

Karakterizacija funkcionalnih spojeva izoliranih iz espresso kave „Karoma“ i srebrne pokožice kao njenog nusproizvoda

Šango, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:229267>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Diplomski rad

Zagreb, srpanj 2020

Marina Šango

1089/PI

**KARAKTERIZACIJA
FUNKCIONALNIH SPOJEVA
IZOLIRANIH IZ ESPRESSO KAVE
„KAROMA“ I SREBRNE
POKOŽICE KAO NJENOG
NUSPROIZVODA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Antonele Ninčević Grassino, doc. Sastav masnih kiselina je određivan u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Službi za zdravstvenu ekologiju i zaštitu okoliša uz pomoć dr. sc. Marinka Petrovića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KARAKTERIZACIJA FUNKCIJONALNIH SPOJEVA IZOLIRANIH IZ ESPRESSO KAVE „KAROMA“ I SREBRNE POKOŽICE KAO NJENOG NUSPROIZVODA

Marina Šango, 1089/PI

Sažetak: *Proizvodnjom espresso kave, prženjem zrna sirove kave nastaju znatne količine nusproizvoda - srebrne pokožice. U ovom radu je ispitana mogućnost iskorištenja srebrne pokožice kao izvora različitih funkcionalnih spojeva, poput fenola, flavonoida, masnih kiselina i pektina. Izuzev pektina, ostali navedeni spojevi su određeni i u samoj espresso kavi. Nakon mikrovalovima potpomognute ekstrakcije uzoraka ($T = 50$ i 70 °C, $t = 5$ i 15 minuta i 50 i 70 %-tne vodene otopine etanola), UV/Vis spektrofotometrijom je potvrđeno da srebrna pokožica sadrži manje fenola ($7,23 - 9,32$ mg g^{-1}) u odnosu na kavu ($57,79 - 70,98$ mg g^{-1}). Metodom plinske kromatografije, nakon Soxhlet ekstrakcije uzoraka je pokazano da u srebrnoj pokožici dominiraju zasićene, a u kavi nezasićene masne kiseline. Nakon refluksiranja uzoraka srebrne pokožice i izolacijom pektina iz različitih kiselih ekstrakata utvrđeno je da najveći udio galakturonske kiseline ($57,86$ %) kao pokazatelja čistoće i primjene pektina kao prehrambenog aditiva daje klorovodična kiselina.*

Ključne riječi: ekstrakcija, espresso kava, masne kiseline, pektin, polifenoli, srebrna pokožica

Rad sadrži : 63 stranice, 18 slika, 16 tablica, 81 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Marinko Petrović, viši znanstveni suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. *Suzana Rimac Brnčić*
2. doc.dr.sc. *Antonela Ninčević Grassino*
3. dr.sc. *Marinko Petrović*, viši znanstveni suradnik
4. doc.dr.sc. *Marija Badanjak Sabolović* (zamjena)

Datum obrane: 16. srpanj 2020.

BASIC DOCUMENTION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

CHARACTERIZATION OF FUNCTIONAL COMPOUNDS ISOLATED FROM ESPRESSO COFFEE AND SILVER SKIN AS ITS BYPRODUCT

Marina Šango, 1089/PI

Summary: *With production of espresso coffee by roasting raw coffee beans significant amounts of by-product is generated. In this work, the possibility of using silverskin as a source of various functional compounds, such as phenols, flavonoids, fatty acids and pectin was studied. Apart from pectin, the other listed compounds are also determined in espresso coffee itself. After microwave - assisted extraction of the samples ($T = 50$ and 70 °C, $t = 5$ and 15 minutes and 50 % and 70 % aqueous ethanol solution), UV/Vis spectrophotometry it is confirmed that the silver epidermis contained less phenol ($7.23 - 9.32$ mg g^{-1}) compared to coffee ($57.79 - 70.98$ mg g^{-1}). The method of gas chromatography, after Soxhlet extraction of samples, showed that saturated fatty acids dominate in silverskin and unsaturated fatty acids in coffee. After refluxing silverskin samples and isolating pectin from various acidic extracts, it is found that the highest proportion of galacturonic acid (57.86 %), as an indicator of purity and application of pectin as a food additive, is given by hydrochloric acid.*

Key words: extraction, espresso coffee, fatty acids, pectin, polyphenols, silverskin

Thesis contain: 63 pages, 18 figures, 16 tables, 81 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis is printed and electronic version is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Antonela Ninčević Grassino, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Marinko Petrović, Senior scientific associate*

Reviewers:

1. PhD. *Suzana Rimac Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
3. PhD. *Marinko Petrović*, Senior scientific associate
4. PhD. *Marija Badanjak Sabolović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 16 July 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Kava i nusproizvodi	3
2.2. Proizvodnja kave.....	5
2.2.1. Prženje zrna sirove kave.....	7
2.3. Kemijski sastav kave i srebrne pokožice.....	7
2.3.1. Polifenoli	8
2.3.2. Masne kiseline.....	9
2.3.3. Pektin	10
2.4. Metode ekstrakcije	11
2.4.1. Ekstrakcija mikrovalovima	12
2.4.2. Soxhlet ekstrakcija	13
2.4.3. Refluksiranje	13
2.5. Analitičke metode	14
2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija.....	14
2.5.2. Plinska kromatografija	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijal	17
3.2. Kemikalije.....	17
3.3. Aparatura i pribor.....	18
3.3.1. Aparatura.....	18
3.3.2. Pribor.....	18
3.4. Otopine i njihova priprema	19
3.4.1. Otopine za određivanje fenola i flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice	19
3.4.2. Otopine za određivanje masnih kiselina u uzorcima kave i srebrne pokožice	20
3.4.3. Otopine za određivanje galakturonske kiseline, šećera i fenola u uzorcima pektina	20
3.5. Metode	21
3.5.1. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka kave i srebrne pokožice mikrovalovima	21
3.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u uzorcima kave i srebrne pokožice.....	21
3.5.2.1. Postupak određivanja ukupnih fenola	21
3.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice.....	21
3.5.3.1. Postupak određivanja ukupnih flavonoida	21
3.5.4. Ekstrakcija masti iz uzoraka kave i srebrne pokožice	21
3.5.5. Određivanje metil estera masnih kiselina u ekstraktima kave i srebrne pokožice.....	25
3.5.6. Ekstrakcija pektina iz uzoraka srebrne pokožice.....	25
3.5.6.1. Određivanje boje pektina	27
3.5.6.2. Određivanje ukupne galakturonske kiseline u uzorcima pektina	28
3.5.6.3. Određivanje ukupnih šećera u uzorcima pektina.....	29
3.5.6.4. Određivanje ukupnih fenola u uzorcima pektina.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Određivanje ukupnih fenola u uzorcima kave i srebrne pokožice.....	31
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice.....	36
4.3. Određivanje sastava i sadržaja masnih kiselina u uzorcima kave i srebrne pokožice	42
4.4. Karakterizacija pektina ekstrahiranog iz srebrne pokožice	46
4.4.1. Određivanje boje pektina	46
4.4.2. Određivanje sadržaja galakturonske kiseline	48
4.4.3. Određivanje sadržaja šećera	51
4.4.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	53
5. ZAKLJUČAK	56
6. LITERATURA	57

1. UVOD

Kava već godinama slovi kao jedan od najomiljenijih napitaka širom svijeta zbog svoje ugodne arome i okusa ali i povoljnog utjecaja na ljudski organizam zbog visokog sadržaja bioaktivnih sastojaka. Ime ovog popularnog prehrambenog proizvoda potječe od naziva provincije „Kaffa“ u Etiopiji. Smatra se da su zrna kave otkrili pastiri iz Abesinije u 6. stoljeću kada su uočili "čudno" ponašanje svojih koza nakon što su jele bobice s nepoznatog grma (Hagos i sur., 2018) no prvi pisani zapisi datiraju 575. godine u Jemenu (Mussatto i sur., 2011a). Dodatnoj popularnosti kave doprinijelo je otvaranje kuće kave u Meki krajem 15. stoljeća a ovaj napitak predstavljen je europskom stanovništvu 1570. godine zahvaljujući mletačkim trgovnicama koji je donose zajedno s duhanom. Veliki interes doveo je do otvaranja prve kavane u Veneciji polovicom 17. stoljeća. Francuz De Clieu zaslužan je za kultivaciju kave na Martiniqueu u 18. stoljeću a ubrzo nakon toga kava je stigla u Južnu Ameriku čije se podneblje pokazalo najpogodnijim za njezin uzgoj (Anonymous 1, 2009).

Unatoč tome što je diljem svijeta poznato više od 80 vrsta kave samo su dvije ekonomski važne, *Coffea arabica* i *Coffea canephora*. Smatra se da je zrno *Coffea arabica* bolje kvalitete što doprinosi kompleksnijoj aromi pa shodno tome *Coffea arabica* postiže višu cijenu na svjetskim tržištima (Farah, 2012).

S obzirom na sve višu, rastuću proizvodnju kave u količini od 10,2 milijuna tona (ICO, 2019), dolazi do velikog političkog i ekološkog pritiska na proizvođače da pronađu načine zbrinjavanja nusproizvoda nastalih njezinom proizvodnjom, ponajviše srebrne pokožice i taloga zaostalog nakon kuhanja kave kojih nastaje u količini iznad 6 milijuna tona (Janissen i Huynh, 2018). Mnogi veliki industrijski proizvođači kave ne smatraju ove nusproizvode otpadom već sirovinom koji će pronaći primjenu u različitim ekonomski važnim procesima, od proizvodnje bioetanola, nutritivnog obogaćivanja prehrambenih proizvoda te do kultivacije mikroorganizama (Mussatto i sur., 2011a).

Sukladno svjetskim trendovima i istraživanjima vezanim uz iskorištavanje nusproizvoda nastalih tijekom proizvodnje prehrambenih proizvoda (Ninčević Grassino i sur. 2016; Marić i sur. 2018; Tranfić Bakić i sur., 2019; Ninčević Grassino i sur., 2019) cilj ovog rada bio je upotrijebiti srebrnu pokožicu, nusproizvod prikupljen proizvodnjom espresso kave, odnosno obradom sirove kave prženjem. Radi procjene korištenja srebrne pokožice kao izvora funkcionalnih sastojaka u ovom radu je:

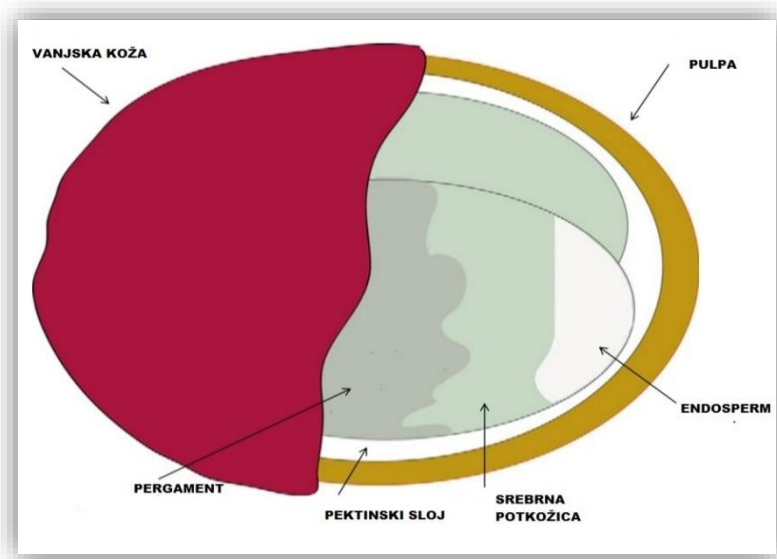
- određena razlika u sadržaju fenola i flavonoida u espresso kavi i srebrnoj pokožici u ovisnosti o temperaturi, vremenu i otapalu primjenjenim za ekstrakciju uzoraka pomoću mikrovalova,
- određen udio masnih kiselina u uzorcima espresso kave i srebrne pokožice metodom plinske kromatografije nakon njihove ekstrakcije metodom po Soxhlet-u, te
- provedena ekstrakcija pektina iz uzoraka srebrne pokožice kao alternativnog bio-supstrata uz određivanje boje, sadržaja galakturonske kiseline, ukupnih šećera i fenola kao kriterija njegove kvalitete.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KAVA I NUSPROIZVODI

Stablo ili grm kave pripada porodici *Rubiaceae* a zrna se proizvode od biljke *Coffea L.*, čije dvije vrste imaju ekonomski značaj, *Coffea arabica* i *Coffea canephora* (Mussatto i sur., 2011a).

Plod kave (Slika 1) sastoji se od glatke, čvrste vanjske kože ili perikarpa koja sazrijevanjem mijenja boju iz zelene u tamnocrvenu ili crveno-ljubičastu. Perikarp prekriva mekanu, žućkastu, vlaknastu, slatku pulpu koja se naziva i vanjski mezokarp. Građu ploda čine još i tanki, prozirni, viskozni i visoko hidratizirani sloj sluzi (naziva se pektinski sloj) te tanki, žućkasti endokarp ili pergament i srebrna pokožica koja prekriva svaku hemisferu zrna kave (Esquivel i Jimenez, 2012).



Slika 1. Plod kave (Esquivel i Jimenez, 2012).

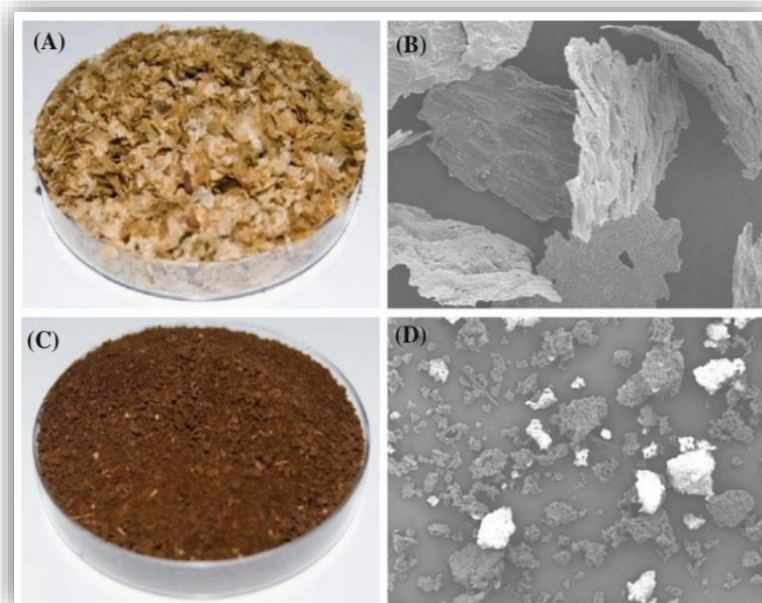
Međutim, kao i u svakoj industriji tako i kod proizvodnje kave dolazi do nastajanja i nakupljanja nusproizvoda, među kojima su značajni srebrna pokožica i talog kave zaostao nakon kuhanja (Slika 2).

Srebrna pokožica predstavlja nusproizvod koji nastaje prilikom procesa prženja kave. Ona ima izuzetno visok udio topljivih prehrambenih vlakana (86 %) i visoki antioksidacijski kapacitet zahvaljujući fenolnim spojevima ali i melanoidima nastalim uslijed Maillardovih reakcija, koje se odvijaju tijekom postupka prženja sirove kave (Borelli i sur., 2004). Također,

srebrna pokožica ima i probiotička svojstva što uz već spomenuti antioksidacijski kapacitet čini ovaj nusproizvod značajnim bioaktivnim materijalom (Narita i Inouye, 2014).

Kemijski sastav srebrne pokožice, baziran na celulozi, hemicelulozi i proteinima, otvara mogućnost primjene ovog biomaterijala u proizvodnji različitih visokovrijednih proizvoda. Celuloza, linearni homopolimer ponavljajućeg niza glukoznih jedinica i hemiceluloza, heteropolimer sastavljen od šećera s C5 (ksiloza i arabinoze) i C6 (manoze, glukoze i dr.) atomima mogu nakon kiselinske ili enzimske hidrolize stvarati jednostavne šećere, koji pak daljnjom transformacijom mogu davati neke druge važne spojeve. Primjerice, transformacijom ksiloze i arabinoze može nastati furfural, ksilitol i arabinitol. Također i prisutstvo proteina u nusproizvodima kave pa tako i srebrnoj pokožici može doprinijeti nutritivnom obogaćivanju pekarskih i konditorskih proizvoda (Mussatto i sur., 2011a). Nadalje, zbog prisustva klorogenske kiseline i melanoida pokožica se koristi i za proizvodnju pića s antioksidacijskim svojstvima, koji pomaže u kontroli tjelesne mase (Martinez-Saez i sur., 2014).

Osim primjene u prehrambenoj industriji, srebrna pokožica se koristi i u biotehnološkim procesima budući da može poslužiti kao supstrat ili čvrsta podloga kod uzgoja mikroorganizama (Mussatto i sur., 2011a). Mussatto i Teixeira (2010) su tako ustanovili da srebrna pokožica i *Aspergillus japonicus* daju značajne koncentracije fruktooligosaharida ($128,7 \text{ g mL}^{-1}$) i β -fruktofuranozida ($71,3 \text{ g mL}^{-1}$). Međutim, prilikom upotrebe pokožice u industrijske svrhe treba uzeti u obzir činjenicu da ona može sadržavati okratoksin A (OTA) koji se smatra kancerogenim. Naime, uslijed postupka prženja kave (vrijeme/temperatura) može doći do stvaranja OTA i to u vrlo različitim koncentracijama. Narita i Inouye (2014) zabilježili su vrijednost od $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ a Toschi i suradnici (2014) $18,7$ i $34,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, što je čak tri puta više u odnosu na maksimalnu dopuštenu vrijednost od $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Maksimalna dopuštena vrijednost OTA za prženu kavu iznosi $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, dok za pokožicu ova vrijednost nije definirana (Toschi i sur., 2014).



Slika 2. Srebrna pokožica (A) i njen mikroskopski prikaz (B), te talog kave (C) i njen mikroskopski prikaz (D) (Mussatto i sur., 2011a).

Talog kave zaostao nakon kuhanja odlikuje se visokim udjelom vode (80 - 85 %) i kiselošću uslijed tretiranja praha kave vrućom vodom ili parom. Istraživanjima Borellija i suradnika (2004) te Mussatto i suradnika (2011a) je ustanovljeno da talog kave čini značajniji izvor šećera od pokožice, od kojih su manozna (21,2 %) i galaktoza (13,8 %) najzastupljeniji. Također u talogu kave su pronađeni i proteini (13,6 %) (Mussatto i sur., 2011a).

Talog zaostao nakon kuhanja sadrži do 15 % ulja što otvara mogućnosti njegove primjene u proizvodnji biodizela, biorazgradivog goriva, dobivenog transesterifikacijom triacilglicerida masnih kiselina s kratkolančanim alkoholima (Al-Hamamre i sur., 2012). Osim u proizvodnji biodizela, talog kave se koristi i kao sirovi materijal u proizvodnji etanola. (Mussatto i sur., 2011a). S ekonomskog i ekološkog gledišta ovi nusproizvodi pokazuju različite mogućnosti primjene, koja će se zasigurno nastaviti istraživati i u budućnosti. Međutim, važno je pronaći rješenja njihovog zbrinjavanja s obzirom da prilikom odlaganja u okoliš pokazuju i toksična svojstva (Mussatto i sur., 2011a).

2.2. PROIZVODNJA KAVE

Berba zrna kave odvija se ručno ili strojno. Ručno branje odvija se tako da se ubire svaki plod zasebno (*engl.* picking) ili se skidaju svi plodovi s grane (*engl.* stripping). Budući da plodovi ne dozrijevaju istodobno, picking metoda iziskuje dosta vremena. Rezultat ovakve

berbe su zrna kave veće kvalitete u odnosu na stripping metodu ili strojno branje kod kojih se uz zrele plodove ubiru i nezreli plodovi, grančice i lišće, kamenčići i ostale nepoželjne tvari. Nakon žetve, plodovi kave prolaze postupak ekstrakcije pulpe u svrhu dobivanja zelenih zrna kave, suhim ili mokrim postupkom.

Suhi postupak čine čišćenje, sušenje i ljuštenje. Sušenje je najvažniji korak u cjelokupnom procesu s obzirom da o njemu ovisi konačna kvaliteta napitka. Ukoliko je kava presušena postaje lomljiva prilikom ljuštenja a ukoliko zaostane vlage sklona je kvarenju uslijed djelovanja gljivica i bakterija. Stoga se sušenje provodi prirodno na sunčevoj svjetlosti ili umjetno, sušilicama sve dok se ne postigne vlaga od oko 10 - 12 %. Nakon sušenja slijedi ljuštenje pri čemu se uklanja vanjska koža i pulpa ostavljajući sluzav materijal (srebrna pokožica) na površini zrna. U svrhu dobivanja napitka visoke kvalitete zrna se mehanički i elektronički sortiraju radi odvajanja oštećenih zrna od kvalitetnih zrna. Suhi postupak se uobičajeno koristi u Brazilu i na afričkom kontinentu gdje ima obilje sunčanih dana i berba se vrši stripping metodom.

Mokri postupak je sofisticiranija tehnika kojom se proizvodi kava veće kvalitete s manje oštećenih zrna što rezultira boljom cijenom kave na tržištu. Prije ljuštenja i odvajanja zrna se selektiraju u flotacijskim spremnicima. Nakon toga slijedi namakanje i fermentacija tijekom koje mogu biti dodani enzimi uz sniženje pH vrijednosti na 4,5. Ovaj korak predstavlja najvažniju razliku između suhog i mokrog postupka budući da se kod mokrog postupka sjemenke odvajaju od pulpe i vanjske kože prije sušenja. Sjemenke se zatim ispiru, poliraju i suše na suncu ili u sušnicama. Mokri postupak je uobičajeniji u državama gdje se žetva kave vrši picking metodom, poput Kolumbije te azijskog kontinenta te Srednje Amerike.

Postoji i alternativna metoda koja kombinira aspekte i jedne i druge metode. Ona se temelji na pranju i selekciji plodova u flotacijskim spremnicima uz izostanak fermentacije. Sjemenke dobivene ovom metodom koriste se u mješavinama espresso kave dajući punoću napitku budući da se polisaharidi u srebrnoj pokožici nisu fermentirali već zaostaju na sjemenkama (Farah, 2012).

Plodovi se zatim suše, ocjenjuju i sortiraju radi uklanjanja oštećenih zrna. Konačno, zrna odnosno plodovi odlaze na prženje.

2.2.1. Prženje zrna sirove kave

Prženje zrna sirove kave je važan proces s obzirom da se tijekom prženja razvijaju specifična organoleptička svojstva (boja, okus i miris). Sirova kava se prži na temperaturama od 100 °C do iznad 200 °C pri čemu zelena boja zrna prelazi u smeđu i razvija se specifična aroma. Do isparavanja slobodne vode dolazi u početnoj fazi prženja. Pri temperaturama do 130 °C počinje karamelizacija saharoze dok se na temperaturama višim od 160 °C odvija niz egzotermnih i endotermnih reakcija pri kojima zrno dobiva svijetlosmeđu boju, njegov volumen značajno poraste i započinje razvoj arome. Kemijske reakcije zaslužne za dobivanje arome i okusa kave kakve su poznate potrošačima izazvane su temperaturama višim od 190 °C (Farah, 2012). Tijekom prženja, dolazi do povećanja volumena zrna kave pri čemu se odvaja srebrna pokožica koja je zbog nižeg sadržaja vlage relativno stabilna (5 - 7 %) u odnosu na ostale nusproizvode poput taloga (Bessada i sur., 2018).

Prženjem dolazi i do značajnih promjena u kemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti kave što se javlja kao posljedica transformacije polifenola u kompleksne spojeve izazvanih Maillardovim reakcijama. Dolazi i do formiranja drugih organskih spojeva uslijed reakcija oksidacije, toplinske degradacije i hidrolize (Mussatto i sur., 2011b). Zbog termičke nestabilnosti, klorogenska kiselina ulazi u reakcije izomerizacije, epimerizacije, laktonizacije i degradacije u niskomolekularne komponente (uključujući fenole i katehole) a može se ugraditi i u melanoide i na taj način doprinijeti razvoju boje i okusa (Farah, 2012). Nakon prženja, zrna je potrebno brzo ohladiti kako bi se zaustavile egzotermne reakcije te izbjeglo prekomjerno prženje (Mussatto i sur., 2011b).

2.3. KEMIJSKI SASTAV KAVE I SREBRNE POKOŽICE

Kafein, termostabilni metilksantin odgovoran za gorčinu napitka kave je najpoznatija njezina komponenta, s udjelom od 0,8 - 1,4 % (w/w) u *Coffea arabica* i 1,7 - 4 % (w/w) u *Coffea canephora*. Drugi važan spoj je trigonelin, alkaloid koji nastaje enzimskom metilacijom nikotinske kiseline. On je prekursor različitih skupina hlapljivih spojeva koji nastaju prilikom prženja poput pirola i piridina. Kava sadrži i topljiva prehrambena vlakna koji se sastoje od visokomolekularnih polisaharida koji doprinose viskoznosti skuhanе kave među kojima su najvažniji galaktomanani i arabinogalaktani tipa II (Farah, 2012).

Ostali spojevi koji se nalaze u kavi uključuju celulozu, minerale, šećere, lipide, tanine i polifenole. Najznačajniji minerali su kalij (40 % ukupnog mineralnog sastava) i fosfor (4 %) iako je pronađeno još 30 različitih minerala u manjim količinama (Mussatto i sur., 2011b).

Među šećerima ističu se saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza i manozna. Zrna kave sadrže i vitamine B kompleksa, niacin te klorogensku kiselinu s udjelom i do 12 % (Mussatto i sur., 2011b).

Također, veliki značaj u sastavu kave imaju proteini, peptidi i slobodne aminokiseline s obzirom da su oni prekursori za formiranje hlapljivih komponenti poput furana, piridina, pirazina, pirola, aldehida i melanoida. Ostale hlapljive komponente zelenih zrna kave daju im slabu ali karakterističnu aromu. Identificirano je oko 100 različitih takvih spojeva koji većinom pripadaju skupinama alkohola, estera i aldehida (Farah, 2012).

Srebrna pokožica sadrži visoki udio prehrambenih vlakana (50 - 60 %) od čega su 85 % netopljiva prehrambena vlakna (Narita i Inouye, 2014). Vrlo važne komponente srebrne pokožice su celuloza (18,5 %) i hemiceluloza (13 %). Mikroskopskom analizom površinskih slojeva pokožice pronađen je i značajan udio proteina (18 %) i njihovih hidrolizata (15 %). Sastav šećera srebrne pokožice temelji se na glukozi (17,8 %), ksilozi (4,7 %), galaktozi (3,8 %), manozni (2,6 %) i arabinozi (2,0 %) (Borelli i sur., 2004; Mussatto i sur., 2011a) dok su najznačajniji minerali kalij (5 %), magnezij (2 %) i kalcij (0,5 %) (Bessada i sur., 2018). Srebrna pokožica sadrži i masti s udjelom između 1,6 i 3,3 % (Bessada i sur., 2018) a najzastupljeniji su triacilgliceroli (48 %), slobodne masne kiseline (21 %), esterificirani steroli (15 %), slobodni steroli (13 %) i diacilgliceroli (4 %). Srebrna pokožica sadrži i vitamin E (4,17 mg/100g). Analiziranom vitaminu E Costa i suradnici (2016) su identificirali α , β , γ i δ tokoferol te β , γ i δ tokotrienol. Među njima je najzastupljeniji α tokoferol (2,25 mg/100g), a slijedi ga β tokotrienol (0,95 mg/100 g).

2.3.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji doprinose senzorskoj i nutritivnoj kvaliteti svih biljnih vrsta a imaju funkciju antioksidansa jer se vežu na slobodne radikale tako da doniraju vodikov atom ili elektron (Balasundram i sur., 2006). Osnovnu strukturu polifenola čini konjugirani aromatski ili benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998). Glavne skupine polifenola su flavonoidi, fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), tanini, stilbeni i lignini (Balasundram, 2006).

U pulpi kave najzastupljenije su kafeinska i ferulinska kiselina a mogu se ekstrahirati na dva načina. Prvi uključuje ekstrakciju otapalom nakon provedene alkalne hidrolize, dok se drugi odvija uz pomoć enzima cinamoil esteraze (Arellano-Gonzales i sur., 2011). U kavi

dominira klorogenska kiselina, a nastaje esterifikacijom trans-hidroksicimetnih kiselina s kininskom kiselinom. Ona doprinosi trpkosti, gorčini i kiselosti kuhane kave (Farah, 2012).

Flavonoidi, podskupina fenolnih spojeva, su niskomolekularni spojevi s 15 C atoma koji sadrže difenipropanski kostur povezan s piranskim prstenom u sredini (Pietta, 2000). S obzirom na stupanj nezasićenosti, stupanj oksidacije te broj i položaj OH skupine u C prstenu razlikujemo flavanole, flavonole, flavone, flavanone, izoflavone i antocijane (Ignat i sur., 2011).

Sastav i količina fenola i flavonoida kao i njihove podskupine u kavi razlikuju se od sorte do sorte. Primjerice, u kavi sorte *Robusta Smile Tiger* uočen je povećan sadržaj galne kiseline, epikatehina i ferulinske kiseline a u kavi sorte *Robusta Santos* mala količina katehina i ferulinske kiseline u odnosu na druge varijetete (Kreicbergs i sur., 2011).

Prema Borelli i suradnicima (2004) najznačajniji fenolni spojevi u pokožici su klorogenska i kafeinska kiselina, te 5- kafeokininska kiselina no za razliku od ovog istraživanja, Bresciani i suradnici (2014) nisu ustanovili značajnu količinu kafeinske i 5- kafeokininske kiseline u srebrnoj pokožici.

2.3.2. Masne kiseline

Masne kiseline u organizmu služe kao izvor energije, kao polazni spojevi za enzimatske sinteze biomolekula, sastavni su dijelovi staničnih membrana i sudjeluju u transportu vitamina topivih u mastima (A, D, E i K). Masne kiseline su molekule građene od ugljikovog lanca s terminalnom metilnom skupinom (-CH₃) na jednom i karboksilnom grupom (-COOH) na drugom kraju lanca (Rustan i Devon, 2005). Dije se na zasićene masne kiseline (*engl.* saturated fatty acids), povezane jednostrukim vezama i nezasićene masne kiseline (*engl.* unsaturated fatty acids) koje u svojoj strukturi sadrže i dvostruke veze. Osim duljinom lanca, nezasićene masne kiseline se razlikuju prema broju dvostrukih veza (jednostruko i višestruko nezasićene), položaju prve dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu (ω -3, ω -6 i ω -9) te prostornom obliku dvostrukih veza (cis i trans oblik) (Rustan i Devon, 2005). Jednostruko nezasićene masne kiseline sadrže jednu dvostruku vezu između C- atoma, dok višestruko nezasićene masne kiseline u svojoj strukturi sadrže dvije ili više dvostrukih veza odvojenih CH₂ jedinicom. Među višestruko nezasićenima ističu se α -linolenska (18:3, ω -3) i linolna (18:2, ω -6), esencijalne za ljudski organizam (Ferreri i Chatgialloglu, 2015).

Istraživanje Efthymiopoulos i suradnika (2018) je pokazalo da zrna kave sadrže ulja (11 - 20 %), a njihova se količina razlikuje ovisno o sorti. Naime, ulje se nalazi u obliku lipida

u endospermu i služi kao zaliha energije potrebna za klijanje i rast zrna kave. Ulje se pretežno sastoji od triglicerida i manjih količina diglicerida, monoglicerida i slobodnih masnih kiselina, terpena, sterola i tokoferola (Efthymiopoulos i sur., 2018). Masne kiseline u zrnima kave najčešće se nalaze esterificirane glicerolom u frakciji triacilglicerola, 20 % je esterificirano diterpenima a manja količina se nalazi u esterima sterola. Najzastupljenije masne kiseline u kavi su linolna, oleinska i linolenska i odgovorne su za održavanje svježine kave i sprječavanje ustajalosti uslijed hidrolize i oksidacije triacilglicerida (Farah, 2012).

U srebrnoj pokožici su najzastupljenije zasićene masne kiseline (65 %) nakon čega slijede polinezasićene (28 %) i mononezasićene (7 %). Od pojedinačnih masnih kiselina najveći udjel pripada linolnoj (24 %), zatim palmitinskoj (22 %), behenijskoj (15 %) i arahidskoj (14 %) (Bessada i sur., 2018).

2.3.3. Pektin

Pektinske tvari sastoje se od D-galakturonske kiseline koja je povezana α -(1,4) vezom u linearni lanac u kojem su različite karboksilne skupine esterificirane metanolom pri čemu je osnovna struktura isprekidana α -(1,2) vezom s L-ramnopiranoznim jedinicama. Osim ramnoze, šećeri prisutni u pektinu su galaktoza, arabinoza, glukoza, manozna i ksiloza (Sharma i sur., 2006).

S obzirom na stupanj esterifikacije (*engl.* degree of esterification, DE), razlikujemo visokometoksilirani (*engl.* high methoxyl pectin, HM) i niskometoksilirani (*engl.* low methoxyl pectin, LM) pektin. Stupanj esterifikacije za komercijalni HM nalazi se u rasponu od 60 do 75 %, dok za LM od 20 do 40 %. Osim toga, HM i LM tvore gel u različitim uvjetima. HM pektin za želiranje zahtijeva niski pH (pH = 3) i prisutnost većih količina šećera prilikom čega nastaje reverzibilni gel. Pri pH vrijednostima od 5 do 6, HM pektin je stabilan samo na sobnoj temperaturi, no kako se temperatura ili pH povećava dolazi do cijepanja lanca kao i smanjenja viskoznosti i sposobnosti želiranja. Osim toga, HM pektin je topljiv u vrućoj vodi i često sadrži disperzijsko sredstvo (najčešće dekstrozu) radi aglomeracije čestica. Za razliku od njega, LM pektin želira neovisno o sadržaju šećera. Također, nije osjetljiv na pH što ga čini stabilnijim ali zahtijeva prisutnost određene količine kalcijevih ili drugih dvovalentnih iona. Otporniji je na tople i vlažne uvjete i kao takav se može čuvati i do godinu dana bez gubitka želirajućih svojstava (Sundar Raj i sur., 2012).

Iako je pektin najzastupljeniji u voću i njihovim nusproizvodima (Marić i sur., 2018), kava također sadrži određene količine pektina. Naime, Garcia i suradnici (1991) su

ekstrakcijom sluzavog sloja koji okružuje pulpu kave s vodenom otopinom NaOH izolirali pektin. Osim s NaOH, pektin se iz sluzavog sloja ekstrahira i s 50 % HCl i heksametafosfatom a ekstrakcija iz pulpe se najčešće provodi otopinom HCl i autoklaviranjem pri 120 °C kroz 30 minuta (Garcia i sur., 1991).

Na vrstu pektina utječe i vrsta kave pa tako sorte *Bourbon*, *Caturra* i *Catimor* koje se kultiviraju na nadmorskoj visini iznad 1500 m sadrže niskometoksilirani pektin sa stupnjem esterifikacije od 23 % (Garcia i sur., 1991). U sluzavom sloju je prisutan visokometoksilirani pektin sa stupnjem esterifikacije od 62 % koji ne pokazuje svojstvo želiranja, tipično za visokometoskilirane pektine i za razliku od pektina iz pulpe ne sadrži pigmente i fenolne spojeve (Avallone i sur., 2000). Također, pektin u kavi ima nizak udjel metoksilnih skupina sa stupnjem esterifikacije između 18,97 i 30,55 %. Niskomolekularnost pektina objašnjava se enzimskom degradacijom tijekom procesa ekstrakcije pri neutralnom pH (Garcia i sur., 1991).

Zbog izuzetnih emulgirajućih svojstava, sposobnosti zgušnjavanja i želiranja, pektin je primjenu pronašao u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Koristi se prvenstveno kao stabilizator, inhibitor kristalizacije i kao sredstvo za inkapsulaciju i želiranje (Ovodov, 2009).

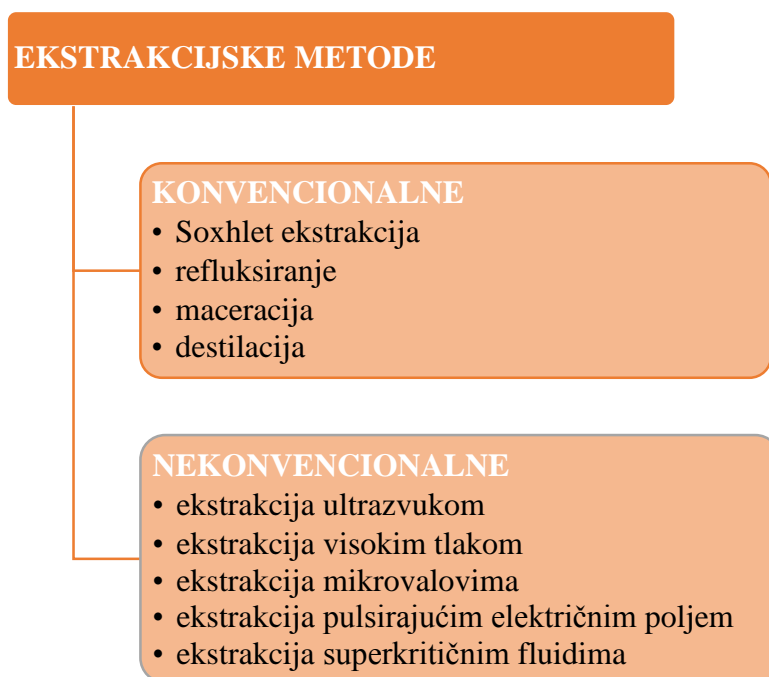
2.4. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je prvi korak u izolaciji različitih komponenti iz biljnih materijala i industrijskih nusproizvoda. Prema definiciji ekstrakcija predstavlja prijenos jedne ili više tvari u tekuću fazu, nakon čega slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze (Conde i sur., 2010). Ekstrakcija je proces koji uključuje desorpciju sastojaka s aktivnog mjesta na matriksu, njegove difuzije u matriks, otapanja i difuzije sastojka u ekstrakt i izolacije otopljene tvari (Camel, 2001).

Učinkovitost ekstrakcije značajno ovisi vrsti otapala i njegovom udjelu, temperaturi i vremenu ekstrakcije, veličini čestica ekstrahiranog materijala te omjeru materijala i otapala. Izbor otapala ovisi ponajviše o interakciji otapala i matriksa pa je tako primjerice istraživanje Brava i suradnika (2013) pokazalo da voda ili vodene otopine etanola omogućuju bolju ekstrakciju fenolnih spojeva iz uzoraka kave u odnosu na čisti etanol. Nadalje, njihovim istraživanjem je utvrđeno da učinkovitost ekstrakcije raste s povišenjem temperature jer se zbog većeg prijenosa mase i topljivosti otopljene tvari u otapalu smanjuje površinska napetost a viskoznost dostiže svoj maksimum na temperaturi od 140 °C.

Važan faktor koji utječe na ekstrakciju je i veličina čestica budući da neusitnjen materijal zahtijeva duže vrijeme ekstrakcije što posljedično dovodi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti (Rajha i sur., 2014).

Ekstrakcijske metode dijele se na konvencionalne i nekonvencionalne (Slika 3) (Azmir i sur., 2013) a u ovom radu je korištena ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, Soxhlet ekstrakcija i refluksiranje.



Slika 3. Podjela metoda ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

2.4.1. Ekstrakcija mikrovalovima

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi, duljina od 1 mm do 100 cm (Wang i Weller, 2006) a nastaju uslijed protoka električne struje kroz vodič (Chemat i sur., 2004). Mikrovalno zagrijavanje (2,45 GHz) je posljedica rasipanja elektromagnetskih valova u ozračenom mediju (Mason i sur., 2011). Za razliku od tradicionalnih metoda, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima osigurava veći prinos ekstraktanta (analita), znatnu uštedu vremena i energije te potrošnju manjih volumena otapala (Ganzler i sur., 1986).

Princip ekstrakcije bazira se na činjenici da upotrebjeno otapalo i sama voda prirodno prisutna u biljnom materijalu preuzimaju energiju mikrovalova. To dovodi do povećanja temperature uslijed ubrzanog kretanja molekula, dipoli polarnih komponenti započnu s rotacijom uslijed čega dolazi do pucanja slabih vodikovih veza i razaranja staničnih stijenki.

Time je olakšano prodiranje otapala unutar stanice pri čemu dolazi do povećanja površine interakcije između otapala i ekstrahirane komponente (Wang i Weller, 2006).

Kod ekstrakcije mikrovalovima prijenos mase i topline se odvijaju u istom smjeru odnosno iz unutrašnjosti tretiranog materijala pri čemu se toplina raspršuje kroz cijeli volumen ozračenog medija, postižući znatno brže povećanje temperature, ovisno o snazi mikrovalova i dielektričnoj konstanti ozračenog materijala (Mason i sur., 2011). U odnosu na ekstrakciju mikrovalovima, kod konvencionalne ekstrakcije prijenos mase se odvija iznutra prema van, a prijenos topline u obrnutom smjeru što zahtijeva duže vrijeme potrebno za povećanje temperature.

2.4.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je metoda ekstrakcije koja se bazira na upotrebi Soxhlet ekstraktora spojenog s hladilom i tikvicom za destilaciju. U papirnatu čahuru (naprstak) umetnutu u Soxhlet ekstraktor stavlja se suhi uzorak a potom se ekstraktor puni otapalom koje pomoću kapilarne cjevčice kapa u destilacijsku tikvicu nakon što započne njeno zagrijavanje u vodenoj kupelji.

Soxhlet ekstrakcija je pokazala niz prednosti kao što je kontinuirano dovođenje materijala u kontakt s otapalom, smanjena potreba za filtracijom, mogućnost provođenja nekoliko simultanih ekstrakcija, niska cijena aparature i korištenje većih odvaga uzoraka za ekstrakciju. Međutim, kao najveći nedostatak ove metode ističe se dugo vrijeme ekstrakcije u točki vrenja otapala što može uzrokovati termičku razgradnju ciljanog analita (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010).

2.4.3. Refluksiranje

Refluksiranje je konvencionalna metoda ekstrakcije koja se uobičajeno provodi kod ekstrakcije čvrstog materijala otapalom pri čemu tvari prelaze iz čvrste u tekuću fazu. Princip metode temelji se na zagrijavanju uzorka s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom pri čemu se otapalo prevodi u paru a para kondenzira u tekućinu koja se vraća u reakcijsku smjesu (Rapić, 1994).

Unatoč visokoj efikasnosti osnovni nedostaci ove metode su dugo vrijeme ekstrakcije, upotreba velikih količina otapala, primjena postupka filtracije radi odvajanja ekstrahiranog materijala od otopine te mogućnost ekstrakcije interferenata.

2.5. ANALITIČKE METODE

Postoji više skupina analitičkih metoda koje se koriste za analizu uzoraka, a općenita podjela je na separacije i neseparacijske (Nuhu, 2014).

Separacijske metode se temelje na prolasku ekstrakta kroz separacijski sustav nakon čega slijedi detekcija izdvojenog sadržaja odgovarajućim detektorom. Ovoj skupini analitičkih metoda pripadaju kromatografske metode (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija i tankoslojna kromatografija) te kapilarna elektroforeza. Detekcija analita može biti UV/Vis detektorom, detektorom s refrakcijskim indeksom, detektorom s diodnim nizom i kemiluminiscentnim detektorom a najčešće se primjenjuju u određivanju biološki aktivnih spojeva.

Neseparacijske metode ne zahtijevaju provođenje postupka separacije. U karakterizaciji analita promatra se ponašanje molekula, način fragmentacije, magnetska rezonancija, električna svojstva i UV/Vis i IR apsorpcija. Ove metode su se pokazale kao jako osjetljive i selektivne te je njima moguće određivanje spojeva velikom brzinom. Prema Nuhu (2014) uža podjela ovih metoda je najčešće na spektrofotometrijske, elektrokemijske i spektralne.

U ovom radu je korištena separacijska (plinska kromatografija) metoda za određivanje masnih kiselina i neseparacijska (UV/Vis spektrofotometrija) za određivanje ukupnih fenola, flavonoida, ukupnih šećera i galakturonske kiseline.

2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija

Obzirom da većina biološki aktivnih makromolekula apsorbira svjetlost u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) dijelu spektra, spektrofotometrija kao metoda koristi se u određivanju njihove koncentracije ali i pri detekciji promjena u konformaciji, vezanju liganada i praćenju odvijanja enzimskih reakcija.

Spektroskopske tehnike temelje se na mjerenju interakcija molekula s elektromagnetskim zračenjem pri čemu molekula apsorbira ili emitira određenu količinu zračenja. Energija zračenja u UV i vidljivom dijelu spektra iznosi oko 150 - 400 kJ mol⁻¹ i služi za pobuđivanje elektrona iz osnovnog u više energijsko stanje.

Uređaj koji se koriste u ovim određivanjima naziva se spektrofotometar. Najčešće sadrži dva izvora svjetlosti: deuterijevu lampu koja emitira svjetlost u UV području i žarulju s wolframovom niti za vidljivi dio spektra. Nakon prolaska svjetla kroz monokromator (ili optičke filtre), ono se fokusira na kivetu pri čemu se količina svjetlosti koja prođe kroz uzorak

detektira fotomultiplikatorom ili fotodiodama. Dakle, uređaj mjeri i uspoređuje intenzitet upadnog svjetla s intenzitetom svjetla koje je prošlo kroz uzorak. Zakon koji povezuje intenzitet svjetla koju propušta otopina neke tvari i koncentracija otopine poznat je kao Lambert-Beerov zakon. Povezanost intenziteta svjetla prije (I_0) i nakon prolaska kroz uzorak (I) s apsorbancijom prikazuje jednadžba 1 a linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji prema Lambert-Beerovom zakonu jednadžba 2 (Schmid, 2001):

$$A = -\log_{10} (I/I_0) \quad [1]$$

$$A = \varepsilon c l \quad [2]$$

gdje je c množinska koncentracija (mol dm^{-3}), l debljina sloja otopine (cm), a ε molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

2.5.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*engl.* gas chromatography, GC) je prvi put primijenjena za analizu masnih kiselina 1951. godine i do danas objavljeno je na tisuće radova o uspješnoj detekciji čistih supstancija, osobito hlapljivih spojeva ovom metodom.

GC sustav sastoji se od sljedećih dijelova: sustava plina nositelja (uključujući njegov spremnik i regulator tlaka), sustav za unošenje uzorka s razdjelnikom, kolone za razdvajanje i detektora (Zuo i sur., 2013).

Princip metode se temelji na unošenju rasplinutog uzorka u kolonu pri čemu se komponente uzorka gibaju nošene plinom nosiocem, uobičajeno helijem ili dušikom. Različito se raspodjeljuju između pokretne i nepokretne faze što se detektira nakon izlaska iz kolone. Najčešće se koriste detektor toplinske vodljivosti i plameno-ionizacijski detektor. Detektor toplinske vodljivosti se sastoji od izvora topline (wolfram - renijeva žica) čija temperatura ovisi o toplinskoj vodljivosti plina nosioca (prolaskom helija žica se naglo ohladi) i promjenama toplinske vodljivosti do kojih dolazi tokom elucije analita u plinu nosiocu. Posljedično, dolazi do promjene otpora koji je proporcionalan koncentraciji analita u pokretnoj fazi. Češću primjenu u prehrambenoj industriji nalazi plameno-ionizacijski s obzirom da se većinom analiziraju organski spojevi a osim toga tisuću puta je osjetljiviji od detektora toplinske vodljivosti. Komponente nošene plinom nosiocem se nakon izlaska iz kolone miješaju s vodikom i izgaraju u struji zraka. Jedan dio molekula se pri tome ionizira i daje struju na detektoru koja je proporcionalna koncentraciji analita.

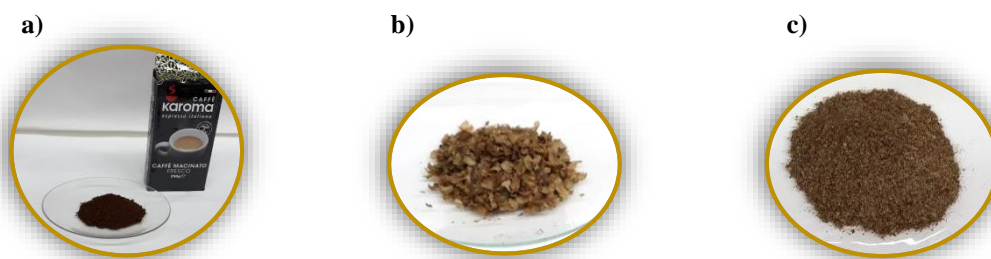
Vrijeme proteklo od trenutka unošenja uzorka u kolonu do pojave eluiranih sastojaka u detektoru naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme. Ono ovisi o hlapljivosti tvari, temperaturi te duljini i promjeru kolone (Al-Bukhaiti i sur., 2017).

U odnosu na ostale metode detekcije analita, plinska kromatografija je pokazala niz prednosti pa danas nalazi široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutsko-kozmetičkoj industriji. Neke od njih su: izvrsna rezolucija, visoka preciznost i točnost u kvantifikaciji, minimalna termička i katalitička degradacija osjetljivih komponenti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL

Espresso kava „Karoma“ (mješavina *Arabice* i *Robuste*) i njen nusproizvod, srebrna pokožica nastao tijekom prženja sirove kave (Slika 4) dobavljeni su FEIO srl, (Angri, Salerno, Italija).



Slika 4. Espresso kava „Karoma“ (a), srebrna pokožica (b) i samljevena srebrna pokožica (c).¹

3.2. KEMIKALIJE

- Aceton (Gram - mol, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram - mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fenol (Acros organics, Geel, Belgija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Glukoza monohidrat (Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD)
- Galakturonska kiselina (Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD)
- Galna kiselina (Sigma - Aldrich, Hong Kong, Kina)
- Izooktan (J.T. Backer, Deventer, Nizozemska)
- Kalijev hidroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Karbazol (Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Jabučni pektin (Sigma - Aldrich, Hong Kong, Kina)

¹Sve slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju.

- Nitratna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev hidrogensulfat monohidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Oksalna kiselina (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Petroleter (Carlo Erba Reagents S.A.S., Rouen, Francuska)
- Rutin (Alfa Aesar Karlsruhe, Njemačka)
- Sumporna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.3. APARATURA I PRIBOR

3.3.1. Aparatura

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Kolorimetar (CM - 3500d, Konica Minotta Sensing Inc., Osaka, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH Basic 2, Boutersem, Belgija)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, START S Microwave Labstation for Synthesis, Bergamo, Italija)
- Plinski kromatograf (2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Tehnička vaga (Mikrotehna, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis spektrofotometar (Lambada 1, Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- Vodena kupelj za Soxhlet ekstrakciju (Inka, Zagreb, Hrvatska)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)

3.3.2. Pribor

- Epruvete
- Erlenmeyerove tikvice, 500 i 1000 mL
- Falcon epruvete, 50 mL
- Kapaljka
- Menzura

- Mikropipeta
- Odmjerne tikvice, 10, 25, 50, 100, 200, 500 i 1000 mL
- Pipete, 1, 2, 5, 10 mL
- Staklene čaše, 50, 100, 250 i 500 mL
- Stakleni štapić
- Stakleni lijevak
- Tikvica s okruglim dnom
- Tikvica s ravnim dnom

3.4. OTOPINE I NJIHOVA PRIPREMA

3.4.1. Otopine za određivanje fenola i flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice

Za određivanje fenola pripravljene su sljedeće otopine:

- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$).
Otpipetirano je 2,5 mL FC množinske koncentracije $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ u odmjernoj tikvici od 25 mL, a potom je tikvica nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.
- Otopina natrijeva karbonata ($w = 20 \text{ \%}, w/v$)
200 g Na_2CO_3 otopi se u 800 mL vruće, ključale deionizirane vode i nakon hlađenja doda se nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Sadržaj se profiltrira nakon 24 h.
- Otopina galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$)
Odvagano je 0,5 g galne kiseline, te otopljeno u 10 mL 96 %-tnog etanola. Otopljeni sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja je potom nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.

Za određivanje flavonoida pripravljene su sljedeće otopine:

- Otopina natrijevog hidroksida ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$)
Izvagano je 4 g NaOH i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL te je tikvica do oznake nadopunjena destiliranom vodom.
- Otopina natrijevog nitrita ($w = 5 \text{ \%}, w/v$)
Odvagano je 5 g NaNO_2 te otopljeno deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijevog klorida ($w = 10 \text{ \%}, w/v$)

Odvagano je 10 g AlCl_3 te otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL.

- Otopina rutina ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$)

Odvagan je 0,1 g rutina te otopljen u 10 mL metanola. Otopljeni sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja je potom nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.

3.4.2. Otopine za određivanje masnih kiselina u uzorcima kave i srebrne pokožice

U postupku određivanja metil estera masnih kiselina pripremljene su sljedeće otopine:

- Otopina kalijeva hidroksida ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$)

Odvagano je 13,1 g kalijevog hidroksida te otopljeno uz grijanje u 100 mL metanola.

3.4.3. Otopine za određivanje galakturonske kiseline, šećera i fenola u uzorcima pektina

Za određivanje ukupne galakturonske kiseline u izolatima pektina pripremljene su sljedeće otopine:

- Otopina karbazola ($w = 0,1 \text{ \%}$, w/v)

Odvagano je 100 mg karbazola te otopljeno s 96 %-tnim etanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

- Otopina natrijeva hidroksida ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

Odvagano je 0,4 g NaOH te otopljeno u deioniziranoj vodi, te nadopunjeno do oznake u odmjerne tikvici od 200 mL.

- Otopina galakturonske kiseline ($\gamma = 120,5 \text{ mg L}^{-1}$)

Odvagano je 120,5 mg galakturonske kiseline te otopljeno u 10 mL priređenog NaOH. Otopljeni sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 1 L, koja je potom nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.

Za određivanje ukupnih šećera u izolatima pektina pripremljene su sljedeće otopine:

- Otopina fenola ($w = 5 \text{ \%}$, w/v)

Odvagano je 5 g fenola te otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL koja je potom nadopunjena do oznake.

- Otopina glukoza ($\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$)

Odvagano je 100 mg glukoze te otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 50 mL koja je potom nadopunjena do oznake.

Za određivanje ukupnih fenola u izolatima pektina pripremljene su otopine čija je priprema identična onoj opisanoj u potpoglavlju 3.4.1.

3.5. METODE

3.5.1. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka kave i srebrne pokožice mikrovalovima

Točno 1,5 g kave i prethodno usitnjenog uzorka srebrne pokožice ekstrahirano je s 50 mL vodenih otopina etanola (50 i 70 %), pripremljenih razrijeđivanjem 96 %-tnog etanola s deioniziranom vodom u odmjernim tikvicama od 500 mL, pri vremenu od 5 i 15 min i temperaturi od 50 i 70 °C (Tablica 1).

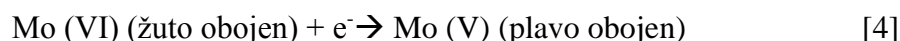
Tablica 1. Uzorci kave i srebrne pokožice s parametrima upotrebljenim tijekom ekstrakcije pomoću mikrovalova.

Oznaka uzorka	Vrsta uzorka	ϕ (etanol)/%	$T/^\circ\text{C}$	t/min	
1 MŠ	SREBRNA POKOŽICA	50	50	5	
2 MŠ				15	
3 MŠ				70	5
4 MŠ					15
5 MŠ		70	70	5	
6 MŠ				15	
7 MŠ				5	
8 MŠ				15	
9 MŠ	KAVA	50	50	5	
10 MŠ				15	
11 MŠ				70	5
12 MŠ					15
13 MŠ		70	70	5	
14 MŠ				15	
15 MŠ				5	
16 MŠ				15	

Nakon ekstrakcije provedene u mikrovalnom reaktoru snage 2400 W, frekvencije 60 Hz i napona od 220 V uzorci su profiltrirani preko grubog filter papira a potom još jednom preko finog filter papira u Falcon kivete. Takvi ekstrakti čuvani su u hladnjaku na +4 °C do trenutka analize. U dobivenim ekstraktima određen je sadržaj fenola i flavonoida UV/Vis spektrofotometrijom.

3.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u uzorcima kave i srebrne pokožice

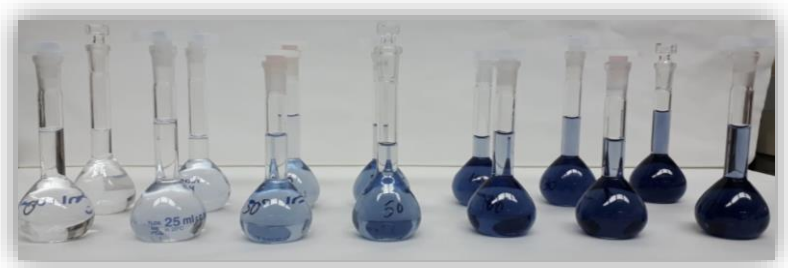
Princip spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola temelji se na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa, smjese fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojen volframov oksid i molibdenov oksid (reakcija 3 i 4). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva. Tvorba plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Singleton i sur., 1999).



3.5.2.1. Postupak određivanja ukupnih fenola

Prije postupka određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorcima kave i srebrne pokožice izrađen je baždarni dijagram. Priređene su pojedinačne otopine galne kiseline, masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130, 180 mg L⁻¹ pipetiranjem 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3 i 1,8 mL alikvota ishodne otopine galne kiseline (priprema opisana u poglavlju 3.4.1) u odmjerne tikvice od 50 mL.

Nakon nadopunjavanja tikvica deioniziranom vodom otpipetiran je 1 mL pojedinačne otopine standarda u odmjerne tikvice od 25 mL. Zatim je dodano 10 mL deionizirane vode i 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Nakon 5 minuta stajanja na sobnoj temperaturi doda se 3,75 mL Na₂CO₃ (20 %, w/v) a potom se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Slijepa proba je pripremljena na identičan način kao i uzorci standarda, no umjesto 1 mL standarda otpipetiran je 1 mL deionizirane vode. Priređene tikvice čuvaju se 2 h na tamnom mjestu nakon čega im se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm (Slika 5). Iz izmjerenih apsorbancija (A) i pripadajućih masenih koncentracija (γ) izradi se baždarni dijagram.



Slika 5. Standardne otopine galne kiseline korištene za izradu baždarnog dijagrama.

Postupak određivanja ukupnih fenola u uzorcima kave i srebrne pokožice je identičan prethodno opisanom postupku, no umjesto 1 mL pojedinačnih otopina galne kiseline, u odmjerne tikvice od 25 mL otpipetirano je 500 μL ekstrakta srebrne pokožice, odnosno 400 μL razrijeđenog ekstrakta kave (2 mL ekstrahirane kave je prethodno razrijeđeno s deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 25 mL). Kod pripreme slijepe probe umjesto 500 μL ekstrakta nusproizvoda kave, odnosno 400 μL razrijeđenog ekstrakta kave upotrebljeno je 500 μL , odnosno 400 μL deionizirane vode.

3.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice

Ukupni flavonoidi su određeni spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju aluminijsko-flavonoidnih kompleksa s C-4 i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola. Vezanje aluminijske na flavonoide ligande dovodi do ružičasto obojenih kompleksa čija se apsorbancija mjeri na valnoj duljini od 510 nm (Pekal i Pyrzynska, 2014).

3.5.3.1. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Prije postupka određivanja sadržaja ukupnih flavonoida izrađen je baždarni dijagram. Priređene su pojedinačne otopine rutina masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg L^{-1} pipetiranjem 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3; i 1,8 mL alikvota ishodne otopine rutina (priprema opisana u poglavlju 3.4.1) u odmjernim tikvicama od 50 mL. Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL pojedinačne otopine standarda u tikvice od 10 mL a potom se doda 2 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 . Nakon 5 minuta doda se 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 a nakon 6 minuta i 2 mL NaOH ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) te se tikvice nadopune

deioniziranom vodom do oznake. Postupak pripreme slijepe probe je isti kao i onaj kod pripreme standarda, no umjesto 1 mL standarda korišten je 1 mL deionizirane vode.

Ovako priređenim otopinama (Slika 6) izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm. Iz izmjerenih apsorbancija (A) i pripadajućih masenih koncentracija (γ) izradi se baždarni dijagram, a iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se masena koncentracija flavonoida u ekstraktima.



Slika 6. Standardne otopine rutina korištene za izradu baždarnog dijagrama.

Postupak određivanja ukupnih flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice je identičan prethodno opisanom postupku, no umjesto 1 mL pojedinačnih otopina rutina, u odmjerne tikvice od 10 mL otpipetira se 500 μ L ekstrakta srebrne pokožice, odnosno 400 μ L razrijeđenog ekstrakta kave (2 mL ekstrahirane kave je razrijeđeno s deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 25 mL).

Za pripremu slijepe probe je umjesto 500 μ L ekstrakta nusproizvoda kave, odnosno razrijeđenog ekstrakta kave upotrijebljeno 500 μ L, odnosno 400 μ L deionizirane vode.

3.5.4. Ekstrakcija masti iz uzoraka kave i srebrne pokožice

Izvagano je 3 g prethodno osušenih uzoraka kave i srebrne pokožice u celulozne čahure koje se potom stave u Soxhlet ekstraktor. Tikvice s okruglim dnom se prije ekstrakcije suše na 105 °C, hlade u eksikatoru, važu te se stave u Soxhlet ekstraktor. Nakon dodatka petroletera započne njihovo zagrijavanje na vodenoj kupelji, uz vrijeme trajanja ekstrakcije od 6 h na temperaturi ključanja otapala. Završetkom ekstrakcije, tikvice s ekstraktom se suše, hlade i važu a udio masti se izračuna prema formuli 5:

$$w (\text{masti}) = \frac{m_2 - m_1}{m (\text{uzorak})} \quad [5]$$

gdje je m_1 - masa prazne tikvice (g), m_2 - mase tikvice i ekstrahirane masti (g) i m - masa uzorka (g).

3.5.5. Određivanje metil estera masnih kiselina u ekstraktima kave i srebrne pokožice

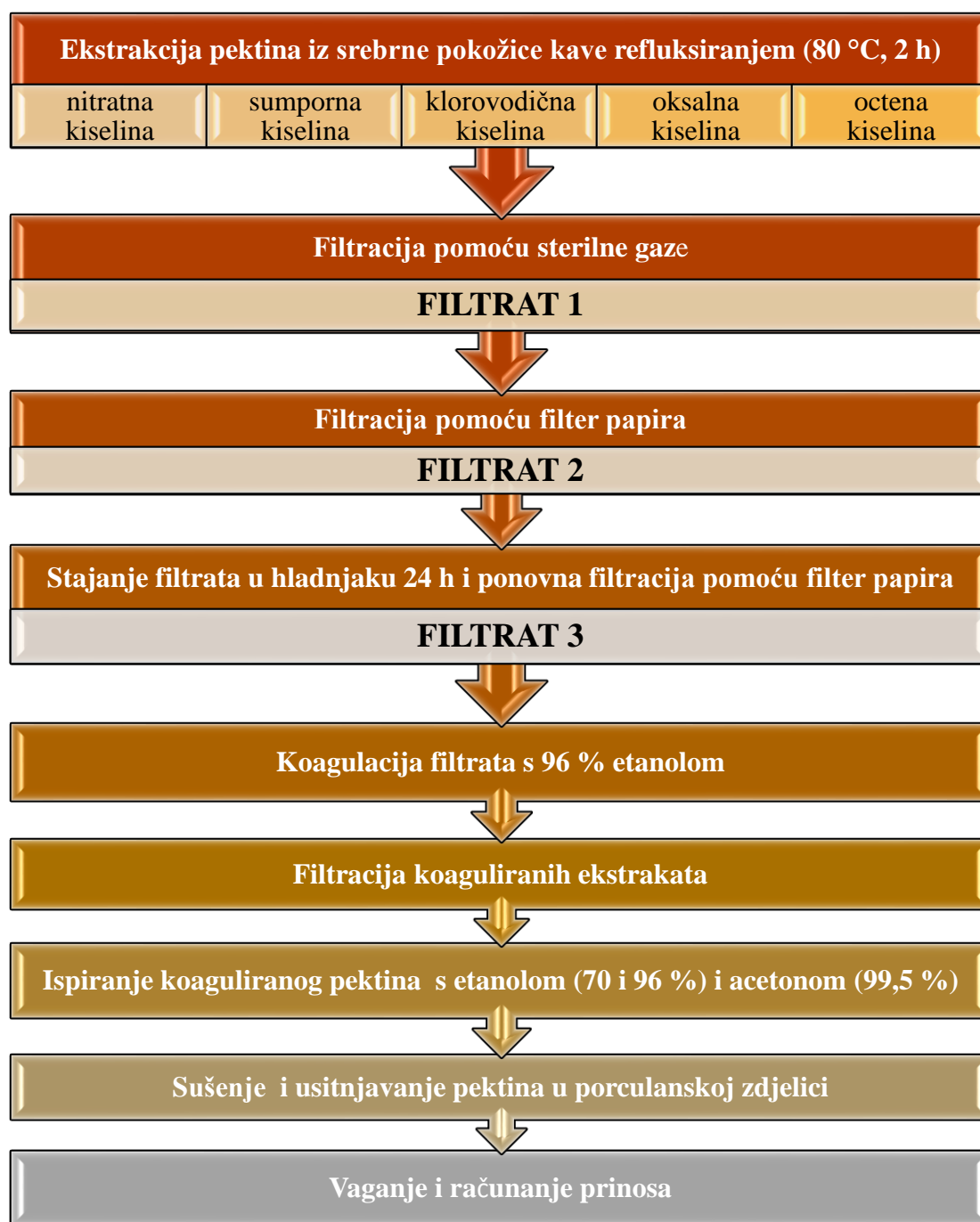
Mast dobivena Soxhlet ekstrakcijom je upotrebljena za određivanje sastava masnih kiselina prema metodi Petrović i suradnika (2010). Ukratko, esterski vezane masne kiseline u trigliceridima su transesterifikacijom prevedene u metilne estere pogodne za analizu plinskom kromatografijom. Izvagano je 60 mg ekstrahirane masti u staklenu epruvetu, koja je potom otopljena dodatkom 4 mL izooktana. Nakon dodatka 200 μ L metanolne otopine kalijevog hidroksida (2 mol L^{-1}) epruveta je snažno protresena a zatim je otopina neutralizirana dodatkom 1 g natrij hidrogensulfata monohidrata. Točno 500 μ L ovako pripremljene otopine je preneseno u vialu za injektiranje uz dodatak 1 mL izooktana.

Dobiveni uzorci su analizirani plinskim kromatografom s plameno ionizacijskim detektorom. Metilni esteri se razdvajaju na kapilarnoj koloni DB-23 dimenzija $60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ čija temperatura poraste s početnih 60 na konačnih 220 °C. Protok helija je bio $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injektor i plameno-ionizacijski detektor se održavaju na temperaturama od 250 i 280 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosio je 1 μ L sa split omjerom 1:30.

Nakon završetka GC analize identifikacija i kvantifikacija metilnih estera masnih kiselina je provedena usporedbom retencijskih vremena i površina ispod krivulje kromatograma uzoraka s kromatogramom standardne smjese 37 metilnih estera masnih kiselina analizirane pri istim uvjetima. Analiza svakog uzorka je provedena dva puta.

3.5.6. Ekstrakcija pektina iz uzoraka srebrne pokožice

Ekstrakcija pektina (Slika 7) iz uzoraka srebrne pokožice provodena je metodom refluksiranja na temperaturi od 80 °C u vremenu od 2 h. U tu svrhu izvagano je 10 g uzorka u tikvicu s okruglim dnom (500 mL), uz dodatak 200 mL odgovarajuće kiseline (sumporna, nitratna, klorovodična, oksalna i octena) množinskih koncentracija $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Slika 7. Shematski prikaz ekstrakcije pektina iz srebrne potkožice.

Po završetku ekstrakcije, uzorci su ohlađeni i ručno stiješnjeni korištenjem sterilne gaze, a potom su filtrirani u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL. Radi dodatnog taloženja sastojaka (interferenata) koji bi mogli utjecati na čistoću pektinskog ekstrakta, filtrirani uzorci su ostavljeni 24 h u hladnjaku na +4 °C. Potom su još jedanput profiltrirani u Erlenmeyerove tikvice od 1 L, a zatim su taloženi dodatkom 800 mL 96 % etanola, tijekom 2 h miješanja na magnetskoj mješalici. Koagulati pektina u matičnoj otopini su potom čuvani u hladnjaku na

+4 °C, a nakon filtracije pektin zaostao na filter papiru je ispran s 70 i 96 % etanolom i acetonom. Potom je sljedilo sušenje pektina na sobnoj temperaturi, usitnjavanje u tarioniku, a zatim i računanje prinosa ekstrakcije prema formuli 6:

$$\eta (\%) = \frac{m(\text{pektin})}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad [6]$$

3.5.6.1. Određivanje boje pektina

Određivanje boje pektina provedeno je kolorimetrom po CIE L, a, b sistemu. Hunterove L, a, b vrijednosti podudaraju se sa sljedećim rasponima boja:

- a^* vrijednost: zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$)
- b^* vrijednost: plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$)
- L^* vrijednost: svijetlo - bijelo ($L = 100$) ili tamno - crno ($L^* = 0$)

Dobivene vrijednosti uzoraka pektina uspoređene su s vrijednostima dobivenim za jabučni pektin kao referentni uzorak. Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednosti boje uzorka (L^*a^*b) prema formuli 7:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [7]$$

gdje je:

$$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}}$$

$-\Delta L$ - uzorak je tamniji od standarda

$+\Delta L$ - uzorak je svjetliji od standarda

$$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}}$$

$-\Delta a$ - uzorak je zeleniji od standarda

$+\Delta a$ - uzorak je crveniji od standarda

$$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}}$$

$-\Delta b$ - uzorak je plaviji od standarda

$+\Delta b$ - uzorak je žući od standarda

3.5.6.2. Određivanje ukupne galakturonske kiseline u uzorcima pektina

Postupak određivanja udjela galakturonske kiseline sastoji se od pripreme standardne otopine galakturonske kiseline, izrade baždarnog dijagrama, pripreme uzorka i određivanja sadržaja galakturonske kiseline u uzorcima pektina.

- Priprema standardne otopine galakturonske kiseline i izrada baždarnog dijagrama:

Nakon što se izvaže 120,5 g galakturonske kiseline i kvantitativno prenese u tikvicu od 1 L, doda se 10 mL otopine natrijeva hidroksida ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$), a potom se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake i ostavi stajati preko noći. Iz pripremljene otopine galakturonske kiseline prirede se pojedinačne otopine masenih koncentracija 12,5; 24,1; 48,2; 72,3 i 96,4 mg L⁻¹ u odmjernim tikvicama od 100 mL.

Točno 2 mL pojedine razrijeđene otopine standarda otpipetira se u staklenu epruvetu, doda se 1 mL 0,1% otopine karbazola i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline uz konstantno snažno miješanje. Otopina se zatim ostavi 15 min na sobnoj temperaturi do razvitka ružičastog obojenja, a potom se ovako priređenim otopinama izmjeri apsorbanacija navalnoj duljini od 525 nm. Slijepa proba se pripremi tako da se umjesto 2 mL standarda i 1 mL karbazola doda 2 mL deionizirane vode odnosno 1 mL 96 % etanola. Iz izmjerenih apsorbanacija i vrijednosti masenih koncentracija konstruira se baždarni dijagram.

- Postupak određivanja galakturonske kiseline u uzorcima pektina

Nakon što se izvaže 100 mg uzorka pektina i otopi u 100 mL otopine natrijeva hidroksida ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) otopina se ostavi 30 min na sobnoj temperaturi kako bi došlo do deesterifikacije pektina. Zatim se 10 mL alikvota deesterificirane otopine razrijedi s deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Daljnji postupak je identičan onom opisanom kod pripreme standarda za spektrofotometrijsko mjerenje.

- Određivanje nepoznate masene koncentracije galakturonske kiseline u uzorcima pektina:

Nepoznate masene koncentracije galakturonske kiseline određuju se iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama, a potom se konačne vrijednosti galakturonske kiseline izraze kao g na 100 g uzorka, uzimajući u obzir odvagu pektina, volumen otopine i razrjeđenje.

3.5.6.3. *Određivanje ukupnih šećera u uzorcima pektina*

Postupak određivanja šećera sastoji se od izrade baždarnog dijagrama, pripreme uzorka za UV/Vis spektrofotometrijsko mjerenje i određivanja šećera u uzorcima pektina pomoću regresijskog pravca.

- Priprema standardne otopine glukoze i izrada baždarnog dijagrama:

Izvaže se 100 mg glukoze, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Iz ishodne otopine glukoze pripreme se pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 5, 10, 20, 40, 60 i 80 mg L⁻¹ u odmjernim tikvicama od 100 mL, koje se potom nadopune deioniziranom vodom do oznake. Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete, doda se 1 mL 5 %-tne otopine fenola i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Nakon miješanja, zagrijavanja (5 minuta u vodenoj kupelji uz ključanje) i hlađenja u posudi s ledom, otopine se ostavljaju 30 minuta na tamnom mjestu kako bi došlo do stvaranja žuto-zlatno obojenog kompleksa. Potom se ovako priređenim otopinama izmjeri apsorbancija na 492 nm. Slijepa proba se pripremi tako da se umjesto 2 mL standarda upotrijebi deionizirana voda.

Iz izmjerenih apsorbancija i vrijednosti masenih koncentracija konstruira se baždarni dijagram.

- Postupak određivanja šećera u uzorcima pektina:

Izvaže se 100 mg uzorka i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, koja se potom nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Zatim se otpipetira 2 mL alikvota uzorka, te razrijedi deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 25 mL. Daljnji postupak je identičan onom opisanom za mjerenje apsorbancije standarda.

- Određivanje nepoznate masene koncentracije šećera u uzorcima pektina:

Određuju se iz dobivenog baždarnog dijagrama pomoću jednadžbe pravca. Konačne vrijednosti šećera izražene su u g na 100 g uzorka, uzimajući u obzir odvag u pektina, volumen otopine i razrjeđenje.

3.5.6.4. *Određivanje ukupnih fenola u uzorcima pektina*

Baždarni dijagram izrađen tijekom određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kave i otpada korišten je i kod određivanja ukupnih fenola u uzorcima pektina.

- Postupak određivanja ukupnih fenola:

Izvaže se 100 mg uzorka i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, koja se potom nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Daljnji postupak je identičan onom opisanom za mjerenje apsorbancije standarda (vidi poglavlje 3.5.2.1).

- Određivanje nepoznate masene koncentracije šećera u uzorcima pektina:

Određuju se iz dobivenog baždarnog dijagrama pomoću jednadžbe pravca. Konačne vrijednosti fenola izražene su kao g na 100 g uzorka, uzimajući u obzir odvagu pektina, volumen otopine i razrjeđenje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednje je vrijeme sve veći interes znanstvene zajednice usmjeren na ispitivanje utjecaja kave na ljudsko zdravlje. Naime, svi se slažu da je kava izvor visokovrijednih biološki aktivnih spojeva koji imaju antioksidacijski učinak. Velika popularnost ovog napitka rezultirala je povećanom proizvodnjom, a vezano time i velikim količinama nusproizvoda koji pritom nastaju. Ukoliko govorimo o brojkama, količina od 1 t zelene kave rezultira generiranjem 650 kg otpada (Mussatto i sur., 2011a). To je potaknulo znanstvenike na istraživanje sastava nusproizvoda i pronalaženja alternativnog načina kojim će se postići njihovo recikliranje, bez odlaganja u okoliš.

Stoga su u ovom radu određeni ukupni fenoli i flavonoidi u srebrnoj pokožici, nusproizvodu nastalom njezinom proizvodnjom, odnosno postupkom prženja sirove kave. Obzirom da je ekstrakcija uzoraka mikrovalovima provedena pri različitim temperaturama, vremenima i volumnim udjelima otapala praćen je utjecaj ovih parametara na količinu ekstrahiranih fenola i flavonoida. Također, u uzorcima srebrne pokožice su identificirane i određene masne kiseline, metodom plinske kromatografije. Osim u srebrnoj pokožici, i u samoj espresso kavi određen je sadržaj fenola, flavonoida i masnih kiselina.

Također, u ovom radu je provedena ekstrakcija pektina iz srebrne pokožice primjenom kiselina različite jakosti, a dobiveni ekstrakti su karakterizirani određivanjem boje, udjela galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola.

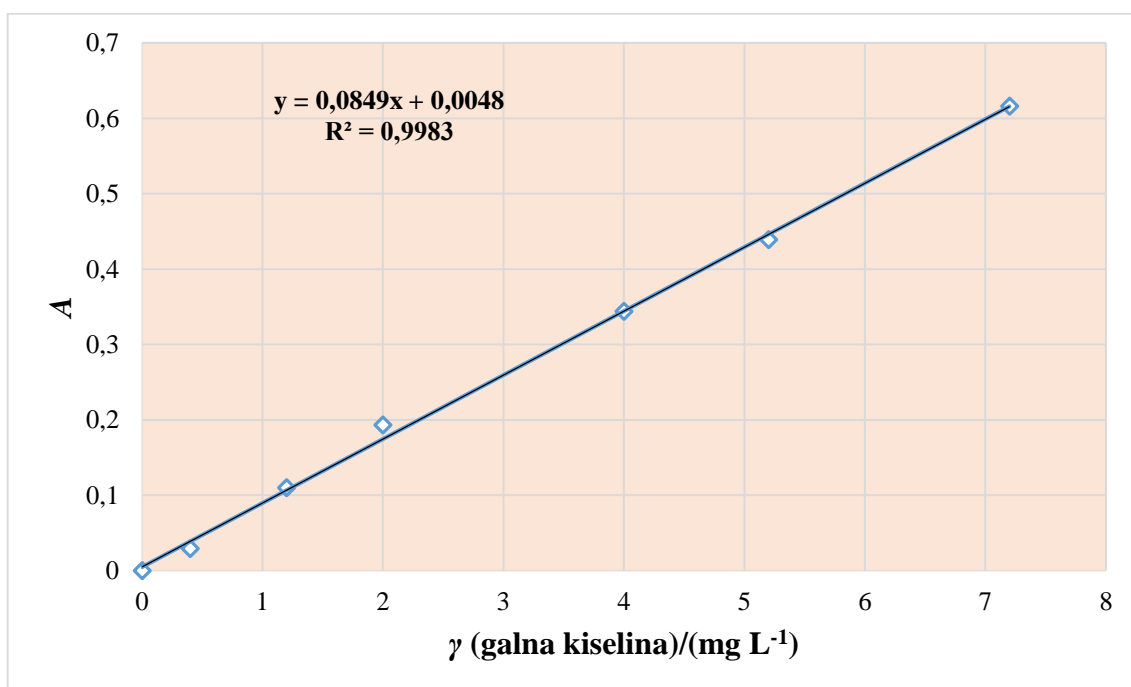
4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U UZORCIMA KAVE I SREBRNE POKOŽICE

Kako bi se odredio sadržaj ukupnih fenola (UF) u uzorcima espresso kave i srebrne pokožice, nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima izrađen je baždarni dijagram (ovisnost apsorbancije o masenoj koncentraciji) (Tablica 2 i Slika 8). Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračunate su masene koncentracije, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola u uzorcima (Tablica 3).

Tablica 2. Masene koncentracije otopina galne kiseline i pripadajuće apsorbancije izmjerene UV/Vis spektrofotometrom na $\lambda = 765$ nm.

STANDARDNA OTOPINA	γ (galna kiselina)/(mg L ⁻¹)	A ± SD
0	0	0,000 ± 0,000
1	0,4	0,029 ± 0,053
2	1,2	0,110 ± 0,011
3	2,0	0,193 ± 0,048
4	4,0	0,344 ± 0,036
5	5,2	0,439 ± 0,032
6	7,2	0,616 ± 0,067

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 8. Baždarni dijagram galne kiseline.

Dobivene vrijednosti ukupnih fenola u srebrnoj pokožici (Tablica 3) nalaze se u rasponu od 7,23 i 9,32 mg g⁻¹. Najmanja količina fenola (7,23 mg g⁻¹) dobivena je upotrebom 50 %-tnog etanola pri temperaturi od 50 °C tijekom 5 minuta ekstrakcije. Primjenom 70 %-tnog etanola pri temperaturi od 70 °C i vremenu od 15 minuta ekstrahira se najveća količina

fenola ($9,32 \text{ mg g}^{-1}$). Na temelju dobivenih rezultata (Slika 9) može se utvrditi da je 70 % etanol učinkovitije otapalo od 50 % etanola bez obzira na primjenjeno vrijeme i temperaturu.

Tablica 3. Maseni udjeli ukupnih fenola (UF) u uzorcima srebrne pokožice određeni UV/Vis spektrofotometrijom nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Oznaka uzorka	ϕ (etanol)/%	$T/^\circ\text{C}$	t/min	$A_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$w(\text{UF})(\text{mg g}^{-1}) \pm \text{SD}$
1 MŠ	50	50	5	$0,373 \pm 0,004$	$7,23 \pm 0,08$
2 MŠ			15	$0,398 \pm 0,003$	$7,71 \pm 0,06$
3 MŠ		70	5	$0,407 \pm 0,003$	$7,99 \pm 0,06$
4 MŠ			15	$0,432 \pm 0,004$	$8,39 \pm 0,08$
5 MŠ	70	50	5	$0,443 \pm 0,004$	$8,60 \pm 0,08$
6 MŠ			15	$0,454 \pm 0,005$	$8,81 \pm 0,10$
7 MŠ		70	5	$0,465 \pm 0,006$	$9,04 \pm 0,11$
8 MŠ			15	$0,480 \pm 0,005$	$9,32 \pm 0,09$

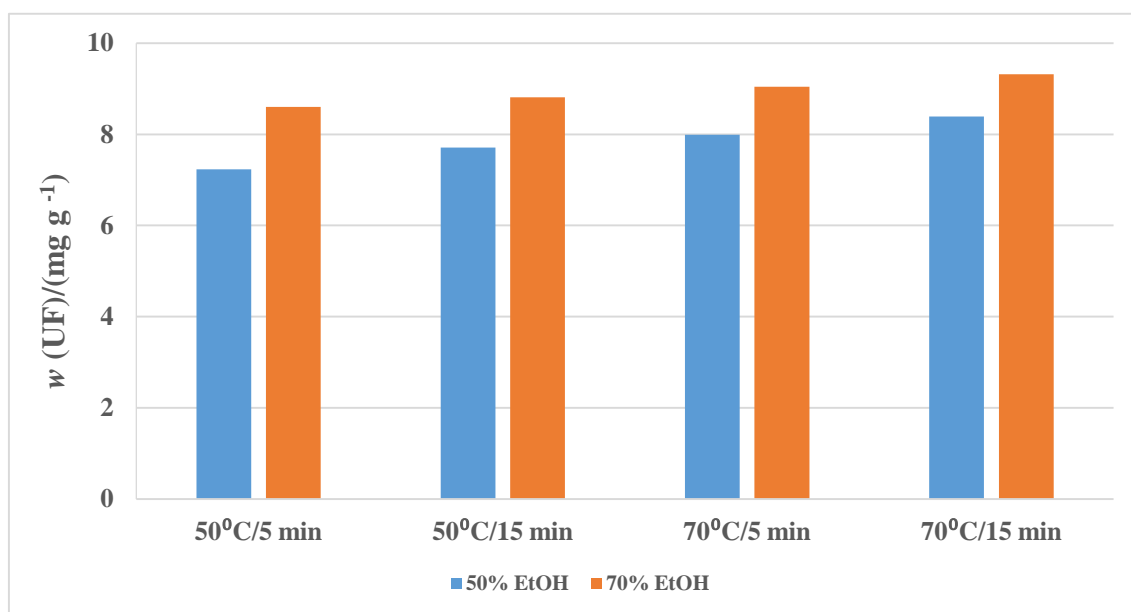
$N = 2$, SD = standardna devijacija

Bravo i suradnici (2013) su pokazali da povećanje volumnog udjela etanola u vodenoj fazi, ili korištenje 100 %-tnog etanola dovodi do slabije ekstrakcije fenola iz taloga kave kao i na njihovu nižu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s vodom ili vodenim otopinama niskog volumnog udjela etanola (Mussatto i sur., 2011b). Kao razlog neučinkovitosti čistog etanola navodi se njegovo svojstvo da taloži visokomolekularne melanoide, koji nakon što se vežu za fenolne spojeve onemogućavaju njihovu učinkovitu ekstrakciju (Bravo i sur., 2013).

Ekstrakcijom srebrne pokožice primjenom 60 %-tnog etanola na temperaturama od 60 do $65 \text{ }^\circ\text{C}$ i vremenu od 30 minuta, Ballesteros i suradnici (2014) dobivaju veći udio ukupnih fenola ($12,77 - 13,00 \text{ mg g}^{-1}$) u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom radu. Iriondo-DeHond (2019a) dobiva i još veći udio fenola (1,56 %) u pokožici, dok Andrade i suradnici (2012) bilježe vrlo širok raspon vrijednosti (0,61 do 15,1 %). Iz navedenog proizlazi da se razlike u dobivenim vrijednostima mogu objasniti razlikom s obzirom na upotrebene ekstrakcijske parametre kao i samu metodu ekstrakcije.

Nadalje, vidljivo je da povećanje temperature i vremena ekstrakcije i kod 50 i 70 %-tnog etanola utječe i na povećanja sadržaja fenola iz srebrne pokožice (Slika 9) te se može

zaključiti da viša temperatura (70 °C) i dulje vrijeme (15 minuta) ekstrakcije doprinose boljoj ekstrakciji fenola, u odnosu na nižu temperaturu (50 °C) i kraće vrijeme (5 min). Naime, povišenje temperature doprinosi smanjenju viskoznosti i površinske napetosti otapala što uzrokuje povećanje brzine prijenosa mase iz matriksa uzorka u otapalo (Belščak-Cvitanović i Komes, 2017). Tako je i istraživanje Narite i Inouye (2012) pokazalo da se povišenjem temperature u rasponu od 25 - 240 °C povećava i udio ukupnih fenola iz pokožice ekstrahirane vodom. Pri 240 °C dobivaju 130 mg g⁻¹, a kod 25 °C 6 mg g⁻¹ ukupnih fenola.



Slika 9. Utjecaj temperature (50 i 70 °C), vremena (5 i 15 min) i volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos ukupnih fenola (UF) ekstrahiranih iz uzoraka srebrne pokožice pomoću mikrovalova.

Usporedbom vrijednosti ukupnih fenola u espresso kavi (Tablica 4) s onima određenim u srebrnoj pokožici (Tablica 3) primjećuje se da je kava bogatija fenolima, što je i očekivano budući da se tijekom prženja zrna formiraju različiti fenolni spojevi, od klorogenske, kafeinske, ferulinske, izoferulinske do sinapinske kiseline (Buffo i Cardelli-Freire, 2004). Naime dobivene vrijednosti ukupnih fenola u kavi su 9 puta veće i kreću se između 57,79 i 70,98 mg g⁻¹ (Tablica 4). Raspon ovih dobivenih vrijednosti je nešto veći od onih nađenih u radu Perez -Martinez i suradnika (2010), koji nakon ekstrakcije kave s vodom na 98 °C dobivaju od 37 do 55 mg g⁻¹ ukupnih fenola. Prema Zuorro i Lavechia (2013)

fenolni spojevi pokazuju bolju topljivost u otapalima manje polarnosti u odnosu na vodu, pa se i 70 %-tni etanol upotrebljen u ovom radu pokazao efikasnijim.

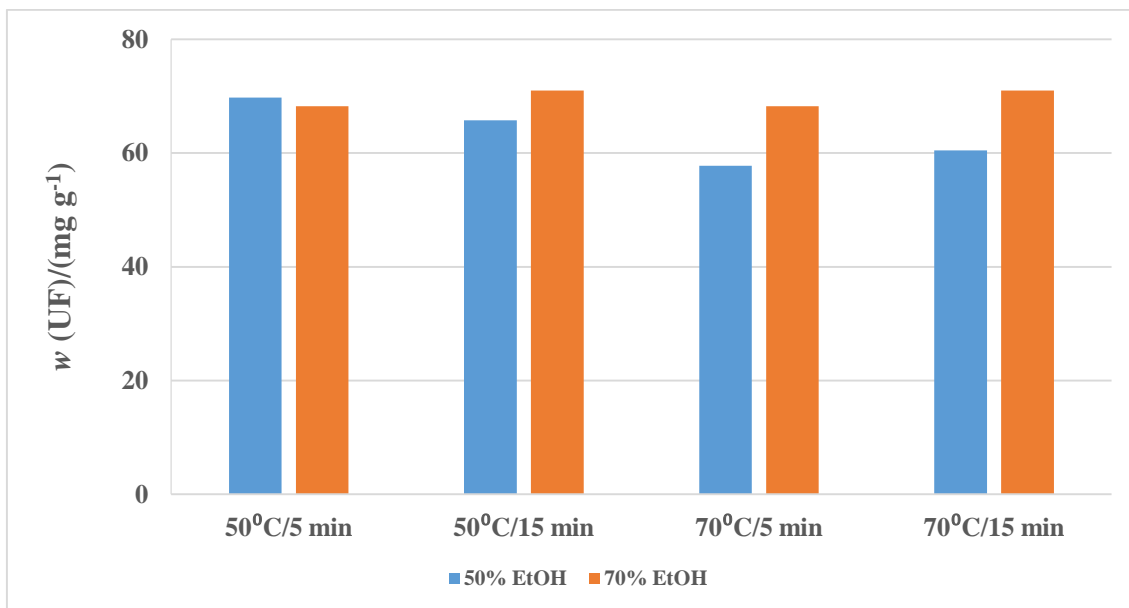
Tablica 4. Maseni udjeli ukupnih fenola (UF) u uzorcima espresso kave određeni UV/Vis spektrofotometrijom nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Oznaka uzorka	φ (etanol)/%	$T/^\circ\text{C}$	t/min	$A_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$w(\text{UF})(\text{mg g}^{-1}) \pm \text{SD}$
9 MŠ	50	50	5	$0,119 \pm 0,002$	$69,75 \pm 1,30$
10 MŠ			15	$0,112 \pm 0,003$	$65,77 \pm 1,73$
11 MŠ		70	5	$0,099 \pm 0,006$	$57,79 \pm 3,47$
12 MŠ			15	$0,104 \pm 0,006$	$60,50 \pm 3,90$
13 MŠ	70	50	5	$0,116 \pm 0,006$	$68,22 \pm 3,47$
14 MŠ			15	$0,121 \pm 0,005$	$70,98 \pm 3,04$
15 MŠ		70	5	$0,109 \pm 0,006$	$63,93 \pm 3,47$
16 MŠ			15	$0,115 \pm 0,003$	$67,61 \pm 173$

$N = 2$, SD = standardna devijacija

Dybkowska i suradnici (2017) su utvrdili da sadržaj fenola i antioksidacijska aktivnost ovise o podrijetlu kave i stupnju prženja. Najveći sadržaj fenola je pronađen u kavi s nižim stupnjem prženja ($39,27 - 43,0 \text{ mg g}^{-1}$) a u kavi sa srednjim i visokim stupnjem prženja vrijednosti fenola iznose $34,06 - 38,43 \text{ mg g}^{-1}$ i $29,21 - 36,89 \text{ mg g}^{-1}$.

Za razliku od ekstrakcije fenola iz srebrne pokožice čiji se prinos povećavao porastom temperature kod uzoraka kave se primjećuje suprotan efekt (Slika 10). Naime, porastom temperature se neznatno smanjuje količina fenola ekstrakcijom i s 50 i s 70 %-tnim etanolom pa se može pretpostaviti da su fenolni spojevi u kavi podložniji termičkoj razgradnji u odnosu na srebrnu pokožicu.



Slika 10. Utjecaj temperature (50 i 70 °C), vremena (5 i 15 min) i volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos ukupnih fenola (UF) ekstrahiranih iz uzoraka espresso kave pomoću mikrovalova.

Promatrajući utjecaj produljenja vremena ekstrakcije na udio fenola (Tablica 4) vidi se da ono, slično kao i kod uzoraka srebrne pokožice, ne utječe značajno na njihov prinos. Prema Zuorro i Lavechia (2013) produljenje vremena ekstrakcije radi dobivanja što veće količine fenola nije ni ekonomski ni tehnički opravdano jer se većina fenola u kavi ekstrahira nakon određenog vremena te se daljnjim produljenjem ovog parametra ne dobiva značajnija količina od one koja je već ekstrahirana.

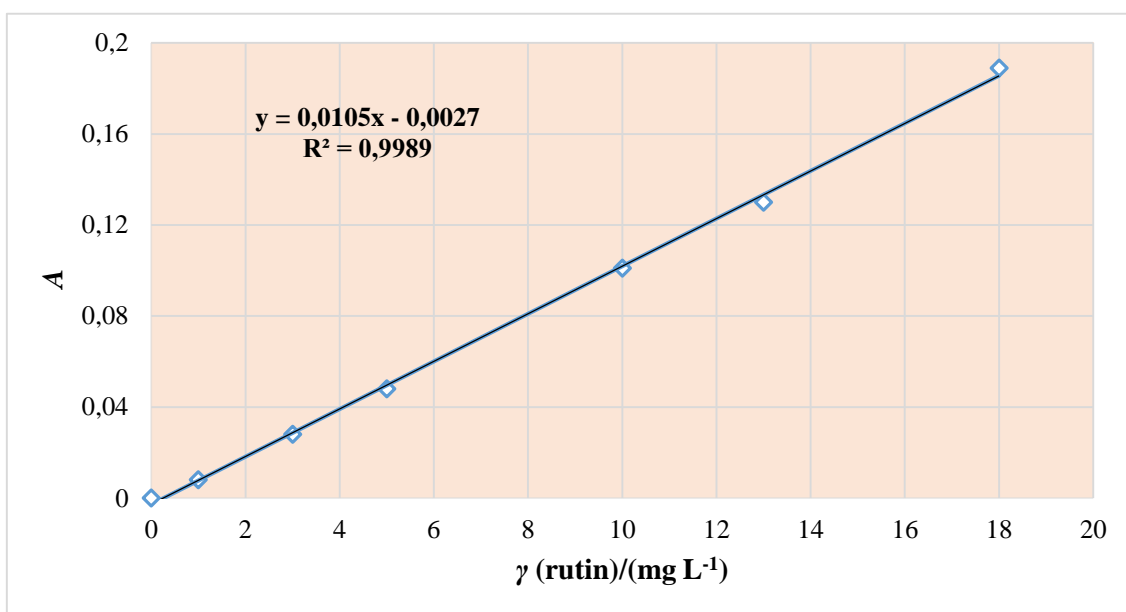
4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA U UZORCIMA KAVE I SREBRNE POKOŽICE

Iz baždarnog dijagrama (Slika 11), odnosno dobivene jednadžbe pravca određene su masene koncentracije, a potom i maseni udjeli ukupnih flavonoida u uzorcima kave i srebrne pokožice. U Tablici 5 prikazane su izmjerene vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracijama rutina na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram.

Tablica 5. Masene koncentracije otopina rutina i pripadajućih apsorbancija izmjerenih UV/Vis spektrofotometrom na $\lambda = 510$ nm.

STANDARDNA OTOPINA	γ (rutin)/(mg L ⁻¹)	A ± SD
0	0	0,000 ± 0,000
1	1	0,008 ± 0,003
2	3	0,028 ± 0,005
3	5	0,048 ± 0,003
4	10	0,101 ± 0,008
5	13	0,130 ± 0,001
6	18	0,189 ± 0,001

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 11. Baždarni dijagram rutina.

Rezultati su pokazali (Tablica 6, Slika 12) da 70 %-tni etanol, temperatura od 70 °C i vrijeme od 15 minuta daju najviše vrijednosti ukupnih flavonoida (8,31 mg g⁻¹) kod uzoraka srebrne pokožice. Najslabiji ekstrakcijski učinak je postignut primjenom 50 %-tnog etanola pri temperaturi od 50 °C i vremenu od 5 minuta. Izmjerena vrijednost iznosila je 5,85 mg g⁻¹.

Tan i suradnici (2016) su za pokožicu *Robusta* kave ekstrahiranu na 80 °C, tijekom 60 minuta uz vodenu otopinu etanola (1:1) dobili 8,09 mg g⁻¹ ukupnih flavonoida, što se podudara s vrijednostima dobivenim u ovom radu korištenjem 70 %-tnog etanola uz

temperaturu od 70 °C i vrijeme od 15 minuta. Iriondo-DeHond i suradnici (2019b) pronalaze znatno niže vrijednosti flavonoida za *Robusta* (0,063 %) i *Arabica* (0,034 %) pokožicu u odnosu na rezultate dobivene u ovom radu. Očigledno je da je voda upotrebljena kao ekstrakcijsko sredstvo u radu Iriondo-DeHond i suradnika (2019b) utjecala i na niži prinos flavonoida. Budući da su flavonoidi nepolarniji organski spojevi u odnosu na fenole za njihovu ekstrakciju su se vodene otopina etanola pokazale efikasnijim nego sama voda (Bravo i sur. 2013).

Tablica 6. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima srebrne pokožice određeni UV/Vis spektrofotometrijom nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

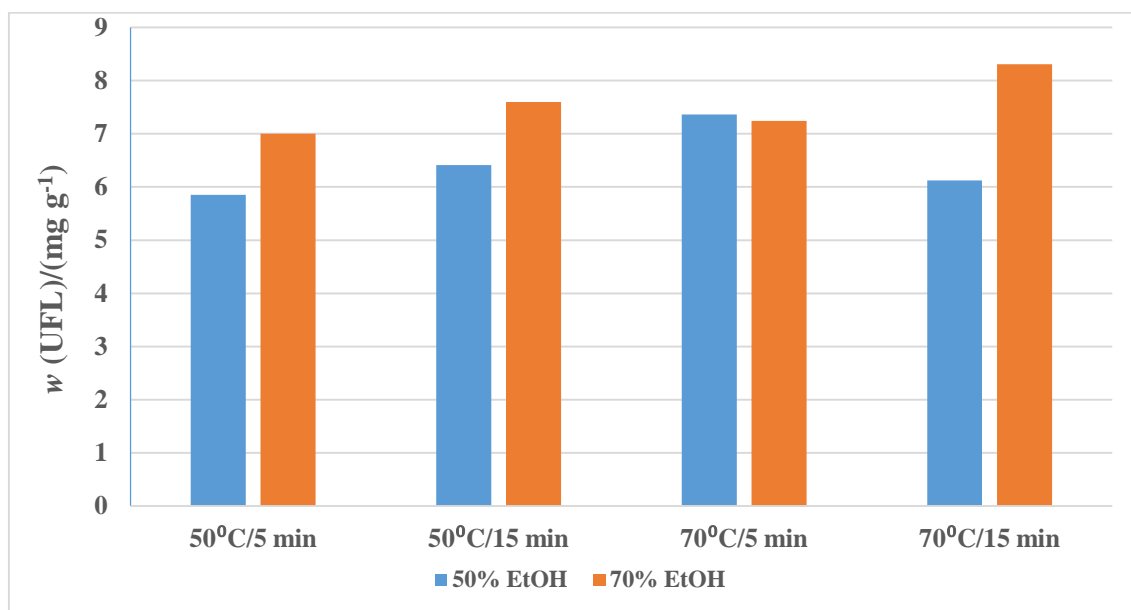
Oznaka uzorka	φ (etanol)/%	$T/^\circ\text{C}$	t/min	$A_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$w(\text{UFL})(\text{mg g}^{-1}) \pm \text{SD}$
1 MŠ	50	50	5	$0,071 \pm 0,003$	$5,85 \pm 0,22$
2 MŠ			15	$0,078 \pm 0,004$	$6,41 \pm 0,33$
3 MŠ		70	5	$0,091 \pm 0,006$	$6,36 \pm 0,56$
4 MŠ			15	$0,075 \pm 0,005$	$6,12 \pm 0,40$
5 MŠ	70	50	5	$0,086 \pm 0,005$	$7,0 \pm 0,39$
6 MŠ			15	$0,093 \pm 0,006$	$7,60 \pm 0,46$
7 MŠ		70	5	$0,089 \pm 0,006$	$8,24 \pm 0,50$
8 MŠ			15	$0,102 \pm 0,004$	$8,31 \pm 0,33$

$N = 2$, SD = standardna devijacija

Spigno i suradnici (2007) smatraju da dodatak vode k polarnim otapalima, poput etanola, metanola i acetona dovodi do stvaranja još efikasnijeg polarnog medija, pa se zato može zaključiti zašto su u ovom radu dobivene veće vrijednosti flavonoida u odnosu na istraživanja Iriondo-DeHond i suradnika (2019b) koji su kao ekstrakcijsko otapalo koristili čistu vodu.

Promatrajući utjecaj temperature na prinos flavonoida (Slika 12) iz uzoraka srebrne pokožice vidi se da se povišenjem temperature povećava i udio flavonoida kod svih analiziranih uzoraka, osim kod 2 i 4 MŠ gdje se udio od $6,41 \text{ mg g}^{-1}$ neznatno smanjio na $6,12 \text{ mg g}^{-1}$. Slično, s produljenjem vremena ekstrakcije vidljivo je da raste i prinos flavonoida

(Slika 12) a izuzetke čine uzorci 3 i 4 MŠ kod kojih se količina flavonoida neznatno smanjila, s 6,36 mg g⁻¹ na 6,12 mg g⁻¹.



Slika 12. Utjecaj temperature (50 i 70 °C), vremena (5 i 15 min) i volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos ukupnih flavonoida (UFL) ekstrahiranih iz uzoraka srebrne pokožice pomoću mikrovalova.

Uzimajući u obzir prije spomenute rezultate Iriondo-DeHond i suradnika (2019b) i rezultate dobivene u ovom radu može se zaključiti da se ekstrakcija fenola i flavonoida potpomognuta mikrovalovima iz pokožice pokazala uspješnijom od konvencionalne metode ekstrakcije a k tome s ekonomskog stajališta zahtjeva minimalan utrošak vremena s većim prinosom ekstrahirane tvari, uz upotrebu manjih volumena otapala, niske cijene.

U odnosu na srebrnu pokožicu, sadržaj flavonoida u espresso kavi je znatno veći a dobivene vrijednosti kreću se između 30,16 i 64,88 mg g⁻¹ (Tablica 7). Usporedbom ovih rezultata s onima dobivenim u drugim istraživanjima vidi se da „Karoma“ kava sadrži visoke udjele flavonoida. Tako Kreicbergs i suradnici (2011) u zrnima pržene kave pronalaze valilin, flavonoid prisutan u količini od 100 - 150 mg 100 g⁻¹. Osim vanilina od ostalih flavonoida određeni su katehin i epikatehin u količinama od 30 - 80 mg 100 g⁻¹ i 11 - 30 mg 100 g⁻¹.

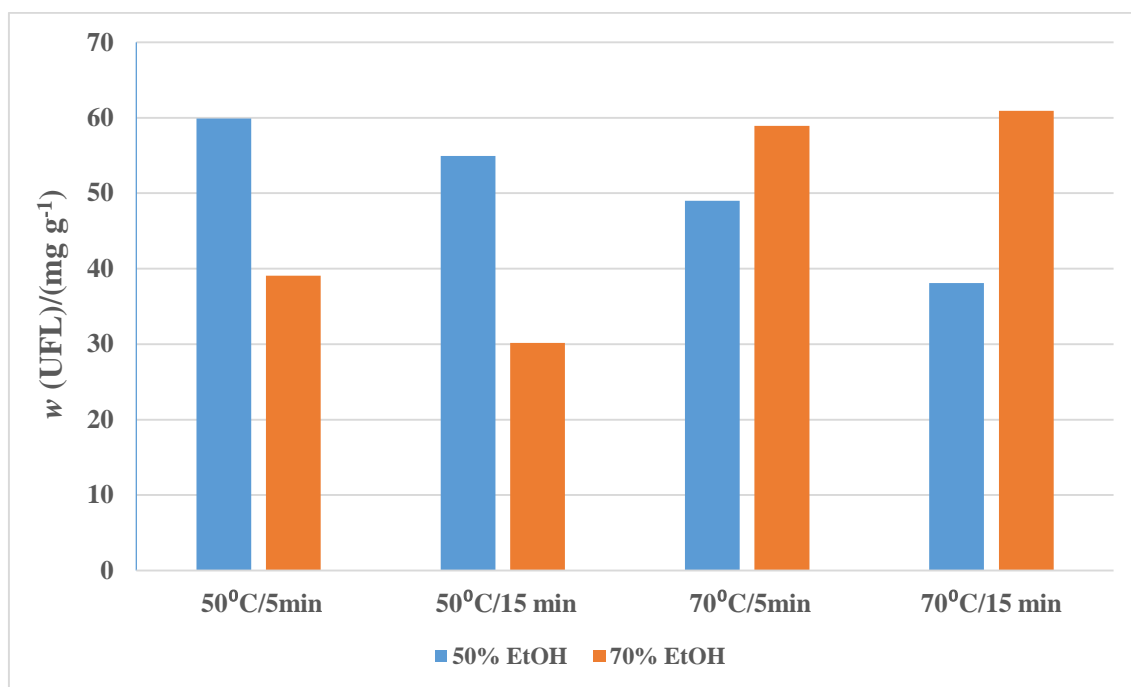
Tablica 7. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima espresso kave određeni UV/Vis spektrofotometrijom nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Oznaka uzorka	φ (etanol)/%	$T/^\circ\text{C}$	t/min	$A_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	$w(\text{UFL})(\text{mg g}^{-1}) \pm \text{SD}$
9 MŠ	50	50	5	$0,028 \pm 0,004$	$59,92 \pm 7,01$
10 MŠ			15	$0,025 \pm 0,003$	$54,96 \pm 5,61$
11 MŠ		70	5	$0,022 \pm 0,004$	$49,01 \pm 8,41$
12 MŠ			15	$0,017 \pm 0,005$	$38,10 \pm 9,82$
13 MŠ	70	50	5	$0,017 \pm 0,003$	$39,09 \pm 5,61$
14 MŠ			15	$0,013 \pm 0,004$	$30,16 \pm 7,01$
15 MŠ		70	5	$0,027 \pm 0,001$	$58,93 \pm 2,81$
16 MŠ			15	$0,026 \pm 0,004$	$60,92 \pm 2,81$

$N = 2$, SD = standardna devijacija

Na sadržaj flavonoida značajno utječe stupanj prženja kave pa je shodno tome veća količina flavonoida određena u jako prženim zrnima kave ($1,41 \text{ mg g}^{-1}$). S druge strane Gatechew i Chun (2016) su utvrdili da uzorci tretirani pri višim temperaturama i vrijednostima tlaka ($220 \text{ }^\circ\text{C}/60 \text{ bar}$) daju niže vrijednosti ukupnih flavonoida ($15 - 43 \text{ mg g}^{-1}$) u odnosu niže temperature i tlak ($180 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ bar}$). To je vidljivo i u ovom radu kod uzoraka 11 i 12 MŠ u odnosu na 9 i 10 MŠ kod kojih temperatura od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ dovodi do smanjenja udjela flavonoida (Tablica 7). Qiao i suradnici (2014) su utvrdili da se degradacija kvercetina uz $80 \text{ } \%$ -tni etanol smanjuje povišenjem temperature tako da razlog povećanog sadržaja flavonoida na temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (uzorci 15 i 16 MŠ) u odnosu na onu od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (uzorci 13 i 14 MŠ) može biti uvjetovana upotrebom $70 \text{ } \%$ -tnog etanola.

Dakle, za razliku od flavonoida u srebrnoj pokožici, najslabiji ekstrakcijski učinak flavonoida iz kave dobiven je primjenom $70 \text{ } \%$ -tnog etanola, na temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ i vremenu od 15 minuta (Slika 13), što ukazuje na različitost u flavonoidnom sastavu kave i pokožice. Međutim, $70 \text{ } \%$ -tni etanol u kombinaciji s temperaturom od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ djeluju vrlo efikasno kod ekstrakcije flavonoida pa je tako kod uzorka 16 MŠ zabilježena najveća količina flavonoida (60 mg g^{-1}).



Slika 13. Utjecaj temperature (50 i 70 °C), vremena (5 i 15 min) i volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos ukupnih flavonoida (UFL) ekstrahiranih iz uzorka espresso kave pomoću mikrovalova.

Također, produljenjem vremena ekstrakcije s 5 na 15 min se smanjivala i količina flavonoida, osim kod uzorka 15 i 16 MŠ, kod kojih je uočen neznan porast vrijednosti, s 58,93 mg g⁻¹ na 60,92 mg g⁻¹. Prema Duy Le i suradnicima (2019) kad vrijeme ekstrakcije prijeđe određenu granicu umjesto daljnjeg ekstrahiranja flavonoida dolazi do njihove razgradnje, što u konačnici rezultira i njihovim manjim prinosom.

Vidljivo je kako su maseni udjeli flavonoida (Tablica 6 i 7), koji pripadaju podskupini fenola, približavaju vrijednostima masenih udjela ukupnih fenola. Kao vjerojatni razlog dobivanja ovakvih vrijednosti flavonoida je i prisutnost različitih drugih bioaktivnih spojeva u kavi i otpadu (Pandey i sur., 2000; Noigam i sur., 2012) koji tijekom spektrofotometrijskog određivanja flavonoida interferiraju s aluminijskim kloridom čime doprinose povećanju apsorbancije, a samim time i ukupnom sadržaju flavonoida. To nas navodi na zaključak da je potrebno pronaći selektivniji reagens od aluminijskog klorida u svrhu dobivanja vjerodostojnijih rezultata ili provesti kromatografsku analizu kojom bi se utvrdio točan fenolni, odnosno flavonoidni sastav.

4.3. ODREĐIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA MASNIH KISELINA U UZORCIMA KAVE I SREBRNE POKOŽICE

Nakon Soxhlet ekstrakcije u uzorcima kave i srebrne pokožice određen je udio masti, a potom i sastav masnih kiselina. Rezultati pokazuju da se sadržaj masti u kavi i srebrnoj pokožici ne razlikuje značajno (Tablica 8). Dobivena vrijednosti od 8,93 % za kavu je nešto niža u odnosu na vrijednosti (11 do 20 %) dobivene u radu Al-Hamamre i suradnika (2012), dok udio masti od 9,09 % u srebrnoj pokožici premašuje vrijednosti (1,6 - 3,3%) pronađene u radu Bessada i suradnika (2018).

Tablica 8. Udio masti u espresso kavi i srebrnoj pokožici.

UZORAK	<i>m</i> (tikvica)/g	<i>m</i> (tikvica + uzorak)/(g)	<i>w</i> (mast)/% ± SD
SREBRNA POKOŽICA 1	128,1546	128,6428	9,09 ± 0,9546
SREBRNA POKOŽICA 2	127,8118	128,2098	
KAVA 1	121,6360	122,1083	8,93 ± 0,7354
KAVA 2	124,5902	125,0105	

N = 2, SD = standardna devijacija

Prema Iličković i suradnicima (2011) udjel masti ovisi o upotrebljenom otapalu pa tako talog kave ekstrahiran petroleterom daje manji prinos (10,44 %) u odnosu na heksan (11,85 %). Osim otapala, i vrijeme ekstrakcije značajno utječe na udjel masti pa tako prema Al-Hamamre i suradnicima (2012) duže vrijeme ekstrakcije kave s etanolom, izopropanolom, kloroformom, pentanom i acetonom dovodi do porasta udjela masti. Međutim, nakon postizanja optimalnog vremena, svako daljnje produljenje vremena dovodi do smanjenja udjela masti.

Nakon transesterifikacije ekstrakata u metilne estere masnih kiselina (poglavlje 3.5.5.) u uzorcima kave i srebrne pokožice određen je udio masnih kiselina (Tablice 9 i 10). Rezultati pokazuju (Tablica 9) da su u uzorcima srebrne pokožice identificirane sljedeće zasićene masne kiseline: C14:0 (miristinska), C15:0 (pentadekanska), C16:0 (heksadekanska ili palmitinska kiselina), C17:0 (heptadekanska), C18:0 (stearinska kiselina), C20:0 (eikosanoidna ili arahidska kiselina), C21:0 (heneikozanska), C22:0 (dokosanoidna ili behenijska kiselina), C21:0 (heneikozanska), C:23 (trikožanska), C24:0 (lignocerinska).

Tablica 9. Sastav i udio masnih kiselina u uzorcima srebrne pokožice.

MASNE KISELINE - NUSPROIZVOD 1					
Zasićene		Mononezasićene		Polinezasićene	
	<i>w /%</i>		<i>w /%</i>		<i>w /%</i>
C14:0	0,90	C16:1n7	0,19	C18:2n6 cis	16,03
C15:0	0,20	C18:1n9 cis	7,12	C18:3n3	0,67
C16:0	18,96	C20:1n9	0,24		
C17:0	0,24				
C18:0	5,13				
C20:0	18,43				
C21:0	0,39				
C22:0	20,90				
C23:0	0,60				
C24:0	5,10				
MASNE KISELINE - NUSPROIZVOD 2					
Zasićene		Mononezasićene		Polinezasićene	
	<i>w /%</i>		<i>w /%</i>		<i>w /%</i>
C14:0	0,89	C16:1n7	0,22	C18:2n6 cis	15,16
C15:0	0,20	C18:1n9 cis	7,18	C18:3n3	0,63
C16:0	18,55	C20:1n9	0,23	C20:5n3	0,16
C17:0	0,27	C22:1n9	0,11		
C18:0	5,06				
C20:0	18,36				
C21:0	0,36				
C22:0	21,16				
C23:0	0,45				
C24:0	5,13				

Među njima je najzastupljenija behenijska kiselina s udjelom 21,03 % a zatim slijede palmitinska i arahidska s udjelima 18,75 % i 18,40 %. U najnižim količinama su nađene heptadekanska (0,255 %) i pentadekanska (0,20 %) kiselina. Od nezasićenih masnih kiselina srebrna pokožica sadrži C18:1n9 cis (oleinska), C20:1n9 (gondoična), C16:1n7 (palmitoleinska), C22:1n9 (eručna) kao monozasićene i C18:2n6 cis (linolna), C18:3n3 (linolenska) i C20:5n3 (eikozapentaenska) kao polinezasićene.

Najzastupljenija mononezasićena masna kiselina je oleinska (7,15 %), dok je eručna (0,11 %) zastupljena u najmanjoj količini. Od polinezasićenih, linolna je određena u najvećoj količini (15,59 %), a eikozapentaenska u najmanjoj (0,16 %).

Prema istraživanju Iriondo-DeHond i suradnika (2019a) u sastavu srebrne potkožice dominiraju zasićene masne kiseline s udjelom od 67 %, slijede ih polinezasićene (26%), dok su najmanje zastupljene mononezasićene masne kiseline (7 %). U odnosu na rezultate prikazane u Tablici 9, Iriondo-DeHond i suradnici (2019a) dobivaju nešto veće vrijednosti palmitinske (26 %) i linolne (21 %), te nešto niže dokosanoidne (19 %) i eikosanoidne (12 %) kiseline.

Kao i Iriondo-DeHond i suradnici (2019a) tako i Bessada i suradnici (2018) u srebrnoj pokožici pronalaze zasićene masne kiseline u najvećem udjelu (65 %), potom ih slijede polinezasićene (28 %) te mononezasićene masne kiseline (7 %). Međutim, u njihovom istraživanju linolna je najzastupljenija masna kiselina (24 %), a zatim slijede palmitinska (22 %), dokosanoidna (15 %) i eikosanoidna (14 %). Suprotno spomenutim istraživanjima u ovom radu je dokosanoidna kiselina najzastupljenija. Slično prethodnim radovima, Alves i suradnici (2017) dobivaju visoke udjele linolenske (29 %), palmitinske (28 %), a slijede ih dokosanoidna i eikosanoidna (11%).

Među zasićenim masnim kiselinama u espresso kavi „Karoma“ su identificirane (Tablica 10) C14:0 (miristinska), C16:0 (palmitinska), C17:0 (heptadekanska), C18:0 (stearinska), C20:0 (eikosanoidna), C21:0 (heneikozanska), C22:0 (dokosanoidna) i C23:0 (trikozanska). Najzastupljenija je palmitinska (34,1 %), a najmanje dokosanoidna masna kiselina (0,04 %) koja se pokazala najzastupljenijom u pokožici (20,9 %).

Od nezasićenih masnih kiselina identificirane su C18:1n9 *cis* (oleinska), C20:1n9 (gondoična), C22:1n9 (eručna) kao mononezasićene i C18:2n6 *cis* (linolna), C18:3n3 (linolenska) i C20:2n6 (*cis*-11,14-eikosadienoična) kao polinezasićene. Među mononezasićenim masnim kiselinama najzastupljenija je oleinska (11,53 %), dok je eručna (0,08 %) nađena u najmanjoj količini, vrlo sličnog udjela kao i u pokožici (0,11 %). Od polinezasićenih masnih kiselina najzastupljenija je linolna (41,56 %), dok je *cis*-11,14-eikosadienoična (0,05 %) prisutna u najmanjoj količini.

Tablica 10. Sastav i udio masnih kiselina u uzorcima espresso kave.

MASNE KISELINE - KAVA 1					
Zasićene		Mononezasićene		Polinezasićene	
	w /%		w /%		w /%
C14:0	0,08	C18:1n9 cis	11,56	C18:2n6 cis	41,19
C16:0	34,24	C20:1n9	0,38	C18:3n3	0,62
C17:0	0,09	C22:1n9	0,10	C20:2n6	0,05
C18:0	7,42				
C20:0	2,56				
C21:0	0,07				
C22:0	0,04				
C23:0	0,10				
MASNE KISELINE - KAVA 2					
Zasićene		Mononezasićene		Polinezasićene	
	w /%		w /%		w /%
C14:0	0,08	C18:1n9 cis	11,50	C18:2n6 cis	41,56
C16:0	33,96	C20:1n9	0,40	C18:3n3	0,64
C17:0	0,09	C22:1n9	0,06		
C18:0	7,35				
C20:0	2,61				
C21:0	0,07				
C22:0	0,04				
C23:0	0,10				
C24:0	0,20				

Za razliku od pokožice u kojoj je linolna kiselina nađena u količini od 15,6 %, u kavi je ima 41,4 %. Također, rezultati su pokazali da u kavi prevladavaju nezasićene masne kiseline u odnosu na zasićene, što nije i slučaj s pokožicom, kod koje su zastupljenije zasićene kiseline. Međutim, za razliku od pokožice, u kavi nije određena eikozapentaenske kiseline poznate po svojim blagonaklonim svojstvima po ljudsko zdravlje uključujući koronarne srčane bolesti, reumatoidni artritis, demenciju i depresiju (Russell i Burgin-Maunders, 2012).

U istraživanju Speera i suradnika (2006) je pokazano da u *Robusta* i *Arabica* kavi prevladavaju linolna (43,9 - 49,3 % za *Robustu* i 52,2 - 54,3 % za *Arabicu*) i palmitinska (27,2 - 32,1 % za *Robustu* i 26,6 - 27,7 % za *Arabicu*) masna kiselina. Također, identificiran je visok udjel stearinske (5,8 - 7,2 % za *Robustu* i 5,6 - 6,3 % za *Arabicu*), oleinske (9,7 - 14,2 %

za *Robustu* i 6,7 - 8,2 % za *Arabicu*) te nešto manje količine eikosanoidne (2,7 - 4,3 % za *Robustu* i 2,6 - 2,8 % za *Arabicu*) i dokosanoidne (0,3 - 0,8 % za *Robustu* i 0,5 - 0,6 % za *Arabicu*), dok su miristinska, linolenska i lignocerinska masna kiselina pronađene u tragovima.

Martin i suradnici (2000) su također dobili linolnu kiselinu kao najzastupljeniju s udjelom od čak 44,1 %, a zatim je slijedi palmitinska kiselina (33,3 %). Miristinska, palmitoleinska i dokosanoidna masna kiselina nađene su u udjelima nižim od 1 % što se podudara s rezultatima ovog istraživanja. Nadalje, Dong i suradnici (2015) su svojim istraživanjem potvrdili već gore spomenule činjenice da u kavi prevladavaju linolna i palmitinska, dok su u manjim količinama nađene linolenska, dokosanoidna, eikosanoidna, miristinska i trikozanska masna kiselina. S obzirom na navedeno, te usporedbom rezultata dobivenih u ovom radu može se pretpostaviti da razlike u sastavu i količini masnih kiselina ovise u prvom redu o vrsti kave, kao i njenom nusproizvodu nastalom tijekom postupka proizvodnje iste.

4.4. KARAKTERIZACIJA PEKTINA EKSTRAHIRANOG IZ SREBRNE POKOŽICE

4.4.1. Određivanje boje pektina

Uzorcima pektina ekstrahiranim i izoliranim iz srebrne pokožice (poglavlje 3.5.6.) određeni su parametri boje po po CIE L , a , b sistemu (poglavlje 3.5.6.1.). Rezultati su pokazali da su uzorci pektina dobiveni ekstrakcijom s H_2SO_4 svjetliji u odnosu na jabučni pektin kao standard, dok su ostali uzorci tamniji od standarda pri čemu je pektin ekstrahiran s CH_3COOH kao najslabijom kiselinom najtamniji s ΔL vrijednošću od - 23,3 (Tablica 11).

Nadalje, s obzirom na negativne Δa vrijednosti može se zaključiti da su uzorci pektina zeleniji u odnosu na standard. Također, i Δb vrijednosti su se pokazale negativnima što ukazuje da su uzorci plaviji od standarda. Kao i kod ΔL vrijednosti, najveće vrijednosti Δa i Δb postignute su upravo s H_2SO_4 .

S obzirom da pektin ima značajnu primjenu u proizvodnji gelova, njegova boja je od velike važnosti, a ovisi o tipu proizvoda koji se želi dobiti. Primjerice, kod žele proizvoda poželjnija je svjetlija boja pektina pa bi se u tu svrhu za njegovu ekstrakciju mogla upotrijebiti sumporna kiselina. U proizvodnji marmelada prihvatljiviji je tamniji pektin pa bi se u tom slučaju kao ekstrakcijsko sredstvo mogla upotrijebiti octena kiselina (May, 1990).

Tablica 11. Parametri boje određeni u uzorcima pektina ekstrahiranih iz srebrne pokožice primjenom različitih kiselina.

PEKTIN	PARAMETRI BOJE						
	$L \pm SD$	$a \pm SD$	$b \pm SD$	$\Delta L \pm SD$	$\Delta a \pm SD$	$\Delta b \pm SD$	$\Delta E \pm SD$
otapalo							
H₂SO₄	78,04 ± 0,96	2,50 ± 0,29	11,52 ± 1,20	8,42 ± 0,96	-4,03 ± 5,69	-8,16 ± 1,96	12,46 ± 2,03
H₂C₂O₄	70,13 ± 1,19	3,91 ± 0,22	15,32 ± 0,13	-0,84 ± 0,82	-2,62 ± 0,22	-3,81 ± 0,13	4,73 ± 0,37
HNO₃	54,21 ± 0,66	5,90 ± 0,42	16,73 ± 0,89	-16,34 ± 0,74	-0,73 ± 0,28	-2,94 ± 0,13	16,62 ± 0,70
CH₃COOH	46,28 ± 3,11	5,61 ± 0,51	15,62 ± 1,52	-23,27 ± 3,11	-0,91 ± 0,51	-3,52 ± 1,52	23,57 ± 3,32
HCl	55,58 ± 2,99	5,5 ± 0,28	15,0 ± 0,65	-16,46 ± 0,57	-1,02 ± 0,28	-4,13 ± 0,65	17,01 ± 0,69
JABUČNI PEKTIN	69,55	6,52	19,13	/	/	/	/

$N = 2$, SD = standardna devijacija

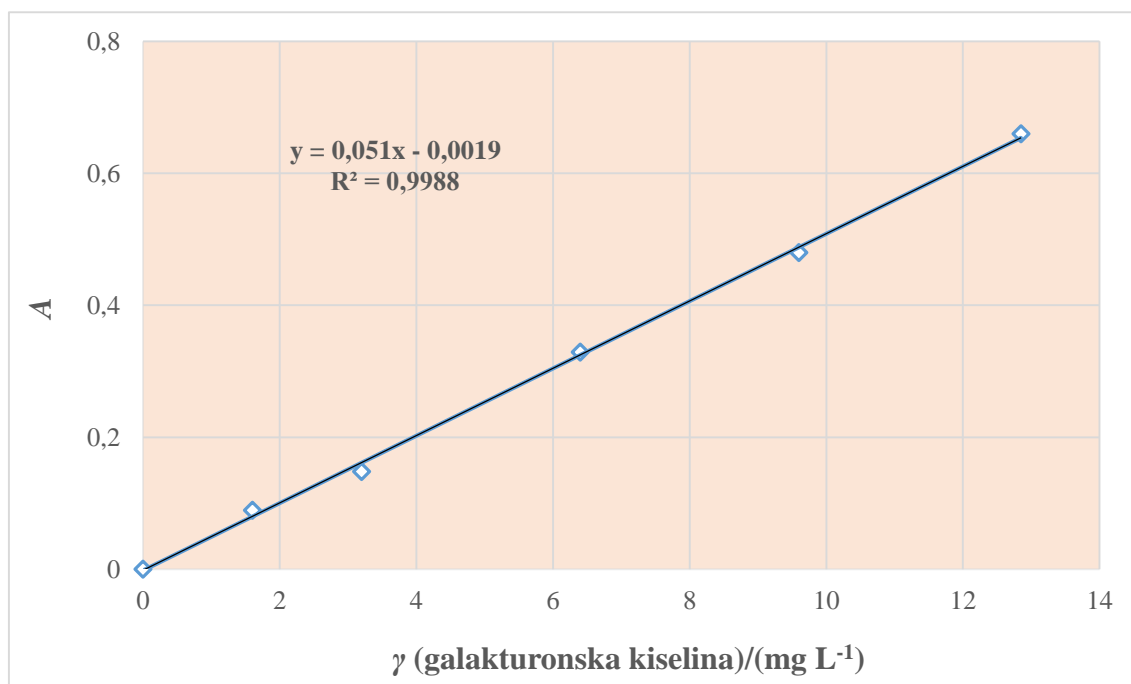
4.4.2. Određivanje sadržaja galakturonske kiseline

U cilju određivanja udjela galakturonske kiseline u uzorcima pektina ekstrahiranog iz srebrne pokožice, metodom refluksiranja, primjenom različitih kiselina izrađen je baždarni dijagram (Tablica 12 i Slika 14), a iz dobivene jednadžbe pravca (Slika 14) izračunati su maseni udjeli galakturonske kiseline (Tablica 13)

Tablica 12. Masene koncentracije otopina galakturonske kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih UV/Vis spektrofotometrom na $\lambda=525$ nm.

STANDARDNA OTOPINA	γ (galakturonska kiselina)/(mg L ⁻¹)	A \pm SD
0	0	0,000 \pm 0,000
1	1,6	0,089 \pm 0,003
2	3,2	0,148 \pm 0,001
3	6,4	0,329 \pm 0,003
4	9,6	0,480 \pm 0,002
5	12,9	0,660 \pm 0,001

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 14. Baždarni dijagram galakturonske kiseline.

Iz Tablice 13 vidljivo je da se udjeli galakturonske kiseline u pektinskim ekstraktima nalaze u širokom rasponu ovisno o kiselini primjenjenoj kod ekstrakcije pokožice. Rezultati pokazuju da je ekstrakcija klorovodičnom kiselinom rezultirala najvećim udjelom galakturonske kiseline (57,86 %). Nakon klorovodične i nitratna kiselina pokazuje značajan ekstrakcijski učinak (50,8 %), a zatim je slijede octena (44,92 %) i oksalna (37,56 %) (Slika 15).

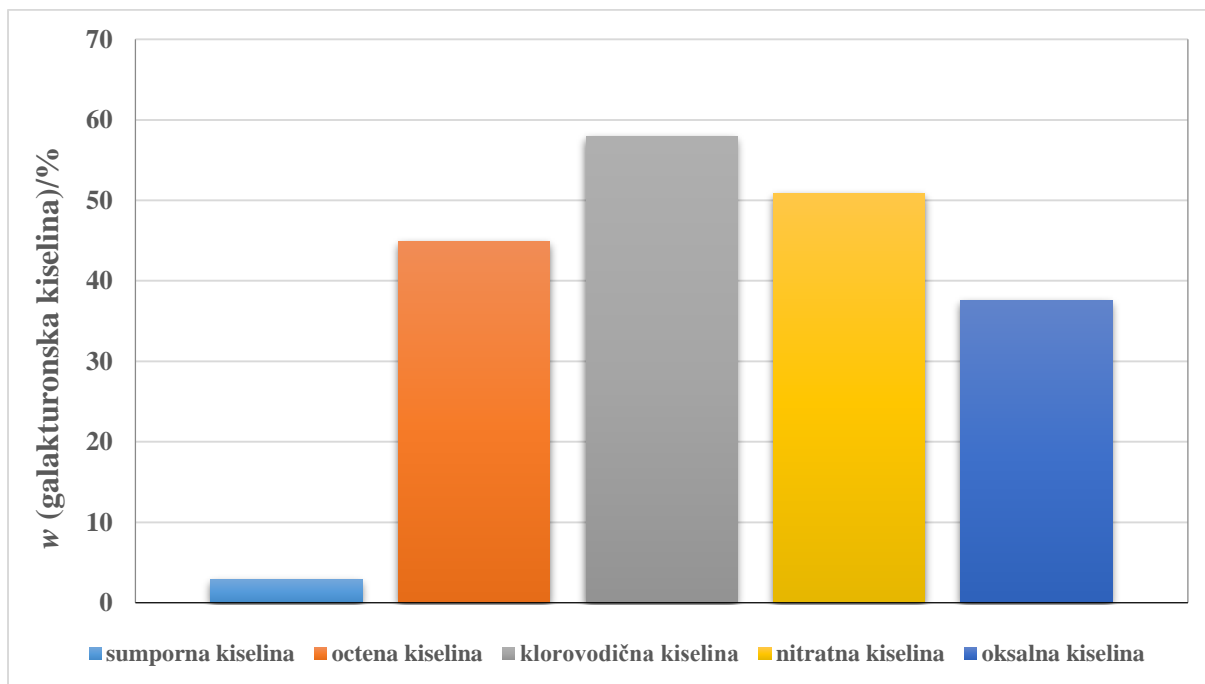
Tablica 13. Maseni udjeli galakturonske kiseline u uzorcima pektina ekstrahiranih iz srebrne pokožice primjenom različitih kiselina.

PEKTIN	A ± SD	w (galakturonska kiselina/% ± SD)
H ₂ SO ₄	0,038 ± 0,004	2,90 ± 0,26
H ₂ C ₂ O ₄	0,254 ± 0,002	37,56 ± 0,31
HNO ₃	0,344 ± 0,005	50,80 ± 0,73
CH ₃ COOH	0,304 ± 0,005	44,92 ± 0,73
HCl	0,385 ± 0,005	57,86 ± 0,73

N = 2, SD = standardna devijacija

S druge strane, pektinski uzorci dobiveni ekstrakcijom s sumpornom kiselinom sadrže vrlo niske udjele galakturonske kiseline (2,90 %), što znači da se ova kiselina ne može koristiti u ekstrakciji srebrne pokožice budući da ne zadovoljava kriterije primjene pektina kao prehrambenog aditiva (Pravilnik, Narodne Novine 2019). Naime, udio galakturonske kiseline mora biti veći od 65 %.

Pektin ekstrahiran upotrebom drugih kiselina pogotovo klorovodične i nitratne sadržava galakturonsku kiselinu, koja se s udjelima približava vrijednosti od 65 %. Budući da srebrna pokožica kao i neki drugi nusproizvodi prehrambene industrije (Ninčević Grassino i sur. 2016; Marić i sur. 2018) sadrže različite kemijske spojeve u svojim kompleksnim strukturama, moguće je da i tijekom ekstrakcije pektina dolazi do ekstrakcije drugih organskih spojeva koji interferiraju zajedno s galakturonskom kiselinom te doprinose ukupnom povećanju apsorbancije, a time i koncentracije željenog analita. Iz navedenih pretpostavki može se zaključiti kako bi se trebale primjeniti i neke od inovativnih metoda ekstrakcije, poput ekstrakcije mikrovalovima ili ultrazvukom kojima bi se smanjilo vrijeme tretiranja uzorka, a time i smanjila mogućnost ekstrakcije neželjenih spojeva.



Slika 15. Ovisnost masenih udjela galakturonske o kiselinama primjenjenim pri ekstrakciji pektina iz srebrne pokožice.

Avallone i suradnici (2000) su refluksiranjem ekstrahirali pektin iz sluzavog sloja (unutarnji mezokarp) koji okružuje pulpu kave (vanjski mezokarp) pomoću 1 mol L^{-1} nitratne kiseline pri $90 \text{ }^\circ\text{C}$, 45 min, a dobiveni svijetlosivi fino usitnjen prah je sadržavao nešto veću vrijednost galakturonske kiseline (59 %) u odnosu na onu dobivenu u ovom radu (50,80 %).

Nadalje, Garcia i suradnici (1991) su proveli istraživanje u kojem su prešanjem pulpe različitih vrsta kave dobili sok koji su miješali s zakiseljenim etanolom kako bi se istaložile u alkoholu netopljive tvari. Nakon pročišćavanja i prešanja, dobiveni čvrsti ostatak se ekstrahirao 1 h vodenom otopinom klorovodične kiseline ($\text{pH} = 2$), a dobiveni pektinski ekstrakt je sadržavao između 46,6 i 91,19 % anhidrogalakturonske kiseline, ovisno o vrsti kave i načinu pročišćavanja.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da bi se nitratna i klorovodična mogle upotrijebiti za ekstrakciju pektina iz srebrne pokožice budući da se njihovom primjenom udio galakturonske kiseline približava onoj od 65 %. Međutim potrebno je provesti daljnja istraživanja u kojima bi se optimirala metoda ekstrakcije i sami parametri procesa.

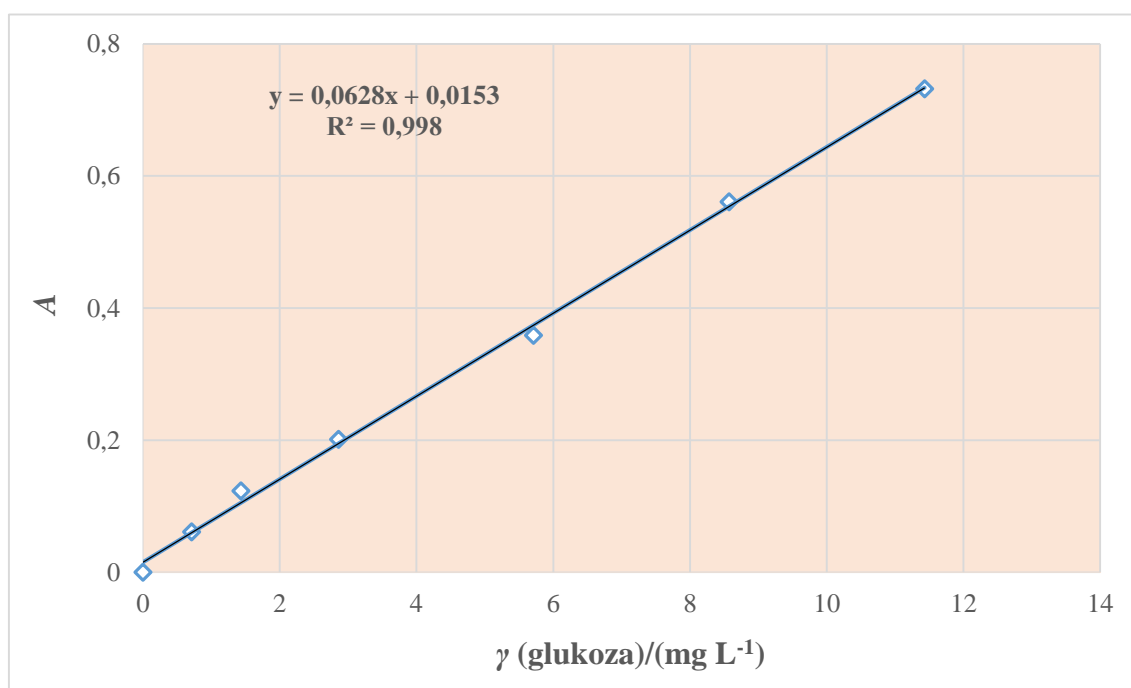
4.4.3. Određivanje sadržaja šećera

U Tablici 14 prikazane su vrijednosti masenih koncentracija glukoze s izmjerenim vrijednostima apsorbancija koje su korištene u izradi baždarnog dijagrama (Slika 16). Iz jednadžbe pravca određene su nepoznate masene koncentracije šećera, odnosno maseni udjeli šećera u uzorcima pektina (Tablici 15).

Tablica 14. Masene koncentracije otopina glukoze i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih UV/Vis spektrofotometrom na $\lambda = 492$ nm.

STANDARDNA OTOPINA	γ (glukoza)/(mg L ⁻¹)	A ± SD
0	0	0,000 ± 0,000
1	0,33	0,061 ± 0,007
2	0,67	0,123 ± 0,003
3	1,33	0,201 ± 0,004
4	2,67	0,359 ± 0,010
5	4,0	0,561 ± 0,007
6	5,33	0,732 ± 0,007

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 16. Baždarni dijagram glukoze.

Rezultati su pokazali (Tablica 15 i Slika 17) da se ne samo kod određivanja galakturonske kiseline, već i šećera u uzorcima pektina ekstrakcijom s sumpornom kiselinom dobivaju najniži udjeli (11,68 %). Međutim, uzorci tretirani octenom kiselinom pokazuju drukčiji trend nego kod određivanja galakturonske kiseline. Ti uzorci sadrže najveće količine šećera (42,38 %). Nadalje, može se uočiti da uzorci kod kojih je za ekstrakciju korištena klorovodična kiselina imaju visok udjel galakturonske kiseline, ali znatno niži udjel šećera od uzoraka ekstrahiranih ostalim kiselinama (17,78 %). Slična korelacija prati i ostale pektinske izolate poput onih ekstrahiranih s nitratnom i oksalnom kiselinom.

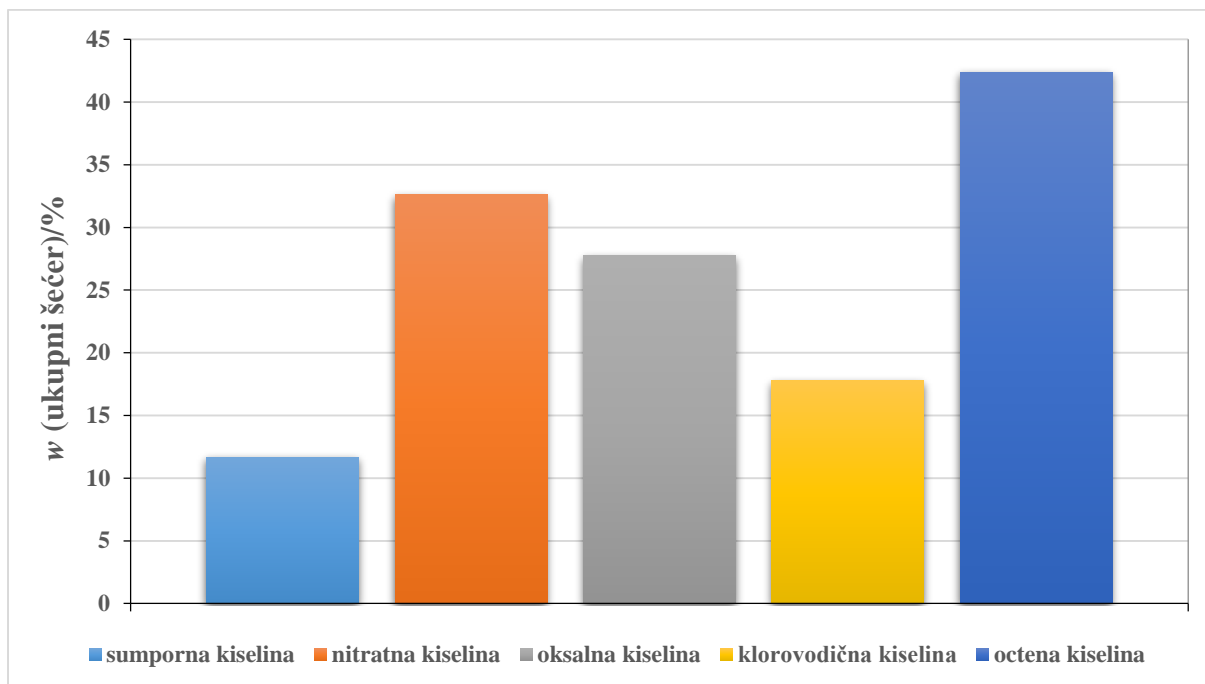
Tablica 15. Maseni udjeli šećera u uzorcima pektina ekstrahiranih iz srebrne pokožice primjenom različitih kiselina.

PEKTIN	A ± SD	w (šećera)/% ± SD
H₂SO	0,183 ± 0,001	11,68 ± 0,10
H₂C₂O₄	0,414 ± 0,001	27,78 ± 0,10
HNO₃	0,483 ± 0,001	32,58 ± 0,10
CH₃COOH	0,624 ± 0,002	42,38 ± 0,15
HCl	0,271 ± 0,002	17,78 ± 0,15

N = 2, SD = standardna devijacija

Vrijednost šećera od 32,58 % dobivena ekstrakcijom srebrne pokožice s nitratnom kiselinom je skoro tri puta veće od vrijednosti dobivene (13,4 %) u istraživanju Avellone i suradnika (2000). Međutim, treba uzeti u obzir da su Avellone i suradnici (2000) kao sirovinu koristili samo sluzavi sloj koji okružuje pulpu kave. Također, osim ukupnih šećera, u njihovom istraživanju su određeni i pojedinačni šećeri, a čine ih arabinoza kao najzastupljenija, tegalaktoza, ksiloza, ramnoza, glukoza, manosa i fukoza.

Istraživanje Belalcezar Otalora (2013) je pokazalo da pulpa kave podvrgnuta dvostupanjskoj ekstrakciji, u kiselim, a zatim i lužnatim uvjetima sadržava između 70 i 95 % šećera, a među njima identificirane ramnoza, arabinoza, ksiloza, manosa, galaktoza i glukoza čine čak 3 - 15 % ukupne količine.



Slika 17. Ovisnosti masenih udjela šećera o kiselinama primjenjenim pri ekstrakciji pektina iz srebrne pokožice.

Za razliku od kore rajčice gdje se dobivene vrijednosti šećera iz pektinskog izolata kreću između 2,70 do 3,80 % (Ninčević Grassino i sur., 2016), u srebrnoj pokožici vrijednosti dosežu čak 42,38 % nakon ekstrakcije octenom kiselinom. Očito je da metoda ekstrakcije kao i upotrebljeno otapalo, ali i vrsta biootpada dovodi do ovakvih znatnih razlika u količini ukupnih šećera.

4.4.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola određene su iz regresijskog pravca dobivenog nakon izrade baždarnog dijagrama (Tablica 2 i Slika 8), a konačne vrijednosti su izražene kao g ukupnih fenola na 100 g uzorka.

Dobiveni rezultati (Tablica 16) ukazuju na jako niske vrijednosti ukupnih fenola u uzorcima pektina izoliranih iz srebrne pokožice. Kreću su u rasponu od 0,13 do 0,56 % što su zanemarivo niske vrijednosti u usporedbi s količinom prisutnom u pektinu izoliranom iz limete (3,92 %) (Rosario Ayora i Talavera, 2017).

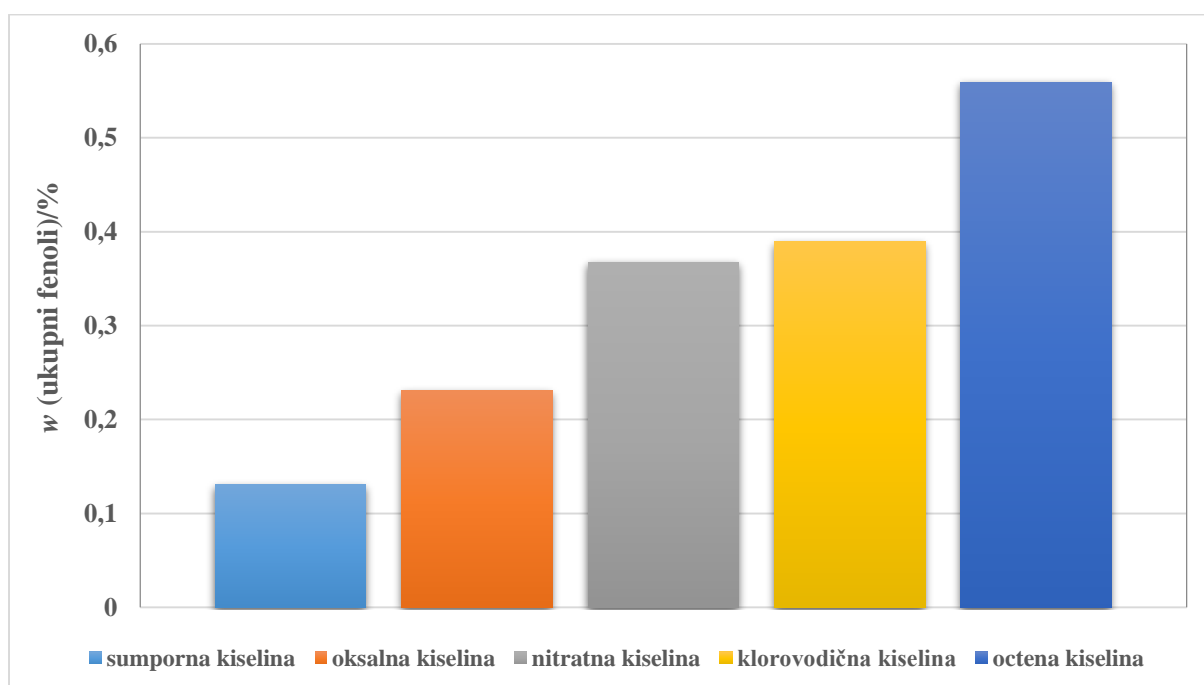
Kao i kod galakturonske kiseline i ukupnih šećera, uzorci tretirani sumpornom kiselinom sadrže i najmanji udio ukupnih fenola (0,13 %) (Tablica 16). Korištenje octene

kiseline rezultiralo je najvećim udjelom ukupnih fenola (0,56 %), a upotrebom klorovodične (0,39 %) i nitratne (0,37 %) kiseline dobiveni su približno isti udjeli ukupnih fenola (Slika 18). Budući da tamnija boja ekstrakata ukazuje na prisutnost fenola (Al Farsi i sur., 2018) može se pretpostaviti da se ekstrakcijom pektina s octenom kiselinom izolira i najveća količina fenola jer su ti uzorci ujedno i najtamniji.

Tablica 16. Maseni udjeli fenola u uzorcima pektina ekstrahiranih iz srebrne pokožice primjenom različitih kiselina.

PEKTIN	A ± SD	w (ukupni fenoli)/% ± SD
H ₂ SO	0,035 ± 0,001	0,131 ± 0,008
H ₂ C ₂ O ₄	0,057 ± 0,001	0,231 ± 0,013
HNO ₃	0,088 ± 0,001	0,368 ± 0,006
CH ₃ COOH	0,132 ± 0,002	0,560 ± 0,009
HCl	0,271 ± 0,002	0,390 ± 0,012

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 18. Ovisnost masenih udjela fenola o kiselinama primjenjenim pri ekstrakciji pektina iz srebrne pokožice.

Isto tako uzorci tretirani sumpornom kiselinom su najsvjetliji pa je to ujedno i razlog zbog čega je u njima nađen najmanji udio fenola. Na temelju boje uzoraka prikazanih u Tablici 11 te rezultata ukupnih fenola (Tablica 16) može se utvrditi da količina fenola opada s porastom svjetline uzoraka.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da pektin izoliran iz srebrne pokožice ne sadrži znatne količine fenola što znači da su tijekom procesa pročišćavanja pektinskih izolata etanolom i acetonom uspješno uklonjeni.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Najveće količine ukupnih fenola i flavonoida iz srebrne pokožice ekstrahirane su pri volumnom udjelu etanola od 70 %, temperaturi od 70 °C i vremenu od 15 min. Najmanja količina ekstrahirana je 50 %-tnim etanolom pri 5-minutnoj ekstrakciji i temperaturi od 50 °C.
2. Najveće količine ukupnih fenola u kavi ekstrahirane su pri volumnom udjelu etanola od 70 %, temperaturi od 50 °C i vremenu od 15 min. Najmanja količina ekstrahirana je 50 %-tnim etanolom pri 5-minutnoj ekstrakciji i temperaturi od 70 °C. Najveće količine flavonoida u kavi ekstrahirane su 70 %-tnim etanolom pri 70 °C i vremenu ekstrakcije od 15 minuta dok su najmanji prinosi postignuti također 70 %-tnim etanolom pri temperaturi od 50 °C i vremenu od 15 minuta.
3. Udio masti u kavi je od 8,93 % dok u srebrnoj pokožici iznosi 9,09 %.
4. Najzastupljenije masne kiseline u srebrnoj pokožici su C22:0 i C20:0, dok u kavi prevladavaju: C18:2n6 > C16:0 > C18:1n9 > C18:0.
5. Uzorci pektina srebrne pokožice ekstrahirani s H₂SO₄ su svjetliji u odnosu na standard a ostali uzorci su tamniji od standarda neovisno o kiselini koja se koristila pri ekstrakciji. Uzorci pektina su zeleniji i plaviji u odnosu na standard.
6. Pektinski uzorci ekstrahirani klorovodičnom kiselinom imali su najveći udio galakturonske kiseline (57,86 %). Pektinski uzorci ekstrahirani sumpornom kiselinom imali su najmanji udio galakturonske kiseline (2,9 %).
7. Najveći udjeli ukupnih šećera dobiveni su u pektinskim uzorcima ekstrahiranim s octenom kiselinom (42,38 %), dok su najmanji udjeli dobiveni kod uzoraka ekstrahiranih sa sumpornom kiselinom (11,68 %).
8. Pektinski ekstrakti imaju nizak udio ukupnih fenola (0,13 - 0,56 %).

6. LITERATURA

- Al-Bukhaiti, W. Q., Noman, A., Qasim, A. S., Al-Farga, A. (2017) Gas Chromatography: Principles, Advantages and Application in Food Analysis. *Int. J. Agric. Res. Innov. Technol.* **6**, 123-128.
- Al-Farsi, M., Al-Amri, A., Al-Hadhrami, A., Al-Belushi, S. (2018) Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. *Heliyon.* **262**, 162-167.
- Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., Kaltsschmitt, M. (2012) Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel* **96**, 70-76.
- Alves, R. C., Nunes, M., Rodrigues, F., Vihna, A.F. (2017) State of the art in coffee processing by-products. U: Handbook of Coffee Processing By Products, (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1-26.
- Andrade, K. S., Gonçalves, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M, Martínez, J., Ferreira, S. R. (2012) Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta* **88**, 544-522.
- Anonymous 1 (2009) Povijest kave, <<http://www.geografija.hr/clanci/750/kava-kratka-povijest-napitka-ukorijenjenog-u-našoj-svakodnevi>>. Pristupljeno 14. srpnja. 2019.
- Arellano-Gonzales, M. A., Ramirez-Coronel, A., Torres-Mancera, T., Perez-Morales, G. G., Saucedo-Castañeda, G. (2011) Antioxidant Activity of Fermented and Nonfermented Coffee (*Coffea arabica*) Pulp Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 374-378.
- Avallone, S., Guiraud, J. P., Guyot, B., Olguin, E., Brillouet, J. M. (2000) Polysaccharide Constituents of Coffee - Bean Mucilage. *J. Food. Sci.* **65**, 1308-1311.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri - industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I., (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Tech.* **7**, 3493-3503.

- Belalcazar Otalora, A. F. (2014) Pectin extraction from coffee pulp. US patent WO2014083032A1.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D. (2017) Extraction and formulation of bioactive compounds. U: Handbook of Coffee Processing By - Products. Sustainable Applications (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 93-140.
- Bessada, S. M. F., Alves, R. C., Oliveira, B. P. P. (2018) Coffee silverskin: A Review on Potential Cosmetic Application, *Cosmetics* **5**, 1-11.
- Borelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V (2004) Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1338-1343.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Bravo, J., Monente, C., Juaniz, I., Paz de Peña, M., Cid, C. (2013) Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food. Res. Int.* **50**, 610-616.
- Bresciani, L., Bruni, R., Calani, L., Brighenti, F. (2014) Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Res. Int.* **61**, 196-201.
- Buffo, R. A., Cardelli-Freire, C. (2004) Coffee flavour: an overview. *Flavour Frag. J.* **19**, 99-104.
- Camel, V. (2001) Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave - assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analysts* **126**, 1182-1193.
- Chemat, S., Lagha, A., Amar, H. A., Chemat, F. (2004) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 5-8.
- Conde, E., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J. C. (2010) Extraction of natural antioxidants from plant foods. U: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries (Rizvi, S. S. H., ured.), Woodhead Publishing Philadelphia, str. 506-568.
- Costa, A. S. G. , Alves, R. C. , Vinha, A. F., Costa, E., Costa C. S. G., Nunes, M. A., Almeida, A. A. , Santos-Silva, A., Oliveira, M. B. P. P. (2016) Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chem.* **267**, 28-35.

- Dong, W., Tan, L., Zhao, J., Hu R., Lu, M. (2015) Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China. *Molecules* **20**, 16687-16708.
- Dybkowska E., Sadowska A., Rakowska R., Dębowska, M., Świdorski F., Świąder, K. (2017) Assessing Polyphenols Content and Antioxidant Activity in Coffee Beans According to Origin and the Degree of Roasting. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **68**, 347-353.
- Duy Le, X., Nguyen M. C., Vu D. H., Pham, M. Q., Pham, Q. L., Nguyen Q. T., Nguyen, T. A., Pham, V. T., Bach, L. G. (2017) Total Flavonoid Contents from Fruits of *Docynia indica*. *Processes* **7**, 485-498.
- Efthymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo - Profili, A., Eveleigh, A., Aliev, A., Kay, A., Mills-Lamptey (2018) Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Ind. Crops. Prod.* **119**, 49-56.
- Esquivel, P., Jimenez, V. M. (2012) Functional properties of coffee and coffee by - products. *Food. Res. Int.* **46**, 488-495.
- Farah, A. (2012) Coffee constituents. U: Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, (Chu, Y. F., ured.), John Wiley & Sons, New York, str. 21-58.
- Ferreri, C., Chatgialiloglu, C. (2015) Fatty Acid Families: Metabolism and Nutrition. U: Membrane Lipidomics for Personalized Health (Ferreri, C., Chatgialiloglu, C., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 21-40.
- Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986) Microwave extraction a novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* **371**, 299-306.
- Garcia, R., Arriola, D., de Arriola, M. C., de Porres, E., Rolz, C. (1991) Characterization of Coffee Pectin. *Lebensm. Wiss. Technol.* **24**, 125-129.
- Gatechew, A. T., Chun, B. S. (2016) Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* **70**, 126-134.
- Hagos, M., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., Mohammed, A. M., Mamo, H. (2018) Corellations between caffeine contents of green coffee beans and altitudes of the coffee plants grown in southwest Ethiopia. *Bull. Chem. Soc. Etioph.* **32**, 13-25.
- ICO (2019) Total production by all exporting countries. ICO - International Coffee Organization, London <<http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>>. Pristupljeno 15. ožujka 2020.

- 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.
- Iličković, Z., Redžić, E., Andrejaš, F., Avdić, G., Stuhli, V. (2011) Ispitivanje mogućnosti dobivanja ulja iz čvrstog ostatka zaostalog nakon spravljanja napitka od kafe kao potencijalne sirovine za dobijanje biodizela. *Hem. Ind.* **66**, 581-586.
- Iriondo-DeHond, A., Rios, M. B., Herrera, T., Rodriguez-Bertos, A., Nuñez, F., San Andres. M. I., Sanchez-Fortun, S., del Castillo, M. D. (2019a) Coffee Silverskin Extract: Nutritional Value, Safety and Effect on Key Biological Functions. *Nutrients* **11**, 2693-2714.
- Iriondo-DeHond, A., Aparicio García, N., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Velázquez Escobar, F., Blanch, G. Patricia, San Andres, M. Ignacio, Sanchez-Fortun, S., del Castillo, M. Dolores. (2019b) Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **51**, 194-204.
- Janissen, B., Huynh, T. (2018) Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: a review. *Resour. Conserv. Recycl.* **128**, 110-117.
- Kreicbergs, V., Dimins, F., Mikelstone, V., Cinkmanis, I. (2011) Biologically active compounds in roasted coffee. *Foodbalt.* **2011**, 110-115.
- Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr.* **1217**, 2183-2389.
- Marić, M., Ninčević Grassino, A., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., Rimac-Brnčić, S. (2018) An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci. Tech.* **76**, 28-37.
- Martin, M. J., Pablos, F., A., Gonzalez, A. G., Valdenebro, M. S., Camacho, M. L. (2001) Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Talanta* **54**, 291-297.
- Martinez-Saez, N., Ullate, M., Martin-Cabrejas, M. A., Martorell P., Genovés S., Ramon, D., del Castillo, M. D. (2014) A Novel Antioxidant Beverage for Body Weight Control Based on Coffee Silverskin. *Food Chem.* **150**, 227-234.
- Mason, T. J., Chemat, F., Vinatoru, M. (2011) The extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Curr. Org. Chem.* **15**, 237-247.
- May, C. D. (1990) Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydr. Polym.* **12**, 79-99.

- Mussatto, S. I., Teixeira, J.A. (2010) Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid - state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro- industrial residues as support and nutrient source. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 1246-1249.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., Teixeira, J .A. (2011a) Production, Composition and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 661-672.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., Teixeira, J. A. (2011b) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.* **83**, 173-179.
- Narita, Y., Inouye, K. (2012) High Antioxidant Activity of Coffee Silverskin Extracts Obtained by the Treatment of Coffee Silverskin With Subcritical Water. *Food Chem.* **135**, 943-949.
- Narita, Y., Inouye, K. (2014) Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res. Int.* **61**, 16-22.
- Ninčević Grassino, A., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Rimac Brnčić, S. (2016) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste, *Food Chem.* **198**, 93-100.
- Ninčević Grassino, A., Djaković, S., Bosiljkov, T., Halambek, J., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Petrović, M., Rimac Brnčić, S. (2019) Valorisation of Tomato Peel Waste as a Sustainable Source for Pectin, Polyphenols and Fatty Acids Recovery using Sequential Extraction, *Waste Biomass Valori.* **4**, 1-19.
- Nogaim, Q. A., Al-Duais, M., Al-Warafi, A., Al-Eriane, H., Al-Sayadi, M. (2013) The chemical composition of Yemeni green coffee. *Food Chem. Nutr.* **1**, 42-48.
- Nuhu, A. A. (2014) Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification. *ISRN Nutr.* **2014**, 1-13.
- Ovodov, Y. S. (2009) Current views on pectin substances. *Russ. Jour. Biorg. Chem.* **35**, 269-284.
- Panday A., Soccol C. R., Nigam P., Brand D., Radjiskumar Mohan, Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* **6**, 153-162.
- Pekal, A., Pyrzynska, K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **7**, 1776-1782.

- Perez-Martinez, M., Caemmerer, B., Paz de Peña, M., Cid, C., Kroh, L. W. (2010) Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *J. Agric. Food. Chem.* **58**, 2958-2965.
- Pietta P. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.
- Petrović, M., Kezić, N., Bolanča, V. (2010) Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food chem.* **122**, 285-291.
- Pravilnik o voćnim džemovima, želeima, marmeladama, pekmezu te zaslađenom kesten pireu (2019) *Narodne novine* **84**, Zagreb.
- Qiao, L., Sun., Y., Chen, R., Fu, Y., Zhang, W., Li, X., Chen, J., Shen, Y., Ye, X. (2014) Sonochemical Effects on 14 Flavonoids Common in Citrus: Relation to Stability. *PLoS One* **9**, 1-10.
- Rajha, H. N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, Maroun, R. (2014) Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18640-18658.
- Rapić, V. (1994) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb, str. 56-58.
- Rosario Aroya-Telavera, C., Ramos-Chan, C. A. Covarrubias-Cardenas, A. G., Sanchez-Contreras, A., Garcia-Cruz, U, Pacheco L., N. A. (2017) Evaluation of Pectin Extraction Conditions and Polyphenol Profile from Citrus x lantifolia Waste: Potential Application as Functional Ingredients. *Agriculture* **7**, 1-12.
- Russell, F. D., Burgin-Maunders, C. S. (2012) Distinguishing Health Benefits of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. *Mar. Drugs.* **10**, 2535-2559.
- Rustan, A. C., Drevon, C. A. (2005) Fatty acids: Structures and properties. Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, New York, str. 1-7.
- Schmid, F. X. (2001) Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. U: Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd, Bayreuth, str. 1-4.
- Sharma, B. R., Naresh, L., Dhuldhoya, N. C, Merchant, S.U., Merchant, U. C. (2006) An Overview on Pectins. *Times Food Process. J.* June/July, 44-51.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **299**, 152-178.

- Speer, K., Kölling-Speer, I. (2006) The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant. Physiol.* **18**, 201-216.
- Spigno, G., De Faveri, D. M., Tramelli, L. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200-208.
- Sundar Raj, A. A., Rubila, R., Jayabalan, R., Ranganathan, T. V. (2012) A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Sci. Rep.* **1**, 1-3.
- Tan, S., Kusumocahyo, S. P., Widiputri, D. I. (2017) Pulverization of coffee silverskin extract as a source of antioxidant. *Mater. Sci. Eng.* **162**, 1-6.
- Toschi, T. G., Cardenia, V., Bonaga, G., Mandrioli, M., Rodriguez - Estrada, M. T. (2014) Coffee Silverskin: Characterization, Possible Uses, and Safety Aspects. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 10836-10844.
- Tranfić Bakić, M. S. Pedisić, Z. Zorić, V. Dragović-Uzelac, A. Ninčević Grassino (2019) Effect of Microwave-Assisted Extraction on Polyphenols Recovery from Tomato Peel Waste, *Act. Chim. Slov.* **66**, 367-377.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312.
- Zuo, H. L., Yang, F. Q., Huang, W. H., Xia, Z. N. (2013) Preparative Gas Chromatography and Its Applications. *J. Chromatogr. Sci.* **51**, 704-715.
- Zuorro, A., Lavecchia, R. (2013) Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *J. Clean. Prod.* **34**, 49-56.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Šargo
Ime i prezime studenta