Antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih visokonaponskim električnim pražnjenjem - plazmom

Čombor, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:971915

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marko Čombor

7061/PT

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA DOBIVENIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNJENJEM - PLAZMOM

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih visokonaponskim električnim praženjenjem-plazmom" (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Mentor: doc.dr.sc. Marija Badanjak Sabolović

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA DOBIVENIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNJENJEM - PLAZMOM

Marko Čombor, 0035155937

Sažetak: Tretiranje visokonaponskim električnim pražnjenjem, hladnom plazmom, jedna je od novih ne-toplinskih metoda koja se do sada u prehrambenoj industriji uglavnom koristila za sterilizaciju, inaktivaciju enzima i dezinfekciju vode. U posljednje vrijeme znanstvena istraživanja usmjerena su na primjenu visokonaponskog električnog pražnjenja za ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz različitih sirovina. Cilj ovoga završnog rada je prema dostupnoj literaturi prikazati rezultate do sada provedenih istraživanja u području primjene ove tehnologije u ekstrakciji bioaktivnih komponenti kao i njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. Rezultati znanstvenih istraživanja ukazuju da je visokonaponsko električno pražnjenje učinkovita metoda kojom se poboljšava brzina ekstrakcije bioaktivnih komponenata u odnosu na dosada korištene metode ekstrakcije.

Ključne riječi: visokonaponsko pražnjenje, ekstrakcija, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 28 stranica, 13 slika, 9 tablica, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Marija Badanjak Sabolović*

Datum obrane: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF EXTRACTS OBTAINED WITH HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES - PLASMA

Marko Čombor, 0035155937

Abstract: Treatment by high-voltage electrostatic discharge, cold plasma, is one of the new non-thermal methods used to date in the food industry for sterilization, enzyme inactivation and disinfection of water. Recently, scientific research has focused on the use of high-voltage electrical discharge for the extraction of bioactive compounds from various raw materials. The aim of this paper is to present the results of previous research in the field of application of this technology in the extraction of bioactive compounds as well as their antioxidant activity. Results of scientific research indicate that high-voltage electrical discharge, using appropriate treatment conditions (pressure, voltage, treatment time) is an effective method for improving the rate of extraction of bioactive compounds compared to the previously used extraction method.

Keywords: high-voltage discharge, extraction, phenolic compounds, antioxidative activity
Thesis contains: 28 pages, 13 figures, 9 tables, 25 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Associate professor Ph.D. Marija Badanjak Sabolović*
Defence date: September 19th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Definicija plazme 2

2.2. Primjena plazme u prehrambenoj industriji 4

2.3. Oksidativni stres i slobodni radikali 6

2.4. Reaktivni spojevi kisika i dušika 7

2.5. Antioksidansi 8

2.6. Polifenoli 9

2.7. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta 9

2.8. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta 9

2.8.1. ORAC 10

2.8.2. DPPH metoda 11

2.8.3. ABTS metoda 12

2.8.4. FRAP metoda 12

3. PRIMJENA VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA – PLAZME U PROCESIMA EKSTRAKCIJE 13

4. ZAKLJUČCI 25

5. LITERATURA 26

1. UVOD

Prehrambena industrija u skladu sa suvremenim trendovima nastoji naći nove i inovativne procese obrade hrane u cilju poboljšanja i očuvanja kvalitete prehrambenih proizvoda. Korištenje visokonaponskog električnog pražnjenja, odnosno hladne plazme, jedna je od modernih nekonvencionalnih metoda kojom su se do sada postizali učinci sterilizacije pa je svoju primjenu našla u suhoj dezinfekciji površina hrane (poput mesa, mliječnih proizvoda, svježe ubranog voća i povrća), sterilizaciji ambalaže i dezinfekciji vode.

Kako primjena hladne plazme ne bi ostala ograničena na područje sterilizacije prehrambenih proizvoda, odnosno inaktivacije mikroorganizama, intenzivna se istraživanja provode u cilju šire primjene te bolje prilagodbe standardima i zahtjevima moderne prehrambene industrije. Jedna od mogućih novih primjena visokonaponskog električnog pražnjenja, odnosno hladne plazme, je zamjena klasičnih ekstrakcijskih metoda. Mnoga istraživanja su posvetila pozornost na efekte koje primjena ove tehnologije kao metode ekstrakcije ima na tretirane uzorke. Najveći dio istraživanja usmjeren je određivanju prinosa bioaktivnih komponenata ponajprije fenolnih spojeva i antioksidacijskoj aktivnosti dobivenih ekstrakata.

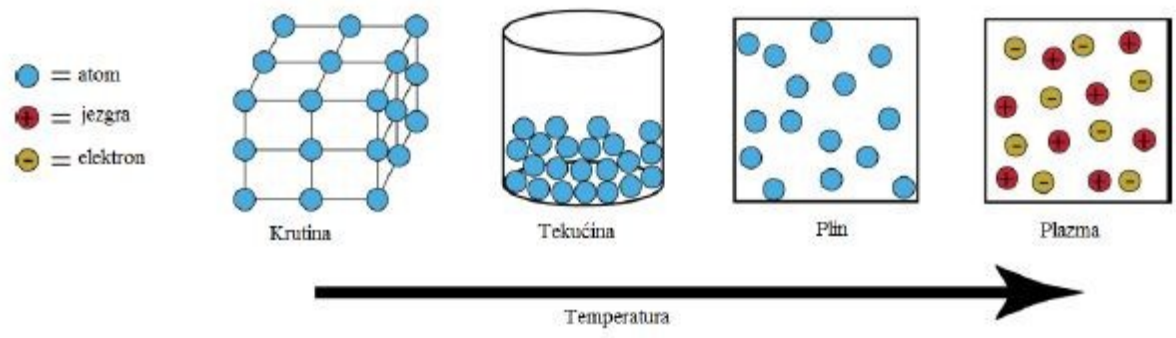
Visokonaponsko električno pražnjenje-plazma je metoda koja se istražuje i u procesima zelene ekstrakcije budući da omogućuje bržu ekstrakciju i bolji prinos bioaktivnih komponenata u vodi uz korištenje manje količine energije, niže temperature, kraće vrijeme ekstrakcije te manji utrošak etanola u otapalima. Svrha ovog završnog rada je upravo proučiti i dati pregled korištenih uvjeta (napon, temperatura, vrijeme) i rezultata dosadašnjih znanstvenih istraživanja primjene visokonaponskog električnog pražnjenja u području ekstrakcije bioaktivnih komponenti kao i djelovanja na antioksidacijsku aktivnost istih.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija plazme

Riječ plazma koristi se za opisivanje širokog spektra mnogočestičnih sistema u kojima postoje slobodne nabijene čestice, kao što su slobodni elektroni i ionizirani atomi ili molekule, a u kojima dominira kolektivna interakcija pomoću elektromagnetnog polja koje te čestice generiraju. Ovom definicijom obuhvaćene su ne samo plinske plazme, odnosno plazme potpuno ili djelomično ioniziranog plina, već i plazme čvrstih tijela kao što su elektronske plazme u metalima i plazme unutar poluvodiča (Bittencour, 2004).

Sa znanstvenog stajališta, sva poznata materija u svemiru dijeli se na četri agregatna stanja: čvrsto, tekuće, plinovito i plazma (slika 1). Osnovna razlika između krutina, tekućina i plinova je zbog snage veza koje drže sastavne čestice zajedno. Spomenute veze relativno su jake kod krutina, slabe kod tekućina dok su kod plinova gotovo potpuno odsutne. Stanje u kojemu će neka materija biti, ovisi o kinetičkoj energiji njezinih atoma ili molekula odnosno o ravnoteži između unutarnje toplinske energije i međučestičnih sila. Dovođenjem energije odnosno zagrijavanjem krute, tekuće ili plinovite materije, povećava se kinetička energija sastavnih čestica koje prelaze na viša energetska stanja te su u mogućnosti savladati međučestične sile. To dovodi do faznih prijelaza, koji je javljaju pri konstantnoj temperaturi i određenom tlaku. Ako se osigura dovoljna količina energije, molekularni plin će postupno disocirati u atomizirani plin kao rezultat sudara između čestica čija kinetička energija prelazi energiju molekularnih veza. Na dovoljno visokim temperaturama sve veći dio atoma posjedovati će dovoljno kinetičke energije, sudari postaju toliko intenzivni da dolazi do oslobađanja elektrona pri čemu nastaju negativno nabijeni elektroni i pozitivno nabijeni ioni što će rezultirati nastankom elektromagnetskih polja čime se dobiva energija za daljnju ionizaciju plina, odnosno nastajanje plazme. Mora se naglasiti kako u termodinamičkom smislu ovaj prijelaz nije fazni s obzirom da se javlja postupno s promjenom odnosno povećanjem temperature (Bittencour, 2004). U elektrostatskom smislu plazma je kvazineutralna što znači da je makroskopski gledano neutralna, ali su njezini dijelovi električki nabijeni (Fridman, 2008).



Slika 1. Promjena agregatnih stanja povećanjem temperature (Anonymous, 2018)

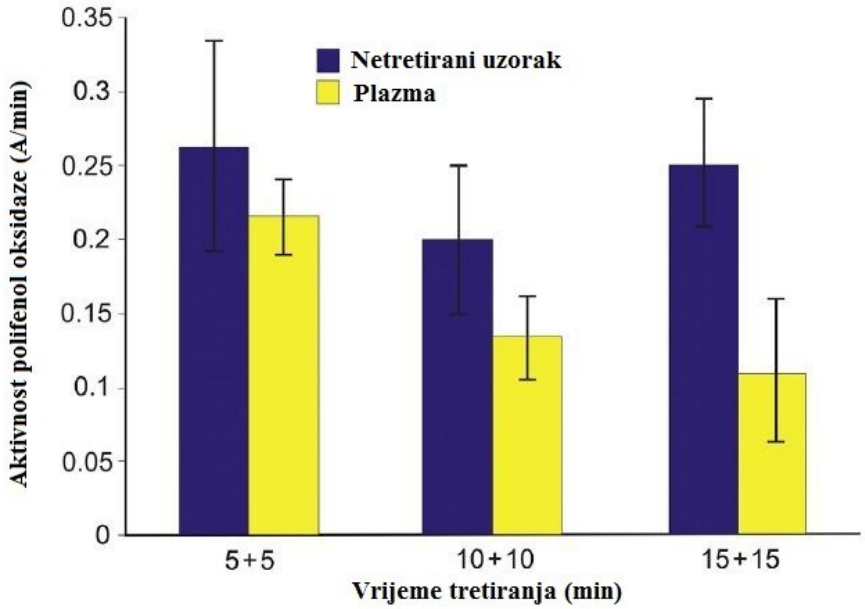
Prema temperaturi plazme djelimo na **hladne plazme** i **vruće plazme**. Vruće plazme su skoro potpuno ionizirane dok je stupanj ionizacije hladnih plazmi relativno malen. Kao u bilo kojem plinu, temperatura u plazmi određena je prosječnim energijama čestica plazme (neutralnim i nabijenim) i njihovim relevantnim stupnjevima slobode (translacijski, rotacijski, vibracijski). U električnim pražnjenjima karakterističnima za plazmu koja se generira u laboratorijskim uvijetima, energija iz električnog polja prvo se prenosi na elektrone, a zatim na ostale čestice rezultirajući višom temperaturom elektrona u odnosu na druge teže čestice prisutne u plazmi (temperatura elektrona je oko 10,000 K, dok je ostatak čestica plazme na sobnoj temperaturi) što dovodi do termodinamičke neravnoteže pa takvu plazmu nazivamo neravnotežnom netermičkom plazmom odnosno hladnom plazmom. Vruće plazme s druge strane su u termodinamičkoj ravnoteži odnosno temperatura elektrona i ostalih čestica prisutnih u plazmi je jednaka (Fridman, 2008).

Za stvaranje hladne plazme potrebno je česticama plina osigurati energiju iz vanjskog izvora. To se postiže električnim pražnjenjem plina koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije. Nastalo električno polje uzrokuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anoda), dok pozitivna jezgra biva privučena od strane negativne elektrode (katoda). Povećanjem napona povećava se i naprezanje u atomima sve do dielektrične granice kada se pojavljuje iskra kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode. Boja plazme ovisi o plinu koji se primjenjuje, a nastaje kao rezultat povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje pri čemu se emitira energija u vidljivom dijelu spektra. U laboratorijskoj primjeni najčešće korišteni plinovi su argon, dušik, helij i uglikov dioksid (Fridman, 2008).

2.2. Primjena plazme u prehrambenoj industriji

Visokonaponsko električno pražnjenje - hladna plazma, kao inovativna i ne-toplinska metoda nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji. Jedna od najznačajnija karakteristika plazme je mogućnost obrade pri niskim temperaturama te velika učinkovitost u inaktivaciji mikrobnih organizama. To je čini idealnom za primjenu u prehrambenoj industriji budući da obrada plazmom ne utječe na nutritivna i senzorska svojstva proizvoda te nema toksično djelovanje. Utjecaj plazme ovisi o parametrima koji se koriste prilikom obrade-vrsta plina, primjenjeni napon, način stvaranja plazme, ali i o vrsti hrane te mogućim interakcijama sa sastojcima hrane (Mir i sur., 2016).

Hladna plazma koristi se u cilju očuvanja mikrobiološke sigurnosti hrane i produljenja trajanja proizvoda uz očuvanje bioaktivnih komponenata, kao i za inaktivaciju enzima odgovornih za enzimatsko posmeđivanje, uklanjanje toksina, dekontaminaciju odnosno sterilizaciju ambalaže i dezinfekciju vode (Pankaj i sur., 2017). Na slici 2 prikazano je smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze kod plazmom tretiranih uzoraka svježe rezanih jabuka.



Slika 2. Usporedba aktivnosti polifenol oksidaze na svježe rezanu jabuku prije i nakon tretmana plazmom (Misra, 2016).

Svoju primjenu hladna plazma nalazi i u industriji žitarica. To potvrđuju rezultati istraživanja koje su proveli Sarangapani i sur. (2015). Rezultati spomenutog istraživanja pokazali su da tretiranje smeđe riže hladnom plazmom dovodi do promjene svojstava riže pri čemu se smanjuje vrijeme kuhanja, tvrdoća i ljepljivost, a dolazi do promjene teksturalnih svojstava.

U mljekarskoj industriji poželjna je obrada hladnom plazmom jer za razliku od toplinskih metoda ne izaziva promjene u kemijskom sastavu mlijeka, a učinkovito djeluje u smanjenju patogenih vrsta. Također, uspješno se primjenjuje za selektivnu modifikaciju strukture proteina u cilju poboljšavanja funkcionalnosti izolata proteina sirutke. U tablici 1. prikazani su neki od bioloških materijala na kojima su se istraživali efekti tretmana plazmom i uočene prednosti.

Tablica 1. Utjecaj plazme na biološki materijal (Mir i sur., 2016)

Tip biološkog materijala	Modifikacije
Enzimi	Smanjena aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze
Kriške jabuka	Smanjena aktivnost polifenol oksidaze
Svježe rezani kivi	Poboljšano zadržavanje boje, smanjeno posmeđivanje
Pšenično brašno	Poboljšanje čvrstoće i elastičnosti tijesta, poboljšano vrijeme miješanja
Pšenični proteinski izolati	Promjena strukture proteina, smanjeni efekti pjenjenja i stvaranja emulzije
Pšenično sjeme	Poboljšana stopa klijanja
Višnja	Poboljšano očuvanje antocijana

U mesnoj industriji obrada plazmom može produljiti vijek trajanja mesa kao i u industriji voća i povrća s obzirom na sposobnost redukcije prisutnih mikroorganizama nakon samo nekoliko minuta tretmana. U tablici 2. prikazana je decimalna redukcija mikrobnih organizama u nekoliko vrsta voća, povrća i mesa te njihovim prerađevinama. Učinak plazme na različite mikroorganizme može biti potpuno selektivan odnosno može uništiti patogene mikroorganizme bez uništavanja stanice (Mir i sur., 2016).

Tablica 2. Inaktivacija mikroorganizama plazmom (Mir i sur., 2016)

Uzorak	**Mikroorganizam**	**Redukcija mikrobne populacije** (log)
Bademi	*E. coli*	5,0
Borovnice	Aerobni mikrobi	2,0
Jabuke	*E. coli*	3,7
Sok od jabuke	*Citrobacter freundii*	5,0
Jagode	*S. typhimurium*	1,8
Kora manga i lubenice	*P. Agglomerans, S. Cerevisiae, E. Coli*	3,0
Sok od naranče	*S. aureus, E. Coli*	5,0
Kupus	*S. typhimurium, L. Monocytogenes*	2,0
Rajčica	*S. typhimurium*	2,0
Zelena salata	*S. typhimurium*	5,0
Žitarice	*A. parasiticus*	3,0
Ljuska jaja	*S. enteritidis*	4,5
Pileća prsa	*Campylobacter jejuni*	4,7
Kuhana pileća prsa	*L. monocytogenes*	2,5
Piletina	*L. innocua*	3,3
Pršut	*L. monocytogenes*	8,0
Slanina	*L. monocytogenes, E. Coli*	2,6

2.3. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres definira se kao pomak ravnoteže u oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Ako govorimo o biološkim sustavima, oksidativni stres možemo opisati prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže između nastalih slobodnih radikala i staničnih mehanizama koji su odgovorni da iste uklone što u konačnici rezultira oštećenjem stanice (Jat i sur., 2017).

Slobodni radikal je svaki atom ili skupina koja ima jedan nespareni elektron ili više njih. Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze (pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu) ili reakcijama molekula s drugim slobodnim radikalima. Radikali mogu biti električki nabijeni ioni ili nenabijene vrste. Zajedničke osobine svih radikala su visoka kemijska reaktivnost i izrazita nestabilnost budući da su kratkog trajanja. Mehanizam stvaranja slobodnih radikala odvija se u tri koraka: **inicijacija** (pucanje kovalentne veze i nastajanje dvaju slobodnih radikala), **propagacija** (napredovanje lančane

reakcije pri čemu nastaje stabilan produkt i novi slobodni radikal) i **terminacija** (dva slobodna radikala se sparuju te nastaje neradikalski produkt čime se zaustavlja lančana reakcija) (Pine, 1994).

2.4. Reaktivni spojevi kisika i dušika

Reaktivni spojevi kisika (ROS) zajedno s reaktivnim spojevima dušika (RNS) su jedne od najznačajnijih skupina slobodnih radikala. Reaktivni spojevi kisika, prikazani u tablici 3, su ioni ili vrlo male molekule koje uključuju ione kisika, slobodne radikale i perokside, te druge anorganske ili organske spojeve. Neki od najčešćih su superoksid (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina (HClO), te hidroksilni radikal ($OH^\cdot$). Neki od najvažnijih reaktivnih spojeva dušika prikazanih u tablici 4 su dušikov monoksid ($NO^\cdot$), peroksinitrit ($ONOO^-$), te dušikov dioksid ($NO_2^\cdot$). Reaktivni spojevi kisika i dušika koji nisu slobodni radikali iako izrazito reaktivni nisu u mogućnosti pokrenuti lančane reakcije koje dovode do stvaranja novih nestabilnih produkata. Gledajući na staničnoj razini kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu (Štefan i sur., 2007).

Tablica 3. Reaktivni kisikovi spojevi (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
supeoksidni, O_2^-	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, $OH^\cdot$	hipokloritna kiselina, HClO
peroksilni, $ROO^\cdot$	ozon, O_3
alkoksilni, $RO^\cdot$	singlet kisik, O_2
hidroperoksilni, $HO_2^\cdot$	

Tablica 4. Reaktivni dušikovi spojevi (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
dušikov (II) oksid, $NO^\cdot$	nitrozil, NO^+
dušikov (IV) oksid, $NO_2^\cdot$	nitratna kiselina, HNO_2
	dušikov (III) oksid, N_2O_3
	peroksinitrit, $ONOO^-$
	alkilperoskinitrit, ROONO

2.5. Antioksidansi

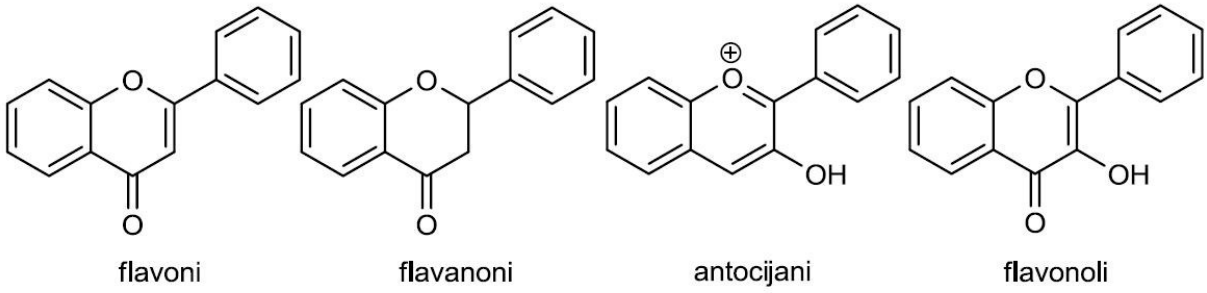
Antioksidansi su reducirajuće tvari koje inhibiraju oksidaciju drugih tvari. U biološkom smislu antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala odnosno sudjeluju u neutralizaciji štetnih oksidacijskih učinaka.

Antioksidansi mogu biti enzimi (npr. superoksid-dismutaza, katalaza), velike molekule poput proteina, male molekule (npr. polifenoli, karotenoidi) i hormoni. U hrani glavne skupine spojeva s antioksidacijskom aktivnosti su vitamini (vitamin C, vitamin E), karotenoidi (karoteni, likopen, ksantofili) i polifenoli (flavonoli, flavoni, flavanoni, antocijanidini, izoflavoni, tanini, lignani).

2.6. Polifenoli

Polifenoli su kao biološka komponenta sveprisutni u biljnim organizmima i čine sastavni dio ljudske prehrane. Zanimljivi su zahvaljujući visokoj antioksidacijskoj aktivnosti. Odlikuju se sposobnošću neutraliziranja slobodnih radikala što postižu putem dva mehanizma. Prvi mehanizam je doniranje atoma vodika u reakciji sa slobodnim radikalom što rezultira nastajanjem stabilnijeg radikala izvedenog od antioksidansa, a drugi je preuzimanje elektrona sa slobodnog radikala te nastajanje stabilnijeg radikal-kationa i manje reaktivne vrste (Crozier i sur., 2007). Polifenoli se prema kemijskoj strukturi, broju fenolnih prstenova te ostalim strukturnim elementima koji tvore prstenove dijele u nekoliko većih skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Manach i sur., 2004). Fenolne kiseline i flavonoidi najzastupljanije su skupine prirodnih spojeva koje se ističu svojim antioksidacijskim djelovanjem.

Fenolne kiseline dijele se u dvije osnovne skupine: hidroksibenzojeve kiseline i hidrosicimetne kiseline i njihovi derivati. Struktura fenolnih kiselina je jednostavnija (jedan aromatski prsten), za razliku od druge velike skupine polifenolnih spojeva – flavonoida čiju strukturu čine 2 benzenska i jedan piranski prsten (Macheix i sur., 1990). U flavonoide koji su kao biljni pigmenti jako zastupljeni u prirodi spadaju flavanoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i antocijanidini. Na slici 3 prikazana je struktura nekih flavonoida.



Slika 3. Struktura flavonoida (Anonymous, 2018)

2.7. Mehanizmi antioksidacijskog djelovanja

Antioksidansi usporavaju oksidativne promjene mehanizmima uklanjanja slobodnih radikala, keliranjem metala, reduciranjem singletnog kisika te inaktivacijom fotosenzibilizatora.

Antioksidansi uklanjaju slobodne radikale tako što im predaju vodik što rezultira nastajanjem relativno stabilnog radikala antioksidansa (R• + AH → RH + A•). Antioksidans (AH) kao donor vodikovog atoma „hvata" slobodne radikale (R•), daje jedan elektron nesparenom elektronu slobodnog radikala i reducira ga čime ometa fazu propagacije te se ujedno zaustavlja ili inhibira lančana reakcija. Na početku nastaju slobodni radikali antioksidansa (A•) koji su stabilni. S obzirom da nastali radikal nema dovoljno energije za daljnju reakciju i nastajanje novih slobodnih radikala dolazi do prekida lančane reakcije oksidacije. Tipični predstavnici antioksidansa koji pokazuju takav mehanizam djelovanja su fenolne komponente. Učinkovitost antioksidansa u uklanjanju slobodnih radikala ovisi o energiji disocijacije veze između kisika i fenolnog vodika, konstanti disocijacije kiseline ako se antioksidans ponaša kao kiselina te redukcijskom potencijalu i delokalizaciji elektrona u radikalu izvedenom od antioksidansa (Mandić, 2017).

2.8. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet je povezan s koncentracijom komponenata uzorka koje su sposobne zaštititi biološki sustav od štetnih učinaka reakcija koje uključuju reaktivne spojeve

kisika ili dušika. Antioksidacijski kapacitet i antioksidacijska aktivnost dva su različita pojma. Antioksidacijska aktivnost neke tvari kinetički je pojam te se odnosi na brzinu kojom promatrana tvar reagira s nekom kisikovom ili dušikovom vrstom. Reakcijski uvijeti kao što su tlak, temperatura i pH u ovom slučaju izrazito su bitni s obzirom da imaju direktni utjecaj. Antioksidacijski kapacitet s druge strane daje informaciju o kumulativnom svojstvu uzorka u uklanjanju određene količine reaktivnih vrsta u određenom vremenu, no ne daje informaciju o brzini rekcija. S obzirom da različite metode mjerenja antioksidacijskog kapaciteta koriste različite reaktivne vrste isti uzorak dati će različite vrijednosti (Laguerre i sur., 2007).

Metode za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta dijelimo u dvije grupe: 1) metode temeljene na reakciji prijenosa vodika (HAT) i 2) metode temeljene na reakciji prijenosa elektrona (SET).

HAT metode mjere mogućnost antioksidansa u uklanjanju radikala doniranjem vodika. HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH vrijednosti te su uglavnom brze (nekoliko sekundi do nekoliko minuta). Metode koje se temelje na HAT mehanizmu su ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parametar)* i metoda izbjeljivanja krocina (*Crocin bleaching assay*) (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).

SET metode temelje se na određivanju mogućnosti antioksidansa da prijenosom elektrona reduciraju neku oksidativnu vrstu kao što su metalni kationi i reaktivne vrste. SET reakcije su pH ovisne jer ovise o standardnom potencijalu funkcionalne grupe te su uglavnom spore. Metode koje se temelje na SET mehanizmu su FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (redukcija 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikala) i TEAC (*TroloxEquivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).

2.8.1. ORAC

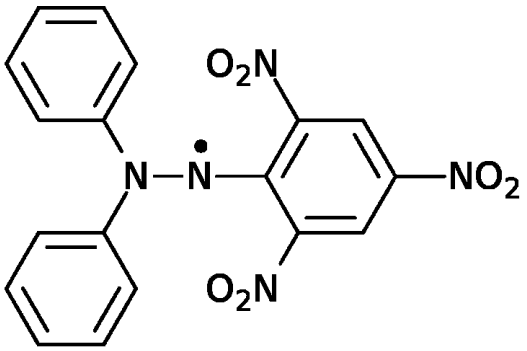
ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) je standardizirana metoda koja se temelji na HAT reakcijskom mehanizmu, a koristi se za određivanje kapaciteta raznih prehrambenih proizvoda. Reakcijska smjesa sadrži izvor peroksidnih radikala, fluorescentnu probu (oksidabilni proteinski supstrat), te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Izvor radikala je azo-spoj 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), koji se raspada na temperaturi od 37°C konstantnom brzinom te tako generira peroksidne radikale. Reakcijom slobodnih radikala i probe, proba se oksidira i prelazi

u nefluoroscentni oblik, odnosno dolazi do pada fluorescencije. Ako se u reakcijsku smjesu dodaju antioksidansi reakcija usporava s obzirom da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. U testu se kao standardna otopina koristi sintetski antioksidans Trolox (u vodi topljiv analog vitamina E). U ORAC testu izmjereni oksidacijski kapacitet se izražava kao Trolox-ekvivalent (TE). Valne duljine pri kojima se mjerenja provode su 485 nm i 520 nm (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).

Antioksidacijska aktivnost prati se usporedbom vremena potrebnog da dođe do pada fluorescencije, sa i bez dodatka uzorka. ORAC je jedina metoda koja kombinira stupanj i trajanje inhibicije u jednu vrijednost, te daje informacije o zaštitnom učinku antioksidanasa u dužem vremenskom periodu (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).

2.8.2. DPPH metoda

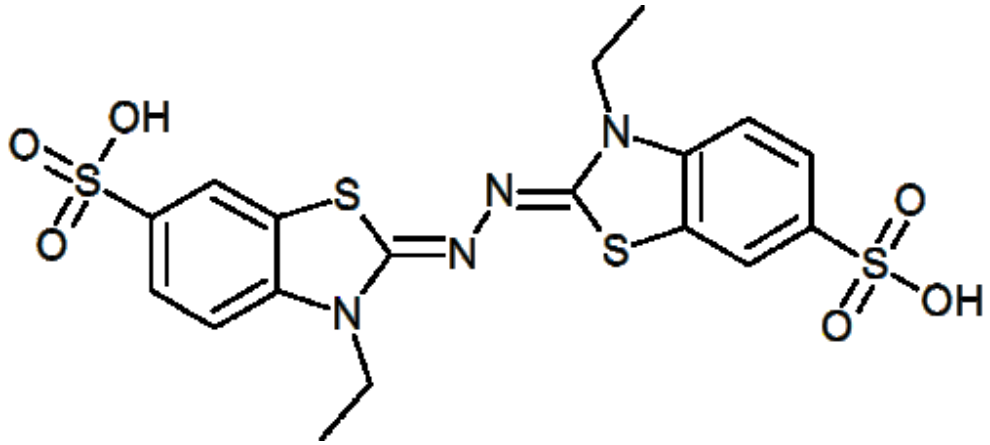
DPPH metoda se temelji na SET mehanizmu, te je jedna od najpoznatijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal prikazan na slici 4 je jedan od rijetkih organskih dušikovih radikala koji su vremenski stabilni. Daje otopinu tamno ljubičaste boje, a dodatkom antioksidansa otopina blijedi jer se slobodni radikal reducira u svijetlo-žuti difenilpikrilhidrazin. Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 515 - 528 nm, a kao konačna točka mjerenja u pravilu se uzima vrijednost nakon 60 minuta. Antioksidacijski kapacitet uzorka izračuna se na temelju postotka obezbojenja DPPH radikala (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).



Slika 4. DPPH radikal (Wikipedia, 2018)

2.8.3. ABTS metoda

ABTS metoda poznata je i pod imenom TEAC metoda (*TroloxEquivalent Antioxidant Capacity*) temelji se na SET mehanizmu, vrlo je slična DPPH metodi, a ima široku primjenu u određivanju antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima prehrambenih proizvoda. ABTS metoda koristi plavo-zeleni obojeni radikal (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), prikazan na slici 5, koji u reakciji a antioksidansima prisutnima u uzorku gubi boju što se prati pri valnoj duljini od 734 nm tijekom 6 minuta. Kod ABST odnosno TEAC metode antioksidacijski kapacitet uzorka dovodi se u vezu sa smanjenjem apsorbancije otopine uslijed smanjenja koncentracije ABTS kadikal - kationa. Rezultati testa izražavaju se kao Trolox-ekvivalenti (TE) (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).



Slika 5. ABTS (Wikipedia, 2018)

2.8.4. FRAP metoda

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reduciraju žuti kompleks željeza(III) sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+}-TPTZ. Spektrofotometrijsko mjerenje intenziteta plave boje prati se pri valnoj duljini od 593 nm 4 minute nakon dodatka antioksidansa u reakcijsku smjesu. Intenzitet boje proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Mandić, 2017; Thaipong i sur., 2006).

3. PRIMJENA VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA – PLAZME U PROCESIMA EKSTRAKCIJE

Općenito ekstrakcija je metoda razdvajanja i koncentriranja tvari te uključuje prijenos jedne ili više sastavnica iz materijala u kojem se nalaze u tekuću fazu, nakon čega slijedi separacija tvari iz tekuće faze. Postoje ekstrakcije čvrstih tvari sa tekućinom i ekstrakcija tekućine sa tekućinom. Ekstrakcija je temeljena na svojstvu tvari koje imaju različite koncentracije da kod dodira uzajamno difundiraju odnosno dolazi do prijenosa mase (Lloyd i van Wyk, 2012).

Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini materijala izloženog otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Promjenom spomenutih parametara može se utjecati na učinkovitost ekstrakcije.

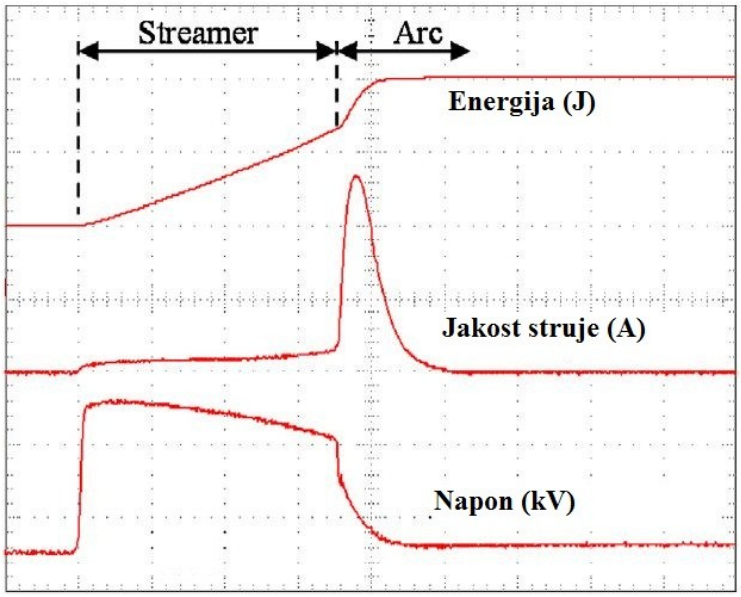
Konvencionalne metode ekstrakcije kao što su maceracija i ekstrakcija uz refluks dugotrajne su i troše velike količine otapala. Stoga se sve više koriste nove nekonvencionalne metode ekstrakcija kao što su ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalovima, visokim tlakom i pulsirajućim električnim poljem (Muredzi, 2012).

Visokonaponsko električno pražnjenje *(High voltage electrical discharge (HVED))* nova je ne-toplinska metoda koja je našla svoju primjenu uz ostalo i u ekstrakciji bioaktivnih komponenti. S obzirom da tijekom električnog pražnjenja dolazi do razaranja stanične strukture biološkog materijala, omogućuje se bolji kontakt otapala s materijalom odnosno dolazi do olakšane ekstrakcije bioaktivnih molekula (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Primjenom visokog napona između dvije elektrode u vodenoj otopini dolazi do tzv. *„električnog sloma*" koji utječe na fizikalne i kemijske promjene u svome okruženju. Formiranjem usmjerenog gibanja elektrona između elektroda uz odgovarajući izvor napona dolazi do pulsirajućeg električnog pražnjenja pri čemu se otpušta energija u okolinu što rezultira stvaranjem lokalizirane plazme koja emitira UV zračenje visokog intenziteta u vidljivom spektru.

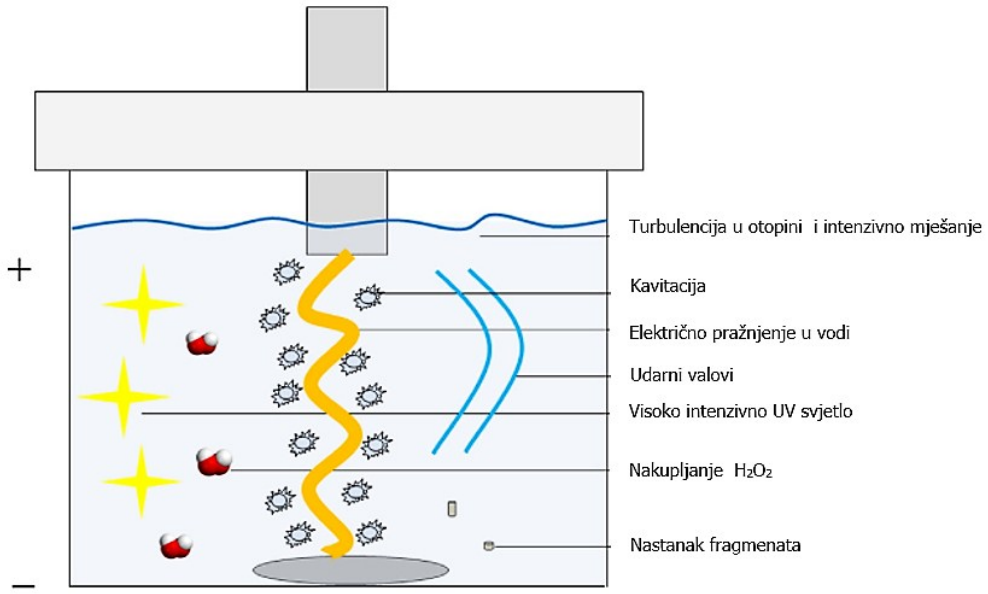
U sustavu s dvije elektrode i visokopulsirajućim električnim izvorom formiranje električnog pražnjenja sastoji se od dvije različite faze. Prva *„streamer*" faza podrazumjeva formiranje elektrovodljivog kanala ioniziranog plina. Na prelazku iz *„streamer*" faze u drugu *„arc*" fazu dolazi do naglog porasta jačine struje nakon čega slijedi električno pražnjenje

odnosno pad jačine struje pri čemu se oslobađa energija. Upravo *„arc"* faza dovodi do stvaranja lokalizirane plazme. Odnos napona, struje i energije sustava prikazan je na slici 6.



Slika 6. Odnos napona, struje i energije električnog pražnjenja (Boussetta i Vorobiev, 2014)

Za vrijeme *„arc"* faze također dolazi po formiranja udarnih valova visokog tlaka (90 – 100 bar) koji mogu izazvati oštećenje stanica biološkog materijala, istodobno formirajući hidroksilne radikale u procesu fotodisocijacije. Nakon formiranja udarnih valova dolazi do formiranja refrakcijskih valova koji su odgovorni za nastajanje kavitacijskih mjehurića ispunjenih plinom (slika 7). Urušavanjem nastalih kavitacijskih mjehurića nastaju sekundarni udari koji mogu dovesti do slabljenja i rupture staničnih struktura. Isti fenomeni mogu dovesti do fragmentacije tretiranog materijala na makroskopskom nivou i nastajanja turbulencije u tekućini što ubrzava procese izlaska biomolekula iz stanica biološkog materijala te pospješuje prijenos mase. Stupanj oštećenja biološkog materijala može se pratiti analizom elektroprovodljivosti nastale suspenzije s obzirom da se izlaskom bioaktivnih komponenata mjenja ionski sastav (Boussetta i Vorobiev, 2014).



Slika 7. Visokonaponsko pražnjenje između dvije elektrode u otopini (Rajha i sur., 2015)

Oprema za laboratorijsku ekstrakciju hladnom plazmom uključuje generator plazme s podesivim naponom i frekvencijom te reaktor spojen na izvor plina. Pripremljeni materijal miješa se s odgovarajućim otapalom te se dobivena smjesa ekstrahira u reaktoru određeno vrijeme. Na slici 8 prikazani su generator plazme IMP-SSPG-1200 i reaktor za ekstrakciju.

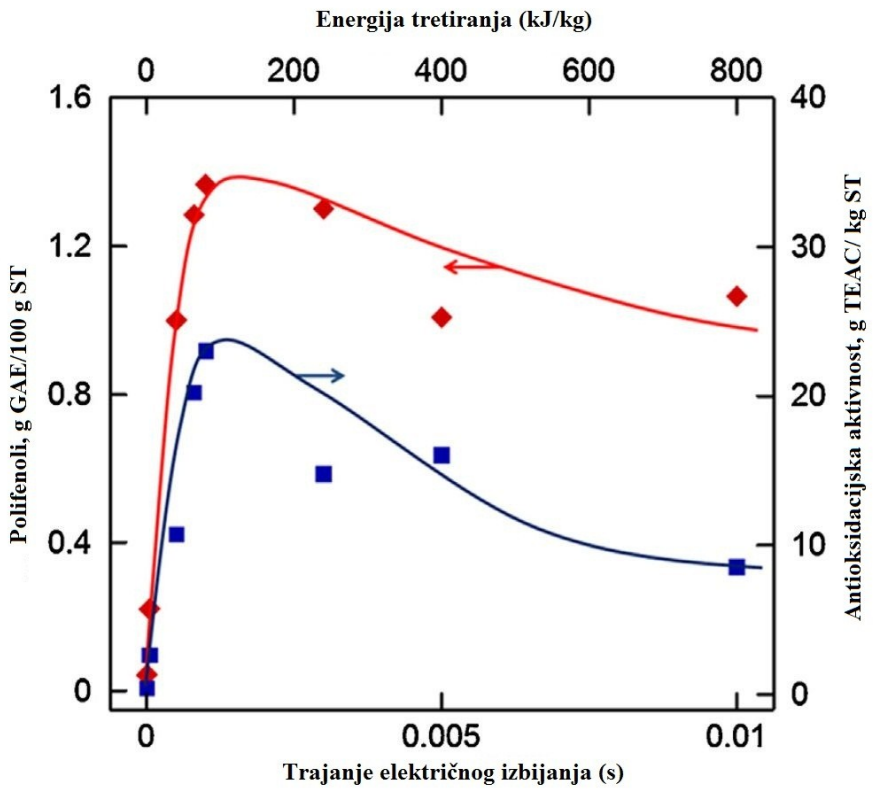
Slika 8. Plazma generator IMP-SSPG-1200 i reaktor (Anonymous, 2018)

Kao i kod konvencionalnih ekstrakcija, uspješnost korištenja visokonaponskog električnog pražnjenja za ekstrakciju bioaktivnih komponenti ovisi o odabranim uvjetima ekstrakcije (napon, temperatura, vrijeme) u skladu s materijalom koji se tretira i ciljanom komponentom koju želimo ekstrahirati. U tablici 5 prikazane su neke sirovine korištene u ekstrakciji uz navedene uvjete tretmana te rezultati prinosa. Podaci jasno pokazuju da tretiranje električnim pražnjenjem može rezultirati višim prinosom ciljanih komponenti uz kraće vrijeme tretiranja u odnosu na referentnu konvencionalnu ekstrakciju.

Tablica 5. Utjecaj električnog pražnjenja na ekstrakciju različitih bioaktivnih komponenti iz različitih bioloških materijala (Boussetta i Vorobiev, 2014)

Materijal	**Uvjeti tretmana** (ET: energija tretiranja; EtOH: otopina etanola u vodi; T:temperatura; t: vrijeme)	**Bioaktivne komponente** (ST: suha tvar; GAE: ekvivalent galne kiseline	**Relativan prinos** (u odnosu na referentnu ekstrakciju)
Komina grožđa	ET: 80 kJ/kg; 30% EtOH; 20 °C; 60 min	Ukupni fenoli: 2,8 g GAE/100g ST	11,2
Pokožica grožđa	ET: 53 kJ/kg; voda; 20 °C; 10 min	Ukupni fenoli: 0,5 g GAE/100g ST	18,0
Sjeme grožđa	ET: 53 kJ/kg; voda; 20 °C; 10 min;	Ukupni fenoli: 5,0 g GAE/100g ST	150,0
	ET: 69 kJ/kg; 30% EtOH; 50 °C; 60 min;	Ukupni fenoli: 9,0 g GAE/100g ST	1,5
Stabljika grožđa	ET: 53 kJ/kg; voda; 20 °C; 10 min	Ukupni fenoli: 0,3 g GAE/100g ST	6,0
Komorač	ET: 50 kJ/kg; voda; 20 °C; 80 min	Ukupna otopljena tvar: 90%	1,3
Listovi stevije	ET: 100 kJ/kg; voda; 55 °C; 60 min	Ukupna otopljena tvar: 92%	1,8
Palmina koštica	ET: 80 kJ/kg; voda; 20 °C	Prinos ulja: 11%	-
Palmin plod	ET: 240 kJ/kg; voda; 20 °C	Prinos ulja: 36%	-

Jedan od ključnih parametara za optimizaciju ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) je energija tretiranja uzorka. Slika 9 prikazuje rezultate znanstvenog rada Boussetta i Vorobiev (2014) koji su proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja. Iz prikazanih rezultata vidi se da prinos fenolnih spojeva i mjerena antioksidacijska aktivnost rastu do energije tretiranja od 80 kJ/kg nakon čega dolazi do pada istih. Daljnjim povećanjem energije počinju prevaladavati negativni učinci električnog pražnjenja što za posljedicu dovodi do pada prinosa ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.



Slika 9. Utjecaj primjene energije tretiranja uzorka na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost (Boussetta i Vorobiev, 2014)

Ovo se može objasniti pretpostavkom da prilikom povećanja energije HVED-a dolazi i do intenzivnijeg nastajanja visoko reaktivnih spojeva (hidroksil radikali, ozon) koji oksidiraju polifenole. Nastali hidroksil radikali reagiraju sa fenolnim spojevima pri čemu nastaju fenoksil radikali koji također mogu nastati i djelovanjem ultraljubičastog zračenja koje nastaje prilikom električnog pražnjenja. Nastali fenoksil radikali nadalje ulaze u reakcije sa hidroksil radikalima ili kisikom stvarajući pirokatehol, hidrokinon, 1,4-benzkinone i druge spojeve (Chen i sur., 2004).

Utjecaj dodatka drugih otapala u vodu također ima značajan efekt na učinkovitst ekstrakcije HVED-om. U svom istraživanju Boussetta i sur. (2013) pokazali su da dodatak etanola u vodu ima sinergistički-učinak kod prinosa ukupnih fenola iz kolača lana. Primjenom napona od 40 kV tokom 5 ms pri temperaturi od 20 °C koristeći čistu vodu kao otapalo ekstrakt tretiranog uzorka kolača lana sadržavao je 3,49 mg/g ukupnih polifenola. Dodatkom etanola volumnog udjela 25% pri jednakim uvjetima vremena tretiranja i temperature, prinos ukupnih polifenola popeo se na 4,33 mg/g kako prikazuje tablica 6. U ovom slučaju, može se

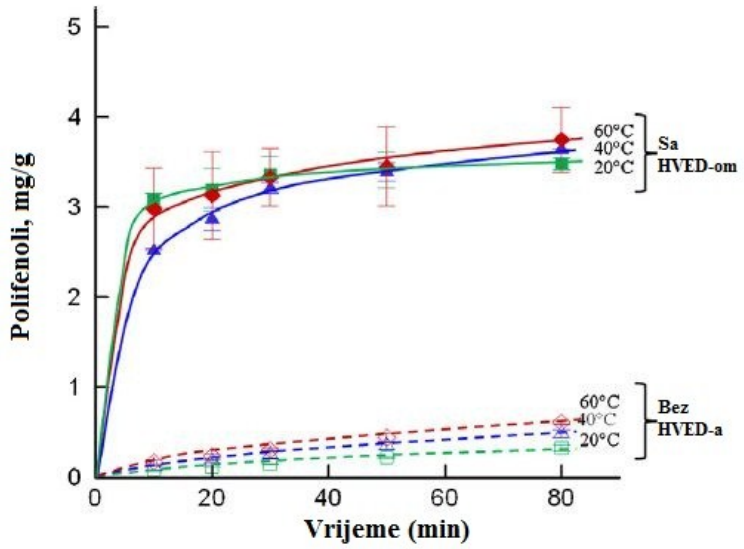
zaključiti da je etanol pospješio ekstrakciju polifenolnih spojeva. Zanimljivo je primjetiti rezultate prinosa ukupnih fenola ekstrakcijom bez tretmana HVED-a. Tokom 80 min pri temperaturi od 20 °C koristeći čistu vodu kao otapalo ukupan prinos polifenola bio je tek 0,33 mg/g. Dodatkom etanola tokom jednakog vremena ekstrakcije i jednake temperature prinos ukupnih polifenola se neznatno povećao na 0,51 mg/g.

Tablica 6. Utjecaj dodatka etanola na količinu ukupnih polifenola (određeni Folin–Ciocalteu metodom) ekstrahiranih iz kolača lana visokonaponskim električnim pražnjenjem (Boussetta i sur., 2013)

Udio etanola (%)	**Napon (kV)**	**Temperatura (°C)**	**Ukupni polifenoli** (mg/g)
0	0	20	0,33
0	0	40	0,49
0	0	60	0,61
25	0	20	0,51
25	0	40	1,15
25	0	60	1,55
0	40	20	3,49
0	40	40	3,64
0	40	60	3,75
25	40	20	4,33
25	40	40	4,70
25	40	60	4,71

U istom radu, autori (Boussetta i sur., 2013) su pratili i utjecaj povišene temperature na ukupni prinos polifenola. Mjerenja su rađena pri tri različite temparature: 20, 40 i 60 °C. Rezultati ukazuju kako porast temperature otapala nije značajno utjecao na prinos ukupnih fenola.

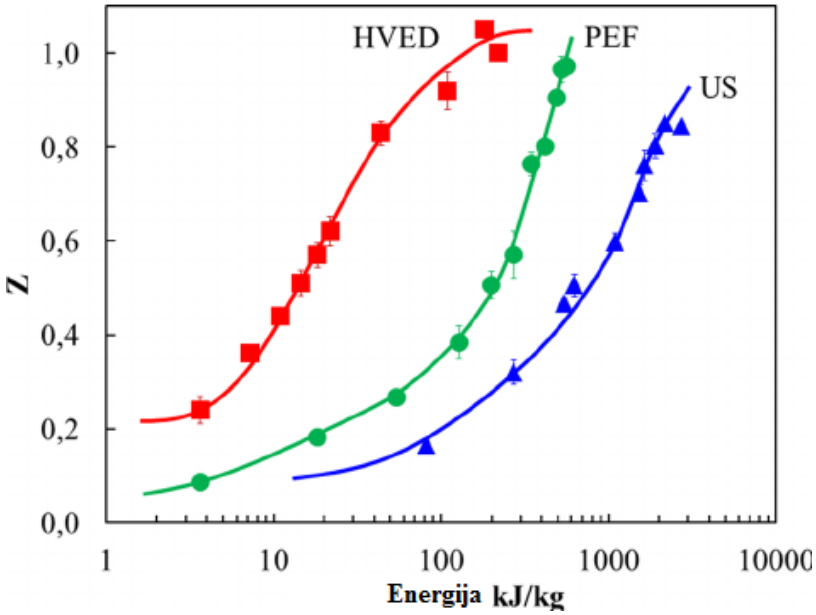
Slika 10 prikazuje razliku u količini ukupnih ekstrahiranih polifenola (mg/g) u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije sa i bez tretmana HVED-om u čistoj vodi.



Slika 10. Količina ukupnih ekstrahiranih polifenola (mg/g) u ovisnosti o vremenu i temperaturi ekstrakcije (Boussetta i sur., 2013)

Barba i sur. (2015) u svom su istraživanju usporedili učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva iz fermentirane komine grožđa ultrazvukom (US), pulsirajućim električnim poljem (PEF) i visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED). Osnovni mehanizam ekstrakcije navedenim metodama je razaranje staničnih struktura biološkog materijala, prvenstveno staničnih stijenki, čime se omogućuje veće prodiranje otapala u materijal, odnosno dolazi do direktnog kontakta otapala sa sadržajem stanice te se time povećava prijenos mase (Barba i sur., 2015). U navedenom radu, naglasak je osim na ekstrakciju polifenola bio i na ekstrakciju antocijana, antioksidacijski kapacitet kao i na ukupnu uloženu energija tijekom svih spomenutih metoda ekstrakcije. Kemijske metode korištene u radu: Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za određivanje udjela antocijana i DPPH metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta dobivenih ekstrakata. Uzorci su tretirani pri jednakim vrijednostima indeksa fragmentacije stanica Z koji je određivan u odnosu na električnu provodnost metodom predstavljenom u radu Lebovka i sur. (2002). Prema navedenoj metodi indeks Z=0 određuje netretirani stanični materijal dok se indeks Z=1 se odnosi na maksimalno fragmentirani stanični materijal.

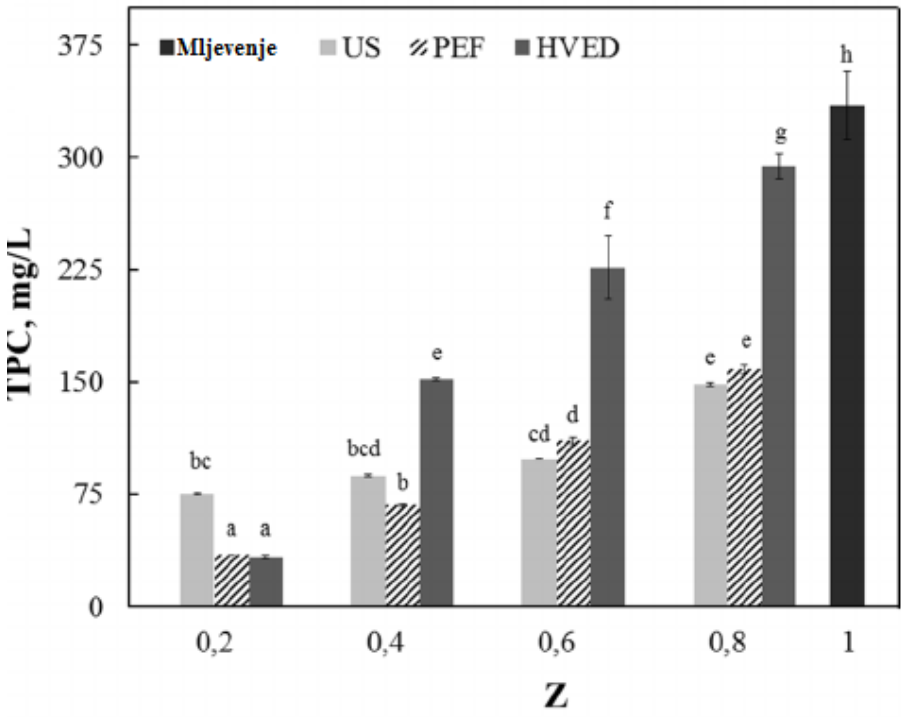
Na slici 11 prikazana je ovisnost indeksa Z o energiji izraženoj u kJ/kg kojom se tretirala komina grožđa.



Slika 11. Ovisnost indeksa fragmentacije stanica (Z) o energiji kojom se tretirala komina grožđa (Barba i sur., 2015)

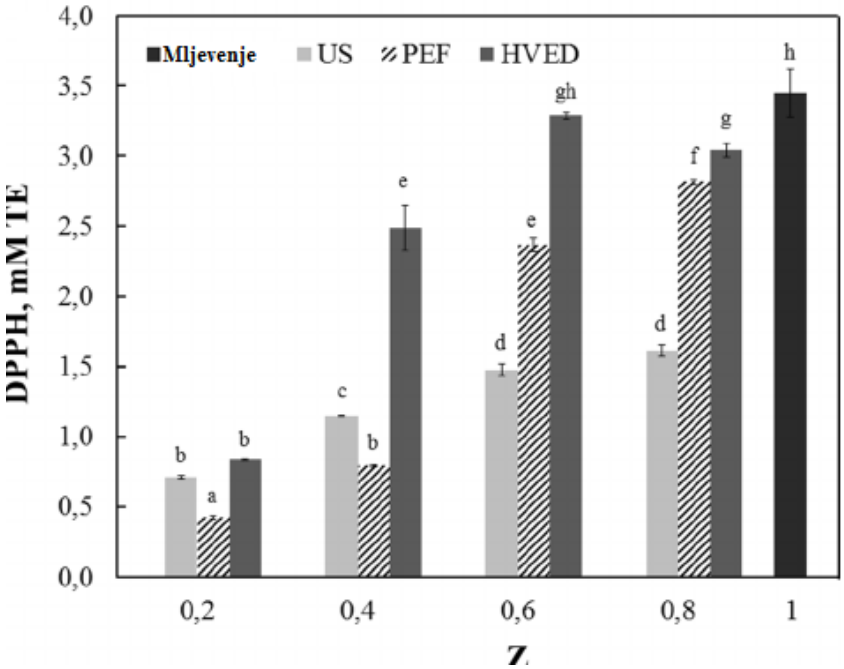
Iz slike se može zaključiti da je visokonaponsko električno pražnjenje (HVED) najučinkovitija metoda s obzirom da se s manje uložene energije postiže jednak učinak (veća fragmentacija) na tretirani materijal u odnosu na pulsirajuće električno polje (PEF) odnosno ultrazvuk (US) koji se pokazao kao najmanje energetski učinkovita metoda. Za referentni uzorak korištena je mljevena komina grožđa otopljena u vodi koja se kao otapalo koristila i u ostalim tretmanima.

Rezultati mjerenja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima komine grožđa također su pokazala da je HVED najučinkovitija metoda ekstrakcije obzirom na količinu ekstrahiranih polifenolnih spojeva bez obzira na stupanj fragmentacije biološkog materijala. Kako je prikazano na slici 12 za indekse fragmentacije 0,4 na više, primjenom HVED-a količina ekstrahiranih ukupnih fenola se povećava više od dva puta u odnosu na korištenje PEF-a odnosno US-a uz korištenje znatno manje količine energije.



Slika 12. Količina ukupnih fenolnih spojeva izraženih u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L nakon ekstrakcije ultrazvukom (US), pulsirajućim električnim poljem (PEF) i visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) (Barba i sur., 2015)

Izmjereni antioksidacijski kapaciteti, kako je prikazano na slici 13, također su bili najveći u uzorcima koji su dobiveni ekstrakcijom s HVED-om. Ipak antioksidacijski kapacitet ne pokazuje istu ovisnost o indeksu fragmentacije Z jer je pri vrijednostima Z=0,6 i Z=0,8 antioksidacijski kapacitet približno jednak.



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa izražen u mM Trolox ekvivalenta (TE) dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom (US), pulsirajućim električnim poljem (PEF) i visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) (Barba i sur., 2015)

Kao što je već spomenuto u istom radu (Barba i sur., 2015) autori su pratili i udio antocijana u uzorcima tretiranim spomenutim ne-toplinskim metodama. Pokazalo se da je HVED manje selektivan od PEF-a i US-a kada je u pitanju prinos ukupnih antocijana.

Za isti indeks fragmentacije stanica Z=0,8 prinos korištenjem PEF-a i US-a bio je znatno veći u odnosu na ekstrakciju HVED-om. Pri navedenom indeksu Z, PEF je imao najbolje rezultate s masenom koncentracijom antocijana od 63,47 mg/L dok se pri jednakim uvijetima ekstrakcijom HVED-om dobilo tek 40,64 mg/L. S druge strane, mjerenja dobivena pri indeksu fragmentacije Z=0,4 i Z=0,6 za sve tri metode ekstrakcije su skoro jednaka što opet daje prednost HVED-u zbog veće energetske učinkovitosti. Ovisnost ukupnih antocijana o Z vrijednosti za spomenute metode prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Usporedba učinkovitosti različitih metoda ekstrakcije na količinu ekstrahiranih ukupnih antocijana iz fermentirane komine grožđa (Barba i sur., 2015)

	Z vrijednost	**Ukupni antocijani** (mg/L)
Ultrazvuk (US)	0,2	14,73
	0,4	21,20
	0,6	31,23
	0,8	51,71
Pulsirajuće električno polje (PEF)	0,2	11,89
	0,4	11,61
	0,6	46,29
	0,8	63,47
Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED)	0,2	10,45
	0,4	21,44
	0,6	32,53
	0,8	40,64

Jedan od ključnih čimbenika pri odabiru prikladne metode za ekstrakciju ciljane komponente uz ukupni prinos je i ukupni utrošak energije. U tablici 8 prikazana je potrošnja energije u kJ po mg dobivenih ukupnih polifenola uz odgovarajući indeks Z, prilikom tretmana ultrazvukom (US), pulsirajućim električnim poljem (PEF) i visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED).

Tablica 8. Usporedba utroška energije tijekom ekstrakcije polifenolnih spojeva različitim metodama (Barba i sur., 2015)

Z	**Metoda tretmana**	**Potrošnja energije** (kJ/mg ukupnih polifenola)	**Potrošnja energije** (kJ/mg ukupnih antocijana)
0,2	US	1,20	6,14
	PEF	0,58	1,69
	HVED	0,12	0,38
0,4	US	3,44	14,16
	PEF	1,62	9,59
	HVED	0,08	0,56
0,6	US	6,99	22,10
	PEF	2,71	6,50
	HVED	0,11	0,74
0,8	US	11,32	32,49
	PEF	2,91	7,26
	HVED	0,16	1,18

Kao što je već ranije spomenuto, a vidi se i iz rezultata koje su objavili Barba i sur. (2015) (tablica 8) tretiranje HVED-om je energetski najučinkovitija metoda ekstrakcije u usporedbi s US-om i PEF-om. HVED se pokazao izrazito energetski učinkovitim pri svim Z vrijednostima pogotovo pri indeksu Z=0,4. S druge strane ekstrakcija US-om zahtijevala je značajne količine energije prvenstveno pri niskoj fragmentaciji materijala.

Utjecaj pH vrijednosti na količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva, kao i na antioksidacjsku aktivnost dobivenih ekstrakata istraživali su Roselló-Soto i sur. (2014) u svom radu. Ekstrakcija fenolnih spojeva visokonaponskim električnim pražnjenjem uz podešavanje pH vrijednosti i dodatak etanola provedena je iz koštica maslina. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Utjecaj pH vrijednosti i dodatka etanola na količinu ukupnih fenola (mg GAE/L) i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata (mM TE) dobivenih ekstrakcijom HVED-om iz koštica masline (Rosello-Soto i sur., 2014)

Energija (kJ/kg)	**pH**	**Udio EtOH** (%)	**Ukupni fenoli** (mg GAE/L)	**ABTS** (mM TE)	**DPPH** (mM TE)
0	2,5	0	264	5,17	4,14
0	2,5	50	520	7,56	5,93
0	12	0	317	5,47	4,30
0	12	50	368	2,46	1,90
109	2,5	0	209	4,67	3,60
109	2,5	50	608	7,83	6,07
109	12	0	230	4,00	3,01
109	12	50	503	8,59	6,79

Kao što se može vidjeti, rezultati ovog istraživanja pokazali su da je najviše ukupnih fenola ekstrahirano u području kiselog pH uz dodatak etanola i primjenom HVED-a (608 mg GAE/L). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koje su proveli Parniakov i sur. (2014) koji su proveli ekstrakciju polifenola iz kore papaje. Što se tiče rezultata mjerenja antoksidacijske aktivnosti koja se mjerila dvjema metodama (ABTS, DPPH) najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci tretirani HVED-om uz dodatak etanola od 50% i pH otopine u lužnatom području (pH=12). Može se zaključiti da lužnato područje više odgovara spojevima koji posjeduju antioksidacijski učinak.

4.ZAKLJUČCI

1. Metoda visokonaponskog pražnjenja pogodna je za ekstrakciju fenolnih spojeva.
2. Promjenom parametara napona, frekvencije i vremena tretiranja može se utjecati na učinkovitost ekstrakcije.
3. Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem utječe na očuvanje ukupnih fenola u ekstraktu.
4. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih visokonaponskim električnim pražnjenjem značajno se ne mijenja.
5. Obzirom da se radi o novoj tehnologiji potrebna su daljnja istraživanja antioksidacijskog učinka ekstrakata dobivenih visokonaponskim pražnjenjem.

5. LITERATURA

Barba F.J., Brianceau S., Turk M., Boussetta N., Vorobiev E. (2015) Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace, *Food Bioprocess Technol,* 8: 1139-1148

Bittencourt J.A. (2004) Fundamentals of Plasma Physics, 3. izd., Springer. str. 1-2.

Boussetta N., Turka M, Taeyec C.D., Larondellec Y., Lanoiselléd J.L., Vorobiev E. (2013) Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake, *Industrial Crops and Products*, 49: 690-696

Boussetta N. i Vorobiev E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review, *C. R. Chimie*, 17: 197–203

Chen, Y.-S., Zhang, X.-S., Dai, Y.-C., & Yuan, W.-K. (2004), Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution, *Separation and Purification Technology*, 34(1–3): 5–12

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2007) Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, 1. izd., Blackwell Publishing. str. 1-21.

Fridman A. (2008) Plasma Chemistry, 1. izd., Cambridge University Press. str. 1-11.

Jat D., Rajak R., Hasan W., Manisha (2017) Oxidative Stress and Antioxidants: An Ovreview, *International Journal of Advanced Research and Review*, 2(9): 110-119

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges, *Prog. Lipid Res*. 46, 244-282

Lebovka N.I., Bazhal M., Vorobiev E. (2002) Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields, *Journal of Food Engineering* 54(4): 337-346

Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, CRC Press. str. 1-24

Macheix J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

Manach , C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, c., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr* 79: 727-747

Mandić V. (2017) Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, str. 2-14.

Mir S.A., Shah M.A., Mir M.M. (2016) Understanding the Role of Plasma Technology in Food Industry, *Food Bioprocess Technol*, 9: 734–750

Misra N.N. (2016) Quality of Cold Plasma Treated Plant Foods, Cold Plasma in Food and Agriculture, Academic Press. str. 253-271.

Muredzi P. (2012) Emerging Non-thermal Food Processing Technologies, 1. izd., CBH Books. str. 199-213.

Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Lebovka N., Vorobiev E. (2014) Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels, *Food Research International*, 65: 337–343

Pankaj S.K., Wan Z., Colonna W., Keener K.M. (2017) Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality, *J Sci Food Agric*, 97: 4016-4021

Pine S.H. (1994) Organska kemija, 3. izd., Školska knjiga. str. 909-943.

Rajha H., Boussetta N., Louka N., Maroun R. G., Vorobiev E. (2015.) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31: 60-66

Roselló-Soto E., Barba F.J., Parniakov O., Galanakis C.M., Lebovka N., Grimi N., Vorobiev E. (2014) High Voltage Electrical Discharges, Pulsed Electric Field, and Ultrasound Assisted Extraction of Protein and Phenolic Compounds from Olive Kernel, *Food Bioprocess Technol* 8: 885-894

Sarangapani C., Yamuna D., Thirumdas R., Annapure U.S., Deshmuk R.R. (2015) Effect of low-pressure plasma on physico-chemical properties of parboiled rice, *LWT - Food Sci Technol*, 63(1): 452–460

Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice, *Medicina*, 43: 84-93

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Marko Čombor

ime i prezime studenta