

Primjena otpada nastalog konzumiranjem espresso kave pri izradi pektinskih biofilmova

Vujnović, Angela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:938631>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Angela Vujnović
7338/PT

**PRIMJENA OTPADA NASTALOG KONZUMIRANJEM ESPRESSO
KAVE PRI IZRADI PEKTINSKIH BIOFILMOVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

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

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Primjena otpada nastalog konzumiranjem espresso kave pri izradi pektinskih biofilmova

Angela Vujnović, 0058209405

Sažetak: Ekstrakcija fenola i flavonoida iz espresso kave i otpada nastalog nakon njena konzumiranja provedena je pomoću mikrovalova pri $T = 50$ i 70 °C, $t = 5$ i 10 minuta i φ (etanol) = 50 i 70 %. Spektrofotometrijskom analizom je utvrđeno da espresso kava sadrži $38,75$ do $51,40$ mg/g, a otpad $4,55$ do $6,90$ mg/g ukupnih fenola.

Budući da temperatura od 70 °C, vrijeme od 5 minuta i 70 %-tni etanol dovode do optimalne ekstrakcije fenola iz otpada kave, navedeni parametri su korišteni kod pripreme 5 , 10 i 20 %-tnih ekstrakata, koji su zatim inkorporirani u pektinske biofilme. Njihovom karakterizacijom je utvrđeno da dodatak ekstrakata otpada utječe na promjenu boje, čvrstoće i elastičnosti biofilmova, pa tako uzorak s 20 %-tnim ekstraktom u odnosu na 5 i 10 %-tne pokazuje najveću čvrstoću i elastičnost. Time je pokazano da se i otpad kave može efikasno iskoristiti pri izradi jestivih i funkcionalnih biofilmova.

Ključne riječi: *biofilm, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, pektin, polifenoli, teksturalna svojstva, UV/Vis spektrofotometrija*

Rad sadrži: 31 stranica, 10 slika, 9 tablica, 36 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. *Antonela Ninčević Grassino*

Datum obrane: 9. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Appliance of espresso coffee waste in preparing pectin biofilms

Angela Vujnović, 0058209405

Abstract: Extraction of phenols and flavonoids from espresso coffee and its waste remained after consumption was assisted by microwave irradiation at $T = 50$ and 70 °C, $t = 5$ and 10 minutes and φ (ethanol) = 50 and 70 %. Spectrophotometric analysis has shown that content of total phenols in espresso coffee is $38,75$ to $51,40$ mg/g and in waste $4,55$ to $6,90$ mg/g. Since temperature of 70 °C, time of 5 minute and φ (ethanol) = 70 % led to optimal extraction of phenols from coffee waste, these parameters have been applied for preparation of 5 , 10 and 20 % extracts, which subsequently have been incorporated in pectin biofilms. Their analyses have shown that addition of coffee waste extracts affects colour, strength and elasticity of biofilms, and sample with 20 % extract in comparison to 5 and 10 % showed the highest strength and elasticity. This has been shown that coffee waste can be used for preparation of edible and functional biofilms.

Keywords: *biofilm, microwave assisted extraction, pectin, polyphenols, textural properties, UV/Vis spectrophotometry*

Thesis contains: 31 pages, 10 figures, 9 tables, 36 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: Assistant Professor, PhD, *Antonela Ninčević Grassino*

Defence date: September 9th, 2019.

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Kava	2
2.2. Polifenoli	2
2.2.1. Fenolne kiseline	3
2.2.2. Flavonoidi	4
2.3. Mikrovalovi	4
2.4. Pektin	5
2.5. Biofilmovi	6
2.6. UV/Vis spektrofotometrija	6
2.7. Kolorimetrija	7
2.8. Teksturalna svojstva	7
3. Materijali i metode	9
3.1. Materijali	9
3.2. Kemikalije	9
3.3. Aparatura i pribor	10
3.4. Metode rada	10
3.5. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka svježeg kave i otpada pomoću mikrovalova	11
3.6. UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	11
3.6.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola	12
3.6.2. Postupak određivanja ukupnih fenola	12
3.7. UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida	12
3.7.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida	13
3.7.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida	13
3.8. Priprema pektinskih biofilmova	14
3.8.1. Priprema ekstrakata otpada kave	14
3.8.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave	14
3.8.3. Postupak pripreme pektinskih biofilmova	14
3.9. Karakterizacija pektinskih biofilmova	15
3.9.1. Određivanje parametara boje	15
3.9.2. Određivanje teksturalnih svojstava	16
4. Rezultati i rasprava	17

4.1.	Oređivanje ukupnih fenola u uzorcima kave i otpada.....	17
4.2.	Određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kave i otpada.....	20
4.3.	Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave namijenjem za izradu biofilmova	23
4.4.	Određivanje boje pektinskih biofilmova	24
4.5.	Određivanje teksturalnih svojstava pektinskih biofilmova.....	25
5.	Zaključak	28
6.	Literatura	29

1. Uvod

Kava je najkonzumiraniji napitak na svijetu zbog jedinstvenih senzoričkih svojstava, jednostavnosti pripreme i nutritivnog sastava. Tako je svjetska proizvodnja kave tijekom 2017. i 2018. godine dosegla vrijednost čak od 168. 05 milijuna vreća (International Coffee Organisation, 2018).

Kava je bogata polifenolima koji imaju antioksidativno, hepatoprotektivno, antiviralno i hipoglikemijsko djelovanje (Farah i Donangelo, 2006). Polifenoli prisutni u sirovoj kavi sudjeluju u Maillardovim reakcijama koje nakon njena prženja daju mljevenom, konzumnom, proizvodu osebujan miris, okus i boju.

Budući da se vrijednost proizvodnje kave i njene konzumacije iz godine u godinu povećava i količina čvrstog ostatka zastalog nakon pripreme napitaka od kave raste, te ga treba na pravilan način zbrinuti.

Čvrsti ostatak (otpad) predstavlja sirovinu s značajnim udjelom fenolnih spojeva, poput klorogenske i kafeinske kiseline, kao i mnogobrojnih drugih bioaktivnih spojeva do čije ekstrakcije ne dolazi u potpunosti (Pandey i sur., 2000), a ovisi o načinu i uvjetima pripreme napitka od kave, vrsti kave i njezinoj prethodnoj preradi.

Uviđajući da se otpad kave može efikasno upotrebiti za ugrađivanje u mikrobiološke kulture (Pérez-Morales i sur., 2011), enzimsku ekstrakciju hidrokisicinamičnih kiselina (Torres-Mancera i sur., 2011) i proizvodnju etanola (Harsono i sur., 2015) njegov značaj i primjena danas dobiva sve veću važnost.

Sukladno navedenim istraživanjima, a u cilju iskorištavanja otpada kave nagomilanog tijekom tradicionalnog postupka pripreme espresso kave kao potencijalnog izvora fenola, u ovom radu su:

- pripremljeni 50 i 70 %-tni etanolni ekstrakti otpada primjenom mikrovalnog zračenja u trajanju od 5 i 10 minuta, na temperaturi od 50 i 70 °C,
- određeni maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima otpada primjenom UV-Vis spektrofotometrije,
- određeni optimalni parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koji su korišteni kod ponovne pripreme ekstrakata otpada i njihove inkorporacije u pektinske biofilmove.

U konačnici, određen je i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida i u samoj espresso kavi radi valorizacije otpada kave kao jeftinog, do sada neiskorištenog izvora polifenola.

2. Teorijski dio

2.1. Kava

Kava (*Coffea*) je tropska, samonikla i zimzelena drvolika biljka iz porodice bročeva (*Rubiaceae*) kojoj pripadaju 73 vrste (Šimunac, 2004). Grm kave ima kožnate, tamno-zelene, sjajne i duguljaste listove, te plodove bobičastog izgleda skupljene u grozdove. Pradomovinom kave se smatra Etiopija, a njena kultivacija obuhvaća i Aziju i Južnu Ameriku. Danas su najveći izvoznici kave Brazil, Vijetnam, Etiopija i Kolumbija. Raznolikost reljefa na kojima kava može rasti pridonosi različitom izgledu, okusu i nutritivnom sastavu ploda kave (Slika 1). Premda prema botaničkoj klasifikaciji kave postoji pet grupa (Šimunac, 2004), u gospodarstvu i konzumaciji navažnije su *Coffea arabica* L. i *Coffea canephora* L. var. *robusta*. Preostale tri grupe kave, *Coffea excelsa* L., *Coffea liberica* L. i *Coffea stenophylla* L. nisu doživjele proizvodnju u velikim količinama.



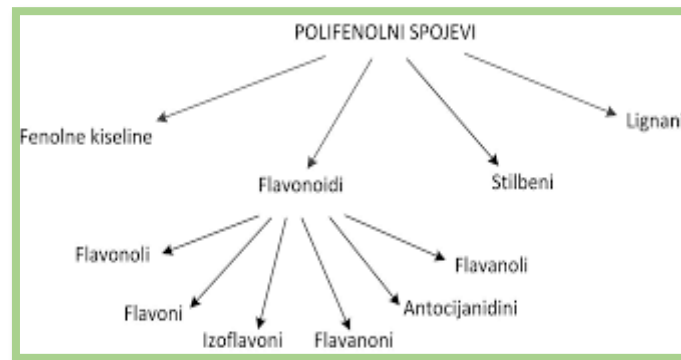
Slika 1. Plod kave (The University of British Columbia).

2.2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti biljnih vrsta. Predstavljaju jednu od najbrojnih skupina spojeva u carstvu *Plantae*. Imaju zaštitnu ulogu od UV zračenja i patogena, izvori su pigmentacije i antioksidacijskog djelovanja (Manach i sur., 2004). Polifenoli su također nositelji gorkog i trpkog okusa kod pojedinih namirnica kao što su kakao, čaj i kava. Sadržaj i količina polifenola u biljci ovisi o vrsti, uzgoju, stupnju zrelosti, okolišu, uvjetima prerade i skladištenja.

Polifenoli su spojevi kod kojih je hidroksilna skupina vezana na aromatski ili benzenski prsten, pa njihova bioaktivnost ovisi o položaju i broju hidroksilnih grupa vezanih na prsten. Fiziološko djelovanje na ljudski organizam je antioksidacijsko, pri čemu se njime smanjuje mogućnost oboljevanja od nekih bolesti potaknutim oksidacijskim stresom kao što su rak i kardiovaskularne bolesti.

Polifenoli su klasificirani u različite skupine, s obzirom na broj prstena u svojoj strukturi, te u različite podskupine, na temelju specifičnih supstitucija u osnovnoj strukturi. Osnovna podjela polifenola prikazana je na Slici 2.

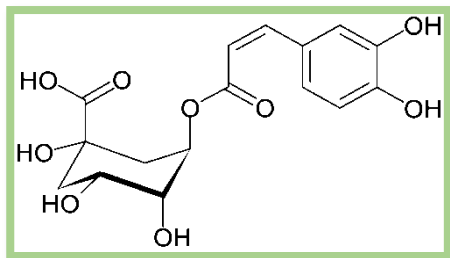


Slika 2. Kategorizacija polifenola (Krešić, 2017).

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele u dvije grupe: derivati hidroksicimetne kiseline i derivati hidroksibenzojeve kiseline (Robbins, 2003). Biološka aktivnost fenolnih kiselina raste s porastom hidroksilnih skupina vezanih na prsten/e zbog mogućnosti prelaska u fenoksid radikal/e.

Sirova kava predstavlja jedan od najbogatijih izvora klorogenske kiseline (Slika 3) čiji udjel varira od 4 do 14 % ovisno o sorti i zrelosti (Farah i Donangelo, 2006). Klorogenska kiselina je termolabilan spoj i tijekom prženja se velikim dijelom raspada na fenolne derivate, kvinolaktate i spojeve manje molekulske mase (Farah i Donangelo, 2006). Osim klorogenske u kavi je nađena i kofeinska kiselina s udjelom od 0,53 do 2,31 % (Farah i Donangelo, 2006). Pokazuje značajan antioksidacijski potencijal, pa može pridonijeti prevenciji karcinoma, ateroskleroze i drugih srčanih oboljenja (Magnani i sur. 2014).

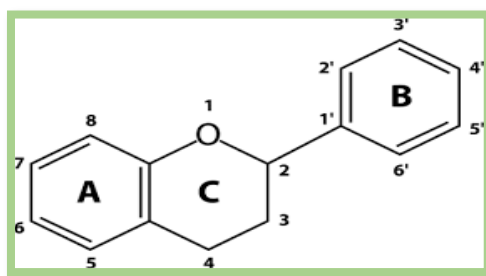


Slika 3. Struktura klorogenske kiseline (Anonimus 1).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća podskupina fenolnih spojeva prisutnih u svim dijelovima biljaka. Ovoj grupi pripada više od 8000 spojeva (Pietta, 2000), čija je osnovna kemijska struktura 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ol (Slika 4).

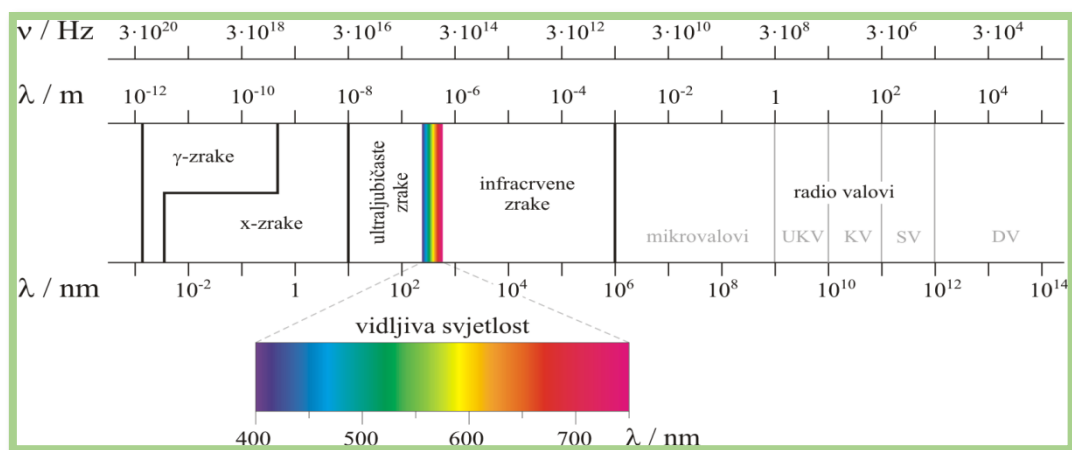
Flavonoidi se s obzirom o broj i položaj hidroksilnih skupina, stupanj nezasićenosti i stupanj oksidacije središnjeg C - prstena dijele na flavonole, flavanole, flavone, izoflavone flavane i proantocijanide (Manach i sur., 2004). Njihovo terapijsko djelovanje na ljudski organizam je antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno.



Slika 4. Kemijska stuktura flavonoida (Anominus 2).

2.3. Mikrovalovi

Mikrovalovi predstavljaju oblik elektromagnetskih vibracija, u području frekvencija između 300 MHz do 300 GHz (Slika 5). Sastoje se od električnog i magnetskog polja kod kojeg magnetsko polje ima toplinski utjecaj (Blekić i sur., 2011). Zagrijavanje mikrovalova se temelji na ionskom i dielektričnom mehanizmu. Ionski mehanizam uključuje gibanje iona prisutnih u uzorku, dok dielektrični gibanje vode pri frekvencijama od 60 do 100 Hz. Prijenos topline ovisi o stupnju pobuđenosti molekula u mediju i frekvenciji polja kojem je taj medij izložen.



Slika 5. Elektromagnetski spektar (Anominus 3).

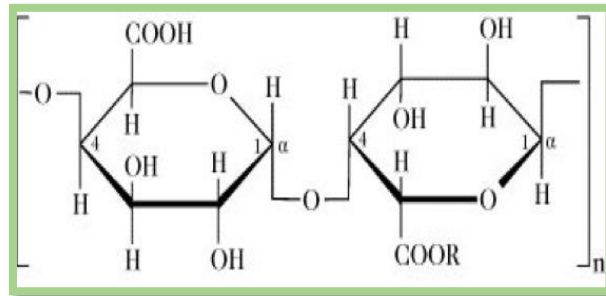
Ekstrakcija potaknuta mikrovalovima se najviše upotrebljava u vodenim sustavima, gdje se pod utjecajem temperature prisutna voda zagrijava i isparava, stvarajući pritisak na stanicu. Uslijed njezinog bubrenja dolazi do pucanja stijenke, te povećanja difuzije analita (Mandal i sur., 2006). Osim temperature na uspješnost ekstrakcije još utječu i vrsta i volumen otapala, vrijeme, energija mikrovalova, te veličina čestica uzorka. Tako je za uspješno provođenje ekstrakcije optimalna veličina od 100 μm do 2 mm (Mandal i sur., 2006). Smanjenjem veličine čestica se povećava dodirna površina i time interakcija otapala s uzorkom. Iako je vrijeme ekstrakcije proporcionalno količini otopljenog analita, dulji period izlaganju uzorka mikrovalima može ipak dovesti do degradacije uzorka i analita.

U odnosu na klasične metode ekstrakcije (npr. refluksiranje i Soxhlet) prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su kraće vrijeme ekstrakcije (od nekoliko sekundi do nekoliko minuta), upotreba manjih volumena otapala (čak i nekoliko mililitara) što ju čini ekološki prihvatljivom tehnikom. Automatski način rada i pogodnost ekstrakcije i termolabilnih sastojaka, teških metala i pesticida su još neki od razloga njene primjene.

2.4. Pektin

Pektinske tvari je zajednički naziv za anionske heteropolimere smještene u središnjoj lameli i primarnoj staničnoj stijenci (Herceg, 2011). Izvore pektinskih tvari predstavljaju jabuka, naranča i limun. Glavni lanac pektina čine D-galakturonske kiseline povezane α-1,4-vezama, djelomično esterificirane metanolom i mjestimično prekinute L-ramnozom (Slika 6). Bočni lanac čine D-galaktoza i L-arabinoza.

Pektin se ponajviše primjenjuje u industriji voća i povrća pri izradi želiranih proizvoda. Također, koristi se i kao dodatak u zamrznutoj hrani, a u posljednje vrijeme i kao zamjena za šećer ili masti u hrani smanjenje kalorijske vrijednosti (Thakur i sur., 1997).



Slika 6. Struktura pektina (Anominus 4).

2.5. Biofilmovi

Biofilmovi su definirani kao fleksibilni, zaštitni filmovi pripremljeni od prirodnih polimera životinjskog i biljnog podrijetla kao što su proteini i polisaharidi. Koriste se u medicinske, farmaceutske i prehrambene svrhe (Duraković i sur., 2009), a primjena im ovisi o mehaničkim svojstvima (snaga i fleksibilnost), svojstvima selektivnosti (permeabilnost za vodenu paru), topljivosti u vodi itd.

U sastav biofilмова ulaze polimeri, plastifikatori i sredstva za umrežavanje (Seixas i sur., 2013). Najčešće upotrebljavani polimeri pri izradi biofilмова su pektin i alginati, pojedinačno ili u kombinaciji. Koriste se zbog niske cijene, dobre sposobnosti želiranja, biokompatibilnosti i netoksičnosti, te lake kemijske i biokemijske modifikacije. Plastifikatori, poput glicerola, imaju funkciju povećanja fleksibilnosti filma smanjenjem unutarnjih vodikovih veza i povećanja volumena kako bi se omogućila difuzija kisika i vodene pare (Seixas i sur., 2013). Sredstvo za umrežavanje, najčešće kalcijev klorid, utječe na topljivost biofilмова tako da kalcijevi ioni potiču interakciju između šupljina polimera.

2.6. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je instrumentalna metoda koja se temelji na interakciji spojeva s vidljivim i ultraljubičastim elektromagnetskim zračenjem valnih duljina između 200 i 800 nm (Skoog i sur. 1992). Tijekom interakcije elektromagnetskog zračenja s analitom dolazi do

pobuđivanja elektrona. Elektroni koji mogu apsorbirati zračenje su n elektroni, karakteristični za spojeve s dušikom, kisikom ili sumporom, te π elektroni karakteristični za spojeve s dvostrukim vezama.

Instrument korišten u detekciji i identifikaciji spojeva je UV/Vis spektrofotometar. Odnos apsorpcije zračenja i koncentracije uzorka može se opisati Lambert Beerovim zakonom koji predstavlja temelj kvantitativne spektrofotometrijske analize (1):

$$A = \varepsilon b c \quad (1)$$

A predstavlja apsorbanciju, ε molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm mol), c koncentraciju uzorka (mol/L) i b duljinu putovanja svjetlosti (cm).

2.7. Kolorimetrija

Najčešći korišteni sustavi boja u kolorimetrijskim metodama su XYZ i CIE $L^*a^*b^*$ skala. Razlika između navedena sustava boja jest manja vizualna uniformnost XYZ sustava u odnosu na CIE $L^*a^*b^*$ sustav. Forma CIE $L^*a^*b^*$ skale je kubična i čine je L , a i b koordinata. Raspon vrijednosti za L koordinatu je od 0 (crna boja) do 100 (bijela boja). ΔL predstavlja razliku L vrijednosti između standarda i uzoraka, pri čemu njegova pozitivna vrijednost znači da je uzorak svjetliji od standarda, a negativna da je tamniji. Negativna a koordinata predstavlja crvenu, a pozitivna zelenu boju. Negativna b koordinata je žuta, a pozitivna plava.

2.8. Teksturalna svojstva

Pored hranjivog sastava, okusa i izgleda proizvoda, i tekstura predstavlja jedan od važnih faktora u konačnoj kvaliteti proizvoda, te njegovom prihvaćanju od strane potrošača. Teksturalna svojstva hrane sastoje se od nekoliko parametra, a objektivna mjerenja se dobivaju pomoću parametra brzine, vremena i mase. Osjećaju se primarno osjetom dodira i nisu povezana s okusom ili mirisom samog proizvoda. Definiiraju se kao (Bourne, 2002 i Lelas, 2006):

- skupina fizikalnih parametara nastalih kao posljedica strukture hrane, točnije kemijskog sastava i fizikalnih veza unutar materijala važnim za definiranje njegove mikrostrukture,

- reološka, odnosno mehanička svojstva hrane, no pri tome nisu uključena magnetska, optička i električna svojstva.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Espresso kava „Kimbo“ (Salerno, Italija) pripremljena je na tradicionalni talijanski način (u posudi kafetijeri) i čvrsti ostatak zaostao kuhanjem, kvantitativno odvojen i osušen na sobnoj temperaturi.



Slika 7. Espresso kava „Kimbo“ (a) i Otpad kave „Kimbo“ (b).¹

3.2. Kemikalije

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bezvodni kalcijev klorid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Pektin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)

¹ Sve slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Analizator teksture TA HDPlus (Stable Mycro System, Engleska)
- Kolorimetar CM - 3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, START S Microwave Labstation for Synthesis, Bergamo, Italija)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka od 50 mL
- Filter papir
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 100 mL
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Odmjerne tikvice od 10, 25 i 100 mL
- Petrijeva zdjelica
- Propipeta
- Stakleni lijevak
- Staklena čaša od 50 mL
- Stakleni štapić
- Tikvice s okruglim dnom od 50 mL

3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su sljedeće metode:

- mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz kave i njena otpada,
- UV/Vis spektrofotometrija određivanja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kave i otpada, i
- priprava pektinskih biofilmova bez i s inkorporiranim polifenolnim ekstraktima otpada kave uz njihovu karakterizaciju određivanjem boje i teksturalnih svojstava.

3.5. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka svježe kave i otpada pomoću mikrovalova

U tikvicu s okruglim dnom je odvagano 3,00 g svježe kave, odnosno njena otpada uz dodatak 50 mL 50 ili 70 %-tne vodene otopine etanola.

Ekstrakcija uzoraka je provedena u mikrovalnom reaktoru, pri vremenu od 5 i 10 minuta i temperaturi od 50 i 70 °C. Ekstrahirani uzorci su profiltrirani u Falcon kivete (50 mL), te čuvani u hladnjaku na 4 °C. Tablica 1 prikazuje ekstrakcijske parametre upotrebene pri izolaciji polifenola iz svježe kave, odnosno njena otpada.

Tablica 1. Ekstrakcijski parametri upotrebjeni pri izolaciji polifenola iz uzoraka svježe kave i njena otpada pomoću mikrovalova.

Oznaka uzoraka	T/°C	φ (etanol)/%	t (ekstrakcije)/min
Otpad Kimbo			
1 AV	50	50	5
2 AV			10
3 AV		70	5
4 AV			10
5 AV	70	50	5
6 AV			10
7 AV		70	5
8 AV			10
Kava Kimbo			
9 AV	50	50	5
10 AV			10
11 AV		70	5
12 AV			10
13 AV	70	50	5
14 AV			10
15 AV		70	5
16 AV			10

3.6. UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa, smjesi fosfotungstične i molibdenske kiseline, s fenoksid ionom. Prilikom reakcija dolazi do oksidacije fenoksid iona i redukcije reagensa do plavo obojenih oksida volframa i molibdena. Intenzitet nastalog bojenja se mjeri pri valnoj duljini od 760 nm (Singleton i sur., 1999).

3.6.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu reagensa ($c = 0,2 \text{ mol/L}$): u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL FC reagensa ($c = 2 \text{ mol/L}$) i do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom.
- Otopina natrijeva karbonata (20 %, *w/v*): odvagano je 200 g krutog Na_2CO_3 koji je otopljen u 800 g vruće, proključale deionizirane vode. Nakon hlađenja dodano je nekoliko kristalića Na_2CO_3 , a sadržaj je profiltriran nakon 24 sata.

3.6.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Otopina galne kiseline masene koncentracije 5 g/L pripravljena je otapanjem 0,5000 g galne kiseline u 10 mL etanola, a potom je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.

Za pripremu standardnih otopina galne kiseline koncentracije 10, 30, 50, 100 i 130 mg/L otpipetirano je 0,2, 0,6, 1,0, 2,0 i 2,6 mL alikvota ishodne otopine (5 g/L) u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola otpipetiran je 1 mL standardnih otopina, odnosno 0,3 mL ekstrakta otpada kave ili 0,3 mL prethodno razrijeđenog ekstrakta svježeg kave (2 mL ekstrakta u 100 mL deionizirane vode) u odmjerne tikvice od 25 mL. Potom je dodano 10 mL deionizirane vode, 1,25 mL otopine FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) i nakon točno 5 minuta 3,75 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Ovako priređene tikvice su nadopunjene deioniziranom vodom do oznake i čuvane na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi, 2 sata, nakon čega im se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 750 nm.

Na isti način je pripravljena i slijepa proba, no umjesto 1 mL standardne otopine, odnosno 0,3 mL ekstrakta kave i njena otpada korištena je deionizirana voda.

3.7. UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Metoda se temelji na kompleksometrijskoj reakciji aluminija s C4 keto skupinom i C3 ili C5 hidroksilnom skupinom flavona i flavanola (de Rijke i sur., 2006). Intenzitet obojenja nastalog kompleksa se mjeri pri valnoj duljini od 510 nm.

3.7.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- Otopina natrijeva nitrita (5 % *w/v*): odvagano je 5 g krutog NaNO_2 i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijska klorida (10 % *w/v*): odvagano je 10 g krutog AlCl_3 i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida ($c = 1 \text{ mol/L}$): odvagano je 8 g krutog natrijevog hidroksida i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 200 mL.

3.7.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Ishodna otopina rutina masene koncentracije 1 g/L je pripravljena otapanjem 0,1 g rutina u 96 %-tnom metanolu, u odmjernoj tikvici od 100 mL. Za pripremu pojedinačnih standardnih otopina rutina koncentracija 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L otpipetirano je 3, 5, 10, 13 i 18 mL alikvota ishodne otopine rutina u tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

Za određivanje ukupnih flavonoida otpipetiran je 1 mL standardnih otopina, odnosno 0,3 mL otpada kave ili 0,3 mL prethodno razrijeđenog ekstrakta svježe kave (2 mL ekstrakta u 100 mL deionizirane vode) u odmjerne tikvice od 10 mL. Zatim je dodano 2 mL deionizirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 , a nakon 5 minuta i 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 . Nakon 6 min stajanja reakcijskoj smjesi je dodano 2 mL otopine natrijevog hidroksida ($c = 1 \text{ mol/L}$), a potom je odmjerna tikvica nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Ovako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

Na isti način je pripravljena i slijepa proba, no umjesto 1 mL standardne otopine, odnosno 0,3 mL ekstrakta kave i njena otpada korištena je deionizirana voda.

3.8. Priprema pektinskih biofilmova

3.8.1. Priprema ekstrakata otpada kave

Odvagano je 6 g otpada kave u tikvice s okruglim dnom i magnetom, a potom je dodano 100 mL 70 %-tnog etanola. Pripremljeni uzorci su tretirani 5 min na 70 °C pomoću mikrovalova. Ekstrahirani uzorci su profiltrirani kroz filter papir u odmjerne tikvice od 50 mL koje su potom nadopunjene 70 %-tnim etanolom do oznake.

Alikvoti od 3,6, 7,1 i 14,3 mL 70 %-tnog ekstrakta su otpipetirani u odmjerne tikvice od 50 mL te razrijeđeni deioniziranom vodom od oznake. Ovako priređeni 5, 10 i 20 %-tni ekstrakti otpada kave su korišteni za izradu pektinskih biofilmova.

3.8.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave

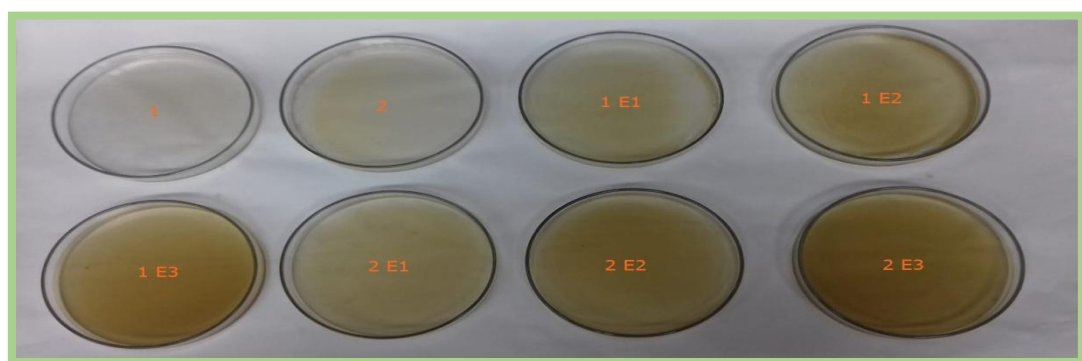
U 5, 10 i 20 %-tnim etanolnim ekstraktima otpada kave namijenjenim za izradu pektinskih biofilmova određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. U tu svrhu otpipetirano je 40 µL 5, 10 i 20 %-tnih ekstrakata, dok su sve ostale upotrebijene otopine i njihovi volumeni identični onima opisanim u poglavljima 3.6. i 3.7.

3.8.3. Postupak pripreme pektinskih biofilmova

Odvagani pektin, kalcijev klorid i glicerol (Tablica 2) su otopljeni u 50 mL vode ili 5, 10 i 20 %-tnog etanolnog ekstrakta u čaši, uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata, na sobnoj temperaturi. Nakon potpunog otapanja sastojaka reakcijska smjesa je zagrijana na 40 °C, prenesena u Petrijevu zdjelicu i osušena na sobnoj temperaturi (Slika 8).

Tablica 2. Sastav otopina upotrijebljenih pri izradi pektinskih biofilmova bez ili s dodatkom etanolnih ekstrakata otpada espresso kave „Kimbo“.

Biofilm*	Pektin	Glicerol	CaCl ₂	H ₂ O	Ekstrakt
	w = 1 %	w = 50 %	w = 2 %	V = 50 mL	
1	0,50 g	0,25 g	0,01 g	+	
1 E1 _{0,05}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
1 E2 _{0,10}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
1 E3 _{0,20}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
	w = 2 %	w = 50 %	w = 2 %	V = 50 mL	
2	1,0 g	0,50 g	0,02 g	+	
2 E1 _{0,05}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+
2 E2 _{0,10}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+
2 E3 _{0,20}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+



Slika 8. Pripremljeni pektinski biofilmovi.¹

3.9. Karakterizacija pektinskih biofilmova

3.9.1. Određivanje parametara boje

U postupku određivanja L , a i b parametara boje biofilmova, CM - 3500d kolorimetar se kalibrira za izabranu masku otvora od 8 mm. Uzorak dimenzija većih od otvora se izreže, namjesti na površinu otvora uređaja, te se zatvori poklopcem zbog sprečavanja interferencija s vanjskom svjetlosti. Očitavanje i obrada podataka je provedena pomoću računalnih programa „Spectra Magic™ NX Ver. 1.7 i „Color Data Software CM - S 100 W“.

3.9.2. Određivanje teksturalnih svojstava

Određivanje teksturalnih svojstava pektinskih biofimova bez i uz dodatak etanolnih ekstrakata otpada kave provedeno je na analizatoru teksture TA.HDPlus. Za analizu se izreže uzorak dimenzija 3×1 cm i postavi okomito između dvije čeljusti. Mjerenja se provode pri brzini od 0,1 mm/s, uz ukupni put kojeg gornja čeljust prewali od 5 cm. Analizom pojedinih uzoraka dobiveni su dijagrami ovisnosti maksimalne upotrijebljene sile (F_{max}) o vremenu (t) potrebnom za prekid uzorka. Iz dijagrama su izračunate sljedeće vrijednosti:

- sila na granici elastičnosti (F_e),
- produljenje na granici elastičnosti (Δl), a definira se kao razlika ukupne duljine između čeljusti uređaja u određenom trenutku (l) i početne duljine uzorka između čeljusti (l_0) prije početka pokusa,
- postotna deformacija na granici elastičnosti (ϵ), a definira se kao omjer produljenja Δl i početne mjerne duljine (1 mm),
- rad potreban za kidanje (W) je umnožak prijeđenog puta čeljusti i sile potrebne za lom uzorka, a određen je integracijom površine ispod krivulje i
- snaga potrebna za pucanje uzorka (P) definirana kao omjer maksimalne sile i vremena potrebnog za lom uzorka.

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu je provedena mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz uzoraka svježe kave i otpada zaostalog nakon njene pripreme, pri temperaturama od 50 i 70 °C, vremenu od 5 i 10 minuta i volumnom udjelu etanola od 50 i 70 % (Tablica 1).

U prvom dijelu rada s ciljem valorizacije otpada kave kao jeftinog izvora polifenola, određen je i uspoređen sadržaj ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u ekstraktima kave i otpada.

U drugom dijelu rada provedena je daljnja ekstrakcija otpada kave primjenom optimalnih ekstrakcijskih parametara utvrđenih na temelju izmjerenih UF i UFL vrijednosti.

U trećem dijelu rada dobiveni ekstrakti su inkorporirani u pektinske biofilmove (Tablica 2), koji su potom karakterizirani određivanjem boje i teksturalnih svojstava.

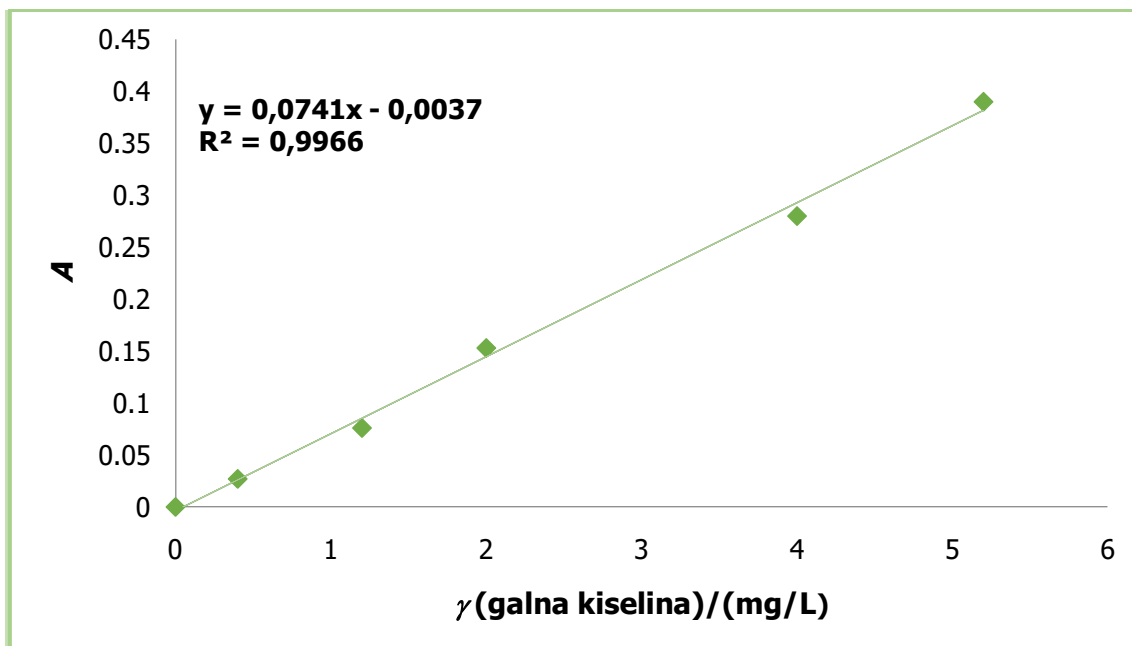
4.1. Određivanje ukupnih fenola u uzorcima kave i otpada

U Tablici 3 se nalaze vrijednosti masenih koncentracija standardnih otopina galne kiseline i njihovih apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom. Na temelju prikazanih vrijednosti izrađen je baždarni dijagram (Slika 9), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su masene koncentracije, a zatim i maseni udjeli ukupnih fenola u uzorcima kave i otpada (Tablica 4).

Tablica 3. Masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija.

Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	$A \pm SD$
1	0,0	0,000 \pm 0,000
2	0,4	0,027 \pm 0,001
3	1,2	0,076 \pm 0,001
4	2,0	0,153 \pm 0,003
5	4,0	0,280 \pm 0,001
6	5,2	0,390 \pm 0,014

$N = 2$, SD = standardna devijacija



Slika 9. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima kave i otpada nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

	Uzorak	$A \pm SD$	$w(UF)/(mg/g) \pm SD$
Otpad kave	1 AV	0,313±0,000	5,93±0,00
	2 AV	0,239±0,001	4,55±0,00
	3 AV	0,303±0,003	5,74±0,01
	4 AV	0,309±0,002	5,86±0,01
	5 AV	0,268±0,002	5,09±0,02
	6 AV	0,289±0,003	5,48±0,02
	7 AV	0,320±0,001	6,90±0,01
	8 AV	0,292±0,003	5,54±0,03
Svježa kava	9 AV	0,060±0,001	47,65±0,00
	10 AV	0,053±0,001	45,78±0,00
	11 AV	0,049±0,001	39,68±0,01
	12 AV	0,046±0,001	38,75±0,01
	13 AV	0,057±0,001	46,72±0,01
	14 AV	0,065±0,002	48,59±0,02
	15 AV	0,072±0,001	51,40±0,01
	16 AV	0,052±0,001	42,03±0,01

$N = 2$, SD =standardna devijacija

Dobivene vrijednosti ukupnih fenola kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pri parametrima prikazanim u Tablici 1 nalaze se u rasponu od 4,55 do 6,90 mg/g za otpad kave i 38,75 do 51,40 mg/g za svježu kavu (Tablica 4).

Promatrajući utjecaj temperature na uspješnost ekstrakcije fenola iz uzoraka svježe kave i njena otpada zapaženo je da uzorci tretirani pri 70 °C daju veće vrijednosti fenola u odnosu na one tretirane na 50 °C (Tablica 4). Naime kod uzoraka svježe kave dobivene vrijednosti ukupnih fenola tretiranih pri 70 °C nalaze su u rasponu od 42,03 do 51,40 mg/g, a pri 50 °C od 38,75 do 47,65 mg/g. Kod uzoraka otpada kave tretiranih na 70 °C nađene vrijednosti nalaze se u rasponu od 4,55 do 5,93 mg/g, te 5,09 do 6,90 mg/g tretirane na 50 °C. Izuzetke čine uzorci otpada (1 i 4 AV), te uzorak svježe kave 9 AV, kod kojih su zabilježene veće vrijednosti fenola pri temperaturi od 50 °C.

Uspoređujući dobivene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola pri različitim vremenima ekstrakcije, vidi se da je vrijeme od 5 minuta sasvim dovoljno za postizanje njihove učinkovite ekstrakcije. Naime, uzorci tretirani 5 minuta daju veće prinose fenola u odnosu na one tretirane 10 minuta (Tablica 4). Iznimke predstavljaju uzorci 4, 6 i 14 AV kod kojih su tijekom 10 minutne ekstrakcije izmjerene nešto veće vrijednosti.

Promatrajući utjecaj volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na uspješnost ekstrakcije fenola iz uzoraka svježe kave i otpada može se uočiti da polarnost otapala znatno utječe na njihov prinos. Tako se pri ekstrakciji otpada kave 70 %-tni etanol pokazao učinkovitijim ekstrakcijskim otapalom u odnosu na 50 %-tni etanol, uz 1 AV uzorak kao izuzetak. S druge pak strane, kod uzoraka svježe kave 50 %-tni etanol daje veće prinose fenola u odnosu na 70 %-tni etanol. Tako su kod 9, 10 i 14 AV uzoraka izmjerene veće vrijednosti u odnosu na 11, 12 i 16 AV uzorke tretirane pri istim ekstrakcijskim vremenima.

U konačnici, kombinacijom primjenjenih ekstrakcijskih parametara može se zaključiti kako su najviše vrijednosti fenola izmjerene kod uzorka 7 AV (otpad kave) i 15 AV (svježa kava) tretiranih na 70 °C, tijekom 5 minuta uz 70 %-tni etanol.

Istraživanje Mussata i sur. (2011) je pokazalo da prosječna vrijednost ukupnih fenola za otpad portugalske kave, nakon ekstrakcije od 90 min uz 60 %-tni metanol iznosi 18 mg/g. Vidi se da je ova vrijednost oko 2 puta veća u odnosu na onu dobivenu pri optimalnim parametrima ekstrakcije (7 AV = 6,90 mg/g). I udio fenola od 87,20 mg/g je otprilike 13 puta veći nakon refluksiranja otpada espresso kave „Kimbo“, tijekom 1 h (Brnica, 2018). Pavlović i sur. (2013) također dobivaju znatno veće vrijednosti fenola (398,95 mg/g) obradom uzorka otpada pomoću mikrovalova u 20 %-tnom etanolu i vremenu od 20 s.

Dakle, usporedbom parametara pri kojima se provodila ekstrakcija u navedenim

radovima s onima opisanim u ovom istraživanju može se zaključiti da je efikasnost ekstrakcije fenola uvjetovana metodom, vrstom otpada, otapalom i vremenom.

Iako su vrijednosti ukupnih fenola značajno manje u odnosu na prikazane radove, kao i svježu kavu analiziranu u ovom radu (8 puta), ovaj otpad ipak treba iskoristiti za izolaciju fenola imajući u vidu činjenicu da predstavlja jeftin, ekološki prihvatljiv biosupstrat nagomilan nakon svakodnevne konzumacije kave.

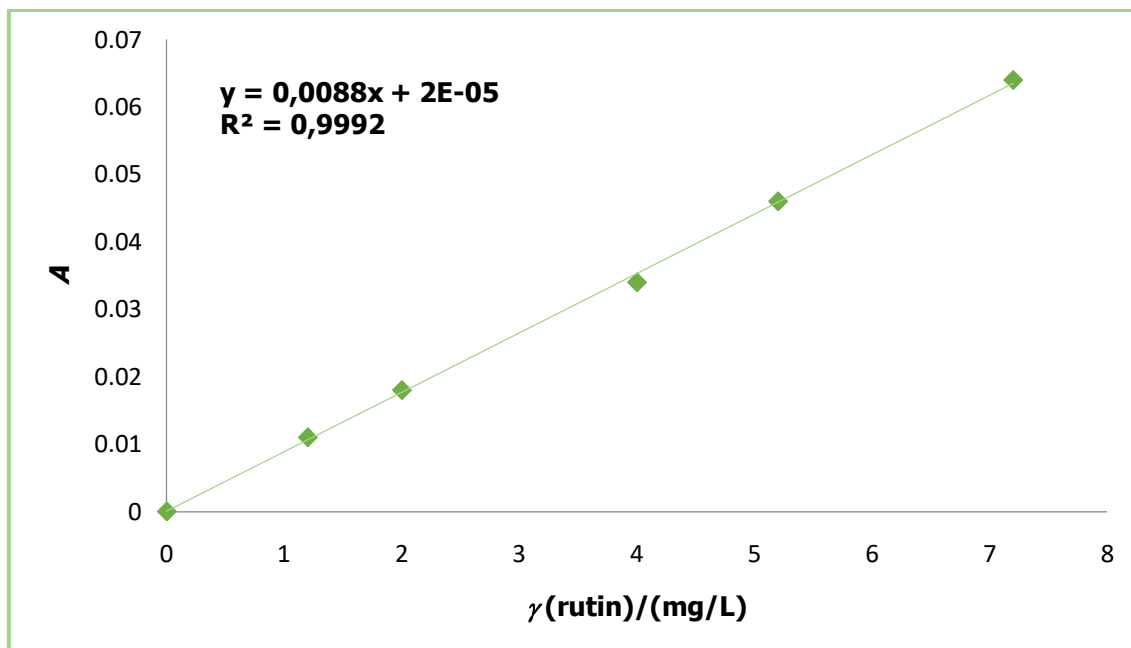
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kave i otpada

U Tablici 5 nalaze se vrijednosti masenih koncentracija standardnih otopina rutina i njihovih apsorbancija izmjenjenih spektrofotometrom. Na temelju prikazanih vrijednosti izrađen je baždarni dijagram (Slika 10), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su masene koncentracije, odnosno maseni udjeli ukupnih flavonoida u uzorcima svježe kave i otpada nastalog njenim konzumiranjem (Tablica 6).

Tablica 5. Masene koncentracije standardnih otopina rutina s pripadajućim vrijednostima apsorbancijama.

Standardna otopina	γ (rutin)/(mg/L)	$A \pm SD$
1	0	0,000 \pm 0,000
2	1,2	0,011 \pm 0,000
3	2,0	0,018 \pm 0,001
4	4,0	0,034 \pm 0,001
5	5,2	0,046 \pm 0,000
6	7,2	0,064 \pm 0,002

$N = 2$, SD=standardna devijacija



Slika 10. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima kave i otpada nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

	Uzorak	$A \pm SD$	$w(\text{UFL})/(\text{mg/g})$
Otpad	1 AV	0,056±0,000	9,15±0,00
	2 AV	0,052±0,001	8,20±0,00
	3 AV	0,055±0,003	8,83±0,00
	4 AV	0,045±0,000	7,57±0,00
	5 AV	0,053±0,001	8,36±0,00
	6 AV	0,054±0,002	8,51±0,00
	7 AV	0,062±0,000	9,78±0,00
	8 AV	0,056±0,001	8,83±0,00
Svježa kava	9 AV	0,017±0,000	66,98±0,00
	10 AV	0,013±0,001	51,31±0,00
	11 AV	0,011±0,000	43,32±0,00
	12 AV	0,009±0,000	39,43±0,00
	13 AV	0,013±0,002	51,21±0,00
	14 AV	0,019±0,000	74,88±0,00
	15 AV	0,024±0,002	94,61±0,00
	16 AV	0,012±0,000	47,26±0,00

$N = 2$ SD=standardna devijacija

Izmjerene vrijednosti ukupnih flavonoida nalaze se u rasponu od 39,43 do 94,91 mg/g za uzorke svježe kave, te 7,57 do 9,78 mg/g za uzorke njena otpada (Tablica 6).

Uspoređujući rezultate masenih udjela flavonoida dobivenih pri različitim temperaturama, vidi se da je veća efikasnost ekstrakcije postignuta pri 70 °C gdje se izmjerene vrijednosti kreću u rasponu od 51,21 do 94,61 mg/g za kavu i 8,36 do 9,78 mg/g za otpad. Kod temperature od 50 °C raspon dobivenih vrijednosti kreće se od 39,43 do 66,98 mg/g za kavu i 8,20 do 9,15 mg/g za otpad.

Uzimajući u obzir utjecaj vremena ekstrakcije na prinos ukupnih flavonoida, primjećeno je da se kod vremena od 5 minuta postiže veći prinos, kod iste temperature i istog volumnog udjela etanola (Tablica 6). Odstupanja pokazuju uzorci 6 AV (otpada) i 14 AV (kava) kod kojih se tijekom 10 minuta ekstrakcije ostvaruje veći prinos flavonoida u odnosu na iste uzorke tretirane 5 minuta (5 AV, otpad i 13 AV, kava).

Promatrajući utjecaj volumnog udjela etanola na efikasnost ekstrakcije flavonoida, primjećeno je da su veći prinosi postignuti upotrebom 50 %-tnog etanola u odnosu na 70 %-tni etanol, i kod uzoraka kave i njena otpada. Iznimke čine uzorci 5 AV (otpada) i 13 AV (kava) kod kojih je dobivena niža vrijednost upotrebom 50 %-tnog etanola u odnosu na uzorke 7 AV (otpada) i 15 AV (kava) tretiranih 70 %-tnim etanolom.

U konačnici, kombinacijom primjenjenih ekstrakcijskih parametara da se zaključiti da su najviše vrijednosti masenih udjela flavonoida (9,78 mg/g i 94,61 mg/g) postignute u uzorcima otpada (7 AV) i svježe kave (15 AV) pri temperaturi od 70 °C, vremenu od 5 minuta i volumnom udjelu etanola od 70 %.

U radu Brnica (2017) prosječna vrijednost ukupnih flavonoida u otpadu kave „Kimbo“ iznosi 50 mg/g i 5 puta je veća u odnosu na vrijednost dobivenu u ovom radu. S druge pak strane vrijednost flavonoida od 2,5 mg/g izmjerena u radu Mussato i sur. (2011) je oko 4 puta niža u odnosu na vrijednost (9,50 mg/g) dobivenu u ovom radu.

Uspoređujući rezultate ukupnih fenola (Tablica 5) i ukupnih flavonoida (Tablica 6) vidi se kako su dobiveni veći maseni udjeli flavonoida u odnosu na fenole, što nije uobičajena pojava pri njihovim određivanjima u nekim drugim materijalima (Marjanović, 2017; Moslavac, 2017; Rajković, 2018). Jedan od mogućih razloga dobivanja većih vrijednosti flavonoida je prisutnost i mnogobrojnost drugih bioaktivnih spojeva u kavi i otpadu (Pandey i sur., 2000; Noigam i sur., 2012) koji tijekom određivanja flavonoida reagiraju s aluminijevim kloridom, te doprinose ukupnom povećanju apsorbancije, a time i masenih udjela. Ove izmjerene vrijednosti upućuju na činjenicu da bi se trebalo pronaći selektivniji reagensi za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida, čime bi se dobio potpuniji uvid u valjanost ove ili neke druge upotrebljene metode.

4.3. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave namijenjem za izradu biofilmova

Optimalni parametri ekstrakcije ($T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{ min}$ i $70\text{ }\%$ etanol, v/v) određeni na temelju dobivenih masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida (Tablice 5 i 6) primjenjeni su za izolaciju fenola iz otpada kave, te njihovu ugradnje u pektinske biofilme, čija je priprema opisana u poglavlju 3.8.1. Neposredno prije izrade pektinskih biofilmova, 5, 10 i 20 %-tnim etanolnim ekstraktima otpada kave određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida prema postupku opisanom u poglavlju 3.8.2.

U Tablici 7 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida i fenola u pripremljenim etanolnim ekstraktima otpada. Vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola dobivene su u rasponu od 10,92 do 41,28 mg/g, a za ukupne flavonoide 19,53 do 63,89 mg/g. Veće vrijednosti udjela flavonoida u odnosu na fenole, ponovno upućuje na činjenicu da bi se trebalo pronaći selektivniji reagens za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida, čime bi se eliminirale moguće interakcije s drugim prisutnim spojevima u otpadu kave.

Tablica 7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u etanolnim ekstraktima otpada kave namijenjenim za izradu biofilmova.

φ (etanol)/%	Etanolni ekstrakt kave	
	Ukupni fenoli	
	$A \pm SD$	$w(\text{UF})/(\text{mg/g}) \pm SD$
5	0,039 \pm 0,001	10,92 \pm 0,00
10	0,110 \pm 0,002	23,82 \pm 0,00
20	0,290 \pm 0,000	41,28 \pm 0,00
	Ukupni flavonoidi	
	$A \pm SD$	$w(\text{UFL})/(\text{mg/g}) \pm SD$
5	0,015 \pm 0,000	19,53 \pm 0,00
10	0,037 \pm 0,002	43,77 \pm 0,02
20	0,054 \pm 0,000	63,89 \pm 0,00

$N=2$, SD = standardna devijacija

4.4. Određivanje boje pektinskih biofilmova

Boja, odnosno L , a i b parametri standardnih pektinskih biofilmova (1 i 2), te biofilmova s inkorporiranim polifenolnim ekstraktima otpada kave (5, 10 i 20 %) određeni pomoću kolorimetra prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. L , a i b parametri boje određeni u pektinskim biofilmovima bez i s dodatkom etanolnih ekstrakata otpada kave.

Biofilm	$L \pm SD$	$a \pm SD$	$b \pm SD$	$\Delta L \pm SD$
1	32,32±0,00	-0,01±0,00	3,18±0,00	-
1 E1 0,05	31,18±0,20	0,26±0,20	4,55±0,23	-1,14±0,23
1 E2 0,10	29,70±0,00	0,86±0,00	5,19±0,00	-2,62±0,00
1 E3 0,20	29,56±0,25	1,00±0,29	5,45±0,27	-2,76±0,20
2	32,83±0,00	-0,15±0,00	1,98±0,00	-
2 E1 0,05	30,69±0,26	0,42±0,24	4,69±0,20	-2,14±0,20
2 E2 0,10	30,12±0,20	0,62±0,17	5,36±0,15	-2,71±0,15
2 E3 0,20	29,10±0,10	1,37±0,12	5,51±0,10	-3,73±0,10

Indeksi 0,05, 0,10 i 0,20 odnose se na 5, 10 i 20 % etanolne ekstrakte otpada kave

$N = 2$, SD = standardna devijacija

ΔL vrijednosti kod 1 E1 0,05, 1 E2 0,10, 1 E3 0,20, 2 E1 0,05, 2 E2 0,10 i 2 E3 0,20 uzoraka su negativne iz čega slijedi da su biofilmovi sa inkorporiranim ekstraktima otpada kave tamniji u odnosu na standardne biofilme (uzorci 1 i 2). Najmanje ΔL vrijednosti su dobivene kod 1 E3 0,20 i 2 E3 0,20 biofilmova, što znači da ih dodatak 20 %-tnog etanolnog ekstrakta otpada kave čini i najtamnijima. Nešto veće vrijednosti pokazuju 1 E2 0,10 i 2 E2 0,10 biofilmovi s 10 %-tnim etanolnim ekstraktima, dok su najveće vrijednosti zabilježene kod biofilmova s najnižim volumnim udjelom etanola (1 E1 0,05 i 1 E2 0,05). Vidi se da s porastom volumnog udjela etanola, a time i masenih udjela fenola (Tablica 7), rastu a i b vrijednosti pektinskih biofilmova (Tablica 8). Pri tome su nešto veće a (0,26 - 1,00) i b (4,55 - 5,45) vrijednosti izmjerene kod biofilmova s 2 %-tnim pektinom u odnosu na one s 1 %-tnim pektinom ($a = 0,42 - 1,37$ i $b = 4,69 - 5,51$).

Budući da su ΔL , L , a i b vrijednosti biofilmova proporcionalne udjelu pektina i etanola u ekstraktima otpada kave, može se zaključiti da raspon boja biofilmova može varirati sukladno željenim, bilo vizualnim i/ili funkcionalnim karakteristikama ovih jestivih proizvoda.

4.5. Određivanje teksturalnih svojstava pektinskih biofilmova

Teksturalna svojstva proizvoda, poput žilavosti, glatkosti, viskoznosti, elastičnosti, tvrdoće, jedroće i krhkosti su određena kemijskim sastavom i fizikalnim vezama unutar samog materijala važnim za definiranje njegove mikrostrukture (Lelas, 2006).

Tako su i u ovom dijelu rada opisana neka od teksturalnih svojstava pektinskih biofilmova, bez i s inkorporiranim etanolnim ekstraktima otpada kave.

Dobiveni rezultati (Tablica 9) su pokazali da je za standardni, 1 %-tni pektinski biofilm (uzorak 1) potrebno utrošiti duže vrijeme (1,835 s), a time i veći rad (0,0030 J) za prekid u odnosu na 1 E1_{0,05} biofilm, te kraće vrijeme i manji rad u odnosu na 1 E3_{0,20} biofilm. Iznimku predstavlja uzorak 1 E2_{0,10} gdje je vrijeme potrebno za prekid veće, a rad manji u odnosu na 1 E3_{0,20}. Kod standardnog biofilma 2 potrebno je utrošiti kraće vrijeme (3,245 s) i manji rad (0,0060 J) za prekid u odnosu na biofilmove sa dodanim ekstraktima otpada kave (2 E1_{0,05}, 2 E2_{0,10}, i 2 E3_{0,20}).

Tablica 9. Parametri teksture izračunati na temelju izmjerene maksimalne sile i vremena potrebnog za pucanje uzoraka biofilmova.

Biofilm	$F_{\max}/N \pm SD$	$F_e/N \pm SD$	$\Delta/e/\text{mm} \pm SD$	$\varepsilon/\%$	$W/J \pm SD$	$t/s \pm SD$	P/W
1	28,1549±0,0120	16,6305±0,0120	0,088±0,002	0,88	0,0030±0,0760	1,835±0,010	0,0016
1 E1 0,05	1,0007±0,001	4,5566±0,0039	0,066±0,006	0,66	0,0012±0,0101	1,150±0,021	0,0010
1 E2 0,10	1,0638±0,008	10,6556±0,0078	0,325±0,008	3,25	0,0020±0,0225	12,825±0,087	0,0001
1 E3 0,20	1,1524±0,069	11,3471±0,0089	0,265±0,010	2,65	0,0090±0,0344	7,820±0,065	0,0011
2	32,8178±0,0450	21,2935±0,0245	0,160±0,009	1,60	0,0060±0,0980	3,245±0,030	0,0018
2 E1 0,05	1,0638±0,009	18,0844±0,0077	0,248±0,020	2,48	0,0070±0,0565	4,725±0,021	0,0015
2 E2 0,10	1,2050±0,0010	19,3252±0,0099	0,248±0,045	2,48	0,0070±0,0850	3,390±0,045	0,0020
2 E3 0,20	1,2234±0,0020	20,5665±0,0078	0,259±0,050	2,59	0,0110±0,0743	5,810±0,067	0,0019

Indeksi 0,05, 0,10 i 0,20 odnose se na 5, 10 i 20 % etanolne ekstrakte otpada kave

$N = 2$, SD = standardna devijacija

S druge pak strane primjećeno je da su vrijednosti maksimalnih sila potrebnih za prekid biofilмова veće kod standarda (uzorci 1 i 2) u odnosu na one s dodanim ekstraktima taloga kave. Tako dodatkom ekstrakta otpada kave u biofilm dolazi do znatnog smanjenja maksimalne sile za 27,0025 do 27,1542 N u odnosu na standard 1, te 31, 5944 do 31,754 N u odnosu na standard 2. Pri tome je za biofilmove pripravljene s većim udjelom pektina (2 %) potrebno utrošiti i nešto veće sile, pa su tako za 2 E3_{0,20}, 2 E2_{0,10} i 2 E1_{0,05} uzorke dobivene F_{max} vrijednosti 1,2234 N, 1,2050 N i 1,0638 N. U slučaju 1 %-tnih biofilмова izmjerene maksimalne sile su niže i iznose 1,1534 N (1 E3_{0,20}), 1,0638 N (1 E2_{0,10}) i 1,0007 N (1 E1_{0,05}). Dakle, vidi se da s povećanjem volumnog udjela etanola u ekstraktima taloga kave kod biofilмова s istim udjelom pektina ne dolazi do znatnog povećanja maksimalnih sila. Nadalje, zapaženo je da biofilmovi pripravljeni s 2 %-tnim pektinom (bez i s inkorporiranim ekstraktima taloga kave) imaju veće vrijednosti sila na granici elastičnosti u odnosu na one pripravljene s 1 %-tnim pektinom. Nadalje, veće vrijednosti sila na granici elastičnosti izmjerene su kod biofilмова pripravljenih s većim volumnim udjelom etanola u ekstraktima talog kave, bilo da se radi o 1 ili 2 %-tnim masenim udjelima pektina. Tako je najveća vrijednost zabilježena kod biofilмова s 20 %-tnim ekstraktom (11,3471 N i 20,5665 N), a zatim ih slijede 10 %-tni (10,6556 N i 19,3252 N) i 5 %-tni ekstrakti (4,5566 N i 18,0844 N). No, usporedbom inkorporiranih pektinskih biofilмова s pripadajućim standardima (uzorak 1 i 2) zamjećeno je da standardni biofilmovi, 1 i 2 pokazuju veće vrijednosti sila na granici elastičnosti (Tablica 9). Tako su vrijednosti sila na granici elastičnosti za inkorporirane 1 %-tne filmove manje za 5,2834 do 12,0739 u odnosu na standard 1, te 0,7270 do 3,3106 u odnosu na standard 2.

Zaključno, rezultati su pokazali da ugradnjom etanolnog ekstrakta dolazi do promjena teksturalnih značajki biofilмова ugradnjom etanolnog ekstrakta otpada kave. Najviše naglašena promjena odnosi se na smanjenje maksimalne sile (F_{max}), što u konačnici rezultira smanjenom čvrstoćom biofilмова s inkorporiranim etanolnim ekstraktima otpada kave. Iako inkorporacijom etanolnog ekstrakta ne dolazi do znatne promjene vrijednosti sila na granici elastičnosti u usporedbi sa standardima, ipak biofilmovi s ekstraktima otpada kave daju niže F_e vrijednosti.

5. Zaključak

Ovim radom je pokazano da otpad kave zaostao nakon njena konzumiranja predstavlja značajan izvor fenola i flavonoida, pa se nagomilana količina otpada efikasno iskoristila za izolaciju ovih biološki aktivnih spojeva. Tako su rezultati mikrovalovima potpomognute ekstrakcije provedene pri $T=50$ i 70 °C, $t=5$ i 10 min i φ (etanol) = 50 i 70 % pokazali da se vrijednosti ukupnih fenola za kavu nalaze u rasponu od $38,75$ do $51,40$ mg/g, te za njen otpad od $4,55$ do $6,90$ mg/g. Najveća efikasnost ekstrakcije postignuta je pri temperaturi od 70 °C, vremenu od 5 minuta i volumnom udjelu etanola od 70 %, i kod kave i njena otpada.

Iako su uzorci otpada kave dali znatno niže prinose fenola u odnosu na kavu, ovaj biosupstrat ipak predstavlja jeftin i neiskorišten izvor fenola. Stoga je u ovom radu njihovom ekstrakcijom i inkorporacijom u pektinske biofilmove predložen jedan od mogućih načina zbrinjavanja, iskorištavanja i primjene otpada kave.

Rezultati karakterizacije boje biofilmova bez i s inkorporiranim ekstraktima taloga kave su pokazali da se s povećanjem udjela pektina i etanolnih ekstrakata otpada kave povećava i intenzitet obojenja biofilmova, pa su biofilmovi s 20 %-tnim ekstraktima kave i najtamniji (uzorci 1 E3_{0,20} i 2 E3_{0,20}).

Karakterizacijom teksture je pokazano da biofilmovi s većim postotkom pektina bez i s dodatkom ekstrakata taloga kave imaju veću čvrstoću i elastičnost u odnosu na one s manjim postotkom pektina. Inkorporacija etanolnog ekstrakta u pektinski biofilm ima za posljedicu značajno smanjenje čvrstoće, te neznatno smanjenje elastičnosti. No, povećanjem volumnog udjela etanola u ekstraktima otpada kave dolazi i do povećanja čvrstoće i elastičnosti. Tako 2E3_{0,20} biofilm s 20 %-tnim inkorporiranim ekstraktom otpada kave daje najveću tvrdoću i elastičnost ($F_{\max}=1,2234$ N i $F_e=20,5665$ N) u odnosu na ostale karakterizirane inkorporirane biofilmove.

Iako biofilmovi s inkorporiranim ekstraktima otpada taloga kave pokazuju slabija teksturalna svojstva (smanjena čvrstoća i elastičnost) u odnosu na standardne pektinske biofilmove, ipak bi mogli naći odgovarajuću primjenu ovisno o konačnoj željenoj namjeni (zaštitna, nutritivna, funkcionalna, itd.)

6. Literatura

- Anonimus 1 < <https://magister2.org/klorogenska-kiselina.html> > Pristupljeno 15.lipnja 2019.
- Anonimus 2 < <https://bs.wikipedia.org/wiki/Flavonoid> > Pristupljeno 15.lipnja 2019.
- Anonimus 3 < <https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=elektromagnetski+spektar> > Pristupljeno 15.lipnja 2019.
- Anonimus 4 < https://www.researchgate.net/figure/Figure-22-Structure-of-Pectin-4-Chemical-Names-and-CAS-Number-Pectin-9000-65-5-5_fig3_312092320 > Pristupljeno 15.lipnja 2019.
- Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **3**: 32 - 47.
- Brnica B. (2018) Kemijski sastav kave „Kimbo“ i otpada nastalog njezinim konzumiranjem. Završni rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet.
- Bourne M. C. (2002) Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement, 2. izd., Academic Press. 35 - 45.
- de Rijke E., Out P., Niessen W. M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A* **1112**: 31 - 63.
- Duraković L., Duraković Z., Blažinkov M., Bošnjak M., Sikora S., Delaš F., Markov K., Skelin A., Čverk D. (2009) Mikrobne zajednice i biofilmovi. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 92 - 97.
- Farah A., Donangelo C. M. (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **14**: 23 - 33.
- Harsono S. S., Salahudin, Fauzi M., Purwono G. S., Soemarno D., Kissinger D. (2015) Second generation bioethanol from Arabica Coffee waste processing at smallholder plantation in Ijen Plateau region of East Java. *Procedia Chemistry* **14**: 408 - 413.
- Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, 1. izd., Plejada. str. 68.
- International Coffee Organisation (2019) Coffee market report <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0519-e.pdf>> Pristupljeno 15. lipnja 2019.
- Krešić V (2017) Adsorpcija polifenolnih spojeva iz jabuke na β -glukanu. Diplomski rad., Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek.

- Lelas V. (2006) Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo I - Fizička svojstva hrane, 1. izd., Golden marketing - Tehnička knjiga, str. 110.
- Magnani C., Corrêa M. A., Isaac V., Salgado H. (2014) Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics, *Analytical Chemistry* **10**: 3200 - 3210.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **5**: 727 - 747.
- Mandai V., Hemalatha S., Mohan V. (2007) Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews* **1**: 7 - 18.
- Marjanović I. (2017) Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima lovora (*Laurus nobilis*) Završni rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet.
- Moslavac, L. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima ružmarina (*Rosmarinus officinalis*). Završni rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet.
- Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2011) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee ground. *Separation and Purification Technology* **83**: 173 - 179.
- Noigam Q. A., Al - Duais M., Al - Warafi A., Al - Eriane H., Al - Sayadi M. (2013) The chemical composition of Yemeni green coffee. *Journal of Food Chemistry and Nutrition* **1**: 42 - 48.
- Pandey A., Soccol C. R., Nigam P., Brand D., Radjiskumar Mohan, Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* **6**: 153 - 162.
- Pavlović M. D., Buntić A. V., Šiler-Marinković S. S., Dimitrijević-Branković S. I. (2013) Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separation and Purification Technology* **118**: 503 - 510.
- Pérez-Morales G. G., Ramírez-Coronel A., Guzmán-López O., Cruz-Sosa F., Perraud-Gaime I., Roussos S., Saucedo-Castañeda G. (2011) Feruloyl Esterase Activity from Coffee Pulp in Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology* **49**: 352 - 358.
- Pietta P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* **63**: 1035 - 1042.
- Rajković, A. (2018). Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz kore mandarine. Završni rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet.
- Robbins R. J. (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**: 2866 - 2887.

- Seixas F. L., Turbianib F. R. B., Salomão P. G., Souzaa R. P., Gimenesa M. L. (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chemical engineering transactions* **32**: 1693 - 1698.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 - 178.
- Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2006) Principles of Instrumental Analysis. 6. izd., Brooks Cole. str. 500.
- Šimunac, D. (2004) Knjiga o kavi, 1. izd., Grafem. str. 10.
- Thakur R. B., Singh R. K., Handa A. K., Rao Dr. M. A. (1997) Chemistry and uses of pectin, *Critical reviews in food science and nutrition* **37**: 47 - 73.
- The University of British Columbia <
<https://botanyphoto.botanicalgarden.ubc.ca/2015/09/coffea-arabica/>> Pristupljeno 15. lipnja 2019.
- Torres-Mancera M. T., Cordova-López J. C., Rodríguez-Serrano G., Roussos S, Ramírez-Coronel M. A, Favela-Torres E., Saucedo-Castañeda G. (2011) Enzymatic Extraction of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp. *Food Technology and Biotechnology* **49**: 369 - 373.

Izjava o izvornosti

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

Angela Vujović
ime i prezime studenta