

# Ultrazvučna ekstrakcija nusproizvoda prerade cikle s ciljem potpunog iskorištavanja sirovine

---

Vlahović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:212517>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2022.

Dora Vlahović

**ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA  
NUSPROIZVODA PRERADE  
CIKLE S CILJEM POTPUNOG  
ISKORIŠTAVANJA SIROVINE**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u laboratoriju Eurofins Croatiakontrola d.o.o. pod voditeljstvom Ive Sabljak, mag. ing.

## *ZAHVALA*

*Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, kao i Ivi Sabljak, mag. ing., na svom znanju i vještinama koje sam stekla prilikom izrade ovog diplomskog rada zahvaljujući njihovoj pomoći i korisnim savjetima. Veliko hvala upućujem i kolegama u laboratoriju Eurofins Croatiakontrola d.o.o. na nesebičnoj pomoći prilikom izrade analitičkog dijela eksperimentalnog rada.*

*Najveće zahvale upućujem svojim roditeljima koji su činili sve u svojoj moći kako bi mi omogućili bezbrižno školovanje ispunjeno potporom i ljubavlju, kao i svojoj sestri, dečku i prijateljima na njihovoj bezuvjetnoj potpori.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za opće programe  
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

### ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA NUSPROIZVODA PRERADE CIKLE S CILJEM POTPUNOG ISKORIŠTAVANJA SIROVINE

*Dora Vlahović, univ. bacc. ing. techn. aliment 0058210390*

**Sažetak:** Prehrambena industrija zadnjih desetljeća intenzivno pridaje pažnju valorizaciji nusproizvoda prerade voća i povrća i sofisticiranim, ekološki prihvatljivim tehnikama za njihovu obadu. Jedna od takvih tehnika je ultrazvuk visoke snage, koja ima velike prinose željenih spojeva uz manju potrošnju energije, otapala i vremena, dok funkcionalnost obrađenih uzoraka ostaje očuvana. U ovom je istraživanju ispitan prinos prehrambenih vlakana (PV) nakon ultrazvučne ekstrakcije metabolita kore cikla u ekstrakcijskom ostatku, kako bi se ispitao potencijal maksimalnog iskorištenja sirovine, kao i utjecaj odabranih procesnih parametara na prinose. Ultrazvučna ekstrakcija pokazala je veće prinose PV od toplinske, s rasponom PV od 25 do 40 %. Maksimalni prinosi vlakana (44,1 %) dobivaju se pri 75 % amplitude, 6 min tretiranja i s otopinom 50 %-tnog etanola kao otapala. Vrijednosti parametara nemaju statistički značajan utjecaj na prinose PV. Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se ekološki prihvatljivom tehnikom obrade nusproizvoda kore cikla za njezino maksimalno iskorištavanje.

**Ključne riječi:** *ultrazvučna ekstrakcija, toplinska ekstrakcija, kora cikla, prehrambena vlakna, zero waste production*

**Rad sadrži:** 56 stranica, 4 slike, 16 tablica, 44 literaturna navoda, 5 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** Iva Sabljak, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač (član)
4. izv. prof. dr. sc. Mojca Semenčić Čakić (zamjenski član)

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Common Programmes**  
**Laboratory for sustainable development**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF RED BEETROOT BYPRODUCTS – ZERO WASTE CONCEPT

*Dora Vlahović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210390*

**Abstract:** In recent decades, the food industry has been intensively paying attention to the valorization of fruit and vegetable processing by-products and sophisticated, environmentally friendly techniques to obtain them. Such technique is high-power ultrasound, which brings high yields of desired compounds with lower consumption of energy, solvents and time, while the functionality of the processed matrices remains preserved. In this study, the dietary fiber (DF) yield was examined after ultrasonic extraction of red beetroot peel metabolites in the extraction residue, in order to examine the maximum utilization potential of the raw material, as well as the impact of selected process parameters on DF yield. Ultrasonic extraction showed higher DF yields than conventional thermal extraction, ranging from 25 to 40 %. Maximum fiber yield (44.1 %) is obtained at 75 % amplitude, 6 min of treatment and with a solution of 50 % ethanol as a solvent. Parametric values do not have a statistically significant impact on DF yields. Ultrasonic extraction has proven to be an environmentally friendly technique for processing by-products of beetroot peel for its maximum utilization.

**Keywords:** *ultrasound-assisted extraction, thermal extraction, red beetroot peel, dietary fiber, zero waste production*

**Thesis contains:** 56 pages, 4 figures, 16 tables, 44 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Iva Sabljak, MSc

#### **Reviewers:**

1. Sven, Karlović, PhD, Associate professor (president)
2. Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Nikolina, Čukelj Mustač, PhD, Associate professor (member)
4. Mojca, Semenčić Čakić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
2.1. ODRŽIVI RAZVOJ I ZERO WASTE PRODUCTION.....	4
2.1.1. Nusproizvodi procesiranja voća i povrća.....	5
2.2. CIKLA .....	6
2.2.1. Uporaba cikle u prehrambenoj industriji.....	7
2.2.2. Nusproizvodi prerade cikle.....	8
2.3. PREHRAMBENA VLAKNA.....	9
2.3.1. Analitičke metode za određivanje prehrambenih vlakana.....	11
2.3.2. Nusproizvodi procesiranja voća i povrća kao izvor prehrambenih vlakana.....	13
2.4. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE .....	13
2.4.1. Princip rada pulsirajućeg električnog polja.....	13
2.4.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja u prehrambenoj industriji.....	14
2.5. ULTRAZVUK .....	15
2.5.1. Princip rada ultrazvuka .....	15
2.5.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke snage kao zelena tehnika ekstrakcije.....	16
2.5.3. Ultrazvuk visoke snage i prehrambena vlakna .....	18
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>20</b>
3.1.1. Kora cikle.....	20
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	21
3.1.3. Aparatura i pribor .....	22
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>23</b>
3.2.1. Priprema uzorka za ekstrakciju .....	23
3.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija .....	24
3.2.3. Klasična toplinska ekstrakcija .....	27
3.2.4. Određivanje prehrambenih vlakana .....	28
3.2.5. Određivanje bjelančevina suvremenom metodom po Kjeldahlu .....	32
3.2.6. Obrada podataka .....	33



<b>4. RASPRAVA I REZULTATI .....</b>	<b>35</b>
4.1. REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETARA DOBIVENIH TIJEKOM ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE.....	36
4.3. REZULTATI I USPOREDBA UKUPNIH PREHRAMBENIH VLAKANA DOBIVENIH ULTRAZVUČNOM I KLASIČNOM TOPLINSKOM EKSTRAKCIJOM .....	39
4.4. REZULTATI STATISTIČKE OBRADÉ PODATAKA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE .....	45
4.5. REZULTATI STATISTIČKE OBRADÉ PODATAKA KLASIČNE TOPLINSKE EKSTRAKCIJE .....	49
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>51</b>

# 1. UVOD

Eksplozivni rast svjetskog stanovništva na godišnjoj razini uvjetuje sve veću potrebu za hranom i prirodnim resursima iste, no istovremeno raste i negativan trend pojačanog stvaranja otpada od hrane te iscrpljivanja spomenutih resursa. Takav razvoj događaja, osim navedenih problema, već dokazano ima i izrazito negativan ekološki učinak na prirodu. Na čitavu je prehrambenu industriju (PI) zadnjih godina pritisak za pronalaženje alternativnih izvora hrane i tehnika za njihov dobitak i preradu s čim manjim negativnim utjecajem na okoliš sve veći. Globalne legislative o zbrinjavanju otpada prehrambene industrije već neko vrijeme stavljaju izrazit naglasak na valorizaciju nusproizvoda prerade hrane kao i tehnološke tehnike i operacije koje su s njima usko povezane, sve u cilju unaprjeđenja održivosti u svim područjima koje ono obuhvaća (Ravindran i Jaiswal, 2016).

Jedna od industrija s najvećim postotkom otpada i nusproizvoda jest industrija prerade voća i povrća. Ciljani proizvod često predstavlja i manje od 50 % početne sirovine, čija prerada posljedično ima poražavajuće jednak sadržaj otpada i gotovog proizvoda. Iz tog razloga rastu potrebe za pretvorbom nusproizvoda voća i povrća u komercijalno vrijedne proizvode, prvenstveno izvore bioaktivnih spojeva, kao što su prehrambena vlakna. Za dobitak bioaktivnih spojeva, međutim, potrebno je razviti mnogo sofisticiranije metode od onih trenutno korištenih u PI, koje velike prinose ostvaruju pri mnogo blažim uvjetima što povoljno djeluje i na kvalitetu namirnice i na okoliš (Hussain i sur., 2020). Takve se metode sve popularnije nazivaju „zelenim tehnikama procesiranja hrane“ i procesiranje ultrazvukom visoke snage, zbog mnogo prednosti koje ima nad konvencionalnim tehnikama, jedna je od njih. Ultrazvuk se posebno podobnim pokazao za ekstrakciju vrijednih bioaktivnih spojeva. Cikla predstavlja jednu od najčešće konzumiranih povrtnica zbog mnogobrojnih zdravstvenih benefita koje ima na ljudski organizam, te se brojčane vrijednosti njene konzumacije diljem svijeta mjere u stotinama tisuća. Kora cikle se prilikom njene prerade, unatoč povoljnom sastavu nutrijenata, često odbacivala. Tek se zadnjih desetljeća, intenzivnijim istraživanjem njenog bioaktivnog sastava, stvorio interes za preradu u vrijedan izvor polifenola (PF) i antioksidanasa (AO). Međutim, kora cikle može predstavljati i značajan izvor prehrambenih vlakana, koje je moguće pridobiti i nakon ekstrakcije PF i AO za

željene svrhe, što znači iskorištavanje i ekstrakcijskog ostatka i maksimalno moguće minimiziranje otpada. Nažalost, radova koji se bave ovom tematikom u pravilu nema, ili ih ima jako malo.

Cilj ovog rada iz tog razloga bio je evaluirati potencijal korištenja ostatka kore cikla (kao alternativnog izvora vlakana) za maksimalno iskorištenje sirovine, nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije kao zelene tehnike ekstrakcije. Za što uspješnije odvajanje kore od pulpe te što manje zaostatke na istoj, cijela je cikla prethodno prošla tretman pulsirajućim električnim poljem. Dodatno, ispitan je utjecaj zadanih parametara ultrazvučne ekstrakcije na prinose, pri čemu su parametri odabrani imajući u vidu kako je primaran cilj ekstrakcije najčešće pribavljanje primarnih i sekundarnih biljnih metabolita poput polifenola i proteina ili aminokiselina (koji se, nakon provedenog procesa, nalaze u ekstraktu). Stoga je eksperimentalni dio rada obuhvaćao (i) usporedbu ultrazvučne ekstrakcije potpomognute s klasičnom toplinskom ekstrakcijom obzirom na zadane parametre procesa, (ii) enzimsko-gravimetrijsko određivanje udjela ukupnih prehrambenih vlakana u ekstrakcijskom ostatku te (iii) provedbu eksperimentalnog dizajna, uz optimizaciju uvjeta ultrazvučne ekstrakcije i statističku obradu izlaznih podataka, kako bi se ustvrdili statistički značajni parametri i produbilo razumijevanje o čimbenicima koji utječu na spomenuti proces i njegove rezultate.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ODRŽIVI RAZVOJ I *ZERO WASTE PRODUCTION*

U zadnjem su stoljeću nagli i nekontrolirani rast stanovništva, razvoj međunarodne trgovine, jačanje gospodarske aktivnosti kao i rastuće potrebe za energijom i sirovinama izazvali onečišćenje i iscrpljivanje prirodnih resursa nužnih za život kao i štetne ekološko-gospodarske posljedice za okoliš općenito. Stoga se još 80-tih godina prošloga stoljeća krenulo s definiranjem strategija *održivog razvoja*, čiji se koncept bazira na tri temeljna načela – načelu okolišne održivosti, socijalne i kulturne održivosti te načelu gospodarske održivosti (Herceg, 2013).

Prehrambena industrija jedna je od industrija u kojoj aspekt održivog razvoja, poglavito zadnjih par desetljeća, predstavlja jedan od ključnih aspekata sveobuhvatnog funkcioniranja i budućeg razvitka. Naime, kombinacija povećane stope proizvodnje, korištenje neprikladnih procesnih tehnologija i neadekvatno rukovanje sirovinama rezultirali su generiranjem enormnih količina otpada u prehrambenoj industriji (uz agrikulturu), a posebice onih procesiranja voća i povrća. Agencija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture organization, FAO*) je ujedno nedavno iznio zabrinjavajući podatak kako se godišnje otprilike jedna trećina svjetske proizvodnje hrane baca, što odgovara ugrubo 1,3 milijarde tona hrane. Od toga se u Europi godišnje generira otprilike 90 milijuna tona hranidbenog otpada, što korespondira 170 milijuna tona ekvivalenta CO<sub>2</sub> emitiranog u okoliš na godišnjoj razini. Prehrambena industrija je odgovorna za čak 60% od ukupnog gubitka hrane tijekom proizvodnje, distribucije i prodaje (Fidelis i sur., 2019; Hussain i sur., 2020; Fernando i sur., 2021). Kako se u periodu od 2009. do 2050. očekuje povećanje svjetske populacije za trećinu (Šeremet i sur., 2020), osim znatnog povećanja potražnje za hranom, povećat će se i stopa generiranja prehrambenog otpada. Iz tog se razloga pred čitav sektor prehrambene industrije stavlja izazov razvoja novih, ekološki prihvatljivijih tehnologija obrade hrane, uz što se velik naglasak stavlja na razvoj tehnika kojima bi se agro-otpad na ekološki prihvatljiv način prenamijenio u sirovine za proizvodnju prehrambenih proizvoda dodane vrijednosti (poput onih obogaćenih vlaknima ili s dodanim antioksidansima). Takve bi operacije podržavale koncepte proizvodnje bez otpada (eng. *zero waste production*) i poželjnog kružnog gospodarstva. U kontekstu procesiranja hrane, otpadom se smatraju svi općeprihvaćeno nejestivi dijelovi polazne sirovine, poput stabljika, listova, peteljki, kore, sjemenki, kože ili kostiju. Oni su često vrijedan izvor prehrambenih vlakana, pigmentata, esencijalnih minerala, antioksidanasa,

masnih kiselina i općenito bioaktivnih spojeva, koje je potrebno smoci tzv. *zelenim* tehnikama (Hussain i sur., 2020). Ekološki prihvatljivim tehnologijama obrade hrane smatraju se one tehnologije koje zahtijevaju manju potrošnju energije i potrebnih kemikalija, imaju bolji prinos a smanjen negativan učinak na okoliš. U takve „*zelene*“, netoplinske tehnologije, spadaju procesiranje hrane ultrazvukom, mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom, ohmskim zagrijavanjem, pulsirajućim električnim poljem i sl.

### 2.1.1. Nusproizvodi procesiranja voća i povrća

U sektoru voća i povrća, čak 45% od ukupne proizvodnje istih izgubi se po završetku berbe, prilikom procesiranja, distribucije i u potrošačkom lancu općenito. Otpad nastao procesiranjem voća i povrća procijenjen je na čak 45% od ukupnog otpada nastalog procesiranjem hrane (Fidelis i sur., 2019; Ganesh i sur., 2022). Održivo gospodarenje otpadom voća i povrća stoga je imperativ, kao i razvoj novih tehnika kojima bi se omogućila njihova učinkovita reciklaža i ponovno korištenje u svrhu proizvodnje hrane dodane vrijednosti. Taj otpad ne uključuje samo lišće, stabljike, korijenje, koru i sjemenke, već i komine voća i povrća dobivene preradom u, primjerice, sok, džemove i pirea. Voće i povrće, i to ne samo njihove pulpe, smatraju se dobrim izvorom bioaktivnih spojeva poput antioksidanasa, minerala, prehrambenih vlakana, pigmenata i sl (Hussain i sur., 2020). Tako se u literaturi mogu pronaći uspješni primjeri ekstrakcije limonena iz narančine kore, polifenola iz komine jabuke, likopena iz komine rajčice, karotenoida iz pokožice rajčice (Ravindran i Jaiswal, 2016), betalaina i polifenola iz komine cikle (Fernando i sur., 2021), a komine jabuke, bobica, grožđa i naranče (kao i kora naranče) pokazali su se bogatim izvorom prehrambenih vlakana (Hussain i sur., 2020), a sve uz primjenu inovativnih netoplinskih metoda obrade hrane. K tome, mogu se pronaći i razvijeni funkcionalni proizvodi poput jogurta i keksa obogaćenih brašnom pokožice grožđa, ribljeg ulja s dodatkom fenola iz pokožice jabuke, kobasice s dodatkom vlakana iz citrusa (Fidelis i sur., 2019), svježih *fettuccini* tjestenine s dodatkom vlakana kore naranče (Costa i sur., 2017), kao i trajnih i svježih pekarskih proizvoda s dodatkom komine cikle kao izvora vlakana i antioksidanasa (Kohajdova i sur., 2018) i mnogi drugi. Iz tog se razloga snažno potiče dodatna valorizacija nusproizvoda prerade voća i povrća budući da takav agro-otpad ne samo da podupire *zero waste* koncept već predstavlja i relativno jeftinu polaznu sirovinu čime se, uz okolišne, ostvaruju i ekonomski benefiti.

## 2.2. CIKLA

Cikla (lat. *Beta vulgaris*) pripada porodici štirovki (*Amaranthaceae*) i dvogodišnja je biljka, značenja da cvate u drugoj godini nakon sadnje. Veoma je popularna sadnica diljem svijeta, može se konzumirati na različite načine, a sadrži nutritivno vrijedne sastojke. Kako je niskog sadržaja masti, a bogata ugljikohidratima (poglavito šećerima niske energetske vrijednosti), škrobom, vlaknima i proteinima, smatra se namirnicom srednje kalorijske vrijednosti. Iako je cikla najtraženija zbog udjela sadržanih vlakana, betalaina, flavonoida i nitrata, njen sastav obuhvaća širok raspon makronutrijenata, mikronutrijenata, fenolnih spojeva i općenito fitokemikalija. Pregled navedenih nutrijenata nalazi se u tablici 1. Promatrajući nutritivni sastav cikle, ne iznenađuje što je uvrštena na listu top 10 povrća sa superiornim zdravstvenim dobrobitima (Fernando i sur., 2021). Pripisuju joj se antioksidativna, antimikrobna, antifugalna, protuupalna pa čak i antivirusna svojstva, djeluje hepatoprotektivno i ojačava imunološki sustav. Različita provedena istraživanja pokazuju kako pomaže u sniženju krvnog tlaka, štiti bubrege, jetru i probavni sustav od toksičnih spojeva te sprječava konstipaciju, potpomažući normalnu probavu (Fernando i sur., 2021; Shuaibu i sur., 2021; Ceclu i Nistor, 2020). Samo u Zapadnoj Europi, godišnje se proizvede preko 200 000 tona cikle (Kojdahova i sur., 2018), a Europska Unija je ujedno i najveći svjetski proizvođač cikle (~70% ukupne proizvodnje). Također, u sljedećem se desetljeću očekuje značajno povećanje globalnog tržišta cikle, kako se samo nekima od njenih proizvoda, kao što je prah cikle, predviđa povećanje proizvodnje s 690 tisuća tona (u 2016. godini) na 11 milijuna tona do 2027. godine (Fernando i sur., 2021).

**Tablica 1.** (prema Ceclu i Nistor, 2020; Hadipour i sur., 2020)

<b>Makronutrijenti</b>	Ugljikohidrati (škrob, fruktoza, glukoza, saharoza)
	Vlakna
	Bjelančevine
	Esencijalne i neesencijalne aminokiseline (Trp, Leu, Lys, Met, Phe, Val, Gly, Pro, His, Ala, Glu, Asp)
	Masti
	Fitosteroli
<b>Mikronutrijenti</b>	Vitamini (vitamin A, tiamin, riboflavin, niacin, vitamin K, askrobinska kiselina, folat)
	Minerali (natrij, kalcij, željezo, fosfor, kalij, magnezij, cink)
<b>Fenolne komponente</b>	Flavonoidi (betagarin, betavulgarin, kvercetin, kampferol, astragalin)
	Saponini (betavulgarozidi I – X)
	Ostali fenolni derivati (epikatehin, katehin hidrat, vanilinska kiselina, p-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina, klorogenska kiselina, ferulinska kiselina)
<b>Betalaini</b>	Betacijanini (betanin, prebetanin, izobetanin, neobetanin) i betaksantini (vulgaksantin-I, vulgaksantin-II i indikaksantin)
<b>Karotenoidi</b>	$\beta$ -karoten, lutein
<b>Ostale fitokemikalije</b>	Alkaloidi, steroidi, seskviterpenoidi, kumarini

### 2.2.1. Uporaba cikla u prehrambenoj industriji

Cikla se godinama najviše (u otprilike 90 % slučajeva) konzumirala kao povrće, minimalno procesirano ili procesirano (Kojdahova i sur., 2018). Međutim, u zadnje vrijeme se uslijed mnogobrojnih spoznaja o njenom korisnom sastavu i potencijalu korištenja ne samo pulpe već i ostalih pripadajućih dijelova kao i njezinih pojedinih komponenti, cikla koristi u razvitku i proizvodnji raznovrsnih prehrambenih proizvoda s blagotvornim učinkom na ljudski organizam. Zadnjih se desetljeća znatno povećalo tržište soka od cikla, a provedena istraživanja pokazuju kako konzumacija 500 ml soka cikla dnevno snižava krvni tlak te ima snažno antioksidacijsko djelovanje (Ceclu i Nistor, 2020; Shuaibu i sur., 2021). Na tržištu se također mogu naći čips od cikla, umaci na bazi i s dodatkom cikla, kao i svježi i trajni pekarski proizvodi (kruh, peciva, keksi,



kolači), tjestenine i ekstrudirani proizvodi s dodatkom praha cikle. Ipak, najpopularnija primjena cikle je kao prehranbenog bojila. Naime, cikla se smatra najvažnijim izvorom betalaina, vodotopljivih pigmenata koji sadrže dušik, a strukturalno mogu pripadati crveno-ljubičastim (betacijanini) i žutim pigmentima (betaksantini). To su fenolni kromoalkaloidi antioksidacijskog, protuupalnog i antivirusnog djelovanja, a stabilnost boje ovisi o pH i temperaturi. Snažno boje matriks i stoga se koriste kako bi se izbjegao gubitak obojenja hrane, pojačala crvena boja umacima, juhama, pasti od rajčice, džemovima, sladoledima i slatkišima, i koriste se za bojanje bombona, jogurta, sladoleda, sokova, zamjena za meso, umaka i slično (Ceclu i Nistor, 2020).

U svim slučajevima, procesiranje cikle generira dostatnu količinu otpada kojeg, ovisno o situaciji, čine kora cikle, pulpa, komina, lišće i stabljike – što znači da se, uz znatno povećanje proizvodnje cikle, očekuje i znatno povećanje generiranja procesnog otpada i nusproizvoda. Pojedini nusproizvodi procesiranja cikle, kao što je njena kora, imaju značajan potencijal reciklaže i ponovnog korištenja u svrhu obogaćivanja pojedinih prehranbenih proizvoda.

## 2.2.2. Nusproizvodi prerade cikle

### 2.2.2.1. Kora cikle

Kora predstavlja neiskorišteni otpad koji nastaje gotovo svakim postupkom prerade cikle (poglavito prilikom minimalnog procesiranja), iako je dobrog nutritivnog sastava. Kora cikle sadrži ugrubo 2 – 33% vlakana, 4 – 18 % proteina, te 10 – 12% minerala (ovisno o ekstrakcijskoj tehnici), od kojih je najbogatija kalijem. U zadnje se vrijeme sve više istražuje njezin antioksidativni i općenito bioaktivni potencijal budući da je prepoznata kao bogata polifenolima i antioksidansima (Ceclu i Nistor, 2020; Shuaibu i sur., 2021). Istraživanje koje su proveli Zin i Bánvölgyi (2021) pokazuje kako se u kori cikle nalazi više betalaina, flavonoida, fenolnih spojeva i antioksidanasa nego u pulpi i stabljici cikle. Abdo i sur. (2020) valorizirali su nusproizvode prerade cikle te navode kako kora sadrži najviše betalaina i galne kiseline od ostalih nusproizvoda (komine, stabljike i lišća). Također priopćavaju kako kora sadrži više prehranbenih vlakana (2,6 %) od komine (1,97 %), stabljike (2 %) te lišća (2,15 %). Lazar i sur. (2022) ispitivali su sastav fitokemikalija, viskoznost, boju i teksturu majoneze s dodatkom kore cikle u različitim omjerima, te je dodatak kore rezultirao povećanjem antioksidativne aktivnosti, mekšom teksturom i boljom viskoznošću u odnosu na kontrolni uzorak majoneze (bez dodatka kore), a takve su majoneze bile i dobro senzorski ocijenjene. I dok kora cikle postaje predmetom sve mnogobrojnijih istraživanja

s ciljem dobivanja antioksidacijski bogatog ekstrakta, pregledom literature se ustanovilo kako ne postoje radovi koji valoriziraju i ekstrakcijski ostatak kore i njezinu potencijalnu primjenu, poglavito u smislu alternativne sirovine za prehrambena vlakna.

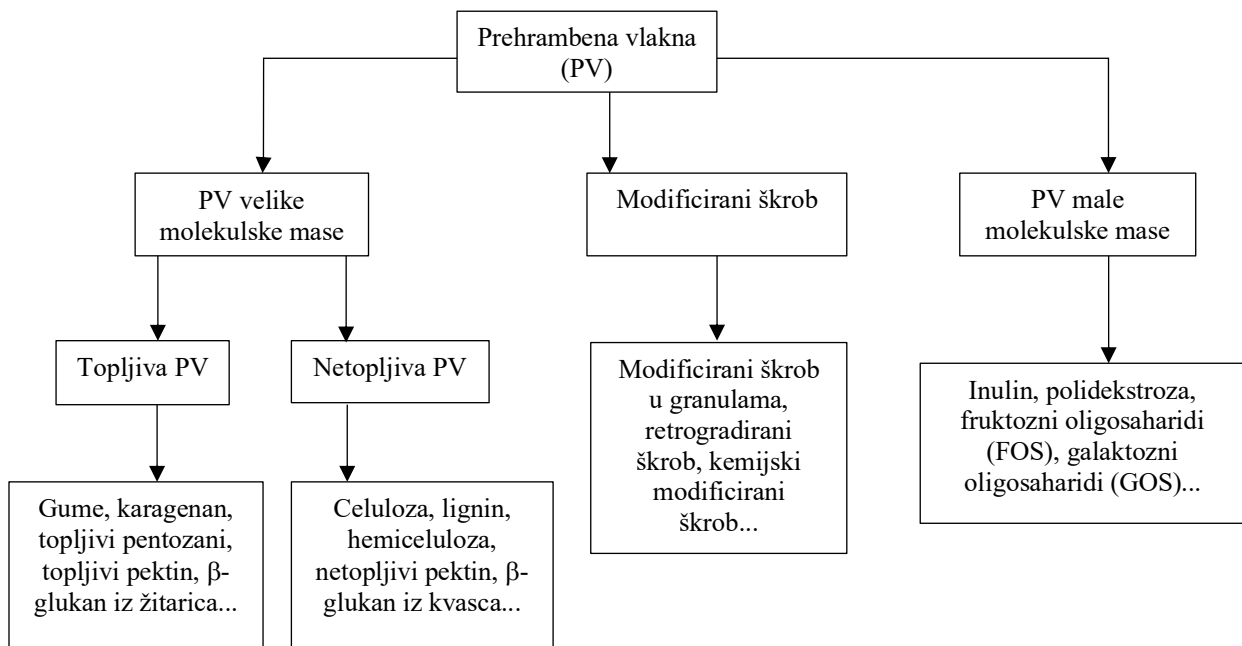
#### *2.2.2.2. Ostali nusproizvodi prerade cikla*

Osim same kore, nusproizvodi prerade cikla ovise o krajnjem proizvodu. Tako, primjerice, minimalno procesirana cikla za otpad najčešće ima (uz koru) lišće, ljuskice i stabljiku, a proizvodi poput soka, umaka te pirea i kominu cikla. Nusproizvodi prerade cikla, kao i sama cikla, smatraju se vrijednim izvorom važnih nutrijenata i bioaktivnih spojeva. Čak štoviše, lišće cikla bogatije je karotenoidima od pulpe, a uz stabljike sadrže i visoke koncentracije vitamina A, K i C. Nusproizvodi prerade su ujedno bogati pigmentima i vlaknima. U literaturi postoji nekoliko primjera valorizacije tih nusproizvoda. Kojdahova i sur. (2018) su u svom radu istraživali potencijal dodatka brašna sušene kome cikla pšeničnim kiflicama, pri čemu je dodano brašno (2 %) tijesto obogatilo vlaknima, ono je imalo dobra hidracijska svojstva i bilo produljene stabilnosti. Costa i sur. (2017) iz kore, ljusaka i stabljika cikla uspjeli su dobiti brašno visokog sadržaja vlakana, antioksidanasa i betalaina s visokim kapacitetom zadržavanja vlage i ulja, kao i bojilo prigodno za bojanje proizvoda srednjeg roka trajanja (20-ak dana). Fernando i sur. (2021) ultrazvučnom su ekstrakcijom uspjeli oporaviti znatne količine vlakana, polifenola i betalaina iz više različitih nusproizvoda prerade cikla (otpadci minimalnog procesiranja, otpadci prerade u sok), a Battistella Lasta i sur. (2019) su iz lišća i stabljika uspjeli ekstrahirati širok raspon bioaktivnih spojeva (poglavito ferulinske kiseline, viteksina i sinapaldehida) visokotlačnom ekstrakcijom.

### **2.3. PREHRAMBENA VLAKNA**

Prehrambena vlakna (PV) predstavljaju jedan od esencijalnih prehrambenih zahtjeva za ljudski organizam. U suštini, prehrambena vlakna su pojam koji se odnosi na skupinu sastojaka hrane koji, uslijed manjka odgovarajućih enzima u ljudskom probavnom sustavu, ostaju neprobavljeni duž većine gastrointestinalnog trakta (želudac i tanko crijevo). U debelo crijevo stižu gotovo nepromijenjeni, a ondje se probavljaju bakterijskom fermentacijom. Prehrambena vlakna obuhvaćaju tri velike podskupine vlakana: (i) prehrambena vlakna male molekulske mase, (ii)

prehrambena vlakna velike molekulske mase te (iii) modificirani škrob, no općeprihvaćena, pojednostavljena podjela vlakana jest na topljiva (najčešće pektini) i netopljiva (najčešće celulozna vlakna). Detaljniji prikaz podskupina PV nalazi se na shemi 1.



**Shema 1.** Skupine i podskupine prehrambenih vlakana (prema [Dietary Fibre Testing](#))

Prehrambena vlakna čine nezaobilazan dio svake pravilne i uravnotežene prehrane i igraju ključnu ulogu u održavanju zdravlja ljudskog organizma, budući da su benefiti koje unos namirnica bogatih prehrambenim vlaknima ima mnogobrojni i raznoliki. Naime, njihov redovit unos u organizam smanjuje rizik od raka debelog crijeva i raznih poremećaja probavnog trakta, kardiovaskularnih bolesti i srčanog udara, smanjuje razinu kolesterola u krvi i ojačava imunološki sustav. Također, prehrambena vlakna normaliziraju razinu šećera i inzulina u krvi čime pomažu u liječenju dijabetesa, te pospješuju probavu i potiču sitost čime potpomažu gubitak težine. Svaka od vrsta prehrambenih vlakana igra ulogu: primjerice, osnovno svojstvo topljivih vlakana kada uđu u crijeva je vezanje žučnih kiselina, blokiranje njihovog rada i smanjenje apsorpcije masti i kolesterola. Netopljiva vlakna pak na sebe vežu vodu, bubre i daju volumen sadržaju u crijevima, što potiče kretanje hrane kroz probavni sustav (Begum i Deka, 2020; Hussain i sur., 2020). Usprkos svim blagotvornim svojstvima koje vlakna imaju za ljude, prosječni europski građanin ne konzumira preporučeni dnevni unos vlakana, koji iznosi otprilike 35 g (ali je ovisan o dobi i spolu),

već tek 15 g, što je dvostruko manje (Khanpit i sur., 2021; WHO/AHPSR, 2020). Osim poticanja povećanog unosa namirnica prirodno bogatih prehrambenim vlaknima (poput lanenih sjemenki, badema, zobnih žitarica, leće), jedan od načina kojima se problem nedovoljnog unosa može riješiti jest obogaćivanje namirnica i dodatak vlakana različitim prehrambenim proizvodima. Posebno pogodnim proizvodima za obogaćivanje vlaknima smatraju se pekarski proizvodi i oni na bazi žitarica, poput keksa, tjestenina, kolača, peciva i različitih ekstrudiranih proizvoda, budući da im se u tom slučaju ne samo povećava sadržaj vlakana, već i smanjuje kalorijska vrijednost (Kojdahova i sur., 2018).

Osim u prehrani, prehrambena vlakna su i od velikog tehnološkog značaja za prehrambenu industriju. Utječu na funkcionalna svojstva hrane na način da povećavaju sposobnost zadržavanja vode i ulja, poboljšavaju stvaranje emulzija i pjena, modificiraju strukturu i produljuju rok trajanja hrane. Pektini su, primjerice, našli uobičajenu primjenu u prehrambenoj industriji kao tvari za želiranje, zgušnjivači i stabilizatori (Karaman i sur., 2017).

### 2.3.1. Analitičke metode za određivanje prehrambenih vlakana

Upravo sve poželjniji povećani unos vlakana kroz namirnice bogate prehrambenim vlaknima i proizvoda obogaćenim prehrambenim vlaknima stavlja naglasak na analitičke metode kojima će se ispravno i vjerodostojno iskazati njihov udio. Općenito, analitičke metode za određivanje prehrambenih vlakana mogu se podijeliti u 3 skupine: 1) gravimetrijske metode, 2) kolorimetrijske metode i 3) metode plinsko-tekućinske kromatografije. U gravimetrijskim metodama određivanja prehrambenih vlakana važe se netopljivi ostatak zaostao nakon enzimatskog ili kemijskog razaranja svih konstituenata uzorka koji nisu vlakna, uz dodatak alkohola (najčešće etanola) koji omogućava precipitaciju (u vodi) topljivih vlakana, bilo zajedno s netopljivim vlaknima ili zasebno. Kolorimetrijske metode određivanja prehrambenih vlakana kolorimetrijski određuju polisaharide. Prehrambena vlakna prvo je potrebno frakcionirati u ne-celulozne polisaharide, celulozu i lignin, a mjerenje heksoza, pentoza i uronskih kiselina temelji se na reakcijama stvaranja obojanih kompleksa (redosljedom) s antronom, orcinolom i karbazolom. Metode plinsko-tekućinske kromatografije uključuju enzimatsku razgradnju škroba uz odvajanje šećera male molekulske mase i produkata razgradnje škroba; kiselinsku hidrolizu slobodnih monomera, derivatizaciju (do hlapivih derivata), separaciju i kvantifikaciju neutralnih monomera, određivanje

uronskih kiselina te određivanje lignina kao kiselinski netopljivog ostatka. Najopširnije se informacije o količini kao i sastavu prehrambenih vlakana dobivaju metodama plinsko-tekućinske kromatografije, međutim te metode zahtijevaju i najveći utrošak vremena i materijala. Zbog relativne lakoće i brzine izvođenja i manjka potrebe za sofisticiranom opremom, za rutinske analize prehrambenih vlakana najčešće se koriste gravimetrijske metode (Asp, 1987; Wolters, 1992).

Jedna od temeljnih metoda za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana je službena enzimsko-gravimetrijska metoda Društva službenih analitičkih kemičara (eng. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC), AOAC 991.43. Ova je metoda određivanja prehrambenih vlakana ujedno korištena prilikom izrade ovog eksperimenta, pobliže je opisana u poglavlju 3.2.4., a odnosi se na određivanje ukupnih, topivih i netopivih prehrambenih vlakana velike molekulske mase. Metoda je prikladna za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana u žitaricama, voću, povrću te prehrambenim proizvodima od žitarica, voća i povrća. Međutim, ukoliko uzorak sadrži i prehrambena vlakna male molekulske mase, modificirani škrob ili prebiotike, prikladnije metode predstavljaju AOAC 2009.1 i AOAC 2011.25 koje obuhvaćaju određivanje grupa prehrambenih vlakana kao što je objašnjeno u tablici 2. U tom bi slučaju prisustvo spomenutih PV negativno utjecalo na određivanje sadržaja vlakana u uzorku izazivajući smetnje, uslijed neprikladnosti korištene metode, prilikom određivanja stvarnih vrijednosti.

**Tablica 2.** Grupe prehrambenih vlakana obuhvaćene pojedinom metodom određivanja

<i>Grupacija prehrambenih vlakana</i>	<i>Metoda</i>		
	AOAC 991.43	AOAC 2009.1	AOAC 2011.25
<i>Ukupna prehrambena vlakna</i>	X	X	X
<i>Netopiva PV velike molekulske mase</i>	X	X	X
<i>Topiva PV velike molekulske mase</i>	X	X	X
<i>Rezistentni škrob</i>		X	X
<i>PV male molekulske mase</i>		X	X
<i>Prebiotici</i>			X

### 2.3.2. Nusproizvodi procesiranja voća i povrća kao izvor prehrambenih vlakana

Zadnjih godina nusproizvodi procesiranja voća i povrća postaju sve popularniji nekonvencionalni izvori vlakana, budući da ih ima u izobilju, jeftini su i podcijenjene vrijednosti. Prehrambena vlakna dobivena iz ovih sirovina primarni su izvor pektina, celuloze, hemiceluloze, gumastih i sluzastih tvari. Međutim, često znaju biti i bogata polifenolima, flavonoidima i karotenoidima i kao takva biti konstituenti biljnog matriksa poznatog kao antioksidativna prehrambena vlakna (eng. *antioxidant dietary fiber*, ADF) (Tejada-Ortigoza i sur., 2016; Hussain i sur., 2020). Prehrambene industrije neprestano istražuju nove načine za dobivanje i ekstrakciju prehrambenih vlakana iz nedovoljno istraženih biljnih izvora kao što su lišće, kore, ljuske, sjemenke i pulpe voća i povrća. K tome, intenzivno se za ekstrakciju vlakana evaluiraju zelene tehnike poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja, mikrovalova, visokog hidrostatskog tlaka i slično (Hussain i sur., 2020).

## 2.4. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

### 2.4.1. Princip rada pulsirajućeg električnog polja

Tehnologija pulsirajućeg električnog polja (PEP) temelji na električnom tretmanu uzorka u izuzetno kratkom vremenskom periodu (od nekoliko nanosekundi do nekoliko milisekundi), s jačinom pulsa električnog polja od uglavnom 15-80 kV/cm. Obrada uzoraka (prehrambenih proizvoda) pulsirajućim električnim poljem dovodi do netoplinke elektroplazmolize staničnog sadržaja, koja uzrokuje povećanu permeabilnost stanične stijenke. Navedeni proces permeabilizacije (točnije, elektropermeabilizacije) izaziva povećanje električne provodnosti, koeficijenta mase i topline, difuzije, poroznosti, brzinu sušenja, pospješuje ekstrakciju staničnog sadržaja a smanjuje otpornost na stres biljnih tkiva kao i njihovu kompresibilnost.

Glavnim učincima pulsirajućeg električnog polja na biološke stanice smatraju se raspad stanične membrane i njene lokalne strukturalne promjene, budući da je ona jedna od važnijih strukturalnih komponenti biljne stanice i odgovorna je za prijenos mase, a potpomaže i sintezu nukleinskih kiselina, proteina i drugih kompleksnih staničnih metabolita. Kako se između slojeva stanične stijenke nalazi lipidno-proteinski međusloj, do njene rupture pa posljedično i razaranja

dolazi tako da se navedeni međusloj električnim pulsovima destabilizira i postaje propustan za manje molekule. One (uz vodu) potom ulaze u stijenku i stanicu, ona bubri i na kraju dolazi do njene lezije i inaktiviranog stanja. Naime, kad nastali potencijal prijeđe kritičnu voltažu (otprilike 1 V, no to je ovisno o debljini stanične stijenke, kompresibilnosti i propusnosti), elektrokompresivna sila izaziva dielektričnu rupturu membrane na način da inducira stvaranje pora, koje se ponašaju kao provodljivi kanali. Taj se fenomen naziva dielektrični (elektromehanički) raspad, a može biti reverzibilan i ireverzibilan. Raspad je reverzibilan ukoliko su, u odnosu na ukupnu površinu membrane, stvorene pore male. Te će se pore nakon određenog vremena ponovno zatvoriti. No, kada dođe do ponovnog zatvaranja pora, provodljivost membrane je u velikoj mjeri narušena, kao i njezin fenomen prijenosa. Intenzitet te promjene, naravno, ovisi o intenzitetu i vremenu trajanja tretmana, snazi električnog polja, kao i o svojstvima tretiranog uzorka. Ukoliko se intenzitet tretmana poveća, sukladno s povećanjem snage električnog polja, nastajat će sve veće pore i reverzibilan dielektrični raspad postat će ireverzibilan (Barba i sur., 2015).

Dobiveni učinci i reverzibilnog i ireverzibilnog elektromehaničkog raspada stanične membrane imaju mnoge primjene u prehrambenoj industriji, poglavito jer se smatra kako ne mijenjaju senzorska svojstva hrane te ne denaturiraju bjelančevine i većinu enzima povezanih s kvalitetom materije. Do sad opisani slučajevi upotrebe PEP-a pri konzerviranju i procesiranju hrane prikazani su u idućem poglavlju.

#### 2.4.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja u prehrambenoj industriji

Primjena PEP-a u prehrambenoj industriji zadnjih je desetljeća privukla znatnu pozornost budući da kao nekonvencionalna tehnologija ima mnoge prednosti u obradi hrane pred konvencionalnima, kao što su: 1) povećan prijenos mase; 2) poboljšani prinos ekstrakcije; 3) smanjeno vrijeme procesiranja; 4) smanjeni intenzitet uobičajenih parametara ekstrakcije (tj. temperatura ekstrakcije, koncentracija otapala); 5) smanjenje razgradnje spojeva osjetljivih na toplinu (npr. aroma, proteina); 6) smanjenje troškova energije i utjecaja na okoliš (Barba i sur., 2015). PEP je poglavito često korišten zbog poboljšanja prinosa ekstrakcije poželjnih komponenti iz različitih prirodnih materija. Pregled postojeće literature donosi spoznaje o uspješnoj ekstrakciji šećera iz šećerne repe, betalaina iz cikle, inulina iz cikoriје, antocijana iz crvenog kupusa, polifenola iz svježih listova čaja i mnogih drugih (Barba i sur., 2015).

Eksperimentalni rad iz mnogih laboratorijskih pokusa također je pokazao kako predtretman PEP-om prije prešanja ili kombinacija PEP-a s prešanjem omogućuje značajno povećanje prinosa i kvalitete soka. Ispitivani uzorci bili su citrusi (limun, grejp i naranča s korom) (Kantar i sur., 2018), borovnica (Bobinaité i sur., 2018), jabuka, mrkva, lubenica (Salehi, 2020), šećerna repa, krumpir, gljive (Barba i sur., 2015) i mnogi drugi. Često su se potom, iz nusproizvoda takve ekstrakcije soka (najčešće komina voća i povrća), također uspješno ekstrahirali bioaktivni spojevi (poput antioksidanasa). PEP je pokazao znatne prednosti i u procesima sušenja (grožđice, kivi, jabuka) i zamrzavanja prehrambenih proizvoda (krumpir, jabuka, mrkva, govedina), kao i poboljšanju njihove mikrobiološke stabilnosti (napitci na bazi mlijeka i voćnih sokova, voćni sokovi, vino, tekući proizvodi na bazi jaja) (Barba i sur., 2015). Dakle, tretman pulsirajućim električnim poljem doprinosi strukturnim modifikacijama čvrstih uzoraka (hrane) koje posljedično dovode željenim modifikacijama u strukturi ili poboljšanim prinosima ekstrakcije, ovisno o primijenjenom tretmanu i željenom ishodu.

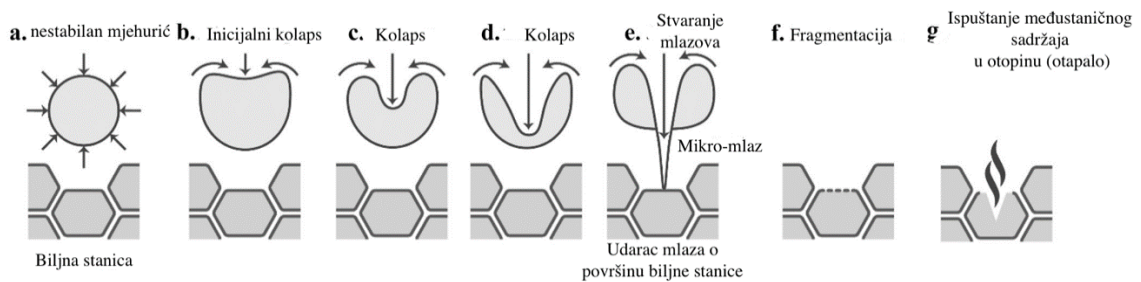
## 2.5. ULTRAZVUK

### 2.5.1. Princip rada ultrazvuka

Primjena ultrazvuka kroz tekući medij najčešća je i koristi se u prehrambenoj industriji. Kada ultrazvučni valovi prolaze kroz medij, pojavljuje se fenomen akustične kavitacije - što je rezultat interakcije između tih valova, tekućine i otopljenog plina. Kavitacija odgovara prvom rastu mjehurića mikro-veličine u tekućini, nakon čega slijedi njihov nasilni kolaps kada dosegnu kritičnu veličinu i posljedično, postanu nestabilni. Takva mikroskopska implozija rezultira visokom turbulencijom, kao i oslobađanjem toplinske energije, stvarajući okruženje vrlo visoke temperature (5000 K) i tlaka (50-100 atm). Mjesta na kojima je došlo do implozije nazivaju se *žarišnim točkama*, a također su mjesta značajno povećane kemijske reaktivnosti. Visoko-temperaturni uvjeti koji nastaju mogu dovesti do stvaranja radikalnih kemijskih vrsta, koje su vrlo reaktivne i mogu imati veliki učinak na ostatak vrsta u otopini, bilo biološkim ili kemijskim. Štoviše, ako je došlo do implozije blizu čvrste površine ili na njoj, generiraju se brzi mlazovi tekućina. Oni stvaraju oštećenja od udarnih valova što može rezultirati fragmentacijom materijala i lokaliziranom erozijom (Gomez-Plaza i sur., 2022). Slika 1 prikazuje ilustraciju fragmentacije biljnog materijala uzrokovanu implozijom kavitacijskog mjehurića (Martinez-Solano i sur., 2020). Ultrazvuk se



općenito dijeli na ultrazvuk visoke frekvencije i male snage, te ultrazvuk visoke snage (i niske frekvencije). Visokofrekventni ultrazvuk, uslijed niske snage i intenziteta, ne proizvodi nikakve promjene u molekularnoj strukturi. Kao takav se najviše koristi kao mjerna i analitička tehnika pružajući informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima hrane. Ultrazvuk visoke snage, s druge strane, inducira snažne turbulencije i uzrokuje oslobađanje toplinske energije u sustavu te se stoga primjenjuje za modifikaciju fizičkih i kemijskih svojstava prehrambenih proizvoda, a posebnu je pažnju stekao kao alternativna tehnika ekstrakcije (Gomez-Plaza i sur., 2022).



**Slika 1.** Fragmentacija biljne stanice uzrokovana implozijom kavitacijskog mjehurića (preuzeto iz Martinez-Solano i sur., 2020)

### 2.5.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke snage kao zelena tehnika ekstrakcije

Najčešći načini provođenja procesa ekstrakcije do danas još su uvijek konvencionalne metode i tehnike poput maceracije i digestije (najčešće se radi o tipu ekstrakcije kruto-tekuće), no one zbog same prirode procesa imaju mnoge nedostatke. Kako bi ekstrakcija željene komponente iz uzorka uopće bila moguća, prvo je potrebno razoriti staničnu stijenku, a potom se komponente oslobađaju iz kompleksnih matriksa u (najčešće tekući) ekstrakt, koji kasnije zahtjeva dodatnu obradu poput pročišćavanja. Razaranje stanične stijenke provodi se ili mehanički (primjerice drobljenjem), ili kemijskim tretmanom, ili toplinski – a takvi tretmani često oštećuju ekstrahirani uzorak i smanjuju njegovu kvalitetu. Nadalje, konvencionalne metode ekstrakcije zahtijevaju korištenje velikog volumena organskih otapala (često toksičnih), dugotrajna su, energetski zahtjevna i smanjenog prinosa željenog konačnog proizvoda, te nerijetko toksično djeluju na okoliš (kemijsko i toplinsko onečišćenje). Kako bi se opisani nedostaci klasičnih metoda nadišli, u zadnje vrijeme razvijaju se tehnike tzv. zelene ekstrakcije, koje označuju procese koji zahtijevaju smanjenu uporabu spomenutih otapala ili koriste „zelena“ otapala poput deionizirane ili

superkritične vode, zahtijevaju niže procesne temperature, vrijeme trajanja procesa ekstrakcije je skraćeno, što u kombinaciji s optimiziranim parametrima procesa dovodi i ka manjoj potrošnji energije a povećanom prinosu, te su smanjenog štetnog utjecaja na okoliš. Jedna od tehnika zelene ekstrakcije svakako je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UZV), odnosno ultrazvučna ekstrakcija. Utjecaji akustične kavitacije uzorkovane ultrazvučnim valovima na tretirani matriks značajno olakšavaju razbijanje staničnih stijenki i povećavaju prijenos mase i topline, što omogućuje olakšanu diseminaciju odnosno prijelaz željenih komponenti u ekstrakcijsko otapalo, što rezultira i većim prinosom ekstrakcije. Ultrazvučni valovi i njegovi sistemski učinci mijenjaju strukturu stanične materije induciranjem fragmentacije, erozije, te naprezanja i deteksturizacije tkiva, kao i poticanjem redoks reakcija sustava. Postoje mnoga provedena istraživanja koja su efikasnost ultrazvučne ekstrakcije ponajprije biljnih metabolita pripisala upravo navedenim mehanizmima, poput ekstrakcije klorofila iz špinata, polifenola iz komine jabuka, antioksidanasa i pigmenata (betalaina) iz komine cikle, ulja iz sjemenki kima i ulja iz stanica svježeg kvasca (*Yarrowia Lipolityca*). Nadalje, kako se temperatura reakcijskog sustava održava ispod kritične (50 °C), tretman ultrazvukom smatra se netermalnom metodom izrazito pogodnom za ekstrakciju i očuvanje vrijednih termolabilnih spojeva u ekstraktu uzorka (poput vitamina) (Fernando i sur., 2021; Bouchez i sur., 2020; Wen i sur., 2019; Chemat i sur., 2017).

#### 2.5.2.1. Čimbenici koji utječu na prinos ultrazvučne ekstrakcije biljnih metabolita

*Otapalo.* Smjese alkohola ili acetona u raznim omjerima i deionizirane vode predstavljaju najčešće korištena otapala u ekstrakciji biljnih metabolita, posebice fenola. Najširu spomenutu upotrebu ima etanol budući da je utvrđeno kako ima najveći afinitet za metabolite, financijski je pristupačan, podrijetlom iz obnovljivih izvora (šećerna trska) i ima GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) status. Iako je cilj zelenih tehnika ekstrakcije eliminirati upotrebu organskih otapala, udio etanola u otapalu je jedan od najvažnijih čimbenika prinosa UZV ekstrakcije, i do sad se optimizacijom njenih parametara uspjela postići jedino redukcija njegovog volumena u otapalu (Kumar i sur., 2021).

*Temperatura.* Porast temperature reakcijske smjese povećava brzinu desorpcije i topljivost otopljene tvari, kao što i smanjuje viskoznost otapala čime se povećava njegova difuzija u matriks ciljanog tkiva. Međutim, mnogim je provedenim eksperimentima ustvrđeno kako optimalna

temperatura ekstrakcije iznosi 30 – 50 °C. Temperatura iznad 50 °C uzrokuje smanjenje prinosa ekstrakcije zbog oslabljenog učinka kavitacije: povećanjem kinetičke energije brže nastaje više kavitacijskih mjehurića, no oni slabije implodiraju, čime je i ekstrakcijski učinak manji. Ova se pojava posebice uočila prilikom ekstrakcije fenola, flavonoida, i prehrambenih vlakana (pektina i različitih polisaharida) iz različitih biljnih matriksa (Martinez-Solano i sur., 2020).

*Snaga ultrazvuka.* Snaga ultrazvuka primijenjena na tretirani medij često je izražena i kao njegova amplituda. Amplituda se izražava u postocima u vrijednostima od 0 do 100, i ukoliko je određenom ultrazvučnom uređaju amplituda na 100 %, vrijednost postignute snage pri toj amplitudi jednaka je maksimalnoj snazi koju uređaj općenito može postići (Kumar i sur., 2021). Za ekstrakciju biljnih metabolita u dosadašnjim se istraživanjima koristila ultrazvučna snaga 20 – 700 W, no odabir UZV snage (istoznačno i amplitude) ovisi o tipu ciljane molekule. Prinos ekstrakcije se povećava kako se povećava snaga ultrazvuka, što je objašnjeno stvaranjem kavitacijskih mjehurića veličine i implozivne snage koja odgovara ultrazvučnim valovima. Međutim, ukoliko se snaga ultrazvuka poveća previše, to će dovesti do porasta broja nastalih kavitacijskih mjehurića koji će ujedno biti i većeg volumena. Kad su mjehurići velikog volumena, može doći do njihove međusobne kolizije, deformacije ili kolapsa koji nije sferične prirode što utječe na jačinu implozije. Dakle, snaga ultrazvuka ima značajan utjecaj na prinos ekstrakcije, no ima i svoj vrhunac nakon kojeg se prinos smanjuje, što je potrebno eksperimentalno ustvrditi za pojedinačnu ciljanu molekulu.

### 2.5.3. Ultrazvuk visoke snage i prehrambena vlakna

#### 2.5.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija vlakana

Prehrambena su vlakna tradicionalno ekstrahirana metodama toplinske (vruća voda ili para), kemijske (uporabom raznih lužina i kiselina, kelata i slično) te enzimske ekstrakcije (celulaze, pektinaze i srodnih). Međutim, takve tehnike imaju mnogo lošeg utjecaja na prehrambena vlakna (primjerice razgradnja, odnosno hidroliza pektina), ponajprije zbog primjene visokih temperatura i dugog vremena tretiranja. Ultrazvuk visoke snage već je dulje vrijeme predmet mnogobrojnih istraživanja kao alternativna, zelena tehnika ekstrakcije prehrambenih vlakana koja pri blažim uvjetima procesiranja ima veće prinose PV od klasičnih metoda ekstrakcije (Martinez–Solano i sur., 2020; Wen i sur., 2019). Sažet prikaz parametara kojima se u pojedinim istraživanjima dobio maksimalni iznos PV dan je u tablici 3. Ipak, većina ekstrahiranih PV pripada

grupi (specifičnih) topljivih PV, što ostavlja za mogućnost neiskorišteni potencijal ekstrakcijskog ostatka sa zaostalim topljivim kao i netopljivim vlaknima.

**Tablica 3.** Parametri UZV s maksimalnim iznosom PV za pojedine namirnice i nusproizvode njihove prerade

Sirovina	Ekstrakt	P (W)	t (min)	T (°C)	Otapalo	Prinos vlakana (%)	Literatura
<b>Kukuruzna svila</b>	Polisaharidi	250	17	56	Voda	6	Martinez–Solano i sur. (2020)
<b>Bundeva (<i>Cucurbita moschata</i>)</b>	Polisaharidi	70	23	70	Voda	16	
<b>Komina grožđa</b>	Pektin	140	60	75	Limunska kiselina	32,4	
<b>Kora šipka</b>	Pektin	130	28	62	Voda	23,9	
<b>List duda</b>	Polisaharidi	60	20	60	Voda	10,8	
<b>Sjemenke grožđa, naranče i grejpa</b>	Ukupna PV	280	20	40*	Voda	80 – 90	Karaman i sur. (2017)

\*maksimalna postignuta temperatura prilikom izvođenja ekstrakcije  
P – snaga; t – vrijeme; T - temperatura

Pregledom literature uočeno je kako ne postoji mnogo eksperimentalnih radova s ciljem utvrđivanja maksimalnog prinosa vlakana pri blažim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije od onih navedenih u tablici X ( $t \leq 10$  min,  $T < 50$  °C,  $P < 150$  W).

### 2.5.3.2. Učinak ultrazvuka visoke snage na modifikaciju prehrambenih vlakana

Ultrazvuk visoke snage se, zbog fenomena kavitacije, često koristi za degradaciju polimera (mehanička i kemijska degradacija zajedno), odnosno modifikaciju strukture prehrambenih vlakana. Funkcionalnost je uvjetovana strukturom, a UZV ima potencijal modificirati trodimenzionalnu strukturu, molekulsku težinu i pobočne lance monomera (od kojih su građeni polimerni lanci). Primjerice, smanjenje molekulske težine polimera izaziva njihovo bubrenje, povećano upijanje otapala i proširenje pora u materijalima. To za posljedicu ima veću propusnost polimera i povećanu topljivost u vodi, čime se poboljšava njihova bioraspoloživost (Martinez-Solano i sur., 2020). Welte-Chanes i sur. (2020) tako opisuju povećanje poroznosti netopivih prehrambenih vlakana češnjaka tretiranog ultrazvukom, kao i porast udjela esencijalnih aminokiselina i elemenata u tragovima, povećanu toplinsku stabilnost te sposobnost zadržavanja vode i ulja u topivim prehrambenim vlaknima ultrazvučno tretiranih nusproizvoda prerade voća.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kora cikle

Cikla, a shodno tome i kora cikle odvojena od pulpe, dobivena je od strane obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva u Suhopolju, Hrvatska. Na kori cikle se, prije podvrgavanja ikakvim tretmanima, provela inicijalna analiza kako bi se ustvrdio sastav njenih nutrijenata čiji su rezultati prikazani u tablici 4.

**Tablica 4.** Inicijalna analiza kore cikle

<b>Parametar</b>	<b>Rezultat (g / 100 g)</b>
Masti	< 0,5
Od kojih zasićene masne kiseline	< 0,1
Ugljikohidrati	8,50
Od kojih ukupni šećeri	8,30
Vlakna	4,82
Proteini	1,98
Sol	0,07
Vlaga	83,58
Pepeo	1,12

##### 3.1.1.1. Označavanje uzorka cikle

Za svaku od metoda ekstrakcije, odnosno za ultrazvučnu kao i za klasičnu toplinsku ekstrakciju, pripremljeno je 27 uzoraka, označenih kao što je prikazano u tablici 5. Brojčane su oznake uzorku nasumično dodijeljene programom STATGRAPHICS Centurion prilikom dizajniranja eksperimenta, a svaki broj označava različite vrijednosti parametara vremena tretiranja, udjela etanola u otapalu i amplitude za ultrazvučno ekstrahirane uzorke, odnosno vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu za klasično, toplinski ekstrahirane uzorke. Detaljan prikaz parametara ovisno o uzorku obrađen je u poglavlju 3.2. i može se pronaći u tablicama 6 i 7.

**Tablica 5.** Način označavanja uzoraka ovisno o metodi ekstrakcije

<i>Metoda ekstrakcije</i>	<i>Oznaka uzoraka</i>
Ultrazvučna ekstrakcija	CU1 – 27
Klasična toplinska ekstrakcija	CK1 – 27

### 3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Aceton (Lachner, Zagreb, Hrvatska)
2. Bakrov (II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) (Lachner, Zagreb, Hrvatska)
3. Borna kiselina (Lachner, Zagreb, Hrvatska)
4. Celit (Neogen, Michigan, USA)
5. Deionizirana voda (Eurofins Croatiakontrola d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
6. Etanol (96%) (Lachner, Zagreb, Hrvatska)
7. Klorovodična kiselina 36,5% ( $\rho = 1,18 \text{ g/ml}$ ) (HCl) (Lachner, Zagreb, Hrvatska)
8. Kalijev sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
9. Koncentrirana sumporna kiselina ( $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$ ) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Lachner, Zagreb, Hrvatska)

10. Indikatori: bromkrezol zeleno i metilno crvenilo

Priprema: *bromkrezol zeleno*: otopiti 200 mg bromkrezol zelenog u 100 ml etanola.

*Metilno crvenilo*: otopiti 200 mg metilnog crvenila u 100 ml etanola.

11. Otopina borne kiseline (4%-tna)

Priprema: 80 g borne kiseline otopi se u 1,7 l deionizirane vode u odmjernoj tikvici.

Potom se u tikvicu doda 14 ml metilnog crvenila, pa bromkrezol zeleno bojila, nadopuni se vodom do oznake i promiješa.

12. Otopina 0,56 M HCl

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 l doda se 94,68 ml 36,5 %-tnog HCl-a i 750 ml deionizirane vode. Sadržaj tikvice se promiješa te se nadopuni vodom do oznake.

13. Otopina 6 M HCl

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 l doda se 100 ml deionizirane vode, a zatim se pažljivo doda i 507,36 ml klorovodične kiseline (36,5%). Otopina u tikvici se promiješa te nadopuni vodom do oznake.

#### 14. Otopina 6 M NaOH

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L odvažuje se 240 g NaOH, nadopuni vodom do oznake i promiješa.

#### 15. MES/TRIS pufer 0,05 M

Priprema: u 1,7 l vode potrebno je otopiti 19,52 g MES (2 [N-morfolin] etansulfatna kiselina) i 12,2 g TRIS (3 [hidroksimetil] aminometan). Potom se pH otopine pri 24 °C podešava uporabom otopinom 6 M NaOH, te doda vode do volumena od 2 l.

#### 16. Megazyme TDF Assay Kit (Neogen, Michigan, USA)

##### 16.1. Termostabilna $\alpha$ -amilaza

##### 16.2. Proteaza

##### 16.3. Amiloglukozidaza

#### 17. Standardna otopina sumporne kiseline za titraciju (0,05 M)

Priprema: za pripremu 10 l standardne otopine u prikladnu bocu ulije se 5 l deionizirane vode, doda 30 ml koncentrirane sumporne kiseline, promiješa i nadopuni s još 5 l vode.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Aparatura

1. Analitička vaga
2. Aparat za destilaciju vodenom parom Kjeltex™ 8200 (Foss, Hilleroed, Danska)
3. Blok za spaljivanje
4. Kriogeni mlin (Stephan, Hameln, Njemačka)
5. Mlin s noževima GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Haan, Njemačka)
6. Mufolna peć (Inkolab, Zagreb, Hrvatska)
7. pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
8. Sušionik (Inkolab, Zagreb, Hrvatska)
9. Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem (Bandelin, Berlin, Njemačka)
10. Ultrazvučni aparat Q700CA Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
11. Vakuum pumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
12. Vodena kupelj (Inkolab, Zagreb, Hrvatska)

### 3.1.3.2. Pribor

1. Aluminijska folija
2. Automatske pipete (100  $\mu$ l, 10 ml)
3. Bireta
4. Büchnerov lijevak
5. Celulozni filter papir
6. Erlenmeyerove tikvice (300 ml, 400 ml)
7. Eksikator
8. Kjedadlove epruvete
9. Laboratorijska žlica
10. Laboratorijske staklene čaše (250 ml)
11. Lončići za filtriranje Gooch Filter Crucibles (Duran, Wertheim, Njemačka)
12. Menzura (100 ml)
13. Odsisna boca
14. Plastične epruvete (Falcon) (50 ml)
15. Plastična posuda
16. Plastične čašice s poklopcem (100 ml)
17. Staklena laboratorijska boca (1000 ml)
18. Stakleni lijevci
19. Stalak za epruvete
20. Špatula
21. Termometar

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema uzorka za ekstrakciju

Uzorak kore cikle stigao je prethodno obrađen pulsirajućim električnim poljem, grubo usitnjen, te zamrznut, i kao takav se držao do početka eksperimenta. Obrada cikle PEP-om rezultirala je jednostavnijim i uspješnijim odvajanjem kore od pulpe cikle, što je uvelike olakšalo proces pripreme uzorka budući da nije bilo potrebno dodatno čistiti zaostatke pulpe s kore kako je nije bilo u velikim količinama. Prije početka provođenja ekstrakcija, uzorak je 80% odmrznut i



fino usitnjen prvo na većem, kriogenom mlinu po dvije minute pri brzinama 1, 2, i 3, a potom i na manjem Retsch mlinu s noževima i HIT (4000 o/min, 20 s) i CUT (2000 o/min, 30 s) programom kako bi se osigurala fina meljava, ali ne i čestice premalih promjera koje bi otežale ekstrakciju.

### 3.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Prvi dio eksperimenta obuhvaćao je ultrazvučnu ekstrakciju metabolita iz cikla s ciljem ispitivanja ekstrakcijskog ostatka na sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana uz uporabu triju različitih otapala: deionizirane vode, smjese deionizirane vode i 96%-tnog etanola (EtOH) u omjeru 75/25 (25 %-tna otopina etanola) te iste u omjeru 50/50 (50 %-tna otopina etanola). Ekstrakcija se odvijala u ultrazvučnoj kupelji DT 100 H (20 kHz) uz sondu promjera 12 mm, a uzorci su se tretirali pri različitim vrijednostima amplitude (50, 75, 100 %) i različitog vremena trajanja (3, 6 i 9 min). Srednja vrijednost ultrazvučne snage za sve uzorke tretirane vodom kao otapalom iznosila je 75 W, a za uzorke tretirane smjesom etanola i vode kao otapala 90 W. Prikaz parametara ekstrakcije ovisno o uzorku i korištenom otapalu nalazi se u tablici 6. Ekstrakcija svakog pojedinog uzorka odrađena je u paraleli.

**Tablica 6.** Parametri ultrazvučne ekstrakcije

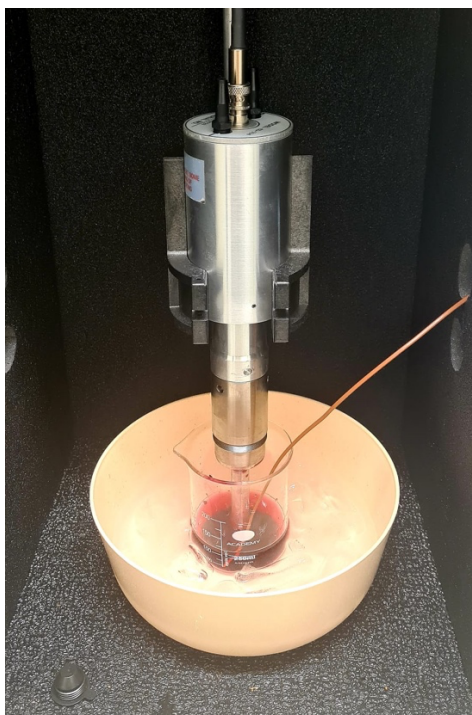
Uzorak	Otapalo	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)
CU1	Deionizirana voda	75	3
CU2		100	9
CU4		50	3
CU5		100	3
CU6		50	9
CU11		50	6
CU17		75	6
CU22		100	6
CU26		75	9
CU7		25 % EtOH	100
CU9	50		3
CU10	100		9

**Tablica 6.** Parametri ultrazvučne ekstrakcije - *nastavak*

CU13		50	6
CU14		75	3
CU16		75	9
CU18		50	9
CU20		100	6
CU21		75	6
CU3		50 % EtOH	100
CU8	100		3
CU12	100		9
CU15	50		9
CU19	50		6
CU23	50		3
CU24	75		3
CU25	75		9
CU27	75		6

### 3.2.2.1. Postupak provođenja ultrazvučne ekstrakcije

5 g usitnjenog uzorka s točnošću  $\pm 0,1000$  g odvaži se, na analitičkoj vagi, u laboratorijsku čašu od 250 ml te se, ovisno u uzorku, doda 100 ml odgovarajućeg otapala. Laboratorijska se čaša potom stavi u plastičnu posudu napunjenu ledom i vodom kako se uslijed oslobađanja energije i topline prilikom procesa temperatura ne bi povisila iznad 50 °C i uzorak pregrijao, pogotovo u slučaju korištenja otopine 50% etanola (EtOH) kao otapala. Tako pripremljeni uzorak se smješta u kućište uređaja, koje služi za izolaciju buke koja nastaje prilikom procesa obrade ultrazvukom. Potom se u sredinu laboratorijske čaše podešava ultrazvučna sonda, koja mora biti namještena dovoljno daleko od dna i uronjena u tekućinu oko 2,4 cm. Kako bi se tijekom procesa ekstrakcije mogla mjeriti temperatura sustava, u laboratorijsku čašu smješta se i termočlanak. Termočlanak ne bi trebao dodirivati niti ultrazvučnu sondu, niti stijenke čaše. Potom se kućište zatvara kako bi bilo izolirano, a na kontrolni LCD monitor se upisuju procesni parametri koji odgovaraju pojedinom uzorku prikazani u tablici 6. Nakon potrebnog podešavanja sustav se pokreće i započinje ekstrakcija.



**Slika 2.** Uzorak kore cikle postavljen u kućište ultrazvučnog aparata (*vlastita fotografija*)

Svakih 15 sekundi tijekom trajanja ekstrakcije pojedinog uzorka bilježene su vrijednosti temperature, snage i energije prikazane na kontrolnom LCD monitoru. Ukupna promjena energije u određenom vremenskom intervalu, tj. ukupna snaga (W) izračunata je sljedećom jednačinom:

$$P_{uk} = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{t} \quad [1]$$

u kojoj je je  $P_{uk}$  ukupna promjena energije u vremenskom intervalu (snaga) (W),  $m$  masa tretiranog uzorka (kora cikle i otapalo) (g),  $c_p$  specifični toplinski kapacitet kore cikle ( $\text{J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $dT$  promjena temperature u intervalu od 15 sekundi ( $^\circ\text{C}$ ) i  $t$  vrijeme (s).

Specifični toplinski kapacitet kore cikle izračunat je prema jednačini:

$$c_p = x_v \cdot c_{p,v} + x_{uh} \cdot c_{p,uh} + x_b \cdot c_{b,p} + x_m \cdot c_{p,m} + x_a \cdot c_{p,a} \quad [2]$$

u kojoj je  $c_p$  specifični toplinski kapacitet kore cikle ( $\text{J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $x_n$  udio pojedine komponente kore cikle (voda, ugljikohidrati, bjelančevine, masti, pepeo), a  $c_{p,n}$  specifični toplinski kapacitet pojedine komponente (voda, ugljikohidrati, bjelančevine masti, pepeo) ( $\text{J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ).

Korištenjem izračunatih vrijednosti ukupne promjene energije, dobivene su vrijednosti gustoće snage ( $\text{W cm}^{-3}$ ) obzirom na volumen tretiranog uzorka (100 ml) i gustoće snage ( $\text{W cm}^{-2}$ ) obzirom na površinu vrha ultrazvučne sonde ( $113,0973 \text{ mm}^2$ ), odnosno vrijednosti intenziteta ultrazvuka.

Po završetku ekstrakcije, uzorci se filtriraju kroz Büchnerov lijevak postavljen na odsisnu bocu i spojen na vakuum pumpu. Dobiveni filtrat (ekstrakt) odvaja se za odvojeno istraživanje, a filtracijski – kao i ekstrakcijski ostatak – kora cikle se dalje ispituje na vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana.

### 3.2.3. Klasična toplinska ekstrakcija

5 g usitnjenog uzorka s točnošću  $\pm 0,1000 \text{ g}$  odvaži se, na analitičkoj vagi, u Erlenmeyerovu tikvicu od 400 ml te se, ovisno u uzorku, doda 100 ml odgovarajućeg otapala. Potom se tikvica pokriva aluminijskom folijom i smješta u vodenu kupelj na vrijeme definirano eksperimentalnim dizajnom, kao što je opisano u tablici 7. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se odvaja od ekstrakcijskog ostatka na isti način kao i kod ultrazvučne ekstrakcije. Ekstrakcija svakog uzorka izvodi se u paraleli.

**Tablica 7.** Parametri konvencionalne toplinske ekstrakcije

Uzorak			Otapalo	Vrijeme (min)
CK1	CK4	CK5	Deionizirana voda	3
CK11	CK17	CK22		6
CK2	CK6	CK26		9
CK7	CK9	CK14	25 % EtOH	3
CK13	CK20	CK21		6
CK10	CK16	CK18		9

**Tablica 7.** Parametri konvencionalne toplinske ekstrakcije - nastavak

CK8	CK23	CK24	50 % EtOH	3
CK3	CK19	CK27		6
CK12	CK15	CK25		9

### 3.2.4. Određivanje prehrambenih vlakana

#### 3.2.4.1. Princip određivanja ukupnih prehrambenih vlakana

Ukupna prehrambena vlakna određena su prema metodi AOAC 991.43, na način da se uzorak tretira termostabilnom  $\alpha$ -amilazom koja hidrolizira škrob, proteazom kako bi se uklonile bjelančevine te amiloglukozidazom kako bi se uklonio ostatak škroba. Topljiva se prehrambena vlakna talože dodatkom etanola. Uzorak se potom filtrira i ispire prvo etanolom, pa zatim acetonom. Ostatak na filter lončiću se osuši i izvaže. Izvode se dvije paralelne probe, od kojih se u jednoj odredi sadržaj proteina, a u drugoj pepeo. Izračun ukupnih prehrambenih vlakana vrši se korekcijom dobivenih vrijednosti bjelančevina i pepela, kao i slijepe probe koja se radi prilikom određivanja svakog uzorka. Mjerna nesigurnost ove metode, izvođene prema metodi AOAC 991.43, iznosi 4,8 %. Metoda je validirana i akreditirana.

#### 3.2.4.2. Priprema uzorka za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana

Uzorak se za određivanje UPV priprema sušenjem. Metalna laboratorijska posudica se izvaže (uz zapis odvage  $m_1$ ) i u nju se izvaže 10 g uzorka uz zapis točne odvage ( $m_0$ ). Uzorak se suši, 16 h ili preko noći, u sušioniku na 103 °C. Potom se ohladi u eksikatoru i izvaže, te se zabilježi masa posudice s uzorkom nakon sušenja ( $m_2$ ). Dobivene vrijednosti koriste se za izračun faktora gubitka mase, odnosno faktora preračuna (FP), prema jednadžbi 3 (kako bi se konačan rezultat odredio na masi početnog uzorka, a ne suhu tvar):

$$FP = \frac{m_2 - m_0}{m_1}$$

[3]

Gdje je FP faktor preračuna (-),  $m_2$  masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g),  $m_0$  masa odvage uzorka (g) i  $m_1$  masa laboratorijske posudice (g). Budući da su inicijalnom analizom kore utvrđene

niske vrijednosti masti i šećera (kao što je prikazano u tablici 4), uzorak nije bilo potrebno odmastiti, kao ni odšećeriti. U suprotnome bi se spomenute procedure trebale vršiti sukladno opisanim metodama u AOAC 991.43.

#### *3.2.4.3. Priprema filtracijskih lončića s celitom*

Oprani i osušeni filtracijski lončići spaljuju se 5 h pri 525 °C kako bi se uklonile sve eventualne zaostale nečistoće. Nakon spaljivanja lončić se hladi u eksikatoru, te se u njega izvaže 1,0 g celita. Lončić s celitom potom se suši 16 h ili preko noći u sušioniku na 103 °C. Nakon sušenja, lončić s celitom se cca 1 h hladi u eksikatoru, i potom izvaže s točnošću od 0,1 mg.

#### *3.2.4.4. Postupak određivanja ukupnih prehrambenih vlakana*

U paraleli se odvaže  $1 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$  uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu od 400 ml. Potom se u svaku tikvicu ulije 40 ml MES/TRIS pufera, te se uzorak dobro promiješa. Zatim se dodaje 50  $\mu\text{L}$  termostabilne amilaze, opet promiješa, te se tikvica pokrije aluminijskom folijom. Tako pokrivena se stavi u vodenu kupelj na 100 °C i inkubira 35 minuta uz miješanje. Nakon inkubacije, tikvice se hlade na 60 °C i ispiru s 10 ml deionizirane vode. Zatim im se dodaje 100  $\mu\text{L}$  proteaze, promiješa ih se, pokrije te se stavljaju u vodenu kupelj na 60 °C 30 minuta, ponovno uz miješanje. Nakon isteka 30 min u tikvicu se, i dalje zagrijanu na 60 °C, dodaje 5 ml 0,56 M otopine HCl-a, te se uzorku namjesti pH na 4,1 – 4,8 upotrebom lužine. Nakon podešavanja pH sadržaja tikvice, u nju se dodaje 200  $\mu\text{L}$  amiloglukozidaze, te se sadržaj tikvice promiješa. Ponovno se pokriva folijom i inkubira 30 min na 60 °C uz miješanje. Potom se 95%-tni etanol stavi grijati na 60°C. Volumen etanola trebao bi biti takav da odnos volumena uzorka i etanola bude 1:4. Po završetku treće inkubacije uzorka, u tikvice se doda zagrijani EtOH, pokrivaju se aluminijskom folijom i ostavlja ih se 1 – 12 h kako bi se istaložila prehrambena vlakna. Potom se filter lončić s celitom prelije s 15 ml 78%-tne otopine EtOH (kako bi se celit ravnomjerno rasporedio po lončiću), i priključuje na vakuum sisaljku. U lončić se zatim dodaje sadržaj tikvice i uzorak se profiltrira. Nakon filtracije, ostatak na lončiću prvo se dva puta ispere s EtOH, a potom dva puta s acetonom. Po završetku ispiranja, ostatak na filtracijskom lončiću se ostavlja sušiti 16 h na 105 °C. Kad se izvadi iz sušionika, uzorak se ohladi u eksikatoru (30 – 60 min) i izvaže. U ostatku od jednog određivanja uzorka odredi se sadržaj bjelančevina metodom po Kjeldahlu uz faktor konverzije 6,25 (kao što je

opisano u poglavlju 3.2.5.), dok se u ostatku od drugog određuje pepeo spaljivanjem 5 h na 525 °C.

#### 3.2.4.5. *Određivanje slijepa probe*

Slijepa se proba određuje na isti način kao kod određivanja uzorka, međutim u Erlenmeyerovu tikvicu od 400 ml ne dodaje se uzorak. Dodaju se samo MES/TRIS pufer i prethodno spomenuti enzimi, te se postupak određivanja vrši jednako kao kod određivanja uzorka. Također se izvodi u paraleli, od čega se u jednom od ostataka određuje udjel zaostalih bjelančevina, a u drugome udjel pepela. Vrijednost slijepa probe potom se računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$S = m_{os} - B - P \quad [4]$$

Gdje S označava vrijednost slijepa probe (mg),  $m_{os}$  srednju vrijednost mase ostatka za oba određivanja slijepa probe (mg), B masu bjelančevina određenu u jednom ostatku slijepa probe (mg), te P masu pepela određenom u drugom ostatku slijepa probe (mg).

#### 3.2.4.6. *Izračun ukupnih prehrambenih vlakana*

Za izračun i izražavanje udjela ukupnih prehrambenih vlakana u uzorku potrebno je srednju vrijednost mase ostataka dvaju određivanih uzoraka korigirati za izračunate vrijednosti proteina, pepela i slijepa probe, i naposljetku pomnožiti s faktorom gubitka mase (faktorom preračuna) kao što je opisano jednadžbom [5].

$$UPV = \frac{m_{ou} - B - P - S}{m} \times FP \times 100 \quad [5]$$

U jednadžbi [5] je UPV postotak ukupnih prehrambenih vlakana (%),  $m_{ou}$  srednja vrijednost mase ostatka za dva određivanja uzorka (mg), B masa zaostalih bjelančevina određena u jednom ostatku uzorka (mg), P masa pepela određena u drugom ostatku uzorka (mg), S dobivena vrijednost slijepa probe (mg), m srednja vrijednost mase uzoraka odvaganih za obje paralele (mg), a FP faktor preračuna.

#### 3.2.4.7. Postupak određivanja topljivih i netopljivih vlakana

Netopljiva vlakna određuju se na način da se uzorak tretiran enzimima nakon posljednje inkubacije odmah filtrira kroz filter lončić, no lončić s celitom se, umjesto s etanolom, prije filtracije ispire s otprilike 3 ml destilirane vode. Potom se uzorak filtrira kroz filter lončić, a ostatak se ispire dva puta s 10 ml destilirane vode zagrijane na 70°C. Filtrat dobiven do ovog koraka potom ide na određivanje topljivih vlakana, a ostatak na filter lončiću ispire se s po 10 ml prvo 95%-tnog etanola, pa acetona.

Topljiva vlakna određuju se na način da se filtrat sačuvan iz postupka određivanja netopljivih vlakana izvaže, te se pripremi 95%-tna otopina EtOH zagrijana na 60°C. Uzorak se prelije pripremljenim etanolom u odnosu filtrat/etanol = 1/4 i ostavi se sat vremena kako bi se formirao precipitat. Otopina s precipitatom potom se na isti način filtrira i ispire kao u slučaju određivanja ukupnih vlakana, a lončić koji sadrži ostatak od filtriranja suši se preko noći (ili 16 h) na 103°C.

Određivanje svakog uzorka radi se u paraleli te jedan od uzoraka potom ide na određivanje bjelančevina, a drugi pepela, na način da se uzorak spaljuje 5 h pri 525°C u mufolnoj peći, hladi u eksikatoru i važe.

Vrijednosti topivih i netopivih vlakana računaju se zasebno prema jednažbi [5], a vrijednost ukupnih prehrambenih vlakana u postocima potom se dobiva zbrajanjem postotka topljivih prehrambenih vlakana i postotka netopljivih prehrambenih vlakana, kao što je prikazano u sljedećoj jednažbi:

$$UPV = TPV + NPV \quad [6]$$

U kojoj UPV predstavlja vrijednost ukupnih prehrambenih vlakana (%), TPV topivih prehrambenih vlakana (%), a NPV netopivih prehrambenih vlakana (%).



### 3.2.5. Određivanje bjelančevina suvremenom metodom po Kjeldahlu

#### 3.2.5.1. Princip određivanja ukupnih bjelančevina metodom po Kjeldahlu

Ovaj se postupak određivanja bjelančevina sastoji od 2 glavna dijela: spaljivanja i destilacije. Prvo se sve organske tvari u uzorku spale koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak bakrovog (II) sulfata pentahidrata kao katalizatora reakcije te kalijevog sulfata koji povisuje vrelište kiseline. To se događa uz oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika, koji potom u reakcijskoj smjesi zaostaje u obliku amonijevih soli, tj. amonijevog sulfata. Po dodatku natrijevog hidroksida, iz amonijevog sulfata se oslobađa amonijak. Potom se amonijak predestilira u bornu kiselinu, nakon čega se dobiveni amonijev borat titrira standardnom sumpornom kiselinom.

#### 3.2.5.2. Postupak određivanja ukupnih bjelančevina metodom po Kjeldahlu

1,0 g homogeniziranog uzorka se odvaže s točnošću  $\pm 0,0001$  i prebaci u Kjeldahlovu epruvetu. Potom se u epruvetu doda smjesa bakrova (II) sulfata pentahidrata i kalijevog sulfata, a konačno i 12 ml koncentrirane sumporne kiseline. Nakon toga se epruveta prebacuje u digestor i zagrijava u bloku za spaljivanje pri 420 °C. Spaljivanje je završeno u trenutku kad u epruveti nalazi bistra zeleno-plava tekućina bez crnih neizgorenih komadića, nakon otprilike sat vremena. Kada se epruveta ohladi, kreće postupak destilacije. Epruveta se prebaci u destilacijsku jedinicu Kjeltex sustava, a Erlenmeyerova tikvica u koju će se saliti destilirani sadržaj se postavi na odgovarajuće postolje. Iz spremnika borne kiseline i spremnika natrijeve lužine spojenih na destilacijski aparat u potrebnome će se trenutku dozirati oba reagensa (borna kiselina kroz destilacijsku cjevčicu u tikvicu, natrijeva lužina u Kjeldahlovu epruvetu), a sama destilacija traje 4 min. Po završetku destilacije, sadržaj Erlenmeyerove tikvice se titrira standardnom otopinom sulfatne kiseline (0,05 M) do promijene boje iz zelene u ružičasto-crvenu (omogućeno uporabom indikatora bromkrezol zeleno i metilno crveno), prilikom čega se zabilježi utrošak otopine sulfatne kiseline potreban za titraciju uzorka.

#### 3.2.5.3. Određivanje slijepa probe

Za svaku pripremljenu standardnu otopinu sulfatne kiseline odredi se volumen titranta u slijepoj probi. On se određuje na način da se umjesto uzorka upotrijebi 2 ml destilirane vode i 0,7

g saharoze koji se destilira, a potom se određuje utrošak standardne otopine za titraciju slijepe probe.

#### 3.2.5.4. Izračun udjela bjelančevina u uzorku

U konačnici se udio bjelančevina određuje na način da se iz količine oslobođenog amonijaka izračuna udio dušika, koji se potom množi s faktorom pretvorbe dušika. Izračun sadržaja bjelančevina u uzorku opisan je sljedećom jednačinom:

$$B = \frac{(V_1 - V_0) \times c(H_2SO_4) \times 0,0014 \times 6,25}{m(\text{uzorak})} \times 100 \quad [7]$$

U kojoj je B sadržaj bjelančevina u uzorku (%),  $V_1$  volumen otopine sulfatne kiseline utrošene pri titraciji uzorka (ml),  $V_0$  volumen utrošene sulfatne kiseline za titraciju slijepe probe (ml), i  $m$  (uzorak) masa izvaganog uzorka (g). 0,0014 predstavlja vrijednost koja se odnosi na količinu dušika ekvivalentnu upotrijebljenom 1 mililitru standardne otopine sulfatne kiseline (g), a 6,25 faktor pretvorbe dušika.

#### 3.2.6. Obrada podataka

##### 3.2.6.1. Statistička obrada podataka dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Podaci dobiveni nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom statistički su obrađeni u programu STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies Inc., Virginia, SAD). Program je, osim toga, korišten i za optimizaciju parametara ultrazvučne ekstrakcije kao i sam dizajn eksperimenta. Kako bi se odredio moguć utjecaj nezavisnih, odnosno ulaznih varijabli na zavisne, odnosno izlazne varijable, korišten je faktorijalni dizajn s više razina utjecaja (engl. *Multilevel Factorial Design*). Nezavisne varijable eksperimenta su otapalo (0 %, 25 % i 50 % etanola), amplituda (50, 75 i 100 %) te vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta). Zavisne, odnosno izlazne varijable su postotak ukupnih prehrambenih vlakana (%), srednja postignuta temperatura i ukupna promjena energije (Nutrizio i sur., 2020). Eksperiment je obuhvaćao ukupno 27 uzoraka, odnosno 3 serije (različitog udjela etanola kao otapala) od 9 uzoraka s pripadajućim vrijednostima amplitude i vremena tretiranja, kao što je navedeno u tablici 6.

Metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology, RSM*) korištena je za određivanje optimalnih parametara procesa ekstrakcije, a kroz odzivnu funkciju prikazuje utjecaj nezavisnih varijabli na zavisne. Tako su njome određene optimalne vrijednosti udjela etanola u otapalu, vremena tretiranja uzorka i amplitude koje rezultiraju maksimalnim izlaznim vrijednostima ukupnih prehrambenih vlakana.

Također, napravljena je i analiza varijance (MANOVA, eng. *Multivariate Analysis of Variance*) za vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana. Analiza varijance u obzir uzima interakcije između ulaznih (nezavisnih) parametara te kvadratne interakcije pojedinog ulaznog parametra, kao i što provjerava imaju li spomenute interakcije utjecaj na izlaznu vrijednost ukupnih prehrambenih vlakana. Ukoliko je vrijednost  $p < 0,05$  parametri imaju statistički značajan utjecaj, odnosno značajno se razlikuju od nule u intervalu pouzdanosti od 95,0%.

#### 3.2.6.2. Statistička obrada podataka dobivenih klasičnom ekstrakcijom

Utjecaj vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu na ukupna prehrambena vlakna također je statistički obrađen u STATGRAPHICS Centurion programu. Provedena je analiza varijance (MANOVA) kojom se ustvrdilo imaju li vrijednosti vremena tretiranja i otapala statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) na vrijednosti izlazne varijable, odnosno ukupnih prehrambenih vlakana u intervalu pouzdanosti od 95,0%.

#### 4. RASPRAVA I REZULTATI

Na samom početku istraživanja, nakon obrade cikla PEP-om i odvajanja kore od pulpe, ustvrdio se sadržaj vlakana u samoj kori cikla s malim zaostacima pulpe, u samoj pulpi te u cijeloj cikli, a kora cikla podvrgnuta je ultrazvučnoj ekstrakciji s ciljem ispitivanja ekstrakcijskog ostatka na sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana (UPV). Ultrazvučna ekstrakcija odabrana je zbog blažih potrebnih procesnih parametara koji u konačnici doprinose očuvanju kvalitete uzorka podvrgnutog ekstrakciji. Jedan od njih je i temperatura, koja uz hlađenje sustava nije prelazila 45 °C. Odabrana su tri različita otapala (deionizirana voda, 25 %-tna otopina etanola i 50 %-tna otopina etanola) kako bi se ustvrdilo ima li izbor otapala značajan utjecaj na prinos UPV. Prilikom trajanja procesa svakih su 15 sekundi bilježene vrijednosti temperature, energije i snage. Prikupljeni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel 365 gdje su izračunate vrijednosti ukupne snage, ukupne energije, ukupne promjene energije, promjene temperature i gustoće snage. Usporedo s ultrazvučnom ekstrakcijom provedena je i klasična toplinska ekstrakcija uzoraka pri istim parametrima (udjela otapala – 0, 25 i 50 % EtOH i vremena tretiranja – 3, 6 i 9 min) kako bi se usporedio sadržaj UPV obzirom na odabranu tehniku ekstrakcije.

Sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana određivao se enzimsko-gravimetrijskom metodom prema metodi AOAC 991.43, koja se temelji na mjerenju ostatka materije nakon enzimske razgradnje svih komponenti stanice koje nisu vlakna. Dobiveni rezultati sistematizirani su u programu Microsoft Excel 365, gdje su izračunate vrijednosti faktora gubitka mase, udjela pepela, udjela zaostalih proteina i slijepih proba kako bi se u konačnici dobile vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih ultrazvučnom i klasičnom ekstrakcijom. U konačnici su izrađene tablice s najvažnijim podacima kao i grafički prikazi za pregled i usporedbu dobivenih podataka.

Podaci dobiveni objema tehnikama ekstrakcija statistički su obrađeni u programu STATGRAPHICS Centurion. Ulazne varijable su udio etanola u otapalu (0, 25, 50 %), vrijeme tretiranja (3, 6, 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %) za ultrazvučnu ekstrakciju, odnosno udio etanola u otapalu (0, 25, 50 %) i vrijeme tretiranja (3, 6, 9 min) za klasičnu toplinsku ekstrakciju. Dobiveni rezultati za prinos prehrambenih vlakana prikazani su Pareto dijagramom, tablicom analize varijance (MANOVA), tablicom optimalnih vrijednosti za maksimalni prinos, jednadžbom

regresije i dijagramom odzivne površine. Obrađeni su i podaci s ciljem utvrđivanja utjecaja ulaznih parametara na srednju postignutu temperaturu procesa i ukupnu promjenu energije, prikazani Pareto dijagramom, MANOVA tablicom, jednadžbom regresije i dijagramom odzivne površine.

#### 4.1. REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETARA DOBIVENIH TIJEKOM ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE

**Tablica 8.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom uz deioniziranu vodu kao otapalo

*Deionizirana voda (0 % EtOH)*

UZORAK	t (min)	A (%)	T (°C)	P (W)	E (J)	dT (°C)	P <sub>uk</sub> * (W)	P <sub>v</sub> (W cm <sup>-3</sup> )	P <sub>p</sub> (W cm <sup>-2</sup> )
CU1	3	75	21	877,5	92.806,50	0,48	37,0695	0,3707	3277,66
CU2	9	100	30	2787	834.392,00	0,51	72,2144	0,7221	6386,16
CU4	3	50	21,9	735	78.002,00	0,79	52,7097	0,5271	4660,56
CU5	3	100	26,5	918	111.571,00	1,08	79,0000	0,7900	6985,14
CU6	9	50	30	2289	655.410,50	0,57	75,5415	0,7554	6679,34
CU11	6	50	26,2	1461	286.052,50	0,71	61,6157	0,6162	5448,03
CU17	6	75	30,4	1868	389.026,00	0,79	182,6140	1,8261	16.146,63
CU22	6	100	32,7	1986,5	415.902,00	0,90	92,1596	0,9216	8148,70
CU26	9	75	33,4	2790	817.467,50	0,58	87,5480	0,8755	7740,94

\* za izračun [1] korišteno:  $m = 105 \text{ g}$ ;  $c_p(\text{uzorak}) = 3,6885 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$

t-vrijeme tretiranja; A - amplituda; T - temperatura; P - snaga; E - energija; dT - promjena temperature; P<sub>uk</sub> - ukupna promjena energije; P<sub>v</sub> - gustoća snage s obzirom na volumen (100 ml), P<sub>p</sub> - gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Najmanja srednja vrijednost ukupne snage, kao i energije, postignuta je prilikom tretiranja uzorka CU4, koji je ujedno tretiran pri najblažim uvjetima (3 min, amplituda 50 %). Sukladno tome, najveće spomenute vrijednosti očituju se u uzorku CU2, tretiranom pri najintenzivnijim uvjetima (9 min, amplituda 100 %). Snaga ultrazvuka ovisna je o amplitudi, a to je također veća što je vrijeme tretiranja dulje, stoga su ovakvi rezultati očekivani. Međutim, najveća vrijednost ukupne promjene energije ipak je uočena kod uzorka CU17. Ukupna promjena energije označava energiju utrošenu za održavanje sonde u centralnom položaju prilikom ultrazvučnog procesiranja. Iz tog je razloga moguće kako je prilikom obrade uzorka CU17 došlo do pojačanog stvaranja i

implozije kavitacijskih mjehurića popraćenih intenzivnim kemijskim reakcijama, koje su posljedično utjecale na potrebu

**Tablica 9.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom uz 25%-tni etanol kao otapalo

25 % EtOH

UZORAK	t (min)	A (%)	T (°C)	P (W)	E (J)	dT (°C)	P <sub>uk</sub> * (W)	P <sub>v</sub> (W cm <sup>-3</sup> )	P <sub>p</sub> (W cm <sup>-2</sup> )
CU7	3	100	30,4	1171,5	127.985,00	1,38	94,4632	0,9446	8352,38
CU9	3	50	25,25	708,5	74.706,00	0,83	49,0742	0,4907	4339,11
CU10	9	100	37	3155,5	937.419,50	0,65	97,0479	0,9705	8580,92
CU13	6	50	29,50	1498,5	295.033,00	0,67	68,7504	0,6875	6078,87
CU14	3	75	30,5	1012	108.106,50	1,21	75,7889	0,7579	6701,21
CU16	9	75	37,9	2962,5	875.754,00	0,74	102,2013	1,0220	9036,58
CU18	9	50	29,35	2879,5	654.931,50	0,54	61,3555	0,6136	5425,02
CU20	6	100	33	2336,5	481.530,50	0,65	74,2655	0,7427	6566,51
CU21	6	75	30,2	1775	365.360,00	0,58	64,2983	0,6430	5685,22

\* za izračun [1] korišteno:  $m = 99,625 \text{ g}$ ;  $c_p(\text{uzorak}) = 3,6885 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$

t-vrijeme tretiranja; A - amplituda; T - temperatura; P - snaga; E - energija; dT - promjena temperature; P<sub>uk</sub> - ukupna promjena energije; P<sub>v</sub> - gustoća snage s obzirom na volumen (100 ml), P<sub>p</sub> - gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Sukladno rezultatima ekstrakcije uz deioniziranu vodu kao otapalo, ekstrakcija 25%-tnom otopinom etanola kao otapalom također pokazuje najmanje srednje vrijednosti ukupne snage i energije za uzorak tretiran pri najblažim uvjetima (CU9, pri 3 min i A 50). Shodno tome, najveće se spomenute srednje vrijednosti javljaju tretiranjem uzorka pri najintenzivnijim uvjetima (CU10, 9 min i 100 % amplitude). Najveća se vrijednost ukupne promjene energije očituje kod uzorka CU16, tretiranog 9 min pri 75 % amplitude.

**Tablica 10.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom uz 50%-tni etanol kao otapalo

50 % EtOH

UZORAK	t (min)	A (%)	T (°C)	P (W)	E (J)	dT (°C)	P <sub>uk</sub> * (W)	P <sub>v</sub> (W cm <sup>-3</sup> )	P <sub>p</sub> (W cm <sup>-2</sup> )
CU3	6	100	36	2404	481.602,0	0,91	98,104	0,9810	8674,30
CU8	3	100	29	1474	151.013,5	2,00	213,9707	2,1397	18919,17
CU12	9	100	38,5	4125,5	1.181.910,0	0,77	175,4749	1,7547	15515,39
CU15	9	50	35	2718	760.984,5	0,65	143,0844	1,4308	12651,44
CU19	6	50	30,7	1955,5	370.092,0	1,04	192,4734	1,9247	17018,39
CU23	3	50	29	951,5	94.076,0	1,31	177,9683	1,7797	15735,86
CU24	3	75	31,8	1271	131.559,0	1,54	194,6707	1,9467	17212,67
CU25	9	75	40	3648	1.066.211,0	0,80	187,0664	1,8707	16540,30
CU27	6	75	35,7	2526	501.324,0	1,04	188,9903	1,8899	16710,41

\* za izračun [1] korišteno: m = 94,25 g; c<sub>p</sub> (uzorak) = 3,6885 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>

t-vrijeme tretiranja; A - amplituda; T - temperatura; P - snaga; E - energija; dT - promjena temperature; P<sub>uk</sub> - ukupna promjena energije; P<sub>v</sub> - gustoća snage s obzirom na volumen (100 ml), P<sub>p</sub> - gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Kao i kod tretmana prethodnim dvama otapalima, i prilikom tretmana 50%-tnim etanolom kao otapalom najmanje su srednje vrijednosti ukupne snage i energije očitovane kod uzorka tretiranog pri najblažim uvjetima, CU23 (3 min i 50 % amplitude), a najveće kod uzorka tretiranog pri najintenzivnijim uvjetima, CU12 (9 min i 100 % amplitude). Uzorak CU8, tretiran 3 min pri amplitudi 100 % pak pokazuje najveće vrijednosti ukupne promjene energije. To se može objasniti naglim povećanjem temperature u početku procesa obzirom na primijenjenu amplitudu koja je maksimalna i otapalo koje se brzo zagrijava.

#### 4.2. REZULTATI SADRŽAJA PREHRAMBENIH VLAKANA CIKLE I NJEZINIH DIJELOVA PRIJE PODVRGAVANJA ULTRAZVUČNOJ EKSTRAKCIJI

**Tablica 11.** Vrijednosti topljivih, netopljivih i ukupnih prehrambenih vlakana u cikli i njezinim dijelovima

	<i>Cijela cikla</i>	<i>Pulpa cikle</i>	<i>Kora cikle*</i>
<i>TPV (g / 100 g)</i>	3,30	2,93	5,74
<i>NPV (g / 100 g)</i>	8,70	7,58	14,90
<i>UPV (g / 100 g)</i>	12,00	10,51	20,64

\*efikasnost odvajanja i čišćenja pulpe od kore nije bila 100 % stoga se očekuju maleni udjeli pulpe na kori  
 TPV – topljiva prehrambena vlakna, NPV – netopljiva prehrambena vlakna, UPV – ukupna prehrambena vlakna

Iz tablice 11 jasno se može zaključiti kako kora cikle sadrži više prehrambenih vlakana nego pulpa cikle, kao i cijela cikla, što je u skladu s rezultatima istraživanja Abdo i sur. (2020). Ujedno se očituje i znatno povećanje udjela vlakana u kori cikle općenito nakon obrade PEP-om, što je vidljivo u usporedbi rezultata s onima iz tablice 4 (inicijalne analize kore cikle).

#### 4.3. REZULTATI I USPOREDBA UKUPNIH PREHRAMBENIH VLAKANA DOBIVENIH ULTRAZVUČNOM I KLASIČNOM TOPLINSKOM EKSTRAKCIJOM

**Tablica 12.** Vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom

<i>Uzorak</i>	<i>A (%)</i>	<i>t (min)</i>	<i>EtOH (%)</i>	<i>Ukupna prehrambena vlakna (%)*</i>
<i>CU1</i>	75	3	0	25,55
<i>CU2</i>	100	9	0	32,93
<i>CU3</i>	100	6	50	36,23
<i>CU4</i>	50	3	0	24,65
<i>CU5</i>	100	3	0	25,58
<i>CU6</i>	50	9	0	27,17



**Tablica 12.** Vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom -  
*nastavak*

<i>CU7</i>	100	3	25	26,49
<i>CU8</i>	100	3	50	41,05
<i>CU9</i>	50	3	25	25,57
<i>CU10</i>	100	9	25	32,11
<i>CU11</i>	50	6	0	26,85
<i>CU12</i>	100	9	50	32,85
<i>CU13</i>	50	6	25	40,02
<i>CU14</i>	75	3	25	32,79
<i>CU15</i>	50	9	50	32,66
<i>CU16</i>	75	9	25	35,25
<i>CU17</i>	75	6	0	63,55
<i>CU18</i>	50	9	25	32,96
<i>CU19</i>	50	6	50	29,57
<i>CU20</i>	100	6	25	27,55
<i>CU21</i>	75	6	25	32,47
<i>CU22</i>	100	6	0	26,22
<i>CU23</i>	50	3	50	34,58
<i>CU24</i>	75	3	50	35,09
<i>CU25</i>	75	9	50	51,51
<i>CU26</i>	75	9	0	25,17
<i>CU27</i>	75	6	50	37,96

\*mjerna jedinica (%) jednoznačna je mjernoj jedinici (g / 100 g uzorka)  
A – amplituda; t – vrijeme tretiranja; EtOH – udio etanola u otapalu

Promatranjem rezultata iz tablice 12 očituje se kako udio prehrambenih vlakana ekstrahiranih ultrazvukom varira od 25 % do 40 % (što odgovara istraživanju koje su proveli Šeremet i sur., gdje je po završetku UZV obrade dobiveno 33,6 % UPV), uz iznimku uzoraka CU17 i CU25 s rezultatima od (redosljedom) 63,55 % i 51,51 %. Ovako odudarajući i neobično visoki rezultati mogu biti posljedica nepravilnog homogeniziranja uzorka ili prilikom pripreme za ekstrakciju ili pripreme za određivanja PV, kao i posljedica ljudske greške ili greške uređaja prilikom

određivanja PV (primjerice prenizak rezultat zaostalih proteina ili pepela, koji za uzrok ima višu vrijednost PV). Izuzimajući spomenuta dva rezultata, uočava se uglavnom pravilan trend porasta udjela UPV u ekstrakcijskom ostatku povećanjem vremena tretiranja, amplitude i udjela etanola u otapalu. To bi, zapravo, značilo da je povećanjem vrijednosti navedenih parametara prinos ekstrakcije (prelazak vlakana u otapalo) manji. Uz pretpostavku da ekstrakcijski ostatak čine većinski netopljiva vlakna, može se zaključiti sljedeće:

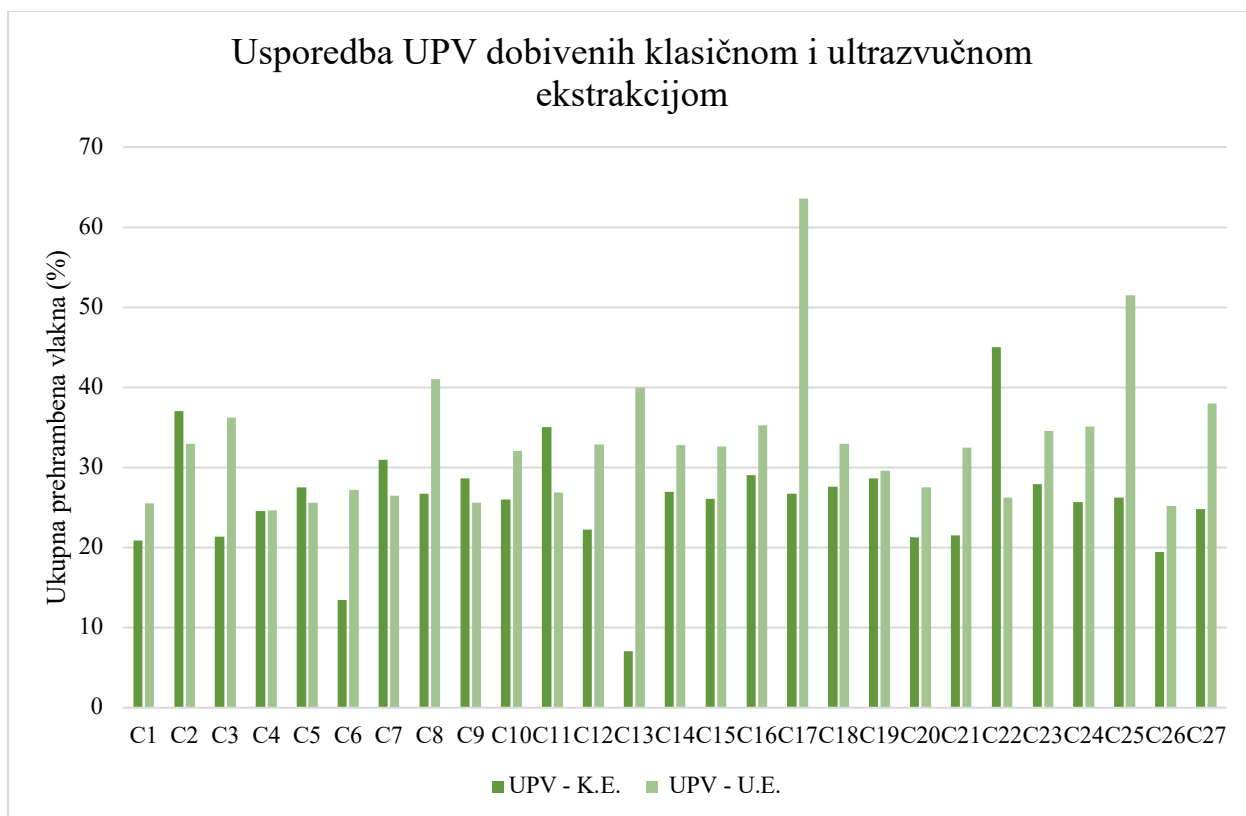
- U slučaju kad je otapalo deionizirana voda, dulje trajanje ultrazvučne obrade i povećanje amplitude potencijalno potiču bubrenje netopljivih vlakana, odnosno vezanje vode u velikoj količini. U svojoj strukturi prilikom bubrenja tako mogu zahvatiti, primjerice, pektin kao i druge molekule ne-polisaharidne prirode i s njima tvoriti kompleks koji otežano prelazi u otapalo.
- U slučaju kad je otapalo 50 %-tna otopina etanola, u vodi topljiva prehrambena vlakna precipitiraju i potencijalno čepe pore stvorene ultrazvučnim učinkom, čime je ekstrakcija u otapalo otežana.

Ujedno se može primijetiti i porast sadržaja UPV u kori cikle u odnosu na sadržaj u uzorku prije tretmana ultrazvukom visoke snage koji je iznosio 20,64 %. Razlog povećanja udjela vlakana u tretiranim uzorcima potencijalno leži u činjenici kako je kora cikle prije ultrazvučnog tretmana sadržavala određene (iako male) udjele pulpe, koja prirodno sadrži manje vlakana od kore. Mogućnost da se pulpa prilikom procesa ekstrakcije u potpunosti otopila i prešla u ekstrakt i da je u ekstrakcijskom ostatku zaostala samo čista kora cikle objašnjava porast sadržaja prehrambenih vlakana kada govorimo o gramu čistih prehrambenih vlakana na 100 grama uzorka. Također, dosadašnja znanstvena literatura koja se bavila problematikom utjecaja ultrazvuka na fizikalno-kemijska svojstva vlakana donosi spoznaje kako je tretman ultrazvukom doveo do povećanja udjela topljivih prehrambenih vlakana u tretiranim uzorcima (Spotti i Campanella, 2017). Najveće povećanje očituje kod uzoraka tretiranim s otapalima koji sadrže etanol, koji je potencijalno uzrokovao precipitaciju topljivih prehrambenih vlakana i njihovo zadržavanje u ekstrakcijskom ostatku, što može objasniti značajno povećanje udjela UPV u ekstrakcijskom ostatku tako tretiranih uzoraka.

**Tablica 13.** Vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih klasičnom toplinskom ekstrakcijom

<i>Uzorak</i>	<i>t (min)</i>	<i>EtOH (%)</i>	<i>Ukupna prehrambena vlakna (%)</i> *
<i>CU1</i>	3	0	20,92
<i>CU2</i>	9	0	37,00
<i>CU3</i>	6	50	21,38
<i>CU4</i>	3	0	24,55
<i>CU5</i>	3	0	27,51
<i>CU6</i>	9	0	13,44
<i>CU7</i>	3	25	30,93
<i>CU8</i>	3	50	26,74
<i>CU9</i>	3	25	28,61
<i>CU10</i>	9	25	26,01
<i>CU11</i>	6	0	35,11
<i>CU12</i>	9	50	22,26
<i>CU13</i>	6	25	7,03
<i>CU14</i>	3	25	26,99
<i>CU15</i>	9	50	26,11
<i>CU16</i>	9	25	29,06
<i>CU17</i>	6	0	26,69
<i>CU18</i>	9	25	27,61
<i>CU19</i>	6	50	28,61
<i>CU20</i>	6	25	21,31
<i>CU21</i>	6	25	21,48
<i>CU22</i>	6	0	45,12
<i>CU23</i>	3	50	27,9
<i>CU24</i>	3	50	25,67
<i>CU25</i>	9	50	26,23
<i>CU26</i>	9	0	19,46
<i>CU27</i>	6	50	24,8

\*mjerna jedinica (%) jednoznačna je mjernoj jedinici (g / 100 g uzorka)  
t – vrijeme tretiranja; EtOH – udio etanola u otapalu

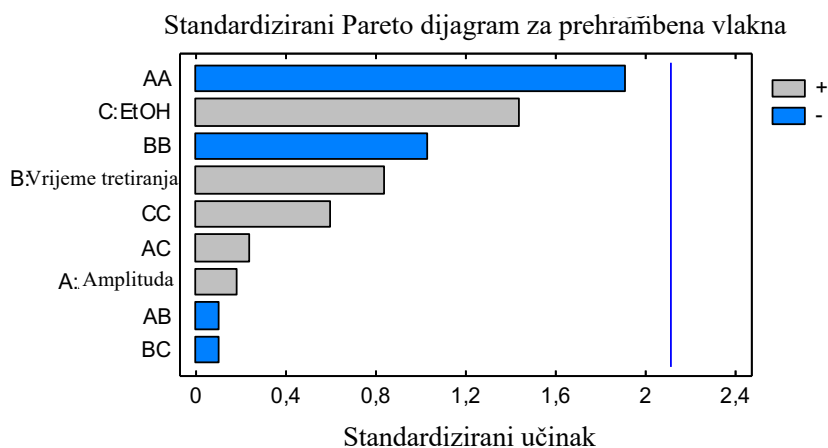


**Slika 3.** Grafički prikaz usporedbe ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih klasičnom (toplinskom) i ultrazvučnom (netoplinskom) ekstrakcijom (C1-27 – uzorci kore cikle tretirani objema metodama; UPV – K.E. – ukupna prehrambena vlakna dobivena klasičnom ekstrakcijom; UPV – U.E. – ukupna prehrambena vlakna dobivena ultrazvučnom ekstrakcijom)

Promatrajući usporedbu ukupnih prehrambenih vlakana dobivenih klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom (slika 3) može se zaključiti kako se veći postotak vlakana nalazi u ostatku kore tretirane ultrazvučnom ekstrakcijom. Iako bi bilo logično da se ultrazvučnom ekstrakcijom, kontrolišući fizikalno-kemijskih učinaka koje ima na tretirani medij, u otapalo ekstrahira više prehrambenih vlakana – shodno čime bi postotak u ostatku kore bio niži, pažnja se mora obratiti na temperaturne uvjete procesa. Naime, najviše prosječne temperature ultrazvučne ekstrakcije iznose 33,4; 37,9 i 40 °C (0 %, 25 % i 50 % EtOH, redosljedom), dok su klasične ekstrakcije vršene pod konstantnom temperaturom od 60 °C, dakle najmanje 1,5 puta većom od ultrazvučnih. Viša temperatura reakcijskog sustava prirodno pospješuje proces ekstrakcije uslijed povećanja kinetičke energije molekula sustava, a samim time i ubrzava ekstrakciju. To rezultira većim prinosom vlakana u ekstrakt klasičnom ekstrakcijom u istom vremenskom periodu u odnosu na ultrazvučnu. Nadalje,

ulogu u ekstrakciji imaju i enzimi prisutni u kori cikle, kao što je  $\beta$ -glukozidaza.  $\beta$ -glukozidaza katalizira hidrolizu oligosaharida, najčešće celuloze, do  $\beta$ -D-glukoze, a time utječe na konverziju pojedinih netopljivih vlakana u topljiva, koja se potom mogu ekstrahirati u reakcijsko otapalo. Ona je aktivna pri temperaturi od 40 do 80 °C, s najvećom aktivnošću pri 65 – 70 °C, te joj temperatura izvođenja klasične ekstrakcije više pogoduje nego one postignute ultrazvučnom ekstrakcijom. Iako i blaga-do-srednja ultrazvučna iradijacija povećava aktivnost ovog enzima (dekonstrukcijom sekundarne strukture enzima i izlaganjem odnosno ekspozicijom više aktivnih mjesta, čime se povećava njihov kontakt sa supstratom), temperatura reakcijske smjese naizgled ima dominantniji učinak (Fan i sur., 2018). Veći postotak vlakana dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom nego klasičnom u ostatku jest, zapravo, poželjan. Naime, kao što je već spomenuto, kora cikle postaje sve popularniji izvor bioaktivnih spojeva poput betalaina, koji se ultrazvukom ekstrahiraju u puno većoj količini i antioksidativna svojstva im ostaju više očuvana nego klasičnom ekstrakcijom. Ostatak te ultrazvučne ekstrakcije, odnosno ostatak tretirane kore cikle, bogatiji je na prehrambenim vlaknima (kao što je i opisano) nego ostatak od klasične ekstrakcije i iz tog razloga predstavlja bolju sirovinu za korištenje u svrhe poboljšanja tehnoloških i funkcionalnih svojstava hrane – a korištenje i dobivenog ekstrakta i ostatka ekstrakcije umnogome podržava *zero waste production* koncept.

#### 4.4. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE



Slika 4. Standardizirani Pareto dijagram za ukupna prehranbena vlakna

Tablica 14. Rezultati analize varijance (MANOVA) za ukupna prehranbena vlakna dobivena ultrazvučnom ekstrakcijom

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A: Amplituda	2,70669	1	2,70669	0,03	0,8540
B: Vrijeme tretiranja	54,2882	1	54,2882	0,70	0,4144
C: % EtOH	160,982	1	160,982	2,08	0,1678
AA	283,09	1	283,09	3,65	0,0731
AB	0,864033	1	0,864033	0,01	0,9172
AC	4,3923	1	4,3923	0,06	0,8147
BB	82,8321	1	82,8321	1,07	0,3159
BC	0,848008	1	0,848008	0,01	0,9179
CC	27,8067	1	27,8067	0,36	0,5572
Ukupna pogreška	1318,42	17	77,554		
Ukupno (korelacija)	1936,23	26			

$R^2 = 31,9079 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 0,0 %

Standardna pogreška procijene = 8,80648

Srednja apsolutna pogreška = 4,85685

Durbin-Watson statistika = 2,03349 (P=0,5316)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,0468001

Promatrajući sliku 4 i tablicu 14, očituje se kako niti jedna ulazna varijabla (amplituda, vrijeme tretiranja, udio etanola u otapalu) nema statistički značajan utjecaj na izlaznu varijablu, odnosno udio ukupnih prehrambenih vlakana, u ultrazvučno tretiranim uzorcima. Beznačajan statistički utjecaj udjela etanola u otapalu na prinos ekstrakcije svakako odudara uvriježene činjenice kako je udio etanola jedan od najvažnijih čimbenika ultrazvučne ekstrakcije (Kumar i sur., 2021). Ovdje je, međutim, situaciju (odnosno, rezultate) potrebno sagledati iz drugačije perspektive. Udio prehrambenih vlakana se određivao na ekstrakcijskom ostatku, a ne u ekstraktu. Netopljiva PV ionako nisu topiva u vodi (a većinski ni etanolu), i udio etanola u kombinaciji s ostalim blagim uvjetima procesiranja niti ne stvara uvjete kojima se ona mogu više ili manje uspješno ekstrahirati. S druge strane, etanol uzrokuje precipitaciju topljivih prehrambenih vlakana (mnogo je manje polarno otapalo od vode), što onemogućava njihov prelazak iz biljne materije u ekstrakt otežavajući propusnost (Prosky i sur., 1994). S tog se gledišta nedostatak statistički značajnog utjecaja udjela etanola u otapalu može nazvati i logičkim. Što se tiče vremena tretiranja, bitno je naglasiti kako je, u usporedbi s dosadašnjim istraživanjima i optimizacijom parametra vremena tretiranja, uočeno da je raspon vremenskog intervala mnogo manji. Naime, većina istraživanja navodi kako se pozitivna korelacija između produljenog vremena tretiranja i prinosa ekstrakcije očituje kad vrijeme tretiranja premašuje 10 minuta (Kumar i sur., 2021; Begum i Deka, 2019), što je dulje vrijeme tretiranja i od onog najduljeg primijenjenog u ovom istraživanju. Kumar i sur. (2021) ujedno napominju kako je pregledom dosadašnjih radova ustanovljeno kako se optimalni prinosi biljnih metabolita, pa tako i vlakana, postižu u vremenskim rasponima 10 – 60 min, nakon čega učinkovitost opada. Stoga postoji mogućnost kako je učinak vremena tretiranja koji nije statistički značajan uvjetovan premalim vremenskim rasponom tretiranja. Iste navedene nesukladnosti mogu biti i pojašnjenje za nedostatak statističkog značaja utjecaja amplitude na prinos ekstrakcije, budući da su trend porasta prinosa u ovisnosti o vremenu trajanja procesa i primijenjene snage ultrazvuka u skladu jedno s drugim (Martinez-Solano i sur., 2020). Poželjno je provesti istraživanje koje će obuhvaćati vremenski raspon od 10 do 60 minuta tretiranja, kako bi se moglo ustvrditi kakav točno utjecaj ekstenzivno povećanje vremena tretiranja ima na udio vlakana, kao i koji je maksimalan vremenski period unutar kojeg je održivo vršiti proces.

Optimizacijom ultrazvučne ekstrakcije uzorka kore cikla dobivene su optimalne ulazne vrijednosti amplitude, vremena tretiranja te udjela etanola za maksimalnu izlaznu vrijednost

ukupnih prehrambenih vlakana. Za maksimalnu izlaznu vrijednost od 44,0673 % optimalni parametri su 76,7141 % amplitude, 6,5867 minuta i 50 %-tna otopina etanola kao otapala.

**Tablica 15.** Optimizacija parametara za maksimalnu izlaznu vrijednost ukupnih prehrambenih vlakana

<i>Faktor</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Optimum</i>
Amplituda (%)	50,0	100,0	76,7141
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	6,5867
EtOH (%)	0,0	50,0	50,0
<i>Maksimalna vrijednost vlakana (%)</i>	44,0673		

Uz navedeno, provedena je analiza statističkog utjecaja ulaznih varijabli na izlazne vrijednosti srednje temperature i ukupne promijene energije prilikom ultrazvučnog tretiranja kore cikla. Dobiveni rezultati, iskazani u prilogima 2 i 3 (standardizirani Pareto dijagrami te analize varijance), jasno pokazuju kako vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na postignutu srednju vrijednost temperature procesa, kao što ima i otapalo, odnosno udio etanola u istom. Rezultati su očekivani i logični, budući da je (i) porast temperature produljenim vremenom trajanja tretmana neminovan, i (ii) specifični toplinski kapacitet etanola skoro dvostruko manji nego specifični toplinski kapacitet čiste vode ( $c_p(\text{H}_2\text{O},l) = 4,184 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $c_p(\text{EtOH},l) = 2,46 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), i iz tog se razloga zagrije na višu temperaturu od vode u istom vremenu tretiranja (NIST Chemistry WebBook). Statistički značajan utjecaj na ukupnu promjenu energije, s druge strane, ima samo udio etanola u otapalu. To se može objasniti činjenicom da, kako ukupna promjena energije ovisi o promjeni temperature u zadanom vremenskom intervalu, a etanol je podložan znatnijem povećanju temperature od čiste vode u istom, značajnije promjene temperature ujedno znače i statistički značajniji utjecaj otapala na ukupnu promjenu energije. Jednadžbe regresije za srednju postignutu temperaturu procesa i ukupnu promjenu energije iz priloga 5 opisuju kako se ponašaju polinomi dobiveni iz obrađenih rezultata u ovisnosti o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Iz rezultata prikazanih u tablicama 14 i 15 te prilogu 3, s osvrtom na tablice i grafičke prikaze iz poglavlja 4.2., može se zaključiti sljedeće:



- Iako stvarne razlike u udjelu ukupnih prehrambenih vlakana dobivenima ultrazvučnom ekstrakcijom kore cikle pri različitim uvjetima amplitude i vremena tretiranja postoje, one nisu statistički značajne. Uzimajući u obzir pojedinačne rezultate ukupnih prehrambenih vlakana (UPV) i statističku značajnost vrijednosti amplitude i vremena tretiranja na iste, optimalna vrijednost parametra amplitude iznosi 75%, a optimalno vrijeme tretiranja iznosi 6 minuta. To je potvrđeno i rezultatima optimizacije parametara za maksimalnu izlaznu vrijednost UPV i stoga bi ultrazvučna obrada uzoraka pri tim uvjetima bila i ekonomski i energetski opravdana.
- Optimizacija parametara također je pokazala kako je optimalan udio etanola u otapalu za maksimalnu izlaznu vrijednost UPV 50 %. Toliki je udio etanola i poželjan ukoliko se istovremeno iz kore ekstrahiraju fenolne komponente, obzirom na njegov spomenuti afinitet za fenole. Kako se radi o vlaknima, međutim, a udio etanola u otapalu zapravo nema statistički značajnu vrijednost, ekonomski i ekološki mnogo je prihvatljivije kao otapalo prilikom ultrazvučne ekstrakcije koristiti deioniziranu vodu. Na taj način u potpunosti se izbjegava korištenje toksičnih organskih otapala štetnih po okoliš, što i jest cilj zelenih tehnika ekstrakcije. Nadalje, korištenje vode kao otapala je i ekonomski opravdano. Osim što je manje cijene nego organska otapala, obrada uzorka vodom isključuje potrebu za naknadnim otparivanjem etanola iz ostatka ekstrahiranog uzorka što je izrazito poželjno ukoliko je cilj ostatak iskoristiti u svrhu obogaćivanja, ali i poboljšanje tehnološko-funkcionalnih svojstava prehrambenih proizvoda. Promatrani se učinak svakako može shvatiti kao korak naprijed prema eliminaciji organskih otapala prilikom ultrazvučne ekstrakcije što i jest jedan od ciljeva zelenih tehnika ekstrakcije, kao što je već spomenuto.

#### 4.5. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA KLASIČNE TOPLINSKE EKSTRAKCIJE

**Tablica 16.** Rezultati analize varijance (MANOVA) za ukupna prehrambena vlakna dobivena klasičnom toplinskom ekstrakcijom

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-Omjer</i>	<i>P-Vrijednost</i>
A: Vrijeme tretiranja	7,28347	1	7,28347	0,11	0,7481
B: % EtOH	34,4727	1	34,4727	0,50	0,4869
AA	0,0808907	1	0,0808907	0,00	0,9730
AB	1,22241	1	1,22241	0,02	0,8952
BB	39,6465	1	39,6465	0,58	0,4564
Ukupna pogreška	1302,82	19	68,5694		
Ukupno (korelacija)	1405,98	26			

$R^2 = 31,9079 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $0,0 \%$

Standardna pogreška procijene =  $8,80648$

Srednja apsolutna pogreška =  $4,85685$

Durbin-Watson statistika =  $2,03349$  ( $P=0,5316$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,0468001$

Rezultati iz tablice 16 pokazuju kako ni vrijeme tretiranja niti udio etanola u otapalu nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti ukupnih prehrambenih vlakana za uzorke tretirane klasičnom toplinskom ekstrakcijom. Razlog nesukladnosti svakako bi mogao biti u primijenjenom vremenu tretiranja, budući da je ono u većini dosad provedenih istraživanja premašivao i 60 min (Martinez-Solano i sur., 2020). Stoga treba uvažiti mogućnost kako niti kratko vrijeme tretiranja (poput onih primijenjenih u ovom eksperimentu), niti udio etanola u spomenutom vremenu ne doprinose značajno učinkovitosti, odnosno prinosu ultrazvučne ekstrakcije kad se radi o prehrambenim vlaknima kore cikla.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Ultrazvučnom su ekstrakcijom zaostali veći udjeli ukupnih prehrambenih vlakana u ekstrakcijskom ostatku nego klasičnom toplinskom ekstrakcijom. Ta se pojava može pripisati precipitaciji topljivih PV uzrokovanoj korištenjem većih udjela etanola u otapalu prilikom ultrazvučne ekstrakcije. U toplinskoj je ekstrakciji povišena temperatura imala dominantniji učinak na ekstrakciju vlakana od korištenog udjela etanola.
2. Za maksimalan udio UPV u ekstrakcijskom ostatku (~ 44 %) parametri procesa moraju biti prilagođeni na amplitudu od 75 %, vrijeme tretiranja od 6 minuta i 50 %-tnu otopinu etanola kao otapala. Takvi uvjeti mogu odlično nadopunjavati proces ultrazvučne ekstrakcije, primjerice, fenolnih komponenti kore cikle. Međutim, prije ikakve druge uporabe PV dobivenih u ostatku, prvo je potrebno otpariti etanol, što povećava energetska potrošnju.
3. Udio etanola u otapalu nema statistički značajan utjecaj na rezultate UPV. Iz tog se razloga umjesto njega, prilikom ultrazvučne ekstrakcije, može koristiti deionizirana voda. Prinosi statistički nisu značajno različiti, a voda predstavlja zelenije i jeftinije otapalo koje je lakše zbrinuti.
4. Vrijednost amplitude nema statistički značajan utjecaj na udio UPV u ostatku, a nema ni vrijeme tretiranja – no vremenski okvir tretmana bio je relativno malen.
5. Ultrazvučna ekstrakcija metabolita kore cikle u ispitanim uvjetima (3-9 min, 50-100 % amplitude i 0-50 % otopine EtOH kao otapala) pogodna je za velike prinose prehrambenih vlakana u ekstrakcijskom ostatku. Tako obrađeni nusproizvod pogodan je za korištenje u prehrambenim namirnicama čime se početna sirovina potpuno iskorištava (*zero waste production* koncept).
6. Ultrazvuk predstavlja učinkovitu metodu kojom se može postići smanjenje gubitaka i rasipanja hrane unutar cjelokupnog sustava hrane.

## 6. LITERATURA

Abdo E, El-Sohaimy S, Shaltout O, Abdalla A, Zeitoun A (2020) Nutritional Evaluation of Beetroots (*Beta vulgaris* L.) and Its Potential Application in a Functional Beverage, *Plants* **9**, 1752.

<https://doi.org/10.3390/plants9121752>

Anderson WJ, Baird P, Davis Jr RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL (2009) Health benefits of dietary fiber, *Nutrition Reviews* **67(4)** str. 188–205. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x

*Annex G* AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods [https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal\\_data/sources/files/multimedia/pdfs/annex\\_g.pdf](https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/annex_g.pdf) Pristupljeno 27. srpnja 2022.

Asp NG (1987) Definition and analysis of dietary fibre, *Scand J Gastroentero* **22**, str. 16-20. <http://dx.doi.org/10.3109/00365528709095845>

Balicki S, Pawlaczyk-Graja I, Gancarz R, Capek P, Wilk KA (2020) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Functional Food Fiber from Canadian Horseweed (*Erigeron canadensis* L.), *ACS Omega* **5** (33), str. 20854-20862. DOI: 10.1021/acsomega.0c02181

Barba FJ, Parniakov O, Pereira SA, Wiktor A, Grimi N, Boussetta N, Saraiva JA, Raso J, Martin-Belloso O, Witrowa-Rajchert D, Lebovka N, Vorobiev E (2015) Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry, *Food Res Int* **77**, str. 773-798, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>.

Battistella Lasta HB, Lentz L, Gonçalves Rodrigues LG, Mezzomo N, Vitali L, Salvador Ferreira SR (2019) Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **21** 101353. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101353>

Begum YA, Deka SC (2019) Effect of processing on structural, thermal, and physicochemical properties of dietary fiber of culinary banana bracts. *J Food Process Preserv.* <https://doi.org/10.1111/jfpp.14256>

Begum YA, Deka SC (2020) Ultrasound-assisted extracted dietary fibre from culinary banana bract as matrices for anthocyanin: its preparation, characterization and storage stability. *J Food Sci Technol* <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04273-0>

Bobinaitė R, Pataro G, Lamanauskas N (2015) Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *J Food Sci Technol* **52**, str. 5898–5905. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1668-0>

Bouchez A, Vauchel P, D'Alessandro LG, Dimitrov K (2020) Multi-objective optimization tool for ultrasound-assisted extraction including environmental impacts, *Chem Eng Res Des* **164**, str. 324-337. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.10.001>

Ceclu L, Nistor OV (2020) Red Beetroot: Composition and Health Effects - A Review. *J Nutri Med Diet Care*, **6:043** DOI: 10.23937/2572-3278.1510043

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert- Vian M (2016) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review, *Ultrason Sonochem* **34**, str. 540-560, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chhikara N, Kushwaha K, Sharma, P., Gat, Y., Panghal, A., (2018) Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review, *Food Chem*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.022>

Costa APD, Hermes VS, Rios AO (2017) Minimally processed beetroot waste as an alternative source to obtain functional ingredients. *J Food Sci Technol* **54**, str. 2050–2058. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2642-4>

Eurofins/Expertise Centre CCC (2018) Dietary fibre: What is it and how to measure it correctly - Technical Brochure. Eurofins/Expertise Centre CCC – Eurofins i Expertise Centre for

Comprehensive & Complex Carbohydrate Analyses, [https://cdnmedia.eurofins.com/corporate-eurofins/media/12146386/dietary\\_fiber\\_technical\\_brochure\\_v9\\_2018.pdf](https://cdnmedia.eurofins.com/corporate-eurofins/media/12146386/dietary_fiber_technical_brochure_v9_2018.pdf) Pristupljeno 5. listopada 2022.

Fan XH, Zhang XY, Zhang QA, Zhao WQ, Shi FF (2018) Optimization of Ultrasound Parameters and its Effect on the Properties of the Activity of beta-Glucosidase in Apricot Kernels, *Ultrason Sonochem*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.027>

Fernando GSN, Wood K, Papaioannou EH, Marshall LJ, Sergeeva NN, Boesch C (2021) Application of an Ultrasound-Assisted Extraction Method to Recover Betalains and Polyphenols from Red Beetroot Waste, *Sustainable Chemistry & Engineering* **9**, str. 8736-8747. DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c01203

Fidelis M, de Moura C, Kabbas Junior T, Pap N, Mattila P, Mäkinen S, Putnik P, Bursać Kovačević D, Tian Y, Yang B, Granato D (2019) Fruit Seeds as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. *Molecules*. 24(21):3854. <https://doi.org/10.3390/molecules24213854>

Ganesh KS, Sridhar A, Vishali S (2022) Utilization of fruit and vegetable waste to produce value-added products: Conventional utilization and emerging opportunities-A review, *Chemosphere* **287** doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132221>.

Gómez-Plaza E, Pérez-Prieto LJ, Pérez-Porrás P, Bautista-Ortín AB (2022) Ultrasound to process white grapes. U: Morata A (ured.) White Wine Technology, Academic Press, str. 73-85, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00002-8>.

Herceg N (2013) Okoliš i održivi razvoj, Synopsis d.o.o., Zagreb, str. 7-42.

Kantar SE, Boussetta N, Lebovka N, Foucart F, Rajha HN, Maroun RG, Louka N, Vorobiev E (2018) Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction, *Innov Food Sci Emerg* **46**, str. 153-161, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.024>.

Karaman E, Yılmaz E, Tuncel NB (2017) Physicochemical, Microstructural and Functional Characterization of Dietary Fibers Extracted from Lemon, Orange and Grapefruit Seeds Press

Meals, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **11**, str. 9-17.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.06.001>

Kardos N, Luche JL (2001) Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydr Res* **332**, str. 115–131. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00081-7)

Khanpit VV, Tajane SP, Mandavgane SA (2021) Dietary fibers from fruit and vegetable waste: methods of extraction and processes of value addition, *Biomass Conv Bioref*  
<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01980-2>

Kohajdová Z , Karovičová J, Kuchtová V, Lauková M (2018) Utilisation of beetroot powder for bakery applications, *Chem Pap* **72**, str. 1507–1515. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0392-z>

Kumara K, Srivastava S, Sharanagatb VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrason Sonochem* **70** <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Lazăr S, Constantin OE , Horincar G, Andronoiu DG, Stănciuc N, Muresan C, Râpeanu G (2022) Beetroot By-Product as a Functional Ingredient for Obtaining Value-Added Mayonnaise. *Processes*. <https://doi.org/10.3390/pr10020227>

Martinez-Solano KC, Garcia-Carrera NA, Tejada-Ortigoza V, García-Cayuela T, Garcia-Amezquita LE (2020) Ultrasound Application for the Extraction and Modification of Fiber-Rich By-Products, *Food Eng Rev* **13** <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09269-2>

NIST Chemistry WebBook, doi: <https://doi.org/10.18434/T4D303>  
<https://webbook.nist.gov/chemistry/> Pristupljeno 2. studenog 2022.

Nutrizio M, Gajdoš Kljusurić J, Marijanović Z, Dubrović I, Viskiće M, Mikołaj E, Chemat F, Režek Jambrak A (2020) The Potential of High Voltage Discharges for Green Solvent Extraction of Bioactive Compounds and Aromas from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) - Computational Simulation and Experimental Methods, *Molecules* **14**;25(16):3711. doi: 10.3390/molecules25163711

Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, Devries JV, Furda I, Lee SC (1994) Determination of Soluble Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study, *Journal AOAC Int* **77**, str. 690–694, <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.3.690>

Ravindran R, Jaiswal AK (2016) Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products: A Review, *Trends Biotechnol* **34**, str. 58-69, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>

Salehi F (2020) Physico-chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by pulsed electric field: a review, *Int J Food Prop* **23**, str. 1036-1050, DOI: 10.1080/10942912.2020.1775250

Shuaibu BS, Aremu MO, Kalifa UJ (2021) Chemical Composition and Antioxidant Activities of Beetroot Peel, *African Journal of Engineering and Environment Research* **2(1)**, str. 62- 73, <https://ajoeer.org.ng/otn/ajoeer/qtr-1/2021/05.pdf> Pristupljeno 2. srpnja 2022.

Spotti MJ, Campanella OH (2017) Functional modifications by physical treatments of dietary fibers used in food formulations, *Current Opinion in Food Science* **15**, str. 70-78, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.003>

Šeremet D, Durgo K, Jokić S, Huđek A, Vojvodić Cebin A, Mandura A, Jurasović J, Komes D (2020) Valorization of Banana and Red Beetroot Peels: Determination of Basic Macrocomponent Composition, Application of Novel Extraction Methodology and Assessment of Biological Activity In Vitro. *Sustainability*. 12(11):4539. <https://doi.org/10.3390/su12114539>

Tejada-Ortigoza V, Garcia-Amezquita LE, Serna-Saldívar SO (2016) Advances in the Functional Characterization and Extraction Processes of Dietary Fiber. *Food Eng Rev* **8**, str. 251–271. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9134-y>

Zin MM, Bánvölgyi S (2022) Thermal emerging technology approach for the extraction of bioactive compounds from *Cylindra* beetroot (peel, flesh, and stalk) with green solvent, *J Food Process Pres* **46**, doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16436>



Wen L, Zhang Z, Zhao M, Senthamarai Kannan R, Padamati RB, Sun DW, Tiwari BK (2020) Extraction of soluble dietary fibre from coffee silverskin: impact of ultrasound/microwave-assisted extraction. *Int J Food Sci Techn* **55**, str. 2242–2250

Welti-Chanes J, Sergio O, Saldivar S, Osvaldo H, Tejada-Ortigoza CV (2020) *Science and Technology of Fibers in Food Systems*, Springer. Doi: 10.1007/978-3-030-38654-2

WHO/AHPSR (2020) 2019 Annual report: Alliance for Health Policy and Systems Research March 26. WHO/AHPSR – World Health Organization i Alliance for Health Policy and Systems Research. <https://ahpsr.who.int/publications/i/item/2020-03-26-2019-annual-report-for-the-alliance-for-health-policy-and-systems-research> Pristupljeno 12. srpnja 2022.

Wolters MGE, Verbeek C, Van Westerop JJM, Hermus RJJ, Voragen AGJ (1992) Comparison of Different Methods for Determination of Dietary Fiber, *J AOAC Int* **75**, str. 626–634, <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.4.626>

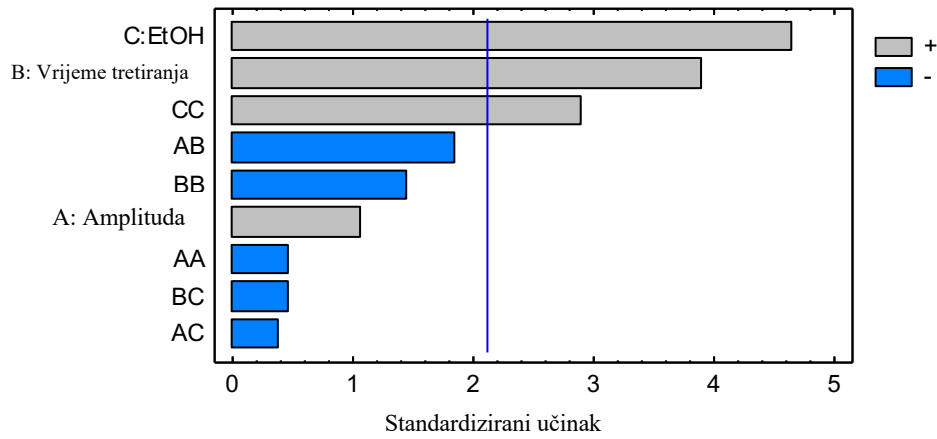
## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** Tablica srednjih postignutih temperatura prilikom ultrazvučnog tretmana uzoraka CU1 – CU27

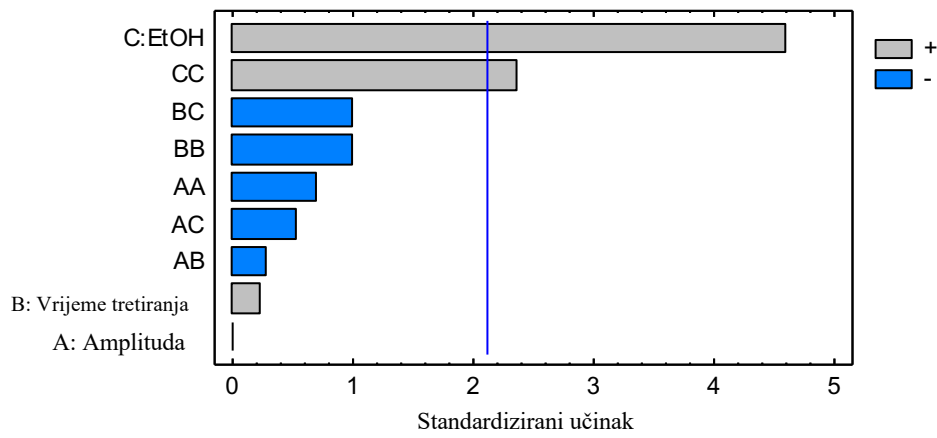
<i>Uzorak</i>	<i>A (%)</i>	<i>t (min)</i>	<i>EtOH (%)</i>	<i>T<sub>sr</sub> (°C)</i>
CU1	75	3	0	21,00
CU2	100	9	0	30,00
CU3	100	6	50	36,00
CU4	50	3	0	21,90
CU5	100	3	0	26,50
CU6	50	9	0	30,00
CU7	100	3	25	30,40
CU8	100	3	50	29,00
CU9	50	3	25	25,25
CU10	100	9	25	37,00
CU11	50	6	0	26,20
CU12	100	9	50	38,50
CU13	50	6	25	29,50
CU14	75	3	25	30,50
CU15	50	9	50	35,00
CU16	75	9	25	37,90
CU17	75	6	0	30,40
CU18	50	9	25	29,35
CU19	50	6	50	30,70
CU20	100	6	25	33,00
CU21	75	6	25	30,20
CU22	100	6	0	32,70
CU23	50	3	50	29,00
CU24	75	3	50	31,80
CU25	75	9	50	40,00
CU26	75	9	0	33,40
CU27	75	6	50	35,70

**Prilog 2.** Grafički prikazi statističke značajnosti utjecaja ulaznih parametara i njihovih interakcija na vrijednosti srednje temperature i ukupne promjene energije ultrazvučno tretiranih uzoraka

Standardizirani Pareto dijagram za srednju postignutu temperaturu



Standardizirani Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije



**Prilog 3.** Tablice analize varijanci za utjecaj ulaznih varijabli na srednju temperaturu procesa i ukupnu promjenu energije u uzorcima tretiranima ultrazvukom

Analiza varijance za srednju temperature procesa

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-Omjer</i>	<i>P-Vrijednost</i>
A: Amplituda	16,0556	1	16,0556	1,14	0,3006
B: Vrijeme tretiranja	213,556	1	213,556	15,16	0,0012
C: EtOH	304,222	1	304,222	21,60	0,0002
AA	3,12963	1	3,12963	0,22	0,6434
AB	48,0	1	48,0	3,41	0,0824
AC	2,08333	1	2,08333	0,15	0,7053
BB	29,6296	1	29,6296	2,10	0,1651
BC	3,0	1	3,0	0,21	0,6503
CC	118,519	1	118,519	8,41	0,0099
Ukupna pogreška	239,435	17	14,0844		
Ukupno (korelacija)	977,63	26			

$R^2 = 75,5086 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 62,5426 %

Standardna pogreška procijene = 3,75292

Srednja apsolutna pogreška = 2,48011

Durbin-Watson statistika = 1,93832 (P=0,4263)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,0411176

Analiza varijance za ukupnu promjenu energije ultrazvuka

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-Omjer</i>	<i>P-Vrijednost</i>
A: Amplituda	0,00385735	1	0,00385735	0,00	0,9989
B: Vrijeme tretiranja	94,5425	1	94,5425	0,05	0,8222
C: EtOH	38395,0	1	38395,0	21,15	0,0003
AA	884,043	1	884,043	0,49	0,4948
AB	153,553	1	153,553	0,08	0,7747
AC	526,47	1	526,47	0,29	0,5972

BB	1807,91	1	1807,91	1,00	0,3323
BC	1813,23	1	1813,23	1,00	0,3317
CC	10111,3	1	10111,3	5,57	0,0305
Ukupna pogreška	30866,7	17	1815,69		
Ukupno (korelacija)	84652,7	26			

$R^2 = 63,5373 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $44,2336 \%$

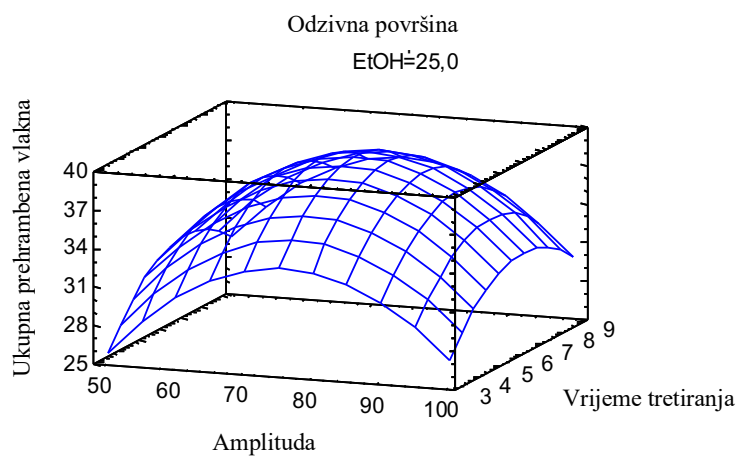
Standardna pogreška procijene =  $42,6109$

Srednja apsolutna pogreška =  $24,8576$

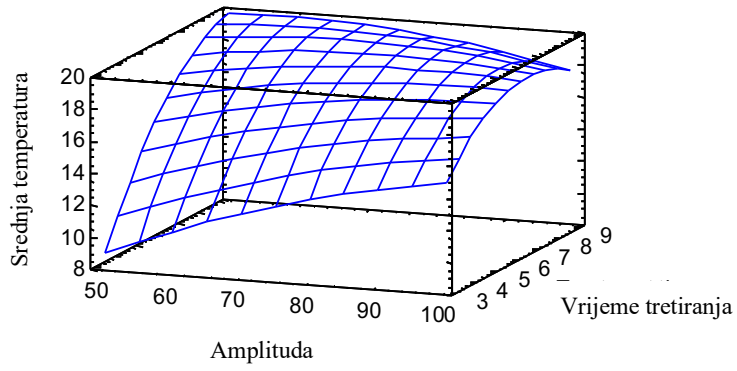
Durbin-Watson statistika =  $1,94857$  ( $P=0,4375$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $0,00769409$

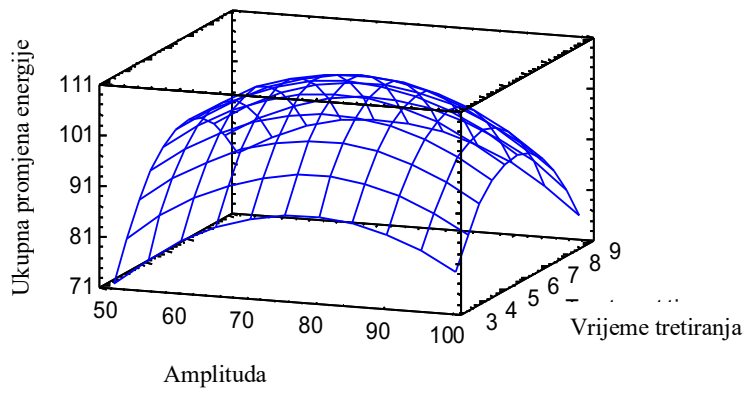
**Prilog 4.** Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupna prehrambena vlakna, srednju postignutu temperaturu i ukupnu promjenu energije (s 25%-tnom otopinom etanola kao otapala)



Odzivna površina  
EtOH=25,0



Odzivna površina  
EtOH=25,0



**Prilog 5.** Jednadžbe regresije za ukupna prehrambena vlakna, srednju postignutu temperaturu i ukupnu promjenu energije za uzorke tretirane ultrazvukom. A – amplituda; B – vrijeme tretiranja; C – udio etanola; UPV – ukupna prehrambena vlakna;  $T_{sr}$  – srednja postignuta temperatura;  $P_{uk}$  – ukupna promjena energije (uz vrijednosti varijabli u njihovim izvornim mjernim jedinicama).

$$UPV = -43,737 + 1,66131*A + 5,88991*B - 0,103933*C - 0,0109902*A^2 - 0,00357778*A*B + 0,000968*A*C - 0,41284*B^2 - 0,00354444*B*C + 0,00344444*C^2$$

$$T_{sr} = -20,7315 + 0,387778*A + 6,27778*B - 0,101111*C - 0,00115556*A^2 - 0,0266667*A*B - 0,000666667*A*C - 0,246914*B^2 - 0,00666667*B*C + 0,00711111*C^2$$

$$P_{uk} = -147,286 + 3,46492*A + 31,5833*B + 0,341519*C - 0,0194214*A^2 - 0,0476954*A*B - 0,0105978*A*C - 1,92873*B^2 - 0,163899*B*C + 0,0656822*C^2$$

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja DORA VLAHOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dora Vlahović', written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis