

# Kemijski sastav "Karoma" kave i njenih nusproizvoda

---

Šušić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:676137>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2020

Iva Šušić

1088 / PI

**KEMIJSKI SASTAV „KAROMA“  
KAVE I NJENIH NUSPROIZVODA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonele Ninčević Grassino, te uz pomoć dr. sc. Željke Fiket, više znanstvene suradnice u Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša i kemoskinamiku nanočestica na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## KEMIJSKI SASTAV „KAROMA“ KAVE I NJENIH NUSPROIZVODA

*Iva Šušić, 1088/PI*

**Sažetak:** Prilikom proizvodnje i konzumacije kave nastaju lakodostupni nusproizvodi. Kako bi se srebrna pokožica i talog kave, nusproizvodi dobiveni postupcima prženja i priprave espresso napitka mogli potencijalno iskoristiti kao izvori različitih analita, u ovom radu je određen njihov kemijski sastav. Istovremeno je ispitan i sastav sirove i espresso kave u cilju procjene vrijednosti analita prisutnih u nusproizvodima. Sadržaj vlage, pepela, masti, celuloze i lignina, te fenola, flavonoida, šećera i proteina određen je gravimetrijskim i spektrofotometrijskim metodama. Mineralni sastav određen je spektrometrijom masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu. Rezultati su pokazali da analizirani uzorci pokazuju razlike u kemijskom sastavu, pa se tako srebrna pokožica ističe bogatim mineralnim sastavom i celulozom, a talog kave visokim udjelom masti. Sirova kava ima najviše šećera, a espresso kava proteina, fenola i flavonoida. Valja naglasiti da srebrna pokožica i talog čine jeftine izvore minerala i masti, pa ih u tom smjeru treba i valorizirati.

**Ključne riječi:** analitičke metode, sirova i espresso kava, nusproizvodi kave, minerali

**Rad sadrži:** 59 stranica, 11 slika, 15 tablica, 64 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Željka Fiket, viša znanstvena suradnica

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić
2. doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino
3. dr. sc. Željka Fiket, viša znanstvena suradnica
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković

**Datum obrane:** 11. ožujka 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of chemistry and biochemistry  
Laboratory for analytical chemistry

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### CHEMICAL COMPOSITION OF „KAROMA“ COFFEE AND ITS BY-PRODUCTS

*Iva Šušić, 1088/PI*

**Abstract:** *During production and consumption of coffee the easily accessible by-products are gained. In order to re-use the silver skin and spent coffee grounds, the by-products formed during processes of roasting and preparation of espresso beverage, as a potential source of various analytes, in this work is determined their chemical composition. Simultaneously, the chemical composition of green and espresso coffee is also examined with the aim to valorise the analytes found in by-products. The content of moisture, ash, fat, cellulose and lignin, and phenols, flavonoids, sugars and proteins is determined by gravimetric and spectrophotometric methods. Mineral composition is determined by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry method. The results showed that analysed samples showed the differences in chemical composition, and thus the silver skin stands out with rich mineral composition and cellulose, while spent coffee ground with high amount of fat. Green coffee has the highest amounts of sugar, while espresso coffee the high amounts of protein, phenols and flavonoides. It should be emphasized that silver skin and spent coffee ground presented the low-cost sources of minerals and fats, and in that direction it might be valorised.*

**Keywords:** analytical methods, green and espresso coffee, coffee by-products, minerals

**Thesis contains:** 59 pages, 11 figures, 15 tables, 64 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** PhD. *Željka Fiket*, Senior Research Associate

**Reviewers:**

1. PhD. *Suzana Rimac Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
3. PhD. *Željka Fiket*, Senior Research Associate
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor

**Thesis defended:** 11.ožujka 2020.

## Sadržaj

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1.	POVIJEST I BOTANIČKA KLASIFIKACIJA KAVE .....	2
2.2.	PROIZVODNJA KAVE .....	3
2.3.	KEMIJSKI SASTAV KAVE I NUSPROIZVODA .....	6
2.3.1.	Kemijski sastav sirove kave .....	6
2.3.2.	Kemijski sastav pržene kave .....	7
2.3.3.	Kemijski sastav srebrne pokožice .....	8
2.3.4.	Kemijski sastav taloga kave .....	9
2.4.	ANALITIČKI POSTUPCI ODREĐIVANJA KEMIJSKOG SASTAVA .....	9
2.4.1.	Gravimetrija .....	9
2.4.1.1.	Određivanje udjela vlage.....	10
2.4.1.2.	Određivanje udjela pepela.....	10
2.4.1.3.	Određivanje udjela masti.....	11
2.4.1.4.	Određivanje udjela celuloze.....	11
2.4.1.5.	Određivanje udjela lignina .....	12
2.4.2.	UV/Vis spektrofotometrija.....	12
2.4.2.1.	Određivanje udjela proteina .....	13
2.4.3.	Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu .....	14
2.5.	EKSTRAKCIJA SPOJEVA.....	15
2.5.1.	Refluksiranje .....	15
2.5.2.	Soxhlet ekstrakcija .....	16
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
3.1.	MATERIJALI .....	17
3.2.	KEMIKALIJE.....	17
3.3.	PRIBOR.....	18
3.4.	APARATURA .....	19
3.5.	METODE RADA.....	20
3.5.1.	Određivanje sadržaja vlage u uzorcima kave i nusproizvoda .....	20
3.5.2.	Određivanje sadržaja pepela u uzorcima kave i nusproizvoda .....	20
3.5.3.	Određivanje sadržaja masti u uzorcima kave i nusproizvoda .....	21
3.5.4.	Određivanje sadržaja celuloze u uzorcima kave i nusproizvoda.....	21
3.5.5.	Određivanje sadržaja lignina u uzorcima kave i nusproizvoda.....	22
3.5.6.	Priprema ekstrakata kave i nusproizvoda.....	23
3.5.7.	Određivanje fenola i flavonoida u uzorcima kave i nusproizvoda.....	23
3.5.7.1.	Priprema otopina .....	23
3.5.7.2.	Postupak određivanje ukupnih fenola .....	24
3.5.7.3.	Postupak određivanje ukupnih flavonoida .....	25
3.5.8.	Određivanje ukupnih šećera u uzorcima kave i nusproizvoda.....	26
3.5.8.1.	Priprema otopina .....	26
3.5.8.2.	Postupak određivanje ukupnih šećera .....	26
3.5.9.	Određivanje proteina u uzorcima kave i nusproizvoda.....	27

3.5.9.1.	Priprema otopina .....	27
3.5.9.2.	Postupak određivanje ukupnih proteina .....	27
3.5.10.	Određivanje ukupne kiselosti u uzorcima kave i nusproizvoda.....	27
3.5.11.	Određivanje mineralnog sastava u uzorcima kave i nusproizvoda .....	28
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
4.1.	SADRŽAJ VLAGE U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	29
4.2.	SADRŽAJ PEPELA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	31
4.3.	SADRŽAJ MASTI U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA.....	32
4.4.	SADRŽAJ CELULOZE U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA.....	33
4.5.	SADRŽAJ LIGNINA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	34
4.6.	SADRŽAJ PROTEINA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA.....	35
4.7.	SADRŽAJ ŠEĆERA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	37
4.8.	SADRŽAJ FENOĻA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	38
4.9.	SADRŽAJ FLAVONOIDA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA.....	42
4.10.	SADRŽAJ MINERALA U UZRCIMA KAVE I NUSPROIZVODA .....	46
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>54</b>



# 1. UVOD

Kava je drugo najpopularnije piće u svijetu nakon vode. Njen ekonomski značaj ne može se zanijekati, budući da čini jedan od najvažnijih primarnih proizvoda na svjetskom tržištu. Postupak njene kultivacije, obrade, transporta i marketinga zapošljava milijune ljudi diljem svijeta. Ključna je za politiku i ekonomiju mnogih razvijenih zemalja, dok kod manje razvijenih zemalja svijeta njen izvoz uglavnom prevladava (u nekim zemljama preko 80 %) u usporedbi s drugim proizvodima (Murthy i Naidu, 2012).

Kao posljedica razvoja globalnog tržišta kave, javljaju se i velike količine nusproizvoda od kojih prevladavaju srebrna pokožica (*engl.* silver skin) i talog (*engl.* spent coffeee residues). Budući da neprikladno zbrinjavanje navedenih nusproizvoda može dovesti do negativnih posljedica za okoliš, teži se pronalasku načina njihove ponovne upotrebe (Murthy i Naidu, 2012).

Srebrna pokožica je tanka opna vanjskog sloja sirovog zrna kave (čini 4 % ukupnog zrna), a kao nusproizvod nastaje tijekom procesa prženja kave. Tako na prema podacima Alves i suradnika (2017 ) na 120 tona pržene kave proizvede se 1 tona srebrne pokožice. Talog kave je nusproizvod koji nastaje u velikim količinama prilikom pripremanja kave s vrućom vodom. Otprilike 2 kg vlažnog taloga kave nastaje nakon pripremanja jednog kilograma pržene kave, što na svjetskoj godišnjoj razini predstavlja 6 milijuna tona otpada (Martinez-Saeza i Castillo, 2018). Oba nusproizvoda bogata su polisaharidima, polifenolima, proteinima i mineralima što im daje značajnu prehrambeno-biotehnološku vrijednost (Martinez-Saeza i Castillo, 2018).

Kako bi se predložila daljnja moguća upotreba srebrne pokožice i taloga, u ovom je radu određen njihov kemijski i mineralni sastav. Udio vlage, pepela, masti, celuloze, lignina, proteina, šećera, fenola i flavonoida određen je primjenom gravimetrijskih i spektrofotometrijskih analitičkih metoda. Multielementnom analizom, koristeći HR-ICP-MS (*engl.* High resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Spektrometrija masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu), određen je sadržaj minerala u uzorcima srebrne pokožice i taloga. Istovremeno su provedene i analize početnih sirovina, odnosno sirove i espresso kave, u cilju valorizacije analita određenih u srebrnoj pokožici i talogu.

## 2. TEORIJSKI DIO

Riječ “kava” originalno potječe od arapske riječi “Quahweh” koju danas zamjenjuju različiti pojmovi kao npr. “café” (francuski), “caffè” (talijanski), “kaffee” (njemački), “koffie” (nizozemski) i “coffee” (engleski). Kava je jedno je od najpopularnijih svjetskih pića čiji komercijalni utjecaj neprestano raste u posljednjih 150 godina, a uzgaja se u oko 80 zemlja i poslije nafte je najbitnija trgovačka roba u svijetu (Daglia i sur., 2000). Tomu svjedoče i podaci da je njena proizvodnja od 2015. do 2016. godine iznosila 145 milijuna vreća (vreća od 60 kg) (Alves i sur., 2017).

O samoj pripremi kave razvijena je prava mala znanost pa tako razlikujemo espresso kavu, tursku kavu, filter kavu, „moka“ kavu i kavu pripremljenu u french press vrču (Mestdagh i sur., 2017). Parametri za pripremu navedenih napitka variraju ovisno o upotrebljenom aparatu ili posudi ili džezvi, mješavini pržene kave, njenoj granulaciji, količini kave, temperaturi pripreme, te vremenu kontakta kave i vode.

### 2.1. POVIJEST I BOTANIČKA KLASIFIKACIJA KAVE

Prva plantaža kave osnovana je u 13. stoljeću nakon što su Arapi donijeli zrna “*Coffea Arabica*” iz Etiopije u Jemen. Provincija Kaffa u Etiopiji smatra se kolijevkom kave Arabica, a afrički kontinent pradomovinom kave (Murthy i Naidu, 2012). Europu su prvi put s kavom upoznali mletački trgovci 1615. godine. Već polovicom 17. st. otvorena je u Veneciji prva kavana, a potom u Milanu, Torinu, Genovi i ostalim talijanskim gradovima. Na zapad kontinenta kava je stigla posredstvom nizozemskih trgovaca. Najprije je iz Arabije prokrijumčarena u Indiju, odakle se ubrzo proširila na nizozemske posjede u Indoneziji, naročito na otok Javu.

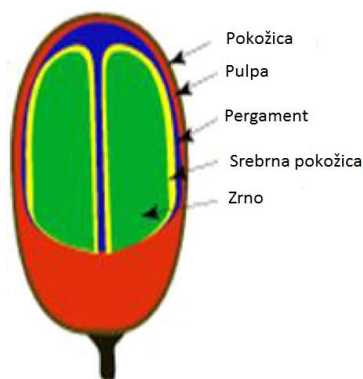
Kava pripada rodu kave “*Genus Coffea*” porodice broćika (“*Rubiaceae*”), a obuhvaća više od 400 rodova s više od 4800 do 5000 vrsta koje su većinom tropska stabla i grmovi (Clifford i sur., 1989). Klasifikacija roda kave započela je sa švedskim botaničarem Carolus Linnaeus koji je prvi opisao ovaj rod, a do sada je klasificirano više od 80 vrsta koje prevladavaju u Africi i Madagaskaru (Bridson i Verdcourt, 1988). Ekonomski su najznačajnije vrste *Coffea arabica* koja obuhvaća oko 70 % svjetske proizvodnje te *C. canephora* var. *Robusta* koja obuhvaća otprilike 29 % svjetske proizvodnje (Farah, 2012).

Ove dvije vrste kave značajno se razlikuju. Stablo *C. arabice* je visoko, tamnozelenog lišća dok su bobice ovalnog oblika, crvenkastosmeđe boje te sadrže 2 spljoštene sjemenke. Stablo *C. robuste* je snažno, robustno, otpornija je i rodniya od Arabice dok su sjemenke ovalne i manje od *arabice*, boja im je žuta do žutosmeđa. Aroma *C. robuste* je oštra i izražena te se smatranja manje kvalitetnom od *arabica* kave.

Stabla kave rastu u tropskim krajevima, na prostorima s padalinama tijekom cijele godine te prosječno toplim temperaturama oko 20 °C. Treba oko pet godina da drvo kave donese svoj prvi puni urod, a njihov životni vijek iznosi otprilike 20 godina.

## 2.2. PROIZVODNJA KAVE

Kako bi se od sirove kave, odnosno zrna kave (Slika 1) dobio tekući napitak, kava mora proći proces prerade. Ovisno o načinu uklanjanja usplođa razlikujemo suhi, mokri te kombinirani postupak obrade kave.



**Slika 1.** Popriječni presijek zrna kave (Murthy i Naidu, 2012).

Kava procesirana na mokri način (Martinez-Saeza i Castillo, 2018, Slika 2) naziva se oprana kava. Kod mokrog načina usplođe se uklanja odmah nakon berbe, prije sušenja, te zahtjeva vodeni transport i posebne uređaje za drobljenje (Murthy i Naidu, 2012). Mesnati dio usplođa uklanja se nakon drobljenja, prilikom ispiranja s vodom, nakon čega slijedi fermentacija. Proces fermentacije nužan je kako bi se uklonio sluzavi omotač pergamentne ovojnice. Fermentacija se provodi 24 - 36 h za arabica i 72 h za robusta kavu pri 30 - 35 °C. Izbjegava se

prekomjerna fermentacija zbog gubitka boje zrna, te prekratka fermentacija jer dolazi do apsorpcije vlage. Fermentirana zrna se suše do udjela vlage od 10 %.

Suhi način podrazumijeva tradicionalni postupak obrade kod kojeg se svježe ubrana kava ravnomjerno raspoređuje u sloj debljine otprilike 8 cm na veće osunčane površine (Murthy i Naidu, 2012). Redovitim prevrtanjem plodova sprječava se fermentacija, a u slučaju nepovoljnih vremenskih prilika plodove je potrebno zaštititi. Sušenje je gotovo nakon 12 do 15 dana ukoliko je pogodno sunčano vrijeme, pri čemu udjel vode u plodovima pada do  $\approx 12$  % (Murthy i Naidu, 2012). Kombinirani način objedinjuje prednosti mokrog i suhog postupka, a podrazumijeva drobljenje i uklanjanje mesnatog usplođa bez naknadnog pranja, postiže se kava punije arome i slađeg okusa.

Nakon uklanjanja usplođa, zrna su još uvijek obavijena pergamentnom ljuskom koja se uklanja procesom ljuštenja. Ovisno o prethodnim postupcima prerade (mokri, suhi ili kombinirani) vrši se i odabir ljuštilica. Nakon ljuštenja slijedi sortiranje i klasificiranje sirove (zelene) kave na temelju stupnja oštećenosti zrna. Selektirana sirova kava je zatim spremna ili za skladištenje ili za prženje.

Aroma pržene kave se značajno razlikuje od arome sirove kave. Iako je postupak prženja kave jednostavan, kemijske i fizikalne promjene do kojih dolazi u zrnu kave uzrokuju promjenu senzorskih osobina, koje su vrlo kompleksne i još uvijek nedovoljno razjašnjene. Najčešći uređaji koji se koriste za prženje jesu rotirajući bubnjevi kod kojih su zrna kave u direktnom doticaju s vatrom i/ili vrućom površinom te uređaji za prženje u struji vrućeg zraka ili plina (Farah, 2012). Uređaji za prženje u struji zraka češće se koriste u prehrambenim industrijama zbog bolje kontrole temperature te ujednačene isprženosti. Temperature koje se koriste za prženje ovise o tipu uređaja, pa su tako maksimalne temperature u uređajima za prženje u struji vrućeg zraka od 210 do 240 °C. U početnoj fazi prženja isparava slobodna voda. Kada temperatura dosegne 130 °C počine termička razgradnja saharoze, mijenjanje boje zrna i povećanja njegova volumena (Sacchetti i sur., 2009). Kemijske promjene u početnoj fazi nisu od velikog značaja za razliku onih pri kraju prženja. Pri temperaturama višim od 160 °C dolazi do niza egzotermnih i endotermnih reakcija, volumen zrna se značajno povećava, boja prelazi u svjetlo smeđu te počinje formiranje arome. Daljnjim prženjem pri 190 °C dolazi do senzorskih promjena uzrokovanih Maillard-ovim i Strecker-ovim reakcijama, povećava se jakost i gorčina, gubi se kiselost, a zrna postaju vrlo tamna, izrazito sjajne površine (Castillo i sur., 2002). Reakcije se

zaustavljaju kada zrna postignu željenu boju. Zrna se zatim hlade zrakom ili vodom, melju te stavljaju u promet ili koriste dalje za proizvodnju instant kave.

Ukoliko se pržena kava stavlja u promet ne smije sadržavati: više od 5 % vode, više od 6 % ukupnog pepela i više od 2 % preprženih (ugljeniziranih) zrna. Količina ukupnih stranih primjesa ne smije biti veća od 0,1 %. Mora sadržavati najmanje 22 % ekstraktivnih tvari topljivih u vodi, osim pržene kave bez kofeina u kojoj sadržaj ekstrahiranih tvari mora biti najmanje 20 %, te ne smije davati napitak neugodnih senzorskih svojstava (Narodne novine, 2004).



**Slika 2.** Proizvodnja kave mokrim načinom prema Martinez-Saeza i Castillo (2018).

## 2.3. KEMIJSKI SASTAV KAVE I NUSPROIZVODA

### 2.3.1. Kemijski sastav sirove kave

Sastav sirove (zelene) kave ovisi o vrsti i podvrsti (varijetetu) kave, a samo u manjoj mjeri o vanjskim faktorima kao što su: način kultiviranja kave, stupanj zrelosti zrna, način obrade (suhi ili vlažni postupak) i skladištenja zrna (Živković, 1998).

Nehlapljiva komponenta sirove kave sastoji se primarno od vode, ugljikohidrata i vlakana, proteina i slobodnih aminokiselina, lipida, minerala, organskih kiselina, klorogenih kiselina, kofeina, trigonelina (Farah, 2012).

Kofein (1,3,7-trimetil-ksantin) je gorka tvar zaslužna za oko 10 % gorčine u šalici kave, a kemijski pripada spojevima koje se nazivaju alkaloidima (Farah, 2012). Kofein po kemijskom sastavu spada među purine i u kavi se, osim kofeina, nalaze neznatne količine purinskih alkaloida teobromina i teofilina. Količina kofeina varira ovisno o vrsti ili podvrsti kave, pa tako u sirovim zrnima arabike kofeina ima od 0,9 do 1,3 %, a u robusti od 1,5 do 2,5 % (Farah, 2012).

Kava je značajan izvor fenolnih spojeva pri čemu dominira klorogenska kiselina, a njen je udio oko 7 % (Nogaim i sur., 2013). Prilikom prženja uništava se više od 90 % klorogenske kiseline, također dio klorogenske kiseline prelazi u lakton klorogenske kiseline. I klorogenska kiselina i lakton klorogenske kiseline važni su u formiranju okusa kave i pozitivno utječu na ljudsko zdravlje (Živković, 1998).

Ugljikohidrati čine skoro 50 % suhe tvari zrna zelene kave pri čemu dominiraju netopljivi polisaharidi kao što su celuloza i hemiceluloza. Topljivi ugljikohidrati kao što su monosaharidi glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza te oligosaharidi saharoza (čini 90 % oligosaharida), rafinoza, stahioza i polimeri galaktoze, manoze, arabinoze i glukoze igraju važnu ulogu u formiranju arome, stabilizaciji pjene, sedimentaciji te povećaju viskoziteta kod espresso kave (Farah, 2012).

I lipidi su jedna od glavnih komponenti kave, a njihov udio značajno varira među vrstama kave. Lipidna frakcija kave sastoji se prvenstveno od triacilglicerola (otprilike 75 %), slobodnih masnih kiselina (1 %), sterola (2,2 % ne- i 3,2 % esterificiranih sa slobodnim masnim kiselinama) i tokoferola (0,05 %), koji se uobičajeno mogu naći u jestivim biljnim uljima (Kolling-Speer i sur., 2005). Lipidna frakcija također sadrži diterpene s udjelima do 20 %

(Kolling-Speer i sur., 2005). Drugi nedavno identificirani sastojci strukturom slični diterpenima jesu kofediol i arabiol. Ukupni udio lipida u osušenim zrnima sirove kave iznosi otprilike 7 do 17 % ovisno o vrsti kave, s tim da arabika sadrži značajno više lipida od robusta kave (Farah, 2012).

Proteini, peptidi i slobodne amino kiseline ključni su za aromu kave budući da su potrebni za odvijanje Maillardovim reakcija. Služe kao prekursori za formiranje spojeva kao što su furani, pirimidini, pirol, pirazini, aldehidi i melanoidi. Melanoidi su odgovorni za formiranje boje kave te djelomično pridonose antioksidativnoj aktivnosti. Ukupni dušični spojevi (isključujući kofein i trigonelin) čine od 9 do 16 % kemijskog sastava zelene kave (Farah, 2012).

Udio vode u zrnu zelene kave *C. arabica* i *C. canephora* varira otprilike 8,5 - 12 % (Farah, 2012). Postotak vlage iznad navedenog udjela nepoželjan je za aromu, okus i kvalitetu kave budući da se povećava aktivitet vode i vjerojatnost rasta mikroorganizama. S druge strane, nizak udio vlage stvara pukotine u sjemenu i smanjuje njihovu sposobnost klijanja (Farah, 2012).

Najvažniji mineral, koji čini otprilike 40 % mineralnog sastava sirove kave je kalij (1 - 2 g 100 g<sup>-1</sup> sirove kave), nakon kojeg slijedi fosfor s udjelom od 4 % (Iorio i sur., 2011). Ostatak mineralnog sastava čini otprilike 30 različitih elemenata, uključujući natrij, magnezij, kalcij i sumpor (Iorio i sur., 2011). Od navedenih elemenata jedino udio magnezija varira značajno, ovisno o vrsti kave (1 - 3 mg 100 g<sup>-1</sup> za *C. canephora* i 2.5 - 6 mg 100 g<sup>-1</sup> za *C. arabica*). Cink, stroncij, silicij, mangan, željezo, bakar, barij, bor i aluminij su prisutni u tragovima, a njihova količina ovisi o sastavu tla (Iorio i sur., 2011).

### 2.3.2. Kemijski sastav pržene kave

Kemijski sastav pržene kave sasvim je različit od sastava sirove kave. Tijekom prženja kave količina nekih spojeva se smanjuje, neki potpuno nestaju, dok se neki potpuno novi pojavljuju. Konačan sastav pržene kave varira ovisno o sirovini, stupnju prženja i drugim čimbenicima, poput načina i vremena prženja, temperaturi i brzini strujanja zraka u komori za prženje (Živković, 1998).

Udio kofeina se gotovo ne mijenja, dok se količina klorogenskih kiselina značajno smanjuje. Udio šećera također se značajno smanjuje, posebice jednostavnih šećera (rafinoza, arabinoza, ramnoza, saharoza, galaktoza i manoza) koji mogu i potpuno nestati prženjem.

Složeni šećeri poput celuloze koji čine kostur zrna također su smanjeni, ponekad na polovicu vrijednosti u sirovom zrnu, a u kavi robusta mogu potpuno nestati.

Spojevi koji sadrže dušik, poput proteina, mogu se prženjem također mijenjati. Slobodnih aminokiselina i peptida ima izuzetno malo budući da sudjeluju u Strekerovim i Maillardovim reakcijama, te sa reducirajućim šećerima čine nove spojeve koji daju aromu i okus kavi (Živković, 1998). Stupanj razgranje proteina ovisi o temperature prženja, pa se tako pri visokim temperaturama ( $>130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) može degradirati više od 50 % proteina.

Makroelement s najvećim udjelom u prženoj kavi je kalij ( $8,28\text{ g kg}^{-1}$ ), zatim slijede magnezij ( $1,42\text{ g kg}^{-1}$ ) i kalcij ( $0,75\text{ g kg}^{-1}$ ) (Voica i sur., 2016). Prema Voica i suradnicima (2016) udio makro i mikro elemenata u prženoj kavi opada u nizu:  $\text{K} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Na} > \text{Fe} > \text{Al} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Cd}$ .

### 2.3.3. Kemijski sastav srebrne pokožice

Srebrna pokožica, nusproizvod nastao prilikom prženja kave, sadrži visoki udio prehrambenih vlakana (50 - 60 %) od čega je 86 % topljivih vlakana, a pri tome kao glavne komponente dominiraju celuloza i hemiceluloza. Od monosaharida prisutni su glukoza, ksiloza, galaktoza, manoza i arabinoza. Srebrna pokožica sadrži niski udio masti (1,56 - 3,28 %), proteina (16 - 19 %), dok je udio pepela oko 5 - 7 % (Borrelli i sur., 2006; Napolitano i sur., 2007).

Srebrna pokožica pokazuje značajan antioksidacijski kapacitet što se može pripisati visokoj koncentraciji fenolnih spojeva kao i prisustvu drugih sastojaka koje se formiraju tijekom Maillardovih reakcija, poput melanoida (Borrelli i sur., 2006). Osim kao gorivo, za kompostiranje i gnojidbu tla (Costa i sur., 2014), može se koristiti i kao prebiotički ugljikohidrat, zbog visokog udjela dijetalnih vlakana. Upotrebljava se i za proizvodnju kratkolančanih fruktooligosaharida koji imaju bolju prebiotičku aktivnost i jači su zaslađivači (Mussatto i sur., 2011c). Zbog navedenog kemijskog sastava srebrna pokožica je i pogodan supstrat ili čvrsta podloga za uzgoj mikroorganizama. Nadalje, zbog visokog udjela dijetalnih vlakana i niskog sadržaja masti srebrna pokožica može se koristiti i kao dodatak pahuljicama, kruhu, keksima i grickalicama (Mussatto i sur., 2011a). Pourfarzad i suradnici (2013) je koriste kako bi produžili rok, kvalitetu i senzorske karakteristike kruha, smanjenjem njegove kalorijske vrijednosti i povećanja udjela dijetalnih vlakana.



Kalij je najzastupljeniji mineralni element u srebrnoj pokožici, nakon čega slijedi kalcij i magnezij (Ballesteros i sur., 2014). Navedeni elementi spadaju u mikronutrijente esencijalne za ljudsko zdravlje, potpomažu vitalne funkcije u organizmu kao što su disanje, probava i cirkulacija zbog čega bi se izolirani iz srebrne pokožice mogli koristiti kao dodaci prehrani.

#### 2.3.4. Kemijski sastav taloga kave

Talog kave nastao nakon njena konzumiranja bogat je šećerima polimeriziranim u celulozu i hemicelulozu koji čine skoro polovinu kemijskog sastava otpada kave. Među njima prednjači manoza, zatim galaktoza te glukoza i arabinoza. Vlakna u talogu kave pokazuju antioksidacijska svojstva (2,4 mmol trolox 100 g<sup>-1</sup> suhe tvari;) (Murthy i Naidu, 2012), slično kao i dobro znani antioksidansi crveno vino i breskve. S obzirom na njihova izražena antioksidacijska svojstva mogli bi se kategorizirati kao antioksidacijska prehrambena vlakna s mogućom primjenom u dodacima prehrani. Talog kave sadrži značajnu količinu proteina čiji udio varira od 6,7 do 14 % (Campos-Vega i sur., 2015), dok se udio masti kreće između 10 i 15 %, a nekad i iznad 20 % (Campos-Vega i sur., 2015). Visok udio ulja otvara mogućnost njegove primjene u proizvodnji biodizela (Campos-Vega i sur., 2015). Također, talog kave se može koristiti i kao supstrat u proizvodnji bioetanola (Campos-Vega i sur., 2015). Nusproizvodi nastali proizvodnjom ili konzumiranjem kave sadrže od 1 do 1,5 % ukupnih fenola pri čemu osim srebrne pokožica, značajno mjesto pripada i talogu kave (Campos-Vega i sur., 2015).

Otpad također sadrži i 1,6 % pepela, koji prema ICP-AES (*engl.* Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Atomska emisijska spektrometrija s induktivnom spregnutnom plazmom) analizi ukazuje na prisustvo nekoliko minerala (Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn i Cu). Najviše ima kalija (3,12 do 21,88 mg g<sup>-1</sup>), zatim fosfora i magnezija (Cruz i sur., 2012).

## 2.4. ANALITIČKI POSTUPCI ODREĐIVANJA KEMIJSKOG SASTAVA

### 2.4.1. Gravimetrija

Gravimetrijske metode analize spadaju u kvantitativne metode, a temelje se na mjerenju mase ili promjeni mase. Jedna od gravimetrijskih metoda jest i gravimetrijska metoda ishlapljivanja koja se temelji se na tome da analit ili produkt razgradnje ishlapi na prikladnoj temperaturi, pri čemu se hlapljivi produkt skuplja i važe ili se masa produkta odredi posredno iz gubitka mase uzorka (Skoog, 1999). Navedena metoda uključuje 3 faze: postupak sušenja ili žarenja uzorka, mjerenja mase isparenog analita ili mase ostatka, izračunavanja rezultata provedene analize. Vrlo često se koristi pri određivanju sadržaja vlage i pepela direktnim vaganjem uzorka ili pak prethodnom obradom uzorka, poput ekstrakcije prikladnim otapalom (određivanje masi) ili kemijskim reakcijama razaranja uzorka kiselinama ili lužinama (određivanje celuloze i lignina).

#### *2.4.1.1. Određivanje udjela vlage*

Voda je glavni sastojak većine prehrambenih proizvoda, uvijek je prisutna u hrani u širokom rasponu od 0,05 do 97 % (Bradley, 2009). Utječe na kemijska, fizikalna i nutritivna svojstva prehrambenih proizvoda zbog čega je podatak o udjelu vode u proizvodu izuzetno bitan. Metode za određivanje vode u uzorcima dijele se na fizikalne i kemijske metode. Fizikalne metode možemo podijeliti na indirektno (određivanje vode sušenjem, određivanje vode/suhe tvari refraktometrom, određivanje vode na principu električne vodljivosti, određivanje vode na principu dielektrične konstante) te direktno (određivanje vode azeotropnom destilacijom). Kemijske metode podrazumijevaju "plinske" postupke te Karl-Fischerov postupak (Bradley, 2009). Najčešće se koristi postupak sušenja kod kojeg se uzorak namirnice poznate mase suši do konstantne mase u zračnoj sušnici pri 101 - 105 °C ili vakuum sušnici pri 68 - 72 °C, a gubitak u masi izražava se kao udjel vode u namirnici, odnosno hlapljivih komponenata čiji se većinski dio odnosi na vodu (Bradley, 2009).

#### *2.4.1.2. Određivanje udjela pepela*

Čisti pepeo predstavlja anorganski ostatak prirodnog podrijetla neke namirnice koji zaostaje nakon spaljivanja, ukoliko namirnica nije onečišćena zemljom, pijeskom ili drugim anorganskim

tvarima. Udio pepela u uzorku određuje se gravimetrijski, dok se iz otopine pepela spektrometrijom masa ili sličnim tehnikama može odrediti multielementini sastav čiji udjel i međusobni kvantitativni odnos daje zaključak o ispravnosti i kvaliteti samog proizvoda (Marshall, 2009).

#### *2.4.1.3. Određivanje udjela masti*

Masti (krute pri sobnoj temperaturi) i ulja (tekuća pri sobnoj temperaturi) su prirodni spojevi koji dolaze u namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla. Sastoje se od gliceridne i negliceridne frakcije. Gliceridnu frakciju čine esteri glicerola i masnih kiselina (trigliceridi), masne kiseline i glicerol, a negliceridnu spojevi koji se prirodno nalaze u uljima i mastima, a u svojoj strukturi ne sadrže glicerol ( tokoferoli, steroli, pigmenti i vitamini) (Min i Ellefson, 2009). Jedno od karakterističnih fizikalnih svojstava masti je netopljivost u vodi, a topljivost u organskim otapalima na čemu se temelji većina postupaka odjeljivanja i određivanje masti. Metode koje se najčešće koriste pri određivanju masti jesu: metoda po Soxhletu, po Grossfeldu, Weibull - Stoldt, po Röse - Gottliebu. Metoda korištena u ovom radu, koja se zbog svoje ekonomičnosti često koristi jest metoda po Soxhletu. Ona podrazumijeva višestruku kontinuiranu ekstrakciju u specijalnoj aparaturi s odgovarajućim otapalom. Količina otapala za ekstrakciju ne mjeri se točno te se nakon završene ekstrakcije i otparavanja otapala cjelokupni ekstrakt suši i važe. Uvjeti ekstrakcije ovise o prirodi hrane (brzina kojom pojedine komponente prelaze u otapalo, topljivosti pojedinih komponenti, veličini čestica), prirodi otapala (sposobnost otapanja i prodiranja u uzorak), veličini površine koja je u kontaktu s otapalom (ovisi o veličini čestica), brzini cirkulacije samog otapala, relativnom odnosu otapalo/hrana. Metoda je pogodna za čvrste, suhe uzorke koji su fino usitnjeni gdje mast nije vezana niti blokirana (Min i Ellefson, 2009).

#### *2.4.1.4. Određivanje udjela celuloze*

Celuloza je neprobavljivi homopolisaharid koji se sastoji od linearnog niza glukoznih jedinica povezanih  $\beta(1\rightarrow4)$ -glikozidnom vezom. Može se odrediti Kürschnerovim i Hanakovim

postupkom (Foyle i sur., 2007), koji se sastoji od razaranja namirnice smjesom dušične i octene kiseline. Dušična kiselina razara sve osim celuloze, a octena kiselina otapa razgradne produkte. Celuloza se filtracijom odvaja, ispire, suši i važe.

#### 2.4.1.5. *Određivanje udjela lignina*

Lignin je naziv za veliku skupinu aromatskih polimera koji nastaju međusobnim povezivanjem 4-hidroksifenilpropana. Analitičke metode određivanja lignina temelje se najvećim dijelom na gravimetrijskom postupku koji uključuje taloženje lignina dodatkom razrijeđenih kiselina, npr. sumporne, izdvajanju nastalog taloga filtracijom, te određivanju mase nastalog osušenog taloga. Dio lignina koji je topljiv u razrijeđenim kiselinama može se odrediti spektrofotometrijski (Sederoff i sur., 1999).

#### 2.4.2. UV/Vis spektrofotometrija

Spektroskopske instrumentalne metode baziraju se pretežno na interakciji elektromagnetskog zračenja sa uzorkom, pri čemu promatrana (mjerena) tvar emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se mjeri i interpretiran (Penner, 2009). Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom (UV-Vis) dijelu elektromagnetskog zračenja je jedna od najčešćih laboratorija tehnika u analizi hrane budući da uzorak ostaje sačuvan, a mjerenja se mogu izvoditi pri izrazito niskim koncentracijama analita. Raspon elektromagnetskog zračenje u UV-Vis dijelu spektra kreće se od približno 200 do 700 nm. Valna duljina UV dijela spektra je od 200 do 350 nm, a Vis od 350 do 700 nm (Penner, 2009). UV-Vis spektroskopija može se podijeliti u dvije opće kategorije, apsorpcijska i fluorescentna spektroskopija, koje se dalje dijele na kvalitativne i kvantitativne tehnike. Većinom se koristi kvantitativna apsorpcijska spektroskopija.

Intezitet signala u UV-Vis spektru ovisi o tri bitna faktora: koncentraciji analita, duljini puta zrake kroz otopinu (debljini kivete) te efikasnosti analita da apsorbira svjetlost (Penner, 2009). Zakon koji prikazuje ovisnost inteziteta apsorpcije o koncentraciji analita naziva se Lambert-Beer zakon (1):

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon l c \quad (1)$$

Pri tome su  $I_0$  i  $I$  intenziteti upadnog i propuštenog zračenja,  $A$  je apsorbancija,  $c$  je množinska koncentracija uzorka ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $l$  je debljina kivete, odnosno duljina puta zračenja (cm), a  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{L mol cm}^{-1}$ ) (Penner, 2009).

Uređaj koji se koristi za snimanje UV-Vis spektara naziva se spektrofotometar te se ne razlikuje mnogo od spektrofotometara za ostala područja spektra osim što kao izvor koristi volframova lampu za valne duljine veće od 375 nm ili deuterijska lampa za manje vrijednosti. Najčešće se koriste kivete od 1 cm od sintetičkog ili prirodnog kvarca. Zbog apsorpcije stakla pri 300 nm staklene kivete nisu pogodne za analizu organskih uzoraka. Kako ne bi došlo do ogrebotina kiveta i time do pogreški prilikom mjerenja, potrebno ih je koristiti uz oprez i skladištiti ih na odgovarajući način.

Neke vrste analita ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, pa je potrebno upotrijebiti kromogene reagense koji takve analite prevode u oblik moguć za spektrofotometrijsko određivanje. Tako se fenol kao kromogeni reagens može koristiti kod određivanja ukupnih šećera, bakrov sulfat kod određivanja ukupnih proteina, Folin-Ciocalteu reagens za fenole i aluminijev klorid za flavonoide.

#### *2.4.2.1. Određivanje udjela proteina*

Proteini su makromolekule građene od velikog broja aminokiselina. Udio proteina u namirnicama većinom se određuje indirektno iz udjela dušika, a koriste se najčešće Dumasov, Will-Varrentroppov, Meulen-Heslingov i Kjeldahlov postupak (Chang, 2009).

Proteini se često određuju i raznim bojenim i taložnim reakcijama kao što su biuret reakcija, ksantoproteinska reakcija, primjena azo bojila, Sørensenova formolna titracija i elektroforeza (Chang, 2009). Princip biuret reakcije temelji se na međudjelovanju proteina s koncentriranom dušičnom kiselinom, a zbog prisutnosti aromatskih aminokiselina nastaje žuto obojenje, čiji je intenzitet proporcionalan količini proteina.

### 2.4.3. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu

Od svoje komercijalizacije 1983. godine, ICP-MS (spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu) je analitička tehnika multielementne analize čija upotreba sve više raste. Istovremeno određivanje velikog broja elemenata (preko 70), kratko vrijeme analize, mogućnost uklanjanja interferencija, velika točnost i preciznost te niske razine detekcije (ppt) čine ovu tehniku atraktivnijom od npr. FAAS (*engl.* Flame atomic absorption spectrometry, plamena atomsko apsorpcijska spektrometrija) ili ICP-OES (*engl.* Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, Optičko emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom) koje se tradicionalno koriste za potrebe multielementne analize (Thomas, 2008).

Princip rada ICP-MS: uzorak (svi uzorci moraju biti tekućina, ukoliko su u krutom stanju moraju se prethodno prevesti u tekućinu) se unosi u sustav za uvođenje uzorka gdje raspršivač prevodi tekuće uzorke u sitne kapljice (aerosol) koje idu kroz sprej komoru u injektor koji je centralni kanal plamenika (Thomas, 2008). U ICP plameniku argon prolazi kroz niz koncentričnih kvarcnih cijevi, koji su na jednom kraju omotani radio-frekvencijskom zavojnicom koja dobiva energiju iz radio-frekvencijskog generatora. Energiju isporučenu zavojnici argon pretvara u plazmu (temp. 6000 °C), atomi apsorbiraju energiju iz plazme i eventualno otpuštaju jedan elektron te nastaju pojedinačno nabijeni ioni koji napuštaju plazmu i odlaze u područje "interface"-a koji je potreban zbog razlike u temperaturi i tlakovima (povezuje atmosferski tlak s vakuumom u masenom spektrometru) (Thomas, 2008). Interface se sastoji od dva stošca od nikla ili platine s otvorom od 1 mm u metalnom kućištu hlađenom vodom. Nakon što se ioni uspješno izdvoje iz „interface“-a, ionske leće ih fokusiraju u zraku i šalju u uređaj za razdvajanje iona (analizator masa) te pritom zaustavljaju dolazak fotona, čestica i neutralnih vrsta do detektora (Thomas, 2008). Uređaj za razdvajanje iona odjeljuje ih prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Postoji više različitih uređaja za razdvajanje iona, no najznačajniji su „quadrupole“ (kvadrupolni analizator masa), TOF (analizator vremena proleta) te DFMS (analizator s dvostruko fokusirajućim magnetskim sektorom). Elektroni prolaze kroz uređaj za razdvajanje te dolaze do detektora koji broji pojedinačne ione koji su prošli kroz uređaj za razdvajanje. Cjelokupnim procesom upravlja i kontrolira software u računalu s kojim je uređaj povezan (Thomas, 2008).

## 2.5. EKSTRAKCIJA SPOJEVA

U postupku izolacije prirodnih produkata primjenjuje se ekstrakcija, tj. prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo. Ekstrakcija komponenata iz materijala uključuje proces pripreme uzorka, tj. sušenje materijala na zraku i mljevenje do određene granulacije čestica, a potom slijedi ekstrakcija usitnjenog materijala primjenom odgovarajuće konvencionalne ili nekonvencionalne metode. Konvencionalne tehnike ekstrakcije se temelje na primjeni selektivnih otapala, povišene temperature uz ili bez miješanja reakcijske smjese. Dije se na Soxhlet ekstrakciju, maceraciju, refluksiranje i destilaciju.

Kako bi se osigurao što uspješniji proces ekstrakcije ciljanih analita, te prevladali nedostaci konvencionalnih metoda, kao što su dugotrajno vrijeme ekstrakcije, primjena otapala visoke čistoće i velikih volumena, niske selektivnosti, te razgradnja termolabilnih spojeva, došlo je do razvoja tzv. nekonvencionalnih metoda ekstrakcije (Azmir i sur., 2013). One obuhvaćaju upotrebu ultrazvuka, pulsno električnog polja i enzima, te mnogih drugih tehnika koje su još u razvoju. Zbog većeg prinosa izolata, skraćenog vremena i poboljšane kvalitete ekstrakta, ove metode pronalaze sve veću primjenu.

Bez obzira na navedene prednosti, u ovom radu su korištene konvencionalne ekstrakcijske metode (refluksiranje i Soxhlet), a u poglavljima 2.5.1. i 2.5.2. dan je i njihov pobliži opis.

### 2.5.1. Refluksiranje

Ova metoda se provodi na način da se tikvica koja sadrži materijal u odgovarajućem otapalu zagrijava do temperature vrenja otapala, pri čemu dolazi do oslobađanja molekula iz unutrašnjosti čvrste faze svladavanjem međumolekulskih sila uz istovremenu difuziju molekula u otapalo. Pare otapala koje sadrže ekstrahirane komponente kondenziraju se prolaskom kroz povratno hladilo. Na kraju procesa refluksiranja ekstrahirani materijal se odvaja od otapala postupcima filtracije ili dekantiranja. Unatoč efikasnosti, ova metoda se slabije primjenjuje zbog upotrebe velikih volumena otapala, dugotrajnog vremena ekstrakcije te dodatnog pročišćavanja otopine analita zbog mogućnosti ekstrahiranja nepoželjnih komponenata (interferenti).

### 2.5.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je vrsta ekstrakcije čija je primjena u početku bila ograničena na izolaciju masti (poglavlje 2.4.1.4), a naposljetku se proširila i na izolaciju ostalih bioaktivnih komponenata. Princip rada, bazira se na uparavanju, kondenzaciji visoko selektivnog otapala koje prolazi kroz celulozni tuljac u kojemu se nalazi usitnjeni i homogenizirani čvrsti uzorak. Otapalo zadržava analit te se vraća u tikvicu zajedno sa ekstraktom. Proces se provodi kontinuirano sve dok se ne ekstrahira određeni analit.

Postupak ekstrakcije bazira se na tome da se čahura s uzorkom pokrije slojem odmašćene suhe vate i stavi u srednji dio Soxhletove aparature (ekstraktor) koji se spoji s hladilom i tikvicom (prethodno ohlađena i izvagana). Kroz hladilo se zatim uz pomoć lijevka ulijeva toliko otapala da se ekstraktor napuni i pomoću kapilarne cjevčice isprazni u tikvicu. Puštanjem vrlo jakog mlaza vode započinje zagrijavanje tikvice s otapalom u vodenoj ili pješčanoj kupelji. Ekstrakcija završava u trenutku kad se otapalo iz ekstraktora prelije u tikvicu, a čahura u ekstraktoru ostane bez otapala.

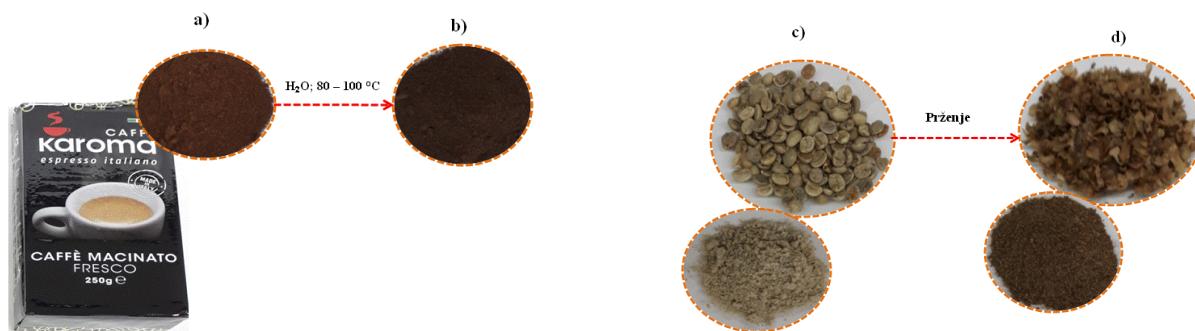
Iako je aparatura za Soxhlet ekstrakciju relativno jeftina, osnovni nedostaci ovog procesa su dugo trajanje (10 do 24 h), zagađenje okoliša zbog velike potrošnje organskih otapala (300 mL/uzorak) i njihova zbrinjavanja te potreba za stabilnošću spojeva koji se ekstrahiraju na temperaturi vrenja otapala (Min i Ellefson, 2010).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Espresso kava „Karoma“ (mješavina arabike i robuste), sirova kava „Karoma“, te srebrna pokožica nastala prženjem sirove kave (Slika 3) dobavljeni su od FEIO srl, Angri (SA), Italija. Čvrsti ostatak zaostao nakon konzumacije espresso kave „Karoma“ pripremljen je u Laboratoriju za analitičku kemiju tradicionalnim talijanskim postupkom u posudi „kafetijeri“, (voda,  $T = 80$  do  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Čvrsti ostatak (talog) je kvantitativno odvojen i osušen na sobnoj temperaturi.



**Slika 3.** Espresso kava (a), talog espresso kave (b), sirova kava (c) i srebrna pokožica (d).<sup>1</sup>

#### 3.2. KEMIKALIJE

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bakrov sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bovin serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Destilirana voda (Zagreb, Hrvatska)
- Dušična kiselina,  $\text{HNO}_3$  (65 % supra pur, Fluka, Steinheim, Švicarska)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

<sup>1</sup> Slike nastale izvorno u laboratoriju za analitičku kemiju.

- Fenol (Acros organics, Geel, Belgija)
- Fenolftalein (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Fluorovodična kiselina, HF (48 %, supra pur, J.T. Baker, Nizozemska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina)
- Glukoza monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Interni standard (In, 1 g L<sup>-1</sup>, Fluka, Steinheim, Švicarska)
- Kalij natrij tartarat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- Kalijev jodid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Petroleter (Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska)
- Pojedinačna standardna otopina Sb (Analytika, Prag, Češka)
- Pojedinačna standardna otopina Sn (Analytika, Prag, Češka)
- Pojedinačna standardna otopina U (Aldrich, Milwaukee, WI, SAD)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Standardna multielementna otopina (Analytika, Prag, Češka)
- Standardna multielementna otopina (Fluka, Steinheim, Švicarska)
- Sumporna kiselina (VWR Chemicals)

### **3.3. PRIBOR**

- Aluminijske posudice
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 µL (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Boce širokog grla za čvrste tvari
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Celulozne čahure (tuljci)
- Eksikator sa silika gelom
- Erlenmeyerove tikvice 100 mL

- Erlenmeyerove tikvice s brušenim grlom 250 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Filter papir
- Gooch lončići
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Laboratorijske čaše
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25, 50, 100 i 500 mL
- Odsisna boca
- Pinceta
- Plamenik
- Porculanske zdjelice
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Satno staklo
- Staklene čaše od 50, 100 i 500 mL
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapići
- Termometar
- Tikvice s okruglim dnom od 250 mL

### **3.4. APARATURA**

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- HR-ICP-MS (Thermo, Bremen, Njemačka)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Mufolna peć (Model Heraew, Grad, Drzava)
- Soxhlet ekstraktor
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)

- Vodena kupelj za Soxlet ekstrakciju (Inka, Zagreb, Hrvatska)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)

### 3.5. METODE RADA

#### 3.5.1. Određivanje sadržaja vlage u uzorcima kave i nusproizvoda

Odvažuje se 3 grama uzorka (kava i nusproizvodi) u prethodno osušenu, ohladenu te izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Nepokrivena posudica s poklopcem suši se pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase, zatim se hladi u eksikatoru 1 h te važe. Ostatak predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi udjel vode u uzorku (2):

$$w(\text{vode}) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je  $m_1$  - masa prazne aluminijske posudice (g),  $m_2$  - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i  $m_3$  - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

#### 3.5.2. Određivanje sadržaja pepela u uzorcima kave i nusproizvoda

Odvažuje se 1 g uzorka (kava i nusproizvodi) u prethodno žarenu, ohladenu (eksikator) te izvaganu porculansku zdjelicu. Uzorak u zdjelici se zagrijava lagano na plameniku dok potpuno ne pougljeni, a zatim stavi u mufolnu peć zagrijanu na 600 °C do postizanja konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru 1 h uzorak se važe te se mineralni ostatak izračuna prema formuli 3:

$$w(\text{pepeo}) = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je:  $m_1$  - masa prazne porculanske zdjelice (g),  $m_2$  - masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g) i  $m_3$  - masa porculanske zdjelice i pepela (g).

### 3.5.3. Određivanje sadržaja masti u uzorcima kave i nusproizvoda

Odvažuje se 5 g prethodno osušenog uzorka (kava i nusproizvodi) u odmašćenu, papirnatu čahuru. Čahura se pokrije slojem odmašćene suhe vate i stavi u srednji dio Soxhletove aparature (ekstraktor) koji se zatim spoji s hladilom i tikvicom, koja je prethodno sušena pri 105 °C, ohlađena i izvagana. Kroz hladilo se zatim uz pomoć lijevka ulije toliko petroletera da se ekstraktor napuni i pomoću kapilarne cjevčice isprazni u tikvicu. Zatim se doda još toliko petroletera da napuni do otprilike polovicu ekstraktora. Ukupni volumen otapala ne smije prijeći  $\frac{3}{4}$  volumena tikvice. Zagrijavanje tikvice s otapalom izvodi se u vodenoj kupelji. Temperatura zagrijavanja regulira se tako da kondenzirane kapljice otapala padaju tolikom brzinom da se jedva mogu brojati. Ekstrakcija traje 6 h i ponavlja se do postizanja konstantne mase (ukupno 16 h). Tikvica s ekstraktom se suši pri 100 °C, 30 minuta, hladi u eksikatoru do sobne temperature i važe. Udio masti izračuna se prema formuli 4:

$$w(\text{masti}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je  $m_1$  - masa prazne tikvice (g),  $m_2$  - masa tikvice i ekstrahirane masti (g) i  $m$  - masa uzorka uzetog za analizu (g).

### 3.5.4. Određivanje sadržaja celuloze u uzorcima kave i nusproizvoda

U Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim grlom odvažuje se 2 g odmašćenog uzorka, doda 200 mL kipuće 0,255 mol L<sup>-1</sup> sumporne kiseline te refluksira 1 h. Vruća otopina filtrira se preko Gooch-ijeva lončića. Zaostali talog ispire se nekoliko puta s 40 do 50 mL kipuće vode, vrati u Erlenmeyerovu tikvicu, doda 200 mL kipućeg 0,313 mol L<sup>-1</sup> natrijevog hidroksida te ponovo refluksira, 1 h. Potom se otopina profiltrira preko Gooch-ijeva lončića, a zaostali talog ispire nekoliko puta s 30 mL etanola i 50 mL kipuće vode. Gooch-ijev lončić s talogom suši se preko noći na 105 °C, a zatim spaljuje 4 h u mufolnoj peći (600 °C), hladi u eksikatoru te važe. Udio celuloze izračuna se prema formuli 5:

$$w(\text{celuloza}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je  $m_1$  - masa Gooch lončića,  $m_2$  - masa Gooch lončića s odmašćenim uzorkom nakon spaljivanja i  $m$  - masa odmašćenog uzorka uzetog za analizu.

### 3.5.5. Određivanje sadržaja lignina u uzorcima kave i nusproizvoda

Lignin je određen po metodi Sluiter i suradnika (2010) po kojoj se izvaže 300 mg uzorka u staklenu čašu, doda 3 mL 72 % sumporne kiseline te postavi u vodenu kupelj 60 minuta na 30 °C uz povremeno miješanje. Čaša s uzorkom izvadi se iz vodene kupelji te se doda 84 mL deionizirane vode kako bi se prethodno dodana 72 % sumporna kiselina razrijedila na volumni udio od 4 %. Uzorak se profiltrira kroz prethodno osušen i izvagan Gooch-ijev lončić. Filtrat se koristi kako bi se odredio topljivi dio lignina daljnjom UV-Vis spektrofotometrijskom analizom, dok se talog koristi za određivanje netopljivog lignina. Gooch lončić s talogom suši se do konstantne mase na 105 °C te žari na 575 °C, 24 h u mufolnoj peći, hladi u eksikatoru te važe.

Netopljivi lignin (*engl.* acid insoluble residue, AIR) odredi se prema formuli 6:

$$\text{AIR} = \frac{m}{M} \quad (6)$$

gdje je  $m$  - masa osušenog taloga (g) i  $M$  - masa suhe tvari uzorka prije hidrolize (g)

Topljivi lignin (*engl.* acid soluble lignin ASL) izračunat je iz dobivene apsorbancije prema formuli:

$$\text{ASL} = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot M} \quad (7)$$

gdje je  $A$  - apsorbancija izmjerena pri 205 nm,  $D$  - faktor razrijedenja (za ove uzorke iznosio je 1:20),  $V$  - volumen filtrata (L) (iznosio je 0,029 L),  $a$  - koeficijent ekstrinkcije lignina ( $\text{g L}^{-1} \cdot \text{cm}$ ) iznosio je  $25 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}$  (Sluiter i sur. 2010),  $b$  - širina kivete = 1 cm,  $M$  - masa suhe tvari uzorka prije hidrolize (g).

Ukupni lignin izračuna se kao zbroj topljivog i netopljivog lignina prema formuli 8:

$$\text{Ukupni lignin} = \text{AIR} + \text{ASL} \quad (8)$$

### 3.5.6. Priprema ekstrakata kave i nusproizvoda

U svrhu pripreme ekstrakata za određivanje fenola i flavonoida odvagano je 1,5 g uzorka (kava i nusproizvodi) te refluksirano s 50 mL vodenih otopina 50 i 70 % (v/v) etanola pri temperaturi od  $85 \pm 15$  °C tijekom 2 h. Ekstrakti za određivanje šećera, proteina i ukupne kiselosti dobiveni su refluksiranjem 5 g uzorka s 100 mL deionizirane vode pri temperaturi od  $50 \pm 5$  °C.

### 3.5.7. Određivanje fenola i flavonoida u uzorcima kave i nusproizvoda

#### 3.5.7.1. Priprema otopina

- Folin-Ciocalteu (FC) reagens ( $c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ): otpipetira se 2,5 mL FC reagensa ( $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ ) u 25 mL destilirane vode.
- Otopina natrijevog karbonata ( $w = 20 \%$ ,  $w/v$ ): otopi se 200 g natrijevog karbonata u 800 mL vruće, ključale destilirane vode i nakon hlađenja doda se nekoliko kristalića natrijevog karbonata. Nakon 24 sata otopina se profiltrira.
- Galna kiselina ( $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$ ): izvaži se 0,25 g galne kiseline te se pomoću 10 mL etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, a potom se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- Otopina rutina ( $\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$ ): 0,1000 g rutina otopi se u 10 mL metanola u odmjernoj tikvici od 100 mL, te se odmjerna tikvica nadopuni s metanolom.
- Natrijev nitrit ( $w = 5 \%$ ,  $w/v$ ): odvaži se 5 g  $\text{NaNO}_2$  i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Aluminijev klorid ( $w = 10 \%$ ,  $w/v$ ): odvaži se 10 g  $\text{AlCl}_3$  i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- Natrijev hidroksid ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ): odvažuje se 2 g NaOH i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjernej tikvici od 100 mL.

### 3.5.7.2. Postupak određivanje ukupnih fenola

Za izradu baždarnog dijagrama odvažuje se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL etanola te nadopuni deioniziranom vodom u odmjernej tikvici od 100 mL. Iz tako pripremljene ishodne standardne otopine galne kiseline ( $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$ ) otpipetira se 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3 i 1,8 mL alikvota u odmjernej tikvici od 50 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180  $\text{mg L}^{-1}$ .

Iz ovako priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se 1 mL alikvota u odmjernej tikvici od 25 mL, doda 10 mL destilirane vode i 1,25 mL FC reagensa ( $c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ). Nakon 5 minuta doda se 3,75 mL 20 % otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Tikvice se nadopune destiliranom vodom do oznake te čuvaju na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu 2 sata, nakon čega im se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL deionizirane vode.

Uzorci s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih fenola pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine, ali umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzeti su različiti alikvoti razrijeđenih ekstrakata (Tablica 1).

**Tablica 1.** Razrjeđenje i alikvoti ekstrakata uzoraka upotrebljeni kod određivanja ukupnih fenola.

	Kava		Nusproizvod	
	Espresso	Sirova	Srebrna pokožica	Talog
Razrjeđenje	2:50 (v/v)	2:50 (v/v)	/	/
Alikvot	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

Iz izmjerenih apsorbancija pripremljenih pojedinačnih standardnih otopina i njihovih masenih koncentracija izradi se baždarni dijagram, a zatim se iz dobivene jednadžbe pravca izračuna masena koncentracija te maseni udio ukupnih fenola u uzorcima.



### 3.5.7.3. Postupak određivanje ukupnih flavonoida

Za izradu baždarnog dijagrama odvaži se 0,1000 g rutina, otopi u 10 mL metanola te nadopuni deioniziranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL. Iz tako priređene ishodne otopine rutina, masene koncentracije  $1 \text{ g L}^{-1}$  otpipetira se 0,5; 1,5; 2,5; 5,0; 6,5 i 9,0 mL alikvota u odmjerne tikvice od 50 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i  $180 \text{ mg L}^{-1}$ .

Iz priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se 1 mL alikvota u odmjerne tikvice od 10 mL te se doda 2 mL deionizirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine  $\text{NaNO}_2$ , 0,5 mL 10 %-tne otopine  $\text{AlCl}_3$  (nakon 5 minuta ) i 2 mL  $\text{NaOH}$ , množinske koncentracije  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (nakon 6 minuta), a potom se tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake. Na isti način priprema se i slijepa proba no umjesto 1 mL standarda upotrebljava se isti volumen destilirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada, srebrne pokožice, te sirove kave s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih flavonoida pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzeti su alikvoti njihovih ekstrakata prikazani u Tablici 2.

Tako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm, a zatim se iz izmjerenih apsorbancija i masenih koncentracija pojedinačnih otopina rutina izradi baždarni dijagram. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija, odnosno maseni udio ukupnih flavonoida u uzorcima.

**Tablica 2.** Razrjeđenje i alikvoti ekstrakata uzoraka upotrebljeni kod određivanja ukupnih flavonoida.

	Kava		Nusproizvodi	
	Espresso	Sirova	Srebrna pokožica	Talog
Razrjeđenje	2:50 (v/v)	2:50 (v/v)	/	/
Alikvot	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

### 3.5.8. Određivanje ukupnih šećera u uzorcima kave i nusproizvoda

#### 3.5.8.1. Priprema otopina

- Otopina glukoze ( $\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$ ): odvagano je 100 mg glukoze i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.
- Otopina fenola ( $w = 5 \%$ ,  $w/v$ ): otopljeno je 2,5 g fenola u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.

#### 3.5.8.2. Postupak određivanje ukupnih šećera

Za izradu baždarnog dijagrama iz ishodne standardne otopine glukoze ( $\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) otpipetira se 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mL alikvota u odmjerne tikvice od 50 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija 5, 10, 20, 40, 60, 80  $\text{mg L}^{-1}$ .

Iz priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se 1 mL alikvota u odmjerne tikvice od 25 mL te se doda 1 mL 5 %-tne otopine fenola i 5 mL koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nakon miješanja na vorteksu, otopina se zagrijava 5 minuta na vodenoj kupelji uz ključanje, zatim se hladi u posudi s ledom. Otopina se zatim ostavi na tamnom mjestu 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do stvaranja žuto-zlatno obojenog kompleksa. Tako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija pri 492 nm. Na isti način priprema se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL deionizirane vode.

Uzorci kave i nusproizvoda s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih šećera pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzet je 1 mL razrijeđenih ekstrakata kave i nusproizvoda.

Razrijeđeni ekstrakti priređeni su tako da je 1 mL espresso kave, sirove kave i srebrne pokožice, te 2 mL taloga kave dobivenih postupkom refluksiranja (poglavlje 3.5.6.) otpipetiran u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene s deioniziranom vodom do oznake.

Iz izmjerenih apsorbancija pripremljenih standardnih otopina i masenih koncentracija otopine glukoze izradi se baždarni dijagram, a iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija, odnosno maseni udio ukupnih šećera u uzorcima.

### 3.5.9. Određivanje proteina u uzorcima kave i nusproizvoda

#### 3.5.9.1. Priprema otopina

- Biuret reagens: odvagano je 1,6 g NaOH, 1,8 g KNa tartarata, 0,6 g CuSO<sub>4</sub> i 1,8 g KI te otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 200 mL.
- Otopina BSA standarda ( $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ): otopljeno je 0,253 g BSA u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 25 mL.

#### 3.5.9.2. Postupak određivanje ukupnih proteina

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su pojedinačne standardne otopine BSA ( $\gamma = 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2$  i  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) tako da su alikvoti od 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 i 3,2 mL ishodne otopine BSA ( $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) otpipetirani u odmjerne tikvice od 10 mL, koje su potom razrijeđene deioniziranom vodom do oznake. Iz ovako priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se po 3 mL alikvota u staklene epruvete, te se doda 3 mL biuret reagensa. Nakon što se otopine homogeniziraju na vorteksu i inkubiraju na sobnoj temperaturi 30 minuta, izmjeri im se i apsorbancija pri valnoj duljini od 540 nm.

Na isti način priprema se i slijepa proba, ali umjesto 3 mL standarda uzima se 3 mL deionizirane vode.

Za određivanje ukupnih proteina u uzorcima otpipetirano je 0,100 mL ekstrakata kave i nusproizvoda, te je dodano 2,900 mL deionizirane vode i 3 mL biuret reagensa.

### 3.5.10. Određivanje ukupne kiselosti u uzorcima kave i nusproizvoda

Točno 2 mL refluksiranih ekstrakata (poglavlje 3.5.6.) otpipetira se u odmjerne tikvice od 100 mL, a potom se tikvice nadopune deioniziranom vodom do oznake. Alikvoti razrijeđenih uzoraka

(25 mL) se zatim otpipetiraju se u Erlenmeyerove tikvice, te titiraju otopinom NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) uz fenolftalein kao indikator.

Rezultati ukupne kiselosti su izraženi kao g limunske kiseline na 100 g uzorka, uzimajući u obzir volumen utrošenog NaOH te razrijeđenje refluksiranih uzoraka.

### 3.5.11. Određivanje mineralnog sastava u uzorcima kave i nusproizvoda

Određivanje mineralnog sastava provedeno je prema metodi Filipović Marijić i Raspor (2012). Ukratko, odvaži se 0,05 g uzorka kave i nusproizvoda u teflonske bočice za raščinjavanje, te doda 6 mL  $\text{HNO}_3$  i 0,1 mL HF. Uzorci se podvrgavaju raščinjavanju u zatvorenom mikrovalnom sustavu (Multiwave ECO). Nakon hlađenja uzorak se prebacuje u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni sa ultračistom vodom do oznake. Odvoji se alikvot (cca 20 mL) za potrebe daljnje analize. Zatim se 9,700 mL alikvota, 200  $\mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$  i 100  $\mu\text{L}$  internog standarda (In,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) otpipetira u falkonicu. Tako pripremljeni uzorci idu na daljnju HR-ICP-MS analizu.

Za kvantifikaciju uzoraka je korištena vanjska kalibracija pomoću multielementnih standardnih otopina u rasponu koncentracija  $1 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$  za elemente u tragovima, odnosno  $1 - 2 \text{ mg L}^{-1}$  za makro elemente (K, Na i Mg). Serija standardnih otopina, na temelju koje su određene koncentracije elemenata u tragovima, pripremljena je odgovarajućim razrijeđivanjem standardne multielementne otopine od  $100 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  koja sadrži sljedeće elemente: Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, Tl, V i Zn uz dodatak pojedinačnih standardnih otopina Sn ( $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ ) Sb ( $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ ) i U ( $1,000 \text{ g L}^{-1} \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ ). Koncentracije K, Mg i Na u uzorcima određene su na temelju standardnih otopina pripremljenih odgovarajućim razrijeđivanjem standardne multielementne otopine. Sve otopine (standardi i uzorci) stabilizirane su dodatkom 2 % (v/v)  $\text{HNO}_3$ . Kao interni standard korištena je standardna otopina In ( $1,000 \text{ g L}^{-1} \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ ).

Kontrola kvalitete mjerenja provedena je istovremenim mjerenjem odgovarajućih certificiranih referentnih materijala za biljke (Apple leave - NIST SRM 1515, The National Institute of Standards and Technology, USA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljedica velike proizvodnje kave u svijetu, kao i njezine konzumacije je i nastanak velikih količina nusproizvoda, primarno srebrne pokožice i taloga, koji ukoliko se ispuštaju u okoliš predstavljaju opasnost od njena onečišćenja (Ballesteros i sur., 2014). Uzimajući u obzir navedene ekološke posljedice, kao i današnji trend iskorištavanja otpada prehrambene industrije u proizvodnji novih funkcionalnih sastojaka, cilj ovoga rada bio je odrediti kemijski sastav srebrne pokožice, nusproizvoda nastalog postupkom prženja sirove kave, te taloga espresso kave nastalog nakon njene pripreme i konzumiranja. U cilju valorizacije navedenih nusproizvoda određen je i kemijski sastav sirove i espresso kave kako bi se na temelju dobivenih vrijednosti izoliranih spojeva mogla pronaći rješenja za njihovu daljnju implementaciju u prehrambenim proizvodima.

U uzorcima espresso i sirove kave „Karoma“, te njihovih nusproizvoda (talog i srebrna pokožica) je određen udio vode, pepela, masti, celuloze i netopljivog lignina gravimetrijom metodom, te ukupnih fenola, flavonoida, šećera, proteina i topljivog lignina UV/Vis spektrofotometrijom metodom. Također, navedenim uzorcima određen je i mineralni sastav koristeći HR-ICP-MS. Niže navedena poglavlja opisuju rezultate ovih određivanja.

### 4.1. SADRŽAJ VLAGE U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Udio vlage u uzorcima sirove i espresso kave, te njihovih nusproizvoda (srebrna pokožica i talog) određen je gravimetrijskom metodom. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 3.

Najveći sadržaj vlage od 11,85 % ima talog, a zatim slijedi sirova kava sa 7,22 %. Dobivene vrijednosti vlage u sirovoj kavi su u skladu s rezultatima Nogaim i suradnika (2013) koji pronalaze vrijednosti u rasponu od 5,22 do 7,77 %. Farah (2012) dobiva nešto viši udio (8,5 do 12 %), pa se može zaključiti da udio vlage u sirovoj kavi varira i ovisi o vrsti kave.

Srebrna pokožica sadrži 6,2 % vlage što je nešto niža vrijednost u odnosu na onu dobivenu u radu Borrelli i suradnika (2004) koji dobivaju vrijednost od 7,3 %. Espresso kava

sadrži znatno niži udio vlage od 1 % što je slično rezultatima Franca i sur. (2004) koji dobivaju vrijednost od 1,35 %.

**Tablica 3.** Udio vlage u uzorcima kave i nusproizvoda.

<b>w (vlaga)/% ± SD</b>			
<b>Kava</b>		<b>Nusproizvod</b>	
<b>Sirova</b>	<b>Espresso</b>	<b>Srebrna pokožica</b>	<b>Talog</b>
7,218 ± 0,201	1,029 ± 0,081	6,198 ± 0,085	11,85 ± 0,468

$N = 6$

Svakako valja naglasiti da su dobivene vrijednosti vlage za sirovu i espresso kavu „Karoma“ u skladu s vrijednostima propisanim Pravilnikom o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina (Narodne novine, 2004) prema kojem sirova kava ne smije sadržavati više od 12 % vode, a pržena kava više od 5 % vode.

Uzimajući u obzir da se espresso kava dobiva prženjem sirove kave (srebrna pokožica kao nusproizvod) u procesu koji dovodi do isparavanje određenog djela vode dobiveni udjeli vlage su u skladu s očekivanjima: 7,218 % (sirova kava) → 6,198 % (srebrna pokožica) → 1,029 % (espresso kava).

Talog kave sadrži značajnu količinu vode jer espresso kava tijekom priprave napitka dolazi u kontakt s vodom pri čemu dolazi do njene apsorpcije, pa je i ova veća dobivena vrijednost u odnosu na ostale uzorke očekivana. Budući da talog kave sadrži značajnu količinu vode trebalo bi pronaći adekvatnu metodu njena uklanjanja kako bi se na ovom vlažnom biosupstru spriječio rast i razmnožavanje mikroorganizama (Mussatto i sur., 2011a). Također, ukoliko se ulje iz taloga kave želi koristiti u proizvodnji biodizela potrebno je provesti brzo i učinkovito uklanjanje vlage kako bi se spriječila hidroliza lipida (Cruz i sur., 2012). Osim ovog, smanjili bi se i troškovi transporta vlažne biomase, a i sam proces iskorištavanja nusproizvoda bio bi isplativiji.

## 4.2. SADRŽAJ PEPELA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Udio pepela neke namirnice predstavlja ukupni mineralni ostatak, odnosno anorganski dio, preostao nakon spaljivanja organske tvari pri povišenim temperaturama (600 °C). Udio pepela u uzorcima kave i otpada prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Udio pepela u uzorcima kave i nusproizvoda.

<b>w (pepeo)/% ± SD</b>			
<b>Kava</b>		<b>Nusproizvod</b>	
<b>Sirova</b>	<b>Espresso</b>	<b>Srebrna pokožica</b>	<b>Talog</b>
4,28 ± 0,03	4,64 ± 0,07	9,89 ± 0,11	1,53 ± 0,07

$N = 4$

Dobiveni rezultati pokazuju da najveći udio pepela od 9,89 % ima srebrna pokožica, a dobivena vrijednost je znatno viša u odnosu na istraživanje Ballesteros i suradnika (2014) koji za mješavinu Robusta i Arabica kave dobivaju vrijednosti od 5,36 % pepela, dok Borelli i suradnici (2004) za mješavinu talijanske kave dobivaju vrijednost od 7 %. Dakle, dobivene razlike u rezultatima ovog rada i drugih istraživanja mogu se objasniti razlikom u vrsti kave i njenom podrijetlu, tlu na kojem stabljika raste, postupku uzgoja (upotreba različitih pesticida i gnojiva) i obradi kave (Semen i sur., 2016).

U odnosu na sirovu (4,28 %), espresso kava ima nešto veće vrijednosti pepela (4,64 %). S druge pak strane Franca i sur. (2004) dobivaju neznato više vrijednosti pepela za sirovu (4,89 %) u odnosu na espresso kavu (4,40 %). Najniži udio pepela sadrži talog kave s vrijednošću od 1,53 %. Sličnu vrijednost od 1,30 % dobivaju Ballesteros i suradnici (2014).

Sirova i espresso kava Karoma zadovoljavaju uvjete Pravilnika o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina (Narodne novine, 2004) koji propisuje da sirova i espresso ne smiju sadržavati više od 5,5 %, odnosno 6 % pepela.

Budući da je sadržaj pepela u uzorcima proporcionalan udjelu minerala, najviši udio elemenata očekuje se u srebrnoj pokožici, zatim u espresso i sirovoj kavi, te talogu. Navedena tvrdnja potvrđena je HR-ICP-MS analizom, a detaljni sastav i udio minerala objašnjen je u poglavlju 4.10.

### 4.3. SADRŽAJ MASTI U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Nakon ekstrakcije kave i nusproizvoda metodom po Soxhletu određen je i udio masti u njima, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Udio masti u uzorcima kave i nusproizvoda.

<i>w</i> (masti)/% ± SD			
Kava		Nusproizvod	
Sirova	Espresso	Srebrna pokožica	Talog
12,41 ± 0,13	8,89 ± 0,85	1,50 ± 0,09	11,84 ± 0,19

*N* = 4

Najveći udio masti ima sirova kava (12,41 %), a potom talog (11,84 %). Prema Cruz i suradnicima (2012) udio lipida u talogu kave nastalom nakon njena konzumiranja varira od 9,3 do 16,2 % ovisno o vrsti kave. Prema Franco i suradnicima (2005) sirova kava sadrži 11,13 % masti što je neznatno niža vrijednost od one nađene u sirovoj kavi Karoma. Visok udio masti ima i espresso kava (8,89 %), dok su značajno niže vrijednosti od 1,5 % nađene kod srebrne pokožice. Prema rezultatima Franca i suradnika (2005) espresso kava sadrži 10,36 % masti, a srebrna pokožica prema Murthy i suradnicima (2012) 2,2 % masti. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da sadržaj masti varira od istraživanja do istraživanja što prvenstveno ovisi o vrsti kave, a prema Cruz i suradnicima (2012) viši udio masti ima Arabica nego Robusta kava.

Promatrajući dobivene rezultate može se zaključiti da je srebrna pokožica zbog niskog udjela masti i vode stabilan nusproizvod koji se može koristiti kao dodatak prehrambenim proizvodima kao što su niskokalorični keksi, biskviti te antioksidacijska pića za kontrolu tjelesne težine (Mussatto i sur., 2011a; Martinez-Saez i sur., 2014).

Budući da talog kave sadrži visoke udjele masti mogao bi se koristiti za proizvodnju biodizela, ali i kao izvor drugih važnih hidrofobnih komponenti kao što su steroli, terpeni, tokoferoli, te kao biosupstrat za proizvodnju poli-3-hidroksibutirata (Campos-Vega i sur., 2015).



#### 4.4. SADRŽAJ CELULOZE U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

U odmašćenim uzorcima kave i otpada određen je udio celuloze, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 6.

**Tablica 6.** Udio celuloze u uzorcima kave i nusproizvoda.

<b>w (celuloze)/% ± SD</b>			
<b>Kava</b>		<b>Nusproizvod</b>	
<b>Sirova</b>	<b>Espresso</b>	<b>Srebrna pokožica</b>	<b>Talog</b>
0,143 ± 0,011	0,425 ± 0,057	0,675 ± 0,035	0,150 ± 0,042

$N = 4$

Istraživanje Campos-Vega i suradnika (2015) je pokazalo da se celuloza i hemiceluloza iz taloga kave mogu potencijalno koristiti u proizvodnji sorbitola, hidroksimetilfurfurala, manitola, arbutola i ksilitola. Također, hidrolizom taloga kave uz visoki tlak i temperaturu proizvodi se manooligosaharid s probiotičkim djelovanjem (Fukami, 2010).

Unatoč činjenici da se talog kave može efikasno iskoristiti u izolaciji celuloze i proizvodnji njenih funkcionalnih sastojaka, rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju da i kava i nusproizvodi čine materijale s niskim udjelom celuloze. Za usporedbu Ballesteros i suradnici (2014) pronalaze vrijednosti od 12,40 % u talogu, odnosno 23,77 % u srebrnoj pokožici što je oko 83 puta više u odnosu na talog i 166 puta više u odnosu na srebrnu pokožicu. Murthy i suradnici (2011) pronalaze 17,8 % celuloze u srebrnoj pokožici.

Arya i Rao (2007) u sirovoj kavi Arabica pronalaze 6,7 do 7,8 % celuloze, a u sirovoj kavi Robusta 7,8 do 8,7 %, što još jednom potvrđuje da su dobivene vrijednosti znatno više u odnosu na one pronađene u ovom radu.

Unatoč velikim odstupanjima u rezultatima može se zaključiti da srebrna pokožica u odnosu na ostale uzorke sadrži najviši udio celuloze, što ju čini potencijalnim funkcionalnim sastojkom u proizvodnji hrane obogaćene vlaknima s niskim sadržajem masti.

#### 4.5. SADRŽAJ LIGNINA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Maseni udio lignina u uzorcima kave i otpada određen je gravimetrijski (netopljivi dio lignina) i spektrofotometrijski (topljivi dio lignina). Budući da netopljivi dio lignina u uzorcima nije detektiran, rezultati prikazani u Tablici 7 odnose se samo na topljivi dio lignina (ASL).

**Tablica 7.** Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja lignina topljivog u kiselini (ASL) u uzorcima kave i nusproizvoda.

	$A \pm SD$	$w \text{ (ASL)/}\% \pm SD$
<b>Kava</b>		
<b>Sirova</b>	$0,067 \pm 0,003$	$0,079 \pm 0,033$
<b>Espresso</b>	$0,148 \pm 0,001$	$0,174 \pm 0,008$
<b>Nusproizvod</b>		
<b>Srebrna pokožica</b>	$0,058 \pm 0,001$	$0,069 \pm 0,007$
<b>Talog</b>	$0,049 \pm 0,001$	$0,058 \pm 0,017$

$N = 4$

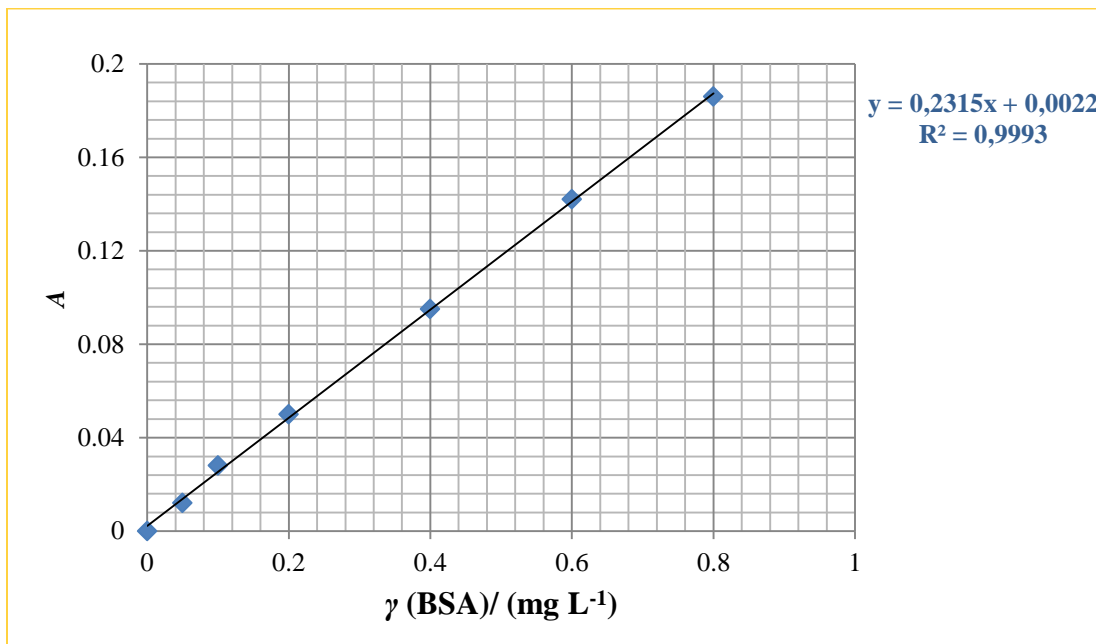
Priloženi rezultati pokazuju da uzorci kave i nusproizvoda sadrže niske vrijednosti ASL. Najveći udio lignina ima espresso kava (0,174 %), što je 2 puta više u odnosu na sirovu kavu (0,079 %) i 3 puta više u odnosu na talog kave, odnosno srebrnu pokožicu. Dobiveni rezultati znatno odstupaju u odnosu na one prikazane u drugim istraživanjima, pa se može zaključiti ga Karoma kava, a pogotovo njeni nusproizvodi ne predstavljaju značajn izvor ligninskih sirovina. Prema Ballesteros i suradnicim (2014) srebrna pokožica sadrži 6,31 % topljivog lignina, a talog kave 7,61 %. Pujola i suradnici (2013) pronalaze vrijednosti od 3,17 do 3,80 %, dok Belitz i suradnici (2009), te Farah (2012) od 1 do 3 %, odnosno 3 % topljivog lignina. Kako na kemijski sastav sirovina biljnog porijekla mogu utjecati uvjeti uzgoja, način prerade i skladištenja, kao i vrsta i varijetet biljke, dovodi do pretpostavke da su neki od navedenih faktora vjerojatno utjecali i na prinos lignina. Očito je kako su vrsta kave i njeni nusproizvodi, kao i metoda određivanja lignina (Sluiter i sur. 2010) upotrebljeni u ovom radu utjecali na prinos lignina, a time i na razlike u rezultatima između ovog i drugih istraživanja.

#### 4.6. SADRŽAJ PROTEINA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Prije određivanja sadržaja proteina u uzorcima kave i otpada izrađen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancija i njima pripadajućih masenih koncentracija (Tablica 8 i Slika 4), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunati su udjeli ukupnih proteina u uzorcima (Tablica 9).

**Tablica 8.** Masene koncentracije individualnih standardnih otopina bovin serum albumina (BSA) i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjenjenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 540 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{BSA})/(\text{mg L}^{-1})$	$A \pm \text{SD}$
0	0,00	0,000 $\pm$ 0,000
1	0,05	0,012 $\pm$ 0,000
2	0,10	0,028 $\pm$ 0,001
3	0,20	0,050 $\pm$ 0,000
4	0,40	0,095 $\pm$ 0,000
5	0,60	0,142 $\pm$ 0,000
6	0,80	0,186 $\pm$ 0,000



**Slika 4.** Baždarni dijagram BSA.

**Tablica 9.** Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih proteina u uzorcima kave i nusproizvoda.

	$A \pm SD$	$w$ (ukupni proteini)/% $\pm SD$
<b>Kava</b>		
<b>Sirova</b>	$0,055 \pm 0,000$	$27,04 \pm 0,00$
<b>Espresso</b>	$0,101 \pm 0,001$	$51,22 \pm 0,73$
<b>Nusproizvod</b>		
<b>Srebrna pokožica</b>	$0,035 \pm 0,004$	$16,72 \pm 1,81$
<b>Talog</b>	$0,019 \pm 0,001$	$8,71 \pm 0,73$

$N = 4$

Rezultati su pokazali da espresso kava sadrži najviše ukupnih proteina (51,22 %), a potom slijedi sirova kava s 2 puta manjim udjelom (27,04 %). Franca i suradnici (2005) u sirovoj Arabica kavi dobivaju vrijednost od 14,47 % proteina, a u espresso kavi 14,24 % proteina. Nogaim i suradnici (2013) u sirovoj Yemeni kavi (Arabica) pronalaze vrijednosti od 10,95 % proteina. Zbog visokih temperatura prilikom prženja sirove kave, očekivala bi se i značajna promjena u udjelu proteina, no prema istraživanju Campos-Vega i suradnika (2015) tijekom prženja dolazi do formiranja hlapivih dušičnih spojeva zbog čega se udio proteina u prženoj kavi ne mijenja značajno. Visoke udjele proteina u espresso i sirovoj kavi (Tablica 9) moguće je objasniti prisustvom interferenata, odnosno spojeva koji se zajedno s proteinima ekstrahiraju u otopinu, te time doprinose ukupnom povećanju njihova sadržaja.

Udio proteina u srebrnoj pokožici iznosi 16,72 %, što je slično rezultatima Murthy i suradnika (2012), te Borelli i suradnika (2004) koji metodom po Kjeldahlu pronalaze vrijednosti od 18,6 %.

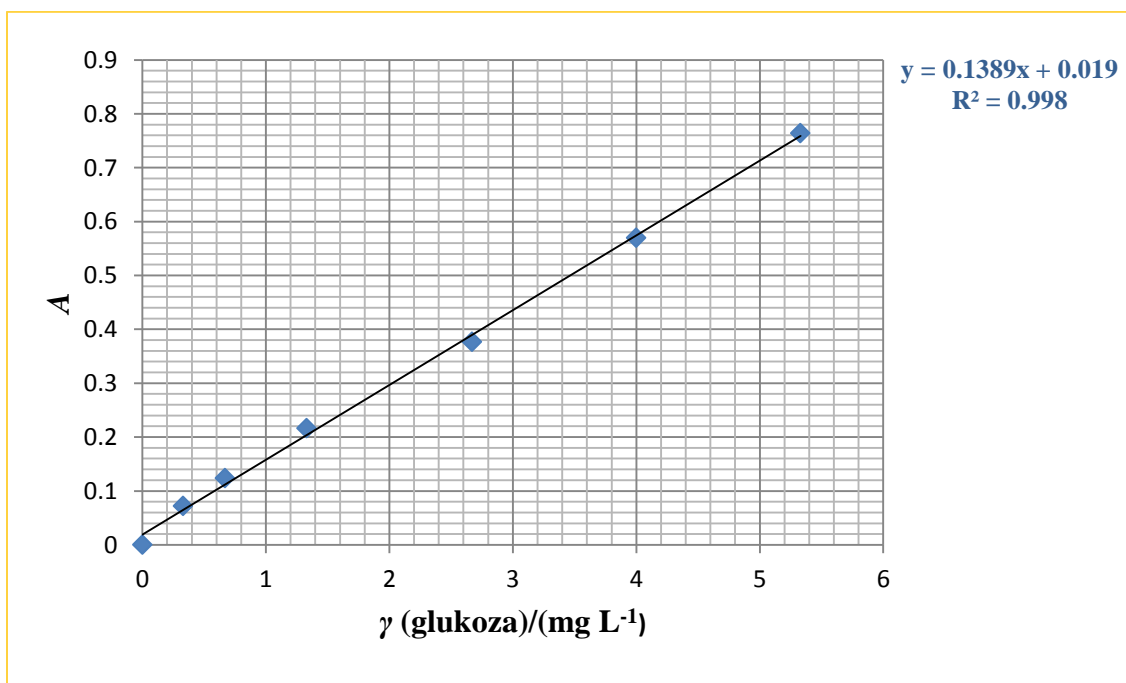
Prema Tablici 9 talog kave sadrži najmanje proteina, svega 8,71 %, dok Campos-Vega i suradnici (2015) pronalaze veće vrijednosti (13,6 %). Na temelju dobivenih rezultata, a sukladno Ballesteros i suradnicima (2014) količine proteina variraju i ovise o uvjetima pripreme kave i njenom varijetetu.

#### 4.7. SADRŽAJ ŠEĆERA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Kako bi se odredio udio šećera u uzorcima kave i otpada izrađen je baždarni dijagram (Tablica 10 i Slika 5), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su vrijednosti masenih koncentracija, odnosno masenih udjela ukupnih šećera u uzorcima (Tablica 11).

**Tablica 10.** Masene koncentracije individualnih standardnih otopina glukoze i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 492 nm.

Standardna otopina	$\gamma$ (glukoza)/(mg L <sup>-1</sup> )	A ± SD
0	0,00	0,000 ± 0,000
1	0,33	0,072 ± 0,001
2	0,67	0,124 ± 0,000
3	1,33	0,217 ± 0,000
4	2,67	0,377 ± 0,001
5	4,00	0,569 ± 0,000
6	5,33	0,711 ± 0,000



**Slika 5.** Baždarni dijagram glukoze.

**Tablica 11.** Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih šećera u uzorcima kave i nusproizvoda.

	$A \pm SD$	$w$ (ukupni šećeri)/% $\pm SD$
<b>Kava</b>		
<b>Sirova</b>	$0,509 \pm 0,002$	$11,98 \pm 0,05$
<b>Espresso</b>	$0,204 \pm 0,001$	$4,78 \pm 0,01$
<b>Nusproizvod</b>		
<b>Srebrna pokožica</b>	$0,169 \pm 0,001$	$3,44 \pm 0,02$
<b>Talog</b>	$0,135 \pm 0,001$	$0,56 \pm 0,00$

$N = 4$

Dobiveni rezultati su pokazali da najveći udio šećera ima sirova kava, nakon čega slijedi espresso kava s otprilike 2,5 puta manje šećera. Nešto niži udio šećera od 3,24 % sadrži srebrna pokožica, što je otprilike 2 puta niže od rezultata koji su dobili Murthy i Naidu (2010). Oni u srebrnoj pokožici pronalaze vrijednosti od 6,65 % šećera. Talog kave sadrži 13 puta manje šećera od espresso kave što upućuje na činjenicu da tijekom ekstrakcije kave pri povišenoj temperaturi dolazi do razgradnje šećera, a time i smanjenja njihova udjela. Zbog niskog sadržaja šećera u srebrnoj pokoži i činjenice da se ovaj nusproizvod nedovoljno iskorištava, a ponekad i baca čini ju potencijalno pogodnim dodatkom u izradi nisko kaloričnih proizvoda. To su dokazali i Martinez-Saez i suradnici (2018) koji ekstrakt srebrne pokožice koriste u proizvodnji antioksidativnih pića, važnim za kontrolu tjelesne težine i dijabetesa.

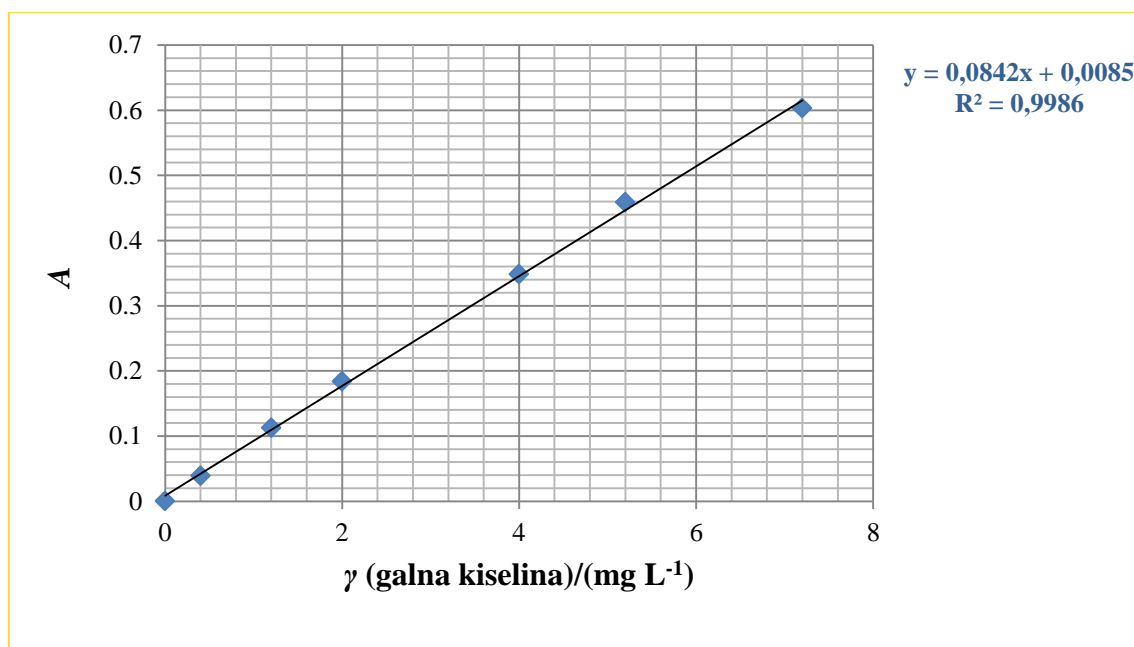
#### **4.8. SADRŽAJ FENOLA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA**

U cilju određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorcima kave i nusproizvoda izrađen je baždarni dijagram ovisnosti masenih koncentracija standardne otopine galne kiseline i njenih pripadajućih apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom (Tablica 11). Iz dobivene jednadžbe pravca (Slika 6) izračunati su maseni udjeli ukupnih fenola u analiziranim uzorcima.

**Tablica 11.** Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbanci izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm.

Standardna otopina	$\gamma$ (galna kiselina)/(mg L <sup>-1</sup> )	A ± SD
0	0,0	0,000 ± 0,000
1	0,4	0,039 ± 0,000
2	1,2	0,113 ± 0,000
3	2,0	0,184 ± 0,000
4	4,0	0,348 ± 0,000
5	5,2	0,459 ± 0,002
6	7,2	0,603 ± 0,000

Rezultati pokazuju da espresso kava sadrži najviše ukupnih fenola, a dobivene vrijednosti se nalaze u rasponu od 6,91 do 7,11 %, ovisno o upotrebljenom otapalu. Zatim slijedi sirova kava s nižim udjelima (4,68 - 4,75 %), što potvrđuje činjenicu da se prženjem sirove kave povećava udio fenola u konzumnoj kavi (Bekhiri-beder i sur., 2018). Tako Belkhiri-beder i suradnici (2018) u prženoj Robusta kavi pronalaze 5,43 % fenola, a u sirovoj Robusta kavi 3,88 %. I stupanj prženja može utjecati na sadržaj fenola, pa je istraživanje Krol i suradnika (2019) pokazalo da svjetlo pržena kava ima više fenolnih spojeva u odnosu na srednje prženu kavu.



**Slika 6:** Baždarni dijagram galne kiseline.

**Tablica 12.** Maseni udjeli ukupnih fenola izmjenjenih UV/Vis spektrofotometrijom u uzorcima kave i nusproizvoda.

	$\varphi$ (etanol)/%	$A \pm SD$	$w$ (ukupni fenoli)/% $\pm SD$
<b>Kava</b>			
<b>Sirova</b>	50	$0,085 \pm 0,003$	$4,75 \pm 0,24$
	70	$0,084 \pm 0,002$	$4,68 \pm 0,15$
<b>Espresso</b>	50	$0,124 \pm 0,005$	$7,11 \pm 0,31$
	70	$0,120 \pm 0,004$	$6,91 \pm 0,15$
<b>Nusproizvod</b>			
<b>Srebrna pokožica</b>	50	$0,273 \pm 0,012$	$1,31 \pm 0,05$
	70	$0,245 \pm 0,013$	$1,17 \pm 0,08$
<b>Talog</b>	50	$0,131 \pm 0,011$	$1,21 \pm 0,13$
	70	$0,118 \pm 0,004$	$1,08 \pm 0,04$

$N = 4$

Fenolni spojevi u sirovoj kavi većinom se pojavljuju u obliku klorogenske kiseline (ester kafeinske i kininske kiseline), a njen udio može varirati (4,1 - 11,3 %) ovisno o vrsti, rodu, klimi i nutritivnom sastavu tla, te procesu prerade (Farah, 2012). Pržena kava ima niži udio klorogenske kiseline od sirove kave jer je podložna termičkoj razgradnji. Pri visokom stupnju prženja klorogenska kiselina se može potpuno razgraditi na fenolne derivate. Iako se prženjem sirove kave smanjuje udio klorogenske kiseline, istim postupkom može doći do povećanja udjela kininske kiseline. U tom procesu derivati klorogenske, kininske, ali i kafeinske kiseline sudjeluju u Maillardovim reakcijama formirajući melanoide (Esquivel i Jiménez, 2011).

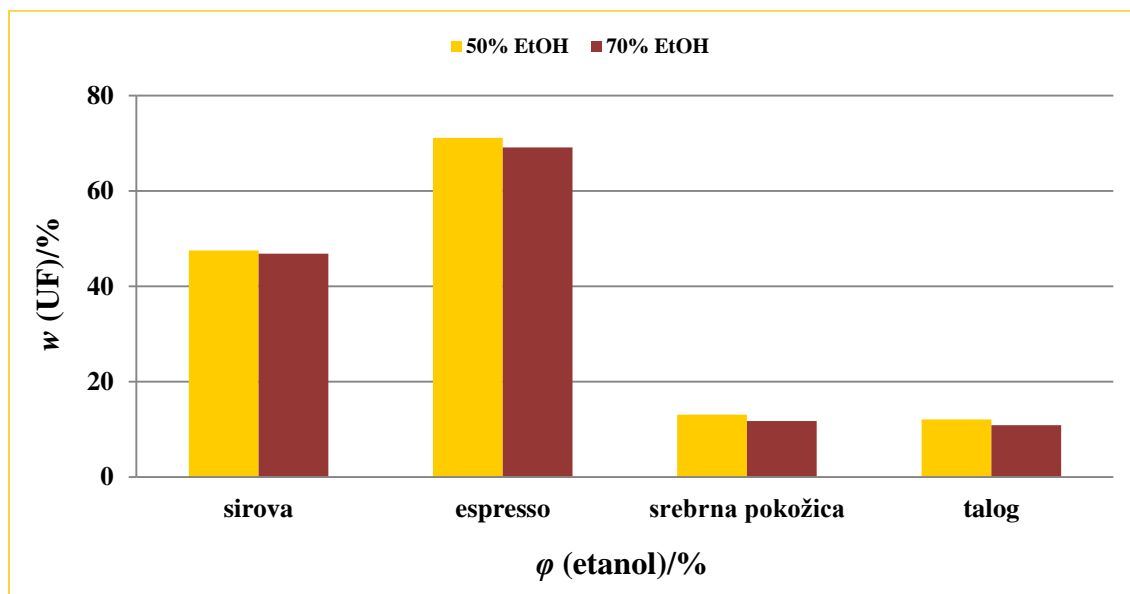
Prisutnost fenolnih spojeva uočena je i u nusproizvodima kave, a među njima kao i u kavi dominira klorogenska kiselina. Tako se u srebrnoj pokožici njen udio kreće od 1 do 6 % (Napolitano i sur., 2007; Costa i sur., 2014).

Niži udio ukupnih fenola nađen je kod nusproizvoda kave (Tablica 12), što navodi na zaključak da postupci obrade kave (prženje i kuhanje) dovode do degradacije fenola. Dobivene vrijednosti se nalaze u rasponu od 1,17 do 1,31 % za srebrnu pokožicu i 1,08 do 1,21 % za talog. U usporedbi s ovim istraživanjem, Iriondo-DeHond (2019) dobiva vrijednost od 1,56 % za srebrnu pokožicu, a Andrade i sur. (2012) vrlo širok raspon udjela (0,61 do 15,1 %), ovisno o



metodi ekstrakcije i upotrebljenom otapalu. Za talog kave Mussatto i suradnici (2011b) pronalaze vrijednosti fenola od 0,6 do 1,82 %, ovisno o otapalu, a Panusa i suradnici (2013) od 0,63 do 2,83 %. Vrijednosti fenola u istraživanju Pujola i sur. (2013) za talog kave, kreću se od 0,17 do 4,54 % ovisno o otapalu, a u radu Zuorro i Lavecchia (2011) od 0,796 do 1,475 %, ovisno o otapalu, temperaturi i vremenu ekstrakcije. Zuorro i Lavecchia (2012) za talog kave dobivaju i vrijednosti od 0,92 do 1,998 %, ovisno o temperaturi, otapalu i vremenu ekstrakcije.

Kako bi se doprinijelo što učinkovitijoj ekstrakciji fenola iz kave i nusproizvoda odabir prikladnog otapala ima vrlo značajnu ulogu (Mussatto i sur., 2011b, Bravo i sur., 2013). Tako su Bravo i suradnici (2013) utvrdili da se veći prinos fenola postiže upotrebom vode, te smjese vode i etanola u odnosu na čisti etanol. Naime, ovi autori bilježe vrijednosti fenola od 0,27 % uz 100 % etanol, te 1,4 % uz vodu i 1,75 % uz 60 % etanol. Tako se i u ovom radu može zamijetiti (Slika 7) kako je 50 % etanol učinkovitije otapalo u odnosu na 70 % etanol i kod uzoraka kave i nusproizvoda.



**Slika 7.** Ovisnost masenog udjela ukupnih fenola (UF) o volumnom udjelu etanola.

Iako je prinos ukupnih fenola u srebrnoj pokožici i talogu znatno niži u odnosu na kavu, činjenica da se radi o neiskorištenoj biomasi koja se s obzirom na svjetsku potrošnju kave nakuplja u velikim količinama, dovodi do razmišljanja o njihovoj ponovnoj upotrebi kao jeftinih

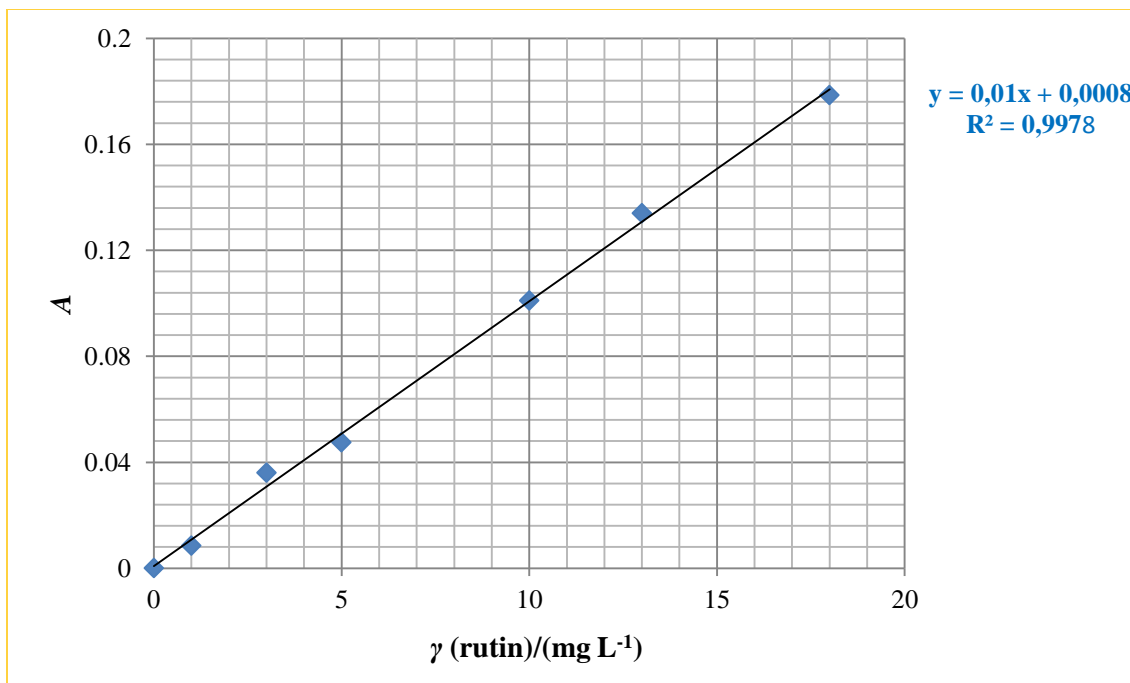
i prirodnih sirovinama za izolaciju biološki aktivnih spojeva. Naime, ovi nusproizvodi mogli bi se koristiti ne samo za ekstrakciju ciljanih fenolnih spojeva, već bi se i mogli i direktno dodavati u prehrambene proizvode (Ballesteros i sur., 2014), što je i u skladu s kriterijima cirkularne ekonomije i održivog razvoja.

#### 4.9. SADŽAJ FLAVONOIDA U UZORCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Osim fenola, u uzorcima kave i nusproizvoda, određen je i sadržaj flavonoida. Na temelju masenih koncentracija standardnih otopina rutina i izmjerenih vrijednosti apsorbancija prikazanih u Tablici 13 izrađen je baždarni dijagram (Slika 8), a iz dobivene jednadžbe pravca određen je maseni udio ukupnih flavonoida u uzorcima (Tablica 14).

**Tablica 13.** Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{rutin})/(\text{mg L}^{-1})$	$A \pm \text{SD}$
0	0	0,000 $\pm$ 0,000
1	1	0,009 $\pm$ 0,001
2	3	0,036 $\pm$ 0,001
3	5	0,048 $\pm$ 0,000
4	10	0,101 $\pm$ 0,000
5	13	0,134 $\pm$ 0,001
6	18	0,179 $\pm$ 0,001



**Slika 8.** Baždarni dijagram rutina.

Rezultati određivanja flavonoida potvrđuju da espresso kava u odnosu na ostale analizirane uzorke sadrži najviše flavonoida. Dobivene vrijednosti se nalaze u rasponu od 16,76 do 17,65 %, ovisno o upotrebljenom otapalu. Zatim slijedi sirova kava (14,31 - 14,68 %), talog (2,37 - 2,67 %), te srebrna pokožica (1,16 - 1,24 %), s najnižim udjelom flavonoida.

U usporedbi s rezultatima ovog rada, istraživanje Kreicbergs i suradnika (2011) je pokazalo da Arabica i Robusta kava sadrže znatno manje flavonoida, a dobivene vrijednostima variraju od 1,5 do 10,3 %. Krol i suradnici (2019) dobivaju još i niže vrijednosti flavonoida (0,071 - 0,141 %), a one ovise o stupnju prženja kave. Fidrianny i suradnici (2016) u sirovoj kavi pronalaze niže vrijednosti flavonoida (3,04 - 7,41 %) u odnosu na one pronađene u ovom radu, a one ovise o regiji iz koje Arabica kava potječe. Cheng i suradnici (2019) za sirovu kavu dobivaju 10,42 % flavonoida. Iriondo-DeHond i suradnici (2019) pronalaze 0,063 % flavonoida u Robusta srebrnoj pokožici, te 0,034 % u Arabica pokožici. Tan i suradnici (2017) za Robusta srebrnu pokožicu nalaze 0,003 % flavonoida te 0,0018 % za Arabica srebrnu pokožicu. Mussatto i suradnic (2011b) u talogu kave pronalaze vrijednosti flavonoida od 0,051 do 0,25 % ovisno o otapalu, dok Panusa i suradnici (2013) u rasponu od 0,211 do 0,803 %.

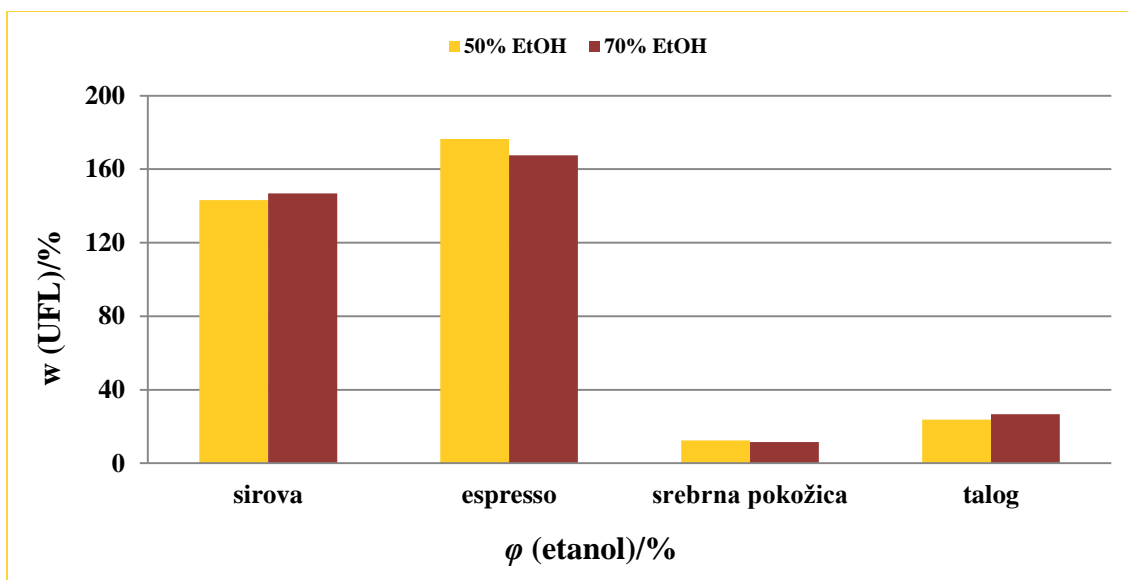
Nadalje, rezultati ovog rada su pokazali da termičkom obradom espresso kave, kuhanjem pri 100 °C, dolazi do smanjenja udjela flavonoida u talogu, i to 7 puta, što odgovara istom sniženju prinosa kao i kod određivanja fenola. Iako rezultati određivanja fenola pokazuju da talog kave sadrži manje fenola u odnosu na srebrnu pokožicu (poglavlje 4.7.) ovdje je utvrđeno da talog kave sadrži više flavonoida od srebrne pokožice.

**Tablica 14.** Maseni udjeli ukupnih flavonoida izmjerenih UV/Vis spektrofotometrijom u uzorcima kave i nusproizvoda.

	$\varphi$ (etanol)/%	$A \pm SD$	$w$ (ukupni flavonoidi)/% $\pm SD$
<b>Kava</b>			
<b>Sirova</b>	50	0,070 $\pm$ 0,002	14,31 $\pm$ 0,44
	70	0,071 $\pm$ 0,001	14,68 $\pm$ 0,07
<b>Espresso</b>	50	0,086 $\pm$ 0,001	17,65 $\pm$ 0,00
	70	0,082 $\pm$ 0,006	16,76 $\pm$ 0,37
<b>Nusproizvod</b>	50		
<b>Srebrna pokožica</b>	50	0,149 $\pm$ 0,014	1,24 $\pm$ 0,14
	70	0,141 $\pm$ 0,017	1,16 $\pm$ 0,14
<b>Talog</b>	50	0,072 $\pm$ 0,002	2,37 $\pm$ 0,09
	70	0,081 $\pm$ 0,007	2,67 $\pm$ 0,28

$N = 4$

Uzimajući u obzir utjecaj otapala na prinos flavonoida u radu Mussatto i sur. (2011b) je pokazano da odabir otapala ima znatan utjecaj na efikasnost ekstrakcije. Tako prema Mussatto i suradnicima (2011b) udio flavonoida varira od 0,051 do 0,25 % ovisno o udjelu metanola u vodenoj fazi. Najviši prinos flavonoida (0,25 %) dobivaju s 80 % metanolom, a najniži (0,051 %) s vodom. Iz navedenog možemo zaključiti da se flavonoidi bolje otapaju uz otapala s većim udjelom organske faze, za razliku od fenola kojima pogoduju niži volumni udjeli organskog otapala u vodenoj fazi, npr. etanola (vidi poglavlje 4.7.).



**Slika 9.** Ovisnost masenog udjela ukupnih flavonoida (UFL) o volumnom udjelu etanola.

Tako i rezultati ovog istraživanja pokazuju da 70 % etanol doprinosi neznatno boljoj ekstrakciji flavonoida iz nusproizvoda i sirove kave (Slika 9). Jedino espresso kava odskaae od navedenih uzoraka, kod koje je uočen viši prinos flavonoida uz 50 % etanol.

Uspoređujući rezultate ukupnih fenola (Tablica 12) i ukupnih flavonoida (Tablica 14) vidi se kako su dobiveni veći maseni udjeli flavonoida u odnosu na fenole, što nije uobičajena pojava pri njihovim određivanjima u nekim drugim materijalima (Ninčević Grassino i sur. 2019). Jedan od mogućih razloga dobivanja većih vrijednosti flavonoida je i prisutnost različitih drugih bioaktivnih spojeva u kavi i otpadu (Pandey i sur., 2000; Noigam i sur., 2012) koji tijekom određivanja flavonoida reagiraju (interferiraju) s aluminijskim kloridom, te doprinose ukupnom povećanju apsorbancije, a time i masenih udjela. Ove izmjerene vrijednosti upućuju na činjenicu da bi se trebao pronaći selektivniji reagensi za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida, čime bi se dobio potpuniji uvid u valjanost ove ili neke druge upotrijebljene metode.

#### 4.10. SADRŽAJ MINERALA U UZRCIMA KAVE I NUSPROIZVODA

Mineralni sastav u uzorcima kave i nusproizvoda određen je multielementnom analizom koristeći HR-ICP-MS uređaj. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablicama 15a i b.

**Tablica 15a.** Maseni udjeli makroelemenata u uzorcima kave i nusproizvoda.

Element	<i>w</i> (kemijski element)/(mg kg <sup>-1</sup> ) ± SD			
	Kava		Nusproizvod	
	Sirova	Espresso	Srebrna pokožica	Talog
Na	82,6 ± 7,8	80,9 ± 29,5	156 ± 33	170 ± 844
Mg	1919 ± 106	2309 ± 119	5298 ± 246	1263 ± 1033
K	15664 ± 547	21523 ± 2311	35993 ± 578	2387 ± 2233

*N* = 3

U Tablici 15a prikazani su maseni udjeli za tri esencijalna makroelementa - kalij, magnezij i natrij. Kalij i magnezij su najzastupljeniji elementi u svim analiziranim uzorcima, a dobivene vrijednosti nalaze se u području od 2387 - 35 993 mg kg<sup>-1</sup> za kalij, odnosno 12633 - 5298 mg kg<sup>-1</sup> za magnezij. Pri tome srebrna pokožica sadrži najveću količinu kalija (35 993 μg g<sup>-1</sup>) i magnezija (5298 mg kg<sup>-1</sup>), što ovaj neiskorišteni nusproizvod čini iznimno važnim izvorom ovih dvaju elemenata. To je potvrdilo i istraživanje Ballesteros i suradnika (2014) koji u srebrnoj pokožici nalaze 21 100 mg kg<sup>-1</sup> kalija, te 50,0 mg kg<sup>-1</sup> magnezija. Iako su udjeli kalija (21 523 mg kg<sup>-1</sup>) i magnezija (2309 mg kg<sup>-1</sup>) u espresso kavi dva puta manji u odnosu na srebrnu pokožicu i sama espresso kava predstavlja značajan izvor ovih dvaju makroelemenata. Tako Jarošová i suradnici (2014) pronalaze iznimno visoke vrijednosti magnezija, u rasponu, od 1780 do 2090 mg kg<sup>-1</sup>, u kavi porijeklom iz Indije, Kenije, Hondurasa, Kolumbije i Etiopije, dok su Welna i suradnici (2013) u Woseba, Lavazza QO i Cafe Sati kavi izmjerili 1716 mg kg<sup>-1</sup>, 1788 mg kg<sup>-1</sup>, odnosno 1605 mg kg<sup>-1</sup> magnezija. Također, i Voica i suradnici (2016) bilježe visoke vrijednost kalija (8280 mg kg<sup>-1</sup>) i magnezija (1420 mg kg<sup>-1</sup>), a one se odnose na aritmetičku sredinu uzoraka uključenih u analizu s obzirom na zemlju porijekla. U radovima Jarošová i suradnika (2014) i Welna i suradnika (2013) nema podataka o količini kalija i natrija, no u radu Voice i suradnika (2016) zabilježene su visoke vrijednosti natrija (223 mg kg<sup>-1</sup>). I u istraživanju

Cruz i suradnika (2012) je pokazano da espresso kava sadrži značajan izvor makronutrienata, s količinama od 9020 mg kg<sup>-1</sup> (kalij), 1493 mg kg<sup>-1</sup> (magnezij) i 75 mg kg<sup>-1</sup> (natrij).

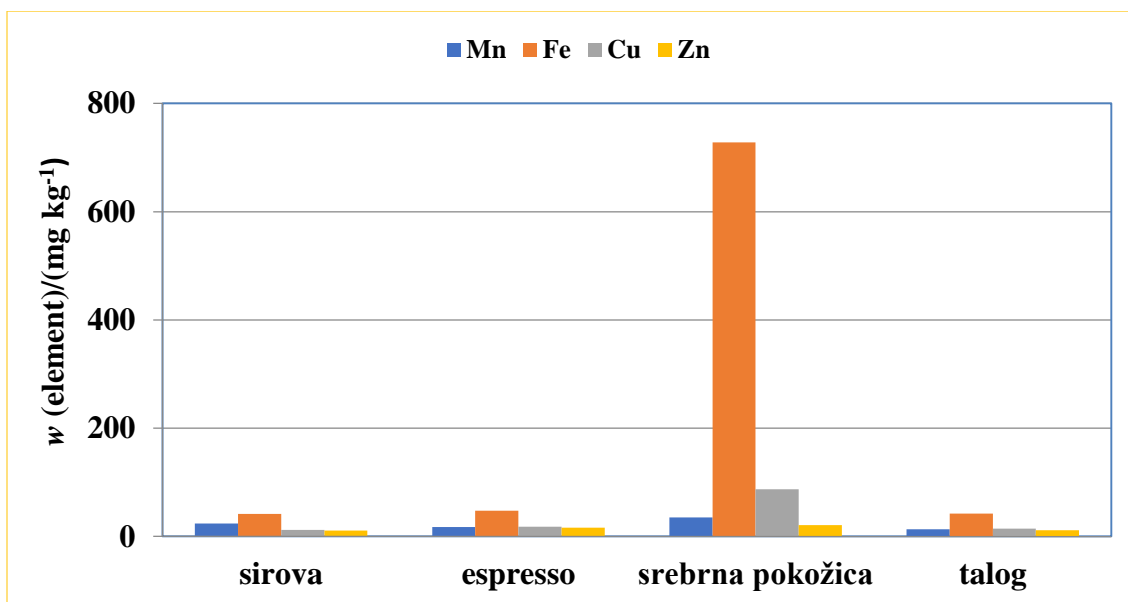
Iako nema dostupnih istraživanja vezanih uz određivanje kalija, magnezija i natrija u sirovoj kavi, u ovom radu je pokazano da ona sadrži nešto niže udjele kalija (156643 mg kg<sup>-1</sup>) i magnezija (1919 mg kg<sup>-1</sup>), te vrlo slične vrijednosti natrija (82,6 µg g<sup>-1</sup>), kao i espresso kava (80,9 mg kg<sup>-1</sup>).

Talog kave sadrži daleko najniže udjele kalija (23877 mg kg<sup>-1</sup>) i magnezija (1263 mg kg<sup>-1</sup>), dok je udio natrija (17069 mg kg<sup>-1</sup>) u talogu nešto veći u odnosu na ostale analizirane uzorke. Istraživanje Ballesteros i suradnika (2014) je pokazalo da talog kave sadrži znatno veće količine natrija (33,7 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na ostala dva makroelementa, kalij (11,7 mg kg<sup>-1</sup>) i magnezij (1900 mg kg<sup>-1</sup>).

Od esencijalnih elemenata u tragovima (u ljudskom tijelu prisutni u količinama od 1 - 100 mg) (Piasek i Mikolić, 2009), kava i nusproizvodi sadrže mangan, željezo, bakar i cink (Tablica 15b). Od navedenih elemenata željezo je prisutno u najvećim količinama, u rasponu od 41,8 do 728 mg kg<sup>-1</sup> ovisno o vrsti uzoraka (Slika 10). I kava (sirova i espresso) i talog sadrže znatno niže količine željeza (41,8 - 47,4 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na srebrnu pokožicu, s udjelom od 728 mg kg<sup>-1</sup>. U odnosu na ovo istraživanje, Ballesterols i suradnici (2014) u pokožici i talogu kave nalaze čak i veće vrijednosti željeza, od 843 mg kg<sup>-1</sup>, odnosno 52,0 mg kg<sup>-1</sup>. U kavi, Jarošova i suradnici (2014) pronalaze slične vrijednosti željeza kao i u ovom istraživanju, a one variraju od 23,9 do 47,8 mg kg<sup>-1</sup>, ovisno o porijeklu kave. Welna i suradnici (2013) bilježe vrijednosti od 11,9 do 36,1 mg kg<sup>-1</sup>, ovisno o vrsti kave (Woseba, Lavazza QO i Cafe Sati), a Voica i suradnici (2016) 64,9 mg kg<sup>-1</sup>, ovisno o porijeklu kave.

Među esencijalnim elementima u tragovima, bakar čini drugi najzastupljeniji element u srebrnoj pokožici s količinom od 87,1 mg kg<sup>-1</sup>. Znatno niže vrijednosti bakra nađene su u sirovoj (12,0 mg kg<sup>-1</sup>) i espresso (18,3 mg kg<sup>-1</sup>) kavi, te talogu (14,4 mg kg<sup>-1</sup>). Za usporedbu Ballesterols i suradnici (2014) u nusproizvodima kave nalaze znatno veće vrijednosti bakra, točnije 18,7 mg kg<sup>-1</sup> (talog) i 63,3 mg kg<sup>-1</sup> (srebrna pokožica). U kavi, ovisno o njenom porijeklu, Jarošova i suradnici (2014) pronalaze vrijednosti u rasponu od 16,6 do 19,3 mg kg<sup>-1</sup>, a Voica i suradnici (2016) 18,4 mg kg<sup>-1</sup>, ovisno o porijeklu kave. Welna i suradnici (2013) bilježe vrijednosti od 13,5 do 18,7 µg kg<sup>-1</sup>, ovisno o vrsti kave (Woseba, Lavazza QO i Cafe Sati).

U odnosu na željezo i bakar, mangan i cink se nalaze u nešto nižim količinama, u rasponu od 13,1 do 35,2 mg kg<sup>-1</sup> (mangan) i 10,8 do 21,3 mg kg<sup>-1</sup> (cink), ovisno o vrsti kavi i njenim nusproizvodima. Pri tome valja naglasiti da srebrna pokožica među analiziranim uzorcima sadrži najveće količine i ovih esencijalnih elemenata, pa ju zaista možemo smatratiti izvrsnim mineralnim izvorom. I druga istraživanja su pokazala da kava i njeni nusproizvodi sadrže znatne količine mangana i cinka. Tako Ballesterols i suradnici (2014) u srebrnoj pokožici pronalaze 50,0 mg kg<sup>-1</sup> mangana i 22,3 cinka mg kg<sup>-1</sup>, a u talogu kave 28,8 mg kg<sup>-1</sup> mangana i 8,40 mg kg<sup>-1</sup> cinka. U odnosu na nusproizvode, Jarošova i suradnici (2014) u kavi, a ovisno o njenom porijeklu nalaze znatno veće vrijednosti mangana (27,3 - 123 mg kg<sup>-1</sup>), te neznatno manje cinka (1,71 - 7,12 mg kg<sup>-1</sup>). Voica i suradnici (2016) dobivaju 24,8 mg kg<sup>-1</sup> za mangan i 8,30 mg kg<sup>-1</sup> za cink, pri čemu izmjerene vrijednosti autori prikazuju kao srednju vrijednost rezultata s obzirom na porijeklo kave. Welna i suradnici (2013), ovisno o vrsti kave (Woseba, Lavazza QO i Cafe Sati) bilježe više vrijednosti mangana (16,2 - 25,8 mg kg<sup>-1</sup>), te nešto niže cinka (7,39 - 8,59 mg kg<sup>-1</sup>). Cruz i suradnici (2012) pronalaze mangan u količini od 2,70 mg kg<sup>-1</sup>, a cink nisu ni određivali.



**Slika 10.** Maseni udio esencijalnih elemenata u tragovima u uzorcima kave i nusproizvoda.



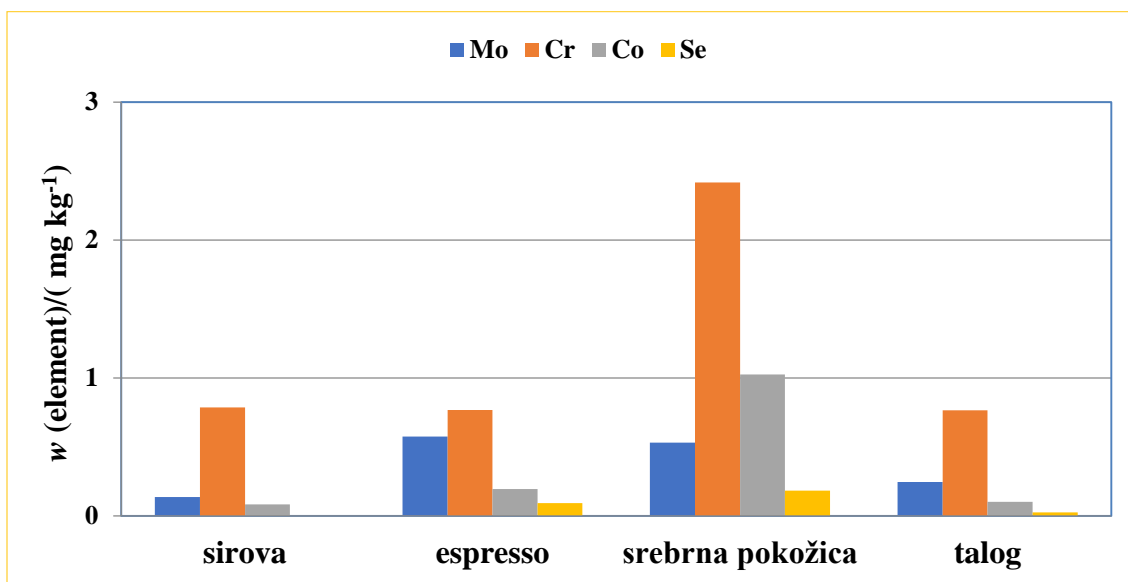
**Tablica 15b.** Maseni udjeli elemenata u tragovima i ultratragovima u uzorcima kave i nusproizvoda.

Element	$w$ (kemijski element)/(mg kg <sup>-1</sup> ) ± SD			
	Kava		Nusproizvod	
	Sirova	Espresso	Srebrna pokožica	Talog
<b>Li</b>	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,024 ± 0,01
<b>Rb</b>	13,2 ± 1,5	30,36 ± 1,30	34,75 ± 3,86	3,46 ± 0,17
<b>Mo</b>	0,14 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,53±0,07	0,24 ± 0,02
<b>Cd</b>	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,06±0,00	0,02 ± 0,01
<b>Sn</b>	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,18 ± 0,09
<b>Cs</b>	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,200 ± 0,02	0,003±0,001
<b>Pb</b>	1,44 ± 1,33	0,2 ± 0,02	0,81 ± 0,18	0,74 ± 0,37
<b>U</b>	0,002 ± 0,00	0,003 ± 0,000	0,02 ± 0,00	0,01± 0,00
<b>Al</b>	72,7 ± 6,7	40,4 ± 4,7	764 ± 33	49,7 ± 3,2
<b>Ti</b>	5,11 ± 0,68	2,00 ± 0,10	86,5 ± 0,39	2,33 ± 0,00
<b>V</b>	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	1,58 ± 0,10	0,04 ± 0,01
<b>Cr</b>	0,79 ± 0,02	0,77 ± 0,04	2,42 ± 0,15	0,77 ± 0,06
<b>Mn</b>	24,2 ± 2,1	17,7 ± 1,1	35,24 ± 2,58	13,1 ± 1,0
<b>Fe</b>	41,8 ± 6,1	47,4 ± 3,4	728 ± 35	42,3 ± 2,5
<b>Co</b>	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,00	1,03 ± 0,06	0,10 ± 0,01
<b>Ni</b>	0,70 ± 0,30	1,53 ± 0,22	3,14 ± 0,09	0,99 ± 0,21
<b>Cu</b>	12,0 ± 0,5	18,3 ± 1,4	87,1 ± 2,5	14,4 ± 1,7
<b>Zn</b>	10,8 ± 3,6	16,1 ± 5,1	21,3 ± 4,8	11,6 ± 5,9
<b>Sr</b>	4,61 ± 0,53	8,73 ± 0,66	70,9 ± 4,2	7,23 ± 0,69
<b>Sb</b>	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<b>Ba</b>	3,76 ± 0,42	7,07 ± 1,29	47,17 ± 2,62	5,11 ± 0,89
<b>As</b>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>Se</b>	<LOD	0,09 ± 0,05	0,18 ± 0,00	0,02 ± 0,01

Napomena: Be, Bi, Tl<LOD

Od esencijalnih elemenata u ultratragovima (u ljudskom tijelu prisutni u količinama < 1 mg), (Piasek i Mikolić, 2009) kava i nusproizvodi sadrže molbiden, krom, kobalt i selen (Tablica 15b). Među njima najzastupljeniji je krom (Slika 11), a najveća vrijednost nađena je u srebrnoj pokožici (2,42 mg kg<sup>-1</sup>). U odnosu na druge uzorke srebrna pokožica sadržava i veće količine

kobalta i selen, te nešto niže molibdena. Tako je molibden u odnosu na kobalt i selen zastupljeniji u sirovoj i espresso kavi, te talogu. Iako srebrna pokožica i espresso kava sadrže niske udjele selen (0,18 i 0,09 mg kg<sup>-1</sup>), u sirovoj kavi selen je ispod granica detekcije (*engl.* limit of detection, LOD). Navedene esencijalne elemente u ultratragovima određivali su Ballesterols i suradnici (2014) u srebrnoj pokožici i talogu, a među njima prevladava kobalt. Ostali elementi poput kroma, molibdena i selen nalaze u rasponu od 1,60 - 1,23 mg kg<sup>-1</sup> za talog, te 1,60 - 1,64 mg kg<sup>-1</sup> za srebrnu pokožicu.



**Slika 11.** Maseni udio esencijalnih elemenata u ultratragovima u uzorcima kave i nusproizvoda.

Među toksičnim elementima kava i nusproizvodi sadrže aluminij, arsen, olovo, kadmij i nikal. Posebno je visok udio aluminijsa, i to u srebrnoj pokožici (763 mg kg<sup>-1</sup>), dok ostali uzorci sadrže 10 puta niže količine. Mogući razlozi dobivanja ovako visokih vrijednosti aluminijsa u srebrnoj pokožici, a i u samoj sirovoj kavi, su najvjerojatnije povezani sa sastavom tla. Tako Farah (2012) smatra kako se razlike u sastavu tla odražavaju i na mineralni sastav kave.

Uzimajući u obzir prihvatljive dnevne doze za kadmij (2,5 µg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase) i nikal (2,8 µg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase) te tjedne doze za aluminij (1 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), olovo (25 µg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase) i arsen (15 µg kg<sup>-1</sup>) (EFSA, 2020), može se zaključiti da se konzumacijom kave ne unose značajne količine ni jednog od navedenih toksičnih elemenata.

U zaključku, ovim radom je pokazano da se dobivene vrijednosti makroelemenata, te mikroelemenata u tragovima i ultratragovima razlikuju od rezultata drugih autora, ovisno o vrsti kave kao i njenom porijeklu. Vidi se da se udio većine elemenata (Mg, K, Rb, Mo, Cd, Sn, V, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Sb i Ba) prženjem povećava, dok se udio pojedinih smanjuje ili ostaje isti (Na, Al, Li, Cs, Pb, Cr i Li). Uspoređujući rezultate dobivene za espresso kavu i njen talog možemo zaključiti da se većina elemenata vjerojatno ekstrahira u sam espresso napitak, budući da je udio pojedinih elemenata, poput K i Mg u talogu značajno smanjen. Srebrna pokožica dominira sa udjelom minerala, posebice makroelementima bitnim za vitalne procese u organizmu zbog čega bi ju trebalo koristiti za njihovu izolaciju ili direktnu implementaciju u pojedine prehrambene proizvode.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu doneseni su sljedeći zaključci:

1. Talog kave ističe se s najvišim udjelom vlage, potom slijedi sirova kava, srebrna pokožica te espresso kava.
2. Udio pepela najviši je u srebrnoj pokožici, dok je dva puta manji sadržaj pepela nađen u espresso i sirovoj kavi. Daleko najniži udio pepela ima talog kave.
3. Udjeli celuloze i lignina su niži u odnosu na rezultate dobivene u drugim istraživanjima, pa se može zaključiti da kava i njeni nusproizvodi ne čine značajne ligno-celulozne materijale. No ipak valja naglasiti da među uzorcima prednjači srebrna pokožica s većim udjelom celuloze, te espresso kava s većim udjelom lignina.
4. Najviši udio proteina ima espresso kava, dok sirova kava ima oko dva puta manji. Također, i srebrna pokožica ima dva puta više proteina u odnosu na taloga kave.
5. Sirova kava i talog kave ističu se višim udjelom masti u odnosu na espresso kavu i srebrnu pokožicu, što znači da bi se talog kave mogao koristiti kao biosupstrat pri proizvodnji masnih kiselina, a srebrna pokožica kao „bezmasni“ dodatak hrani.
6. Najviši postotak šećera određen je u sirovoj kavi, dok je oko 2 do 3 puta manje ovog sastojka nađeno u espresso kavi i srebrnoj pokožici,
7. Prinos fenola i flavonoida ovisi o volumnom udjelu etanola u otopini etanol/voda, pa tako 50 % etanol doprinosi učinkovitijoj ekstrakciji fenola i kod uzoraka kave i nusproizvoda, dok 70 % etanol doprinosi boljoj ekstrakciji flavonoida kod uzoraka srebrne pokožice i taloga kave. Najviši udio fenola i flavonoida zapažen je u espresso kavi, a zatim i u sirovoj kavi. Srebrna pokožica sadrži veći udio fenola od taloga kave, no u talogu kave zapažen je viši udio flavonoida.
8. Srebrna pokožica izdvaja se bogatim mineralnim sastavom kojeg čine prvenstveno esencijalni makroelementi (visok udio kalija te nešto manji magnezija i natrija) te mikroelementi s najvećim udjelom željeza, a potom i bakra. U odnosu na srebrnu pokožicu espresso kava sadrži dva puta manji udio makroelemenata te znatno niže udjele mikroelemenata. Sirova kava sadrži slične ili nešto niže udjele makro i mikroelemenata od espresso kave, dok talog kave sadrži daleko najniže vrijednosti navedenih elemenata.

Mineralni sastav odražava i udio pepela u uzoraku koji opada u nizu srebrna pokožica > espresso kava > sirova kava > talog .

## 6. LITERATURA

- Alves, C., Rodrigues, F., Nunes, M. A., Vinha, A. F., Oliveira, M. B. P. (2017) Chapter 1 - State of the art in coffee processing by-products. U: Handbook of Coffee Processing By-Products, 1. izd., (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1-26.
- Andrade, K. S., Gonçalves, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M, Martínez, J., Ferreira, S. R. (2012) Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, **88**, 544-552.
- Arya, M., Rao, L. J. M. (2007) An Impression of Coffee Carbohydrates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 51-67.
- Azmir, J., Sarker, Md. Z., Rahman, M., Khan, M. S., Awang, M., Ferdosh, S., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. of Food Eng.* **117**, 426-436.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I., (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food. Bioprocess. Technol.* **7**, 3493-3503.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) Coffee, tea, cocoa. U: Food Chemistry, (Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. ured.), Springer, Leipzig, str. 938-951.
- Belkhiri-beder, W., Zeghichi, S., Kadri, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Cardoso, S., Oukhmanou-Bensidhoum, S., Madani, K. (2018) Hydroxycinnamic acids profiling, in vitro evaluation of total phenolic compounds, caffeine and antioxidant properties of coffee imported, roasted and consumed in Algeria. *Med. J. Nutrition Metab.* **11**, 51-63.
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V (2004) Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1338-1343.
- Bradley R. L. (2009) Moisture and Total Solids Analysis. U: Food Analysis, 4. izd., (Nielsen S. S. ured.), Springer, New York, str. 85-105.

- Bravo, J., Monente, C., Juárez, I., Peña, M. P., Cid, C. (2013) Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Res. Int.* **50**, 610-616.
- Bridson, D. M., Verdcourt, B. (1988) Flora of tropical East Africa. Rubiaceae (Part 2). Balkema, Rotterdam, str. 415–747.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Casta, H.A., Oomah, B. D., (2015) Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects, *Trends Food Sci. Techn.* **45**, 24-36.
- Castillo, Del M. D., Ames, J. M., Gordon, M. H. (2002) Effects of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3698-703.
- Chang S. K. C. (2009) Protein Analysis. U: Food Analysis, 4. izd., (Nielsen S. S. ured.) Springer, New York, str. 105-117.
- Cheng K, Dong W, Long Y, et al. Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro digestion of green coffee beans. (2019) *Food. Sci. Nutr.* **7**, 1084-1095.
- Clifford, M. N., Williams, T., Bridson, D. (1989) Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psyllanthus*. *Phytochemistry*, **28**, 829-38.
- Costa, A. S., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V, Nunes, M. A., Cunha, L. M., Oliveira, M. B. P. P (2014) Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Ind. Crops Prod.* **53**, 350-357.
- Cruz, R., Cardoso, M. M, Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., Casal S.(2012) Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7777-7784.
- Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. (2000) In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1449-54.
- EFSA (2020) Metals as contaminants in food, EFSA - European Food Safety Authority, <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food>> Pristupljeno 8. veljače 2020.
- Esquivel, P., Jiménez, V. (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* **46**, 488-495.
- Farah, A. (2012) Coffee Constituents. U: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 1. izd. (Chu, Y., ured.), John Wiley & Sons, New Delhi, str. 22-45.

- Fidrianny, I., Ruslan, A. K. (2016) Antioxidant activities of Arabica green coffee from three regions using ABTS and DPPH assays. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **9**, 189-193.
- Filipović Marijić, V., Raspor, B. (2012) Site-specific gastrointestinal metal variability in relation to the gut content and fish age of indigenous european chub from the Sava river. *Water Air Soil Poll.*, **223**, 4769-4783.
- Foyle, T., Jennins, L., Mulcahy, P. (2007) Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw, *Bioresource Technol.* **98**, 3026-3036.
- Franca, A. S., Mendonca, J. C. F., Oliveira, S. D. (2005) Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT-Food Sci. Technol.* **38**, 709-715.
- Fukami, H. (2010). Functional foods and biotechnology in Japan. U: Biotechnology in functional foods and nutraceuticals, (Bagchi, D., Lau, F. C., Ghosh, D. K. ured.) Taylor & Francis Group, London, 29-49.
- Iorio, A. G., Pierro, L. P., Candreva, V. S., Farah, M. S., dos Santos, K. R. N., Maia, L. C. (2011) Inhibitory properties of Coffea canephora extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Arch. Oral Biol.* **56**, 556-564.
- Iriundo-DeHond, A., Aparicio García, N., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Velázquez Escobar, F., Blanch, G. Patricia, San Andres, M. Ignacio, Sanchez-Fortun, S., del Castillo, M. Dolores. (2019) Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innov. Food Sci. Emer. technol.* **51**, 194-204.
- Jarošová, M., Milde D., Kuba, M. (2014) Elemental analysis of coffee: a comparison of ICP-MS and AAS methods. *Czech J. Food Sci.* **32**, 354-359.
- Kolling-Speer, L., Speer, K. (2005) The Raw Seed composition. U: Espresso Coffee, the Science of Quality, (Illy, A., Viani, R. ured.) Elsevier Academic Press, Italija, str. 148-178.
- Kreicbergs, V., Dimins, F., Mikelsone, V., Cinkmanis, I. (2011) Biologically active compounds in roasted coffee. Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology, FOODBALT: Innovations for food science and production, Jelgava, str. 110-115.
- Król, K., Gantner, M., Tatarak, A., Hallmann, E., (2019) The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur. Food Res. Technol.* **246**, 33-39.



- Marshall M. R. (2009) Ash Analysis. U: Food Analysis, 4. izd., (Nielsen S. S. ured.), Springer, New York, str.105-117.
- Martinez-Saez, N., Ullate, M., Martin-Cabrejas, M. A., Martorell, P., Genovés, S., Ramon, D., del Castillo, M. D. (2014) A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. *Food Chem.* **150**, 227-234.
- Martinez-Saeza, N., del Castillo, M. D. (2018) Development of Sustainable Novel Foods and Beverages Based on Coffee By-Products for Chronic Diseases. *Food Chem.* **216**, 114-122.
- Mestdagh, F., Glabasnia, A., Giuliano, P. (2017) Chapter 15 - The Brew—Extracting for Excellence. U: The Craft and Science of Coffee (Folmer, B., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 355-380.
- Min, B. D., Ellefson W. C. (2009) Fat Analysis. U: Food Analysis, 4. izd., (Nielsen S. S. ured.) Springer, New York, str. 117-133.
- Murthy, P. S., Naidu, M. M. (2012) Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resour. Conserv. Recy.* **66**, 45-58.
- Mussatto S. I., Carneiro L. M., Silva J. P. A., Roberto I. C., Teixeira J. A. (2011c) A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydr. Polym.* **83**, 368-374.
- Mussatto, S. I. , Ballesteros, L.F., Martins, S., José A. (2011b) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.* **83**, 173-179.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., Teixeira, J. A. (2011a) Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 661-672.
- Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A., Ritieni, A. (2007) Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10499-10504.
- Narita, Y., Inouye, K. (2015) Chlorogenic Acids from Coffee. U: Coffee in Health and Disease Prevention, (Preedy, V. R., ured.) Elsevier, Japan, str. 189-199.
- Ninčević Grassino, A., Djaković, S., Bosiljkov, T., Halambek, J., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Petrović, M., Rimac Brnčić, S. Valorisation of Tomato Peel Waste as a Sustainable Source for Pectin, Polyphenols and Fatty Acids Recovery using Sequential Extraction, *Waste Biomass Valori.* (2019). doi:10.1007/s12649-019-00814-7

- Nogaim, Q. A., Al-Duais, M., Al-Warafi, A., Al-Eriane, H., Al-Sayadi, M. (2013) The chemical composition of Yemeni green coffee. *Food Chem. Nutr.* **01**, 42-48.
- Panday A., Socol C. R., Nigam P., Brand D., Radjiskumar Mohan, Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* **6**, 153-162.
- Panusa, A., Zorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., Petrucci, R. (2013) Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 4162-4168.
- Penner, M. H. (2009) Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy. U: Food Analysis, 4. izd., (Nielsen S. S. ured.), Springer, New York, str. 387-407.
- Piasek, M., Mikolić, A. (2009) Minerals and physiology - From essentiality to toxicity: A review of important minerals and their major impact on the human body's physiology. U: Role of Minerals in Food Technology and Nutrition (Gašperlin, L., Žlender, B., ured.), Univeza v Ljubljani, Slovenija, str. 9-19.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., Sedaghat, N. (2013) Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* **50**, 599-606.
- Pravilnik o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina (2004) *Narodne novine* **172**, Zagreb.
- Pujola D., Liua C., Gominhoc, J., Olivellab, M. A., Fiola, N., Villaescusa, I., Pereira, H. (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Ind. Crops Prod.* **50**, 423-429.
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., Mastrocola, D. (2009) Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* **90**, 74-80.
- Sederoff, R. R., McKay, J.J., Ralph, J., Hatfield, R. D. (1999) Unexpected variation in lignin, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 145-152.
- Semen, S., Mercan, S., Yayla, M., Açıkkol, M. (2017) Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. *Food Chem.* **215**, 92-100.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. (1999) Osnove analitičke kemije, 6. izd., Školska knjiga, Zagreb.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2011) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL - National

Renewable Energy Laboratory <<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>>. Pristupljeno 19. prosinca 2019.

- Thomas R. (2008) Practical guide to icp-ms, a tutorial for beginner, 2.izd. Taylor & Francis Group, London, str. 1-7.
- Voica, C., Feher, I., Iordache, A. M., Cristea, G., Dehelean A., Magdas, D. A., Mirel, V. (2016) Multielemental Analysis of Coffee by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* **49**, 2627-2643.
- Welna, M., Szymczycha-Madeja, A., Zyrnicki, W. (2013) Applicability of ICP-OES, UV-VIS, and FT-IR. Methods for the Analysis of Coffee Products, *Anal. Lett.* **46**, 2927-2940.
- Zuorro, A., Lavecchia, R. (2011). Polyphenols and energy recovery from spent coffee grounds. *Chem. Eng. Trans.* **25**, 285-290.
- Zuorro, A., Lavecchia, R. (2012) Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *J. Clean. Prod.* **34**, 49-56.
- Živković, R. (1998) Kava - droga ili lijek. 2. izd., Medicinska naklada, Zagreb, str. 31-97.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Ime i prezime studenta