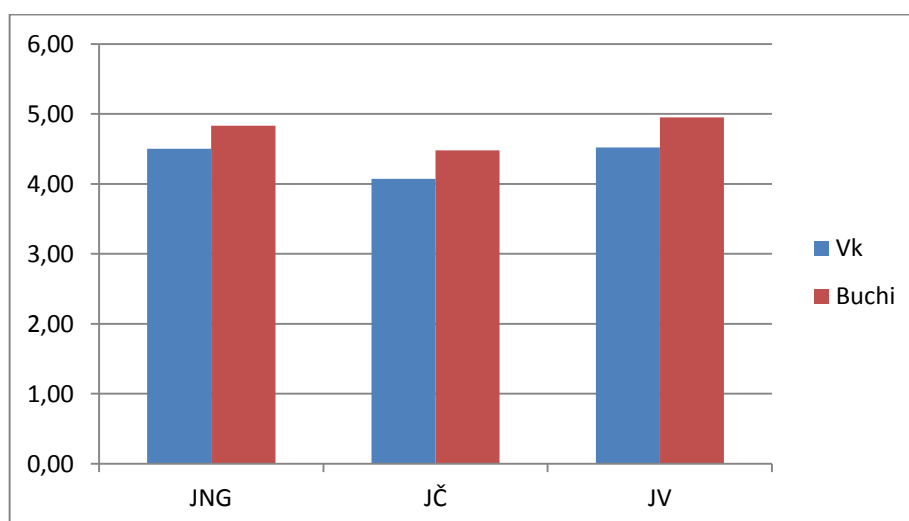
Tablica 22 Maseni udio ukupnih fenolnih tvari, određen metodom standard Soxhlet, pri optimalnim uvjetima

Uzorak	m_{uz} [g]	otapalo [%]	t [min]	C_{sr} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]
JNG	7,50	63	60	4,83
JČ	7,50	63	60	4,48
JV	7,50	63	60	4,95

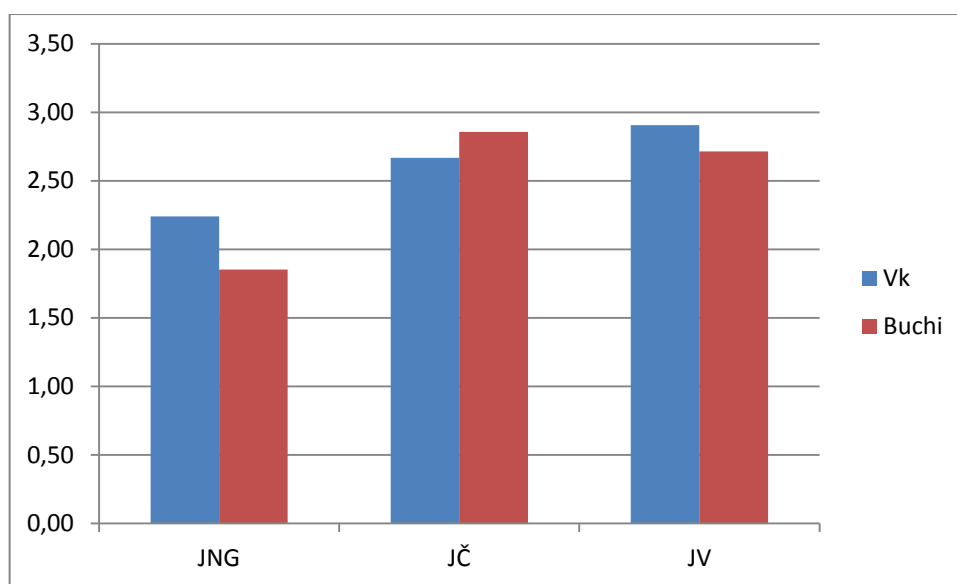
Tablica 23 Maseni udio ukupnih flavonoida, određen metodom standard Soxhlet, pri optimalnim uvjetima

Uzorak	m_{uz} [g]	otapalo [%]	t [min]	C_{sr} [mg _{CE} /g _{s.t.}]
JNG	7,50	90	70	1,85
JČ	7,50	90	70	2,86
JV	7,50	90	70	2,71

Usporedba ove dvije metode prikazana je na **Slikama 40 i 41**:



Slika 40 Grafički prikaz rezultata ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari u vodenoj kupelji (Vk) i metodom standard Soxhlet (Buchi)



Slika 41 Grafički prikaz rezultata ekstrakcije ukupnih flavonoida u vodenoj kupelji (Vk) i metodom standard Soxhlet (Buchi)

5. RASPRAVA

Učinkovitost procesa ekstrakcije znatno ovisi o brojnim procesnim parametrima koji mogu djelovati nezavisno ili zavisno. Da bi se odredili optimalni procesni parametri nekog procesa, potrebno je provoditi veliki broj eksperimenata u što više mogućih kombinacija ispitivanih parametara. Međutim, metoda odzivnih površina kao skup matematičkih i statističkih tehnika pokazala se kao koristan alat u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa uz smanjen broj potrebnih eksperimenata. Ova metoda omogućuje planiranje pokusa tako da se provode samo neki eksperimenti s određenim kombinacijama procesnih parametara na osnovi kojih je moguće odrediti optimalne parametre procesa uz ekonomsku i energetska uštedu (Carley i sur., 2004). U ovom radu, planiranje pokusa kao i statistička obrada dobivenih podataka te određivanje optimalnih uvjeta u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Svi eksperimentalno određeni i izračunati podaci prema primijenjenom matematičkom modelu prikazani su u tablicama i dijagramima.

Prosječna veličina čestica za uzorke JNG, JČ i JV iznosila je kako slijedi: 0,019; 0,020 i 0,015 cm što je uz standardu devijaciju, površinu čestica i broj čestica po gramu za sva tri uzorka prikazano u **Tablici 6**. Suha tvar svih ispitivanih uzoraka ječmenog brašna iznosila je oko 88% što je prikazano u **Tablici 7**.

Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija prikazanih u **Tablicama 8 i 9** dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem pomoću regresijskih jednadžbi (**11 i 13**) dobivenih iz kalibracijskih krivulja (**Slike 24 i 25**), izračunate su masene koncentracije fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari [$\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$], odnosno u ekvivalentima (+)-katehina za ukupne flavonoide po mL ekstrakta [$\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$]. Konačni sadržaj fenolnih tvari izražen je kao maseni udio fenolnih tvari prema jednadžbi (**14**), odnosno u ekvivalentima galne kiseline (katehina) po masi suhe tvari uzorka.

Rasponi masenih udjela fenolnih tvari i flavonoida, dobivenih eksperimentalnim putem, prikazani su u **Tablicama 10 i 11**. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna ječma, pri ispitivanim uvjetima, kretao se u rasponu od 1,17 do 4,68 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JNG; od 1,05 do 4,17 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JČ i za uzorak JV od 1,3 do 4,54 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma, pri ispitivanim uvjetima, kretao se u rasponu od 0,56 do 2,26 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JNG; od 0,51 do 2,39 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za JČ i za JV od

0,37 do 2,38 mg_{CE}/g_{s.t.}. Na osnovi rezultata, vidljivo je da nema značajnije međusobne razlike u masenom udjelu fenolnih tvari i flavonoida u ispitivanim uzorcima ječma.

Da bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije i njihove interakcije (temperature, otapala i vremena ekstrakcije) na zavisnu varijablu (prinos fenolnih tvari) te provjerila prikladnost primijenjenog Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, tj. polinomom drugog reda prema jednadžbi (9). Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisne i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli.

Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Za eksperimentalne uvjete ovoga rada utvrđeno je da je to kvadratni polinom prikazan jednadžbama 15 - 20 sa $R > 0,95$ za ukupne fenolne i flavonoidne tvari. Slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka prikazuju i **Slike 26, 28, 30, 32, 34 i 36**. Međutim, često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga je uz koeficijent korelacije, kao pokazatelja uspješnosti aproksimacije, provedena detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovi koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su vrijednosti "Prob > F " za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost), onda su ti članovi značajni. To znači da je vjerojatnost (eng. Probability) dobivanja tako velike F vrijednosti uslijed šuma, manja od 5% (Bezerra i sur., 2008.).

Statističkom analizom (**ANOVA**) utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti masenih udjela fenolnih tvari (**Tablice 12-14**) i masenih udjela flavonoida (**Tablice 15-17**) u ekstraktima svih ispitivanih uzoraka brašna ječma, kvadratnim polinomom, statistički značajna. Takva opažanja upućuju na to da je navedeni model prikladan za opisivanje procesa ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida u provedenim eksperimentalnim uvjetima. Ipak, budući da je statistički parametar "nedostatak modela" (eng. lack of fit) statistički značajan kod podataka za ukupne fenole dok nije značajan kod podataka za ukupne flavonoide, može se zaključiti da model bolje opisuje proces ekstrakcije ukupnih flavonoida.

Pored toga, ANOVA (**Tablice 12-17**) je pokazala da je koncentracija otapala imala najveći utjecaj na učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida što se očituje kroz statistički značajne kvadratne članove za sve uzorke. Osim otapala, na ekstrakciju ukupnih fenola utjecala je i temperatura, kao individualni parametar i u interakciji s otapalom, kod uzoraka JNG i JČ. Na ekstraktibilnost ukupnih flavonoida, otapalo je imalo statistički značajan utjecaj kao kvadratni i linearni član kod svih uzoraka, te u interakciji s temperaturom za uzorke JČ i JV i s vremenom za uzorak JV. Vrijeme nije značajno utjecalo na maseni udio ukupnih fenolnih i flavonoidnih tvari ekstrahiranih pod provedenim eksperimentalnim uvjetima.

Slike 27, 29 i 31 prikazuju 3D dijagram odzivne površine gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđene masene udjele ukupnih fenolnih tvari za ispitane kombinacije temperature i otapala pri konstantnom vremenu (40 minuta) ekstrakcije budući da ono nije imalo statistički značajan utjecaj na proces ekstrakcije. Iz dijagrama je vidljivo da porastom temperature raste udio ukupnih fenolnih tvari, porastom koncentracije otapala raste ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari do neke maksimalne vrijednosti, a potom opada (dokaz je statistička značajnost kvadratnog člana polinoma). Slične rezultate su dobili i drugi autori (Bucić-Kojić, 2008) pri ispitivanju uvjeta ekstrakcije fenolnih tvari. U slučaju flavonoida, uočeno je da se porastom koncentracije etanola i porastom temperature povećavao maseni udio flavonoida (**Slike 33, 35 i 37**).

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 7.1.6., a prema jednadžbama (**15-20**), izračunati su optimalni uvjeti ekstrakcije za ispitivano eksperimentalno područje, bez obzira na uzorak brašna ječma, pri kojima je moguće dobiti maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari. Izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz svih uzoraka brašna uz poželjnost 0,980 su: otapalo 63% etanol, temperatura 90 °C i vrijeme 60 minuta pri čemu bi se, prema modelu, ekstrahiralo 4,52 mg_{GAE}/g_{s.t.} u uzorku JNG; 3,94 mg_{GAE}/g_{s.t.} u uzorku JČ; 4,52 mg_{GAE}/g_{s.t.} u uzorku JV što je prikazano u **Tablici 18** i **Slici 38**. Za ukupne flavonoide, izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije uz poželjnost 0,996 su: otapalo 90% etanol, temperatura 90 °C i vrijeme 70 minuta pri čemu bi se, prema modelu, dobio prinos od 2,22 mg_{CE}/g_{s.t.} u uzorku JNG; 2,38 mg_{CE}/g_{s.t.} u uzorku JČ i 2,42 mg_{CE}/g_{s.t.} u uzorku JV, što je prikazano u **Tablici 19** i **Slici 39**.

U drugom dijelu eksperimentalnog rada, nakon što su određeni optimalni uvjeti ekstrakcije, ista je provedena pri optimalnim uvjetima zbog provjere uspješnosti optimiranja primijenjenom metodom. Nakon provedene ekstrakcije, pri optimalnim uvjetima, dobiveni su sljedeći prinosi ukupnih fenolnih tvari (**Tablica 20**): 4,50 mg_{GAE}/g_{s.t.} za uzorak JNG; 4,07 mg_{GAE}/g_{s.t.} za uzorak JČ; 4,52 mg_{GAE}/g_{s.t.} za uzorak JV te za flavonoide (**Tablica 21**): 2,24 mg_{CE}/g_{s.t.} za JNG; 2,67 mg_{CE}/g_{s.t.}, za JČ i 2,91 mg_{CE}/g_{s.t.} za JV. Rezultati pokazuju da je eksperimentalni plan (Box-Behnken dizajn) dobro postavljen te da polinom drugog reda dobro opisuje ekstrakciju ispitivanih fenolnih tvari i flavonoida iz ječma.

Nadalje, pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije, ekstrakcija je provedena i na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi-LSV s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo. Ekstrakcija je provedena standardnom Soxhlet metodom (**Tablica 22**) pri čemu je prinos ukupnih fenolnih tvari bio nešto viši (4,83 mg_{GAE}/g_{s.t.} za JNG; 4,48 mg_{GAE}/g_{s.t.}, za JČ i 4,95 mg_{GAE}/g_{s.t.} JV) u odnosu na rezultate dobivene ekstrakcijom u vodenoj kupelji. Prinos ukupnih flavonoida (**Tablica 23**) bio je nešto niži za uzorke JNG (1,85 mg_{CE}/g_{s.t.}) i JV (2,71 mg_{CE}/g_{s.t.}), odnosno nešto viši za uzorak JČ (2,86 mg_{CE}/g_{s.t.}) u odnosu na rezultate dobivene u vodenoj kupelji. Ovakve rezultate dobili su i Stanojević i suradnici (2014.) pri usporedbi tehnika ekstrakcije, prilikom čega se Soxhlet standard pokazao kao metoda kojom se dobiva najveći sadržaj fenolnih i flavonoidnih tvari. Usporedbe rezultata, za obje metode, grafički su prikazane **Slikama 40 i 41**. Analizom rezultata može se pretpostaviti da su neznatne razlike u prinosu fenolnih tvari i flavonoida, posljedica razlika u principu metode kruto-tekuće ekstrakcije, različitom mjerilu i automatiziranosti univerzalnog sustava za ekstrakciju.

Ponovljivost rezultata i u većem mjerilu potvrđuje da je optimiranje procesa ekstrakcije metodom odzivnih površina prikladno za ispitivani proces, a metoda odzivnih površina osigurava pronalaženje optimalnih uvjeta procesa uz minimalan broj eksperimenata i ekonomsko-energetsku uštedu (kemikalije, vrijeme trajanja, utrošak vode i električne energije i sl.).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih eksperimentalnih podataka, njihove statističke obrade Box-Behnkenovom metodom odzivnih površina i rasprave za uvjete provedbe eksperimenta može se zaključiti sljedeće:

- Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna ječma pri ispitivanim uvjetima kretao se u rasponu od 1,17 do 4,68 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JNG; od 1,05 do 4,17 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JČ i za uzorak JV od 1,3 do 4,54 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$
- Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna ječma pri ispitivanim uvjetima kretao se u rasponu od 0,56 do 2,26 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za uzorak JNG; od 0,51 do 2,39 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za JČ i za JV od 0,37 do 2,38 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$
- Rezultati istraživanja RSM metodom pokazuju da je koncentracija otapala imala najveći utjecaj na učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida što se očituje kroz statistički značajne kvadratne članove za sve uzorke. Osim otapala, na ekstrakciju ukupnih fenola utjecala je i temperatura kao individualni parametar i u interakciji s otapalom kod uzoraka JNG i JČ. Na ekstraktibilnost ukupnih flavonoida, otapalo je imalo statistički značajan utjecaj kao kvadratni i linearni član kod svih uzoraka, te u interakciji s temperaturom za uzorke JČ i JV i s vremenom za uzorak JV. Vrijeme nije značajno utjecalo na maseni udio ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida ekstrahiranih pod provedenim eksperimentalnim uvjetima.
- Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz svih uzoraka brašna uz poželjnost 0,980 su: otapalo 63% etanol; temperatura 90 °C i vrijeme 60 minuta.
- Za ukupne flavonoide, izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije uz poželjnost 0,996 su: otapalo 90% etanol; temperatura 90 °C i vrijeme 70 minuta.
- Porastom temperature raste udio ukupnih fenolnih tvari, a porastom koncentracije otapala do neke maksimalne vrijednosti raste ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, a potom opada. U slučaju flavonoida, uočeno je da se porastom koncentracije etanola i porastom temperature povećavao maseni udio flavonoida.
- Ekstrakcijom u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima, maseni udio ukupnih fenolnih tvari iznosi 4,52 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za JNG, 4,07 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za JČ i 4,52 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ za JV.
- Ekstrakcijom na univerzalnom aparatu za ekstrakciju, pri optimalnim uvjetima metodom Soxhlet standard, dobiveni su nešto viši rezultati za ukupne fenolne tvari,

za uzorak JNG 4,83 mg_{GAE}/g_{s.t.}; 4,48 mg_{GAE}/g_{s.t.} za uzorak JČ i 4,95 mg_{GAE}/g_{s.t.} za uzorak JV.

- Ekstrakcijom u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima, maseni udio flavonoida iznosi: 2,24 mg_{CE}/g_{s.t.} za uzorak JNG; 2,67 mg_{CE}/g_{s.t.} za uzorak JČ i 2,91 mg_{CE}/g_{s.t.} uzorak JV.
- Ekstrakcijom na univerzalnom aparatu za ekstrakciju, pri optimalnim uvjetima metodom Soxhlet standard, dobiveni su rezultati za ukupne flavonoide: za uzorak JNG 1,85 mg_{CE}/g_{s.t.}, za uzorak JČ 2,86 mg_{CE}/g_{s.t.} i za uzorak JV 2,71 mg_{CE}/g_{s.t.}
- Neznatne razlike u rezultatima ekstrakcije u vodenoj kupelji i univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi (B-811 LSV) posljedica su razlika u principu metode kruto-tekuće ekstrakcije, različitom mjerilu i automatiziranosti sustava za ekstrakciju.
- Ispitivani matematički model (kvadratni polinom) pokazao je dobra slaganja eksperimentalnih vrijednosti s aproksimiranim vrijednostima masenih udjela ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida te visok stupanj korelacije ($R > 0,95$), što znači da se ovaj model može primijeniti za opisivanje kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz brašna. Međutim, „nedostatak modela“ (eng. lack of fit) je u aproksimaciji bio statistički značajan za prinos fenolnih tvari, ali statistički nije značajan za prinos flavonoida, što pokazuje da ovaj model bolje opisuje ekstrakciju flavonoida.
- Ponovljivost rezultata i u većem mjerilu potvrđuje da je optimiranje procesa ekstrakcije metodom odzivnih površina prikladno za ispitivani proces.
- Metoda odzivnih površina osigurava pronalaženje optimalnih uvjeta procesa uz minimalan broj eksperimenata i ekonomsko-energetsku uštedu (kemikalije, vrijeme trajanja, utrošak vode i električne energije i sl.).

7. LITERATURA

- Babić J, Strelec I i Jozinović A: *Katalog opreme*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Baker S i Herrman T: Evaluating particle size. *Feed Manufacturing*, 2051; Kansas State University, Manhattan, 2002.
- Banjari I, Flanjak I i Nedeljko M: *Antioksidanti u hrani*, propisi za vježbe. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
- Bezerra M, Santelli R, Oliveira E, Villar L, i Escaleira L: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:965–977, 2008.
- Bonoli M, Marconi E, Caboni MF: Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, 1057: 1-12, 2004.
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
- Carley KM, Kamneva NY i Reminga J: *Response Surface Methodology–CASOS Technical Report*. CMU-ISRI-04-136, 2004. <http://reports-archive.adm.cs.cmu.edu/anon/isri2004/CMU-ISRI-04-136.pdf> [22.3.2015.]
- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, i Larondelle Y: Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers). *Separation and Purification Technology*, 55:217–225, 2007.
- Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Radojčić Redovniković I, Lončarić S: *Biološki aktivne komponente u hrani i mehanizmi djelovanja*, vježbe. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2009.
- Dragović-Uzelac V, Levaj B, Komes D, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Lončarić S: *Začinsko i aromatsko bilje*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2013.
- Državni zavod za statistiku RH: *Statistički ljetopis RH za 2014. godinu*, pdf. Zagreb, 2014.
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations-FAOSTAT: *Barley exports*, 2011. <http://faostat3.fao.org/home/E> [25.5.2015.]
- Garvin DF, Raman H, Smith KP: Barley. *Encyclopedia of Food and Culture*, 2003. (revizija 2015.) <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3403400063.html> [25.5.2015.]
- Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzman NE, Gonzalez-Laredo RF, Pulido-Alonso J: Effect of processing on the antioxidant properties of extracts from Mexican barley (*Hordeum vulgare*) cultivar. *Food Chemistry*, 119: 903-906, 2010.

- Gomez-Pinilla F and Nguyen TJ: Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15: 127–133, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355196/> [23.3.2015.]
- Goufo P and Trindade H: Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science Nutrition*, 2: 75-104, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959956/> [28.3.2015.]
- Jakobek L: *Instrumentalne metode analize, vježbe*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Jerković I i Radonić A: *Praktikum iz organske kemije*. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2009.
- Ježek D: *Ekstrakcija*, 2008. <http://be2001.hdb.hr/hr/content/download/7251/39474/version/1/file/Ekstrakcija.pdf> [29.3.2015.].
- Komljenović I, Todorović J: *Ratarsko-povrtarski priručnik*. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2009.
- Klapec T i Strelec I: *Prehrambena biokemija-oksidativni stres, predavanja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Klepacka J, Gujska E and Michalak J: Phenolic Compounds as Cultivar- and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66: 64–69, 2011.
- Leskošek-Čukalović I: *Tehnologija piva - slad i nesladovane sirovine*. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2002.
- Liu Q, Yao H: Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry* 102: 732-737; Southern Yangtze University, China, 2006.
- Liyana-Pathirana C i Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93:47–56, 2005.
- Madhujith T, Shahidi F: Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. *Food Chemistry*, 117: 615-620, 2009.
- Mandal SM and Dey S: LC-MALDI-TOF MS-Based Rapid Identification of Phenolic Acids. *Journal of Biomolecular Techniques*, 19: 116–121, 2008.
- Mandić ML: *Znanost o prehrani*, interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Mandić ML: *Funkcionalna hrana i prehrambeni dodaci*, predavanja. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

- Naczki M and Shahidi F: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1523-1542, 2006.
- Navas-Lopez JF, Ostos-Garrido FJ, Castillo A, Martín A, Gimenez MJ and Pistón F: Phenolic content variability and its chromosome location in tritordeum. *Front Plant Science*, 5: 10, 2014.
- Pavel S, Klejdus B, i Kuban V: Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables-Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:607–616,2006.
- Planinić M, Bucić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, i Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. U *Proceedings of International Congress FLOUR – BREAD '03 and 4. Croatian Congress of Cereal Technologists*, str. 102-108. Faculty of Food Technology, Osijek, 2004.
- Public Chemistry: *Gallic acid*, 2015.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370#section=Top> [4.6.2015.]
- Stanojević Lj, Stanković B, Cakić M, Nikolić V, Ilić D i Perić M: Uticaj tehnike ekstrakcije na prinos, kinetiku i sastav vodenih ekstrakata iz ploda mirođije (*Anethi fructus*). *Znanstveni rad*, 3 (1): 23-29. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2014.
<http://www.tf.ni.ac.rs/casopis/sveska3/c4.pdf> [11.6.2015.]
- Statista, The Statistics Portal, 2013. <http://www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/> [25.5.2015.]
- Šeruga M: *Kolorimetrija*. Laboratorijske vježbe iz fizikalne kemije. PTF, Osijek, 1988.
- Taylor M, Boland Mand Brester G: *Barley profile*. Agricultural Marketing Resource Center, 2005. (revizija 2013.)
http://www.agmrc.org/commodities_products/grains_oilseeds/barley-profile/ [25.5.2015.]
- Thilakarathna SH and Vasantha Rupasinghe HP: Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5: 3367–3387, 2013.
- Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: *Jedinične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Ugarčić-Hardi Ž: *Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla*, predavanja. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010a.
- Ugarčić-Hardi Ž: *Sirovine biljnog podrijetla*, predavanja. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010b.
- Van Hung P: Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. Vietnam National University, Vietnam, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075608> [20.3.2015.]

- Veljković VB i Milenović DM: Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L)-II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *znanstveni rad*. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2001. <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0367-598X/2002/0367-598X0202060V.pdf> [11.6.2015.]
- Vurdelja M: *Antioksidansi*, 2014. <http://matuzalem.hr/o-antioksidansima/> [27.6.2015.]
- Waterhouse A: *Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine*. UC Davis, 2012. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370> [4.6.2015.]
- Xiao ZP, Peng ZY, Peng MJ, Yan WB, Ouyang YZ, Zhu HL: Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11: 169-177, 2011.