

# Utjecaj procesa sušenja i odabira otapala na ekstraktibilnost fenolnih spojeva komine maslina

---

Šrajbek, Žaklina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:793452>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Žaklina Šrajbek

775/PI

**UTJECAJ PROCESA SUŠENJA I  
ODABIRA OTAPALA NA  
EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH  
SPOJEVA KOMINE MASLINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Klare Kraljić. Diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta br. 9550 - Zelena otapala za zelene tehnologije.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se doc.dr.sc. Klari Kraljić na pruženoj pomoći i izdvojenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada te stručnim savjetima koji su izradu učinili lakšom.

Hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili obrazovanje i beskonačno me poticali u tome.

Hvala mojoj sestri Mihaeli s kojom sam prolazila sve dobre i loše trenutke tijekom obrazovanja te na pruženoj podršci i ohrabrenju u najtežim trenucima.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ PROCESA SUŠENJA I ODABIRA OTAPALA NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA

*Žaklina Šrajbek, 775/PI*

**Sažetak:** Komina masline je nusproizvod koji se odlikuje visokom koncentracijom fenolnih spojeva te se može koristiti kao jeftina sirovina za njihovu ekstrakciju. S obzirom da je svježa komina masline pogodna mikrobiološkoj i enzimatskoj aktivnosti, nužno ju je osušiti kako bi se sigurno skladištila. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj procesa sušenja na ekstraktibilnost fenolnih spojeva. Na mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru/reaktoru provedene su ekstrakcije fenolnih spojeva iz svježe i suhe komine 60%-tnim metanolom. Sušenjem je došlo do razgradnje fenolnih spojeva, no koncentracija nekih fenolnih spojeva veća je u suhoj komini. Veća koncentracija uočena je za vrlo traženi fenolni spoj vanilin. Drugi cilj rada bio je odrediti ekstraktibilnost fenolnih spojeva ekstrakcijom 60%-tnim metanolom i prirodnim eutektičkim otapalom, 70%-tnim kolin citratom. Ekstrakcije su provedene iz suhe komine na mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru/reaktoru. Gotovo dvostruko veća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva ekstrahirana je 70%-tnim kolin citratom, stoga ono predstavlja učinkovito otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva, a ujedno je ekološki prihvatljivo.

**Ključne riječi:** komina maslina, polifenoli, mikrovalno-ultrazvučna ekstrakcija, prirodna eutektička otapala

**Rad sadrži:** 41 stranica, 12 slika, 8 tablica i 54 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Klara Kraljić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Doc. dr. sc. Klara Kraljić
3. Prof. dr. sc. Dubravka Škevin
4. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (zamjena)

**Datum obrane:** 19. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Oil and Fat Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF DRYING AND SOLVENT CHOICE ON THE EXTRACTABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM OLIVE POMACE

*Žaklina Šrajbek, 775/PI*

**Abstract:** Olive pomace is a byproduct that contains high amounts of phenolic compounds and can be used as a cheap material for their extraction. Fresh olive pomace is susceptible to microbiological and enzymatic degradation and it is necessary to dry it so it can be safely stored. The aim of this study was to determine the influence of the drying process on the extraction of phenolic compounds. By using microwaves and ultrasound assisted extractor, phenolic compounds were extracted from fresh and dry olive pomace with 60% methanol. Even though drying leads to significant degradation of the total phenolic compounds, the concentration of some phenolic compounds is higher in dry olive pomace. A higher concentration of vanillin was observed. Another aim of this study was to determine the impact of the extraction solvent, 60% methanol, and a natural deep eutectic solvent, 70% choline citrate on extractability of phenolic compounds. Extractions were carried out on a dry olive pomace by using microwaves and ultrasound. Almost two times higher concentrations of total phenolic compounds were extracted with choline citrate, so it is an effective solvent for extraction of phenolic compounds that is also environmentally acceptable.

**Keywords:** olive pomace, phenolic compounds, ultrasound-microwave assisted extraction, natural deep eutectic solvents

**Thesis contains:** 41 pages, 12 figures, 8 tables and 54 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Klara Kraljić, Assistant professor

**Reviewers:**

1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
2. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
3. PhD. Dubravka Škevin, Full professor
4. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 19 July 2017

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. MASLINA.....	2
2.2. MASLINOVO ULJE .....	3
2.2.1. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja .....	4
2.2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja.....	4
2.3. KOMINA MASLINA .....	7
2.4. FENOLNI SPOJEVI.....	8
2.4.1. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva .....	11
2.4.2. Fenolni spojevi komine masline .....	12
2.5. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Komina.....	18
3.1.2. Reagensi .....	18
3.1.3. Aparatura.....	19
3.2. METODE RADA .....	20
3.2.1. Određivanje udjela vode u komini .....	20
3.2.2. Određivanje udjela ulja u komini.....	21
3.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstratoru/reaktoru .....	22
3.2.4. Određivanje sastava fenolnih spojeva komine maslina .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. UDIO VODE I ULJA U KOMINI MASLINA.....	25
4.2. UTJECAJ PROCESA SUŠENJA NA SASTAV I UDJEL FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA.....	26
4.3. UTJECAJ IZBORA OTAPALA NA SASTAV I UDJEL EKSTRAKATA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA.....	30
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>36</b>



## 1. UVOD

Maslina je jedno od najstarijih i najpoznatijih biljaka Sredozemlja. Prvenstveno se uzgaja zbog proizvodnje djevičanskog i ekstra djevičanskog maslinovog ulja, koje se smatra jedno od glavnih sastojka mediteranske prehrane. Nusproizvod zaostao nakon izdvajanja ulja iz ploda masline je komina masline. Komina masline predstavlja velik ekološki problem na području Sredozemlja. Razlog tome su organski spojevi, zaostali u komini masline, koji se razgrađuju do fitotoksičnih spojeva. Zbog toga velik broj istraživanja ukazuje na mogućnost korištenja komine kao ekonomski i energetski prihvatljivu sirovinu u različite svrhe. S obzirom da veliki udio komine masline čine fenolni spojevi, komina predstavlja jeftinu sirovinu za ekstrakciju ovih važnih antioksidanasa.

Zbog negativnih strana konvencionalnih metoda ekstrakcije organskim otapalima, razvijaju se nove ekonomski i energetski prihvatljive metode ekstrakcije. Neke od njih su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ultrazvukom čime se znatno smanjuje vrijeme ekstrakcije, ali i utrošak energije. Velika usmjerenost posvećuje se „zelenim otapalima“ koja su prihvatljiva za okoliš. Tu spadaju prirodna eutektička otapala koja su ujedno jednostavna i jeftina za pripremu.

U ovom radu usporedit će se ekstrakcija fenolnih spojeva iz svježe i suhe komine te ekstrakcija eutektičkim otapalom u odnosu na organsko otapalo. U ovom istraživanju primijenit će se mikrovalna ekstrakcija i mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Istražit će se utječe li sušenje komine masline na koncentraciju i sastav fenolnih spojeva. Kao prirodno eutektičko otapalo koristit će se kolin citrat te će se istražiti mogućnost zamjene metanola kolin citratom pri ekstrakciji fenolnih spojeva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLINA

Maslina je zimzeleno stablo u koju spada 35 vrsta zimzelenog grmlja i drveća roda *Oliva* i porodice *Oleaceae* (Boskou, 2006). Stablo masline živi i do nekoliko stotina godina (van Doosselaere, 2013), a raste u tropskom i umjereno toplom području. Najčešće se pod imenom „maslina“ smatra vrsta *Olea europaea*, koja se uzgaja zbog svojih jestivih plodova. Postoje teorije da je predak maslinovom ulju vrsta *Olea chrysophylla*, nađena u Aziji i Africi, dok drugi smatraju da je praotac mediteranska divlja maslina *Olea oleaster*. Treća teorija govori da je *Olea oleaster* inermidijer u razvoju divlje masline *Olea chrysophylla* do vrste *Olea europaea*. Kultivacija masline počela je četiri tisućljeća pr. Kr. na području današnje Sirije i Palestine (Boskou, 2006).

Stablo masline naraste od 3 do 20 metara visine (slika 1). Uzgojem su dobivene sorte nešto nižeg rasta, 4-5 metara visine, a uobičajene su u mnogim zemljama uzgajivača. Deblo mladog stabla je zeleno-sive boje i glatkih površina, a s vremenom ono postaje neravno s čestim uvijanjem i nastankom šupljina, dok kora poprima tamnosivu boju. Lišće je duguljasto i usko sa zelenom bojom lica te svilenkasto bijelom bojom naličja. Cvjetovi masline su žućkasto-bijele boje, malih dimenzija. Iako je stablo masline vrlo otporno na nepovoljne uvjete, ono zahtjeva odgovarajuću njegu tijekom rasta, što uključuje: navodnjavanje, obrezivanje, suzbijanje štetočina te kontrolu berbe (Boskou, 2006).



**Slika 1.** Stablo masline (Annmarie, 2017)

Plod masline je koštunica ovalnog oblika, sastavljena od perikarpa i endokarpa. Sazrijevanjem ploda, boja se od svijetlozelene mijenja u crnu (Boskou, 2006). Perikarp sadrži 50-60% vode i 20-25% ulja, a iz njega se dobiva djevičansko maslinovo ulje (van Doosselaere, 2013). Stablo masline postiže punu produktivnost nakon sedme godine ukoliko se nasadi navodnjavaju, a bez navodnjavanja, puna produktivnost postiže se nakon jedanaeste godine (Boskou, 2006). Najveći proizvođači maslina su Španjolska, Italija, Grčka, Turska i Maroko (FAOSTAT, 2017).

## 2.2. MASLINOVO ULJE

Upotreba djevičanskog maslinovog ulja poznata je još od razdoblja prije nove ere (Boskou, 2002). Ono se najviše proizvodi i upotrebljava u mediteranskim zemljama (Boskou, 2011), posebice u Španjolskoj koja proizvodi oko 36% ukupne proizvodnje maslinovog ulja u svijetu, a zatim slijede Italija, Grčka, Tunis i Maroko (slika 2) (FAOSTAT, 2017). Godišnje se proizvede više od 3 milijuna tona djevičanskog maslinovog ulja (FAOSTAT, 2017; Boskou, 2011). Djevičansko maslinovo ulje smatra se jednim od osnovnih sastojaka mediteranskog zdravog načina života, zbog čega raste njegova potražnja i u zemljama sjeverne Europe te SAD-a i Kanade. Brojna istraživanja su pokazala da mediteranski način prehrane ima pozitivnu ulogu u prevenciji nekih bolesti, posebice koronarne bolesti srca (Boskou, 2011).



**Slika 2.** Glavni svjetski proizvođači maslinovog ulja u 2014. godini (FAOSTAT, 2017)

Na tržištu postoje ulja od ploda i komine maslina, a razvrstavaju se u kategorije, pod sljedećim nazivima: ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko maslinovo ulje, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja te ulje komine maslina (Provedbena uredba, 2012).

### 2.2.1. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja

Djevičanska maslinova ulja su ulja dobivena od ploda masline isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima pod uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja, koja nisu drugačije obrađena osim pranjem, dekantacijom, centrifugiranjem ili filtriranjem, isključujući ulja dobivena upotrebom otapala ili dodavanjem pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja ili ulja dobivena reesterifikacijom i miješanjem s uljima drugih vrsta. (Uredba, 2013). Plodovi masline najprije se podvrgavaju procesu mljevenja, za čiju se upotrebu koriste kameni mlinovi ili metalni mlinovi. Sve je češća upotreba metalnih mlinova, nakon čega je nužno provesti postupak miješenja kako bi se razbila emulzija nastala tijekom mljevenja. Nakon mljevenja i miješenja dobiva se maslinovo tijesto iz kojeg se izdvaja ulje. Četiri su moguća načina izdvajanja ulja, a najstariji i još uvijek korišten postupak, jest prešanje. Zbog pritiska tijekom prešanja tekuća faza, koju čini ulje s vodom, izdvaja se od čvrste faze, tj. komine. Nakon toga slijedi postupak centrifugiranja kojim se ulje odvaja od vode. Drugi postupak proizvodnje maslinovog ulja je centrifugalna ekstrakcija s tri faze. Tijekom ovog postupka dodaje se topla voda maslinovom tijestu u svrhu boljeg izdvajanja ulja. Treći način dobivanja ulja je upotreba centrifugalnih ekstraktora s dva izlaza, koja ne podrazumijeva dodavanje tople vode, čime se značajno smanjuje količina otpadne vode. Procjeđivanje je četvrti način izdvajanja ulja pomoću kojeg se ulje izdvaja na temelju razlike u površinskoj napetosti (Boskou, 2011). Filtracija je zadnji korak pri proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja. Filtriranjem se uklanjaju suspendirane čvrste tvari, čime se dobije ulje prihvatljivo za potrošače (Frankel i sur., 2013).

### 2.2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja

Djevičansko maslinovo ulje je smjesa triacilglicerola s malim udjelom slobodnih masnih kiselina, mono i diacilglicerola te negliceridnih spojeva, kojih ima svega 0,5-1,5%.

Najzastupljenija masna kiselina u maslinovom ulju je oleinska kiselina i čini 55-85% sastava triacilglicerola (Boskou, 2011). Oleinska kiselina je mononezasićena masna kiselina (18:1), a njezin povećan unos u prehrani smanjuje rizik od nastajanja kardiovaskularnih bolesti (Lopez-Huertas, 2010). Osim oleinske masne kiseline, u značajnim udjelima prisutne su i palmitinska (16:0) i linolna kiselina (18:2) s udjelom 7,5-20%, stearinska kiselina (18:0) s udjelom 0,5-5% i palmitoleinska kiselina (16:1) s udjelom 0,3-3,5%. U maloj količini nalaze se linoleinska, lignocerinska i arahidonska kiselina (tablica 1) (Boskou, 2011).

**Tablica 1.** Sastav masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju (Boskou, 2011)

Masna kiselina		Udio [% od ukupnih masnih kiselina]
miristinska kiselina	14:0	0,0 – 0,1
palmitinska kiselina	16:0	7,5 – 20,0
palmitoleinska kiselina	16:1	0,3 – 3,5
heptadekanska kiselina	17:0	0,0 – 0,5
heptadecenska kiselina	17:1	0,0 – 0,6
stearinska kiselina	18:0	0,5 – 5,0
oleinska kiselina	18:1	55,0 – 83,0
linolna kiselina	18:2	3,5 – 21,0
linoleinska kiselina	18:3	0,0 – 1,0
arahidonska kiselina	20:0	0,0 – 0,8
behenska kiselina	22:0	0,0 – 0,3
lignocerinska kiselina	24:0	0,0 – 1,0

Sastav masnih kiselina razlikuje se ovisno o mjestu proizvodnje, klimi, sorti i stupnju zrelosti ploda. Kao i sva druga biljna ulja, djevičansko maslinovo ulje u molekuli triacilglicerola najčešće u položaju 2 sadrži oleinsku kiselinu, a rjeđe palmitinsku i stearinsku kiselinu. U djevičanskom maslinovom ulju najzastupljeniji su OOO triacilgliceroli koji čine 40-59% ukupnih triacilglicerola. Važan udio čine OOL triacilgliceroli i SOO triacilgliceroli s udjelom do 20% (O-oleinska kiselina; L-linolna kiselina; S-stearinska kiselina). Sadržaj slobodnih masnih kiselina (SMK) ovisi o vrsti ulja i važan je parametar kod utvrđivanja stupnja kvalitete ulja (Boskou, 2011). Kod ekstra djevičanskih maslinovih ulja udio SMK (izraženih kao % oleinske kiseline) ne smije prelaziti 1,0%, a kod djevičanskih maslinovih ulja udio SMK ne

smije prelaziti 2,0% (Uredba, 1991). Mono i diacilgliceroli u maslinovom ulju nalaze se zbog nepotpune biosinteze triacilglicerola ili su oni posljedica hidrolitičkog kvarenja. Djevičansko maslinovo ulje sadrži oko 2% mono i diacilglicerola. U sastavu maslinovog ulja, u malim količinama, nalaze se fosfolipidi, voskovi, steroli, alifatski alkoholi, fenolni spojevi, tokoferoli te pigmenti klorofili i karotenoidi (Boskou, 2011).

Tokoferoli su vitamini topivi u mastima. Njihova prisutnost daje stabilnost ulju, a u ljudskom organizmu oni djeluju kao antioksidansi. Udio tokoferola u maslinovom ulju varira od 5 do 300 mg kg<sup>-1</sup> (Boskou, 2011). S obzirom na broj metilne skupine koja je vezana za heterociklički ostatak, razlikujemo  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol (Gustone, 2013). U maslinovom ulju  $\alpha$ -tokoferol čini 95% od ukupnih tokoferola (Boskou, 2011).

Karotenoidi i klorofili su spojevi koji ulju daju boju (Verhoeff i van Dujin, 2013). Karotenoidi ulje štite od fotooksidacije, a u djevičanskom maslinovom ulju ih ima 1-20 mg kg<sup>-1</sup>. Od karotenoida, u maslinovom ulju najviše su prisutni  $\beta$ -karoten i lutein. Klorofili su pigmenti odgovorni za zelene nijanse maslinovog ulja (Boskou, 2011). Ovisno o zrelosti maslina i postupku dobivanja ulja, djevičanska maslinova ulja sadrže 10-30 mg kg<sup>-1</sup> klorofila (Gustone, 2013; Boskou, 2011).

U usporedbi s drugim uljima, djevičansko maslinovo ulje pokazuje iznimnu otpornost prema oksidaciji i polimerizaciji tijekom dubokog prženja na visokoj temperaturi. Ovo pozitivno svojstvo vjerojatno proizlazi zbog niskog jednog broja, a visokog sadržaja tokoferola, skvalena i  $\Delta^5$ -avenasterola. Taj sterol spada u grupu desmetilsterola kojih ima 1000-2000 mg kg<sup>-1</sup> maslinovog ulja. Osim ove grupe sterola u djevičanskom maslinovom ulju nalaze se metilsteroli, dimetilsteroli (triterpenski alkoholi) te triterpenski dialkoholi. Od ukupnih sterola,  $\beta$ -sitosterol čini 75-90%. Voskovi su esteri masnih alkohola i masnih kiselina, a djevičansko maslinovo ulje ih sadrži u vrlo maloj količini, do 350 mg kg<sup>-1</sup> ulja (Boskou, 2011).

Jedno od specifičnosti djevičanskog maslinovog ulja u odnosu na druga ulja jest prisutnost velikih količina fenolnih spojeva. Fenolni spojevi važni su za aromu i stabilnost maslinovog ulja. Ovisno o sorti masline, načinu ekstrakcije te uvjetima proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja udio fenolnih spojeva varira od 100 do 300 mg kg<sup>-1</sup>. Najznačajniji fenolni spojevi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su: apigenin, kavaska kiselina, *o*- i *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, galna kiselina, homovanilinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, hidroksitirozol, luteolin, oleuropein, pinosresinol, protokatehinska kiselina, sinapinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, vanilin i elenolna te cimetna kiselina koje se ubrajaju u ovu skupinu iako nemaju fenolni prsten (Boskou, 2011). Fenolni spojevi detaljnije su obrađeni u podpoglavlju 2.4.

### 2.3. KOMINA MASLINA

Komina maslina je industrijski nusproizvod dobiven nakon izdvajanja ulja iz plodova masline (Cardoso i sur., 2005). Otprilike se od 100 kg maslina dobije 35 kg komine (Nasopoulou i Zabetakis, 2013). To je tamna smjesa, intenzivnog mirisa i umjereno kisele pH vrijednosti. Sastav komine masline varira ovisno o sorti masline i postupku obrade ploda masline (Nogueira, 2015). Različiti postupci proizvodnje maslinovog ulja rezultiraju različitim kemijskim sastavom komine. Centrifugalnom ekstrakcijom s dvije faze dobije se komina s većim udjelom vode, a manjim udjelom ulja, dok se upotrebom centrifugalnih ekstraktora s tri izlaza dobije komina bogatija uljem, a siromašnija vodom (Frankel i sur., 2013). Komina masline sadrži mali udio ulja (Nasopoulou i Zabetakis, 2013) te je uglavnom sastavljena od vode koje ima oko 65% (Nogueira, 2015), polisaharida i drugih šećera te fenolnih spojeva i drugih pigmenata (tablica 2) (Nasopoulou i Zabetakis, 2013). Komina se podvrgava sušenju na 8-10% vlage, a u tu svrhu koriste se sušilice s vrućim zrakom. Osušena komina masline sadrži 45-50% koštice i 50-55% pulpe. S obzirom da pulpa sadrži 10-15% ulja, ulje se iz komine masline izdvaja ekstrakcijom (van Doosselaere, 2013). Komina masline sadrži znatan udio lignina koji otežava njenu razgradnju mikroorganizmima i njihovim enzimima (Nogueira, 2015).

**Tablica 2.** Sastav suhe komine masline (Nogueira, 2015)

Komponenta	Udio [%]
lipidi	7 - 19
proteini	4 - 11
u vodi topivi ugljikohidrati	1 - 16
u vodi topivi fenoli	0,6 - 2
lignin	32 - 55
hemiceluloza	27 - 41
celuloza	14 - 25

Komina masline se podvrgava ekstrakciji s heksanom pri čemu se dobije sirovo ulje komine masline. S obzirom da takvo ulje sadrži veći udio fosfolipida i voskova, obavezno se provodi postupak degumiranja. Nakon toga se provodi postupak rafinacije te se na taj način proizvede rafinirano ulje komine maslina. Rafinacija se primjenjuje za uklanjanje pigmenata,

slobodnih masnih kiselina i produkata oksidacije, koje ulje čine neprikladnim za upotrebu (Boskou, 2011). Sam proces rafinacije obuhvaća neutralizaciju, bijeljenje, vinterizaciju i deodorizaciju (Kochhar, 2011; Andersen, 1962). Tijekom rafinacije primjenjuju se visoke temperature koje mogu uzrokovati gubitak poželjnih sastojaka (Boskou, 2011), uključujući vitamine, karotene i tokoferole. Zbog toga se proces rafinacije mora provoditi tako da se maksimalno uklone nepoželjni sastojci ulja, a gubitak poželjnih sastojaka smanji na najmanju moguću mjeru (Gustone, 2011).

Komina masline predstavlja problem onečišćenja okoliša na mediteranskim područjima gdje se u vrlo kratkom vremenu proizvede u velikim količinama. Glavni problem onečišćenja okoliša predstavljaju velike količine fenolnih spojeva, lipida i organskih kiselina koje zaostaju u komini masline. Razlog je što se ovi spojevi razgrađuju do fitotoksičnih spojeva koji imaju negativne učinke na populaciju mikroorganizma u tlu i vodenom ekosustavu (Roig i sur., 2006). Osim toga, komina masline je izvor neugodnih mirisa koji se pripisuju hlapivim masnim kiselinama, naročito maslačnoj, kaprnskoj, valerijanskoj i izobutiričnoj kiselini (Bhatnagar i sur., 2014). S obzirom da komina masline predstavlja jedan od glavnih otpada u mediteranskim zemljama, ona pokazuje velik potencijal kao sastojak u hrani za životinje i riba (Nasopoulou i Zabetakis, 2013). U novije vrijeme, komina masline predstavlja ekonomski i energetski prihvatljivu sirovinu za proizvodnju metana anaerobnom kodigestijom (Riggio i sur., 2015). Također se razmatraju postupci ekstrakcije organskih spojeva, naročito fenolnih spojeva koji pokazuju veliku antioksidacijsku aktivnost i potencijal u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Roig i sur., 2006).

## **2.4. FENOLNI SPOJEVI**

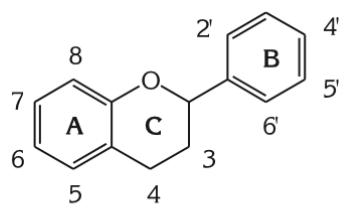
Jedna od najmnogobrojnijih skupina fitokemikalija u prirodi su fenolni spojevi, sekundarni metaboliti biljaka u kojima obavljaju najrazličitije uloge. Od vrlo jednostavnih spojeva antocijana koji su zaslužni za boju biljaka, do vrlo složenih spojeva tanina koji su važni za zaštitu od insekata, fenolni spojevi danas broje preko 8000 spojeva (Šubarić i sur., 2010). U biljkama ovi spojevi djeluju antimikrobno, kao fotoreceptori, kao agensi za privlačenje pozornosti (Kazazić, 2004), a zanimanje za njima raste zbog njihove antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004; El Gharras, 2009). Fenolni spojevi su najrašireniji antioksidansi u ljudskoj prehrani. Nalaze se u voću, povrću, cjelovitim žitaricama, začинима i nekim pićima kao što su čaj i vino. Posebno bogato fenolnim spojevima je bobičasto voće (Seeram i Heber, 2007). Ovi



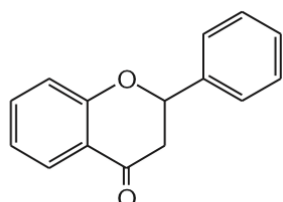
spojevi u našem organizmu pokazuju antibakterijski, antialergijski, sedativni, antimutageni učinak te imaju i druga pozitivna djelovanja (Kazazić, 2004).

Fenolni spojevi u svojoj strukturi sadrže nekoliko hidroksilnih skupina vezanih na jedan ili više aromatskih prstena. S obzirom na broj aromatskih prstena i njihov međusobni položaj, oni se dijele u nekoliko skupina. Glavne skupine fenolnih spojeva su: flavonoidi, fenolne kiseline, tanini, stilbeni i lignani (Ignat i sur., 2011).

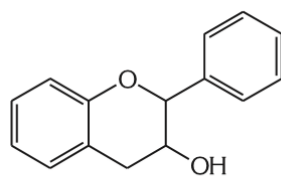
Najmnogobrojnija skupina fenolnih spojeva su flavonoidi. U biljkama flavonoidi su nositelji boje cvijeća, voća i lišća, a zajedno s ostalim fenolnim spojevima grade drvenaste dijelove, kao što su stabljike i kore (El Gharras, 2009). Flavonoidi su spojevi male molekulske mase, koji se sastoje od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u C6-C3-C6 konfiguraciju (slika 3) (Ignat i sur., 2011). Ta osnovna struktura flavonoida naziva se aglikon, no flavonoidi u biljkama dolaze u obliku glikozida (Tsao, 2010). Glikozidi su spojevi u kojima su na aglikon vezane različite jedinice monosaharida ili oligosaharida u različitoj poziciji. Osim šećera, flavonoidi mogu vezati hidroksilne i metoksilne skupine (Kazazić, 2004). S obzirom na broj hidroksilnih, metoksilnih i glikozidnih skupina te konjugaciji A i B prstena (Kazazić, 2004), flavonoidi se dalje dijele na antocijane, flavone, izoflavone, flavanone, flavonole i flavanole (slika 3) (Ignat i sur., 2011).



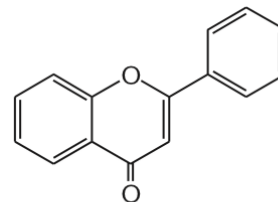
osnovna struktura



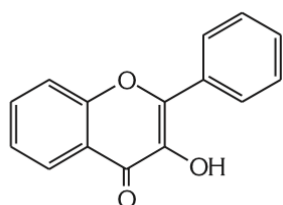
flavanon



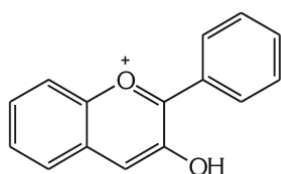
flavan-3-ol



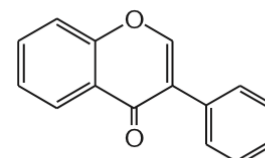
flavon



flavon-3-ol



antocijanidin



izoflavon

**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Fenolne kiseline su fenolni spojevi koji u biljkama dolaze u vezanom i slobodnom obliku. Dvije glavne skupine fenolnih kiselina su derivati cimetine kiseline i derivati benzojeve kiseline (Tsao, 2010). Derivati cimetine kiseline imaju C6-C3 strukturu, a derivati benzojeve kiseline C6-C1 strukturu (slika 4) (Ignat i sur., 2011).



**Slika 4.** Struktura derivata hidroksibenzojeve (lijevo) i hidroksicimetine kiseline (desno) (Ignat i sur., 2011)

Tanini su spojevi relativno velike molekulske mase, a dijele se na hidrolizirane i kondenzirane tanine. S obzirom da postoje velike razlike u strukturi ovih spojeva, tanini imaju različite učinke u biološkim sustavima (Ignat i sur., 2011). Stilbeni su fenolni spojevi sastavljeni od dva aromatska prstena (Teixeira i sur., 2014). U ljudskoj prehrani su prisutni u maloj količini (Ignat i sur., 2011), a uglavnom se nalaze u pokožici grožđa, stabljici i sjemenkama (Teixeira i sur., 2014). Lignani se također ubrajaju u fenolne spojeve, a nastali su spajanjem dviju cinaminskih kiselina. Nalaze se u gotovo svim biljkama u slobodnom obliku, a rjeđe dolaze u obliku glikozida (Goyal i sur., 2014).

#### 2.4.1. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva

Nedavna istraživanja pokazala su da su mnoge kronične bolesti, kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti te karcinom, posljedica oksidativnog stresa od reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (Tsao, 2010). Za sprječavanje ili usporavanje oksidativnog stresa potrebno je unositi određenu količinu antioksidanasa koji štite stanične sustave od oksidacijskih oštećenja te u konačnici smanjuju rizik od nastajanja kroničnih bolesti (Kaur i Kapoor, 2001).

Antioksidansi u hrani mogu se definirati kao bilo koje tvari koje su sposobne odgoditi, zaustaviti ili spriječiti razvoj užeglosti ili drugog neugodnog okusa kao posljedica oksidacije. Oni mogu inhibirati ili odgoditi oksidaciju na dva načina. Prvi način uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala, a komponente koje imaju ovakav učinak nazivaju se primarnim antioksidansima. Drugi način obuhvaća mehanizme koji ne uključuju direktno uklanjanje slobodnih radikala te se u tom slučaju komponente nazivaju sekundarnim antioksidansima. Sekundarni antioksidansi imaju sljedeće mehanizme djelovanja: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u ne-radikalske vrste, apsorpcija UV zračenja i deaktivacija singleton kisika (Pokorny i sur., 2001). S obzirom na veliku strukturnu raznolikost, fenolni spojevi kao antioksidansi djeluju na više različitih načina. Smatra se da mogu neutralizirati slobodne radikale doniranjem elektrona ili vodika čime oni postaju stabilni, manje reaktivni radikali. Osim toga, fenolni spojevi mogu vezati metalne ione te na taj način spriječiti oksidaciju. Neki fenolni spojevi imaju mogućnost induciranja antioksidativnih enzima koji razgrađuju hidroperokside, dok drugi uzrokuju povišenje endogenih antioksidanasa (Tsao, 2010).

## 2.4.2. Fenolni spojevi komine masline

Plod masline sadrži velik broj različitih fenolnih spojeva. U tablici 3 prikazani su najznačajniji fenolni spojevi koji se nalaze u plodu masline (Nogueira, 2015).

**Tablica 3.** Fenolni spojevi koji se nalaze u plodu masline (Nogueira, 2015)

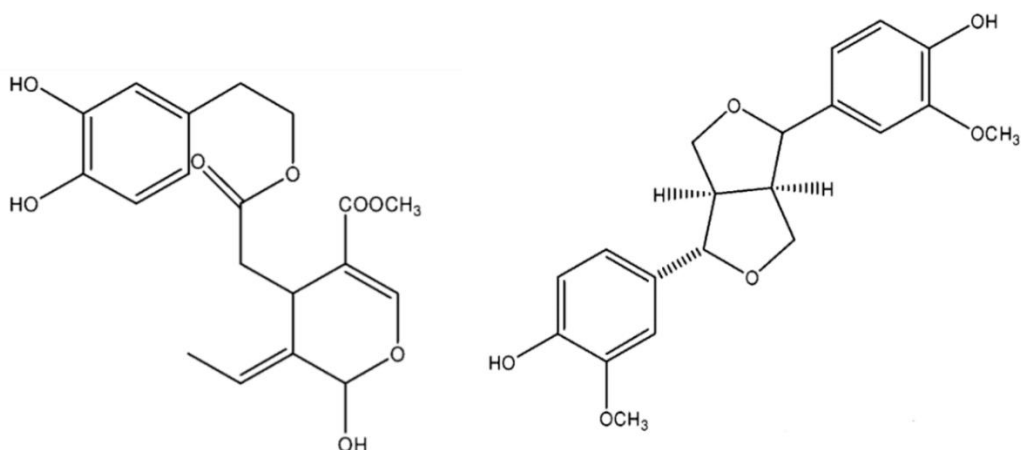
Skupina	Fenolni spoj
<b>Feniletanoidi</b>	oleuropein
	hidroksitirosol
	tirosol
<b>Derivati cimetine kiseline</b>	ferulinska kiselina
	kavska kiselina
	<i>p</i> -kumarinska kiselina
<b>Derivati benzojeve kiseline</b>	3,4-dihidroksifenilacetinska kiselina
	4-hidroksibenzojeva kiselina
<b>Benzenedioli</b>	katehol
	metil-katehol
<b>Flavonoidi</b>	cinarozid (luteolin-7- <i>o</i> -glukozid)
	apigetrin (apigenin-7- <i>o</i> -glukozid)
	kvercetin
	rutin (kvercetin-3- <i>o</i> -rutinozid)
<b>Antocijani</b>	krizantemin (cijanidin-3-glukozid)
	antirinin (cijanidin-3-rutinozid)

Tirosol i hidroksitirosol su fenolni alkoholi i jedni su od glavnih fenolnih spojeva nađenih u plodu masline (slika 5). Nalaze se u slobodnom obliku ili kao esteri tvoreći spojeve sekoiridoide (Fabiani, 2016).



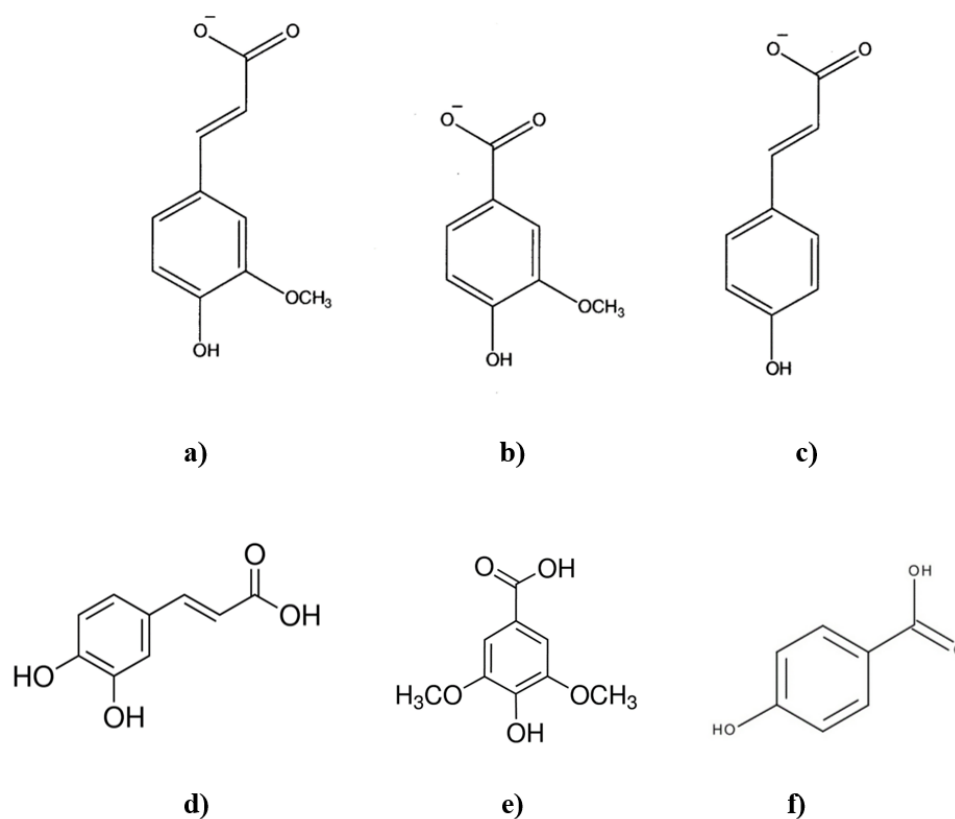
**Slika 5.** Kemijska struktura hidroksitirosola (lijevo) i tirosola (desno) (Barontini i sur., 2013)

S elenolnom kiselinom hidroksitirosol tvori ester oleuropein (slika 6). Oleuropein spada u skupinu sekoiridoida, koji su specifični za biljke iz porodice *Oleaceae*, a nalazi se u slobodnom obliku i u obliku glikozida (Tripoli i sur., 2005). Fenolni alkoholi i njihovi sekoiridoidni derivati pokazuju inhibicijski učinak na inicijacijsku i propagacijsku fazu karcinogeneze (Fabiani, 2016).



**Slika 6.** Kemijska struktura oleuropeina (lijevo) i pinoresinola (desno) (Frankel i sur., 2013)

U većoj količini prisutan je i pinoresinol koji spada u skupinu lignana (slika 6) (Tripoli i sur., 2005). Iz skupine fenolnih kiselina najznačajnije su kavaska, siringinska, vanilinska, *p*-kumarinska, ferulinska i 4-hidroksibenzojeva kiselina (slika 7) (Nogueira, 2015; Tripoli i sur., 2005).



**Slika 7.** Kemijska struktura fenolnih kiselina: a) ferulinska kiselina, b) vanilinska kiselina, c) *p*-kumarinska kiselina (Kanski i sur., 2002), d) kavaska kiselina, e) siringinska kiselina i f) 4-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich, 2017)

Fenolni spojevi se usprkos hidrofilnom karakteru, nalaze i u djevičanskom maslinovom ulju. Fenolni spojevi posjeduju velik antioksidacijski potencijal, zbog čega doprinose prehrambenoj vrijednosti maslinovog ulja (Tripoli i sur., 2005). Znatno veći udio fenolnih spojeva nalazi se u komini masline u odnosu na djevičansko maslinovo ulje. Komina sadrži i do 100 puta veću količinu fenolnih spojeva od djevičanskog maslinovog ulja. Stoga, komina masline predstavlja jeftin izvor prirodnih antioksidanasa (Frankel i sur., 2013).

## 2.5. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA

Prvi korak u izolaciji, identifikaciji i iskorištenju fenolnih spojeva iz komine masline je ekstrakcija (Tsao i Deng, 2004). To je učinkovita metoda kojom se omogućuje razdvajanje ili koncentriranje tvari. Tvari iz homogenih smjesa ekstrahiraju se na osnovi različite topivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju (Blekić i sur., 2011). Polarni antioksidansi

kao što su fenolni spojevi i njihovi glikozidi ekstrahiraju se pomoću vode, alkohola ili vodenom otopinom alkohola. Najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva je metanol, koncentracije 50-80%. Ovakva metoda ekstrakcije omogućuje dobru izolaciju fenolnih spojeva, no zahtijeva uporabu velikih količina otapala i ekološki je neprihvatljiva. Zbog toga se javljaju alternativne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom (Tsao i Deng, 2004), a umjesto organskih otapala sve češće se koriste ekološki prihvatljiva otapala, tzv. prirodna eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrovalova, mogu se dobiti slični udjeli ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama, a vrijeme ekstrakcije je kraće, što je energetski i ekonomski isplativo (Blekić i sur., 2011).

Kao što je već navedeno, konvencionalne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva povezane su s visokom potrošnjom organskih otapala i dugim vremenom ekstrakcije. Stoga se za ekološki prihvatljive metode ekstrakcije sve češće koriste prirodna eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Prirodna eutektička otapala (*eng.* Natural Deep Eutentic Solvents, NADES) su sastavljena od akceptora vodika i donora vodikove veze, kao što su vitamini, šećeri, amini, alkoholi i karboksilne kseline (García i sur., 2016). Danas je većina studija usmjerena na NADES otapala sastavljena od kvaternih amonijevih soli ili kationa imidazola i kolin-klorida (Smith i sur., 2014). Jedno od najvažnijih svojstva NADES otapala je da smjesa ima nižu točku topljenja nego svaka komponenta pojedinačno (García i sur., 2016). NADES otapala imaju sposobnost doniranja i prihvaćanja protona i elektrona, što im omogućuje formiranje vodikovih veza i bolju sposobnost otapanja (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Osim što su ekološki prihvatljiva, NADES otapala imaju izvrsnu sposobnost otapanja i ekstrakcije polarnih i nepolarnih spojeva, viskozna su i nezapaljiva te imaju zanemarivu hlapljivost na sobnoj temperaturi. Osim toga, NADES otapala su jednostavna i jeftina za pripremu (García i sur., 2016). NADES otapala se danas koriste kao otapala u organskoj sintezi i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, nanomaterijala, elektrokemiji, a primjenjuju se i kao alternativa pri procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenti (Zhang i sur., 2012).

Osim ekološki prihvatljivijih otapala, danas se sve više istražuju i nove tehnologije kao što su mikrovalovi i ultrazvuk koje posjeduju potencijal skraćivanja vremena samog procesa ekstrakcije. Mikrovalovi spadaju u elektromagnetsko zračenje, frekvencije od 1 GHz do 300 GHz. S obzirom da prolaze kroz papir, staklo i plastiku, mikrovalovi mogu uzrokovati zagrijavanje hrane. Mikrovalovi ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, već se zagrijavanje hrane odvija zbog titranja i međusobnog trenja molekula čime dolazi do oslobađanja topline.

Oni oštećuju vodikove veze uzrokujući rotaciju dipola i kretanje otopljenih iona, čime se povećava penetracija otapala u matriks (Blekić i sur., 2011).

Postoje dvije vrste mikrovalne ekstrakcije: ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Za mikrovalnu ekstrakciju važan je izbor otapala, koje mora imati što višu dielektričnu konstantu i imati mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova. Voda, etanol i metanol su otapala koja su dovoljno polarna da bi se mogli zagrijati energijom mikrovalova. Na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije utječe temperatura, tako da se povišenjem temperature poboljšava učinak ekstrakcije. No temperatura može imati negativan utjecaj jer može dovesti do razaranja termolabilnih spojeva. Mikrovalna ekstrakcija se može koristiti kao alternativna ekstrakcija standardnim metodama ekstrakcije jer omogućuje brže grijanje, bolji energetski učinak, smanjenje vremena zagrijavanja te smanjenje cjelokupnog procesa ekstrakcije jer se istovremeno ekstrakcija može provoditi na više uzoraka (Blekić i sur., 2011).

Ultrazvuk je zvučni val s frekvencijama višim od praga osjetljivosti ljudskog sluha (16 Hz – 16 kHz). Za ekstrakciju se koriste ultrazvučni valovi visokog intenziteta frekvencije od 20 do 100 kHz. Ovi ultrazvučni valovi su niskih frekvencija, ali visoke energije, odnosno razina snage je u rasponu od 10 do 1000 W cm<sup>-2</sup>. Zbog visoke snage oni uzrokuju oštećenja materijala kroz koja prolaze, izazivaju fizička oštećenja tkiva i određene kemijske reakcije, a također uništavanju mikroorganizme te inaktiviraju enzime. Utječu i na ubrzanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije te dispergiranje agregatnih sustava. Upotrebom ultrazvuka visoke snage poboljšava se proces ekstrakcije zbog boljeg prodiranja otapala u stanične materijale i osigurava se bolji prijenos mase. Ultrazvuk visoke snage oštećuje stanične stjenke čime se osigurava bolje otpuštanje sadržaja. Za procesiranje hrane važan je učinak kavitacije. Kavitacija je pojava koju karakterizira formiranje i nastanak mjehurića u nekoj tekućini. Zvučni val prolazi kroz tekući medij u kojem se generira u obliku longitudinalnih valova te se stvaraju ekspanzijski vrtlozi i razrjeđenje dijelova medija. Ekspanzijski vrtlozi utječu na stvaranje negativnog tlaka u tekućini, a kada je taj tlak dovoljno nizak da svlada intramolekularne sile, formiraju se mjehurići. Tijekom sljedeće ekspanzije vrtloga, odnosno kompresije, mjehurići pare se šire, odnosno skupljaju. Primjenom ultrazvuka visokog intenziteta veličina mjehurića snažno oscilira, a tijekom svakog ciklusa promjer mjehurića raste. Nakon brojnih ciklusa kompresije i ekspanzije mjehurići postižu svoju maksimalnu veličinu nakon čega u idućem ciklusu kompresije para naglo kondenzira, a mjehurići implodiraju. Zbog toga se ova pojava naziva „kratkotrajna ili prijelazna kavitacija“ (Herceg, 2009). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija značajno smanjuje utrošak energije, stoga se takav način ekstrakcije može ubrojiti u „ekološku“



ili „zelenu tehniku“. Ultrazvučna ekstrakcija ima jak potencijal za industrijski razvoj kao učinkovit i prihvatljiv proces ekstrakcije prirodnih antioksidativnih spojeva kojima je cilj zamjena sintetskih antioksidanasa (Khan i sur., 2010).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Komina

U ovom radu je korištena industrijski proizvedena komina masline, dobivena u uljari Agrolaguna d.d., Poreč. Analize svježe komine provedene su unutar 12 sati od proizvodnje, dok je drugi dio komine osušen na 60°C kroz 7 dana. Osušena komina samljevena je na mlinu s pločama na sitne čestice i do analiza je skladištena u zamrzivaču na -20°C.

#### 3.1.2. Reagensi

Pri izradi ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi i otapala:

- NADES otapalo 70%-tni kolin citrat, pH 0,93
- metanol (HPLC čistoće)
- mravlja kiselina
- natrijev dietilditiokarbamat, DIECA
- petroleter ( $t_v$  40-60°C).

U radu su korišteni sljedeći standardi fenolnih spojeva:

- sinapinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- tirosol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *trans*-cimetna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- kavaska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- oleuropein (Extrasynthèse)
- klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

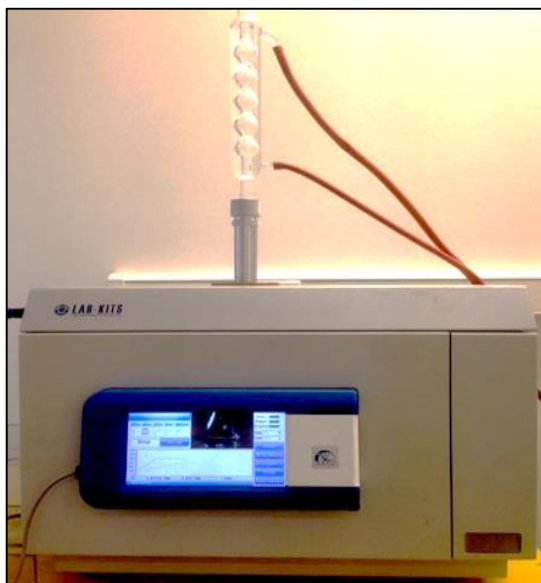
- siringinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- siringaldehid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- 4-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- galna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD).

### 3.1.3. Aparatura

Za ispitivanje u ovom radu korištena je aparatura po Soxhletu (INKO, Zagreb, Hrvatska) (slika 8), mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (Lab Kits, Hong Kong, Kina) (slika 9), centrifuga (Falcon, Colorado, SAD) i ultrazvučna kupelj (Sonorex, Belin, Njemačka). Za analizu fenolnih spojeva korišten je Agilent Technologies HPLC 1200 Series sustav s binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom (Santa Clara, SAD) (slika 10).



**Slika 8.** Aparatura po Soxhletu (vlastita fotografija)



**Slika 9.** Mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (vlastita fotografija)



**Slika 10.** HPLC sustav (vlastita fotografija)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Određivanje udjela vode u komini

Udio vode u svježoj komini određen je prema modificiranoj metodi HRN EN ISO 665:2004 sušenjem do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . U izvaganu i osušenu petrijevu zdjelicu izvažuje se oko 20 g suhog kvarcnog pijeska. Nakon toga se u

pripremljenu petrijevu zdjelicu izvaže 20 g svježe komine s točnošću 0,001 g. Petrijeva zdjelica se stavi u sušionik s podignutim poklopcem te se uzorak suši na  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  kroz 2 sata. Zatim se uzorak hladi u eksikatoru, nakon čega se važe. Uzorak se ponovno suši u sušioniku 1 sat, nakon čega se hladi i važe. Sušenje se nastavlja po 1 sat do konstantne mase. Analize su provedene u dva paralelna određivanja. Iz razlika masa prije i nakon sušenja izračunava se udio vode prema jednadžbi [1].

$$\%vode = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [1]$$

$m_0$  – masa prazne posudice (g)

$m_1$  – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$m_2$  – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

### 3.2.2. Određivanje udjela ulja u komini

Za određivanje udjela ulja u svježoj i suhoj komini korištena je standardna metoda HRN EN ISO 659:2010 ekstrakcije po Soxhletu. U tuljcu za ekstrakciju izvaže se 5-10 g komine s točnošću 0,001 g. Izvagani uzorak u tuljcu se zatvori vatom i stavi u aparaturu za ekstrakciju po Soxhletu. Doda se potreban volumen otapala, petroletera, a ekstrakt se skuplja u izvaganu tikvicu s 2-3 staklene kuglice za vrenje. Vrijeme ekstrakcije je 8 sati. Nakon završene ekstrakcije otapalo se otpari, a ostatak suši 60 minuta pri  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ohladi i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do konstantne mase. Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja između kojih razlika u masi ne iznosi više od 0,5%. Maseni udio ulja izračunava se prema jednadžbi [2], a rezultat se izražava u postocima.

$$\%ulja = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad [2]$$

$m_0$  – masa komine masline (g)

$m_1$  – ukupna masa ekstrahiranog ulja (g)

### 3.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz svježe i suhe komine provedena je prema metodama opisanim u diplomskim radovima Cvitanić (2016) i Jurković (2017). Kao otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz svježe komine korišten je 60%-tni metanol. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz suhe komine provedena je koristeći 60%-tni metanol te NADES otapalo (70%-tni kolin citrat).

U posebnu Erlenmeyerovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova doda se 10 g svježe komine masline ili 5 g suhe komine i 100 mL 60%-tnog metanola s 20 mg DIECA L<sup>-1</sup>. Ekstrakcija se provodi pri uvjetima optimiranim u diplomskom radu Cvitanić (2106). Mikrovalna ekstrakcija provedena je kroz 6 minuta koristeći mikrovalove snage 300 W, dok je za mikrovalnu ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom korištena snaga od 200 W također kroz 6 minuta. Fenolni ekstrakt je zatim odvojen od komine centrifugiranjem kroz 15 min na 5000 okretaja min<sup>-1</sup>. Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL te je tikvica nadopunjena 60%-tnim metanolom s 20 mg DIECA L<sup>-1</sup> do oznake. Ekstrakt je profiltriran kroz PVDF filter veličine pora 0,2 µm.

Ekstrakcija s NADES otapalom provedena je prema metodi razvijenoj u diplomskom radu Jurković (2017). Za ekstrakciju je korištena posebno konstruirana epruveta koja se postavi na tikvicu u kojoj se nalazi voda tako da se ultrazvuk, umjesto direktno, provodi preko ultrazvučne kupelji. U epruvetu se doda 0,5 g suhe komine masline i 10 mL 70%-tnog kolin citrata. Mikrovalna ekstrakcija provedena je na 300 W kroz 12 min, dok je mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena na 300 W tijekom 9 min. Dobiveni ekstrakt fenolnih spojeva centrifugira se 15 min na 6000 okretaja min<sup>-1</sup>. Supernatant se prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ekstrakt se filtrira kroz PVDF filter veličine pora 0,2 µm.

### 3.2.4. Određivanje sastava fenolnih spojeva komine maslina

Za određivanje sastava fenolnih spojeva iz komine maslina korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz komine maslina provedeno je na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å). Uvjeti HPLC analize razvijeni su i validirani u diplomskom radu Cvitanić (2016). Kao mobilna faza korištene su 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1%-tna otopina mravlje

kiseline u metanolu (mobilna faza B). Volumni udio mobilnih faza mijenjao se tijekom vremena eluiranja (tablica 4). Tijekom cijelog vremena eluiranja protok mobilnih faza iznosio je 0,9 ml min<sup>-1</sup>, a temperatura kolone iznosila je 30°C. Količina injektiranog uzorka bila je 5 µL.

**Tablica 4.** Prikaz promjene gradijenta mobilne faze A i B u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio mobilne faze A (%)	Volumni udio mobilne faze B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su na 280 i 320 nm, a tijekom trajanja analize spektri su snimani u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm. Identifikacija fenolnih spojeva komine masline provedena je usporedbom spektra i retencijskih vremena detektiranih spojeva i komercijalnih standarda. Kvantifikacija fenolnih spojeva u proizvedenim ekstraktima određena je pomoću baždarnih krivulja izrađenih injektiranjem otopina fenolnih spojeva (tablica 5). Koncentracija neidentificiranih spojeva određena je koristeći baždarnu krivulju tirosole. Koncentracija fenolnih spojeva u suhoj tvari komine određena je prema formuli [3].

**Tablica 5.** Jednadžbe pravca injektiranih standarada

Fenolni spoj	Jednadžba pravca
Galna kiselina	$y = 8,7988x - 2,3445$
Protokatehinska kiselina	$y = 4,9943x - 0,2453$
Tirosol	$y = 0,6050x - 0,5151$
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	$y = 4,6524x + 2,5514$
4-hidroksibenzojeva kiselina	$y = 4,6518x - 2,0145$
Klorogenska kiselina	$y = 4,5688x + 3,1608$
Vanilinska kiselina	$y = 5,4442x - 1,7303$
Kavska kiselina	$y = 10,371x + 13,579$
Vanilin	$y = 13,183x - 1,6452$
Siringinska kiselina	$y = 9,4718x + 23,027$
Siringaldehid	$y = 6,6395x - 9,4967$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 15,994x - 5,8029$
Ferulinska kiselina	$y = 9,407x - 11,748$
Sinapinska kiselina	$y = 4,2393x - 0,5326$
Oleuropein	$y = 0,6797x + 0,1827$
<i>Trans</i> -cimetna kiselina	$y = 27,066x - 16,313$

$$c \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{x \cdot V}{m(100-z)} \cdot 100 \quad [3]$$

y – površina ispod pika fenolnog spoja

x - koncentracija fenolnog spoja u ekstraktu ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

V - volumen ekstrakta (mL)

m - masa komine uzete za ekstrakciju (g)

z – udio vode u ekstrahiranoj komini (%)



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Komina masline je nusproizvod proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja kojeg je potrebno zbrinuti jer predstavlja velik ekološki problem. S obzirom da sadrži veliku koncentraciju polifenola, biološki visokovrijednih spojeva, može se koristiti za njihovu ekstrakciju. No svježa komina masline je, zbog velikog udjela vode, pogodna za rast mikroorganizma, stoga ju je potrebno osušiti te kao takvu skladištiti. U ovom radu provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz svježe i osušene komine kako bi se utvrdio utjecaj procesa sušenja na koncentraciju i sastav fenolnih spojeva. Ekstrakcija je provedena 60%-tnim metanolom po metodi opisanoj u diplomskom radu Cvitanić (2016). U drugom djelu rada ispitan je utjecaj izbora otapala na ekstraktibilnost fenolnih spojeva komine maslina. S obzirom na potrebu smanjenja upotrebe organskih otapala koja predstavljaju problem za okoliš, danas se sve češće istražuju ekološki prihvatljiva otapala. U tu skupinu se ubrajaju i prirodna eutektična otapala (NADES). Stoga je u ovom radu provedena ekstrakcija fenolnih spojeva 70%-tnim kolin citratom kako bi se utvrdilo postoji li mogućnost zamjene metanola pri ekstrakciji fenolnih spojeva kao najkorištenijeg otapala za ekstrakciju polifenola,. Ova ekstrakcija provedena je po metodi optimiranoj u diplomskom radu Jurković (2017). Za izolaciju fenolnih spojeva konvencionalnim i NADES otapalima korištene su ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te mikrovalovima u kombinaciji s ultrazvukom. Rezultati istraživanja prikazani su tabličnim i grafičnim prikazima.

### 4.1. UDIO VODE I ULJA U KOMINI MASLINA

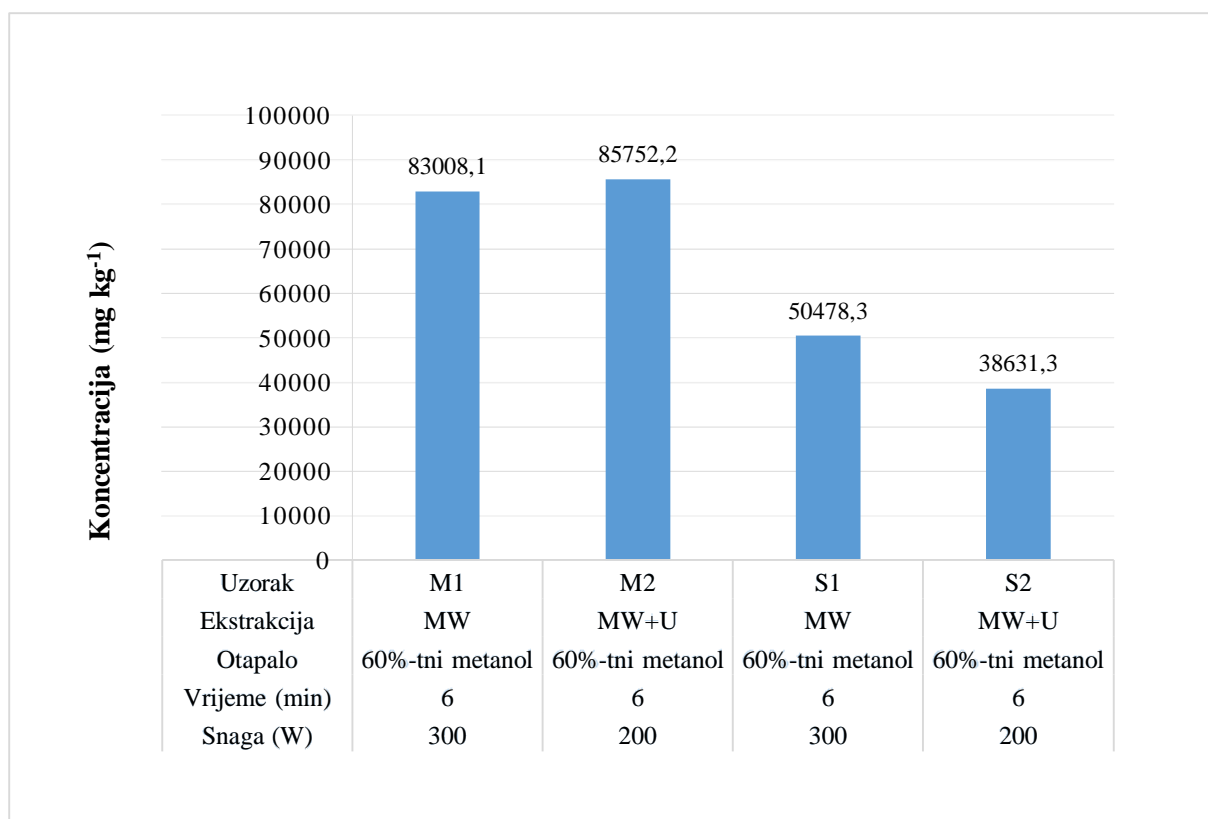
Tablica 6 prikazuje udjele ulja i vode u svježoj te suhoj komini. Udio vode u svježoj komini iznosi 68,03%, a udio ulja 4,01%. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim u radu Nogueire i suradnika iz 2015-te godine. Svježa komina se po primitku odmah stavila sušiti na 60°C kroz 7 dana, stoga udio vode u suhoj komini iznosi 2,25%, a udio ulja 12,2%. Tako osušena komina može se skladištiti do ekstrakcije bez bojazni od mikrobiološke i enzimske aktivnosti. U ovom radu, osušena komina je do ekstrakcije fenolnih spojeva skladištena u zamrzivaču na -18°C.

**Tablica 6.** Udjeli vode i ulja u svježoj i suhoj komini

<b>Uzorak</b>	<b>Udio vode (%)</b>	<b>Udio ulja (%)</b>
<b>Svježa komina</b>	68,03	4,01
<b>Suha komina</b>	2,25	12,2

#### **4.2. UTJECAJ PROCESA SUŠENJA NA SASTAV I UDJEL FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA**

Istraživanjem koje su proveli Frankel i suradnici (2013) utvrđeno je da se najveći prinos fenolnih spojeva iz komine masline osigurava ekstrakcijom s metanolom pri 70°C kroz 12 sati. No u ovom radu koristile su se nove tehnike ekstrakcije, mikrovalna ekstrakcija te mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom po metodi razvijenoj i opisanoj u diplomskom radu Cvitanić (2016). Nove tehnike koje utječu na staničnu strukturu matriksa koriste se upravo kako bi se ubrzao proces ekstrakcije (Blekić i sur., 2011). Iz svježe i suhe komine ekstrahirani su fenolni spojevi 60%-tnim metanolom koji je sadržavao 20 mg L<sup>-1</sup> natrijevog dietilditiokarbamata (DIECA) kroz 6 minuta. Za mikrovalnu ekstrakciju korišteni su mikrovalovi snage 300 W, a za mikrovalnu ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom mikrovalovi snage 200 W i ultrazvuk frekvencije 40 kHz. Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 11 i u tablici 7, vidljiv je značajan utjecaj procesa sušenja na koncentraciju, ali i sastav fenolnih spojeva komine maslina.



*M1, M2 – uzorci fenolnih ekstrakata iz svježe komine*

*S1, S2 – uzorci fenolnih ekstrakata iz suhe komine*

*MW – mikrovalna ekstrakcija*

*MW+U – mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom*

**Slika 11.** Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva svježe i osušene komine maslina izraženih na masu suhe tvari

Slika 11 prikazuje koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u svježoj i suhoj komini izraženih na masu suhe tvari. Najveću koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva ( $85752,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sadrži svježa komina mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Suha komina istom ekstrakcijom sadrži bitno manju koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva ( $38631,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Isto je uočeno kod mikrovalne ekstrakcije, gdje je iz svježe komine ekstrahirano znatno više fenolnih spojeva ( $83008,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), nego iz suhe ( $50478,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Rezultati su u skladu s rezultatima Azeez i suradnika (2017) u kojem je utvrđeno da pad koncentracije fenolnih spojeva tijekom sušenja najviše ovisi o vremenu sušenja. S obzirom da je komina u ovom radu sušena na  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 7 dana, velik dio fenolnih spojeva razgrađen je tijekom dugotrajnog procesa sušenja.

**Tablica 7.** Sastav i koncentracije fenolnih spojeva svježe i suhe komine izraženih na masu suhe tvari

Uzorak	M1	M2	S1	S2	
<b>Ekstrakcija</b>	MW	MW+U	MW	MW+U	
<b>Otapalo</b>	60% metanol	60% metanol	60% metanol	60% metanol	
<b>Vrijeme ekstrakcije (min)</b>	6	6	6	6	
<b>Snaga (W)</b>	300	200	300	200	
<b>Fenolni spoj (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	Hidroksitirozol	13903,9	13014,0	326,5	208,0
	Protokatehinska kiselina	74,4	83,5	39,9	39,2
	Tirozol	1417,1	1460,0	236,4	nd
	Katehin	nd	nd	585,8	464,3
	Vanilinska kiselina	128,2	137,3	180,9	196,4
	Kavska kiselina	122,7	137,9	nd	nd
	Vanilin	63,0	nd	192,2	177,7
	Sirinaldehid	nd	nd	92,4	84,2
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	76,2	80,1	nd	47,5
	SDG	1055,6	1393,2	879,3	644,0
	Oleuropein	1570,8	1592,1	695,5	nd
	Pinoresinol	2387,4	2627,0	2676,4	1750,1
	Luteolin	2314,2	2636,8	385,0	355,2
<b>Neidentificirani spojevi (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	59894,7	62590,4	44187,9	34664,7	

*M1, M2 – uzorci fenolnih ekstrakata iz svježe komine*

*S1, S2 – uzorci fenolnih ekstrakata iz suhe komine*

*MW – mikrovalna ekstrakcija*

*MW+U – mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom*

*nd – nije detektiran*

Sastav pojedinačnih fenolnih spojeva izražen na suhu tvar svježe i suhe komine prikazan je u tablici 7. Iz rezultata je vidljivo da kod svježe komine u odnosu na suhu nije identificiran katehin ni siringaldehid, dok kod suhe komine nije identificirana kavska kiselina. Svježa komina u odnosu na suhu sadrži veće koncentracije svih identificiranih spojeva, osim već

navedenih katehina i siringaldehida te vanilinske kiseline i vanilina. Udio pinoresinola nije se značajno promijenio procesom sušenja komine. U radu Gallage i suradnici (2014) predlažu da se iz monomernih prekursora lignina kao što su kavaska i *p*-kumarinska kiselina može formirati vanilin zbog enzimske aktivnosti. Ovaj je podatak u skladu s dobivenim rezultatima, jer je u suhoj komini koncentracija *p*-kumarinske kiseline manja u odnosu na svježju, a kavaska u suhoj komini nije ni detektirana dok je koncentracija vanilina u suhoj komini 3 puta veća nego u svježjoj. Rodrigues Pinto i suradnici (2012) su također utvrdili mogućnost formiranja vanilina i siringaldehida iz lignina. S obzirom da komina masline sadrži veliki udio lignina, veća koncentracija vanilina i formiranje siringaldehida u suhoj komini najvjerojatnije proizlazi zbog enzimske razgradnje lignina. S obzirom da je komina u ovom diplomskom radu sušena na relativno niskoj temperaturi, proces sušenja bio je spor i dugotrajan te je vjerojatno došlo do produžene aktivnosti prirodno prisutnih enzima komine maslina.

Dominantan identificiran spoj ekstrahirano iz svježje komine je hidroksitirozol, kojeg se mikrovalnom ekstrakcijom ekstrahiralo 13903,9 mg kg<sup>-1</sup>, dok je mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom koncentracija nešto manja (13014,0 mg kg<sup>-1</sup>). U radu Araújo i suradnika (2015) hidroksitirozol je također utvrđen kao dominantan spoj u nusproizvodima nakon izdvajanja maslinovog ulja. Zatim ga slijede luteolin (2636,8 mg kg<sup>-1</sup>) i pinoresinol (2387,4 mg kg<sup>-1</sup>) čije su koncentracije veće mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Suha komina sadrži gotovo 50 puta manju koncentraciju hidroksitirozola u odnosu na svježju te je to spoj koji se najviše razgradio tijekom sušenja. Veća razgradnja tijekom sušenja također je uočena za luteolin i tirozol. Također, sušenjem se značajno smanjila i koncentracija oleuropeina, specifičnog fenolnog spoja maslina. Do smanjenja njihove koncentracije vjerojatno je došlo zbog povećane temperature i/ili enzimske aktivnosti. U suhoj komini dominantan spoj je pinoresinol, čija je koncentracija 2676,4 mg kg<sup>-1</sup> ekstrahirana mikrovalnom ekstrakcijom, dok je mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom koncentracija nešto manja (1750,1 mg kg<sup>-1</sup>), a slijedi ga SDG (sekoizolaricirezinol diglukozid). Značajne koncentracije neidentificiranih spojeva detektirane su i u svježjoj i u osušenoj komini. Veliki dio neidentificiranih spojeva vjerojatno su sekoiridoidi, specifični spojevi za koje nisu bili dostupni standardi te nije bila moguća njihova identifikacija. Udio neidentificiranih spojeva također se smanjuje procesom sušenja. Iz rezultata je vidljivo da su lignani, pinoresinol i SDG stabilniji tijekom sušenja od ostalih fenolnih spojeva komine maslina.

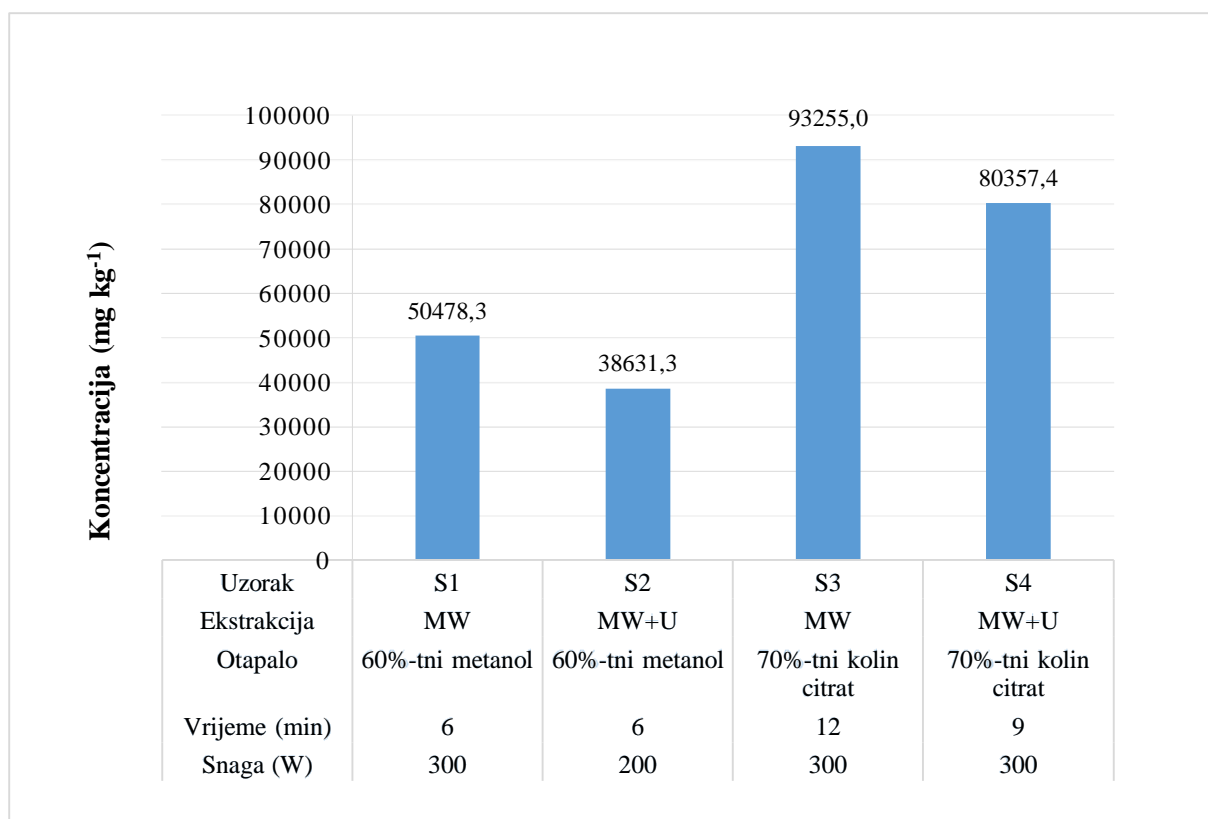
Iz suhe komine mikrovalnom ekstrakcijom dobivene su više koncentracije fenolnih spojeva u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, uz izuzetak vanilinske kiseline. Razlog tome je što se bolji učinak ekstrakcije postiže sa snagom mikrovalova od 300

W nego od 200 W potpomognuto ultrazvukom, što je utvrđeno u diplomskom radu Cvitanić (2016). Iz suhe komine spojevi tirosol i oleuropein identificirani su samo u ekstraktima proizvedenim mikrovalnom ekstrakcijom, dok je *p*-kumarinska kiselina identificirana samo kod mikrovalne ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Suprotno se događa sa svježom kominom kod koje su koncentracije svih spojeva osim hidroksitirosola i vanilina veće mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju.

Mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom mnogo je učinkovitija za ekstrakciju fenolnih spojeva iz svježe komine jer se uz manju snagu mikrovalova uspjelo ekstrahirati više fenolnih spojeva. Sušenjem svježe komine koncentracija ukupnih fenolnih spojeva se snizila te je značajno manja u suhoj komini. Unatoč tome, suha komina sadrži 3 puta veću koncentraciju vanilina u odnosu na svježju kominu. S obzirom da je vanilin jedan od najtraženijih spojeva arome, komina masline predstavlja jeftinu sirovinu za njegovu ekstrakciju. Osim toga, komina masline sadrži velik udio lignina, stoga ona predstavlja sirovinu za proizvodnju vanilina i siringaldehida, što su utvrdili Rodrigues Pinto i suradnici (2012). Proces sušenja negativno utječe na hidroksitirosol, tirosol, oleuropein i luteolin stoga se za njihovu ekstrakciju preporučuje koristiti svježa komina.

#### **4.3. UTJECAJ IZBORA OTAPALA NA SASTAV I UDJEL EKSTRAKATA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINA**

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz suhe komine provedena je sa dva različita otapala mikrovalnom ekstrakcijom i mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Kao prvo otapalo korišten je 60%-tni metanol sa 20 mg DIECA L<sup>-1</sup>, koji se dodaje u svrhu inaktivacije enzima prisutnih u suhoj komini. Kao drugo otapalo korišteno je NADES otapalo 70%-tni kolin citrat koji je odabran kao najbolje otapalo za ekstrakciju polifenola komine maslina u diplomskom radu Jurković (2017). S obzirom da je pH vrijednost 70%-tnog kolin citrata 0,93 te se enzimi u suhoj komini inaktiviraju zbog vrlo niske pH vrijednosti, kolin citratu nije dodano 20 mg DIECA. Iz rezultata prikazanih na slici 12 i u tablici 8 uočava se različit sastav i udio fenolnih spojeva suhe komine ovisno o upotrijebljenom otapalu za ekstrakciju.



*S1, S2, S3, S4 – uzorci fenolnih ekstrakata iz suhe komine*

*MW – mikrovalna ekstrakcija*

*MW+U – mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom*

**Slika 12.** Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva osušene komine ekstrahiranih otopinom metanola i otopinom kolin citrata izraženih na masu suhe tvari

Slika 12 prikazuje koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva izraženih na masu suhe tvari ekstrahiranih 60%-tnim metanolom i 70%-tnim kolin citratom iz suhe komine. Najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva ( $93255,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ekstrahirana je 70%-tnim kolin citratom mikrovalnom ekstrakcijom, dok je 60%-tnim metanolom ekstrahirano znatno manje ukupnih fenolnih spojeva ( $50478,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom ekstrahirano je nešto manje ukupnih fenolnih spojeva, no također je 70%-tnim kolin citratom koncentracija fenolnih spojeva znatno veća ( $80357,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) u odnosu na ekstrakciju provedenu 60%-tnim metanolom ( $38631,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

**Tablica 8.** Sastav i koncentracije fenolnih spojeva suhe komine ekstrahiranih uz dva različita otapala

Uzorak	S1	S2	S3	S4	
<b>Ekstrakcija</b>	MW	MW+U	MW	MW+U	
<b>Otapalo</b>	60% metanol	60% metanol	70% kolin citrat	70% kolin citrat	
<b>Vrijeme ekstrakcije (min)</b>	6	6	12	9	
<b>Snaga (W)</b>	300	200	300	300	
<b>Fenolni spoj (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	Galna kiselina	nd	nd	nd	17,6
	Hidroksitirozol	326,5	208,0	nd	nd
	Protokatehinska kiselina	39,9	39,2	45,3	nd
	Tirozol	236,4	nd	1853,5	1670,3
	Katehin	585,8	464,3	396,1	nd
	Vanilinska kiselina	180,9	196,4	194,4	193,3
	Kavska kiselina	nd	nd	15,0	nd
	Vanilin	192,2	177,7	177,4	172,8
	Sirinaldehid	92,4	84,2	103,8	nd
	Genska kiselina	nd	nd	1404,5	nd
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	nd	47,5	40,8	63,2
	Sinapinska kiselina	nd	nd	nd	77,7
	Ružmarinska kiselina	nd	nd	691,5	780,2
	SDG	879,3	644,0	1440,8	1243,0
	Oleuropein	695,5	nd	nd	nd
Pinoresinol	2676,4	1750,1	1677,1	1686,4	
Luteolin	385,0	355,2	380,9	308,1	
<b>Neidentificirani spojevi (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	44187,9	34664,7	84834,1	74144,7	

S1, S2, S3, S4 – uzorci fenolnih ekstrakata iz suhe komine

MW – mikrovalna ekstrakcija

MW+U – mikrovalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

nd – nije detektiran



Uspoređujući sastav fenolnih spojeva identificiranih iz suhe komine dvama različitim otapalima, iz rezultata prikazanih u tablici 8, uočava se da su galna, kavaska, genska, ružmarinska i sinapinska kiselina identificirane uz ekstrakciju 70%-tnim kolin citratom, a hidroksitirozol i oleuropein ekstrahirani su jedino 60%-tnim metanolom. U radu García i suradnika (2016) utvrđeno je da zbog niskih pH vrijednosti NADES otapala dolazi do razgradnje oleuropeina pa je taj podatak u skladu s dobivenim rezultatom. Istovremeno je utvrđeno da raste koncentracija hidroskitirosola, što u ovom radu nije dokazano. Veća razlika u udjelu fenolnih spojeva uočena je za spoj tirozol kojeg se mikrovalnom ekstrakcijom uz 70%-tni kolin citrat ekstrahiralo 9 puta više nego 60%-tnim metanolom. Rezultat je u skladu s rezultatima dobivenim u radu García i suradnika (2016) gdje je utvrđeno da NADES otapalima vrlo niskih pH vrijednosti dolazi do razgradnje derivata sekoiridoida, stoga raste koncentracija slobodnih fenola, kao što je tirozol. Također, uočava se da su 60%-tnim metanolom ekstrahirane više koncentracije katehina, što je u skladu s rezultatima istraživanja Jeonga i suradnika (2017) koji su utvrdili da je zbog niske pH vrijednost kolin citrata koncentracija katehina manja u odnosu na ekstrakciju provedenu otapalom neutralne pH vrijednosti. Vrlo velik broj spojeva za koje nisu bili dostupni standardi ekstrahirani su 70%-tnim kolin citratom, stoga je koncentracija neidentificiranih spojeva duplo veća ekstrakcijom sa 70%-tnim kolin citratom u odnosu na 60%-tni metanol.

Dominantan spoj ekstrahiran 60%-tnim metanolom je pinoresinol, čija koncentracija mikrovalnom ekstrakcijom iznosi 2676,4 mg kg<sup>-1</sup>, a nešto manji udio ekstrahiran je mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (1750,1 mg kg<sup>-1</sup>). Dominantni spojevi ekstrahirani 70%-tnim kolin citratom su tirozol i pinoresinol. Koncentracija tirozola manja je mikrovalnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, a pinoresinola mikrovalnom ekstrakcijom. Slijedi ih SDG čija je koncentracija veća mikrovalnom ekstrakcijom (1440,8 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (1243,0 mg kg<sup>-1</sup>).

Koncentracije fenolnih spojeva ekstrahiranih iz suhe komine sa 60%-tnim metanolom mikrovalnom ekstrakcijom veći su u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, izuzev vanilinske kiseline. Isti trend uočen je i kod ekstrakcije 70%-tnim kolin citratom uz izuzetak *p*-kumarinske i ružmarinske kiseline. S obzirom na istu upotrijebljenu snagu mikrovalova, učinkovitiju ekstrakciju predstavlja mikrovalna ekstrakcija. S obzirom na niske pH vrijednosti 70%-tnog kolin citrata, ono pokazuje veću selektivnost u ekstrahiranju fenolnih kiselina. Zbog toga su galna, kavaska, genska, ružmarinska i sinapinska kiselina ekstrahirane 70%-tnim kolin citratom, a 60%-tnim metanolom nisu detektirane ni u svježoj ni

suhoj komini. Znatno veća koncentracija 70%-tnim kolin citratom uočena je za spojeve SDG i tirosol čija je koncentracija veća i usporedbom sa svježom kominom. 70%-tni kolin citrat predstavlja vrlo učinkovito otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine masline. Ovo otapalo može učinkovito zamijeniti metanol u ekstrakciji fenolnih spojeva komine.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sušenjem dolazi do razgradnje fenolnih spojeva te suha kolina sadrži gotovo upola manju koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na svježu kominu.
2. Tijekom sušenja najviše se smanjila koncentracija hidroksitirosola, tirosola, luteolina i oleuropeina, a povećala koncentracija vanilina. Lignani, pinosinoli i SDG pokazali su se kao najstabilniji fenolni spojevi koline masline.
3. 70%-tnim kolin citratom ekstrahirano je gotovo dvostruko više polifenola iz osušene koline masline nego 60%-tnom otopinom metanola. Ekstrakti fenola u kolin citratu bogatiji su tirozolom, SDG-om te fenolnim kiselinama zbog vrlo niske pH vrijednosti otapala.
4. Mikrovalovi potpomognuti ultrazvukom efikasniji su za ekstrakciju fenolnih spojeva svježe koline masline, dok se za osušenu kominu preporuča izbor ekstrakcije potpomognute samo mikrovalovima bez obzira na izbor otapala.
5. Kolin citrat može učinkovito zamijeniti metanol u ekstrakciji fenolnih spojeva iz koline masline.

## 6. LITERATURA

Andersen, A. J. C. (1962) Refining of oil and fats for edible purposes, 2. izd., Pergamon Press, Oxford/London/New York/Paris, str. 31.

Annamarie (2017) Olive Leavs and Olive for Skin, the Ancient Skin-Care Secret of the Greeks. <<https://www.annmariegianni.com/olive-leaves-and-oil-for-skin-the-ancient-skin-care-secret-of-the-greeks/>>. Pristupljeno 15. ožujka 2017.

Araújo, M., Pimentel, F., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P. (2015) Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends Food Sci. Tech.* doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.010

Azeez, L., Adebisi, S. A., Oyedeji, A. O., Adetoro, R. O., Tijani, K. O. (2017) Bioactive compounds' contents, drying kinetics and mathematical modelling of tomato slices influenced by drying temperatures and time. *J. Saudi Soc. Agr. Sci.* doi: 10.1016/j.jssas.2017.03.002

Barontini, M., Bernini, R., Arastro, I., Gentili, P., Romani, A. (2013) Synthesis and DPPH radical scavenging activity of novel compounds obtained from tyrosol and cinnamic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5179-5188.

Bhatnagar, A., Kaczala, F., Hogland, W., Marques, M., Paraskeva, C. A., Papadakis, V G., Sillanpää, M. (2014) Valorization of solid waste products from olive oil industry as potential adsorbents for water pollution control—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 268-298.

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.

Boskou, D. (2002) Olive oil. U: Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, (Gustone, F. G., ured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 244-278.

Boskou, D. (2006) Olive oil Chemistry and Technology, 2. izd., AOCS Press, Thessaloniki.

Boskou, D. (2011) Olive oil. U: Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, 2. izd., (Gustone, F. G., ured.), Yohn Wiley & Sons Ltd., Chichester, str. 243-273.

Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Renard, C. M. G. C., Coimbra, M.A. (2005) Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **85**, 21-32.

Cvitanić, M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* **200**, 159-166.

El Gharras, H. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications. *Food Sci. Tech.* **44**, 2512–2518.

FAOSTAT (2017) Crops, FAOSTAT – Statistics Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>>. Pristupljeno 15. ožujka 2017.

Fabiani, R. (2016) Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies. *Food Funct.* **7**, 4145-4159.

Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2013) Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5179–5188.

Gallage, N. J., Hansen, E. H., Kannangara, R., Olsen, C. E., Motawia, M. S., Jørgensen, K., Holme, I., Hebelstrup, K., Grisoni, M., Møller, B. L. (2014) Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nat. Commun.* **5**, doi:10.1038/ncomms5037

García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., Fernández-Bolaños, J. (2016) Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chem.* **197**, 554-561.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.* doi: 10.1007/s13197-013-1247-9

Gunstone, F. D. (2011) Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties and Uses, 2. izd., Wiley-Blackwell, Chichester, str. 1-2.

Gustone, F.D. (2013) Composition and Properties of Edible Oils. U: Edible Oli Processing, 2. izd. (Hamm, W., Hamilton, R. J., Calliauw, G., ured.), Yohn Wiley & Sons, Chichester, str. 7-15.

Herceg, Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane. Golden Marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.

Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., Lee, J. (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J. Clean. Prod.* doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.038

Jurković, P. (2017) Izolacija fenolnih spojeva komine masline eutektičkim otapalima. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D.A. (2002) Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure–activity studies. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 273-281.

Kaur C., Kapoor H.C. (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's healt. *Int. J. Food Sci. Tech.* **36**, 703-725.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

Khan, M. K., Albert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., Chemat, F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.* **119**, 851-858.

Kochhar, S.P. (2011) Minor and Speciality Oils. U: Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties and Uses, 2. izd., (Gunstone, F. D., ured.), Wiley-Blackwell, Chichester, str. 306-309.

Lopez-Huertas, E. (2010) Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol. Res.* **61**, 200-207.

Nasopoulou, C., Zabetakis, I. (2013) Agricultural and Aquacultural Potential of Olive Pomace A Review. *J. Agr. Sci.* **5**, 116-127.

Nogueira, F. (2015) Valorization of olive pomace through combination of biocatalysis with supercritical fluid technology, Dizertacija, Fakultet znanosti i tehnologije Sveučilišta u Lisabonu, Lisabon.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001) Antioxidants in food, Woodhead Publishing, Abington Hall, str. 7-22.

Provedbena uredba komisije (EU) o tržišnim standardima za maslinovo ulje (kodifikacija) (2012) *Službeni list Europske unije* **012/14**, Bruxelles.

Riggio, V., Comino, E., Rosso, M. (2015) Energy production from anaerobic co-digestion processing of cow slurry, olive pomace and apple pulp. *Renew. Energ.* **83**, 1043-1049.

Rodrigues Pinto, P. C., Borges da Silva, E. A., Rodrigues, A. E. (2012) Lignin as Source of Fine Chemicals: Vanillin and Syringaldehyde. U: Biomass Conversion [online] (Baskar, C., Baskar, S., Dhillon, R. S. ured.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, str. 381-420. <[http://www.springer.com/gp/book/9783642284175?wt\\_mc=ThirdParty.SpringerLink.3.EPR653>About\\_eBook](http://www.springer.com/gp/book/9783642284175?wt_mc=ThirdParty.SpringerLink.3.EPR653>About_eBook)>. Pristupljeno 5. srpnja 2017.

Roig, A., Cayuela, M. L., Sánchez-Monedero, M. A. (2006) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Was. Man.* **26**, 960-969.

Seeram, N. P., Heber, D. (2007) Impact of Berry Phytochemicals on Human Health: Effects beyond Antioxidation. U: Antioxidant Measurement and Applications, (Shahidi, F., Ho, C.H., ured.), American Chemical Society, Washington, str. 326-336.

Smith, E., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060-11082.

Sigma-Aldrich (2017) Product Comparison Guide, <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/caffeicacid1801633139511?lang=en&region=HR>>. Pristupljeno 4. svibnja 2017.

Šubarić, D., Kopjar, M., Ačkar, Đ. (2010) Polifenoli i zdravlje. Zbornik radova i sažetaka Sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti“. Tuzla, str. 32-39.

Uredba (EU) Europskog parlamenta i vijeća o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) (2013) *Službeni list Europske unije* **347/671**, Bruxelles.

Uredba komisije (EEZ) o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (1991) *Službeni list Europske unije* **248/1**, Bruxelles.

van Doosselaere, P. (2013) Production of Oils. U: Edible Oil Processing, 2. izd., (Hamm, W., Hamilton, R. J., Calliauw, G., ured.), John Wiley & Sons, Chichester, str. 88-91.



Verhoeff, M., van Duijn, G. (2013) *Quality and Food Safety Assurance and Control. U: Edible Oli Processing*, 2. izd. (Hamm, W., Hamilton, R. J., Calliau, G., ured.), John Wiley & Sons, Chichester, str. 256.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* **18**, 98-112.

Tsao, R., Deng, Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **812**, 85-99.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.

Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.