

Zelene tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine (Citrus unshiu): fitokemijska analiza i optimizacija procesa

Ćorković, Ina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:109:934965>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ina Ćorković

**ZELENE TEHNIKE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KORE
MANDARINE (*Citrus unshiu*): FITOKEMIJSKA ANALIZA I
OPTIMIZACIJA PROCESA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2020.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnološko projektiranje
Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 29. svibnja 2020. godine.
Mentor: prof. dr. sc. *Stela Jokić*
Komentor: doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*
Pomoć pri izradi: *Silvija Šafranko*, mag. chem.
Martina Jakovljević, mag. nutr.

Zelene tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine (*Citrus unshiu*): Fitokemijska analiza i optimizacija procesa

Ina Ćorković, 0065038787

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost iskorištenja nusproizvoda kore mandarine sorte *Citrus unshiu* primjenom inovativnih tehnika ekstrakcije. Prvi korak istraživanja uključio je ekstrakciju isparljivih komponenti iz kore mandarine primjenom ekstrakcije superkritičnim CO₂ (SC-CO₂) pri različitim procesnim uvjetima tlaka (100 i 300 bar) te analizu dobivenih ekstrakata primjenom plinske kromatografije s masenim detektorom (GC/MS). Nakon SC-CO₂ ekstrakcije zaostaje materijal bogat bioaktivnim spojevima koji su se iz kore mandarine ekstrahirali primjenom vode u subkritičnom stanju. Ispitan je utjecaj različitih procesnih parametara (temperatura (130 - 220 °C), vrijeme ekstrakcije (5 -15 min), omjer tekuće/kruto (10-30 ml/g) na svojstva i kemijski sastav ekstrakata. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih bioflavonoida, od kojih se hesperidin izdvaja kao najzastupljeniji flavanon u kori mandarine, ostalih polifenolnih spojeva kao mogućih međuprodukata termalne razgradnje provelo se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). Uporabom spektrofotometrijskih metoda određena je antioksidacijska aktivnost i udio polifenola u ekstraktima. Provedena je i optimizacija procesa primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa *Design Expert*[®].

Ključne riječi: kora mandarine, ekstrakcija, bioaktivni spojevi, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: 68 stranica
24 slika
18 tablica
33 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

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

Datum obrane: 17. srpnja, 2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of technological design process and construction materials
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Technological design

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII held on May 29, 2020.

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

Co-mentor: *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

Technical assistance: *Silvija Šafranko*, MSc
Martina Jakovljević, MSc

Green Extraction Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu*): Phytochemical Analysis and Process Optimization

Ina Ćorković, 0065038787

Summary: The aim of this study was to investigate the possibility of using by-products of mandarin peel of the *Citrus unshiu* variety using innovative extraction techniques. The first step of the research included the extraction of volatile components from mandarin peel using supercritical CO₂ (SC-CO₂) extraction under different pressure conditions (100 and 300 bar) and the analysis of the obtained extracts using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). After SC-CO₂ extraction, material rich in bioactive compounds remains that was further extracted using subcritical water extraction (SWE). The influence of different process parameters (temperature (130 - 220 °C), extraction time (5 - 15 min), solvent/solid ratio (10 - 30 mg/l)) on the properties and chemical composition of the extracts was examined. Identification and quantification of individual bioflavonoids, of which hesperidin was determined as the most abundant flavanone in mandarin peel, and also other polyphenolic compounds as possible products of thermal degradation, was performed using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). Antioxidant activity and total polyphenol content in extracts were determined using spectrophotometric methods. Process optimization was also performed by response surface methodology (RSM) using Design Expert® software.

Key words: mandarin peel, extraction, bioactive compounds, response surface methodology

Thesis contains: 68 pages
24 figures
18 tables
33 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | co-mentor |
| 4. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: July 17, 2020

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

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na neiscrpnim idejama i stručnim savjetima bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Zahvaljujem i komentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću kao i asistentici Silviji Šafranko, mag. chem. na tehničkoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i svima ostalima koji su se našli na mom putu tijekom studiranja i pružili mi svoju podršku i ohrabrenje.



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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. CITRUSNO VOĆE – MANDARINA	6
2.1.1. PRERADA MANDARINA.....	6
2.1.2. FITOKEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE	7
2.1.2.1. ISPARLJIVE KOMPONENTE.....	9
2.1.2.2. FENOLNI SPOJEVI.....	11
2.1.2.3. OSTALE KOMPONENTE.....	15
2.2. INOVATIVNE METODE EKSTRAKCIJE	16
2.2.1. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM CO ₂	18
2.2.2. EKSTRAKCIJA SUBKRITIČNOM VODOM.....	20
2.3. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE	22
2.3.1. BOX-BEHNKENOV PLAN POKUSA.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. ZADATAK	28
3.2. MATERIJALI	28
3.2.1. UREĐAJI I KEMIKALIJE	29
3.3. METODE	30
3.3.1. EKSTRAKCIJA ISPARLJIVIH KOMPONENTI SUPERKRITIČNIM CO ₂ IZ KORE MANDARINE (<i>Citrus unshiu</i>)	30
3.3.2. ODREĐIVANJE ISPARLJIVIH KOMPONENTI U SC-CO ₂ EKSTRAKTIMA PRIMJENOM PLINSKE KROMATOLOGRAFIJE-MASENE SPEKTROMETRIJE	31
3.3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH KOMPONENTI SUBKRITIČNOM VODOM IZ PREDTRETIRANOG UZORKA KORE MANDARINE (<i>Citrus unshiu</i>)	32
3.3.4. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA IZ EKSTRAKATA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOLOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC).....	35
3.3.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	37
3.3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	38
3.3.7. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KORE MANDARINE (<i>Citrus unshiu</i>)	39
4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. OPTIMIRANJE PROCESA SWE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KORE MANDARINE (<i>CITRUS UNSHIU</i>) PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA	50
5. ZAKLJUČCI	61
6. LITERATURA	65

Popis oznaka, kratica i simbola

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
€	euro
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>Analysis of Variance</i>)
BBD	Box-Behnkenov plan pokusa (engl. <i>Box-Behnken design</i>)
CO ₂	ugljikov (IV) oksid
D	željena funkcija (engl. <i>Desirability function</i>)
df	stupnjevi slobode (engl. <i>Degrees of freedom</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
GAE	ekvivalenti galne kiseline
GC/MS	vezani sustav plinske kromatografije i masenog spektrometra (engl. <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>)
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-DAD	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection</i>)
k	broj nezavisnih varijabli
MS	varijanca (engl. <i>Mean square</i>)
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
p	tlak
p _c	kritični tlak

pK_w	konstanta disocijacije
RSM	metoda odzivnih površina (<i>engl. Response surface methodology</i>)
SC-CO ₂	superkritični CO ₂ (<i>engl. Supercritical CO₂</i>)
SWE	ekstrakcija subkritičnom vodom (<i>engl. Subcritical water extraction</i>)
T	temperatura
T _c	kritična temperatura
ϵ	dielektrična konstanta
ρ	gustoća
$x_{i,j}$	ispitivane nezavisne varijable
y	modelom predviđena odzivna funkcija

1. UVOD

Cilj je svake industrije dobivanje kvalitetnog proizvoda uz što bolje iskorištenje sirovine. Tijekom prerade sirovine nastaje određena količina nusproizvoda koja nužno ne mora biti otpad, nego visokovrijedna sirovina za razvoj novih proizvoda. Posljednjih nekoliko desetljeća raste zainteresiranost za primjenom zelenih metoda ekstrakcije u izolaciji bioaktivnih komponenti iz različitih polaznih materijala. Zelene tehnike ekstrakcije, kao alternativa konvencionalnim metodama, omogućuju dobivanje ekstrakata visoke kvalitete pridržavajući se principa zelene kemije. Takvi su procesi ekstrakcija superkričnim CO₂ (SC-CO₂) i ekstrakcija subkričnom vodom (SWE). Uporaba ovih novih, zelenih tehnologija otvara mogućnost postizanja bolje kvalitete postojećih i/ili razvoja novih proizvoda u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Jokić i sur., 2018). Otkrićem superkričnih otapala, CO₂ pokazao se kao odlična alternativa toksičnim i ekološki neprihvatljivim organskim otapalima. CO₂ je nepolarna molekula, a njegovo superkrično stanje omogućuje efikasniju ekstrakciju nepolarnih ili slabo polarnih spojeva iz materijala. Zbog toga je SC-CO₂ ekstrakcija povoljna tehnika za izdvajanje nepolarnih komponenti, dok je SWE dobra ekstrakcijska tehnika za izdvajanje polarnih komponenti. SWE kao otapalo koristi vodu u subkričnom stanju. Zbog svoje netoksičnosti, niske cijene i široke dostupnosti, primjena vode u subkričnom stanju kao ekstrakcijskog otapala svake godine sve je raširenija (Jokić i sur., 2019). U određivanju ciljanih bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda prehrambene ili procesne industrije, često se koriste visokosofisticirane kromatografske tehnike kao što su vezani sustav plinske kromatografije i masenog spektrometra (GC/MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD).

Citrusno voće poznato je čovječanstvu još od drevnih vremena zbog pozitivnih učinaka koje njegovi nutritijenti i sekundarni metaboliti, kao što su vitamin C, flavonoidi, fenolne i organske kiseline, pektini itd. imaju na ljudsko zdravlje. U današnje vrijeme dostupnost citrusa nije ograničena samo na određena geografska područja, nego se citrusi uzgajaju u mnogim tropskim i subtropskim državama diljem svijeta. Postoji 140 država koje su proizvođači citrusa, a svjetska proizvodnja iznosi preko 70 milijuna tona citrusa godišnje (Sharma i sur., 2018). Kore citrusa, koje su najzastupljeniji nusproizvod u industriji sokova, izvor su bioaktivnih spojeva, kao što su fenolni spojevi i organske kiseline. Koncentracija flavonoida u citrusnom voću veća je u kori i sjemenkama, a njihovi pozitivni učinci na ljudsko zdravlje dokazani su u brojnim istraživanjima (Lachos-Perez i sur., 2018). Također, poznati su i brojni pozitivni učinci isparljivih

komponenti na ljudsko zdravlje zbog kojih ti spojevi imaju široku primjenu u biomedicini (Indulekha i sur., 2017). Vrlo je važno naći najučinkovitije metode ekstrakcije određenih bioaktivnih komponenti i zatim optimirati proces ekstrakcije kako bi se omogućila njihova primjena u industrijskom mjerilu (Jokić i sur., 2019).

Cilj ovog rada je odrediti fitokemijski profil ekstrakata kora mandarina (*Citrus unshiu*) bogatih isparljivim komponentama i fenolnim spojevima. Zbog različite polarnosti ovih spojeva, istraživanje je potrebno provesti koristeći dvije metode ekstrakcije. SC-CO₂ ekstrakcija pri različitim procesnim uvjetima korištena je za dobivanje isparljivih i nepolarnih komponenti. Dobiveni ekstrakti analizirani su koristeći GC/MS. Nakon SC-CO₂ ekstrakcije, odmašćena kora mandarine korištena je za provedbu SWE pri različitim procesnim uvjetima radi dobivanja ekstrakata bogatih bioaktivnim fenolnim spojevima i kiselinama. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih i drugih polarnih spojeva provedena je pomoću HPLC metode. Optimizacija sadržaja fenolnih spojeva u SWE ekstraktima provedena je korištenjem metode odzivnih površina (RSM) pomoću programa *Design Expert*[®]. Antioksidacijska aktivnost te udio polifenola u ekstraktima određeni su spektrofotometrijskim metodama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CITRUSNO VOĆE – MANDARINA

Citrusno voće pripada rodu *Citrus* porodice Rutaceae. Poznato je po svojoj osvježavajućoj aromi, sposobnosti utaživanja žeđi i dobrim zalihama vitamina C. Osim vitamina C, citrusi sadrže i druge fitokemijske komponente – flavonoide, fenolne kiseline, isparljive komponente, pigmente, pektinske tvari, šećere i lipide. Od ovih bioaktivnih spojeva flavonoidi su posljednja dva desetljeća izazvali veće zanimanje zahvaljujući svojim brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje (Ledesma-Escobar i sur., 2019).

Mandarina u Hrvatskoj najbolje uspijeva u dolini Neretve gdje su odlični uvjeti za plantažno uzgajanje vrlo kvalitetnih sorti *unshiu* mandarina koje se uzgajaju od 1933. godine (Popović i Vego, 2010). Mandarina *unshiu* predstavlja jednu od 200 sortnih skupina japanskih mandarina. Zbog otpornosti na hladnoću (može izdržati kraća razdoblja hladnoće i do -10 °C) postala je glavna sorta uzgoja u ovim krajevima (Popović i Vego, 2010).

2.1.1. PRERADA MANDARINA

Citrusno se voće u prehrambenoj industriji većinom koristi kao svježi sok ili kao sok na bazi citrusa. Osim što se koristi za zasebnu upotrebu, sok mandarine može se koristiti kao pojačivač boje soka naranče s pojačanjem boje soka čak i do 10 % (Marti i sur., 2011).

S obzirom na to da je prinos soka iz citrusa manji od polovice mase voća, prilikom prerade citrusa nastaju velike količine nusproizvoda. To su najčešće kora, pulpa, bijele vlaknaste membrane i sjemenke. Ovaj otpadni materijal zasebno se ili u različitim kombinacijama koristi kao izvorni materijal za životinjsku hranu, proizvodnju vlakana ili proizvodnju goriva. Nusproizvodi imaju i svoju drugu primjenu jer kao izvori prirodnih flavonoida imaju antioksidacijska svojstva (Cheigh i sur., 2012).

Razlikujemo više vrsti otpada koji nastaje prilikom prerade citrusa:

- otpad proizveden prilikom proizvodnje sokova (pulpa, kora, sjemenke, membrane),
- voće odbačeno iz komercijalnih razloga (npr. oštećeno voće),
- voće odbačeno zbog regulacija koje određuje proizvodnja.

Sav ovaj materijal smatra se otpadom zbog toga što nije dio prehrambenog lanca. U procesu ekstrakcije voćnog soka proizvede se otprilike 500 tona otpada na 1000 tona voća. Postotak

voća odbačenog iz komercijalnih razloga ili regulacija je između 2 % i 10 % ovisno o tipu citrusa i vremenskih uvjeta prilikom uzgoja (Kose i Bayraktar, 2018).

Kora citrusa koristi se za proizvodnju važnih komercijalnih proizvoda, kao što su prehrambena vlakna, vitamini, šećeri, eterična ulja i hlapljive aromatske komponente, organske kiseline i antioksidansi. Te komponente koriste se u proizvodnji više od 400 vrsta komercijalnih proizvoda (Berk, 2016). Neki proizvodi dobiveni od dijelova otpadnog flaveda kore citrusa su: šamponi, sapuni, aromatična ulja, osvježivači zraka, mirisni gelovi i mirisne svijeće. Proizvodi dobiveni od dijelova albeda i membrana su: pektini, biskviti, keksi, slatkiši, čokolade, marmelade, dodaci prehrani i ocat (Mahato i sur., 2019).

2.1.2. FITOKEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE

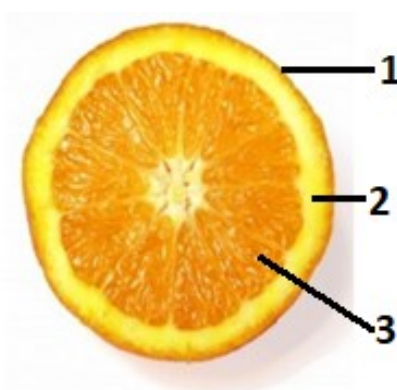
Citrusno voće, kao i svi poljoprivredni proizvodi, varira u kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama, ovisno o vrsti, tlu, uzgoju, navodnjavanju i starosti. Odnos udjela jestivih i nejestivih dijelova mandarine prikazan je u **Tablici 1** (Mahato i sur., 2019).

Tablica 1 Sastav mandarine – udjeli jestivih i nejestivih (otpadnih) dijelova mandarine (Mahato i sur., 2019)

Cijelo voće		Sok		Kora (flavedo i albedo)		Pulpa i membrane		Sjemenke	
udio u cijelom voću (%)	udio u ukupnoj krutoj tvari (%)	udio u cijelom voću (%)	udio u ukupnoj krutoj tvari (%)	udio u cijelom voću (%)	udio u ukupnoj krutoj tvari (%)	udio u cijelom voću (%)	udio u ukupnoj krutoj tvari (%)	udio u cijelom voću (%)	udio u ukupnoj krutoj tvari (%)
100	15-20	30-40	10-13	7-11	25-30	45-55	15-20	2	33-40

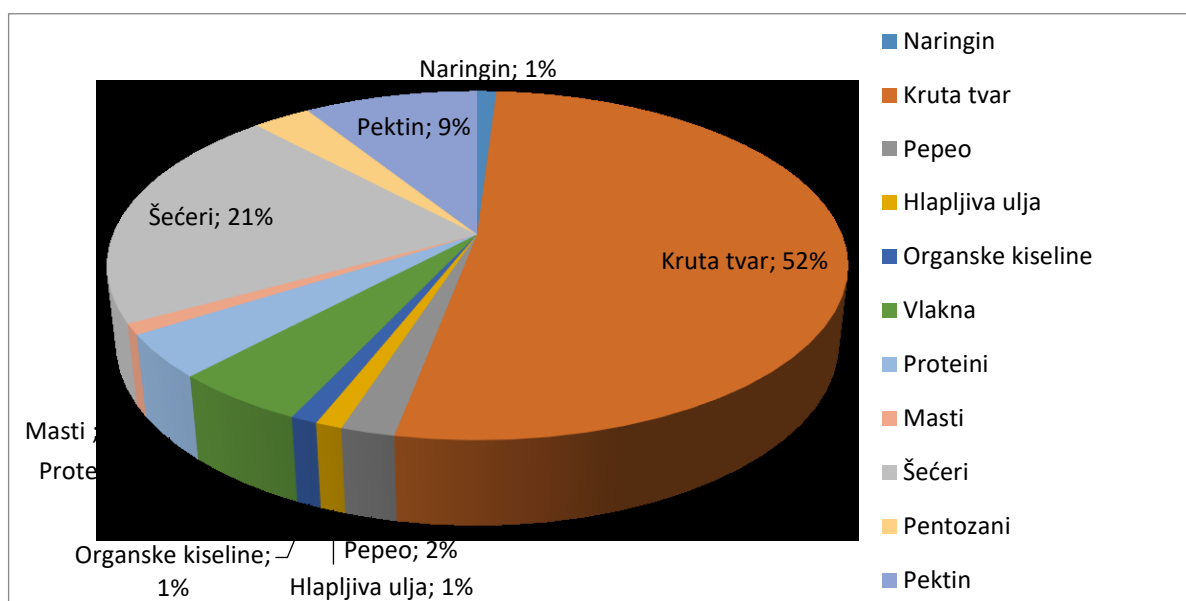
Gotovo svo citrusno voće ima sličnu opću strukturu i anatomiju (Berk, 2016). Plod mandarine sočna je kriškasta boba (hisperidij). **Slika 1** prikazuje detaljnu građu ploda citrusa (Ferenčić i sur., 2016). Citrusno voće prekriveno je vrlo tankom (manje od 3 μ m) kutikulom, koja se sastoji od polimeriziranog materijala i prirodnih voskova. Kutikula štiti voće od insekata i mikroorganizama, regulira izmjenu plinova, kisika i ugljikovog dioksida i ograničava gubitak vode. Ispod kutikule, nalazi se vanjski dio kore ili epikarp, kojeg nazivamo još i flavedo (od latinskog *flavus*, što znači žut). Sadrži pigmente kore u obliku plastida i ulja kore koja se nalaze

u žlijezdama, veličine od 10 μm do otprilike 0,5 mm (Berk, 2016). Obojenost kore mijenja se razmjerno o stupnju zrelosti ploda. Uljne žlijezde s eteričnim uljem štite plod od sunčevog pregrijavanja i oštećenja i daju mandarinama karakterističan miris. Do oslobađanja mirisa dolazi pri mehaničkim oštećenjima kao što su guljenje ili tješćenje usplođa za dobivanje eteričnog ulja (Ferenčić i sur., 2016). Srednji sloj, ispod flaveda je mezokarp, također poznat kao albedo (od latinskog *albus*, što znači bijel). Albedo je bijelo tkivo, nalik spužvi, osobito bogato pektinskim tvarima. Njegova debljina varira ovisno o vrstama citrusa, od nekoliko milimetara u mandarinama do 2 cm ili više u grejpu. Sastoji se od parenhimskih stanica i praznina između njih. S obzirom na masu i volumen, predstavlja većinski dio kore citrusa. Unutar voća, ispod kore, nalazi se endokarp koji je najveći dio voća (Berk, 2016). Mesnati dio ima 9-14 kriški koje sadržavaju sok slatko-kiselog okusa i mirisa. Između kore i mesnatog dijela isprepliću se mrežaste niti zbog kojih je mandarina u sistematici smještena u porodicu *Rutaceae*. Plod, ovisno o sorti, može biti potpuno bez sjemenki, a može imati najviše do 27 kljunastih sjemenki. Meso je narančasto – žute boje (Ferenčić i sur., 2016).



Slika 1 Građa ploda citrusa: 1. epikarp (flavedo), 2. mezokarp (albedo), 3. sočno meso (Jašić, 2010)

Otpadna kora citrusa bogata je šećerima, vlaknima, organskim kiselinama, aminokiselinama i proteinima, mineralima, eteričnim uljima (većinu čini d-limonen), lipidima, velikom količinom polifenola i vitamina. Na **Slici 2** grafički je prikazan uobičajen udio pojedinih spojeva u ukupnoj otpadnoj kori mandarine (Mahato i sur., 2019).



Slika 2 Uobičajeni sastav otpadne kore citrusa (Mahato i sur., 2019)

Kemijski sastav različit je u različitim dijelovima citrusnog voća. Najvažnije komponente epikarpa su eterična ulja i pigmenti. Svježi albedo sadrži otprilike 70-80 % vode. Ostali spojevi albeda su celuloza, škrob, pektinske tvari, šećeri, kiseline i manji spojevi poput flavonoida (Berk, 2016). Endokarp je izvor soka citrusa koji je glavni citrusni proizvod. Sok citrusa sadrži 85-90 % vode. Tvari otopljene u soku su: ugljikohidrati, kiseline, dušični spojevi, lipidi, minerali i manji spojevi poput glikozida, vitamina i topljivih pigmenata. Pulpa se sastoji od netopljivih krutih tvari, a osobito je bogata celulozom (Berk, 2016). Prema Iqbal i sur. (2018) svježe kore citrusa sadrže 90 % terpena, 5 % oksigeniranih spojeva, a ostatak čine neisparljive komponente kao što su voskovi i pigmenti. Kore sadrže još i biljna ulja čiji sastav ovisi o vegetativnom stanju biljke, dozrijevanju, uvjetima skladištenja i ekstrakcijskim metodama.

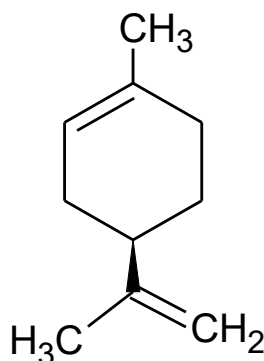
2.1.2.1. ISPARLJIVE KOMPONENTE

Eterična ulja predstavljaju isparljive komponente u kori mandarine, njegov sadržaj iznosi od 0,4 % do 1,6 %, a njegov je prosječni udio oko 1 %. Nalaze se većinom u kori i sjemenkama. Većina ovog ulja postaje otpad, s obzirom na to da isparava u atmosferu tijekom sušenja prešanog otpada prilikom same obrade citrusnog otpada. U isto vrijeme kore citrusa izvor su

eteričnih ulja koja imaju široku komercijalnu primjenu. Koriste se kao dodaci prehrani u prehrambenoj, ali i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Indulekha i sur., 2017).

Eterična ulja kore mirisni su hlapljivi spojevi koji se nalaze u žlijezdama epikarpa. Nisu „ulja“ u kemijskom smislu, zbog toga što nisu trigliceridi, nego većinom smjesa terpena i spojeva sličnih terpenima (terpenoida). Zovu se „ulja“ zbog lipofilnog/hidrofobnog karaktera. Ekstrahiraju se još od srednjeg vijeka, a konkretna primjena u manufakturama poznata je od 16. stoljeća. Njihova primarna i biološka funkcija je zaštita voća od štetnih insekata. Imaju antimikrobnu aktivnost i u tu svrhu se koriste u farmaceutskoj industriji. Komponente eteričnih ulja sintetiziraju se u epitelnim stanicama epikarpa, okruženim uljnim žlijezdama. U nezrelom voću broj uljnih žlijezda vrlo je malen. Tijekom zrenja, voće povećava broj žlijezda, najprije brzim, a zatim sporijim tempom. Eterična ulja mandarine sadrže velik broj različitih kemijskih spojeva. Isparljive komponente su terpeni i njihovi oksigenirani derivati: alkoholi (linalool, α -terpineol), aldehidi (oktanal, nonanal, dekanal), ketoni (metil-heptanon) i esteri karboksilnih kiselina (metil-antranilat, geranil-acetat). Terpeni se dijele na: monoterpeni (d-limonen, dipentan, α -pinen, β -pinen, terpinen) i seskviterpeni (kadinen, bisabolen) (Berk, 2016).

Terpeni su ugljikovodici široko rasprostranjeni u biljci. Predstavljaju glavninu eteričnih ulja kore citrusa, ali ipak malo pridonose karakterističnom mirisu citrusa, za što su više zaslužni oksigenirani derivati. Tijekom skladištenja, procesima oksidacije, izomerizacije i polimerizacije mogu nastati spojevi neugodnog mirisa. Molekulska struktura terpena i terpenoida sastoji se od nezasićenih, razgranatih jedinica izoprena (C_5H_8) koje se ponavljaju. Ovakve jedinice vrlo su česte u prirodi, ne nalaze se samo u terpenima, nego i u karotenoidima (Berk, 2016). D-limonen najznačajnija je komponenta ulja kore mandarine, većinom predstavlja oko 90 % mase ulja. Po sastavu je monoterpen. Njegova struktura prikazana je na **Slici 3**. Ima slab miris, nalik na limun. Najčešće se ekstrahira pomoću destilacije vodenom parom ili obradom alkalijama iz kora koje su zaostale nakon proizvodnje soka ili hladno prešanih ulja (Indulekha i sur., 2017). Izoliran i pročišćen služi kao otapalo i kozmetičko sredstvo za čišćenje kože (Berk, 2016). Prema Indulekha i sur. (2017) d-limonen u ljudskom tijelu sudjeluje u borbi protiv raka i kao mikrobn inhibitor. Zbog toga ima veliku primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Koristi se i u proizvodnji plastike i izoprena (Mahato i sur., 2019).



Slika 3 Struktura d-limonena kao najzastupljenije komponente aromatskog profila kore citrusa (Indulekha i sur., 2017)

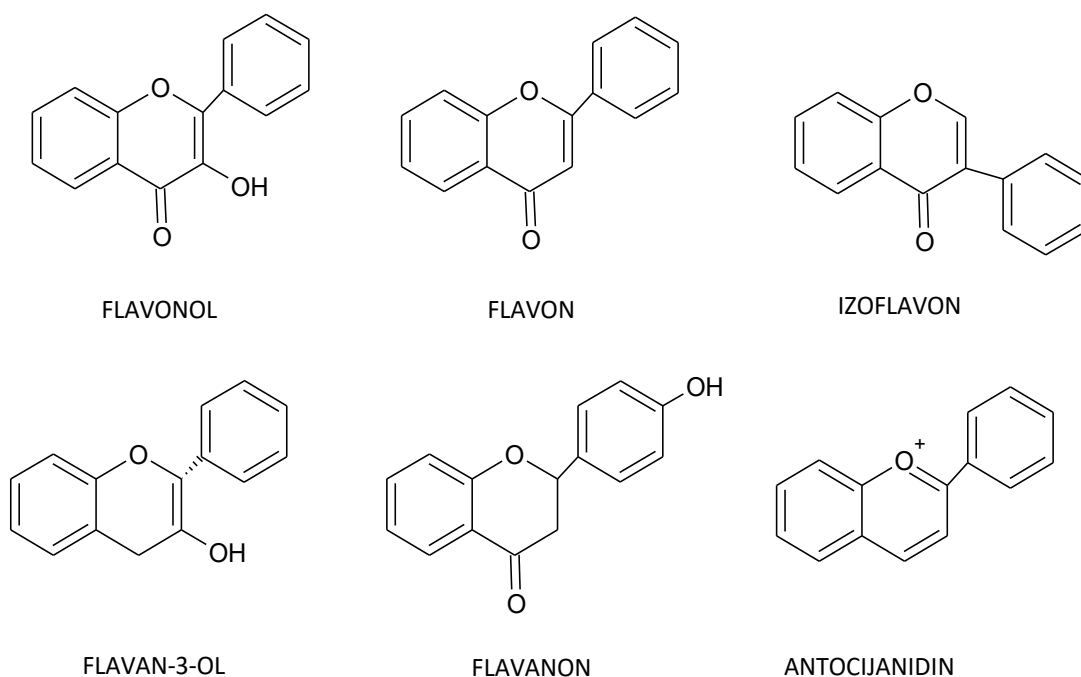
Aldehidi i alkoholi nalaze se u ulju u manjim količinama. Slobodni alkoholi dijelom su prisutni i zbog hidrolize prisutnih estera. Važna komponenta arome u cvijeću, začinima i kori citrusa je linalool. Koristi se u kozmetici i sapunima kao mirisna nota. Nedavno je dokazano da inhalacija linaloola utječe na smanjenje stresa (Berk, 2016). Citrusno voće poznato je kao kiselo voće, a njihov sok bogat je organskim kiselinama. Glavni su pridonositelji kiselosti limunska i jabučna kiselina. Ostale prisutne kiseline su mliječna, vinska, benzojeva, sukcinna, oksalna i mravlja. Limunska kiselina koristi se u prehrambenoj, kozmetičkoj industriji i u ljudskoj prehrani. Koristi se za podešavanje pH vrijednosti i poboljšanje okusa. Pokazuje antioksidativna svojstva zahvaljujući svojem svojstvu stvaranja kelata s metalnim ionima koji kataliziraju oksidaciju (Mahato i sur., 2019). Aroma citrusa jedna je od najvažnijih karakteristika ovog voća. Isparljive komponente citrusa daju citrusima svježinu koja je iznimno važno svojstvo u industriji sokova. Prisutne hlapljive tvari arome u korama mandarine su: acetaldehid, etil-format, etil-butirat, α -pinen, n-heksanal, aceton, metanol, etanol, d-limonen i n-oktanal. Etanol je najzastupljenija tvar arome, ali aldehidi daju citrusima specifičnu aromu svježine. Limonin je ekstremno gorka komponenta endokarpa kore citrusa. Pripada u skupinu limonoida koji su skupina triterpenoida. Nalazi se većinom u sjemenkama citrusnog voća. Druga gorka komponenta je nomilin koji je također triterpenoid (Berk, 2016).

2.1.2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi prisutni su u vanjskim dijelovima citrusnog voća i štite unutarnje tkivo od štetnog UV i IR zračenja, kao i od mikrobnih infekcija (Mahato i sur., 2019). S obzirom na to da je kora najviše izložena okolišu, najveće količine fenolnih spojeva nalaze se upravo u kori.

Flavonoide najčešće pronalazimo u vanjskom tkivu kore (flavedo), ali nalaze se i u unutrašnjem tkivu kore (albedo) te djeluju kao prva i druga barijera obrane biljke (Ledesma-Escobar i sur., 2019).

Postoje brojni načini klasifikacije fenolnih spojeva; s obzirom na strukturu, biološku aktivnost, biosintetski put ili na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli (Martić i Oguić, 2018). S obzirom na strukturu fenolni spojevi dijele se u dvije velike skupine: flavonoide (flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli i antocijani) i ne-flavonoide (fenolne kiseline: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, lignani, stilbeni i tanini). Udio fenolnih spojeva razlikuje se ovisno o dijelu biljke (Martić i Oguić, 2018). Flavonoidi su najveća skupina fenolnih spojeva i sastoje se od tri prstena. Dva aromatska benzenska prstena spojena su pomoću piranskog prstena i različitog broja hidroksilnih skupina na različitim pozicijama u prstenu (Mahato i sur., 2019). Struktura šest glavnih skupina flavonoida prikazana je na **Slici 4**. Uglavnom su prisutni u kombinaciji s drugim biljnim pigmentima. Pojavljuju se kao glikozidi u kojima je jedna ili više fenolnih OH skupina vezana za šećer (Obradović, 2011).

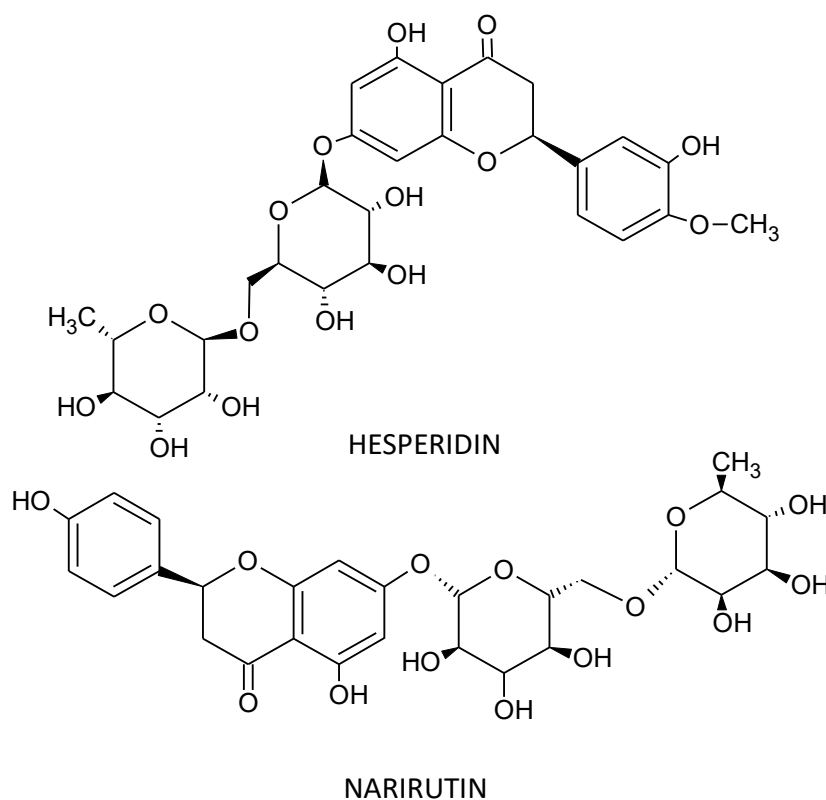


Slika 4 Struktura šest glavnih skupina flavonoida (Obradović, 2011)

Molekule glikozida sastoje se od dva dijela. Jedan dio je šećer koji može biti monosaharid, disaharid ili oligosaharid. Šećerni dio zove se još i glikon. Ako je šećer glukoza, onda se glikozid

naziva glukozid. Drugi dio može biti alkohol, amin ili fenol i naziva se aglikon. Glikozidna veza nastaje između anomernog ugljika šećera i funkcionalne skupine aglikona. U citrusnim glikozidima, funkcionalna skupina većinom je OH skupina, a glikozidna veza je eterska. U većini citrusnih glikozida, aglikoni pripadaju skupini flavonoida koji su fenolni spojevi (Berk, 2016). Citrusno voće sadrži mnoštvo različitih flavonoida, odnosno glikozida. Iako su prisutni u manjim količinama i većinom sekundarni metaboliti, glikozidi su spojevi od velikog ekonomskog i znanstvenog interesa. Izraz bioflavonoidi koristi se zbog naglaska na biološkoj aktivnosti flavonoida (Berk, 2016). Ekstrakcijom flavonoida povećat će se vrijednost proizvoda koji nastaju od poljoprivrednog otpada (Inoue i sur., 2010). Flavonoidi imaju svestrana svojstva, kao što su antioksidacijska, antikancerogena svojstva i protuupalna aktivnost. Imaju sposobnost antiperoksidacije lipida (Mahato i sur., 2019). Ljudsko tijelo crpi energiju iz niza oksidativnih procesa. Produkti tih reakcija uključuju slobodne radikale i perokside, visoko reaktivne oksidativne produkte (Mahato i sur., 2019). Antioksidacijska aktivnost povezana je sa sposobnošću fenolnih spojeva da hvataju slobodne radikale i cijepaju lančane reakcije radikala i kelatnih metala (Nayak i sur., 2015). Oksidativni stres uzrokuje oštećenje stanica i poznato je da sudjeluje u procesu starenja i razvoju bolesti kao što su: ateroskleroza, rak, infekcije, kardiovaskularne bolesti, mentalna oštećenja i dr. Prehrambeni antioksidansi su sastojci hrane koji imaju sposobnost prevencije ili odgađanja oštećenja nastalih u ovim reakcijama (Mahato i sur., 2019). Neki flavonoidi imaju i svojstva repelenata insekata. Također, u prehrambenoj tehnologiji flavonoidi se intenzivno proučavaju zbog svojstva poboljšanja gorkog ili slatkog okusa. Prosječan Europljanin potroši do 454,7 € godišnje na kardiovaskularne lijekove koji sadržavaju flavonoide (Mahato i sur., 2019).

Najzastupljeniji flavonoidi u korama mandarine su: hesperidin, narirutin, naringin i eriocitrin. Neki manji flavonoidi su: apigenin, luteolin, naringenin i hesperitin (Mahato i sur., 2019). Hesperidin je građen od flavanonskog aglikona hesperitina povezanog s rutinozom. Zbog svoje male topljivosti, često formira sitne kristale u sokovima i koncentratima. Za razliku od drugih citrusnih glikozida, hesperidin nema okus. Jedan od njegovih derivata, hesperidin metil kalkan zbog svoga se utjecaja na kapilarnu permeabilnost koristi za uklanjanje podočnjaka (Berk, 2016). Struktura hesperidina i narirutina prikazana je na **Slici 5**.



Slika 5 Struktura hesperidina i narirutina (Shan, 2016)

Naringin je flavonoid intenzivno gorkog okusa. Koncentracija naringina smanjuje se zrenjem. Njegov aglikon je naringenin, a glikon neohesperidoza koja je izomer rutinoze. Enzimatskom hidrolizom naringina uklanja se gorki okus citrusnog voća. Ostali glikozidi prisutni u kori mandarine su rutin, kvercetin i kaempferol-3-O-rutinozid koji su flavonolni glikozidi (Berk, 2016).

Fenolne kiseline su aromatski, sekundarni biljni metaboliti. Nastaju u proizvodima citrusa tijekom skladištenja. Kora citrusnog voća sadrži sljedeće fenolne kiseline: kavena, sinapinska, p-kumarinska, ferulinska, p-cimentna, vanilinska, hidroksicimetna, 2-oksibenzojeva, klorogenska kiselina i p-hidroksibenzojeva. Većina fenolnih kiselina nastaje u veznom obliku, vezane za strukturne komponente u biljnom tkivu (celulozu, protein, lignin), za flavonoide i manje organske spojeve (glukozu, vinsku ili maleinsku kiselinu) ili za terpene pomoću esterskih veza. Samo manji dio fenolnih kiselina postoji kao slobodne kiseline. Biološka funkcija fenolnih kiselina zaštita je protiv oksidativnih oštećenja i bolesti, kao što je koronarna bolest srca (Mahato i sur., 2019).

2. 1. 2. 3. OSTALE KOMPONENTE

Epikarp je zaslužan za karakterističnu boju citrusnog voća: zelena, žuta, narančasta ili crvena. Kombinacijom različitih pigmenata nastaje boja kore. Najvažniji pigmenti su: klorofil za zelenu, ksantofili za žutu i narančastu, karoten za narančastu i likopen za crvenu boju. Pigmenti su koncentrirani u plastidima. Klorofili se nalaze u kloroplastima, a svi ostali u kromoplastima. Izvori su boja pulpe i soka i vrlo su važni u senzorskoj kvaliteti citrusa. Nezrelo je voće zeleno. Kako voće dozrijeva, klorofil se uništava, kloroplasti postaju kromoplasti, a kora dobiva svoju karakterističnu boju. Paralelno s degradacijom klorofila, sintetiziraju se velike količine karotenoida i ksantofila. Da bi se dogodila promjena boje, temperatura tla tijekom nekoliko sati mora biti između 20 °C i 23 °C. Karotenoidi su široko rasprostranjeni u zelenim biljkama i uvijek prisutni zajedno s klorofilima. Karoten je narančasto-crveni pigment. Sastoji se od nezasićenog ugljikovodikovog lanca. Postoje njegove različite izomerske strukture ovisno o poziciji dvostruke veze. Najvažniji izomer je β -karoten. Molekula β -karotena simetrična je i njezinim cijepanjem nastaju dvije molekule retinala koji se zatim reducira do retinola (vitamin A). Ksantofili su velika skupina obojenih karotenoida i njihova je molekulska struktura slična karotenima, osim što ksantofili sadrže hidroksilne skupine preko kojih su često esterskim vezama povezani s masnim kiselinama (Berk, 2016). Karakteristična žuto-narančasta boja endokarpa i soka potječe od karotenoida, uglavnom β -karotena i ksantofila. Procesirana hrana, poput bezalkoholnih pića, mliječnih proizvoda i tjestenine sadrži β -karoten kao bojilo (Mahato i sur., 2019).

Dijetalna vlakna citrusnog otpada mogu biti topljiva i netopljiva. Topljiva vlakna uključuju pektin, a netopljiva vlakna uključuju celulozu, hemicelulozu i lignin. Pektinske tvari u citrusnom voću uključuju pektininsku kiselinu, pektin, protopektin i pektinsku kiselinu (Mahato i sur., 2019). Pektinske tvari mezokarpa su kompleksni, koloidni polisaharidi široko rasprostranjeni u biljkama. Prisutni su u stanicama staničnih stijenki i osobito u sloju između susjednih stanica. Njihove molekulske strukture sastoje se od polimera d-galakturonske kiseline. Pektinske tvari vrlo su bitne komponente citrusnog voća: u fiziologiji biljaka važni su jer vežu stanice albeda i omogućuju stanicama staničnih stijenki rast; kore citrusa najvažniji su sirovi materijal za proizvodnju pektina koji se koristi kao sastojak džemova; pektinske tvari imaju važnu ulogu u stabilnosti citrusnih sokova; u ljudskoj se prehrani unosom pektinskih tvari snižava razina kolesterola u krvi i smanjuje rizik nastanka koronarne bolesti (Berk, 2016).

Šećeri čine većinu topljivih krutih tvari u citrusima, dok škrob nije prisutan u zreloom citrusnom voću. Polovicu prisutnih šećera čini saharoza, a drugu polovicu reducirajući šećeri kao što su glukoza i fruktoza. U mandarinama, šećeri su najodgovorniji za sladak okus. Također, glavni su nositelji energije citrusnog soka (Berk, 2016). Ugljikohidrati i šećeri prisutni su velikim količinama u citrusnom otpadu. Količina šećera u citrusima ovisi o klimi, temperaturi i tlu (Mahato i sur., 2019).

Lipidi u citrusima su: linolenati, linolati, palmitati, stearati, oleati, konjugirani dieni, trieni i tetraeni. Lipide u citrusima možemo podijeliti u tri glavne skupine: jednostavni lipidi (prirodne masti, esteri glicerola i masnih kiselina, ulje citrusnih sjemenki), složeni lipidi (spojevi masnih kiselina s alkoholima ili glicerolom) i derivati lipida, steroli i karoteonidi. Različiti tipovi lipida citrusnih ulja imaju različitu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Mahato i sur., 2019).

Vitamini su specifični kemijski spojevi koji nisu sintetizirani u ljudskom tijelu i moraju se unijeti prehranom. Citrusno voće bogato je vitaminom C, a sadrži i manje količine pro-vitamina A i B kompleksa. Vitamin C važan je za rast i oporavak tkiva u svim dijelovima tijela i ojačava imunološki sustav (Mahato i sur., 2019). Najzastupljeniji je vitamin u tijelu topljiv u vodi i djeluje preventivno u sprječavanju bolesti koje uključuju mehanizam biološke oksidacije, kao što su rak i kardiovaskularne bolesti (Berk, 2016).

2.2. INOVATIVNE METODE EKSTRAKCIJE

U mnogim industrijskim procesima velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala koriste se u različitim reakcijskim sustavima i separacijskim procesima te tako određuju ekološku i ekonomičnu uspješnost procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Posljednjih godina porasla je čovjekova svijest o zaštiti prirode i okoliša. Shodno tome, javila se potreba za uporabom ekološki prihvatljivih supstanci i netoksičnih kemikalija pri provođenju različitih istraživačkih i proizvodnih procesa s ciljem očuvanja okoliša, kao i poboljšanja kvalitete naših života (Jokić i sur., 2011). Konvencionalni postupci ekstrakcije prilično su dugotrajni i uključuju velike količine otapala poput ugljikovodika, alkohola i kloralkana. Većina tih bioaktivnih spojeva nije topiva u vodi i može izazvati razgradnju dobivenog ekstrakta. Usprkos velikoj potrošnji energije i otapala, iskorištenje pri ovakvim ekstrakcijama često je vrlo nisko. Stoga

se u proteklom desetljeću vrlo često razmatraju tehnike sigurnijih i učinkovitijih ekstrakcija. Zelena kemija, kao jedna od grana kemije, bazira se na 12 načela i vrlo je značajna u industrijskim poljima poput prehrambene tehnologije i biotehnologije. Izraz zelena ekstrakcija zasniva se na poboljšanju i optimizaciji postojećih procesa, uporabi nenamjenske opreme i inovacijama u procesima koje uključuju otkrivanje alternativnih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Šest načela zelene kemije koja su prilagođena za ekstrakcijske postupke prikazana su u **Tablici 2.**

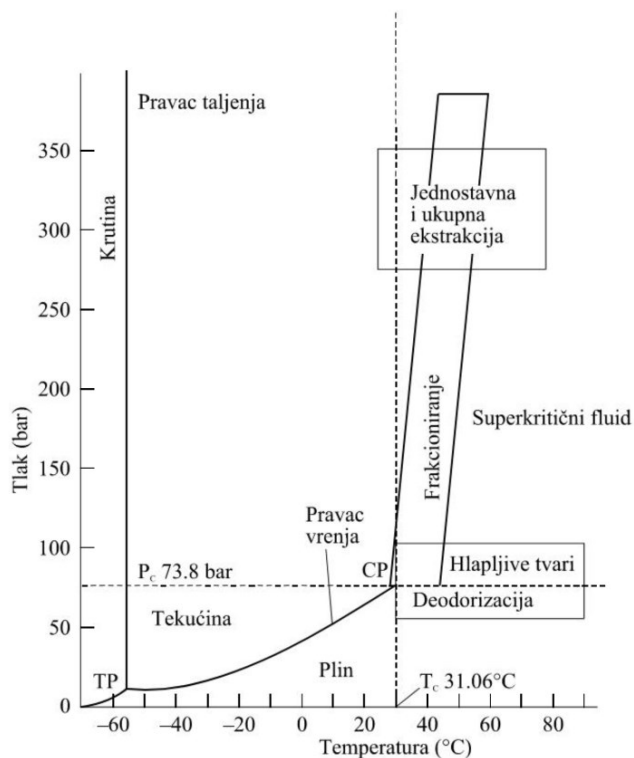
Tablica 2 Načela zelene ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2018)

NAČELO	OPIS
Korištenje obnovljivih izvora energije	Upotrebljene biljne stanice moraju pogodovati intenzivnom kultivacijom ili rastom <i>in vitro</i> .
Uporaba alternativnih otapala	Odabir odgovarajućeg otapala zasniva se na sigurnosti radnika, sigurnosti procesa, zaštiti okoliša i održivosti procesa. Zeleno otapalo mora biti kemijski stabilno, neisparljivo, lako za uporabu i s mogućnošću recikliranja. Zbog toga se kao otapala razmatraju voda, superkritični fluidi (CO ₂ , voda), otapala na bazi organskih soli (eutektička otapala) i agro otapala (glicerol, metil esteri masnih kiselina, terpeni).
Smanjenje potrošnje energije	Značajno smanjene potrošnje energije optimizacijom postojećeg procesa, rekuperacijom energije oslobođene prilikom procesa ekstrakcije (rekuperacija topline oslobođene prilikom kondenzacije pare, uporaba pulsirajućeg električnog polja, aktivacija mikrovalovima ili ultrazvukom).
Prerada otpada	"Biorafinerija" označava postrojenje koje kombinira preradu biomase, uključuje opremu koja proizvodi visokovrijedne spojeve iz agro-otpada, kao što su biogoriva i biomaterijali.
Smanjenje jediničnih operacija i očuvanje arome kontroliranim procesima	Pojedine industrije (kozmetička, farmaceutska) moraju tijekom procesa ekstrakcije očuvati pojačane arome ekstrakata, ali pri tom ne smiju ugrožavati sigurnost procesa.
Dobivanje nerazgrađenih, biorazgradivih ekstrakata	Da bi zadovoljio zahtjeve tržišta, ekstrakt mora ispunjavati kriterije: mora biti dobiven iz poznatog sirovog materijala, imati određena fizikalno-kemijska svojstva, biti pravilno skladišten, ne smije sadržavati ostatke pesticida, teških metala ili mikotoksina.

Prema načelima zelene kemije odabir odgovarajućeg otapala utemeljen je na sigurnosti radnika (toksičnost, kancerogenost, mutagenost, apsorpcija putem kože i dišnog sustava), sigurnosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost), zaštiti okoliša (ekotoksičnost, kontaminacija podzemnih voda, oštećenje ozonskog omotača) i održivosti procesa (mogućnost recikliranja i ponovnog korištenja). Zbog toga moderne ekstrakcijske tehnologije koje koriste netoksična otapala (voda, CO₂, etanol), primijenjene su na raznim materijalima. Neke od tih tehnologija su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ubrzana ekstrakcija otapalima (ASE), ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SC-CO₂) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE). Osim što su sigurnije za okoliš i čovjeka, ove su ekstrakcijske tehnologije i mnogo učinkovitije od konvencionalnih tehnologija (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

2.2.1. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM CO₂

Primjena ovog procesa ekstrakcije na prehrambene proizvode relativno je novijeg datuma. Ekstrakcija superkritičnim fluidima može se primijeniti kako na krutine, tako i na tekućine. U ovom procesu otapalo je plin u uvjetima temperature i tlaka pri kojima ne dolazi do kondenzacije odabranog plina u kapljevinu. Naime, pojedini plinovi posjeduju pojačanu sposobnost otapanja kad su komprimirani iznad kritične točke. U tim uvjetima, iako nije u kapljevitom stanju, plin ima vrlo veliku topljivost topljivih tvari, gotovo kao u kapljevinu. To znači da je, na primjer, primjenom superkritičnih fluida moguće uspješno provesti ekstrakciju tipa kruto-tekuće. Topljivost tvari koje se ekstrahiraju superkritičnim fluidima u velikoj je mjeri zavisna o primijenjenom tlaku. Ugljikov dioksid je bez sumnje najzanimljiviji fluid za ekstrakciju prirodnih tvari i u tehnologiji pojedinih prehrambenih proizvoda. Relativno je jeftin, lako dostupan, netoksičan, neškodljiv za okolinu i dobrih svojstava otapanja većine sastojaka koji se koriste u proizvodnji hrane, uz nisku kritičnu temperaturu (31,3 °C pri kritičnom tlaku 72,9 bar) što je vidljivo na faznom dijagramu za CO₂ prikazanom na **Slici 6** (Lovrić i sur., 2003).



Slika 6 Fazni dijagram za CO₂ (Lovrić i sur., 2003)

Superkritični CO₂ vrlo je nepolaro otapalo, njegova polarnost može se usporediti s tekućim pentanom i pogodan je za ekstrakciju slabo polarnih spojeva male molekulske mase, kao što su: karotenoidi, trigliceridi, masne kiseline i tvari arome. Pravilo je da topljivost tvari u superkritičnom CO₂ pada s povećanjem broja polarnih skupina (hidroksilna, karbonilna, amino i nitro). Dakle, zbog indeksa polarnosti CO₂ nije prikladan za ekstrakciju polarnih spojeva (npr. fenolnih spojeva) (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Na komercijalnoj se razini ekstrakcija superkritičnim CO₂ najčešće primjenjuje za dekafeinizaciju kave, u pripremi ekstrakta hmelja (za potrebe industrije piva) i sve više za dobivanje prirodnih tvari arome (eteričnih ulja i aroma voća) i boje, ekstrakta mirodija te različitih aktivnih tvari za industrije farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Nadalje, sve značajnije mjesto ovaj proces zauzima u tehnologiji ulja, uključujući dobivanje lecitina te za uklanjanje kolesterola iz maslaca iz životinjskih masti (Lovrić i sur., 2018).

Prednosti SC-CO₂ su sljedeće (Cvjetko Bubalo i sur., 2018):

- Učinkovita obrada materijala osjetljivih na visoke temperature (kritična temperatura je 31,3 °C što je ključ za očuvanje bioaktivnih spojeva u ekstraktima);

- Dobiveni ekstrakti ne sadrže tragove otapala;
- Otapalo je ekološki prihvatljivo, nije zapaljivo, nema visoku cijenu;
- Arome prilikom ekstrakcije ostaju nepromijenjene;
- Otapalo ima nisku viskoznost, lako difundira kroz čvrste materijale;
- Topljivost je visoka za nepolarne spojeve i spojeve s niskom polarnošću;
- Dobiveni ekstrakti mogu se direktno analizirati na GC-u.

Nedostaci SC-CO₂ prema Cvjetko Bubalo i sur. (2018) su:

- Uporaba visokih tlakova;
- Skupa ulaganja u opremu;
- Visoko su polarni spojevi netopljivi;
- Tlakovi koji se koriste vode do visokih troškova postrojenja;
- Fazna ravnoteža sustava otapalo/otopljena tvar vrlo je složena.

2.2.2. EKSTRAKCIJA SUBKRITIČNOM VODOM

Subkritična voda je voda pri temperaturi većoj od normalne temperature vrelišta (100 °C), a nižoj od temperature kritične točke vode (374 °C) i tlaku pri kojem ostaje u tekućem stanju. Pri temperaturi većoj od 374 °C smatra se da je voda u subkritičnom stanju. Svojstva vode pri normalnim uvjetima, subkritičnom i superkritičnom stanju, prikazana su u **Tablici 3**. Vidljivo je kako se promjenom temperature i tlaka mijenjaju svojstva vode (Jokić i sur., 2018).

Tablica 3 Svojstva vode pri različitim uvjetima i u različitim stanjima (Jokić i sur., 2018)

SVOJSTVO	VODA PRI NORMALNIM UVJETIMA	SUBKRITIČNA VODA	SUPERKRITIČNA VODA
T (°C)	25	350	400
p (bar)	1	250	500
ρ (kg·m ⁻³)	997,45	625,45	577,79
ϵ (-)	78,5	14,86	12,16
pK_w (-)	14,0	11,5	11,5

U usporedbi s vodom pri normalnim uvjetima, subkrična voda ponaša se vrlo slično organskim otapalima zbog svoje smanjene polarnosti, površinske napetosti i konstante disocijacije. Pri normalnim se uvjetima voda smatra otapalom vrlo velike polarnosti čija je vrijednost dielektrične konstante oko 80. U ovom stanju voda je prikladna za ekstrakciju visoko polarnih spojeva. Pri temperaturi između 100 °C i 374 °C i pod dovoljno visokim tlakom da se voda zadrži u tekućem stanju, polarnost vode značajno pada i takva voda postaje prikladna za ekstrakciju i polarnih i nepolarnih spojeva. Ovo je uzrokovano značajnijim padom dielektrične konstante s porastom temperature. Pri visokim su temperaturama u subkričnom stanju površinska napetost, viskoznost i gustoća također značajno smanjene. Smanjenje površinske napetosti omogućuje pojačano vlaženje ekstrahiranog materijala i puno brže otapanje ciljanih spojeva. Smanjena viskoznost vode pojačava ulazak vode u ekstrahirani materijal i tako povećava brzinu difuzije (Jokić i sur., 2018).

Primjena vode u subkričnom stanje svake je godine sve veća. Najveća je primjena ipak u području ekstrakcija biljnog materijala. SWE najčešće se primjenjuje pri ekstrakcijama antioksidativnih spojeva. Metoda je jeftina, učinkovita i pristupačna za ekstrakciju nutritivno vrijednih spojeva (fenola, tvari arome, antocijanina). Zbog toga se svrstava u skupinu zelenih ekstrakcija (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Prednosti SWE prema Jokić i sur. (2018) možemo sažeti na sljedeći način:

- Voda je sigurno, netoksično, nezapaljivo otapalo, ne zagađuje okoliš;
- Voda je lako dostupno i jeftino otapalo;
- Dobiveni ekstrakti su sigurni, bez tragova toksičnih otapala;
- SWE postiže bolju difuziju u matriks biljke i bolji prijenos mase u usporedbi s drugim ekstrakcijskim tehnikama;
- SWE se može primijeniti za nisko polarne kao i za nepolarne spojeve;
- Primjena jeftinih, lako dostupnih otapala i kratko vrijeme ekstrakcije smanjuju troškove ekstrakcijskih procesa.

Nedostaci SWE (Jokić i sur., 2018):

- Visoki troškovi ulaganja;

- Pri visokim temperaturama raste rizik pojavljivanja neželjenih reakcija (karamelizacija, Maillardove reakcije) i nastaju određeni toksični spojevi;
- Pri visokim temperaturama moguće je razlaganje spojeva osjetljivih na visoku temperaturu.

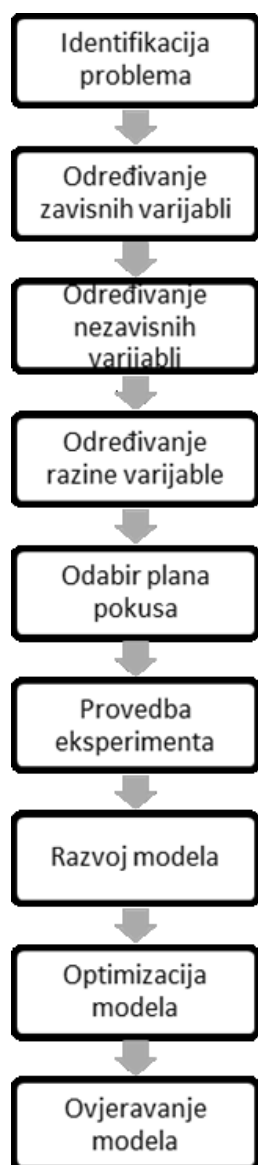
2.3. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

Prehrambena industrija pokušava poboljšati svoje procese na način da poveća njihovo iskorištenje bez povećanja troškova i vremena. Pronalaženje uvjeta procesa s najpovoljnijim ishodom glavna je svrha optimizacije. U industriji se istražuju alternativni procesi koji će povećati iskorištenje, a istovremeno smanjiti troškove proizvodnje. Tako i sve nove tehnike ekstrakcije imaju za cilj poboljšati kvalitetu i fizikalno-kemijska svojstva hrane, a smanjiti energiju i vrijeme proizvodnje (Aydar, 2019). U prošlosti se optimizacija u prehrambenim procesima provodila na način da se istraživao utjecaj promjene jednog od parametara na ishod, dok su ostali parametri zadržavali svoje konstantne vrijednosti. Glavni je nedostatak ove metode to što se u obzir ne uzimaju interaktivni odnosi među varijablama. U današnje vrijeme metoda odzivnih površina (RSM) najpopularnija je multivarijabilna statistička metoda koja se koristi u optimizaciji prehrambenih procesa. RSM je skup statističkih i matematičkih metoda utvrđenih u svrhu modeliranja polinomskih modela i podataka koji moraju prikazati ponašanje skupa podataka u svrhu izrade statističkih predviđanja. Ovaj model koristan je pri optimiziranju, dizajniranju, razvijanju i poboljšanju procesa gdje su odzivi pod utjecajem više varijabli (Yolmeh i Jafari, 2017).

Izraz metoda odzivnih površina izveden je iz grafičkog prikaza kreiranog nakon prilagodbe tehnološkog problema matematičkom modelu. RSM prikazuje utjecaj nezavisne varijable na zavisne varijable. Glavni koraci za ispravnu provedbu ove metode prikazani su na **Slici 7**. Radi boljeg shvaćanja ove metode potrebno je razumjeti određene pojmove:

1. Eksperimentalna domena eksperimentalno je polje koje treba istražiti i definirano je i maksimumom i minimumom nezavisnih varijabli.
2. Eksperimentalni dizajn specifični je skup eksperimenata definiranih matricom koja je sastavljena od različitih kombinacija nezavisnih varijabli.

3. Nezavisne varijable ili čimbenici varijable su koje unosimo, eksperimentalne varijable i mogu se mijenjati neovisno jedna o drugoj.
4. Razine varijable predstavljaju različite vrijednosti varijabli na kojoj se eksperiment provodi.
5. Zavisne varijable ili odziv izmjerene su vrijednosti, na njih utječu nezavisne varijable.
6. Ostatak je razlika između izračunatih i eksperimentalnih podataka. Niska vrijednost ovog indeksa važna je za dobru prilagodbu matematičkog modela izmjerenim vrijednostima (Yolmeh i Jafari, 2017).



Slika 7 Shematski prikaz glavnih koraka za provedbu RSM (Aydar, 2019).

RSM se sastoji od matematičkih i statističkih analiza koje koristimo da bismo razvili odzivnu funkciju koja opisuje odnose između zavisne varijable y (izmjerena vrijednost) i k broja nezavisnih varijabli x (ulazne vrijednosti). Zavisnu varijablu zatim možemo označiti kao funkciju nezavisnih varijabli (1), gdje ε predstavlja eksperimentalnu pogrešku:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (1)$$

Ako zavisnu varijablu označimo:

$$E(y) = f(x_1, x_2, \dots, x_k) = \eta \quad (2)$$

tada je odzivna površina:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (3)$$

Obično koristimo model drugog reda (4) za opisivanje odnosa između zavisne varijable i nezavisnih varijabli:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

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,

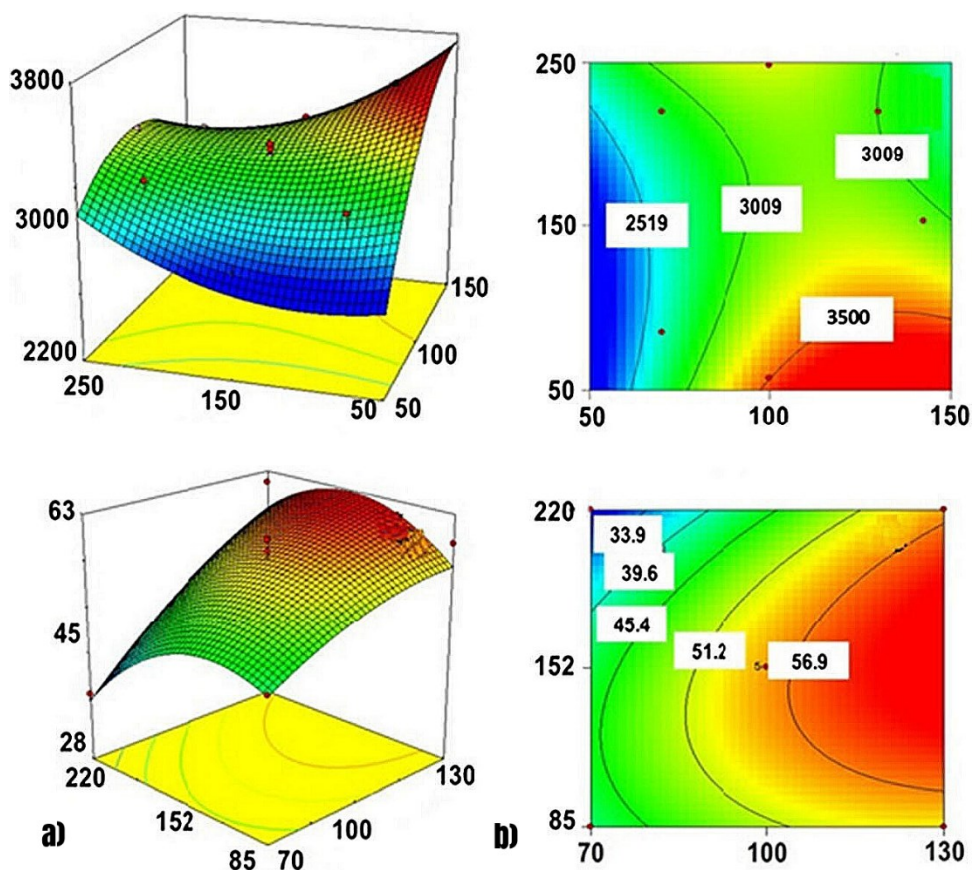
β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

x_i, x_j – ispitivane nezavisne varijable.

Svrha je RSM pristupa odrediti utječu li nezavisne varijable na dobiveni odziv značajno ili neznajno. U industriji je vrlo često potrebno optimalno postaviti vrijednosti nezavisnih varijabli da bismo dobili maksimalni, minimalni ili ciljani odziv određenog područja interesa. Da bismo to postigli, prvo moramo provesti određen broj eksperimenata. U tim eksperimentima mjerimo zavisne varijable, a nezavisne postavljamo optimalno. Sveukupnost ovih postavki čini model odzivnih površina kojeg predstavlja matrica (5), označena sa D , reda $n \times k$, koja se naziva matrica plana pokusa:

$$D = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1k} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix} \quad (5)$$

gdje x_{ui} označava u-ti model postavljen od x_i ($i = 1, 2, \dots, k; u = 1, 2, \dots, n$). Svaki red matrice D označava točku u k -dimenzijalnom euklidskom prostoru. 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 (Ruby-Figueroa, 2016). Metoda odzivnih površina daje trodimenzionalni prikaz u kojem svaka os (x , y i z os) predstavlja vrijednost jedne nezavisne varijable ili prikaz u obliku kontura (Yolmeh i Jafari, 2017). Ovi prikazi prikazani su na **Slici 8**.



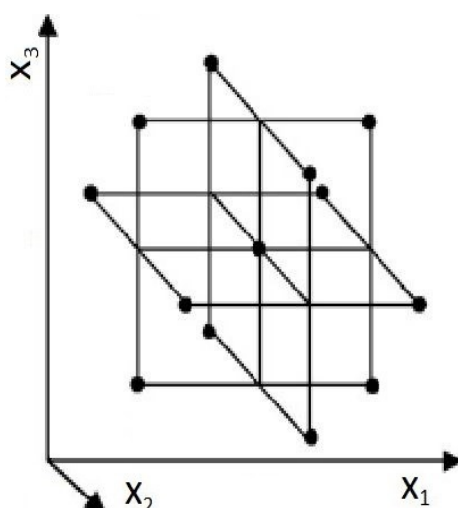
Slika 8 Prikaz odzivnih površina u cijelom eksperimentalnom području: tri dimenzije – prikaz pomoću 3D dijagrama (a) i dvije dimenzije – prikaz u obliku kontura (b) (Yolmeh i Jafari, 2017)

2.3.1. BOX-BEHNKENOV PLAN POKUSA

Planovi pokusa mogu se podijeliti na tri glavne skupine: centralni kompozitni plan, kubični plošno centrirani plan i Box-Behnkenov plan. Ključno je odabrati odgovarajući plan pokusa jer će plan pokusa utjecati na kvalitetu predviđenog modela. Box-Behnkenov plan pokusa jedan je od planova pokusa koji se najčešće koriste u prehrambenoj industriji (Aydar, 2019). Ovaj plan pokusa popularan je u industrijskim istraživanjima zbog svog ekonomičnog dizajna, zahtjeva samo tri razine svake od nezavisnih varijabli: minimum (-1), sredina (0) i maksimum (1). Broj eksperimenata koje treba provesti računamo na sljedeći način (6):

$$N = 2k(k - 1) + c_p \quad (6)$$

Gdje je k broj nezavisnih varijabli, a c_p broj centralnih točaka. Eksperimentalne točke smještene su na hipersferi što znači da su jednako udaljene od centralne točke (**Slika 9**). Box-Behnkenov plan pokusa predlaže kako odabrati točke eksperimenata kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Dizajn može ispitivati od 3 do 10 varijabli (Yolmeh i Jafari, 2017). Ovaj plan pokusa obično se sastoji od 17 provedenih eksperimenata (ako imamo 3 ulazne procesne varijable), uključujući 3 do 5 ponavljanja u centralnoj točki koja služe za ocjenu statističke pogreške (Aydar, 2019).



Slika 9 Prikaz Box-Behnkenovog plana na kocki (Bezzeri i sur., 2008)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada izrađen je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je:

- Provesti ekstrakciju isparljivih komponenti iz kore mandarine (*Citrus unshiu*) primjenom superkritičnog CO₂ pri različitim procesnim parametrima tlaka (100 i 300 bar) te dobivene ekstrakte analizirati primjenom GC/MS;
- U pogači koja zaostaje nakon SC-CO₂ ekstrakcije ekstrahirati bioaktivne spojeve primjenom ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju te ispitati utjecaj različitih procesnih parametara (temperatura (130 - 220 °C), vrijeme ekstrakcije (5 - 15 minuta), omjer tekuće/kruto (10 - 30 ml/g) na svojstva i kemijski sastav ekstrakta (pretpostavka je bila da su u pogači zaostale polarne komponente koje SC-CO₂ kao nepolarno otapalo nije ekstrahiralo);
- Identificirati i kvantificirati pojedine bioflavonoide, fenolne spojeve te HMF u dobivenim ekstraktima kore mandarine primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). ;
- Spektrofotometrijskim metodama odrediti antioksidacijsku aktivnost te udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima;
- Optimirati procese primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa *Design Expert*[®].

3.2. MATERIJALI

Za potrebe istraživanja korištene su kore mandarine (*Citrus unshiu*) s obiteljske farme Dalibor Ujević iz Opuzena dobivene 2019. godine (**Slika 10**).



Slika 10 Kora ploda *Citrus unshiu* (Izvor: autor)

3.2.1. UREĐAJI I KEMIKALIJE

U ovom istraživanju korišteni su sljedeći uređaji:

- Univerzalni mlin (IKA M 20 univerzalni mlin)
- Uređaj za ekstrakciju SC-CO₂ (Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska);
- Sustav GC/MS (Agilent Technologies (Palto Alto, CA, SAD));
- Uređaj za SWE (Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska);
- Sustav HPLC-DAD (Agilent 1260 Infinity II (Analytical Instruments, CA, SAD));
- Spektrofotometar (Shimadzu UV-1280 i Spectronic Helios Gamma UV-Vis spektrofotometar; Thermo Fisher Scientific);

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

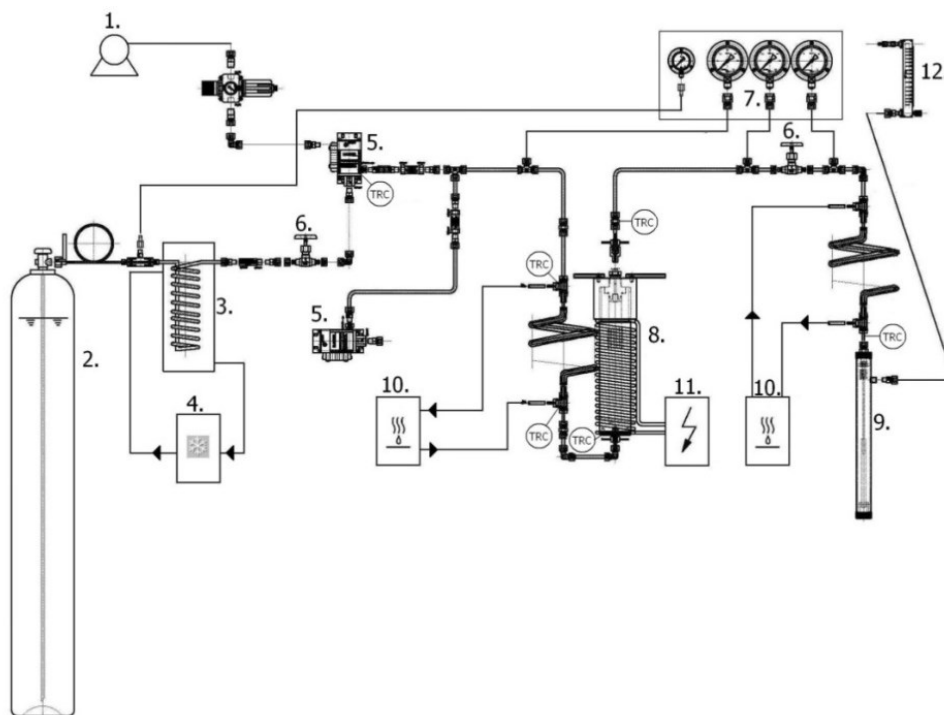
- CO₂ za ekstrakciju čistoće 99,97 % (Messer, Osijek, Hrvatska);
- Otapala visoke čistoće (n-heksan (CARLO ERBA Reagents, Francuska), dietil-eter (J. T. Baker, Poljska), metanol (J. T. Baker, Poljska));
- Standardi: d-limonen, hesperidin, narirutin, naringin, rutin, kaempferol-3-O-rutinozid, kvercetin, naringenin, hesperitin, luteolin, HMF, klorogenska kiselina (Dr. Ehrenstorfer GmbH);
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (TCI, Japan);
- Folin-Ciocalteuov reagens (Merck, Njemačka);

- Otopina Na_2CO_3 (Merck, Njemačka);
- Mili-Q voda (provodnost: $\leq 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$).

3.3. METODE

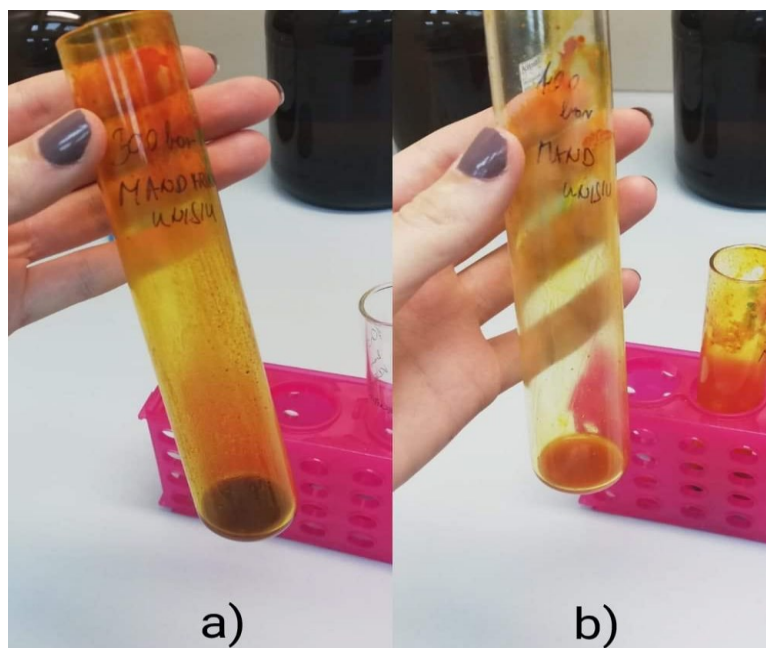
3.3.1. EKSTRAKCIJA ISPARLJIVIH KOMPONENTI SUPERKRITIČNIM CO_2 IZ KORE MANDARINE (*Citrus unshiu*)

Za potrebe ekstrakcije superkričnim CO_2 pripremljeni su uzorci tako da je kora mandarine usitnjena i homogenizirana pomoću univerzalnog mlina. Odvagano je 100 g uzorka koji je zatim stavljen u ekstraktor (**Slika 11**). Ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima tlaka (100 i 300 bar), temperaturi od 40 °C, tijekom 90 minuta i masenom protoku CO_2 od 2 kg/h. Dobiveni ekstrakti (**Slika 12**) koji su korišteni za daljnju analizu sakupljeni su u prethodno izvagane staklene epruvete. Pogača koja zaostaje nakon ove ekstrakcije pri 300 bar, tzv. odmašćeni uzorak kore mandarine, korištena je u daljnjim istraživanjima za SWE.



Slika 11 Procesna shema uređaja za ekstrakciju superkričnim CO_2

(1-kompresor, 2- CO_2 spremnik, 3-izmjenjivač toplote od nehrđajućeg čelika, 4-rashladna kupel, 5-zrakom pogonjena pumpa Haskel MS-71; 6-ventili (B-HV), 7-manometri, 8-ekstraktor, 9-separator, 10-vodena kupel, 11-centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana, 12-mjerač protoka) (Izvor: Horvat i sur., 2017)



Slika 12 Dobiveni SC-CO₂ ekstrakti kora mandarina: a) ekstrakcija pri 300 bar, b) ekstrakcija pri 100 bar (Izvor: autor)

3.3.2. ODREĐIVANJE ISPARLJIVIH KOMPONENTI U SC-CO₂ EKSTRAKTIMA PRIMJENOM PLINSKE KROMATOGRAFIJE-MASENE SPEKTROMETRIJE

Dobiveni ekstrakti kora mandarina dobiveni SC-CO₂ ispitani su u odnosu na kvalitativni i kvantitativni sastav primjenom GC/MS analize. Za analizu isparljivih komponenti korišten je plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890B u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977A, spojenim na računalo (**Slika 13**).

Separacija komponenti provedena je na kapilarnim kolonama H5-5MS (dužine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 μ m, J&W, SAD).

Korišteni su sljedeći uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje 18 min na 200 °C,
- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 45-450 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC/MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

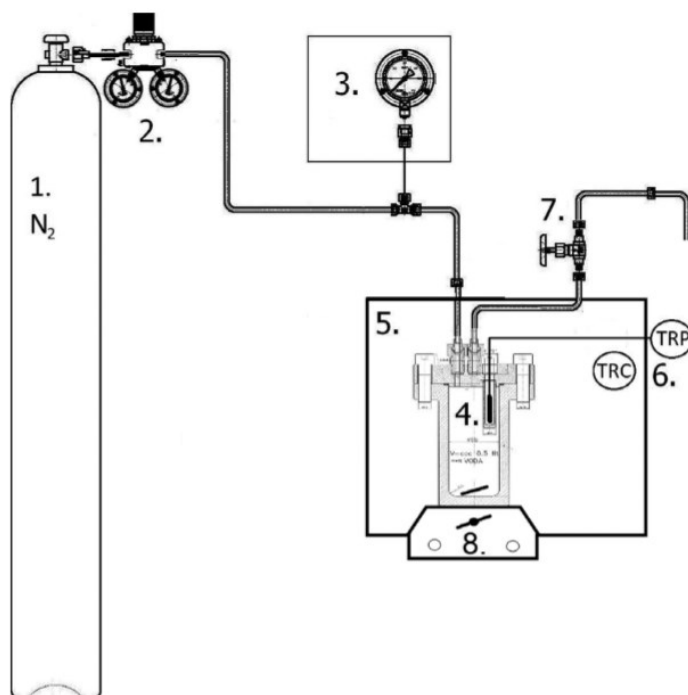
- kromatogram ukupne ionske struje,
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbližnji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente, relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.



Slika 13 GC/MS uređaj (Izvor: autor)

3.3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH KOMPONENTI SUBKRITIČNOM VODOM IZ PREDTRETIRANOG UZORKA KORE MANDARINE (*Citrus unshiu*)

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kore mandarina vodom u subkritičnom stanju odrađena je na laboratorijskom ekstraktoru za ekstrakciju subkritičnom vodom čija je shema prikazana na **Slici 14**, a ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije te omjera tekuće/kruto na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima. U **Tablici 4** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju. Uvjeti ekstrakcije prikazani su u **Tablici 5**.



Slika 14 Procesna shema SWE postrojenja

(1-boca s plinom N_2 , 2-regulator N_2 (20/5 MPa), 3-manometar (0-20 MPa), 4-ekstraktor (20 MPa), 5-termostat ili pećnica (20-300 °C), 6-TRC,TRP (regulator temperature i temperaturna sonda), 7-visokotlačni igličasti ventil, 8-magnetska miješalica) (Izvor: Jokić i sur., 2018)

Odvagano je 1 g omašćenog uzorka kora mandarina (pogače koja je dobivena nakon $SC-CO_2$ ekstrakcije) te je dodana voda u različitim omjerima kako bi se pripremile različite koncentracije. Ovako pripremljen uzorak položio se u šaržni reaktor. Pri ekstrakciji reaktor se zagrijavao, a smjesa miješala. Plin dušik koristio se za kontrolu tlaka te uklanjanje prisutnog kisika kako bi se izbjegle reakcije oksidacije. Nakon provedene ekstrakcije, reaktor se odmah hladio u ledenoj kupelji, a sadržaj filtrirao vakuum filtracijom. Filtrat tj. dobiveni ekstrakt koristio se u daljnjoj analizi.

Tablica 4 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju

Nezavisne varijable	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Temperatura (°C)	X_1	130	175	220
Vrijeme (min)	X_2	5	10	15
Omjer tekuće/kruto (ml/g)	X_3	10	20	30

Tablica 5 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kore mandarine vodom u subkritičnom stanju prema BBD

Redni broj uzorka za optimizaciju	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)
1.	175	10	20
2.	175	15	10
3.	130	10	30
4.	220	5	20
5.	175	15	30
6.	175	10	20
7.	220	10	10
8.	130	15	20
9.	130	10	10
10.	175	5	30
11.	175	5	10
12.	175	10	20
13.	175	10	20
14.	220	15	20
15.	130	5	20
16.	175	10	20
17.	220	10	30

Svih 17 dobivenih ekstrakta sačuvano je u zamrivaču na temperaturi od -18 °C do daljnje analize. Na **Slici 15** vidljive su razlike u boji ekstrakata ovisno o temperaturi i vremenu trajanja ekstrakcije. Pri temperaturi 220 °C i u trajanju od 5 minuta ekstrakti poprimaju puno tamnije boje u usporedbi s ekstraktima koji nastaju pri temperaturi od 130 °C ili 175 °C. Već ta razlika u boji ekstrakata upućuje na njihove različite sastave jer se pri različitim temperatura stvaraju različiti međuprodukti termalne razgradnje.



Slika 15 Ekstrakti dobiveni pomoću SWE (Izvor: autor)

3.3.4. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA IZ EKSTRAKATA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kvantitativna i kvalitativna analiza flavonoida u ekstraktima dobivenim pomoću SWE odrađena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) prikazanom na **Slici 16** pri sljedećim uvjetima:

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



Slika 16 HPLC-DAD uređaj (Izvor: autor)

Kvalitativna analiza provedena je usporedbom retencijskog vremena (vrijeme između injektiranja uzorka i pojave odziva na detektoru) fenolnih spojeva u uzorku s retencijskim

vremenom nakon injektiranja standarda određenog fenolnog spoja poznate koncentracije. Kvantitativna analiza komponenti u uzorcima provedena je određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje za svaki fenolni spoj koji je analiziran.

Pripremljene su otopine standarda sljedećih fenolnih spojeva: klorogenska kiselina (10-1000 $\mu\text{g/mL}$), narirutin (10-150 $\mu\text{g/mL}$), naringin (10-1000 $\mu\text{g/mL}$), hesperidin (1-1500 $\mu\text{g/mL}$), rutin (10-500 $\mu\text{g/mL}$), kaempferol 3-O-rutinozid (10-1000 $\mu\text{g/mL}$), kvercetin (10-100 $\mu\text{g/mL}$), naringenin (10-150 $\mu\text{g/mL}$), hesperitin (10-100 $\mu\text{g/mL}$), luteolin (20-1000 $\mu\text{g/mL}$) pri koncentracijama navedenima za svaku komponentu. Uz navedene komponente, pripremljen je standard hidrokсимetilfurfurala (HMF) (10-1000 $\mu\text{g/mL}$).

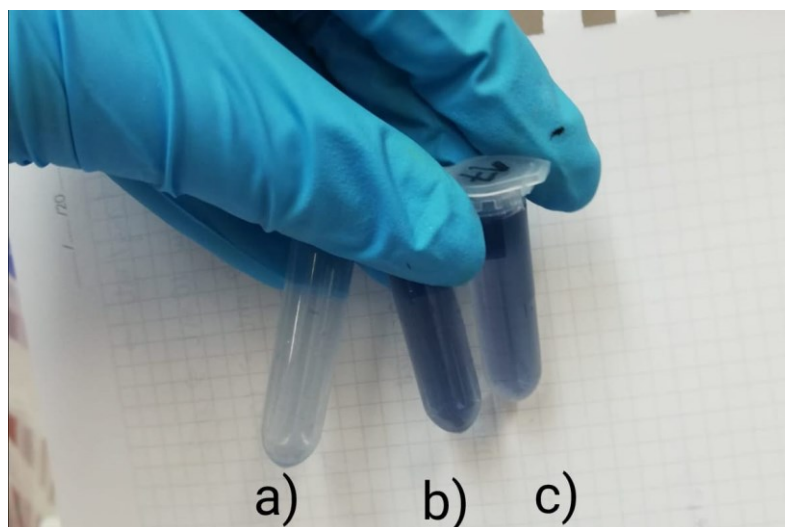
Dobiveni su kromatogrami temeljem kojih se linearnom regresijom dobila jednadžba pravca za svaku komponentu te je izračunat koeficijent korelacije koji iznosi za HMF ($R^2=0,99927$), klorogensku kiselinu ($R^2=0,99912$), narirutin ($R^2=0,99888$), naringin ($R^2=0,99896$), hesperidin ($R^2=0,99720$), rutin ($R^2=0,99842$), kaempferol-3-O-rutinozid ($R^2=0,99996$), kvercetin ($R^2=0,99933$), naringenin ($R^2=0,99985$), hesperitin ($R^2=0,99769$), luteolin ($R^2=0,99971$) pri koncentracijama navedenima za svaku komponentu. R^2 koji je u svim slučajevima viši od 0,995 potvrđuje da je metoda linearna u cijelom području ispitivanih koncentracija.

Retencijsko vrijeme za sve komponente: HMF (4,30 min), klorogenska kiselina (12,333 min), narirutin (18,363 min), naringin (18,688 min), hesperidin (18,838 min), rutin (19,034 min), kaempferol-3-O-rutinozid (20,324 min), kvercetin (22,789 min), naringenin (23,133 min), hesperitin (23,701 min), luteolin (28,642 min).

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) za komponente iznose: HMF ($2,023\text{E-}05$ $\mu\text{g/mL}$; $6,74334\text{E-}05$ $\mu\text{g/mL}$), klorogenska kiselina ($0,001356106$ $\mu\text{g/mL}$; $0,004520355$ $\mu\text{g/mL}$); narirutin ($0,020970657$ $\mu\text{g/mL}$; $0,069902191$ $\mu\text{g/mL}$); naringin ($0,005839391$ $\mu\text{g/mL}$; $0,019464638$ $\mu\text{g/mL}$), hesperidin ($0,009915032$ $\mu\text{g/mL}$; $0,033050106$ $\mu\text{g/mL}$), rutin ($0,0001511610$ $\mu\text{g/mL}$, $0,00503868$ $\mu\text{g/mL}$), kaempferol-3-O-rutinozid ($0,005927117$ $\mu\text{g/mL}$, $0,019757055$ $\mu\text{g/mL}$), kvercetin ($0,048360253$ $\mu\text{g/mL}$, $0,161200844$ $\mu\text{g/mL}$), naringenin ($0,044095963$ $\mu\text{g/mL}$, $0,146986544$ $\mu\text{g/mL}$), hesperitin ($0,019451279$ $\mu\text{g/mL}$, $0,064837598$ $\mu\text{g/mL}$), luteolin ($0,003150596$ $\mu\text{g/mL}$, $0,010501986$ $\mu\text{g/mL}$).

3.3.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Ukupni fenoli u ekstraktima dobivenim pomoću SWE određivani su Folin-Ciocalteuovom metodom. To je kolorimetrijska metoda pri kojoj tvari iz ekstrakta reagiraju s redoks reagensom. Upotrebljeni redoks reagens je Folin-Ciocalteu reagens, a po kemijskom sastavu to je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline. Fenolne skupine oksidiraju se do kinona dodatkom molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Mjerenjem apsorbancija tih otopina možemo pomoću kalibracijske krivulje kvantificirati ukupne fenole (Blainski i sur., 2013). Kalibracija je konstruirana prema galnoj kiselini. Razlike u intenzitetu boja uzoraka nakon reakcije s reagensom vidljive su na **Slici 17**.



Slika 17 Razlike u boji uzoraka nakon reakcije: a) slabije reducirani Folinov reagens, boja upućuje na to da uzorak sadrži manje ukupnih fenola; b) i c) reducirani reagens, reakcija je intenzivna, intenzivna plava boja ukazuje na prisustvo fenola (Izvor: autor)

Postupak:

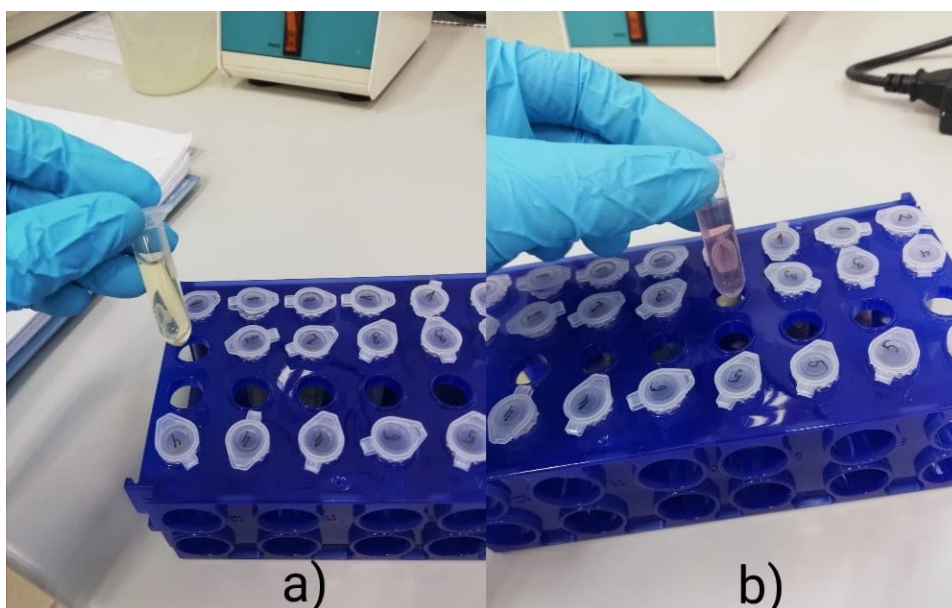
U 20 μL razrijeđenog ekstrakta, koncentracije 10 mg/ml dodano je 100 μL Folinovog reagens, 300 μL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (otopljeno 200 g bezvodog natrijeva karbonata u 1 litri vode kuhanjem) i 1580 μL mili-Q vode (provodnost: $\leq 0,055 \mu\text{S/cm}$). Uzorci su termostatorani 30 min. Zatim je mjerena apsorbancija spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm u tri paralele. Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama masenog udjela galne kiseline i ukupnih fenola te izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po litri ekstrakta.

3.3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Metoda koja je upotrebljena utemeljena je na uporabi stabilnog, slobodnog radikala DPPH (2,2-difenil-1-pirkrilhidrazila) tamno ljubičaste boje i sposobnosti antioksidativnih tvari da hvataju slobodne radikale. Ova je metoda brza, jednostavna i koristi se u kvantifikaciji antioksidansa u voću, povrću, uljima, žitaricama i vinima. Reakcija je prikazana sljedećom jednadžbom (7):



Antioksidansi (AH) u reakciji s radikalom doniraju jedan atom vodika. Kao produkt nastaje DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A·). Ako DPPH reagira sa spojem koji može donirati atom vodika, dolazi do gubitka nastale ljubičaste boje otopine jer nastaje reducirani oblik difenilpirkrilhidrazin koji je žute boje (**Slika 18**) (Kedare i Singh, 2011).



Slika 18 Razlike u boji upućuju na razlike u antioksidacijskoj aktivnosti: a) veća antioksidacijska aktivnost, b) manja antioksidacijska aktivnost (Izvor: autor)

Postupak:

U 1,2 ml razrijeđenog ekstrakta, koncentracije 1 mg/ml dodano je 0,5 ml svježe otopine DPPH, koncentracije 0,2 mM. Nakon 30 minuta stajanja uzorka u mraku, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm. Određivanje je provedeno u tri ponavljanja i izraženo kao % aktivnosti vezanja (% DPPH). Moć hvatanja radikala izračunata je kao omjer smanjenja

apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka i apsorbcije otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka, prema jednadžbi (8):

$$\% DPPH = \frac{(ADPPH+AB)-AS}{ADPPH} \cdot 100 \quad (8)$$

gdje ADPPH predstavlja apsorbciju pripremljene otopine DPPH, AB apsorbciju slijepe probe, a AS apsorbciju uzorka.

3.3.7. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KORE MANDARINE (*Citrus unshiu*)

Proces optimizacije provodio se na način da su prvo primjenom SC-CO₂ izdvojene isparljive komponente kore mandarine. Dobivena je pogača zatim korištena kao polazni materijal u sljedećoj zelenoj tehnici ekstrakcije, SWE. Isparljive komponente ekstrahirali smo pomoću CO₂ koji je kao nepolaro otapalo prikladan za tu vrstu spojeva, a pomoću vode u subkritičnom stanju ekstrahirali smo polarne fenolne spojeve. Na taj način je kora mandarine, koja u industriji predstavlja ekološki i financijski problem potpuno iskorištena.

Modeliranje i optimiranje procesa SWE odrađeno je primjenom metode odzivnih površina. Box-Behnkenov plan pokusa korišten je za procjenu utjecaja procesnih parametara tijekom SWE na kvalitetu dobivenih ekstrakata; odnosno na udio HMF-a, hesperidina, narirutina, rutina, udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kore mandarine. U procesu SWE odabrane su tri različite nezavisne varijable koje po literaturnim podacima imaju potencijalno najveći utjecaj: temperatura ekstrakcije (X_1), vrijeme ekstrakcije (X_2) i omjer tekuće/kruto (X_3).

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 17 eksperimenata ekstrakcije (**Tablica 5**). Dobiveni eksperimentalni podaci aproksimirani su matematičkim modelom (4) odzivnih površina, tj. polinomom drugog reda. Na osnovi dobivenih matematičkih modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućavaju 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*[®], v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ekstrakti kora mandarine dobiveni pomoću SC-CO₂ bogati su hlapljivim i nepolarnim komponentama zbog nepolarnih svojstava CO₂ kao otapala. U **Tablici 6** prikazani su sastavi SC-CO₂ ekstrakata (pri tlaku od 100 i 300 bar) identificirani pomoću GC/MS. Svi rezultati prikazani su u postotcima.

Tablica 6 Sastav SC-CO₂ ekstrakata (pri 100 i 300 bara i konstantnoj temperaturi od 40 °C) dobiven pomoću GC/MS

Redni broj	Naziv komponente	100 bar 40 °C (%)	300 bar 40 °C (%)	Redni broj	Naziv komponente	100 bar 40 °C (%)	300 bar 40 °C (%)
1.	α-pinen	0,03	0,09	41.	Undekanal	0,09	0,06
2.	Sabinen	-	0,04	42.	δ-elemen	0,31	0,4
3.	β-pinen	0,03	0,1	43.	p-menta-1,8-dien-1,2-diol	-	-
4.	Heksanska kiselina	0,05	0,03	44.	α-kubeben	0,11	0,08
5.	β-mircen	0,13	0,54	45.	Citronelil acetat	0,24	0,15
6.	Oktanal	-	0,04	46.	(E)-9-hidroksilinalool	-	-
7.	α-terpinen	-	0,04	47.	Neril acetat	0,43	0,28
8.	p-cimen	0,04	-	48.	α-kopaen	1,46	0,89
9.	Limonen	13,16	30,65	49.	Geranil acetat	0,72	0,45
10.	Benzil-alkohol	-	-	50.	β-kubeben	1,26	0,78
11.	(Z)-β-ocimen	0,02	0,05	51.	β-elemen	0,99	0,86
12.	γ-terpinen	1,75	3,69	52.	Dodekanal	0,23	0,13
13.	cis-sabinen hidrat	0,11	0,16	53.	trans-kariofilen	0,9	0,54
14.	Oktan-1-ol	-	0,01	54.	α-guaien	0,38	0,24
15.	cis-linalool oksid	-	-	55.	α-humulen	1,58	0,95
16.	Heptanska kiselina	-	-	56.	Germakren D	6,66	4,11
17.	α-terpinolen	0,17	0,32	57.	Valencen	0,51	0,3
18.	trans-linalool oksid	-	-	58.	biciklogermakren	1,06	0,62
19.	Linalool	2,18	1,58	59.	α-muurolen	0,63	-
20.	Nonanal	0,07	0,06	60.	Eremofilen	6,7	3,99
21.	2-fenil-etanol	-	-	61.	α-farnezen	10,63	5,72
22.	trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	-	0,02	62.	γ-kadinen	2,21	1,38
23.	cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	-	-	63.	Elemol	0,09	0,11
24.	trans-limonen oksid	0,02	0,02	64.	Germakren B	1,11	0,69
25.	Citronelal	0,11	0,1	65.	Dodekanska kiselina	0,34	0,32
26.	Terpinen-4-ol	0,22	0,16	66.	t-Muurulol	0,07	0,06

27.	Oktanska kiselina	0,08	0,05		67.	3-okso- α -ionol	-	-
28.	α -terpineol	2,1	1,31		68.	α -sinensal	0,08	0,05
29.	Dekanal	0,53	0,37		69.	Tetradekanska kiselina	2,42	1,56
30.	trans-karveol	0,17	0,11		70.	Neofitadien	-	-
31.	β -citronelol	0,19	0,13		71.	Nootkaton	0,14	0,13
32.	Karvon	0,03	0,02		72.	Heksahidrofarnesil aceton	-	-
33.	trans-geraniol	0,08	0,05		73.	6,7-Dimetoksi-kumarin	-	-
34.	Izopiperitenon	-	-		74.	Heksadekanska kiselina	8,39	8,6
35.	Perila aldehid	0,43	0,3		75.	Oktadekan-1-ol	0,18	0,17
36.	Nononska kiselina	0,08	0,06		76.	Heptadekanska kiselina	0,19	0,4
37.	p-menta-1,8-dien-9-ol	0,23	0,15		77.	Linoleinska kiselina	15,44	19,04
38.	Timol	0,09	0,08		78.	Oleinska kiselina	2,87	-
39.	Perila alkohol	-	-		79.	Oktadekanska kiselina	1,27	1,38
40.	Karvakrol	0,19	0,12					

Dominantna komponenta u dobivenim SC-CO₂ ekstraktima je limonen (13,16 – 30,65 %) koji je karakteristični citrusni monoterpen, kao i linalool (2,18 – 1,58 %). Linalool je oksigenirani terpen kore citrusa i njegova prisutnost u višim koncentracijama pokazatelj je dobre kvalitete ekstrakata dobivenih iz kora citrusa. Još jedan predstavnik oksigeniranih monoterpena je α -terpineol (1,31 – 2,10 %). Prisutnost ovog terpena u niskim koncentracijama potvrđuje dobru kvalitetu ekstrakata, njegova koncentracija raste termičkom obradom (Jokić i sur., 2019).

Valencen je jedan od najvažnijih predstavnika seskviterpena, njegova prisutnost različita je u različitim vrstama citrusnog voća. Valencen je prisutan u kutikularnom vosku naranči i pridonosi mirisu koji zaostaje na rukama nakon dodirivanja voća (Jokić i sur., 2019). Ostali seskviterpeni prisutni u ekstraktima koji pridonose karakterističnoj aromi citrusa su: α -humulen (0,95 – 1,58 %), γ -kadinen (1,38 – 2,21 %), trans-kariofilen (0,54 – 0,90 %) i α -sinensal (0,05 – 0,08 %) i farnezen (5,72 – 10,63 %).

Osim terpena, najvažnije komponente arome su određeni aldehidi kao što su oktanal (0 – 0,04 %) i dekanal (0,37 – 0,53 %). Ovi aldehidi zajedno s linaloolom čine najvažnije hlapljive komponente kore citrusa. Ukupan sadržaj aldehida citrusa raste sazrijevanjem voća i zbog toga se sadržaj aldehida koristi kao komercijalni pokazatelj kvalitete (Jokić i sur., 2019).

Masne kiseline poput heksadekanske (8,39 – 8,60 %), linoleinske (15,44 – 19,04 %) i oleinske (0 – 2,87 %) kiseline također su prisutne u dobivenim ekstraktima. Ovi spojevi nisu važne komponente citrusne arome voća.

Ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima tlaka kao parametra koji ima najveći utjecaj u procesu superkritične CO₂ ekstrakcije. Povećanjem tlaka sa 100 na 300 bar povećava se topljivost limonena u nepolarnom otapalu, njegov udio raste s 13,16 % na 30,36 %. Udio linaloola i udio aldehida (nonanal, dekanal) se povećanjem tlaka smanjuje. U ekstraktima dobivenim pri 100 bar veći je udio određenih seskviterpena (valencen, α -humulen, γ -kadinen, trans-kariofilen, α -sinensal i farnezen) nego u ekstraktima dobivenim pri 300 bar. Pri tlaku od 300 bar bilježi se veća topljivost masnih kiselina (heksadekanska, heptadekanska, linoleinska) u CO₂ nego pri tlaku od 100 bar.

Nadalje, odmaščena kora mandarine nakon SC-CO₂ ekstrakcije, korištena je za daljnju ekstrakciju polarnijih komponenti subkritičnom vodom te je za isti postupak odrađeno modeliranje i optimiranje procesa primjenom metode odzivnih površina. Pomoću HPLC-DAD uređaja detektirana je značajna prisutnost sljedećih spojeva u SWE ekstraktima: HMF, hesperidin, narirutin, rutin, kaempferol-3-O-rutinozid i klorogenska kiselina. Rezultati su izraženi kao mg/g biljke i prikazani u **Tablici 7**. Redni broj uzorka ekvivalentan je rednom broju uzorka prikazanom u **Tablici 5** u eksperimentalnom dijelu rada dobiven BBD.

Tablica 7 Vrijednosti udjela HMF-a, hesperidina, narirutina, rutina, kaempferol-3-O-rutinozida i klorogenske kiseline u ekstraktima dobivenim pri različitim uvjetima SWE

Broj uzorka (BBD)*	HMF (mg/g biljke)	Hesperidin (mg/g biljke)	Narirutin (mg/g biljke)	Rutin (mg/g biljke)	Kaempferol-3-O-rutinozid (mg/g biljke)	Klorogenska kiselina (mg/g biljke)
1.	4,68	9,28	3,65	3,14	0,17	0,27
2.	4,32	8,56	1,05	0,89	0,05	1,90
3.	0,01	9,19	3,83	1,31	1,42	0,28
4.	10,08	0,19	0,09	0,19	0,66	58,93
5.	9,48	14,89	4,27	3,91	0,88	8,69
6.	6,48	10,52	3,63	3,03	0,62	3,62
7.	5,38	1,15	0,03	0,80	0,32	21,26
8.	0,00	11,25	4,87	1,04	0,82	0,00
9.	0,00	3,66	1,99	0,52	0,23	0,08

10.	7,83	15,07	4,72	4,21	0,16	0,28
11.	3,67	5,28	1,91	1,68	0,08	0,79
12.	6,18	9,61	3,44	2,94	0,09	1,98
13.	6,02	11,23	3,38	2,81	0,42	1,84
14.	6,39	0,16	0,08	0,18	0,07	54,48
15.	0,03	7,34	3,76	1,04	0,70	0,29
16.	6,41	11,99	5,11	4,27	0,17	9,10
17.	14,33	0,35	0,11	0,26	0,11	68,58

*Procesni uvjeti za redni broj uzorka tj. ekstrakta dobivenog SWE prikazani su u Tablici 5 (eksperimentalni dio rada)

Vrijednosti koncentracije **HMF-a** kretale su se od 0,00 mg/g biljke do 14,33 mg/g biljke. Najveće koncentracije uočene su u uzorku br. 17 (temperatura ekstrakcije 220 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min, omjer tekuće/kruto 30 ml/g), a najniže u uzorcima br. 8 (temperatura ekstrakcije 130 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min, omjer tekuće/kruto 20 ml/g) i br. 9 (temperatura ekstrakcije 130 °C, vrijeme ekstrakcije 10 minuta, omjer tekuće/kruto 10 ml/g). Koncentracije HMF-a veće su u uzorcima čija je ekstrakcija provedena pri višim temperaturama. Pri temperaturi 130 °C njegova koncentracija je zanemariva. Značajnije koncentracije HMF-a pojavile su se pri temperaturi ekstrakcije od 175 °C, a najviše HMF-a je detektirano pri 220 °C. Prema Lachos-Perez i sur. (2018) tijekom SWE komponente kore mandarine mogu međusobno reagirati pa često nastaju novi spojevi. Pri visokim temperaturama dolazi do Maillardovih reakcija. To su reakcije neenzimskog posmeđivanja, a odvijaju se između karbonilnih skupina reducirajućih šećera i amino skupina aminokiselina. Produkti ovih reakcija imaju tamniju boju i uzrokuju posmeđivanje ekstrakata. Reakcije posmeđivanja odvijaju se intenzivnije s povećanjem temperature. Zbog njihove visoke koncentracije u kori mandarine, šećeri reagiraju s oksonijevim i hidroksidnim ionima i nastaju reducirajući šećeri. Naime, dokazano je da HMF nastaje kao produkt termalne razgradnje prilikom reakcija neenzimskog posmeđivanja, a zbog svoje potencijalne toksičnosti, ovaj spoj predmet je brojnih istraživanja (Czerwonka i sur., 2020).

Koncentracija **hesperidina** detektirana je od 0,16 mg/g biljke do 15,07 mg/g biljke. Nadalje, najmanje koncentracije uočene su u uzorku br. 14 (temperatura ekstrakcije 220 °C, vrijeme

ekstrakcije 15 min, tekuće/kruto 20 ml/g), a najveće u uzorku br. 10 (temperatura ekstrakcije 175 °C, vrijeme ekstrakcije 5 min, omjer tekuće/kruto 30 ml/g). Koncentracija hesperidina znatno je veća u uzorcima čija se ekstrakcija provodila pri 130 °C i 175 °C, nego pri 220 °C pa se može zaključiti da se hesperidin potencijalno razgrađuje na temperaturama višim od 175 °C. Na prisutnu koncentraciju hesperidina utječe i omjer tekuće/kruto, s povećanjem omjera tekuće/kruto raste i njegova koncentracija. Prema Lachos-Perez i sur. (2018) povećanjem temperature ekstrakcije povećava se topljivost flavanona. Istovremeno dolazi do smanjenja polarnosti vode pa se tako povećava i koncentracija ekstrahiranog hesperidina i narirutina. Kako se temperatura povećava, dielektrična konstanta vode se smanjuje i manje polarne komponente postaju topljivije. Cheigh i sur., (2012) bilježe najveći prinos hesperidina (72 ± 5 mg/g biljke) pri temperaturi ekstrakcije od 160 °C. U tom istraživanju ekstrakti su dobiveni pomoću SWE i analizirani HPLC metodom. 1 g kore mandarine (*Citrus unshiu*) pomiješan je s dijatomejskom zemljom u omjeru 1:2 i stavljen s otapalom u ekstraktor volumena 34 ml. Ekstrakcija je provedena pri temperaturama od 110 °C do 220 °C, pod visokim tlakom (100 ± 10 atm) i vremenu od 5 do 20 minuta.

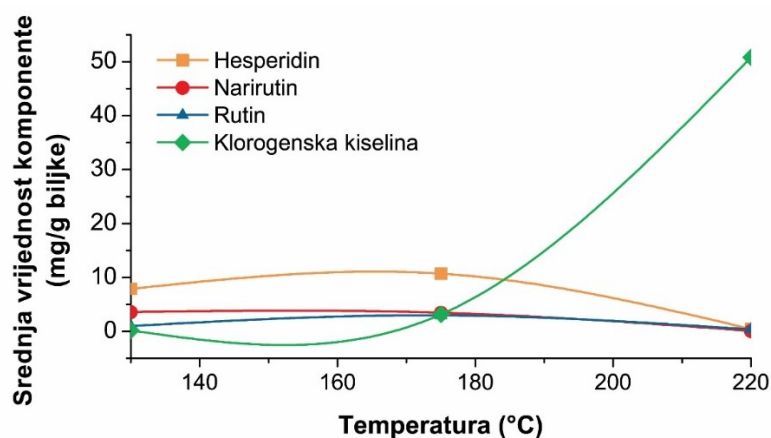
Koncentracija **narirutina** određena je u rasponu od 0,03 mg/g biljke do 5,11 mg/g biljke. Najniže koncentracije uočene su u uzorku br. 7 (temperatura ekstrakcije 220 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min, omjer tekuće/kruto 10 ml/g), a najviše u uzorku br. 16 (temperatura ekstrakcije 175 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min, omjer tekuće/kruto 20 ml/g). Pri temperaturama od 220 °C koncentracije narirutina zanemarive su što ukazuje na moguću termolabilnost ovog spoja pri toj temperaturi. S porastom omjera tekuće/kruto bilježi se porast koncentracije narirutina. Cheigh i sur., (2012) bilježe najveći prinos narirutina ($11,7 \pm 0,8$ mg/g biljke) pri temperaturi ekstrakcije od 160 °C. SWE su provedene pri temperaturama ekstrakcije od 110 °C do 220 °C, pod visokim tlakom (100 ± 10 atm) i vremenu ekstrakcije od 5 do 20 minuta. Uzorci su pripremljeni miješanjem 1 g kore mandarine (*Citrus unshiu*) s dijatomejskom zemljom u omjeru 1:2 i stavljeni s otapalom u ekstraktor volumena 34 ml. Dobiveni ekstrakti analizirani su pomoću HPLC metode.

Koncentracija **rutina** detektirana je od 0,18 mg/g biljke do 4,27 mg/g biljke. Najniže koncentracije rutina detektirane su u uzorku br. 14 koji je pripremljen pri uvjetima ekstrakcije od 220 °C, 15 min i uz omjer tekuće/kruto 20 ml/g. Najviše koncentracije detektirane su u uzorku br. 16 koji je pripremljen pri uvjetima ekstrakcije od 175 °C, 10 min i uz omjer

tekuće/kruto 20 ml/g. Ovo upućuje na moguću razgradnju rutina pri dužim ekstrakcijama na temperaturama višim od 175 °C. S povećanjem omjera tekuće/kruto raste i koncentracija rutina u ekstraktima.

Kaempferol-3-O-rutinozid detektiran je u rasponu od 0,05 mg/g biljke do 1,42 mg/g biljke. Gdje je najmanja koncentracija u uzorku br. 2 (temperatura ekstrakcije 175 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min, omjer tekuće/kruto 10 ml/g), a najveća u uzorku br. 3 (temperatura ekstrakcije 130 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min i omjer tekuće/kruto 30 ml/g). Najniže koncentracije ovog spoja detektirane su pri temperaturama ekstrakcije od 175 °C što ukazuje na njegovu moguću termalnu razgradnju u rasponu od 130 °C do 175 °C. Veći omjer tekuće/kruto otapala utjecao je na porast koncentracije kaempferol-3-O-rutinozida.

Detektirane vrijednosti koncentracije **klorogenske kiseline** u pripremljenim ekstraktima kretale su se od 0,00 mg/g biljke do čak 54,48 mg/g biljke. Najniže koncentracije klorogenske kiseline zabilježene su kod uzorka br. 8 (temperatura ekstrakcije 130 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min, omjer tekuće/kruto 20 ml/g), a najviše kod uzorka br. 14 (temperatura ekstrakcije 220 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min, omjer tekuće/kruto 20 ml/g). Pri temperaturama ekstrakcije od 130 °C, koncentracija klorogenske kiseline zanemariva je. Klorogenska kiselina detektirana je tek pri temperaturi od 175 °C, a najviše koncentracije detektirane su tek pri 220 °C što ukazuje na to da je moguće da klorogenska kiselina nastaje kao međuprodukt termalne razgradnje kemijskih komponenti. **Slika 19** prikazuje utjecaj temperature na udio triju najzastupljenijih flavonoida u ekstraktima iskazanu kao srednju vrijednost dobivenih koncentracija te ovisnost koncentracije klorogenske kiseline s povećanjem temperature.



Slika 19 Utjecaj temperature na najzastupljenije bioflavonoide u kori mandarine i na prisutnost klorogenske kiseline u analiziranim ekstraktima

Spektrofotometrijskim metodama određeni su ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost u dobivenim ekstraktima. Njihove vrijednosti prikazane su u **Tablici 8** prema BBD danom u **Tablici 5**.

Tablica 8 Vrijednosti ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima dobivenim pri različitim procesnim uvjetima SWE

Broj uzorka (BBD)*	Ukupni fenoli (mg GAE/g biljke)	DPPH (%)
1.	54,39 ± 0,63	94,55 ± 1,32
2.	43,57 ± 1,20	93,14 ± 0,64
3.	19,50 ± 1,90	39,51 ± 4,34
4.	38,49 ± 1,67	93,04 ± 0,69
5.	48,24 ± 2,27	95,28 ± 0,37
6.	47,57 ± 4,16	93,87 ± 0,53
7.	27,44 ± 4,69	86,91 ± 0,61
8.	22,60 ± 0,89	16,74 ± 5,34
9.	15,80 ± 1,32	11,14 ± 5,32
10.	49,55 ± 3,22	93,53 ± 1,22
11.	47,55 ± 2,69	93,43 ± 0,88
12.	46,75 ± 4,82	92,75 ± 0,55
13.	45,60 ± 7,29	91,82 ± 1,01
14.	35,98 ± 0,42	91,82 ± 0,53
15.	18,44 ± 1,86	11,78 ± 4,13
16.	49,62 ± 4,10	91,87 ± 0,30
17.	49,73 ± 1,59	93,87 ± 0,81

*Procesni uvjeti za redni broj uzorka tj ekstrakta dobivenom SWE prikazani su u Tablici 5 (eksperimentalni dio rada)

Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteu. Rezultati su izraženi u mg GAE/g biljke, a prikazane su i njihove standardne devijacije. Usporedbom rezultata s kalibracijskim pravcem za galnu kiselinu utvrđeno je da je najmanji udio ukupnih fenola u uzorku br. 9 i iznosio je 15,80 ± 1,32 mg GAE/g biljke (uvjeti ekstrakcije: 130 °C, 5 min, 20 ml/g). Najveći je udio

ukupnih fenola u uzorku br. 1 i iznosio je $54,39 \pm 0,63$ (uvjeti ekstrakcije: 175 °C, 10 min, 20 ml/g). Najviše udjele ukupnih fenola uočavamo pri uvjetima ekstrakcije od 175 °C, a najmanje pri uvjetima od 130 °C. Kada temperatura ekstrakcije prelazi 175 °C ukupni se fenoli smanjuju pa tako i uzorci ekstrahirani pri 220 °C imaju manje ukupne fenole od onih ekstrahiranih pri 175 °C. Jedan je od mogućih uzroka takve pojave termalna razgradnja fenola. Porastom omjera tekuće/kruto blago rastu i ukupni fenoli. Lachos-Perez i sur., (2018) došli su do zaključka da je temperatura jedan od važnijih čimbenika koji utječu na ekstrakciju ukupnih fenola pomoću SWE. Pri višim temperaturama raste njihova topljivost, povećava se prijenos mase i molekularna difuzija. Istovremeno dolazi do smanjenja napetosti površina i viskoznosti pa je bolja reakcija između otapala i otopljenih tvari. Kim i sur., (2009) su povećanjem temperature tijekom SWE sa 100 °C na 150 °C došli do povećanja ukupnih fenola s 84,4 mM na 204,9 mM.

Pomoću jednadžbe (8) dobivene su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti koje su izražene u postotcima. Vrijednosti su se kretale od $11,14 \pm 5,32$ % do $95,28 \pm 0,37$ %. Najmanja vrijednost određena je u uzorku br. 9. (temperatura ekstrakcije 130 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min, omjer tekuće/kruto 10 ml/g), a najviša vrijednost u uzorku br. 5 (temperatura ekstrakcije 175 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min, omjer tekuće/kruto 30 ml/g). Najmanju antioksidacijsku aktivnost imali su uzorci čija se ekstrakcija provodila pri temperaturi od 130 °C, a najveću pri temperaturi od 175 °C. Povećanjem temperature povećava se antioksidacijska aktivnost što se jasno uočava pri uvjetima ekstrakcije od 175 °C i 220 °C. Maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti postignuta je pri 175 °C. Daljnjim porastom temperature antioksidacijska aktivnost počinje opadati te se pri uvjetima ekstrakcije od 220 °C bilježi ponovni pad antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijskoj aktivnosti najvjerojatnije pogoduju složeniji i jednostavniji polifenoli te mogući produkti razgradnje kemijskih komponenti. Prema Lachos-Perez i sur. (2018) visoke temperature pridonose većoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata, ali pri temperaturama višim od 160 °C dolazi do razgradnje hesperidina i narirutina, spojeva koji su glavni nositelji antioksidacijske aktivnosti.

Ispitana je korelacija između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti koja je iznosila 0,88. Koeficijent linearne korelacije (R^2) između ovih vrijednosti iznosio je 0,78 što znači da između ovih veličina postoji linearna ovisnost.

4.1. OPTIMIRANJE PROCESA SWE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KORE MANDARINE (*Citrus unshiu*) PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

Aproksimacijom eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, tj. polinomom drugog reda prema izrazu (4) ispitan je utjecaj nezavisnih varijabli SWE (temperatura, vrijeme i omjer tekuće/kruto) na zavisne varijable te je provjerena prikladnost primijenjenog Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije. Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisnih i nezavisnih varijabli pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora. Model za svaku zavisnu varijablu napisan je posebno.

Tablica 9 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za koncentraciju HMF-a

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	241,09	9	26,79	23,29	0,0002
X_1 - temperatura	163,24	1	163,24	141,91	<0,0001
X_2 - vrijeme	0,2552	1	0,2552	0,22	0,6520
X_3 - omjer tekuće/kruto	41,72	1	41,72	36,27	0,0005
X_1X_2	3,35	1	3,35	2,91	0,1316
X_1X_3	19,95	1	19,95	17,35	0,0042
X_2X_3	0,25	1	0,25	0,22	0,6553
X_1^2	10,93	1	10,93	9,50	0,0177
X_2^2	0,20	1	0,20	0,17	0,6886
X_3^2	1,45	1	1,45	1,26	0,2984
OSTATAK	8,05	7	1,15		
NEDOSTATAK MODELA	5,88	3	1,96	3,60	0,1238
POGREŠKA	2,18	4	0,5439		
UKUPNO	249,15	16			
R^2	0,9677				

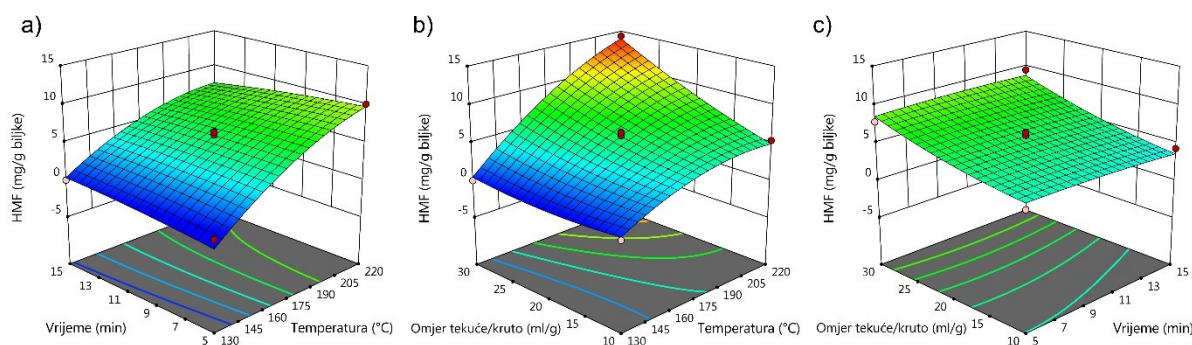
f-vrijednost modela (23,29) ukazuje na to da je model značajan. Iz **Tablice 9** vidljivo je da p-vrijednost ovog regresijskog modela iznosi 0,0002. Ukoliko je p-vrijednost manja od 0,05 to znači da su uvjeti modela značajni, odnosno da postoji statistički značajna veza između nezavisnih varijabli i odziva. Upravo ta p-vrijednost ukazuje na to da od nezavisnih varijabli, temperatura (X_1) i omjer tekuće/kruto (X_3) statistički značajno utječu na odziv, što je u ovom

slučaju koncentracija HMF-a, a vrijeme ekstrakcije (X_2) nema statistički značajnog utjecaja na promatrani odziv. Interakcija parametara X_1X_3 ima statistički značajan utjecaj na udio HMF-a, dok interakcija parametara X_1X_2 i X_2X_3 nije statistički značajna. Kvadratni član modela X_1^2 koji se odnosi na temperaturu također je pokazao statistički značajan utjecaj na koncentraciju HMF-a. Vrijednost R^2 za promatrani odziv iznosi 0,9677, što znači da primijenjeni regresijski model odgovara eksperimentalno predviđenim podacima. Na **Slici 20** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto) na zavisnu varijablu (koncentracija HMF).

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje koncentracije HMF-a kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za HMF:

$$HMF = 5,95 + 4,52X_1 - 0,1786X_2 + 2,28X_3 - 1,61X_1^2 - 0,2184X_2^2 + 0,5871X_3^2 - 0,9153X_1X_2 + 2,23X_1X_3 + 0,25X_2X_3$$



Slika 20 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na koncentraciju HMF-a (Izvor: autor)

Tablica 10 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za koncentraciju hesperidina

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	371,66	9	41,30	10,61	0,0026
X_1 - temperatura	109,44	1	109,44	28,11	0,0011
X_2 - vrijeme	6,10	1	6,10	1,57	0,2510
X_3 - omjer tekuće/kruto	54,30	1	54,30	13,95	0,0073
X_1X_2	3,87	1	3,87	0,9942	0,3519
X_1X_3	10,05	1	10,05	2,58	0,1522

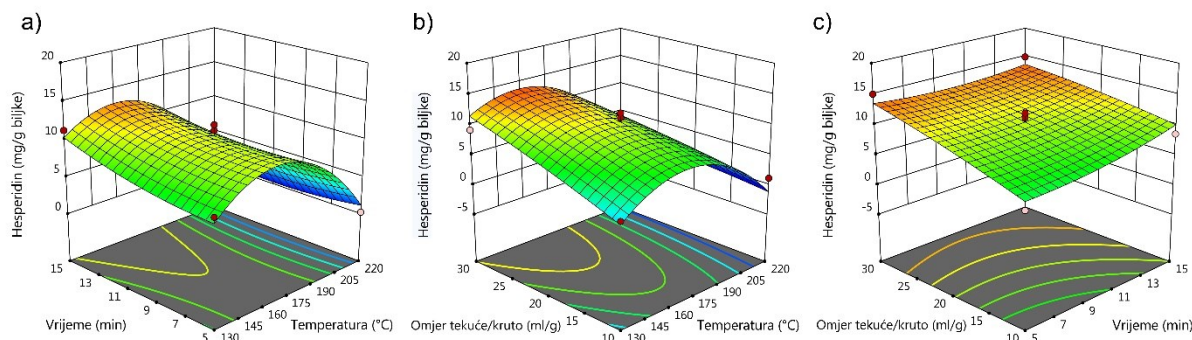
X_2X_3	2,98	1	2,98	0,7649	0,4108
X_1^2	182,13	1	182,13	46,78	0,0002
X_2^2	2,59	1	2,59	0,6663	0,4412
X_3^2	0,55	1	0,5538	0,1422	0,7172
OSTATAK	27,26	7	3,89		
NEDOSTATAK MODELA	22,23	3	7,41	5,90	0,0597
POGREŠKA	5,03	4	1,26		
UKUPNO	398,91	16			
R^2	0,9317				

Iz **Tablice 10** vidljivo je da f -vrijednost modela iznosi 10,61 što ukazuje na to da je model značajan. p -vrijednost ovog regresijskog modela manja je od 0,05 što znači da postoji značajna veza između nezavisnih varijabli i odziva. Temperatura (X_1) i omjer tekuće/kruto (X_3) statistički značajno utječu na promatrani odziv, a vrijeme ekstrakcije (X_2) ne utječe statistički značajno na koncentraciju hesperidina u dobivenim ekstraktima. Interakcija parametara nema statistički značajan utjecaj na odziv. Kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu (X_1^2) također pokazuje statistički značajan utjecaj na koncentraciju hesperidina. R^2 iznosi 0,9317 što ukazuje na to da regresijski model odgovara eksperimentalno predviđenim podacima. Na **Slici 21** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto) na zavisnu varijablu (koncentracija hesperidina).

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje koncentracije hesperidina kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za hesperidin:

$$HESPERIDIN = 10,53 - 3,7X_1 + 0,873X_2 + 2,61X_3 - 6,58X_1^2 + 0,7849X_2^2 - 0,3627X_3^2 - 0,9838X_1X_2 - 1,58X_1X_3 - 0,8629X_2X_3$$



Slika 21 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na koncentraciju hesperidina (Izvor: autor)

Tablica 11 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za koncentraciju narirutina

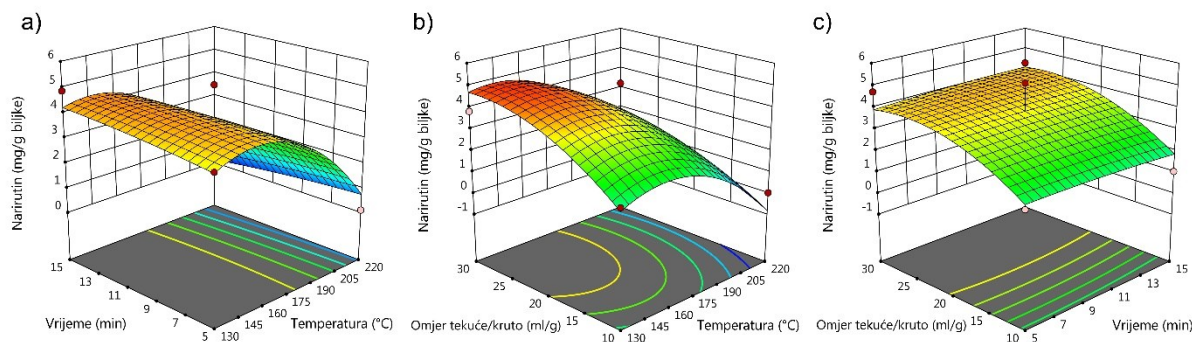
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	<i>f</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
Model	47,72	9	5,30	6,35	0,0118
X_1 - temperatura	24,99	1	24,99	29,90	0,0009
X_2 - vrijeme	0,0058	1	0,0058	0,0069	0,9362
X_3 - omjer tekuće/kruto	7,90	1	7,90	9,45	0,0180
X_1X_2	0,3102	1	0,3102	0,3712	0,5616
X_1X_3	0,7676	1	0,7676	0,9187	0,3696
X_2X_3	0,0436	1	0,0436	0,0522	0,8258
X_1^2	10,36	1	10,36	12,40	0,0097
X_2^2	0,0239	1	0,0239	0,0286	0,8705
X_3^2	2,58	1	2,58	3,09	0,1221
OSTATAK	5,85	7	0,8356		
NEDOSTATAK MODELA	3,79	3	1,26	2,46	0,2026
POGREŠKA	2,06	4	0,5142		
UKUPNO	53,57	16			
R^2	0,8908				

f-vrijednost modela pokazuje da je model značajan. Iz *p*-vrijednosti (**Tablica 11**) vidljivo je da postoji značajna veza između nezavisnih varijabli i odziva. U tom smislu statistički značajne nezavisne varijable su one čija je *p*-vrijednost manja od 0,05. U ovom slučaju to su: temperatura ekstrakcije (X_1), omjer tekuće/kruto (X_3) i kvadratna vrijednost temperature (X_1^2). Ostale vrijednosti nemaju statistički značajan utjecaj na promatrani odziv. Koeficijent korelacije R^2 iznosi 0,8908 i pokazuje slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Na **Slici 22** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto) na zavisnu varijablu (koncentracija narirutina).

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje koncentracije narirutina kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za narirutin:

$$NARIRUTIN = 3,84 - 1,77X_1 - 0,0268X_2 + 0,9936X_3 - 1,57X_1^2 - 0,0753X_2^2 - 0,7832X_3^2 - 0,2785X_1X_2 - 0,4381X_1X_3 + 0,1045X_2X_3$$



Slika 22 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na koncentraciju narirutina (Izvor: autor)

Tablica 12 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za koncentraciju rutina

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	<i>f</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
Model	29,11	9	3,23	4,36	0,0325
X_1 - temperatura	0,7642	1	0,7642	1,03	0,3437
X_2 - vrijeme	0,1556	1	0,1556	0,21	0,6607
X_3 - omjer tekuće/kruto	4,20	1	4,20	5,67	0,0489
X_1X_2	0,00	1	0,00	0,00	0,9964
X_1X_3	0,4424	1	0,4424	0,5969	0,4650
X_2X_3	0,0605	1	0,0605	0,0817	0,7833
X_1^2	22,01	1	22,01	29,70	0,0010
X_2^2	0,4767	1	0,4767	0,6432	0,4489
X_3^2	0,2183	1	0,2183	0,2946	0,6042
OSTATAK	5,19	7	0,7411		
NEDOSTATAK MODELA	3,79	3	1,26	3,61	0,1233
POGREŠKA	1,40	4	0,3496		
UKUPNO	34,29	16			
R^2	0,8487				

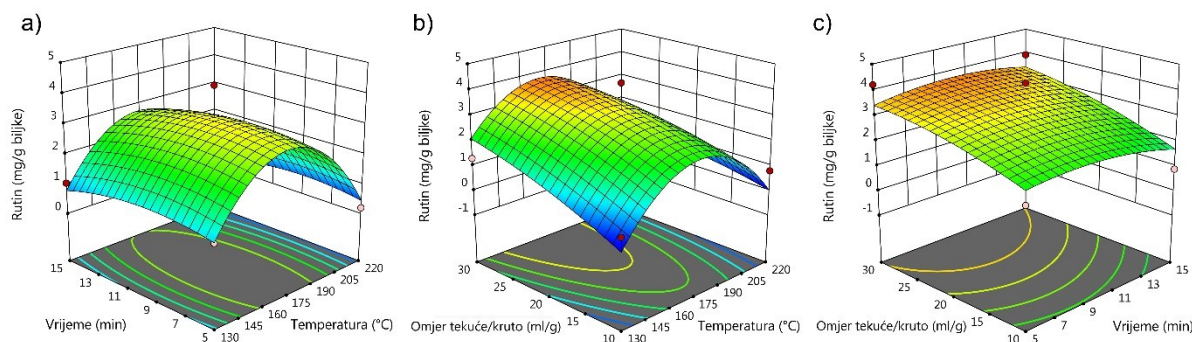
Iz **Tablice 12** vidljivo je da *f*-vrijednost modela iznosi 4,36, što znači da je model značajan. *p*-vrijednost ovog regresijskog modela iznosi 0,0325. Ta je vrijednost manja od 0,05 što ukazuje na to da postoji značajna veza između nezavisnih varijabli i odziva. Statistički značajna nezavisna varijabla je omjer tekuće/kruto (X_3), a temperatura (X_1) i vrijeme ekstrakcije (X_2) nisu. Interakcije parametara nemaju statistički značajnog utjecaja na promatrani odziv. Kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu (X_1^2) također pokazuje statistički

značajan utjecaj na koncentraciju rutina. f -vrijednost nedostatka modela iznosi 3,61 i pokazuje nam da nedostatak modela nije statistički značajan. Koeficijent korelacije R^2 iznosi 0,8487 i pokazuje slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Na **Slici 23** prikazan je 3D dijagram utjecaja procesnih parametara (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto) na zavisnu varijablu (koncentracija rutina).

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje koncentracije rutina kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za rutin:

$$RUTIN = 3,24 - 0,3091X_1 - 0,1395X_2 + 0,7244X_3 - 2,29X_1^2 - 0,3365X_2^2 - 0,2277X_3^2 - 0,002X_1X_2 - 0,3326X_1X_3 + 0,123X_2X_3$$



Slika 23 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na koncentraciju rutina (Izvor: autor)

Tablica 13 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne fenole

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f -vrijednost	p -vrijednost
Model	2549,52	9	283,28	20,68	0,0003
X_1 - temperatura	708,82	1	708,82	51,75	0,0002
X_2 - vrijeme	1,66	1	1,66	0,1209	0,7383
X_3 - omjer tekuće/kruto	133,28	1	133,28	9,73	0,0169
X_1X_2	11,11	1	11,11	0,8112	0,3977
X_1X_3	86,35	1	86,35	6,30	0,0403
X_2X_3	1,78	1	1,78	0,1299	0,7291
X_1^2	1580,53	1	1580,53	115,40	< 0,0001
X_2^2	0,2988	1	0,2988	0,0218	0,8867
X_3^2	4,44	1	4,44	0,3244	0,5868
OSTATAK	95,88	7	13,70		

NEDOSTATAK MODELA	61,49	3	20,50	2,38	0,2101
POGREŠKA	34,39	4	8,60		
UKUPNO	2645,40	16			
R ²	0,9638				

Na osnovu p -vrijednosti iz **Tablice 13** ($p < 0,05$) vidljivo je da je model za ukupne fenole značajan. Temperatura (X_1), omjer tekuće/kruto (X_3) i interakcija ovih parametara (X_1X_3) imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odziv (ukupni fenoli). Kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu (X_1^2) također je pokazao statistički značajan utjecaj na odziv. Ostale kvadratne vrijednosti nisu pokazale statistički značajan utjecaj. R^2 iznosi 0,9638. To nam govori da ovaj regresijski model odgovara eksperimentalno predviđenim podacima. Značajan utjecaj tekuće/kruto omjera može se objasniti da veća količina otapala može prodrijeti u stanice biljnog materijala i na taj način je i veći prijenos fenola u samo otapalo. Na **Slici 24** (b) prikazan je 2D dijagram ovisnosti temperature ekstrakcije o ukupnim fenolima.

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje ukupnih fenola kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za ukupne fenole:

$$UKUPNI FENOLI = 48,52 + 9,41X_1 - 0,4550X_2 + 4,08X_3 - 19,37X_1^2 - 0,2664X_2^2 - 1,03X_3^2 - 1,67X_1X_2 + 4,65X_1X_3 + 0,667X_2X_3$$

Tablica 14 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za antioksidacijsku aktivnost

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	16310,37	9	1812,26	43,52	< 0,0001
X_1 - temperatura	10258,28	1	10258,28	246,36	< 0,0001
X_2 - vrijeme	3,39	1	3,39	0,0814	0,7837
X_3 - omjer tekuće/kruto	176,41	1	176,41	4,24	0,0786
X_1X_2	9,55	1	9,55	0,2293	0,6466
X_1X_3	114,61	1	114,61	2,75	0,1411
X_2X_3	1,04	1	1,04	0,0251	0,8786
X_1^2	5704,10	1	5704,10	136,99	< 0,0001
X_2^2	2,84	1	2,84	0,0682	0,8015
X_3^2	57,40	1	57,40	1,38	0,2787
OSTATAK	291,47	7	41,64		

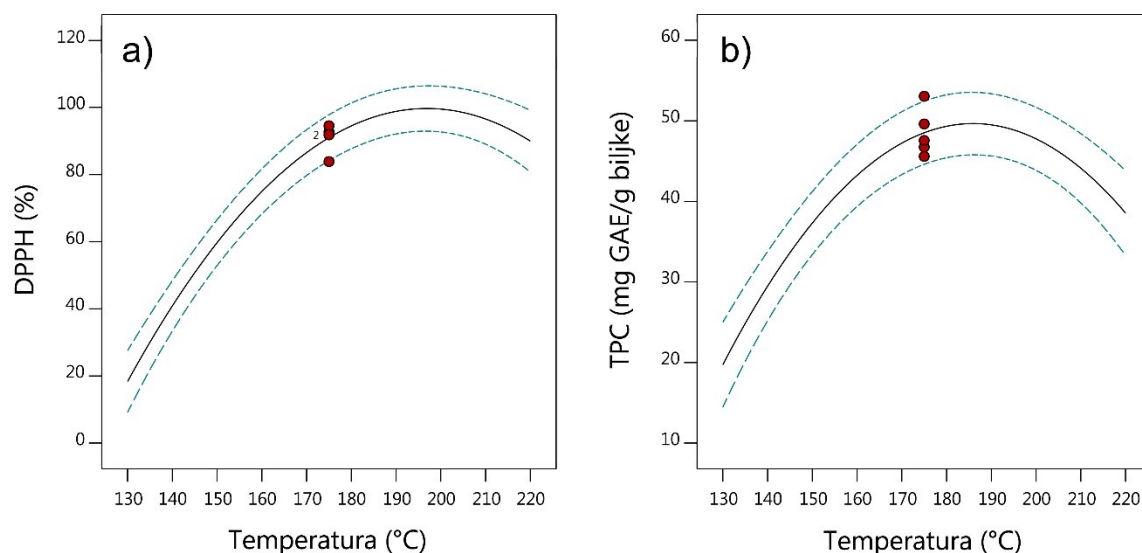
NEDOSTATAK MODELA	223,52	3	74,51	4,39	0,0936
POGREŠKA	67,96	4	16,99		
UKUPNO	16601,84	16			
R ²	0,9824				

Iz **Tablice 14** vidljivo je da je p -vrijednost modela manja od 0,05 što znači da su uvjeti modela značajni. U tom slučaju, od nezavisnih varijabli (temperatura, vrijeme, omjer tekuće/kruto) statistički značajna je samo temperatura (X_1). Niti jedna od tri interakcije parametara nema statistički značajnog utjecaja na promatrani odziv. Kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu (X_1^2) također je pokazao statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. R² iznosi 0,9824 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima. Na **Slici 24** (a) prikazan je 2D dijagram ovisnosti temperature ekstrakcije o antioksidacijskoj aktivnosti.

Prikazan je i model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) koji se koristi za izražavanje antioksidacijske aktivnosti kao funkcije nezavisnih varijabli.

Model u kodiranim vrijednostima za antioksidacijsku aktivnost:

$$\text{ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST} = 90,97 + 35,81X_1 + 0,6509X_2 + 4,7X_3 - 36,81X_1^2 - 0,8212X_2^2 + 3,69X_3^2 - 1,55X_1X_2 - 5,35X_3 + 0,5109X_2X_3$$



Slika 24 2D prikaz ovisnosti temperature o odzivu: a) antioksidacijska aktivnost te b) ukupni fenoli (Izvor: autor)

Posljednji korak metode odzivnih površina je optimizacija procesa. Cilj ovog istraživanja bio je pronaći odgovarajuće parametre ekstrakcije tj. temperaturu ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i omjer tekuće/kruto za dobivanje optimalnih vrijednosti udjela triju najzastupljenih bioflavonoida (hesperidina, narirutina i rutina) te antioksidacijske aktivnosti i ukupnih fenola u ekstraktima. Optimizacija je jedan od osnovnih alata u prehrambenoj industriji koji se koristi za poboljšanje procesa radi dobivanja proizvoda željenih komponenti i karakteristika. U ovom radu korištena je metoda koja se temelji na principu željene funkcije (eng. desirability function, D). Optimiranje se provodi tako da se promatrani odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, dok 1 predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv.

Uvjeti optimizacije su sljedeći:

- Maksimalan udio hesperidina (**Tablica 15**);
- Maksimalan udio narirutina (**Tablica 16**);
- Maksimalan udio rutina (**Tablica 17**);
- Maksimalna antioksidacijska aktivnost i udio ukupnih fenola (**Tablica 18**);

U **Tablicama 15-18** prikazani su uvjeti ekstrakcije pri kojima su zadovoljeni željeni uvjeti optimizacije. Ako ukupna željena funkcija ima vrijednost 1 ili vrijednost vrlo blisku 1 to nam govori da dobivene vrijednosti parametara predstavljaju najbolje moguće rješenje za željeni odziv.

Tablica 15 Optimalni uvjeti ekstrakcije (kriterij: maksimalan udio hesperidina)

Temperatura ekstrakcije	153,55 °C
Vrijeme ekstrakcije	15 min
Omjer tekuće/kruto	30 ml/g
Predviđeni udio hesperidina	15,058 mg/g biljke
Ukupna željena funkcija (D)	0,999
Dobiveno eksperimentom	15,12 ± 0,39 mg/g biljke

Tablica 16 Optimalni uvjeti ekstrakcije (kriterij: maksimalan udio narirutina)

Temperatura ekstrakcije	139,85 °C
Vrijeme ekstrakcije	15 min
Omjer tekuće/kruto	29,194 ml/g
Predviđeni udio narirutina	5,045 mg/g biljke
Ukupna željena funkcija (D)	0,987
Dobiveno eksperimentom	5,31 ± 0,40 mg/g biljke

Tablica 17 Optimalni uvjeti ekstrakcije (kriterij: maksimalan udio rutina)

Temperatura ekstrakcije	168,70 °C
Vrijeme ekstrakcije	9,88 min
Omjer tekuće/kruto	30 ml/g
Predviđeni udio narirutina	3,799 mg/g biljke
Ukupna željena funkcija (D)	0,879
Dobiveno eksperimentom	3,58 ± 0,54 mg/g biljke

Tablica 18 Optimalni uvjeti ekstrakcije (kriterij: maksimalna antioksidacijska aktivnost i maksimalan udio ukupnih fenola)

Kriterij	Temperatura ekstrakcije	Vrijeme ekstrakcije	Omjer tekuće/kruto	Predviđeni udio	Ukupna željena funkcija (D)	Dobiveno eksperimentom
DPPH	202,22 °C	14,82 min	18,025 ml/g	97,89 %	1	95,55 ± 0,50 %
Ukupni fenoli	190,03 °C	13,97 min	29,020 ml/g	53,256 mg GAE/g biljke	1	52,82 ± 0,30 mg GAE/g biljke

U konačnici, optimalne vrijednosti predviđene modelima dokazane se i eksperimentalno te je utvrđeno da su modeli adekvatni za optimizaciju procesa ekstrakcije unutar raspona pogreške

od $\pm 10\%$. Eksperimenti su odrađeni u triplikatu te su vrijednosti izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

5. ZAKLJUČCI

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

- Kora mandarine (*Citrus unshiu*) sirovina je bogata visokovrijednim bioaktivnim spojevima koji imaju niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje;
- SC-CO₂ i SWE pokazale su se kao povoljne zelene tehnike ekstrakcije za izdvajanje bioaktivnih komponenti iz kore mandarine;
- GC/MS analizom ekstrakata kore mandarine dobivenih SC-CO₂ uočena je najveća zastupljenost limonena;
- Box-Behnkenova metoda odzivnih površina pokazala se kao učinkovita metoda u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije;
- Prilikom SWE, temperatura ekstrakcije i omjer tekuće/kruto pokazali su se kao parametri koji statistički značajno utječu na kvalitetu dobivenih ekstrakata, dok se vrijeme ekstrakcije nije pokazalo kao statistički značajan parametar;
- Najviši udjeli hesperidina, narirutina, rutina te kaempferol-3-O-rutinozida dobiveni su pri temperaturi ekstrakcije od 175 °C. Zbog moguće termalne razgradnje, uzorci čija ekstrakcija je provedena pri 220 °C sadrže manje koncentracije ovih flavonoida od onih pri 175 °C;
- Najviše koncentracije klorogenske kiseline detektirane su pri 220 °C što ukazuje na to da je moguće da klorogenska kiselina nastaje kao međuprodukt termalne razgradnje pojedinih kemijskih komponenti;
- Najviši udjeli ukupnih fenola dobiveni su pri temperaturi ekstrakcije od 175 °C, a najmanji pri 130 °C. Pri temperaturi ekstrakcije od 220 °C sadržaj ukupnih fenola se smanjuje;
- Maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti postignuta je pri uvjetima ekstrakcije od 175 °C. Daljnjim porastom temperature antioksidacijska aktivnost počinje opadati te se pri uvjetima ekstrakcije od 220 °C bilježi ponovni pad antioksidacijske aktivnosti. Moguće je da do tog pada dolazi zbog toga što se pri temperaturama višim od 175 °C razgrađuju složeniji i jednostavniji polifenoli koji su nositelji antioksidacijske aktivnosti;

- Optimalni ekstrakcijski uvjeti, pri kojima dobivamo maksimalan udio hesperidina su: temperatura ekstrakcije 153,55 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min i omjer tekuće/kruto 30 ml/g. Maksimalan udio narirutina dobivamo pri uvjetima ekstrakcije od 139,85 °C, vrijeme ekstrakcije 15 min i omjer tekuće/kruto 29,194 ml/g, dok maksimalan udio rutina dobivamo pri uvjetima od 168,70 °C, vremenu ekstrakcije od 9,88 min te omjeru tekuće/kruto 30 ml/g. Maksimalnu antioksidacijsku aktivnost dobivamo pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: 202,22 °C, 14,82 min i omjeru tekuće/kruto 18,028 ml/g te maksimalan udio fenola pri 190,03 °C, 13,97 min i omjeru tekuće/kruto 29,020 ml/g;
- Ovo je istraživanje korisno jer ukazuje na mogućnost iskorištenja visokovrijednih komponenti iz kore mandarine, a istovremeno rješava financijski i ekološki problem stvaranja velike količine organskog otpada koji nastaje tijekom industrijske prerade mandarina.

6. LITERATURA

- Aydar A: Statistical Methods in Optimization of Food Materials. *European International Journal of Science and Technology*, Vol. 8, 3: 33-40, 2019.
- Berk Z: *Citrus Fruit Processing*, Academic Press, 2016. 9-47, 261-274, ISBN 9780128031339
- Bezzera MA, Santelli RE, Oliviera EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965-977, 2008.
- Blainski A, Lopes G, Palazzo de Mello J: Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. *Molecules*, 18:6852-6865, 2013.
- Cheigh C, Chung E, Chung M: Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110: 472-477, 2012.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Radovniković I, Jokić S: Green Solvents for Green Technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 90, 9: 1631-1639, 2015.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 109, 52-73, 2018.
- Czerwonka M, Pietrzak-Sajjad R, Bobrowska-Korczak B: Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in market milk products. *Food Additives & Contaminants, Part A*, 1–10. 2020.
- Ferenčić D, Gluhic D, Dudaš S: Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour). *Glasnik zaštite bilja*, Vol. 39, 5: 46-52, 2016.
- Horvat G, Aladić K, Jokić S: Projektiranje pilot postrojenja za ekstrakciju superkričnim CO₂ – prema integraciji i Internetom objekata (IoT). *Tehnički vjesnik*, Vol. 34, 3: 925-934, 2017.
- Indulekha J, Karuppan M, Appusamy A: A review on the potential of citrus waste for D-limonene, pectin and bioethanol production. *International Journal of Green Energy*, Vol. 14, 7: 599-612, 2017.
- Inoue T, Tsubaki S, Ogawa K, Onishi K, Azuma J: Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 123: 542-547, 2010.
- Iqbal Z, Akhtar M, Usman Sabri M: Comparative volatile components examination of various citrus peel essential oils. *International Journal of Biosciences*, Vol. 13, 4: 262-266, 2018.
- Jašić M: Voće u Bosni i Hercegovini, *Tehnologija voća i povrća*, Tehnološki fakultet, Tuzla, 2010.
- Jokić S, Aladić K, Šubarić D: Subcritical Water Extraction Laboratory Plant Design and Application. *Jubilee Annual 2017-2018 of the Croatian Academy of Engineering*, 248-257, 2018.

- Jokić S, Molnar M, Cikoš A, Jakovljević M, Šafranko S, Jerković I: Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO₂ extraction and ultrasound solvent extraction: optimization of limonene and hesperidin content. *Separation Science and Technology*, 2019.
- Jokić S, Nagy B, Velić D, Bucić-Kojić A, Bilić M: Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkritičnim CO₂. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, Vol. 3, 2:39-54, 2011.
- Kedare S, Singh R: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 48, 4: 412-422, 2011.
- Kim J, Nagaoka T, Ishida Y, Hasegawa T, Kitagawa K, Lee S: Subcritical Water Extraction of Nutraceutical Compounds from Citrus Pomaces. *Separation Science and Technology*, 44: 2598-2608, 2009.
- Kose M, Bayraktar O: Valorization of Citrus Peel Waste. *Natural Volatiles and Essential Oils*, Vol. 4, 2: 10-18, 2018.
- Lachos-Perez D, Basseggio A. M., Mayanga-Torres P.C., Marostica Junior M. R., Rostagno M. A., Martinez J, Forster-Carneiro T: Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138: 7-16, 2018.
- Ledesma-Escobar C, Priego-Capote F, Leque de Castro M: Relevance and Analysis of Citrus Flavonoides. *Polyphenols in Plants*, Academic Press, 2019. 133-150, ISBN 9780128137697
- Lovrić T, Tripalo B, Pozderović A, Hribar J: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Hinus, 2003. 299-303, ISBN 9789536904082
- Mahato N, Sinha M, Sharma K, Koteswararao R, Hwan Cho M: Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods*, Vol. 8, 11: 523-604, 2019.
- Marti N, Saura D, Fuentes E, Lizama V, Garcia E, Mico-Ballester M.J., Lorente J: Fiber from tangerine juice industry. *Industrial Crops and Products*, 33: 94-98, 2011.
- Martić I, Oguić A: Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u izolaciji fenolnih spojeva bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i definiranje antioksidacijskog kapaciteta. Znanstveni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2018.
- Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, Khodir M: Comparison of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from *Citrus Sinensis* Peels. *Food Chemistry*, 187: 507-516, 2015.
- Obradović, Valentina: *Tehnologija konzerviranja i prerade voća i povrća-interna skripta*. Požega, Veleučilište u Požegi, 2011.

Popović L, Vego D: Sortiment mandarine na području Opuzena. *Pomologia Croatica*, Vol. 16, 3-4: 89-107, 2010.

Ruby-Figueroa R: Responce Surface Methodology. *Drioli E., Giorno L.: Encyclopedia of Membranes*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2016. 1729-1730, ISBN 9783662443248

Shan Y: Functional Components of Citrus Peel, *Comprehensive Utilization of Citrus By-Products*, Academic Press, 2016. 1-13 ISBN 9780128097854

Sharma K, Mahato N, Lee Y R: Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 2018.

Yolmeh M, Jafari S: Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 10, 3: 413-433, 2017.