

# Subkrićna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave i ljuške crvenog luka

---

**Zećiri, Muhamed**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:109:593357>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Muhamed Zećiri**

**Subkritična ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave i  
ljuske crvenog luka**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, prosinac 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij procesnog inženjerstva

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Energija i okoliš  
**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022., održanoj 18. srpnja 2022.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*  
**Pomoć pri izradi:** *Mirna Brekalo*, mag. ing. techn. aliment.

### Subkritična ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz taloga kave i ljuske crvenog luka

*Muhamed Zečiri*, 0113142418

**Sažetak:** Korištenjem postupka subkritične ekstrakcije provela se ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka i taloga kave. Subkritična ekstrakcija bioaktivnih komponenti odvijala se sekvencijskim šaržnim postupkom gdje se prilikom ekstrakcije komponenti iz ljuske crvenoga luka koristio etanol u koncentracijama od 96 %, 75 % i 50 % te voda, a kod ekstrakcija iz taloga kave korišten je etanol u koncentracijama od 96 % i 50 % te voda. Prethodno subkritičnoj ekstrakciji uzorci ljuske crvenoga luka i taloga kave podvrgnuti su odmaščivanju na automatskom uređaju za ekstrakciju (SoxROC) upotrebom *n*-heksana kao otapala te je ekstrahirano  $10,58 \pm 1,63$  g/100 g s.t. masti iz taloga kave i  $1,26 \pm 0,30$  g/100 g s.t. masti iz ljuske crvenog luka. Iz taloga kave ukupno je ekstrahirano  $5,57 \pm 0,20$  g/100 g polifenola,  $4,27 \pm 0,15$  g/100 g flavonoida,  $2,88 \pm 0,14$  g/100 g topivih proteina te  $4,54 \pm 0,24$  g/100 g šećera. Iz ljuske crvenog luka ukupno je ekstrahirano  $8,40 \pm 0,38$  g/100 g polifenola,  $8,16 \pm 0,47$  g/100 g flavonoida,  $3,47 \pm 0,11$  g/100 g topivih proteina te  $4,11 \pm 0,10$  g/100 g šećera. HPLC-PDA metodom određeno je da su redom najzastupljeniji polifenoli u talogu kave kafein, klorogenska kiselina, kafeinska kiselina te ferulična kiselina, dok je najzastupljeniji flavonol ljuske crvenog luka kvercetin.

**Ključne riječi:** Subkritična ekstrakcija, bioaktivne komponente, talog kave, ljuska luka, otpad

**Rad sadrži:** 35 stranica  
8 slika  
9 tablica  
0 priloga  
27 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i>	predsjednik
2.	prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i>	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>	član
4.	prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 7. prosinca 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of energy environment and sustainable development**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Process Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Energy and environment

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held on July 18, 2022.

**Mentor:** *Sandra Budžaki*, PhD, prof.

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

### Subcritical Extraction of Bioactive Components from Spent Coffee Grounds and Brown Onion Skins

*Muhamed Zečiri*, 0113142418

**Summary:** Using the subcritical extraction procedure, the extraction of bioactive components from brown onion skins and spent coffee grounds was carried out. The subcritical extraction of bioactive components from brown onion skins was carried out by a sequential batch process where ethanol was used in concentrations of 96%, 75% and 50% and water. Ethanol in concentrations of 96% and 50% and water was used for extractions from spent coffee grounds. Prior to subcritical extraction, samples of brown onion skins and spent coffee grounds were subjected to defatting on an automatic extraction device (SoxROC) using *n*-hexane as a solvent.  $10.58 \pm 1.63$  g/100 g *d.w.* fats were extracted from coffee grounds and  $1.26 \pm 0.30$  g/100 g *d.w.* fats from brown onion skins. A total of  $5.57 \pm 0.20$  g/100 g of polyphenols,  $4.27 \pm 0.15$  g/100 g of flavonoids,  $2.88 \pm 0.14$  g/100 g of soluble proteins and  $4.54 \pm 0.24$  g/100 g of sugars were extracted from spent coffee grounds. A total of  $8.40 \pm 0.38$  g/100 g of polyphenols,  $8.16 \pm 0.47$  g/100 g of flavonoids,  $3.47 \pm 0.11$  g/100 g of soluble proteins and  $4.11 \pm 0.10$  g/100 g sugars were extracted from brown onion skins. Using the HPLC-PDA method, it was determined that the most abundant polyphenols in spent coffee grounds are caffeine, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid, while the most abundant flavonol in brown onion skins is quercetin.

**Key words:** Subcritical extraction, bioactive components, spent coffee, onion skins, waste

**Thesis contains:** 35 pages  
8 figures  
9 tables  
0 supplements  
27 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof.              | chair person |
| 2. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof.             | supervisor   |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, associate prof. | member       |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.              | stand-in     |

**Defense date:** December 7, 2022.

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

## Sadržaj

1.	UVOD.....	2
2.	TEORIJSKI DIO.....	4
2.1.	SUBKRITIČNA EKSTRAKCIJA .....	5
2.2.	BIOAKTIVNE KOMPONENTE U HRANI .....	7
2.2.3.	Djelovanje bioaktivnih komponenti.....	7
2.3.1	Bioaktivne komponente u talogu kave .....	9
2.4.	NUSPROIZVODI PROIZVODNJE LUKA.....	10
2.4.1.	Bioaktivne komponente ljuske crvenog luka .....	11
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1.	ZADATAK.....	13
3.2.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.2.1.	Sirovine .....	13
3.2.2.	Kemikalije i reagensi .....	13
3.2.3.	Uređaji .....	14
3.2.4.	Priprema sirovine.....	14
3.2.5.	Određivanje suhe tvari .....	15
3.2.6.	Odmašćivanje po Soxhlet-u .....	15
3.2.7.	Subkritična ekstrakcija.....	18
3.2.8.	Određivanje topivih proteina .....	20
3.2.9.	Određivanje ukupnih polifenola .....	20
3.2.10.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	21
3.2.11.	Određivanje šećera.....	21
3.2.12.	Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih spojeva HPLC-PDA metodom .....	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1.	KEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA TALOGA KAVE I LJUSKE CRVENOG LUKA .....	24
4.1.1.	Sastav ekstrakata taloga kave .....	24
4.1.2.	Sastav ekstrakata ljuske crvenog luka .....	26
5.	ZAKLJUČCI.....	29
6.	LITERATURA .....	31



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

## 1. UVOD

Prilikom proizvodnje jednog od najpopularnijih pića, kave, dolazi i do generiranja velike količine otpada. Za samo jednu šalicu napitka kave potrebno je oko 7,5 g mljevene kave dok u napitku završi tek oko 1,8 g tvari. Tih 1,8 g čini samo 6 % od početne mase ploda kave čija se masa kontinuirano gubi prilikom obrade. Otpad nastaje tijekom primarne industrijske obrade (pokožica, pulpa i pergamentna ovojnica prilikom mokrog postupka ili *kaskara* kod upotrebe suhog postupka) i sekundarne obrade (srebrna pokožica i talog). Talog kave predstavlja zadnji i glavni nusprodukt proizvodnje napitaka kave. Kako se prilikom proizvodnje napitaka kave ne ekstrahiraju svi raspoloživi sastojci, u talogu i dalje zaostaju velike količine bioaktivnih spojeva među kojima se najviše ističu kafein i klorogenska kiselina (Komes i sur., 2021). U literaturi se mogu pronaći brojni primjeri korištenja taloga kave kao sirovina za proizvodnju: alkoholnih napitaka (Sampaio i sur., 2013), keksa (Martinez-Saez i sur., 2017), muffina (Severini i sur., 2019.), čokolade (Yoo i sur., 2011) i jestive ambalaže (Batista i sur., 2020). Zbog svog kemijskog sastava, mogućnost upotrebe taloga kave kao gnojiva (Emmanuel i sur., 2017) ili kao krmne hrane (Pandey i sur., 2000) je ograničena.

Nešto više od jedne trećine mase samog luka nakon njegove prerade i obrade predstavlja otpadnu biomasu. Otpadna biomasa crvenog luka tijekom proizvodnje dehidriranog, smrznutog ili ukiseljenog luka sačinjena je od ljuske luka, vanjskog mesnatog sloja, korijena, gornjeg i donjeg dijela lukovice te lukovice nezadovoljavajuće kvalitete, a prilikom kalibracije i pakiranja luka zaostaje samo vanjska ljuska. Zbog karakterističnog mirisa i mogućnosti razvijanja fitopatogena, otpadnu biomasu crvenog luka nije moguće koristiti za ishranu stoke ili kao gnojivo na poljima pa u većini slučajeva završava na odlagalištu. U crvenom luku i njegovoj ljusci od bioaktivnih komponenata najviše dominiraju fenoli kojih ima i do 3 puta više; te flavonoidi kojih ima i do 4 puta više u ljusci nego u cijelom plodu. Kvercetin 4'-glukozid i kvercetin 3,4'-diglukozid najznačajniji su flavonoli (podskupina flavonoida) ljuske luka (Stjepanović i sur., 2022). Ljuska luka prikazuje potencijal u upotrebi prilikom proizvodnje tjestenine (Sayed i sur., 2014.), ekstrudiranih proizvoda (Tonyali i Sensoy, 2017), pšeničnog tijesta (Michalak-Majawska i sur., 2020) i kruha (Piechowiak i sur., 2020) te tvrdih bombona i želea (Om-Hashem i sur. 2016).

Subkritična ekstrakcija zelena je ekstrakcijska metoda koja je prvi put korištena u analiziranju uzoraka iz područja okoliša ali se brzo proširila i na ostala područja. Subkritična ekstrakcija je tehnika u kojoj se otapalo (najčešće voda) održava u tekućem agregatnom stanju na temperaturi višoj od temperature ključanja pri standardnom tlaku. Ta visoka temperatura ekstrakcije održava se pomoću povišenog tlaka. Visoka temperatura i tlak poboljšavaju ekstrakcijska svojstva otapala (Vladić i sur., 2022).

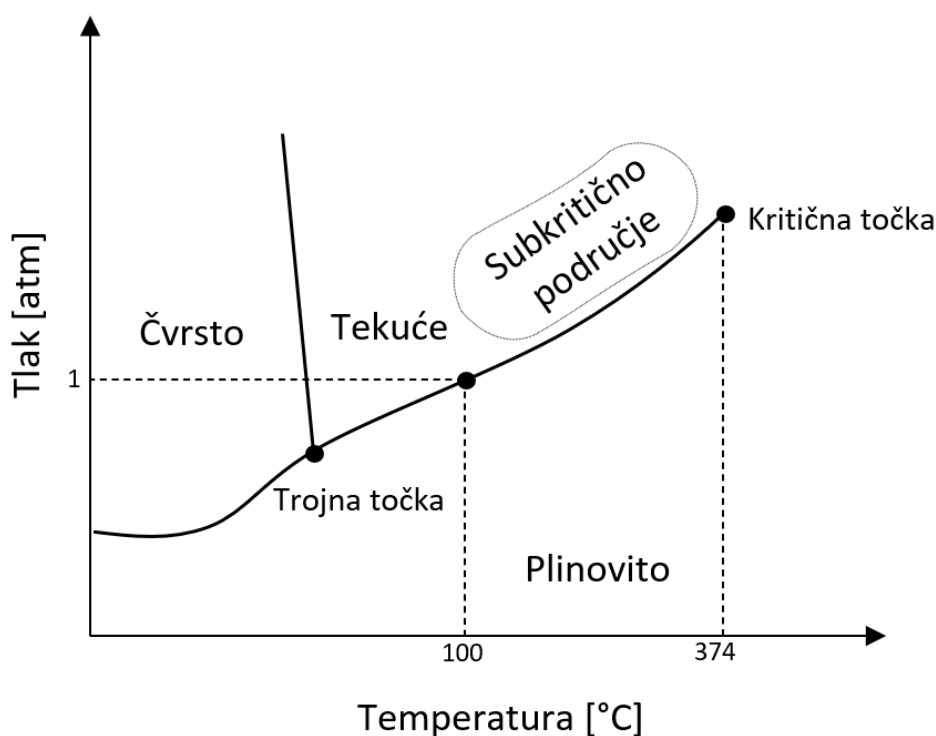
U ovom radu istražena je mogućnost korištenja subkritične ekstrakcije i njezina efikasnost za ekstrakciju bioaktivnih komponenata taloga kave i ljuske luka na temelju analize dobivenih ekstrakata na sastav polifenola, flavonoida, topivih proteina i šećera.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. SUBKRITIČNA EKSTRAKCIJA

Subkritična ekstrakcija je ekstrakcijska tehnika razvijena 1990-ih godina kao alternativa standardnim postupcima ekstrakcije u analitičkoj kemiji, a koja je zbog svoje primjenjivosti ubrzo korištena i u ekstrakcijama bioaktivnih komponenti. Smatra se jednom od zelenih tehnika ekstrakcija zbog toga što se kao ekstrakcijsko otapalo najčešće koristi voda koja je jeftina, netoksična i ne zahtjeva nikakav poseban način odlaganja, a dobiveni ekstrakti mogu



Slika 1 Fazni dijagram vode te prikaz područja subkritične ekstrakcije

se koristiti bez potrebe za dodatnom obradom (Vladić i sur., 2022). Upotrebom vode kao otapala u subkritičnoj ekstrakciji, temperatura ekstrakcije nalazi se u rasponu od 100 °C do 374 °C. Subkritična ekstrakcija etanolom odvija se u rasponu od 78 °C do 241 °C. Otapalo se na toj povišenoj temperaturi održava u tekućem agregatnom stanju upotrebom povišenog tlaka. Na faznom dijagramu vode (Slika 1), grafički je prikazano područje u kojem se odvija subkritična ekstrakcija vodom (Vladić i sur., 2022).

Povišenjem tlaka i temperature mijenjaju se svojstva vode te se manipulacijom tih svojstava može dovesti do selektivnosti ekstrakcije, odnosno ekstrahirati točno željene komponente iz materijala.

Voda pri standardnim uvjetima ima visoku dielektričnu konstantu od 78,5 na 25 °C što ju čini izuzetno polarnim otapalom pa je kao takva pogodna za ekstrakciju polarnih spojeva (Vladić i sur., 2022). Iz **Tablice 1** možemo uočiti da povećavanjem temperature i prelaskom u subkritično stanje dielektrična konstanta vode opada te tako ona postaje podobna za otapanje i ekstrakciju nepolarnijih spojeva. Iz vrijednosti prikazanih u **Tablici 1** možemo uočiti da je dielektrična konstanta vode pri 150 °C približna onoj dimetil-sulfoksida, dok daljnjim povećanjem temperature na 250 °C dielektrična konstanta je niža od konstanti acetonitrila i metanola (Marcus, 2018; Vladić i sur., 2022).

**Tablica 1** Primjeri otapala i njihove dielektrične konstante te temperature na kojima ih postižu (Marcus, 2018; Generalić, 2022; Vladić i sur., 2022)

Otapalo	Temperatura (°C)	Dielektrična konstanta
Voda	25	78,5
Voda	150	45
Voda	250	27
Dimetil-sulfoksid (DMSO)	25	46,68
Acetonitril	20	37,5
Metanol	25	32,7
Etanol	20	25

Povišenjem temperature dolazi i do smanjenja gustoće otapala, površinske napetosti i viskoznosti. Sve te promjene navedene u **Tablici 2** poboljšavaju penetraciju otapala i kvašenje materijala, ubrzava raspadanje matriksa te povećava prijenos mase (Vladić i sur., 2022).

**Tablica 2** Fizikalna svojstva vode i etanola pri različitim temperaturama (Marcus, 2018)

Otapalo	Temperatura (°C)	Gustoća (kg m <sup>-3</sup> )	Viskozitet (mPa s)	Površinska napetost (mN m <sup>-1</sup> )
Voda	150	917	0,182	48,7
	200	864,9	0,106	26,19
	350	575	0,066	3,79
Etanol	150	664,4	n.p.	n.p.
	200	610,1	n.p.	n.p.
	225	574,6	n.p.	n.p.

n.p. – nema podataka

Mehanizam subkritične ekstrakcije sastoji se od 5 faza:

1. Kvašenje uzorka
2. Početna desorpcija otopljenih spojeva
3. Difuzija otopljenih spojeva u porama materijala
4. Uravnoteživanje između vode i materijala
5. Kontinuirana difuzija komponenti (Vladić i sur., 2022).

## 2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE U HRANI

Iako se biološki aktivnim može označavati i negativan utjecaj, bioaktivne, odnosno biološki aktivne komponente najčešće se definiraju kao sastojci prirodnog porijekla koji konzumacijom u određenim količinama imaju pozitivan učinak na zdravlje organizma. Zbog širokog spektra spojeva koji su obuhvaćeni pod pojmom biološke aktivne komponente, kemijski sastav značajno se razlikuje te se oni ne mogu svrstati u jednu kemijsku skupinu spojeva. U hrani se nalaze u malim količinama, a po svome porijeklu mogu biti biljne, životinjske, mineralne ili mikrobne čiji su primjeri komponenata navedeni u **Tablici 3**. Iz razloga što većina bioaktivnih komponenata ne posjeduje nutritivnu vrijednost, za njih nije izdana vrijednost preporučenog dnevnog unosa. Njihova konzumacija može biti u prirodnom obliku, kao sastojak hrane ili pak prerađena u farmaceutski oblik dodatka prehrani poput tableta, kapsula, sirupa, dražeja ili u praškastom obliku (Jašić i sur., 2021).

**Tablica 3** Bioaktivne komponente te njihovi izvori ( Jašić i sur., 2021.).

Porijeklo	Komponenta
<b>Biljno</b>	Alkaloidi, betalaini, flavonoidi, glikozidi, karotenoidi, polifenoli
<b>Životinjsko</b>	Probiotici i proteini sirutke
<b>Mineralno</b>	Kalcij, magnezij, jod
<b>Mikrobno</b>	Funkcionalne mikrobne kulture

### 2.2.3. Djelovanje bioaktivnih komponenti

Biološku aktivnost pojedine komponente nije moguće opisati djelovanjem samo na određeni dio organizma ili na pojedine organe zbog složenosti i povezanosti samog organizma. Stoga, najlakše je opisati njihovo djelovanje kao djelovanje na prioritetni organ s posrednim utjecajem na sustav organa ili cijeli organizam.

Utjecaj bioaktivnih komponente obzirom na koji dio organizma djeluje dijelimo na:

- **živčani sustav** - Kao stimulansi centralnog živčanog sustava tein, teobromin, guaranin i kofein u umjerenim količinama povećavaju budnost dok u većim količinama imaju nepoželjan učinak na krvni tlak i gubitak koncentracije.
- **endokrini sustav** – Melatonin koji se u tragovima može pronaći u različitom voću i žitaricama ima pozitivan utjecaj na san, dok njegov nedostatak pojačava depresivna stanja. Fitoestrogeni porijeklom iz soje kemijske građe sličnog ljudskom estrogenu veže se na njegove receptore te tako dovodi do stabilizacije razine hormona i pomaže kod osteoporoze, predmenstrualnog sindroma te ostalih stanja hormonske neuravnoteženosti.
- **krvožilni sustav** – Omega-3 masne kiseline pozitivno utječu na krvožilni sustav, smanjuju krvni tlak i povećavaju imunosti odgovor tijela na traumu i infekciju. Uz omega-3 masne kiseline na smanjenje tlaka također utječu i spojevi iz celera, češnjaka i tamne čokolade kao i namirnice s većom količinom kalija poput dinje, kajsije, šljive, lososa, graha i banane. Vitamin K, acetilsalicilna kiselina te brojni polifenoli pozitivno utječu na koagulaciju krvi.
- **gastrointestinalni sustav** – Bioaktivne komponente poput polifenola, kapsaicina i piperina djeluju baktericidno u probavnom traktu te pružaju zaštitu protiv patogena. Poboljšavanjem crijevne mikroflore pozitivan utjecaj na gastrointestinalni sustav imaju i probiotici, prebiotici te simbiotici (Jašić i sur.,2021).

### 2.3. NUSPROIZVODI PROIZVODNJE KAVE

Od crvenog ploda koji se ubere sa grma kave do ekstrakta u napitku kave, početna sirovina izgubi oko 94 % svoje mase. Masa sirovine gubi se kroz sve faze proizvodnje, a započinje obradom i skidanjem pulpe, pokožice i pergamentne ovojnice primarnom preradom. Prerađuje li se arabica kava, koristi se mokri postupak primarne prerade gdje se pomoću *depulpera* uklanja pulpa i pokožica te se plodovi fermentiraju. Fermentacijom se uklanja zaostala pulpa i pektinski sloj. Pranjem, sušenjem i ljuštenjem nakon fermentacije uklanja se i pergamentna ovojnica, a udio vode u poluproizvodu smanjuje se na 10 %. Robusta kava prerađuje se jednostavnijim suhim postupkom primarne prerade. Kava se u suhom

postupku prerade suši u tankom sloju na suncu dok sadržaj vode ne padne na vrijednost nižu od 12 % nakon čega se osušeni plod ljušti i uklanja se *kaskara* (pokožica, pulpa i pergamentna ovojnica). Nakon primarne obrade, sljedeći korak prerade zrna je prženje. U svome radu Komes i sur. (2021.) iznose podatak da se prilikom prženja kave izdvoji oko 2 % srebrne pokožice iz mase suhog zrna. *Kaskara*, pulpa, pergamentna ovojnica i srebrna pokožica nastale primarnom i sekundarnom obradom sirovine kave zbog svoga sastava postavljaju se kao potencijalna sirovina za izolaciju bioaktivnih i nutritivnih spojeva (Komes i sur., 2021).

Talog kave nastaje u finalnoj fazi proizvodnje napitaka kava ili instant kave. Dobiva se nepotpunom ekstrakcijom topivih komponenti iz prethodno obrađenog i mljevenog zrna kave. Zbog toga što se prilikom ekstrakcije ne ekstrahiraju sve komponente, sam talog kave i dalje je bogat različitim bioaktivnim spojevima (Komes i sur., 2021).

### 2.3.1 Bioaktivne komponente u talogu kave

Talog kave čini od 49 do 53 % ukupnog nusproizvoda proizvodnje napitaka kave te on predstavlja glavni i najznačajniji nusproizvod industrije kave. Kako bi se dobio kvalitetan proizvod prilikom proizvodnje napitaka ekstrakcija se ne odvija u potpunosti, jer se prilikom ekstrakcije ekstrahiraju tvari koje kvare okus. Kako ekstrakcija nije potpuna u talogu kave ostaje puno u vodi topljivih i netopljivih bioaktivnih komponenata i funkcionalnih spojeva.

U talogu kave zaostaje od 10 do 15 % ulja i u ulju topljivih spojeva. Zbog njihove hidrofobnosti nije ih moguće ekstrahirati prilikom proizvodnje kave te tako zaostaju u talogu. U sastavu ulja taloga kave najviše se ističu palmitinska i omega-6-linolna kiselina. Valja spomenuti kako je ulje taloga kave bogato i vitaminom E.

Najznačajnije bioaktivne komponente taloga kave su polifenolni spojevi. Polifenolni spojevi, odnosno polifenoli čine skupinu od preko 8000 identificiranih spojeva, a u talogu kave najznačajnije su klorogenske kiseline (CGA) i kofein.

- Klorogenske kiseline nastaju esterifikacijom molekule kininske kiseline s jednom do tri molekule derivata *trans*-hidroksicimetnih kiselina među kojima prevladavaju kofeinska, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina. Od svih kofeinskih kiselina najdominantnija je 5-kafeoilkininska kiselina (5CQA). Zbog svojih fenolnih skupina imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala pa se u istraživanjima koje Tresserra-Rimbau (2015.) iznosi u svome radu klorogenska kiselina prikazuje kao dobar

antioksidans za lipoproteine niske gustoće (LDL) i lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL). Osim antioksidativnih svojstava, CGA posjeduje i antivirusna, antimikrobna i antikancerogena svojstva (Komes i sur., 2021).

- 1,3,7-trimetilksantin, poznatiji pod trivijalnim nazivom kofein najpoznatiji je alkaloid u svijetu. U ljudskom organizmu, nakon adsorpcije, 75-80 % kofeina metabolizira se u paraksantin. Utjecaji kofeina na organizam proizlazi iz mehanizma:
  - Inhibiranja receptora adenzina kompetitivnim vezanjem kofeina i paraksantina na receptore adenzina,
  - povećavanja unutarstanične koncentracije cikličkog adenzin monofosfata inhibiranjem djelovanja enzima fosfodiesteraze
  - povećavanja intracelularne koncentracije kalcija poticanjem njegovog transporta kroz staničnu membranu i sarkoplazmatski retikulum (Nehlig i sur., 1992; IOM, 2001).

## 2.4. NUSPROIZVODI PROIZVODNJE LUKA

Tijekom prerade, na otpad koji nastaje otpada oko 37 % od početne mase svježeg luka. Prilikom prerade ili proizvodnje dehidriranog, smrznutog ili ukiseljenog luka otpadna biomasa luka se klasificira u dvije različite skupine:

- Otpad nastao tijekom industrijske obrade. Taj otpad sačinjen je od ljuske luka, vanjskog mesnatog sloja, korijena, gornjeg i donjeg dijela lukovice te lukovice nezadovoljavajuće kvalitete.
- Otpad nastao tijekom kalibracije i pakiranja. Taj otpad sadrži samo vanjsku ljusku (Stjepanović i sur., 2022).

U radu Stjepanović i sur. (2022) navodi se kako je zbrinjavanje nastale biomase luka poprilično izazovan zadatak jer se zbog svog karakterističnog mirisa ne može koristiti kao primjesa stočne hrane, a zbog razvijanja fitopatogena nije moguće raspršivanje po poljima i korištenje kao organskog gnojiva. Kako otpadna biomasa ne bi završila na odlagalištu ona se može koristiti u proizvodnji bioplina, tehnologiji obrade otpadnih voda, za zaštitu metala i tekstila ili kao sirovina za ekstrakciju bioaktivnih komponenti (Stjepanović i sur., 2022).

### **2.4.1. Bioaktivne komponente ljuske crvenog luka**

Flavonoidi i fenolni spojevi polifenoli su ti koji dominiraju u luku i njegovoj ljusci. Njihova najveća koncentracija zabilježena je u ljusci gdje se fenolnih spojeva nalazi i 3 puta više po masi suhe tvari za razliku od cijelog ploda, a flavonoida i do 4 puta više. Ta velika razlika u lukovici rezultat je svjetlosno induciranog enzima fenilalanin-amonij-liaze koji katalizira proizvodnju flavonoida. Unutarnje žive stanice lukovice sposobne su sintetizirati flavonole. Vanjski mesnati slojevi lukovice su sposobni sintetizirati flavonole, ali i dalje pod utjecajem svjetlosti daju mogućnost sinteze viših spojeva flavonola katalizirani enzimom fenilalanin amonij-liaze. Najznačajniji flavonoli su kvercetin 4'-glukozid i kvercetin 3,4'-diglukozid. Kvercetin spada u skupinu spojeva koji se koristi u borbi protiv karcinoma (Stjepanović i sur., 2022).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je potpuno iscrpljivanje bioaktivnih komponenti iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom subkritične ekstrakcije etanolom različite koncentracije ovisno o vrsti uzoraka. Subkritična ekstrakcija provedena je sa etanolom različite koncentracije (96 %, 75 % 50 %) i vodom po principu od nepolarnog ka polarnom. Prije subkritične ekstrakcije uzorci taloga kave i ljuske crvenog luka podvrgnuti su odmašćivanju metodom po Soxhlet-u na automatskom uređaju za ekstrakciju (SocROC) upotrebom *n*-heksana kao otapala. Nadalje, ekstrakti dobiveni subkritičnom ekstrakcijom analizirani su na udio suhe tvari, udio ukupnih polifenola, flavonoida, topivih proteina te ukupnih šećera. Određen je i polifenolni profil kako bi se kvantitativno i kvalitativno utvrdila vrijednost navedenih vrsta otpada kao i uspješnost subkritične ekstrakcije.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Sirovine

Kao sirovine za ovaj rad korištene su ljuske crvenog luka nastale nakon industrijske prerade luka (pakiranje u mrežice) koja je dobavljena od proizvođača Ena Fruit d.o.o te talog kave nastao prilikom proizvodnje espresso kave prikupljen u lokalnom kafiću.

#### 3.2.2. Kemikalije i reagensi

Tijekom eksperimentalnog dijela ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije: etanol  $C_2H_5OH$  proizvođača Kefo, Slovenija; metanol  $CH_3OH$  proizvođača J.T. Baker, Poljska; *n*-heksan proizvođača Carlo Erba, Francuska, Bradford reagens proizvođača Bio-Rad, Njemačka; Folin-Ciocalte reagens proizvođača CPChem, Bugarska; natrijev karbonata  $Na_2CO_3$  proizvođača T.T.T. Sveta Nedjelja, Hrvatska; natrijev nitrit  $NaNO_2$  proizvođača Kemika, Zagreb, Hrvatska; aluminij klorida  $AlCl_3$  proizvođača Acros Organics, Njemačka; natrijev hidroksida  $NaOH$  proizvođača T.T.T. Sveta Nedjelja, Hrvatska; fenol  $C_6H_6O$  proizvođača Lachner, Češka; sulfatna kiselina  $H_2SO_4$  proizvođača Carlo Erba, Francuska; standardi galne, ferulične, klorogenske i kafeinske kiseline te kvercetina proizvođača Sigma Aldrich (Sjedinjene Američke Države SAD); standard kafeina proizvođača Acros Organics, Kina; glukoza proizvođača BDH PROLABO, Engleska.

### 3.2.3. Uređaji

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovoga rada korišteni su sljedeći uređaji: Laboratorijski mlin (IKA MF 10 basic, Njemačka), sušionik (Memmert UF55, Njemačka), mlin (Albrigi Luigi s.r.l. Mulino, Italija), Uređaj za automatsku ekstrakciju metodom po Soxhlet-u (Opsis SoxROC, Švedska), uređaj za subkritičnu ekstrakciju (Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska), vibrirajuća miješalica (DLAB MX-S, Kina), vodena kupelj (Memmert WNB 14, Njemačka), analitička vaga (Gibertini CRYSTAL 200 CE, Italija), tehnička vaga (Kern 372, Njemačka), centrifuga (HERMLE Z 326 K, Njemačka; Eppendorf Minispin, Njemačka), ultrazvučna kupelj (Bandelin SONOREX RK 31; SONOREX RK 100, Njemačka), Spektrofotometar (Lasany Li- 285, Indija), digitalni termometar sa temperaturnom sondom (CEM DT-610B, Kina) i HPLC sustav (Agilent technologies 1260 Infinity II , SAD).

### 3.2.4. Priprema sirovine

Talog kave prikupljen u lokalnom kafiću homogeniziran je i osušen u sušnici na pliticama u tankom sloju debljine do cca 5 mm pri 60 °C u vremenu od 24 h.

Ljuska crvenog luka pristigla od proizvođača usitnjena je upotrebom mlina Albrigi Luigi s.r.l. Mulino na granulaciju od 3 do 5 mm. Usitnjena ljuska luka sadržavala je primjese zemlje i pijeska. Nakon prvog usitnjavanja ljuska je ispirana 4-6 puta hladnom vodom. Nakon pranja ljuska luka je sušena u sušnici pri 60 °C u vremenu od 24 h na pliticama u tankom sloju debljine



Slika 2 Mljevenje ljuske crvenog luka na granulaciju od 0,5 mm

cca 5 mm. Osušena ljuska luka naknadno je usitnjena na IKA MF 10 basic mlinu (**Slika 2**) na granulaciju od 0,5 mm (uz međukorak od 1 mm).

### 3.2.5. Određivanje suhe tvari

Određivanje suhe tvari ili određivanje sadržaja vode je gravimetrijska metoda koja se bazira na sušenju uzorka u sušioniku do konstante mase. Sušenje se provodi dok razlika u masi dvije uzastopne paralele ne bude manja od 3 mg ili u nekim slučajevima manja od 0,1 % mase uzorka. Ako se suše uzorci koji imaju visoki udio masti, prilikom sušenja može doći do porasta mase, tada se za masu suhe tvari uzima ona masa odmjerena prije povećanja. Na uzorcima koji sadrže veliki udio hlapivih komponenti metodom sušenja nije moguće odrediti suhu tvar jer prilikom sušenja dolazi do isparavanja hlapivih komponenti (Primorac i Flanjak, 2012).

U aluminijsku posudu, koja je zajedno s poklopcem osušena 1 sat na 105 °C i ohlađena u eksikatoru, odvagano je 3 do 5 g uzorka. Posudica je postavljena otvorena u sušionik i sušena je zajedno s poklopcem 1 sat. Nakon sušenja u sušioniku posudica je zatvorena te je s pomoću metalnih kliješta postavljena u eksikator na hlađenje u trajanju od 30 min. Posudica s uzorkom odvagana je te ponovno vraćena u sušionik na sušenje od 1 sata. Nakon sušenja posudica je ponovno ohlađena u eksikatoru. Ohlađeni uzorak ponovno je odvagano. Postupak je ponavljan dok se nije postigla konstantna masa, odnosno dok razlika u dvije uzastopne odvaga nije bila manja od 0,1 % mase uzorka. Udio suhe tvari izračunat je prema **jednadžbi (1)**:

$$ST = 100 - \left( \frac{m(a) - m(b)}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \right) \quad (1)$$

Gdje su:

- $ST$ - udio suhe tvari [%]
- $m(a)$ - masa posudice s uzorkom prije sušenja [g]
- $m(b)$ - masa posude s uzorkom nakon sušenja [g]
- $m(\text{uzorak})$ - masa uzorka [g]

### 3.2.6. Odmašćivanje po Soxhlet-u

Soxhlet metoda je standardna metoda ekstrakcije nepolarnih lipida iz uzorka pomoću organskih otapala kao što su  $n$ -heksan, dietil eter ili petrol eter u svrhu određivanja slobodnih masnoća u prehrambenim materijalima. Količina vode u uzorku ne smije biti viša od 10 % te

se s toga uzorci prethodno moraju osušiti. Standardna Soxhlet metoda uključuje postupak u kojem se u ekstraktoru (posudi za ekstrakciju) nakuplja otapalo i natapa uzorak nakon čega se sifonski vraća nazad u ekstraktor i postupak se ponavlja. Vrijeme ekstrakcije je propisano metodom ovisno o tipu materijala koji se iscrpljuje ili brojem prelijevanja uzorka/ekstraktora (Wrolstad i sur., 2005.). Standardna metoda po Soxhletu ima kako svoje prednosti (jednostavnost aparature i određivanja kao i male količine uzorka) tako i nedostatke (dugo vrijeme ekstrakcije, velike količine otapala) te je temelj za razvoj metoda za određivanje slobodnih masti kojima se pokušava riješiti nedostatke standardne metode. Jedan od takvih uređaja, koji se temelji na standardnoj Soxhlet metodi, je i automatski uređaj za ekstrakciju SoxRoc prikazan na Slici 3.



**Slika 3** Uređaj za automatsku ekstrakciju SoxROC

Uređaj za automatsku ekstrakciju SoxROC (**Slika 3**) koristi Randall i Twisselmann tehniku ekstrakcije koja je modifikacija Soxhlet-a. U njemu se vruće, ključajuće otapalo u direktnom kontaktu s uzorkom koristi kao sredstvo za ekstrakciju masti (Opsis, 2016.). Prednost uređaja u odnosu na standardnu metodu ekstrakcije prema Soxhletu je značajno skraćivanje vremena trajanja ekstrakcije kao i automatsko otparavanje i redestilacija otapala, sušenje i hlađenje ekstrahirane masnoće. Redestilacija otpala je 98 % koje se za sljedeće

ekstrakcije koristi u kombinaciji s nekorištenim otapalom u omjeru 50:50. Dakle, prednost uređaja za automatsku ekstrakciju osim skraćivanja vremena ekstrakcije je i ušteda otapala.

Ekstrakcija u ovom uređaju odvija se u tri koraka:

1. Kuhanje- otapalo u direktnom kontaktu s uzorkom i pod utjecajem ogrjevnog tijela ključa čime se održava propisana temperatura i ekstrakcija lipida iz uzorka.
2. Ispiranje- uzorak se ispiri refluksom otapala koje je otparilo i kondenziralo na hladilu.
3. Sušenje- otapalo se otpari iz uzorka i suši te hladi.

U okviru ovog diplomskog rada, odmaščivanje uzoraka provedeno je u 6 paralela. Tri grama uzorka odvagano je u celulozni tuljak. Tuljak je poklopljen s tankom vatom te je zajedno s oprugom/držačem postavljen u ekstraktor. U ekstraktor je uz rub uliveno 90 mL *n*-heksana koji je korišten kao otapalo. Ekstraktor je postavljen na za to predviđeno mjesto u uređaju te je uređaj propisno zatvoren. Na digitalnom zaslonu postavljeni su uvjeti ekstrakcije.

Ekstrakcija je provedena pri sljedećim uvjetima:

- temperatura – 155 °C
- kuhanje – 40 minuta
- ispiranje – 40 minuta
- redukcija otapala – 5 minuta
- sušenje – 5 minuta.

Za određivanje količine masti u uzorku korištena je klasična gravimetrijska metoda vaganjem tuljka i ekstraktora prije i poslije same ekstrakcije te je po razlici u masi određen postotak masti u uzorku koristeći **jednadžbu (2)**:

$$M = \frac{m(n) - m(p)}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad (2)$$

Gdje su:

- *M*- udio masti u uzorku [%]
- *m* (n)- masa ekstraktora nakon ekstrakcije [g]
- *m* (p)- masa ekstraktora prije ekstrakcije [g]
- *m* (uzorak)- masa uzorka [g]

### 3.2.7. Subkritična ekstrakcija

Ekstraktor za subkritičnu ekstrakciju sastoji se od cilindrične debelostijene posude s čepom koji se pričvršćuje s navojnom kapom, a svi elementi izrađeni su od nehrđajućeg čelika AISI 304 kako bi se smanjio utjecaj materijala na sastav dobivenih ekstrakata s obzirom da se ekstrakcija provodi na visokim vrijednostima tlaka i temperature. Na čepu ekstraktora, kao priključni spoj, koristi se Hermeto® spojnica na koju se spaja bešavna cijev izrađena od AISI 316Ti kroz koju se s dušikom održava tlak. Uz navedenu spojnicu na čepu se također nalazi slijepa cijev koja vodi do središta cilindra, a namijenjena je za pozicioniranje temperaturnog osjetila u središte ekstraktora. Za miješanje uzorka u samom ekstraktoru koristi se magnetno miješalo dok se za održavanje temperature koristi izolirana zračna komora s ventilatorom, grijačem i temperaturnim regulatorom.

U ekstraktor je dodana prethodno odvagana količina uzorka, otapala i magnetno miješalo. Na vrh ekstraktora je postavljena brtva i čep ekstraktora te se zatezanjem navojne kape ostvarila nepropusnost. Cijev za održavanje tlaka u sustavu je pomoću ručnog alata postavljena i zategnuta kako ne bi došlo do curenja dušika. Ekstraktor je postavljen u zračnu



Slika 4 Subkritični ekstaktor u termostatiranoj komori

komoru vidljivo na **Slici 4**. Regulacijski ventil oprezno je otvoren te je dušik pušten u sustav, a tlak je prethodno postavljen na 30 bara. Nakon tlačenja ekstraktora dušikom, u za to predviđeno mjesto, postavljeno je mjerno osjetilo temperature kojim je praćena temperatura u središtu ekstraktora. Termostatorana komora je zatvorena te je na zaslonu postavljena željena temperatura ekstrakcije čime je omogućen direktan prijenos topline na ekstraktor. Uključivanjem magnetske mješalice omogućeno je miješanje materijala i otapala tijekom cijelog vremena ekstrakcije. Kada je temperatura u središtu ekstraktora dostigla 5 °C nižu temperaturu od zadane, započelo je vremensko odbrojavanje tijekom ekstrakcije. Nakon 60 minuta termo komora je isključena i otvorena, te je pomoću rukavica ekstraktor uronjen u hladnu vodu kako bi se ubrzalo hlađenje sustava. Nakon hlađenja sadržaja ekstraktora na temperaturu nižu od 60 °C regulacijski ventil dušika je zatvoren, a laganim otvaranjem visokotlačnog ventila izjednačen je tlak ekstraktora s atmosferskim. Po izjednačavanju tlakova rastavljen je cijeli sustav (a to uključuje skidanje visokotlačnog ventila, navojne kape i čepa ekstraktora). Smjesa koja se nalazila u ekstraktoru profiltrirana je preko Buchnerovog lijevka s nabranim filter papirom (Whatman 113, Ujedinjeno Kraljevstvo). Talog je skinut s filter papira i vraćen je u ekstraktor kako bi se ekstrakcijski postupak ponovio sa sljedećim otapalom. Nakon završetka svih stupnjeva ekstrakcije talog je osušen u sušnici pri 60 °C u vremenu od 24 h. Preliminarnim istraživanjima određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije te su navedeni u **Tablicama 4 i 5**.

**Tablica 4** Uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz taloga kave

Broj koraka ekstrakcije	3		
Korak	1.	2.	3.
Otapalo	96 % EtOH	50 % EtOH	Voda
Tlak	30 bar		
Omjer uzorak:otapalo	1:30		
Vrijeme ekstrakcije	60 min		

**Tablica 5** Uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz ljuske crvenog luka

Broj koraka ekstrakcije	4			
Korak	1.	2.	3.	4.
Otapalo	96 % EtOH	75 % EtOH	50 % EtOH	Voda
Tlak	30 bar			
Omjer uzorak:otapalo	1:30			
Vrijeme ekstrakcije	60 min			



### 3.2.8. Određivanje topivih proteina

Koncentracija topivih proteina određivana je spektrofotometrijskom metodom po Bradfordici. Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina. Tim vezanjem dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja koji pri niskom pH uz maksimum apsorbancije pri 595 nm (Bradford, 1976).

Određivanje proteina ovom metodom provedeno je u 3 paralele. U PMMA kivete odmjeren je, zbog ograničenosti metode, ovisno o očekivanoj količini proteina 50 ili 100  $\mu\text{L}$  uzorka. U kivete je nakon toga dodavano je 2 mL Bradfordičinog reagensa te se na sobnoj temperaturi čekalo 5 minuta kako bi se razvila boja. Apsorbancija je mjerena na 595 nm pomoću spektrofotometra. Kao slijepa proba korištena je destilirana voda s Bradfordičinim reagensom. Koncentracija proteina određena je iz baždarne krivulje goveđeg serumskog albumina, BSA.

### 3.2.9. Određivanje ukupnih polifenola

Određivanje ukupnih polifenola odrađeno je spektrofotometrijskom metodom prema Folin-Ciocalteu uz Folin-Ciocalteu reagens (smjesa fosfotungstata i molibdata). Ova metoda bazirana je na mehanizmu prijenosa elektrona između fenolnih aniona, koji su nastali iz fenola djelovanjem natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), i Folin-Ciocalteu reagensa. U toj reakciji se  $\text{Mo}^{6+}$  reducira u  $\text{Mo}^{5+}$  te otopina mijenja boju u plavo. Ovisno o količini fenola u uzorku reakcija će biti jača, odnosno boja će biti intenzivnija. Najintenzivnija apsorbancija je pri 765 nm (Matić i sur., 2017).

Određivanje ukupnih polifenola provedeno je u 3 paralele. U 20  $\mu\text{L}$  uzorka u staklenoj epruveti dodano je 1580  $\mu\text{L}$  vode i 100  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te 300  $\mu\text{L}$  (200g/L)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Smjesa se na vibrirajućoj miješalici nakratko izmiješa te se postavi na inkubaciju u vodenu kupelj pri temperaturi od 40 °C na 30 minuta. Poslije 30 minuta na spektrofotometru mjeri se apsorbancija pri 765 nm. Kao slijepa proba korištena je destilirana voda umjesto 20  $\mu\text{L}$  uzorka.

Za ekstrakte ljuske crvenoga luka koncentracija ukupnih polifenola određena je preko baždarne krivulje dobivene galnom kiselinom, a za izračun koncentracije polifenola u ekstraktima taloga kave korištena je klorogenska kiselina.

### 3.2.10. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su spektrofotometrijskom metodom uz aluminij klorid ( $\text{AlCl}_3$ ) kao reagens. Ova metoda zasniva se na reakciji pri bazičnim uvjetima između aluminijevih iona i molekula flavonoida. Njihovom reakcijom dolazi do stvaranja crvenih kelata aluminij-flavonoida. Većom koncentracijom nastalih kelata povećava se apsorbanacija. U alkalnom mediju, se uz prisutnost natrijevog nitrata ( $\text{NaNO}_2$ ), apsorbanacija mjeri pri 510 nm (Matić i sur., 2017).

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je u 3 paralele. U 200  $\mu\text{L}$  uzorka dodano je 60  $\mu\text{L}$  5 %  $\text{NaNO}_2$  te je nakratko izmiješano na vibrirajućoj miješalici. Inkubirano je 5 minuta nakon čega je dodano 60  $\mu\text{L}$  10 %  $\text{AlCl}_3$ . Uzorak je ponovno promiješan na vibrirajućoj miješalici te je inkubiran dodatnih 6 minuta. Nakon inkubacije u epruvetu je dodano 400  $\mu\text{L}$  1 M natrijevog hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) i 480  $\mu\text{L}$  vode. Uzorak je izmiješan na vibrirajućoj miješalici te je kvantitativno prenesen u PMMA kivetu. Apsorbanacija je na spektrofotometru mjerena na 510 nm. Paralelno uzorcima odrađen je i kontrolni uzorak u koji je umjesto 60  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  i 60  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  dodano 120  $\mu\text{L}$ . Kao slijepa proba korištena je voda umjesto uzorka. Koncentracija ukupnih flavonoida određena je preko baždarnog dijagrama za kvercetin.

### 3.2.11. Određivanje šećera

Ova spektrofotometrijska metoda provedena je uz fenol i sumpornu kiselinu kao reagense. U ovoj metodi, uz prisustvo sumporne kiseline  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , formiraju se obojeni aromatski kompleksi spajanjem fenola i ugljikohidrata. Apsorbanacija je mjerena pri 495 nm (Wrolstad i sur., 2005).

Određivanje šećera provedeno je u 3 paralele. U staklene epruvete s navojem i 50  $\mu\text{L}$  uzorka dodano je 500  $\mu\text{L}$  fenola te je izmiješano na vibrirajućoj miješalici. Nakon miješanja dodano je 2,5 mL 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  te je epruveta zatvorena s čepom. Zatvorena epruveta izmiješana je na vibrirajućoj miješalici. Nakon miješanja sadržaj je kvantitativno prenesen u PMMA kivetu te je na spektrofotometru izmjerena apsorbanacija na valnoj duljini od 495 nm. Kao slijepa

proba korištena je voda umjesto uzorka. Koncentracija ukupnih šećera određena je preko baždarnog dijagrama za glukozu.

### 3.2.12. Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih spojeva HPLC-PDA metodom

Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih spojeva odrađena je po metodi Jakobek i sur. (2019). U plastične kivete dodano je 0,2 g uzorka zajedno s 1,5 mL 80 % metanola. Smjesa je tretirana ultrazvukom u kupelji 15 minuta nakon čega je 10 min centrifugirana pri 10 tisuća okretaja u minuti. Supernatant je filtriran kroz politetrafluoretilen (PTFE) filtere s veličinom pora od 0,45  $\mu\text{m}$ .

Za analizu uzoraka korišten je HPLC sustav opremljen autosamplerom, kvarternom pumpom te photo-diode array detectorom (PDA). Za kromatografsko razdvajanje korištena je Poroshell 120 EC C-18 kolona unutarnjeg promjera 4,6 mm, duljine 100 mm te veličine čestica 2,7  $\mu\text{m}$ . Korištena je i predkolona Poroshell 120 EC-C-18 4,6 mm. Kao mobilna faza A korištena je 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  te 100 % metanol kao mobilna faza B. Brzina protoka mobilne faze je 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$  uz sljedeće gradijente faza kako slijedi: 0 min 5 % B, 5 min 25 % B, 14 min 34 % B, 25 min 37 % B, 30 min 40 % B, 34 min 49 % B, 35 min 50 % B, 58 min 51 % B, 60 min 55 % B, 62 min 80 % B, 65 min 80 % B, 67 min 5 % B, i 72 min 5 % B. Volumen injektiranih kalibracijskih standarada i uzoraka u dvije paralele iznosila je 10  $\mu\text{L}$ . Sve kalibracijske krivulje prikazale su linearnost s  $r^2$  od 0,9927 do 1,0000, a korištene su standardne otopine kafeina, ferulične kiseline, kvercetina te klorogenske kiseline. Statistička analiza podataka provedena je u Minitab programu (Minitab LLC, SAD) i MS Excel-u (Microsoft, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. KEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA TALOGA KAVE I LJUSKE CRVENOG LUKA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je potpuno iscrpljivanje bioaktivnih komponenti iz taloga kave i ljuske crvenog luka primjenom subkritične ekstrakcije etanolom različite koncentracije ovisno o vrsti uzoraka. Nadalje, ekstrakti dobiveni subkritičnom ekstrakcijom analizirani su na udio suhe tvari, udio ukupnih polifenola, flavonoida, topivih proteina te ukupnih šećera. Određen je i polifenolni profil kako bi se kvantitativno i kvalitativno utvrdila vrijednost navedenih vrsta otpada kao i uspješnost subkritične ekstrakcije.

Rezultati određivanja prikazani su u tablicama i dijagramima.

### 4.1.1. Sastav ekstrakata taloga kave

Kemijskom analizom ekstrakata (prikazani na **Slici 5**) dobivenih nakon sekvencijalne subkritične ekstrakcije taloga kave, provedene u okviru ovog diplomskog rada, dobiveni su rezultati navedeni u **Tablici 7**.

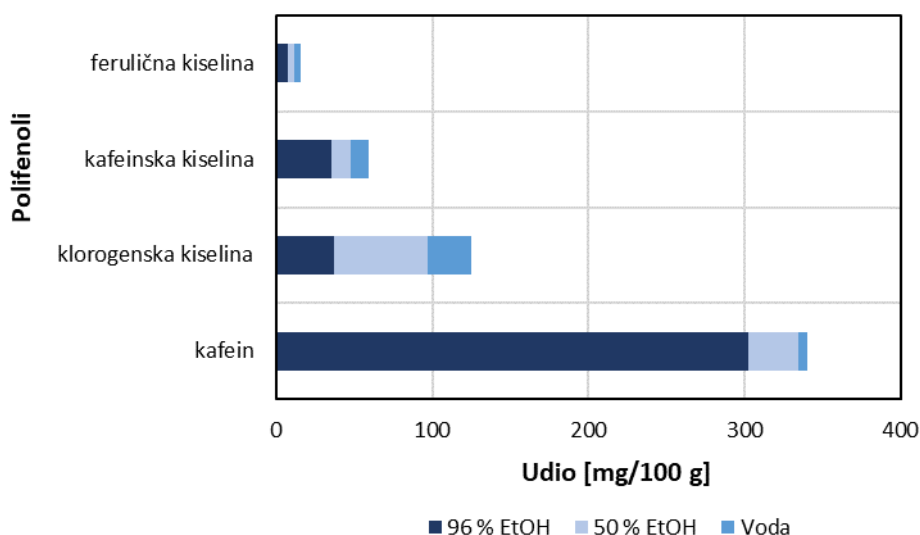


**Slika 5** Ekstrakti dobiveni nakon subkritične ekstrakcije : 1 - 96 % etanol, 2 - 50 % etanol, 3 - voda

Tablica 6 Kemijski sastav ekstrakata nakon sekvencijske ekstrakcije iz taloga kave

Ekstrakcijsko otapalo	Ukupni polifenoli [g/100 g]	Ukupni flavonoidi [g/100g]	Topivi proteini [g/100g]	Ukupni šećeri [g/100g]
96 % etanol	2,14 ± 0,20	2,18 ± 0,12	0,94 ± 0,08	0,69 ± 0,06
50 % etanol	2,50 ± 0,19	1,50 ± 0,15	1,44 ± 0,14	1,68 ± 0,16
Voda	0,93 ± 0,10	0,59 ± 0,13	0,50 ± 0,09	2,17 ± 0,24
<b>Ukupno</b>	<b>5,57 ± 0,20</b>	<b>4,27 ± 0,15</b>	<b>2,88 ± 0,14</b>	<b>4,54 ± 0,24</b>

Iz rezultata **Tablice 7** možemo uočiti da se od ukupno ekstrahiranih  $5,57 \pm 0,20$  g/100 g polifenola, najviše njih ekstrahiralo 50 % etanolom, dok je najmanje ekstrahirano vodom ( $0,93 \pm 0,10$  g/100 g). Iz taloga kave sličnu raspodjelu imaju i topivi proteini koji su se najviše ekstrahirali u 50 % etanolu ( $1,44 \pm 0,14$  g/100 g) i najmanje u vodi ( $0,50 \pm 0,09$  g/100 g), a ukupno ih je ekstrahirano  $2,88 \pm 0,14$  g/100 g. 96 % etanol iskazao se kao najbolje ekstrakcijsko sredstvo za flavonoide ekstrahirajući  $2,18 \pm 0,12$  g/100 g flavonoida od ukupno  $4,27 \pm 0,15$  g/100 g. Šećera je ukupno ekstrahirano  $4,54 \pm 0,24$  g/100 g gdje se u koraku ekstrakcije s vodom ekstrahiralo najviše ( $2,17 \pm 0,24$  g/100 g). U usporedbi s metanolnom ekstrakcijom prilikom karakterizacije sirovine ekstrahirano je 93 % više polifenola i 116 % više flavonoida.

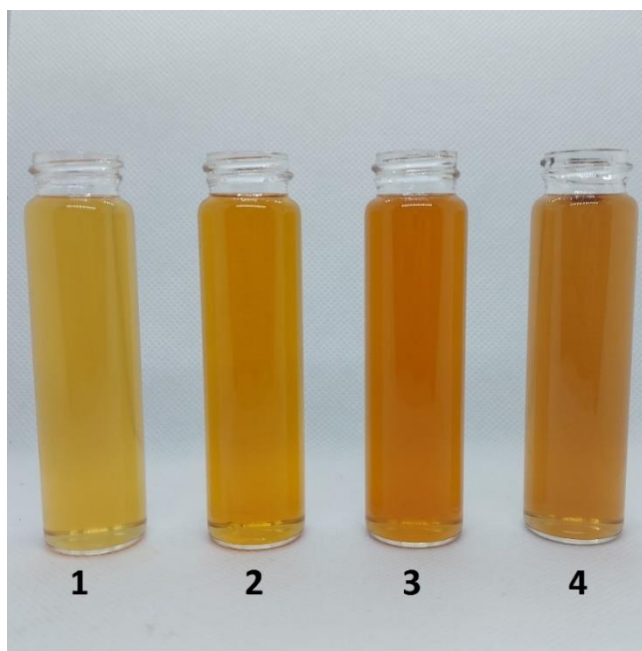


Slika 5 Dominantni polifenoli u ekstraktima taloga kave

Analizom polifenolnog profila HPLC-PDA metodom potvrđeno je da se u talogu kave količinski najviše nalazi kafeina što se može vidjeti na **Slici 6**. Iz istog grafa možemo uočiti da se najviše kafeina ekstrahiralo 96 % etanolom, a najmanje vodom. Klorogenska kiselina po udjelu drugi je polifenol taloga kave kojeg se najviše ekstrahiralo u koraku ekstrakcije s 50 % etanolom dok je kao i kod kafeina najmanje ekstrahiran vodom. Kafeinska kiselina treći je po udjelu u talogu kave i slijedi sličan trend kafeina, to jest najviše kafeinske kiseline ekstrahirano je s 96 % etanolom, a najmanje s vodom. Kao četvrta po udjelu ferulična kiselina najviše je ekstrahirana 96 % etanolom.

#### 4.1.2. Sastav ekstrakata ljuske crvenog luka

Rezultati prikazani u **Tablici 8** rezultati su analize ekstrakata (prikazani na **Slici 7**) dobiveni nakon subkritične ekstrakcije ljuske crvenog luka.



**Slika 7** Ekstrakti ljuske industrijskog luka : 1 - 96 % etanol, 2 - 75 % etanol, 3 - 50 % etanol, 4 - voda

Iz ljuske crvenog luka sekvencijalnom subkritičnom ekstrakcijom ukupno je ekstrahirano  $8,40 \pm 0,38$  g/100 g polifenola,  $8,16 \pm 0,47$ g/100 g flavonoida,  $3,47 \pm 0,11$  g/100 g topivih proteina te  $4,11 \pm 0,10$  g/100 g šećera. Najviše polifenola ekstrahirano je 96 % etanolom ( $4,25 \pm 0,30$  g/100 g), zatim 75% etanolom ( $2,51 \pm 0,38$  g/100 g), 50 % etanolom ( $1,07 \pm 0,09$  g/100g) te vodom ( $0,57 \pm 0,11$  g/100 g). Flavonoidi, kao i topivi proteini slijede sličan trend polifenola u tome što se najviše njih ekstrahiralo u 96 % etanolu, a najmanje u vodi. 96 %

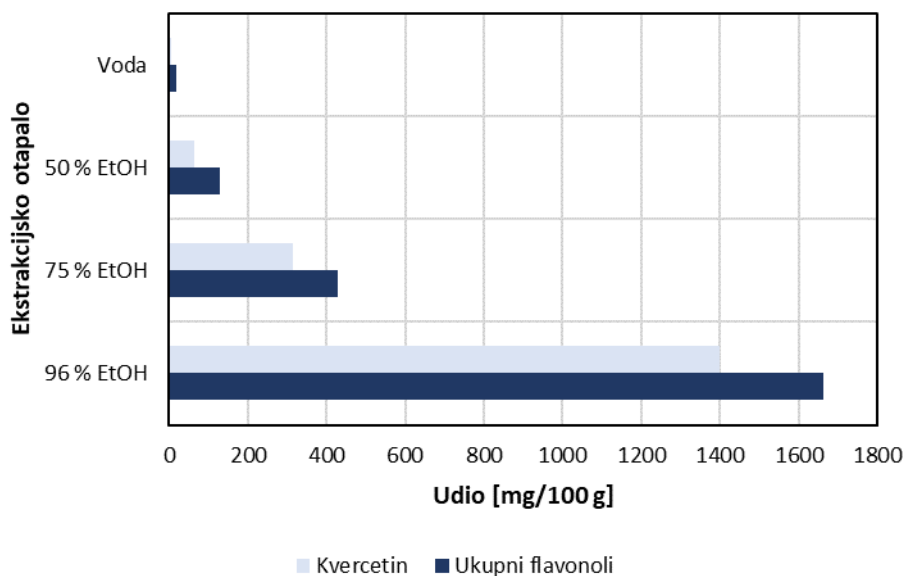
etanolom ekstrahiralo se  $5,26 \pm 0,47$  g/100 g flavonoida i  $1,59 \pm 0,11$  g/100 g proteina, dok se u vodi ekstrahiralo samo  $0,35 \pm 0,16$  g/100g flavonoida te  $0,22 \pm 0,11$  g/100 g proteina. Šećeri su se kao i kod taloga kave najviše ekstrahirali vodom ( $2,04 \pm 0,10$  g/100 g), a najmanje 96 % etanolom ( $0,61 \pm 0,05$  g/100 g). U usporedbi s metanolnom ekstrakcijom provedene prilikom karakterizacije sirovine, subkritičnom ekstrakcijom ekstrahirano je 50 % više polifenola i 84 % više flavonoida.

**Tablica 7** Kemijski sastav ekstrakata ljuske crvenog luka

Ekstrakcijsko otapalo	Ukupni polifenoli [g/100 g]	Ukupni flavonoidi [g/100 g]	Topivi proteini [g/100 g]	Ukupni šećeri [g/100 g]
96 % etanol	$4,25 \pm 0,30$	$5,26 \pm 0,47$	$1,59 \pm 0,11$	$0,61 \pm 0,05$
75 % etanol	$2,51 \pm 0,38$	$1,92 \pm 0,17$	$1,14 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,08$
50 % etanol	$1,07 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,02$
Voda	$0,57 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,16$	$0,22 \pm 0,11$	$2,04 \pm 0,10$
<b>Ukupno</b>	$8,40 \pm 0,38$	$8,16 \pm 0,47$	$3,47 \pm 0,11$	$4,11 \pm 0,10$

**Slika 8** Razdioba kvercetina i ukupnih flavonola u ekstraktima ljuske crvenog luka

Analizom polifenolnog profila ekstrakata ljuske crvenog luka utvrđeno je da kvercetin čini gotovo 85 % ukupnih flavonola ekstrahiranih ovom metodom. Kao što je prikazano na **Slici 8**



najviše kvercetina ekstrahirano je pomoću 96 % etanola nakon čega slijedi 75 % etanol te 50 % etanol, dok voda, kao završna faza ekstrahira neznajne količine.

## 4.2. USPJEŠNOST SUBKRITIČNE EKSTRAKCIJE



Kemijski sastav taloga kave i ljuske crvenog luka (**Tablica 9**) određivan je standardnim kemijskim metodama kako slijedi u okviru istraživanja ImoLipWaste projekta (IP-2020-02-6878). Udio suhe tvari određen je sušenjem do konstante mase pri 103 °C; ukupni proteini određivani su metodom po Kjeldahl-u; slobodne masti metodom po Soxhlet-u; sirova vlakna ISO 6865:2000 metodom; NDF, ADF i ADL metodom po van Soest-u; ukupni polifenoli spektrofotometrijski Folin-Cioacaltea metodom, ukupni flavonoidi spektrofotometrijski uz aluminijev klorid kao reagens; udio pepela žarenjem pri 550 °C.

**Tablica 9** Kemijski sastav taloga kave i ljuske crvenog luka\* (rezultati ImoLipWaste projekta)

Parametar	Talag kave	Ljuska crvenog luka
Suha tvar [g/100 g]	39,88 ± 0,75	82,08 ± 0,16
Ukupni proteini [g/100 g s.t.]	16,68 ± 0,06	2,82 ± 0,03
Slobodne masti [g/100 g s.t.]	10,58 ± 1,63	1,26 ± 0,30
Sirova vlakna [g/100 g s.t.]	29,86 ± 3,13	34,41 ± 1,50
Sirova vlakna (NDF) [g/100 g s.t.]	58,73 ± 1,31	41,63 ± 1,84
<i>Celuloza (ADF-ADL) [g/100 g s.t.]</i>	23,59 ± 0,15	37,48 ± 0,34
<i>Hemiceluloza (NDF-ADF) [g/100 g s.t.]</i>	23,35 ± 1,51	2,53 ± 1,46
<i>Lignin (ADL) [g/100 g s.t.]</i>	11,79 ± 0,35	1,62 ± 0,03
Ukupni polifenoli [g/100 g s.t.]	2,88 ± 0,40 (11,26 ± 0,20)**	5,59 ± 0,26 (8,40 ± 0,38)**
Ukupni flavonoidi [g/100 g s.t.]	1,98 ± 0,13 (4,83 ± 0,15)**	4,34 ± 0,35 (8,16 ± 0,47)**
Pepeo [g/100 g s.t.]	1,80 ± 0,03	9,98 ± 0,51

\* rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija 5 neovisnih pokusa; u slučaju određivanja ukupnih polifenola i flavonoida svako određivanje u neovisnim pokusima je provedeno u 3 paralele

\*\* udio određen na temelju sadržaja polifenola i flavonoida u ekstraktima nakon sekvencijalne ekstrakcije tijekom pripreme nosača

Iz **Tablice 9** je vidljivo da u slučaju ukupnih polifenola i flavonoida uspješnija metoda ekstrakcije navedenih bioaktivnih komponenti se pokazala subkrična ekstrakcija u odnosu na standardnu metodu ekstrakcije.

## **5. ZAKLJUČCI**

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

- Subkritičnom ekstrakcijom moguće je iz taloga kave i ljuske crvenog luka ekstrahirati bioaktivne komponente.
- Najznačajniji polifenoli u talogu kave su kafein, klorogenska kiselina, kafeinska kiselina te ferulična kiselina.
- Najznačajniji flavonol u ljusci crvenog luka je kvercetin.
- Flavonoidi iz obje sirovine su najviše ekstrahirani 96 % etanolom.
- Polifenoli ljuske crvenog luka najviše su se ekstrahirali u 96 % etanolu, dok su polifenoli taloga kave najekstrahibilniji 50 % etanolom.
- Najbolje otapalo za ekstrakciju topivih proteina ljuske crvenog luka je 96 % etanol.
- Najbolje otapalo za ekstrakciju topivih proteina taloga kave je 50 % etanol.
- Šećeri su iz obje sirovine najbolje su ekstrahirani vodom.
- Sekvencijska subkritična ekstrakcija pokazala se kao uspješnija metoda za ekstrakciju bioaktivnih spojeva u odnosu na standardnu metodu ekstrakcije.

## **6. LITERATURA**

- Batista MJPA, Avila AF, Franca AS, Oliveira LS: Polysaccharide-rich fraction of spent coffee grounds as promising biomaterial for films fabrication. *Carbohydrate polymers* 233:115851, 2020.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Emmanuel SA, Yoo J, Kim EJ, Chang JS, Park YI, Koh SC: Development of functional composts using spent coffee grounds, poultry manure and biochar through microbial bioaugmentation. *Journal of environmental science and health, part B* 52:802-811, 2017.
- Generalić E: "Dielektrična konstanta." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. KTF-Split. 2022. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=dielektri%C4%8Dna+konstanta> [03.11.2022]
- IOM, Institute of Medicine: Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations. National academies press, Washington (DC), 2001.
- Jakobek L, Ištuk J, Buljeta I, Voća S, Žlabur JŠ, Babojelić MS: Traditional, indigenous apple varieties, a fruit with potential for beneficial effects: their quality traits and bioactive polyphenol contents. *Foods* 9(1):52, 2020.
- Jašić M, Galali Y, Šubarić D, Lončarić A, Jozinović A, Miličević B: Biološki aktivne komponente u nusproizvodima prehrambene industrije. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3*, str. 25-56. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, 2021.
- Komes D, Šeremet D, Mandura A, Cebin A: Valorizacija bioaktivnog potencijala nusproizvoda kave. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3*, str. 207-237. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, 2021.
- Marcus, Y: Extraction by subcritical and supercritical water, methanol, ethanol and their mixtures. *Separations* 5(1), 4 2018.
- Martinez-Saez N, Garcia AT, Pérez ID, Rebollo-Hernanz, Mesías M, Morales FJ, Martin-Cabrejas MA, del Castillo MD: Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. *Food chemistry* 216:114-122, 2017.
- Matić P, Sabljčić M, Jakobek L: Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 100:1795–1803, 2017.

- Michalak-Majewska M, Teterycz D, Muszyński S, Radzki W, Sykut-Domańska E: Influence of onion skin powder on nutritional and quality attributes of wheat pasta. *PLoS ONE* 15(1):e0227942 2020.
- Nehlig A, Daval J-L, Debry G: Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain research reviews* 17:139-170, 1992.
- Om-Hashem A, Al-Sayed H, Yasin N, Afifi E: Effect of different extraction methods on stability of anthocyanins extracted from red onion peels (*Allium cepa*) and its uses as food colorants. *Bulletin of the National Nutrition Institute of the Arab Republic of Egypt* 47:1-24, 2016.)
- OP SIS AB: OP SIS LiquidLINE SoxROC Extraction Unit. 2016.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S: Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical engineering journal* 6:153-162, 2000.
- Piechowiak T, Grzelak-Blaszczyk K, Bonikowski R, Balawejder M: Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *LWT- Food science and technology* 117:108614, 2020.
- Primorac Lj, Flanjak I: Kontrola kakvoće hrane. *Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek*, 2012.
- Sampaio A, Dragone G, Vilanova M, Oliveira JM, Teixeira JA, Mussatto SI: Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *LWT- Food science and technology* 54:557-563, 2013.
- Sayed HS, Hassan NMM, Abed El khalek MH: The effect of using onion skin powder as a source of dietary fiber and antioxidants on properties of dried and fried noodles. *Current science international* 3(4): 468-475, 2014.
- Severini C, Caporizzi R, Giuseppina Fiore AG, Ricci I, Oral MO, Derossi A: Reuse of spent espresso coffee as sustainable source of fibre and antioxidants. A map on functional, microstructure and sensory effects of novel enriched muffins. *LWT- Food science and technology* 119:108877, 2019.
- Stjepanović M, Budžaki S, Velić N, Ostojčić M, Šereš Z, Maravić N, Brekalo M, Strelec I: Valorizacija i karakterizacija otpadne biomase crvenog luka. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 4*, str 349-363. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2022.
- Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Estruch R, Lamuela-Raventós RM: Coffee polyphenols and high cardiovascular risk parameters. u *coffee in health and disease prevention*, str 387 – 394. Academic press, SAD, 2015.

- Tonyali B, Sensoy I: The effect of onion skin powder addition on extrudate properties. *Acta horticulturae* 1152:393-398, 2017.
- Vladić J, Vidović S, Jokić S: Primjena ekstrakcije subkritičnom vodom u svrhu valorizacije otpada i nusproizvoda prehrambene industrije. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 4*, str. 61-88. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2022.
- Wrolstad R.E, Acree T.E, Decker E.A, Penner M.H, Reid D.S, Schwartz S.J, Shoemaker C.F, Smith D.M, Sporns P: *Handbook of food analytical chemistry, volume 1: water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*. John Wiley & Sons, SAD 2005.
- Yoo KM, Song MR, Ji EJ: Preparation and sensory characteristics of chocolate with added coffee waste. *The korean journal of food and nutrition* 24:111-116, 2011.