

Optimiranje ekstrakcije polifenola iz komine grožđa potpomognute ultrazvukom u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Mlinac, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:096939>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Anamarija Mlinac

**OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE
POLIFENOLA IZ KOMINE
GROŽĐA POTPOMOGNUTE
ULTRAZVUKOM U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo i u Laboratoriju za tehničku termodinamiku na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, te uz pomoć dr.sc. Manuele Panić.



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“, KK.01.1.1.07.007. Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Voditelj projekta: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Manueli Panić na iznimnom trudu tijekom izrade rada te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Filipu Dujmiću na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem obitelji, suprugu Ivanu i prijateljima na nesebičnoj podršci i razumijevanju tijekom svih ovih godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ KOMINE GROŽĐA POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Anamarija Mlinac, univ. bacc. ing. biotechn.
0125158721

Sažetak: Posljednjih desetljeća sve se veća pažnja usmjerava prema primjeni eutektskih otapala i inovativnih metoda u ekstrakciji polifenola iz komine grožđa. Eutektska otapala (DES) su nezapaljiva, viskozna i nehlapljiva otapala koja se istražuju kao zamjena konvencionalnim otapalima. Ultrazvučna ekstrakcija je metoda ekstrakcije kojom se smanjuje vrijeme ekstrakcije, potrošnja energije i povećava se prinos u odnosu na konvencionalne metode. U ovom radu provedena je ultrazvučna ekstrakcija komine grožđa pomoću NADES-a odabranog softverom COSMOtherm. Primijenjen je NADES betain:glukoza. Ukupni sadržaj polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa određen je pomoću Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. Ispitan je utjecaj veličine čestica, sonde i način vođenja procesa na rezultate ekstrakcije. Provedena je i optimizacija procesnih parametara ekstrakcije pomoću Box-Behnkenovog plana pokusa.

Ključne riječi: *eutektska otapala, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, polifenolni spojevi, COSMOtherm, Box-Behnken model*

Rad sadrži: 41 stranica, 11 slika, 5 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

Pomoć pri izradi: dr.sc. Manuela Panić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Filip Dujmić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (član)
4. prof. dr. sc. Mladen Brnčić (zamjenski član)

Datum obrane: 28. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM GRAPE POMACE IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Anamarija Mlinac, univ. bacc. ing. biotechn.
0125158721

Abstract: In recent decades more attention has been directed towards the use of eutectic solvents and innovative methods in the extraction of polyphenols from grape pomace. Deep eutectic solvents (DES) are non-flammable, viscous and non-volatile solvents that are being investigated as alternatives for conventional solvents. Ultrasonic extraction is an extraction method that reduces extraction time, energy consumption and increases yield compared to conventional methods. In this work ultrasonic extraction of grape pomace was carried out using NADES selected by COSMOtherm software. NADES betain:glucose was applied. The total content of polyphenolic compounds in grape pomace was determined by Folin-Ciocalteu (FC) method. The influence of particle size, probes and the method of conducting the process on the extraction results was examined. The optimization of the extraction process parameters was also carried out using the Box-Behnken model.

Keywords: deep eutectic solvents, ultrasound-assisted extraction, polyphenol compounds, COSMOtherm, Box-Behnken model

Thesis contains: 41 pages, 11 figures, 5 tables, 46 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ivana, Radojčić Redovniković, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Manuela, Panić, PhD*

Reviewers:

1. Filip, Dujmić, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana, Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (mentor)
3. Kristina, Radošević, PhD, Associate professor (member)
4. Mladen, Brnčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ZELENA EKSTRAKCIJA	2
2.2.1. Princip 1: Odabir novih izvora biljnih materijala i primjena obnovljivih biljnih izvora.....	4
2.2.2. Princip 2: Primjena alternativnih otapala, uglavnom vode ili otapala iz prirodnih izvora.....	5
2.2.2.1. Ekstrakcija bez primjene otapala	5
2.2.2.2. Voda	6
2.2.2.3. Superkritični CO ₂	6
2.2.2.4. Glicerol.....	6
2.2.2.5. Terpeni	7
2.2.2.6. Ionske kapljevine	7
2.2.2.7. Eutektička otapala	7
2.2.3. Princip 3: Smanjenje potrošnje energije ponovnom primjenom energije i primjenom inovativnih tehnologija.....	10
2.2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	10
2.2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija.....	11
2.2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem	12
2.2.3.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija	12
2.2.3.5. Ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom.....	12
2.2.4. Princip 4: Proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada prema konceptu biorafinerije	13
2.2.4.1. Komina grožđa, otpad iz industrije vina	13
2.2.5. Princip 5: Smanjenje broja operacija i razvoj sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa.....	14
2.2.6. Princip 6: Industrijska proizvodnja zelenog, stabilnog i biorazgradivog biljnog ekstrakta	14
2.3. PRIMJENA ULTRAZVUKA I EUTEKTIČKIH OTAPALA U INDUSTRIJI	14
2.3.1. Primjena eutektičkih otapala u industriji	14
2.3.2. Primjena ultrazvuka u industriji	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Komina grožđa	18

3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Otopine	18
3.1.4. Uređaji i oprema	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Određivanje topljivosti polifenola u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pomoću COSMOtherm programa	19
3.2.2. Priprava prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala	21
3.2.3. Priprema komine grožđa	21
3.2.4. Odabir prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala za ekstrakciju	21
3.2.5. Ispitivanje utjecaja veličine čestica	21
3.2.6. Odabir metode ekstrakcije	22
3.2.6.1. Ispitivanje utjecaja sonde i načina vođenja procesa na rezultate ekstrakcije	22
3.2.7. Optimizacija ekstrakcije komine grožđa pomoću prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala djelovanjem ultrazvuka	23
3.2.8. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom	24
3.2.9. Statistička obrada	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. ODABIR TEHNOLOGIJE EKSTRAKCIJE, OPTIMIZACIJA PARAMETARA EKSTRAKCIJE	26
4.1.1. Ispitivanje utjecaja veličine čestica	26
4.1.2. Ispitivanje utjecaja sonde i načina vođenja procesa na učinak ekstrakcije	27
4.1.3. Utjecaj otapala	29
4.2. OPTIMIZACIJA LABORATORIJSKIH PARAMETARA PROCESA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE ULTRAZVUKOM	31
4.3. 3 D DIJAGRAMI	34
5. ZAKLJUČAK	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Posljednjih desetljeća javlja se sve veći interes za ekološka, sigurnosna i ekonomska pitanja. Inovativne tehnike s trajnim i zelenim vrijednostima primijenjene su u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim industrijama. Zbog toga je definirano 12 principa zelene kemije i 12 principa zelenog inženjerstva. Slijedeći ove principe definiran je pojam zelene ekstrakcije te je definirano i 6 principa zelene ekstrakcije. Principi su opisani kao primjeri koje treba slijediti, a ne pravila te ih uspješno primjenjuju akademske zajednice i industrije. Zelena ekstrakcija temelji se na dizajnu procesa ekstrakcije koji će smanjiti potrošnju energije, osigurati visokokvalitetan proizvod i omogućiti primjenu alternativnih otapala i obnovljivih izvora energije (Chemat i sur., 2019). Konvencionalne metode, primjenjuju organska otapala, zahtijevaju velike količine energije i dugo vrijeme ekstrakcije te predstavljaju velik rizik za okoliš (Anticoni i sur., 2020).

Eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su smjese akceptora vodika i donora vodika povezanih vodikovim vezama. Karakterizira ih nezapaljivost, nehlapljivost, često visoka viskoznost, netoksičnost i dobra biorazgradljivost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). DES, za čiju se izradu koriste prirodni sastojci naziva se prirodno eutektičko otapalo (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES). Eutektička otapala mogu se primjenjivati u kozmetičkim, farmaceutskim i prehrambenim industrijama (Raj i sur., 2022).

Jedan od principa zelene ekstrakcije je smanjenje potrošnje energije inovativnim metodama (Chemat i sur., 2019). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija je metoda kojom se vrijeme ekstrakcije smanjuje na nekoliko minuta. Karakterizira ju pouzdanost, smanjenje potrošnje otapala te smanjenje potrošnje energije (Raj i sur., 2022).

Cilj zelene ekstrakcije je i proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada (Chemat i sur., 2019). Komina grožđa predstavlja otpad iz industrije vina, bogat biološki aktivnim fenolnim spojevima koji sudjeluju u prevenciji kroničnih bolesti (Charalampia i sur., 2016).

Cilj ovog rada je bio primijeniti principe zelene ekstrakcije na proces ekstrakcije polifenola iz komine grožđa i optimirati uvjete ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Uz optimizaciju uvjeta procesa potrebno je bilo odabrati i optimalno otapalo. Ekstrakcija polifenola se provodila pomoću ultrazvuka s NADES-om betain:glukoza (BGlc).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je metoda koncentriranja i odjeljivanja tvari iz homogenih smjesa. Provodi se na temelju različite topljivosti u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Produkt ekstrakcije je otopina koju je potrebno kristalizirati ili otpariti kako bi se dobila čista tvar. Standardne metode ekstrakcije su: destilacija vodenom parom, destilacija vodenom parom i vodom, direktna destilacija eteričnih ulja, hladno prešanje, ekstrakcija otapalima, ekstrakcija uljima i maceracija (Blekić i sur., 2011). Standardne metode ekstrakcije, općenito, nisu ekološki prihvatljive zbog velike količine utrošene energije i otapala. Uz velike troškove, nedostatak je i upitna sigurnost za radnike i potrošače. Prinosi dobiveni standardnim metodama ekstrakcije manji su od prinosa dobivenih inovativnim metodama ekstrakcije. Inovativne metode su brže i učinkovitije od standardnih. Unatoč tome, standardne se metode koriste i danas zbog jednostavnije opreme, poput destilacije eteričnih ulja (Carreira-Casais i sur., 2022). Metode ekstrakcije primjenjuju se u parfemskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Raj i sur., 2022).

Temelj zelene ekstrakcije je dizajniranje metoda ekstrakcije koje će omogućiti primjenu alternativnih otapala i prirodnih obnovljivih izvora, smanjiti potrošnju energije i osigurati siguran i kvalitetan proizvod. Kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, energije i otapala, za projektiranje i vođenje zelene ekstrakcije u laboratorijskim i industrijskim uvjetima, utvrđena su tri glavna rješenja: poboljšanje i optimizacija postojećih procesa, inovacije u procesima, postupcima i u otkrivanju novih alternativnih otapala, te korištenje nenamjenske opreme (Chemat i sur., 2012). Neke od inovativnih metoda ekstrakcije su: ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem i enzimski potpomognuta ekstrakcija (Carreira-Casais i sur., 2022). Ove tehnike su poznate i kao tehnike hladne ekstrakcije, jer je temperatura tijekom procesa relativno niska i ne utječe na stabilnost ekstrahiranih spojeva. Mogu se koristiti i kao predtretmani, te u kombinaciji s ekološki prihvatljivim organskim otapalima kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije (Tiwari i sur., 2015). Hidroliza celuloze iz biomase superkričnom vodom i ekstrakcija hidrofobnih komponenata pomoću superkričnog CO₂ su neki od primjera metoda zelene ekstrakcije (Raj i sur., 2022).

2.2. PRINCIPI ZELENE EKSTRAKCIJE

Principi zelene ekstrakcije opisani su kao primjeri koje treba slijediti, a ne kao pravila. Utvrdili su ih znanstvenici, a uspješno ih primjenjuju akademska zajednica i industrija. Razlikujemo šest principa zelene ekstrakcije:

Princip 1: Odabir novih izvora biljnih materijala i primjena obnovljivih biljnih izvora

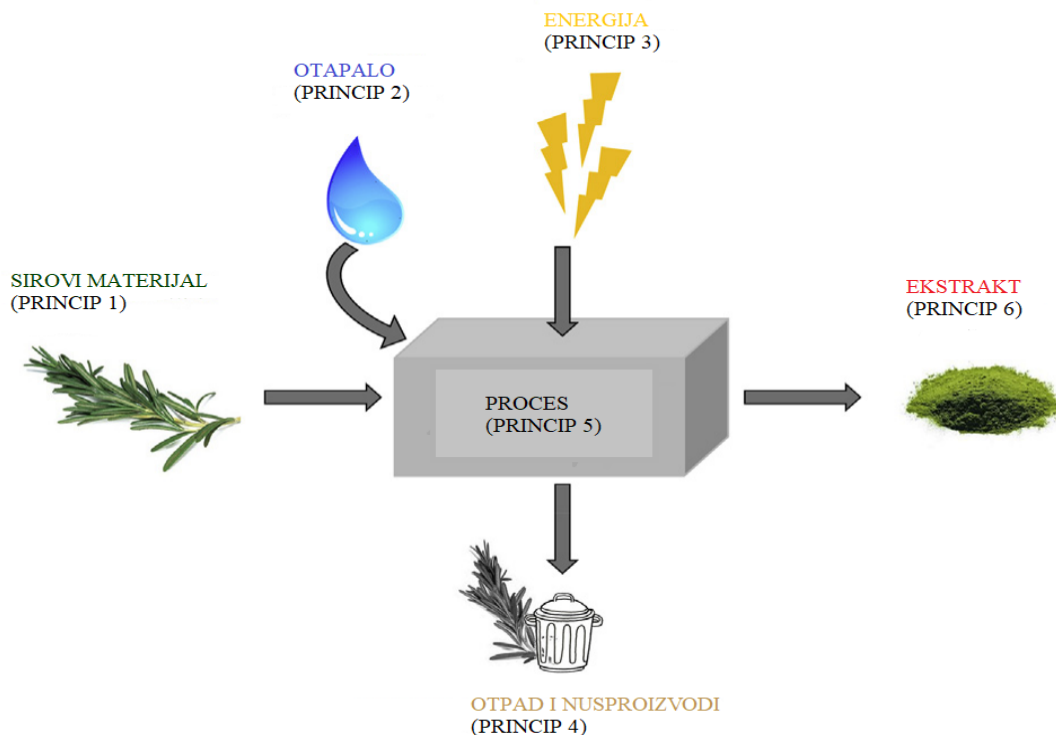
Princip 2: Primjena alternativnih otapala, uglavnom vode ili otapala iz prirodnih izvora

Princip 3: Smanjenje potrošnje energije ponovnom primjenom energije i primjenom inovativnih tehnologija

Princip 4: Proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada prema konceptu biorafinerije

Princip 5: Smanjenje broja operacija i razvoj sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa

Princip 6: Industrijska proizvodnja zelenog, stabilnog i biorazgradivog biljnog ekstrakta



Slika 1. Osnovni ulazi i izlazi procesa koji se temelje na šest principa zelene kemije (prema Chemat i sur., 2019)

2.2.1. Princip 1: Odabir novih izvora biljnih materijala i primjena obnovljivih biljnih izvora

Potrebe prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih industrija, za prirodnim proizvodima i ekstraktima je sve veća. Zbog toga dolazi do prekomjernog iskorištavanja izvora biljnih materijala. Nekontrolirana berba biljnih materijala može dovesti do toga da određene biljne vrste postanu rijetke ili izumrle. Kako bi se spriječilo izumiranje biljnih vrsta, industrije se sve više okreću uporabi obnovljivih biljnih izvora, uzgoju biljaka i novim tehnologijama. Kako bi se smanjio utjecaj industrijskih procesa na okoliš, potrebno je podržavati tehnologije obrade koje omogućuju učinkovitu proizvodnju usjeva i proizvoda za zaštitu bilja, izbjegavati kulture koje uzrokuju zagađenja i ugrožavaju biološku raznolikost. Oplemenjivanje biljaka, također, može doprinijeti povećanju prinosa, te proizvodnji sorti koje sadrže ciljane spojeve.

Najpoznatiji primjer izolacije lijekova iz biljaka je antikancerogeni paklitaksel (Taxol®). Paklitaksel se izolira iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*). Tijekom 1970-ih godina proizvodnja paklitaksela dovela je od prekomjernog iskorištavanja drveta pacifičke tise (Chemat i sur., 2019). Udio paklitaksela u osušenoj kori iznosi 0,01 %, a 0,002 % u osušanim iglicama. Jedno stablo, starosti 100 godina, može dati 300 mg paklitaksela. Kako bi se dobilo 1 kg paklitaksela potrebno je oko 10 000 kg kore. Uzrok prekomjernog iskorištavanja je i to što je pacifička tisa spororastuća biljka. Kako bi se pronašao bolji izvor ljekovite tvari proučavale su se i druge vrste roda *Taxus* (Pejković, 2016). 1980. godine otkriven je 10-deacetilbakatin III koji se koristio kao početni materijal za polusintezu paklitaksela. Relativno velika količina 10-deacetilbakatina izolirana je iz lišća europske tise. Lišće predstavlja obnovljivi izvor energije.

Nova metoda ekstrakcije tvari bez uništavanja biljaka je „plant milking“. Primjenjuje se za proizvodnju aktivnih sastojaka iz rijetkih biljaka i sastojaka čija je kemijska sinteza vrlo komplicirana i ekonomski neisplativa. Uzgoj se provodi u staklenicima u tekućem mediju. Izlučivanje tvari kroz korijenje potiče se fizikalnom, kemijskom ili biološkom stimulacijom. Izlučene tvari prikupljaju se metodama ekstrakcije i pročišćavanja (Chemat i sur., 2019). Ova metoda primjenjuje se u uzgoju bijele murve (*Morus alba L.*), stablu koje predstavlja simbol tradicionalne kineske medicine. Dobiveni ekstrakt korijena sadrži 18 puta veću koncentraciju preniliranih molekula nego dostupni komercijalni ekstrakt korijena. Dokazano je da je ekstrakt visoko biološki aktivan, te se može koristiti kao učinkovit aktivni sastojak sa svojstvima protiv starenja kože (Chajra i sur., 2020).



Slika 2. „Plant milking“ (Chemat i sur., 2012).

2.2.2. Princip 2: Primjena alternativnih otapala, uglavnom vode ili otapala iz prirodnih izvora

Iako organska otapala imaju brojne prednosti, potrebna je zamjena zelenijim otapalima. Organska otapala imaju toksičan učinak na zdravlje čovjeka i okoliš. Veliki dio organskih otapala karakteriziramo kao hlapive organske spojeve koji doprinose povećanju rizika od požara i eksplozije. Također, oslobađaju se u atmosferu te mogu djelovati kao zagađivači zraka (Chemat i sur., 2019).

2.2.2.1. Ekstrakcija bez primjene otapala

Metode ekstrakcije bez primjene otapala koriste se u ekstrakciji mnogih važnih prirodnih proizvoda (jestiva ulja, eterična ulja, mirisi, antioksidansi). Tim metodama smanjuje se cijena i rizik primjene velikih količina otapala. Smanjuje se i količina otpadne vode nakon ekstrakcije i količina primijenjene energije u odnosu na tradicionalne metode ekstrakcije (Raj i sur., 2022). Neke od metoda ekstrakcije bez primjene otapala su: mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (engl. *Microwave Hydrodiffusion and Gravity*, MHG), trenutačna kontrola pada tlaka i metoda pulsirajućeg električnog polja. MHG primjenjuje se za ekstrakciju aroma, pigmentata i antioksidansa, a metoda pulsirajućeg električnog polja za ekstrakciju antioksidansa i pigmentata (Chemat i sur., 2019).

2.2.2.2. Voda

Voda je najsigurnije i najjeftinije otapalo, te nije toksična za zdravlje i okoliš. Voda se sve češće primjenjuje kao ekstrakcijsko otapalo zbog mogućnosti promjene svojstava promjenom temperature (Castro-Puyana i sur., 2017). Vodu karakterizira i niska topljivost nepolarnih spojeva i velika potrošnja energije prilikom koncentriranja proizvoda. Nedostatak vode je nedovoljna selektivnost i mikrobiološka nestabilnost. Metode ekstrakcije koje koriste vodu su: destilacija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE) i ekstrakcija superkritičnom vodom (engl. *Subcritical Water Extraction*, SWE) (Chemat i sur., 2019).

Vodi, pri superkritičnim uvjetima, pri temperaturama iznad temperature vrelišta (100 °C), ispod kritične točke (374 °C) i tlaku pri kojem ostaje u tekućem stanju, polarnost opada i tako postaje dobra zamjena organskim otapalima (Jokić i sur., 2018).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provodi se u reaktorima pod tlakom ili u otvorenim sustavima pri atmosferskim tlakom. Primjenjuje se za ekstrakciju esencijalnih ulja, a velik značaj ima u povećanju prinosa procesa (Chemat i sur., 2019).

2.2.2.3. Superkritični CO₂

Superkritični CO₂ (SC-CO₂) je nepolaro otapalo, te se koristi za ekstrakciju slabo polarnih spojeva niske molekulske mase poput triglicerida, masnih kiselina i karotenoida. Topljivost tvari u superkritičnom CO₂ se smanjuje povećanjem broja polarnih funkcionalnih skupina (hidroksilne, amino, nitro i karbonilne skupine). Kritična temperatura je 31,3 °C, a kritični tlak 7,38 MPa. Ekstrakcija SC-CO₂ omogućava obradu materijala osjetljivih na visoke temperature, dobiveni proizvod ne sadrži otapalo, a arome ostaju nepromijenjene. Otapalo nije zapaljivo ni toksično i ima GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe*), općenito priznato kao sigurno. Neki od nedostataka postupka ekstrakcije SC-CO₂ su: primjena visokih tlakova, visoki troškovi ulaganja, te netopivost visoko polarnih spojeva (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

2.2.2.4. Glicerol

Glicerol (propano-1,2,3-triol) je viskozna tekućina bez boje i mirisa, slatkog okusa. Može se dobiti iz obnovljivih izvora ali i fosilnih. Glicerol je česti sastojak lijekova, kozmetike i hrane zbog svoje netoksičnosti i ekološke prihvatljivosti. U svojoj strukturi posjeduje tri hidroksilne skupine zbog kojih je topljiv u vodi i higroskopan. Ima izrazito visoko vrelište (290

°C) i izrazito je viskoznan zbog međusobnog povezivanja molekula vodikovim vezama (Makris i Lalas, 2020).

2.2.2.5. Terpeni

Kao zelena otapala primjenjuju se i terpeni ekstrahirani iz bora (α -pinen) ili citrusnog voća (D-limonen) (Chemat i sur., 2012). Zbog svojih svojstava, polaritetu i afinitetu prema mastima i uljima, D-limonen je dobro ekstrakcijsko otapalo. Glavni nedostatak primjene D-limonena kao ekstrakcijskog otapala je povećana potrošnje energije prilikom uklanjanja otapala jer je temperatura vrelišta D-limonena 175 °C, a *n*-heksana 69 °C (Virot i sur., 2008).

2.2.2.6. Ionske kapljevine

Ionske kapljevine su organske soli s talištem nižim od 100 °C. Obično su građene od organskog kationa i organskog ili anorganskog aniona. Kationi mogu biti različito supstituirane molekule koje sadrže pozitivno nabijeni fosforov, dušikov ili sumporov atom (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Često ih se naziva dizajniranim otapalima zbog toga što je različitim kombinacijama kationa i aniona moguće dobiti otapalo željenih svojstava. Ionske kapljevine imaju sposobnost otapanja brojnih organskih i anorganskih tvari, nisu hlapive, eksplozivne ni zapaljive. Karakterizira ih i električna vodljivost, elektrokemijska postojanost, toplinska postojanost, mogućnost regeneracije i ponovne upotrebe. U tekućem stanju se nalaze u širokom temperaturnom rasponu, te mogu biti hidrofilne ili hidrofobne. Porastom duljine bočnog lanca na kationu raste toksičnost, a biorazgradivost opada. Smatra se da su neke ionske kapljevine štetnije za okoliš od tradicionalno primjenjivanih organskih otapala (Sander, 2012).

2.2.2.7. Eutektička otapala

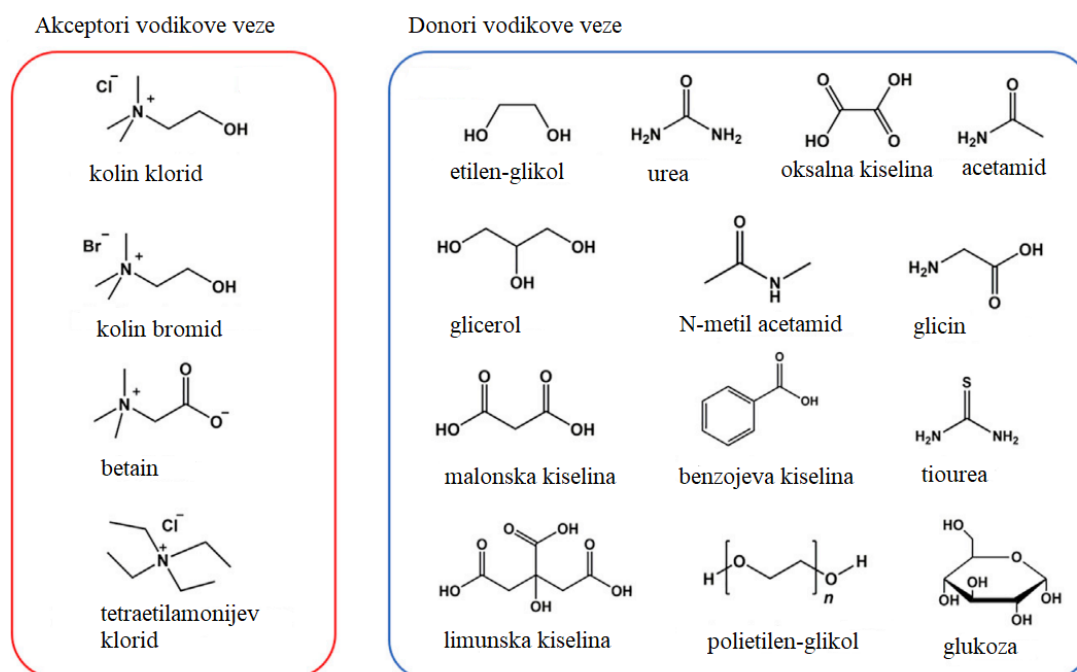
Eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su alternativa ionskim kapljevina (Paiva i sur., 2014). Zbog svojih svojstava, koja su vrlo slična svojstvima ionskih kapljevina, nazivaju se četvrtom generacijom ionskih tekućina. DES-ovi su, poput ionskih tekućina, viskozni, nehlapljivi i nezapaljivi. To su smjese akceptora vodika (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) koji mogu biti netoksične kvaterne amonijeve soli i donora vodika (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) poput amina, alkohola, karboksilnih kiselina i šećera, međusobno povezanih vodikovim vezama. DES-ove karakteriziraju niže vrijednosti temperature tališta u odnosu na tališta polaznih materijala. Primjer takvog DES-a je mješavina kolin-klorida, temperatura tališta je 302 °C, i uree, čija je temperatura tališta 133 °C, u molarnom omjeru 1:2. Temperatura tališta dobivenog DES-a je 12 °C. DES-ovi na bazi kolina

prvo su se primjenjivali u elektrotaloženju, elektropoliranju metala i u proizvodnji biodizela. Nakon toga, DES-ovi se primjenjuju i kao otapala u organskoj sintezi, biokatalizi, elektrokemiji i ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Općenita formula DES-a je: Cat^+X^-zY . Cat^+ predstavlja amonijev, sulfonijev ili fosfonijev kation, X^- je Lewisova baza, halogenidni anion, a Y predstavlja Lewisovu ili Bronstedovu kiselinu. Z predstavlja broj molekula Y koje su u interakciji sa X^- (Smith i sur., 2014).

Razlikujemo pet skupina DES-ova:

- 1.) DES se sastoji od kvaterne amonijeve soli i metalnog klorida
- 2.) DES se sastoji od kvaterne amonijeve soli i hidriranog metalnog klorida
- 3.) DES se sastoji od kvaterne amonijeve soli i organske komponente poput amida, karboksilne kiseline ili šećernih alkohola
- 4.) DES se sastoji od hidriranog metalnog klorida i organskih komponenata poput amida, karboksilne kiseline ili šećernih alkohola
- 5.) DES se sastoji od neionskih, molekularnih donora i akceptora vodika



Slika 3. Kemijska struktura nekih spojeva koji se primjenjuju za pripremu eutektičkih otapala (prema Yu i sur., 2022).

DES, za čiju se izradu koriste prirodni sastojci poput aminokiselina, organskih kiselina i šećera, naziva se prirodno eutektičko otapalo (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES). Zbog prirodnih sastojaka NADES-ovi su lako biorazgradivi i ekološki korisni. Prednost uporabe prirodnih sastojaka je ta što je dobiveni ekstrakt moguće koristiti u prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim pripravcima. Karakterizira ih velika stabilnost i svojstvo solubilizacije, zbog čega se smatraju idealnim kandidatom za zamjenu tradicionalnih otapala. Učinkovito ekstrahiraju bioaktivne spojeve poput fenolnih kiselina, flavonoida, alkaloida, šećera i peptida (Raj i sur., 2022). Priprema NADES-a je općenito vrlo jednostavna, a metoda izrade ovisi o osobnim preferencijama i dostupnoj opremi. Najčešća metoda pripreme je zagrijavanje uz miješanje sastojaka dok se ne dobije homogena tekućina. Tijekom pripreme nisu potrebna dodatna otapala, ne odvijaju se reakcije, te nije potrebno pročišćavanje proizvoda (Hansen i sur., 2021). Manje primjenjivane metode pripreme NADES-a su: isparavanje, sušenje smrzavanjem, mljevenje, grijanje uz pomoć ultrazvuka i djelovanjem mikrovalnog zračenja. Metoda isparavanja provodi se otapanjem komponenata u vodi, nakon čega slijedi isparavanje otapala u rotacijskom isparivaču. Dobivena tekućina se stavlja u eksikator sa silika gelom dok se ne postigne konstantna masa. Metoda sušenje zamrzavanjem provodi se tako što se prvo vodena otopina NADES-a ili pojedinačne komponente zamrznu, a potom se voda iz zamrznutog proizvoda uklanja sublimacijom. Mljevenje je metoda koja se temelji na usitnjavanju komponenata u mužaru na sobnoj temperaturi dok se ne dobije homogena tekućina. Zagrijavanje ultrazvukom se provodi tako da se komponente smjese izlože ultrazvuku dok otopina ne postane homogena. Priprema djelovanjem mikrovalnog zračenja se provodi tako da se komponente izlažu mikrovalovima male snage tijekom nekoliko sekundi. Na način primjene NADES-a utječu njihova fizikalno kemijska svojstva poput polarnosti, vodljivosti, gustoće i viskoznosti. Prisutnost vode snižava temperaturu taljenja i mijenja fizikalno-kemijska svojstva. Razrjeđivanjem otopine NADES-a vodom interakcije između donora i akceptora vodika postupno slabe, a pri udjelu vode od oko 50 % mogu i u potpunosti izostati. Također, dodatkom vode može se smanjiti viskoznost, ali i povećati vodljivost NADES-a do 100 puta. Jedno od najvažnijih svojstava NADES-a je polarnost, koje određuje njihovu sposobnost miješanja s drugim otapalima kao i sposobnost ekstrakcije. Većina NADES-a opisanih u literaturi su hidrofilni, dok se primjena hidrofobnih još istražuje (Mišan i sur., 2020).

2.2.3. Princip 3: Smanjenje potrošnje energije ponovnom primjenom energije i primjenom inovativnih tehnologija

Jedan od glavnih problema industrije je potrošnja energije. Velika potrošnja energije doprinosi povećanim troškovima proizvodnje. Među najvećim potrošačima energije su kemijska industrija, industrija proizvodnje plastike i prehrambena industrija. Smanjenje potrošnje energije procesa moguće je ukoliko se usvoje četiri principa:

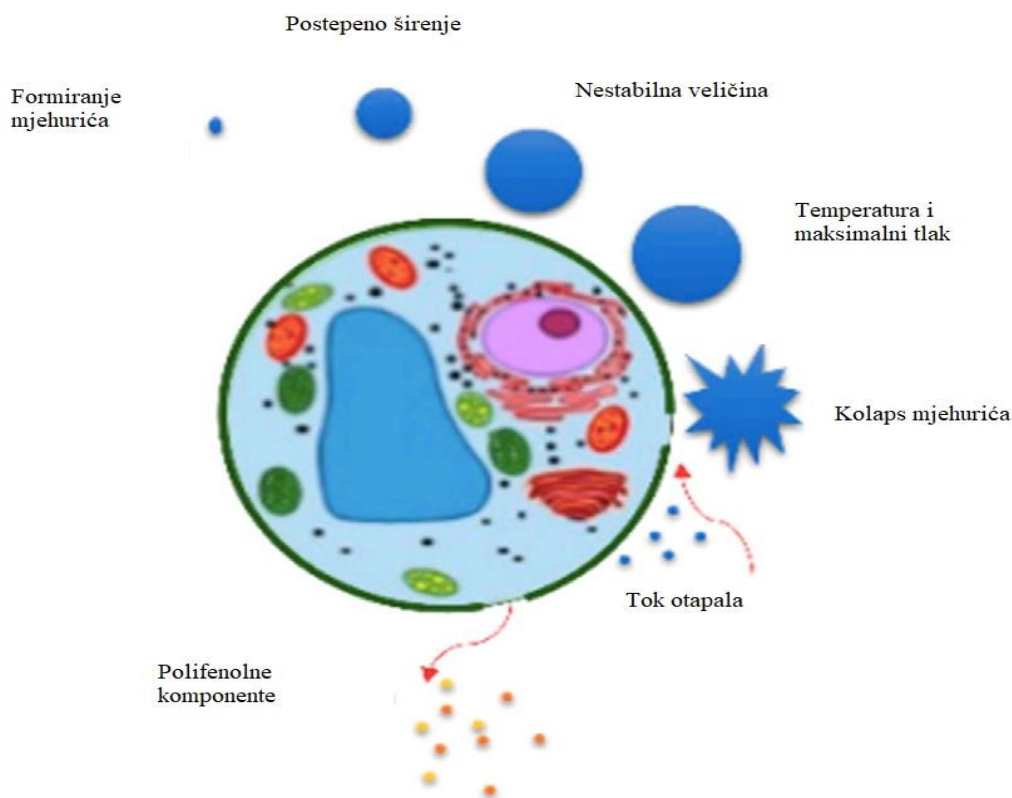
- 1.) optimizacija postojećeg procesa
- 2.) ponovna primjena oslobođene energije
- 3.) unaprjeđivanje postojećih procesa
- 4.) primjena inovativnih tehnologija (Chemat i sur., 2019).

2.2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Djelovanjem ultrazvuka vrijeme ekstrakcije se smanjuje na samo nekoliko minuta uz visoku pouzdanost, smanjenu potrošnju otapala, povećanu čistoću proizvoda, uklanjanje otpadne vode nakon procesa i smanjenju potrošnju energije u odnosu na tradicionalne metode (Raj i sur., 2022). Također, primjenom ultrazvuka u postupcima ekstrakcije povećava se prinos ekstrakcije, omogućena je primjena otapala koja posjeduju GRAS status i ekstrakcija komponenti osjetljivih na povišene temperature. Primjenjuje se za ekstrakciju različitih molekula i biomaterijala, poput polisaharida, eteričnih ulja, proteina, boja, pigmentata i bioaktivnih molekula. Ultrazvučni valovi su valovi koji imaju frekvenciju veću od gornje granice osjetljivosti ljudskog uha (>20 kHz) i manju od frekvencije mikrovalova (< 10 MHz). Razlikujemo ultrazvuk niskog intenziteta (<1 W cm⁻²) i ultrazvuk visokog intenziteta (10-1000 W cm⁻²). Fizikalni i biokemijski utjecaj ultrazvuka ovisi o frekvenciji. Fizikalni utjecaj prevladava na frekvencijama od 20 do 100 kHz, a biokemijski utjecaj na frekvencijama višim od 200 do 500 kHz. Akustična kavitacija je glavna pokretačka snaga ekstrakcije. Širenje ultrazvuka kroz medij, uzrokuje stvaranje niza kompresija i razrjeđenja u molekulama medija. Takve promjene izazivaju stvaranje i kolaps mjehurića u tekućem mediju. Pojava kavitacijskog učinka ovisi o karakteristikama ultrazvuka, frekvenciji i intenzitetu, svojstvima medija, poput viskoznosti i površinske napetosti, te uvjetima okoline, temperaturi i tlaku (Tiwari, 2015).

Razlikujemo dvije vrste ultrazvučnih reaktora: sustav sa direktno uronjenom sondom i ultrazvučne kupelji. Sustav sa direktno uronjenom sondom temelji se na piezoelektričnom ili magnetostriktivnom pretvorniku. Sustav se sastoji od generatora koji električnu energiju

pretvara u visoku frekvenciju izmjenične struje, pretvornika koji dobivenu visoku frekvenciju izmjenične struje pretvara u mehaničke vibracije koje su odgovorne za pojavu kavitacije. Zbog svoje dostupnosti i niže cijene, ultrazvučne kupelji, se češće koriste u laboratorijima. Volumeni tretirane tekućine u standardnim ultrazvučnim kupeljima su veliki, te zbog toga rade pri manjim akustičnim snagama, a rade i pri nižim intenzitetima kako bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika (Brnčić i sur., 2009).



Slika 4. Poremećaj staničnih struktura uzrokovanih kolapsom kavitacijskog mjehurića pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom (prema Picot-Allain i sur., 2021).

2.2.3.2 Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi su neionizirajuća zračenja koja zauzimaju područje frekvencija od 300 do 300 000 MHz. Mikrovalne pećnice, koje su karakteristične za primjenu u domaćinstvu, imaju frekvenciju od 2450 MHz. Mikrovalovi prolaze kroz staklo, papir, plastiku i zagrijavaju vodu u hrani. Uzrokuju istovremeno zagrijavanje cijelog volumena, a rotacijom dipola se oštećuju vodikove veze. Ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku i ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranim uvjetima temperature i tlaka su dva tipa mikrovalnih

ekstrakcija. Na uspješnost mikrovalne ekstrakcije veliki utjecaj imaju veličina čestica i raspodjela čestica, te izbor otapala i temperatura. Povišenjem temperature postiže se bolji ekstrakcijski učinak, ali povišena temperatura može negativno djelovati na termo labilne spojeve. Otapala koja se koriste trebaju imati mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova i visoku dielektričnu konstantu. Neka od tih otapala su: voda, etanol i metanol (Blekić i sur., 2011).

2.2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

Snaga električnog polja, u šaržnom načinu rada, iznosi 100-300 V cm⁻¹, a u kontinuiranom načinu iznosi 20-80 kV cm⁻¹. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem koristi se za ekstrakciju karotenoida, likopena, antocijanina, polifenolnih spojeva, polisaharida, ulja, masti i drugih bioaktivnih spojeva. Za povećanje propusnosti staničnih membrana koristi se vanjska električna sila, te dolazi do perforacije membrane stvaranjem hidrofilnih rupa, što dovodi do otvaranja proteinskih kanala (Raj i sur., 2022).

2.2.3.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija

Na uspješnost enzimski potpomognute ekstrakcije utječu pH medija, temperatura, odabir enzima i vrijeme trajanja ekstrakcije. Primjena enzima pektinaze omogućila je ekstrakciju polifenolnih spojeva koji se nisu mogli ekstrahirati iz komete trešnje. Primjena pektinaza, celulaza i hemicelulaza povećala je prinose proteina iz lišća šećerne repe za 43,27 %. Navedeni enzimi sudjeluju u razgradnji stanične stijenke i mezokarpa. Nedostatak primjene enzima u metodama ekstrakcije je njihova visoka cijena (Picot-Allain i sur., 2021).

2.2.3.5. Ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom

Hladna plazma je djelomično ioniziran plin koji se sastoji od iona, elektrona, ultraljubičastih fotona i reaktivnih neutralnih radikala, poput molekula u pobuđenom i osnovnom stanju. Ekstrakcija se može provoditi pri atmosferskom tlaku ili nižim tlakovima pri čemu ne zahtijeva skupe reakcijske komore za regulaciju tlaka i temperature. Smatra se vrlo pristupačnom metodom zbog vrlo niske potrošnje energije. Potrošnja energije, na laboratorijskoj razini, je od 15 do 900 W. Djelovanjem hladne plazme dolazi do oštećenja stanične stijenke biljaka i poboljšanja prijenosa mase i ekstrakcije. Primjeri ekstrakcije potpomognute hladnom plazmom su ekstrakcija galaktomanana iz piskavice i fenolnih spojeva iz komete grožđa (Picot-Allain i sur., 2021).

2.2.4. Princip 4: Proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada prema konceptu biorafinerije

Biorafinerija predstavlja mrežu postrojenja, koja pretvara biomasu u njezine sastojke, a pritom proizvodi energiju, kemikalije, materijale i biogoriva. Koncept biorafinerija postaje sve više prihvaćen jer se prirodni resursi svakodnevno smanjuju. Primjenjuje se u procesima ekstrakcije prirodnih proizvoda koji se potom primjenjuju kao dodaci prehrani ili bioaktivni spojevi. Neki od primjera ovog pristupa su potpuna valorizacija nusproizvoda iz lanca proizvodnje soka od naranče, maslinovog ulja i vina. Za ekstrakciju polifenolnih spojeva, u ovom radu, je korištena komina grožđa, koja predstavlja otpad iz industrije vina (Chemat i sur., 2019).

2.2.4.1. Komina grožđa, otpad iz industrije vina

Oko 70 % proizvedenog grožđa namijenjeno je proizvodnji vina, a 20-30 % čini industrijski otpad koji se naziva komina grožđa. Komina grožđa se sastoji od pokožice, sjemenki, preostale pulpe i peteljki. Zbrinjavanje komine grožđa može uzrokovati onečišćenja podzemnih i površinskih voda, te negativno djelovati na biorazgradnju zbog niske pH vrijednosti i prisustva antibakterijskih spojeva (Antonić i sur., 2020). Sastojci komine grožđa su: voda, vitamini, minerali, proteini, lipidi, ugljikohidrati, fenolni spojevi, vitamin C i dijetalna vlakna. Pomažu u prevenciji raka, kardiovaskularnih bolesti, Alzheimerove bolesti i drugih degenerativnih bolesti (Sousa i sur., 2014). Nakon proizvodnje, komina sadrži velike količine vode koju je potrebno ukloniti sušenjem kako ne bi došlo do mikrobnog kvarenja.

Komina sadrži oko 85 % dijetalnih vlakana, a točan udio ovisi o sorti grožđa. Komina bijelog grožđa sadrži manji udio dijetalnih vlakana od komine crnog grožđa. Netopiva vlakna, celuloza i hemiceluloza, imaju pozitivan utjecaj na probavni trakt jer su visoko porozna i niske gustoće. Dijetalna vlakna prisutna u žitaricama imaju manju hranjivu vrijednost u odnosu na vlakna prisutna u komini grožđa. Razlog tome je taj što vlakna u komini grožđa stvaraju veze s fenolnim spojevima pri čemu nastaju antioksidativna dijetalna vlakna (Antonić i sur., 2020).

Oko 70 % polifenolnih spojeva zaostaje u komini nakon fermentacije grožđa zbog njihove nepotpune ekstrakcije (Antonić i sur., 2020). Polifenolne spojeve sadržane u grožđu i vinu možemo svrstati u dvije skupine: neflavonoidne polifenolne spojeve u koje ubrajamo hidroksibenzojevu kiselinu, hidroksicimetnu kiselinu i njihove derivate, stilbene i fenolne alkohole, te flavonoide u koje ubrajamo antocijanine, flavonole, dihidroflavonole i flavanole (Antonioli i sur., 2015). Grožđe sadrži velike količine fenolnih kiselina i flavonoida kao što su

galna kiselina i katehini. Polifenoli imaju mogućnost inhibicije aktivnosti proteolitičkih enzima in vitro djelujući kao agensi za poticanje stvaranja kompleksa ili taloženja (Wittenauer i sur., 2015). Flavonoidi imaju protuupalno djelovanje i sposobnost modulacije upalnog odgovora domaćina. Provedena su klinička istraživanja koja dokazuju da flavonoidi pozitivno djeluju na paradontitis, oralnu upalnu bolest (Torre i sur., 2020).

2.2.5. Princip 5: Smanjenje broja operacija i razvoj sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa

Industrije uključene u ekstrakciju prirodnih proizvoda, zbog trenutnih ekoloških i ekonomskih problema, moraju razviti nove čišće i sigurnije protokole ekstrakcije (Chemat i sur., 2012). Cilj je povećati prinos ekstrakcije, čistoću i kvalitetu ekstrakta, uz smanjenje broja jediničnih operacija, količine otapala, potrošnje energije, utjecaja na okoliš, vremena trajanja, ekonomskih troškova i ukupnog otpada. Jednofazni proces ekstrakcije bi bio idealan jer se smanjenjem koraka procesa smanjuju troškovi i doprinosi boljem iskorištenju energije. Jedan od primjera povoljnog procesa je ekstrakcija superkritičnim CO₂. Nakon ekstrakcije pri superkritičnim uvjetima, postavlja se atmosferski tlak i time se trenutačno i potpuno uklanja plinoviti CO₂ iz ekstrakta (Chemat i sur., 2019).

2.2.6. Princip 6: Industrijska proizvodnja zelenog, stabilnog i biorazgradivog biljnog ekstrakta

Kako bi se tvar mogla nazvati prirodnom ne smije biti kemijski modificirana, tj. njezina molekularna struktura ne smije biti promijenjena postupcima obrade. Deklaracija ekstrakta kao prirodnog je diskutabilna i zastupaju se različita gledišta jer doneseni zakoni ne definiraju detalje o procesu ekstrakcije otapalom. Pojedini smatraju da je ekstrakcija fizikalni proces, a dobiveni ekstrakt je prirodan ukoliko se otapalo ukloni na kraju procesa, a neki smatraju da je ekstrakt prirodan ukoliko je korišteno otapalo prirodnog porijekla ili ukoliko se kao otapalo koristi voda. Da bi se ekstrakt smatrao eko-ekstraktom mora biti prirodan, visoke kvalitete s aktivnim i nedenaturiranim spojevima, biti visoko funkcionalan (antimikrobna svojstva, antioksidativna svojstva, svojstva okusa, boje) i imati nizak utjecaj na okoliš. U ekstraktu ne smiju biti prisutni mikrobnih kontaminanti, ostaci pesticida, teških metala i policikličkih aromatskih ugljikovodika (Chemat i sur., 2019).

2.3. PRIMJENA ULTRAZVUKA I EUTEKTIČKIH OTAPALA U INDUSTRIJI

2.3.1. Primjena eutektičkih otapala u industriji

Zamjena neučinkovitih i opasnih otapala učinkovitijim i sigurnijim otapalima, DES-ovima, najučinkovitiji je način postizanja zelenih procesa. DES-ovi imaju mogućnost lakog

otapanja fenolnih spojeva ili aktivnih farmaceutskih sastojaka čime se povećava njihova dostupnost. Promjenom molarnog omjera moguće je promijeniti svojstva pripremljenog DES-a. Većina podnositelja patentnih prijava vezanih za primjenu DES-a su akademske institucije, te održivost patentiranog postupka na industrijskoj razini nije prikazana. Od industrija, kozmetička industrija je preuzela inicijativu primjene NADES otapala (Naturex, Gattefosse). Jedan od industrijskih patenata opisuje metodu pripreme DES-a koji sudjeluje u ekstrakciji bioaktivnih spojeva nevena (*Calendula officinalis*). Ispitan je citotoksični učinak i primjena ekstrakta u kozmetičkim preparatima. U ovom patentu DES je predstavljen kao alternativa standardnim otapalima poput vode, kojoj je potreban dodatak mikrobioloških stabilizatora, glikola koji su potencijalno toksični, te etanola koji je hlapljiv i zbog toga je otežan transport i skladištenje. Opisani DES se sastoji od šećera, aminokiselina i poliola. Ima mogućnost ekstrakcije bioaktivnih spojeva, posebno klorogenske kiseline iz biljke nevena. Prednost primjene DES-a u kozmetičkoj industriji je taj što kozmetički preparati sadrže velike količine vode. Dodatkom ekstrakta s NADES-om u formulaciju na bazi vode, dolazi do pucanja vodikovih veza što uzrokuje širenje aktivnih sastojaka.

U praksi se industrijski procesi ne mogu dizajnirati bez razmatranja procesa u reaktoru (engl. *upstream processing*) i postupaka izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (engl. *downstream processing*). Proces u reaktoru uključuju sve procese vezane uz čvrstu fazu, od polja za uzgoj do punjenja reaktora za ekstrakciju. Svi koraci procesa moraju biti detaljno istraženi i kontrolirani, od načina branja biljnog materijala do fizičkog stanja sirovine koja se ekstrahira. Postupci izdvajanja i pročišćavanja proizvoda uključuju postupke oporavka tekuće faze nakon ekstrakcija, pročišćavanja ekstrakta i regeneraciju otapala. Ekonomska održivost procesa ocjenjuje se od ranih faza razvoja na laboratorijskoj razini. Potrebno je predvidjeti i riješiti probleme koji se pojavljuju tijekom uvećanja procesa. Jedan od problema uvećanja procesa može biti nedovoljno poznavanje biljke. Fitokemijski sadržaj biljnih usjeva može se razlikovati ovisno o klimatskim uvjetima. Industrijski reaktori najčešće se izrađuju od nehrđajućeg čelika, dok su laboratorijski reaktori najčešće od stakla. Prijenos topline i brzina zagrijavanja se razlikuju te je potrebno prilagoditi parametre procesa. Dimenzije pumpe i tehnologije filtracije proučavaju se na pilot razini. U nekim slučajevima pročišćavanje ekstrakta može biti štetno za biološku aktivnost sirovog ekstrakta. Tada, proces optimizacije se provodi putem kompromisa između sadržaja glavnih fitokemijskih skupina i testova biološke aktivnosti. Najveći problem uvećanja procesa u kojem se kao otapalo koristi DES je njegova viskoznost. Povećana viskoznost otapala smanjuje učinkovitost ekstrakcije zbog niskog prijenosa mase,

uzrokuje i probleme pri dizajnu opreme, te povećava potrošnju energije potrebne za miješanje i pumpanje. Viskoznost DES-a može se smanjiti povećanjem temperature ili povećanjem udjela vode u otapalu. Dodavanjem vode može doći do slabljenja vodikovih veza između komponenata DES-a, a time i do smanjenja kapaciteta ekstrakcije. Na primjenu DES-ova u industriji utjecaj može imati i njihova cijena. Prosječna cijena otapala je od 7 do 100 € kg⁻¹, što je usporedivo s organskim otapalima. E-faktor (engl. *Environment Factor*), odnosno omjer težine generiranog otpada i ukupne mase krajnjeg proizvoda, pomnožen s kvocijantom opasnosti za okoliš, te omjerom ukupne mase korištene u procesu i mase krajnjeg proizvoda su industrijski prihvaćeni faktori za procjenu troškova i održivosti (Rente i sur., 2022). Trenutno, jedine komercijalne dostupne kozmetičke proizvode, ekstrakte na bazi NADES-a, proizvode Naturex (Givaudan, Avignone, France) i Gattefosse (Lyon, France) (Panić i sur., 2020).

2.3.2. Primjena ultrazvuka u industriji

Energija ultrazvuka ima sve veću primjenu u industriji za intenzifikaciju industrijskih procesa. Primjenjuje se u predtretmanima biomase, konverziji celuloze, razgradnji celuloze i povećanju proizvodnje šećera biokemijskim putem. Učinci povezani s primjenom energije ultrazvuka u tretmanima predobrade biomase su povećanje konvektivne sile, akustična kavitacija i proizvodnja visoko reaktivnih radikala. Djelovanjem ultrazvučnih valova topljivost lignocelulozne biomase se povećava. Promjer veličine lignoceluloznih materijala se smanjuje, te se tako povećava kontakt s otapalom i ubrzava otapanje (Flores i sur., 2021). Predtretman kombinacijom ultrazvuka i razrijeđene kiseline povećava delignifikaciju trave s 33 % na 80,4 % (Ong i Wu, 2021). Ultrazvuk se primjenjuje u postupcima predobrade biomase koja se koristi za proizvodnju proizvoda visoke vrijednosti poput goriva i finih kemikalija. Primjena ultrazvuka u kombinaciji s biološkim tretmanima koriste se za proizvodnju etanola, butanola i sintetskog plina (Bizzi i sur., 2021). Ultrazvučni valovi, pri proizvodnji biodizela, pridonose povećanju interakcije između alkohola i masnih kiselina poboljšavanjem prijenosa mase u dvofaznoj reakciji. Najučinkovitiji raspon frekvencija za proizvodnju biogoriva je od 25 do 45 kHz u sustavu s direktno primijenjenom sondom u reakcijskom mediju. Fenomeni udarnih valova, mikrokonvekcije i akustične kavitacije doprinose poboljšanju homogenizacije, disperzije i/ili emulgiranja katalizatora i sirovina. Također, aktivacijom kemijskih, fizikalnih ili bioloških katalizatora, nakon što erozija i ispiranje katalizatora biogoriva dovedu do smanjenja aktivacijske energije i vremena reakcije, poboljšava se proizvodnja biogoriva. Energija ultrazvuka primjenjuje se i za ekstrakciju biljnih ulja za daljnju proizvodnju biogoriva (Flores i sur., 2021). Broj tvrtki koje primjenjuju ultrazvuk, kao tehniku ekstrakcije, značajno

je porastao. Jedna od njih je Arkopharma, francuska tvrtka specijalizirana za dodatke prehrani na bazi biljnih ekstrakata. Za ovu tvrtku, ultrazvučna ekstrakcija se pokazala kao učinkovita metoda ekstrakcije. Postignuti su bolji prinosi ekstrakcije, osigurano je povećanje performansi od 73 % za sve ispitane ljekovite biljke (Khadhraoui i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Komina grožđa

U ovom eksperimentu je korištena osušena i mehanički usitnjena komina grožđa sorte Graševina (berba 2022. godine).

3.1.2. Kemikalije

- Betain, 98 %, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Destilirana voda, PBF, HR
- Folin-Ciocalteu, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glukoza, Fisher Bioreagents, Pennsylvania, SAD
- Natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Otopine

- Folin-Ciocalteu reagens
Folin-Ciocalteu reagens do 25 mL
Destilirana voda do 250 mL
- Otopina natrijevog karbonata (75 g L^{-1})
Natrijev karbonat 7,5 g
Destilirana voda do 100 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Büchnerov lijevak
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, laboratorijske čaše, laboratorijske boce, menzure, odmjerne tikvice, kivete, nastavci za pipete)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Mikropipete (100 μL , 1 mL, 5 mL)
- Mlinac, IKA MlutiDrive control, Njemačka
- pH-metar, Mettler Toledo pH/ion meter S220, Švicarska
- Protočna ćelija Hielscher FC2T600K, Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka

- Pumpa MD025-6L, Seepex
- Stalak za epruvete
- Ultrazvučna kupelj, XUB Series Digital Ultrasonic Baths, Biosan, Latvija
- Ultrazvučni procesor UIP1000hdT, Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka
- Ultrazvučne sonde: BS4D22 (promjer sonde 22 mm), BS4D34 (promjer sonde 34 mm), BS4D40 (promjer sonde 40 mm) i sonda BS4D50 (promjer sonde 50 mm) Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka
- Uređaj za mjerenje gustoće, Mettler Toledo, Švicarska
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYSTEM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Viskozimetar, ViscoQC, Anton Paar, Austrija
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje topljivosti polifenola u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pomoću COSMOtherm programa

COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) je jedna od najtočniji računskih metoda za računalno predviđanje eutektične točke i topljivosti komponenata u eutektičnom otapalu. σ -Profili molekula pohranjeni su kao izlazna datoteka COSMO-proračuna. Oni se, statističko-termodinamičkim proračunima pomoću COSMOtherm programskog paketa, preračunavaju u σ -potencijale komponenata ili njihovih smjesa i odgovarajuće kemijske potencijale. Pomoću metoda fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike moguće je izračunati ravnotežni tlak para, koeficijent aktivnosti, koeficijent raspodjele, topljivosti ili cijeli fazni dijagram.

Opcijom *From database*, ako je molekula već prisutna u bazi podataka, ili *From File*, ako je molekula nacrtana i optimirana u programu TmoleX, unosi se .cosmo datoteka molekule kojoj se želi ispitati topljivost te molekule otapala. Pod sekcijom Properties, odabire se opcija *Activity Coefficient* nakon čega se otvara prozor u kojem se definira temperatura ispitivanja topljivosti. Također, potrebno je odrediti udio akceptora vodikove veze, donora vodikove veze i ispitivane tvari. Nakon definiranja sastava smjese, odabire se opcija *Add* te *Run Job local*. Kao rezultat dobije se $\ln(\gamma)$, logaritam koeficijenta aktivnosti, koji nam daje informaciju o topljivosti ispitivane komponente u ispitivanom otapalu. Zbroj svih udjela mora biti jednak 1.

Ukoliko se kao udio tvari odabere 0, izračunava se logaritam koeficijenta aktivnosti pri beskonačnom razrjeđenju. Veća vrijednost koeficijenta znači manju topljivost komponente u otapalu.

Tablica 1. Molarni omjeri HBD i HBA ispitanih u COSMOtherm softveru za topljivost katehina

NADES	MOLARNI OMJER	NADES	MOLARNI OMJER
B:EG	1:1	Suc:EG	1:2
B:Glc	5:2	Suc:Glc:U	1:1:2
B:Suc	4:1	Pro:Glc:Gly	1:1:1
B:Xyl	1:1	Gly:Sol	2:1
B:Ma	1:1	Gly:Glc	2:1
ChCl:EG	1:2	B:Gly	1:2
ChCl:U	1:2	Glc:Fru	1:1
ChCl:Xyl	2:1	Me:SA	4:1
ChCl:Suc	2:1	Ma:Fru	1:1
ChCl:Fru	1:1	Ma:Glc	1:1
ChCl:CA	2:1	Ma:Suc	2:1
B:CA	1:1	Pro:Ma	1:1
ChCl:Sor	1:1	CA:Sor	2:3
ChCl:Sol	1:1	CA:Suc	1:1
ChCl:Glc	1:1	CA:Fru	1:1
ChCl:Gly	1:2	Me:Ty	3:2
ChCl:Ma	1:1	CA:Glc	1:1
ChCl:Oxa	1:1	Me:C8	1:1
Fru:EG	1:2	Me:C10	1:1
Sor:EG	1:2	Ty:Cou	1:1
Sol:EG	1:2	Me:C18:2	1:1
Glc:EG	1:2	Ty:C8	1:3
Xyl:EG	1:2	Ty:C10	1:1
Me:Cam	1:1	ChCl:Xyol	5:2

**B-betain; ChCl- kolin-klorid; Fru-fruktoza; Sor-sorboza; Glc-glukoza; Xyl-ksiloza; Me- L-mentol; Suc-saharoza; Gly-glicerol; Ma-jabučna kiselina; Pro-prolin; CA-limunska kiselina; Ty-timol; Xyl-ksilitol; U-urea; Sol-sorbitol; Oxa-oksalna kiselina; Cam-L-kamfor; SA-salicilna kiselina; C8- oktanska kiselina; C10-dekanska kiselina; Cou-kumarin; C18:2-linolna.*

3.2.2. Priprava prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Sinteza NADES-a započinje dodatkom izračunatih masa komponenata u laboratorijsku bocu. U ovom radu provedena je sinteza NADES-a betain:glukoza u molarnom omjeru 1:1 sa 65 % i 30 % vode (w/w). Laboratorijska boca nakon dodatka komponenata stavljena je na magnetsku miješalicu s grijanjem, na temperaturu od 50 °C dok se nije formirala bistra tekućina.

3.2.3. Priprema komine grožđa

Sušenje komine provodi se 5 sati na 70 °C. Nakon sušenja komina se melje pomoću kriomlina IKA, MultiDrive control, Njemačka. Mljevenje se provodi pri brzinama od 3000, 5000 i 10000 rpm. Nakon mljevenja izmjeri se raspodjela veličine čestica. Usitnjena komina prosijava se kroz sito od 900 µm.

3.2.4. Odabir prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala za ekstrakciju

NADES-i su pripremljeni i karakterizirani kako je opisano u radu Mitar i sur. (2019). NADES-i se pripremaju pri određenim molarnim omjerima betaina i donora vodikove veze. Betain i glukoza pomiješani su i određenom omjeru s 30 % (v/v) vode, u bocu od 500 mL s čepom. Pripremljeni NADES-i stavljaju se u Shaker-Incubator ES-20/60 (Biosan, Riga, Latvija). Miješaju se i istovremeno zagrijevaju na 50 °C 2 sata dok se ne formira bistra tekućina.

3.2.5. Ispitivanje utjecaja veličine čestica

Kako bi se ispitao utjecaj veličine čestica provedena je ekstrakcija 100 g pripremljene komine grožđa u 5 L vode. Veličine čestica korištene komine su 283 µm, dobivene mljevenjem pri brzini od 3000 rpm tijekom 10 min i 465 µm, dobivene mljevenjem pri brzini od 10 000 rpm tijekom 5 min. Smjesa komine i vode homogenizirana je miješanjem. Homogenizirani uzorak stavljen je u reaktor te se prije pokretanja ultrazvuka izuzima 0. uzorak. Primijenjena je protočna ćelija Hielscher FC2T600K, ultrazvučni procesor UIP1000hdT pri frekvenciji rada od 19 - 20 kHz i sonde BS4D22 priključenoj na buster B4-1.4 sa orijentacijom pojačanja pri amplitudi od 100%, bez hlađenja. Početna temperatura iznosila je 27 °C, a konačna 31 °C.

Pumpa MD025-6L je radila pri maksimalnom protoku. Vrijeme tretiranja je 08min i 43s, a ukupna unesena energija je 1733700 Ws. Uzorkovanje se provodi svakih 50 sekundi, a ukupno se provodi kontinuirano 10 ciklusa. Nakon provedene ekstrakcije određuje se koncentracija ukupnih polifenola.

3.2.6. Odabir metode ekstrakcije

Provedene su ekstrakcije polifenola iz komine grožđa u različitim uvjetima kako bi se ispitala najpovoljnija metoda. Primijenjene su metode ekstrakcije miješanjem bez zagrijavanja i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su se provodile u UZV kupelji, te direktno sondom, šaržnim ili kontinuiranim postupkom. Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka provodila se kontinuirano, pri različitim brzinama pumpe (37,5 %-100 %), tijekom 30 minuta i šaržno tijekom 15 min. 30 grama suhe komine dodano je u 1,5 L vode. Ekstrakcije su se provodile i uz različite promjere sonde (22 mm, 34 mm, 40 mm i 50 mm). Provedena je još i ekstrakcija miješanjem bez zagrijavanja te ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji. Ekstrakcija miješanjem bez zagrijavanja i u ultrazvučnoj kupelji se provode tako da se 6 grama suhe komine doda u 300 mL vode, tijekom 15 min. Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji se provodi pri snazi od 100 %. Dobiveni ekstrakti centrifugiraju se pri 10 000 o min⁻¹ tijekom 5 min. Supernatant se oddekantira u epicu. Oddekantirani uzorci su čuvani u hladnjaku.

3.2.6.1. Ispitivanje utjecaja sonde i načina vođenja procesa na rezultate ekstrakcije

Za provedbu eksperimenta primijenjena je protočna ćelija Hielscher FC2T600K, ultrazvučni procesor UIP1000hdT pri frekvenciji rada od 19 - 20 kHz i različitim sondama priključenim na buster B4-1.4 sa orijentacijom pojačanja pri amplitudi od 90 %, bez hlađenja. U prvom eksperimentu 6 g osušene komine dodano je u 0,3 L vode. Primijenjena je sonda promjera 22 mm. Vrijeme trajanja šaržne ekstrakcije iznosilo je 15 min uz uzorkovanje svake minute. U drugom eksperimentu 30 g komine dodano je u 1,5 L vode. Primijenjena je sonda promjera 34 mm. Vrijeme trajanja kontinuirane ekstrakcije iznosilo je 30 min uz uzorkovanje svake 2 minute. U trećem eksperimentu 6 g komine dodano je u 0,3 L vode. Primijenjena je sonda promjera 34 mm. Vrijeme trajanja šaržne ekstrakcije iznosilo je 15 min uz uzorkovanje svake minute. U četvrtom eksperimentu 30 g komine dodano je u 1,5 L vode. Primijenjena je sonda promjera 40 mm. Vrijeme trajanja kontinuirane ekstrakcije iznosilo je 30 min uz uzorkovanje svake 2 minute. U petom eksperimentu 6 g komine dodano je u 0,3 L vode. Primijenjena je sonda promjera 40 mm. Vrijeme trajanja šaržne ekstrakcije iznosilo je 15 min uz uzorkovanje svake

minute. U šestom eksperimentu 6 g komine dodano je 0,3 L vode. Primijenjena je sonda promjera 50 mm. Vrijeme trajanja šaržne ekstrakcije iznosilo je 15 min uz uzorkovanje svake minute. U sedmom eksperimentu provedena je ekstrakcija miješanjem bez zagrijavanja. 6 g komine dodano je u 0,3 L vode. Ekstrakcija se provodila 15 min uz uzorkovanje svake minute. U osmom eksperimentu provedena je ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji snage 100 %. 6 g komine dodano je u 0,3 L vode. Ekstrakcija se provodila 15 min uz uzorkovanje svake minute.



Slika 5. Aparatura za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (vlastita fotografija)

3.2.7. Optimizacija ekstrakcije komine grožđa pomoću prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala djelovanjem ultrazvuka

Provedene su ekstrakcije polifenola iz komine grožđa potpomognute ultrazvukom s pripremljenim NADES-om. Pripremljen je NADES betain:glukoza u omjeru 1:1 s različitim udjelom vode (65 % i 30 %). U 300 mL NADES-a ili vode dodana je određena masa suhe komine (6 g, 30 g, 18 g). Primijenjena je protočna ćelija Hielscher FC2T600K, ultrazvučni procesor UIP1000hdT pri frekvenciji rada od 19 - 20 kHz i sondom priključenom na buster B4-1.4 sa orijentacijom pojačanja pri različitim amplitudama, bez hlađenja. Uzorak je izložen djelovanju ultrazvuka u različitom vremenu i različitim vrijednostima jačine amplitude. Parametri procesa dobiveni su matematičkim modelom u programu Design Expert 7.0.0. Nakon

djelovanja ultrazvuka uzorak je filtriran vakuum filtracijom. Dobivenom ekstraktu izmjeren je volumen, te je spremljen na čuvanje u hladnjak.

Za procjenu utjecaja procesnih parametara ekstrakcije primijenjen je Box-Behnkenov plan pokusa. Promjenjivi procesni parametri su: udio NADES-a, jačina amplitude, vrijeme i masa suhe komine.

Tablica 2. Faktori utjecaja i tri razine eksperimentalnog ispitivanja ekstrakcije polifenola iz ekstrakta komine grožđa

Faktor	Donja aksijalna razina	Centralna razina	Gornja razina
Kodirane varijable	-1	0	1
Udio NADES-a (%)	0	35	70
Jačina amplitude (%)	20	60	100
Vrijeme (min)	2	8,5	15
Masa/otapalo (g mL ⁻¹)	0,02	0,06	0,1

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa potrebno je provesti 27 eksperimenata.

3.2.8. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom

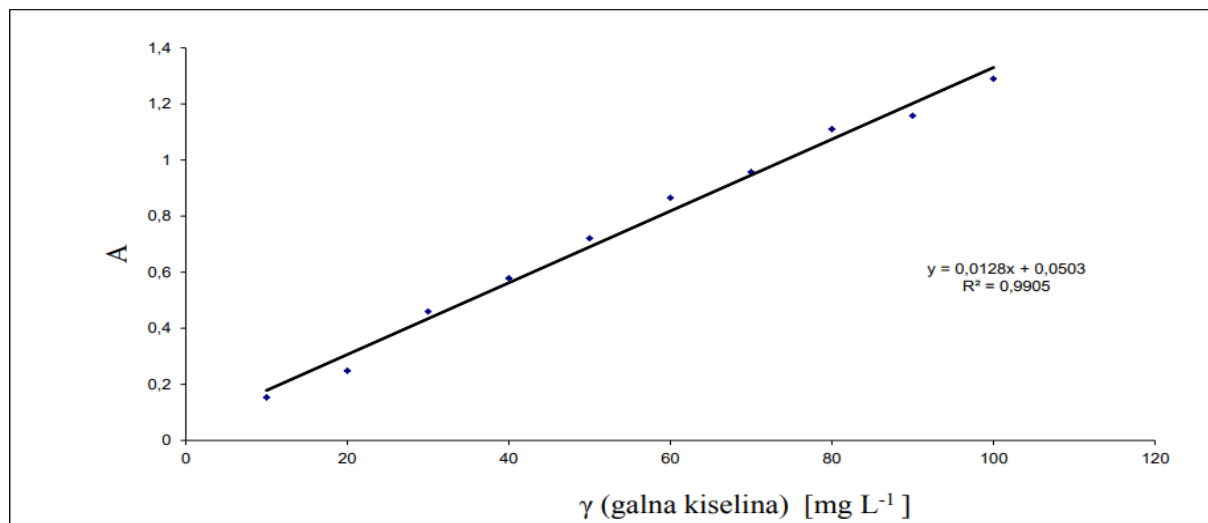
Dobiveni ekstrakt komine grožđa razrijedi se 10 ili 20 puta. U posebnu epruvetu otpipetira se 125 µL razrijeđenog uzorka. Nakon toga doda se 625 µL prethodno razrijeđenog FC reagensa uz vorteksiranje. Nakon dodatka FC reagensa uzorke je potrebno inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije potrebno je dodati 500 µL Na₂CO₃ i ponovno inkubirati 5 min u vodenoj kupelji na 50 °C. Reakcija se zaustavlja u ledenoj kupelji. Mjerenje apsorbancije se provodi na UV/VIS-spektrofotometru, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD pri 760 nm. Koncentracija ukupnih polifenola računa se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Dobiveni rezultati izraženi su kao mg polifenola/ g suhe tvari biomase.

Jednadžba pravca:

$$y=0,0128x+0,0503$$

x- koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

y- apsorbancija pri 760 nm.



Slika 6. Baždarni dijagram galne kiselina (Koret, 2017)

3.2.9. Obrada podataka

Procjena koeficijenta modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametra na promatrane procese, te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametra, provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 10.0.3. Vizualni, trodimenzionalni prikaz parametara koji utječu na ispitivani proces izrađen je pomoću softverskog paketa STATISTICA 8.0.

4. REZULTATI I RASPRAVA

NADES-i se smatraju zelenim otapalima zbog njihove biorazgradivosti, biokompatibilnosti, jednostavne sinteze, niske cijene i visoke dostupnosti sirovina (Santana-Mayor, 2021). U ovom radu korišteni su NADES-i betain:glukoza u omjeru 1:1 s 35 % i 70 % NADES-a. NADES je odabran prema rezultatima COSMO-RS metode.

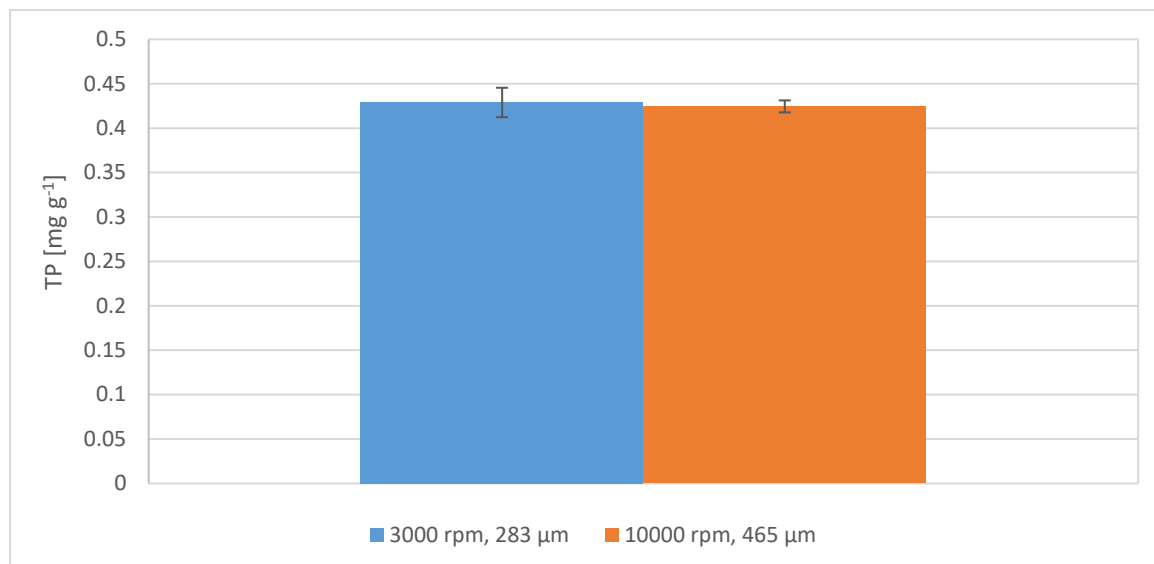
Betain, poznat i kao trimetilglicin, je stabilna, netoksična prirodna tvar koja je prisutna u životinjama, biljkama i mikroorganizmima. U visokim koncentracijama ga možemo naći u pšeničnim mekinjama, pšeničnim klicama i špinatu. Betain sudjeluje u korekciji abnormalnih razina adipokina, smanjuje endoplazmatski stres, poboljšava oksidaciju masnih kiselina (Arumugam i sur., 2021). Betain se primjenjuje i kao vrlo vrijedan dodatak prehrani u peradarskoj industriji (Abd El-Ghany i Babazadeh, 2022).

U ovom radu potrebno je odrediti parametre procesa koji će pokazati najveću učinkovitost ekstrakcije. Glavni pokazatelj učinkovitosti ekstrakcije je koncentracija ukupnih polifenola koji se određuju reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom.

4.1. ODABIR TEHNOLOGIJE EKSTRAKCIJE, OPTIMIZACIJA PARAMETARA EKSTRAKCIJE

4.1.1. Ispitivanje utjecaja veličine čestica

Veličina čestica ima značajnu ulogu u postupcima ekstrakcije pomoću ultrazvuka. Utjecaj veličine čestica na učinkovitost ekstrakcije ultrazvukom proizlazi iz faktora poput površine, prijenosa mase i učinka kavitacije. Manje veličine čestica općenito dovode do poboljšane stope ekstrakcije zbog veće površine i poboljšanog prijenosa mase, što rezultira većim prinosom željenih spojeva. Osim toga, pojava kavitacije, koju uzrokuje stvaranje i kolaps mikromjehurića potaknutih ultrazvukom, djeluje učinkovitije kod manjih čestica, pomažući u razgradnji staničnih stijenki i olakšavanju oslobađanja intracelularnih spojeva.



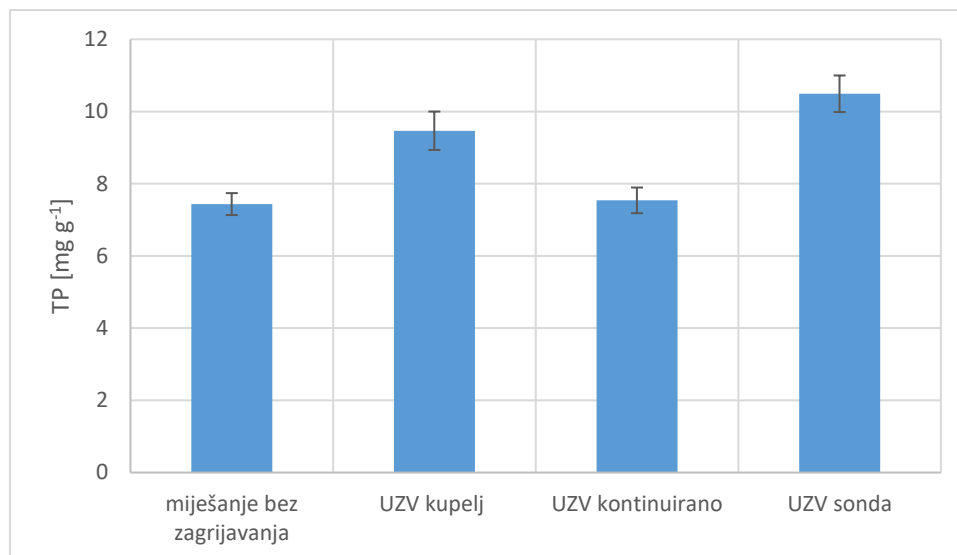
Slika 7. Ukupna koncentracija polifenola nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom tijekom 10. ciklusa

Raspon koncentracije polifenolnih spojeva dobivenih ekstrakcijom čestica veličine 283 μm je od 0,48 mg g⁻¹ do 0,90 mg g⁻¹, a raspon koncentracija dobivenih ekstrakcijom čestica veličine 465 μm je od 0,68 mg g⁻¹ do 1,10 mg g⁻¹. Optimalna veličina čestica je 283 μm.

Patrautanu i sur., (2019) također su ispitivali utjecaj veličine čestica na koncentraciju ukupnih polifenola dobivenu ekstrakcijom kore smreke. Raspon ispitivanih veličina čestica je od 0,25-0,315 mm do 0,63 mm. Dokazano je da su više koncentracije ukupnih polifenola dobivene ekstrakcijom čestica manjih promjera.

4.1.2. Ispitivanje utjecaja sonde i načina vođenja procesa na učinak ekstrakcije

Nakon odabira optimalnog otapala, odabrana je metoda ekstrakcije. Inovativne tehnologije (UZV) razmatrane su kao sredstva za smanjenje potrošnje energije i povećanje učinkovitosti ekstrakcije (slika 8).

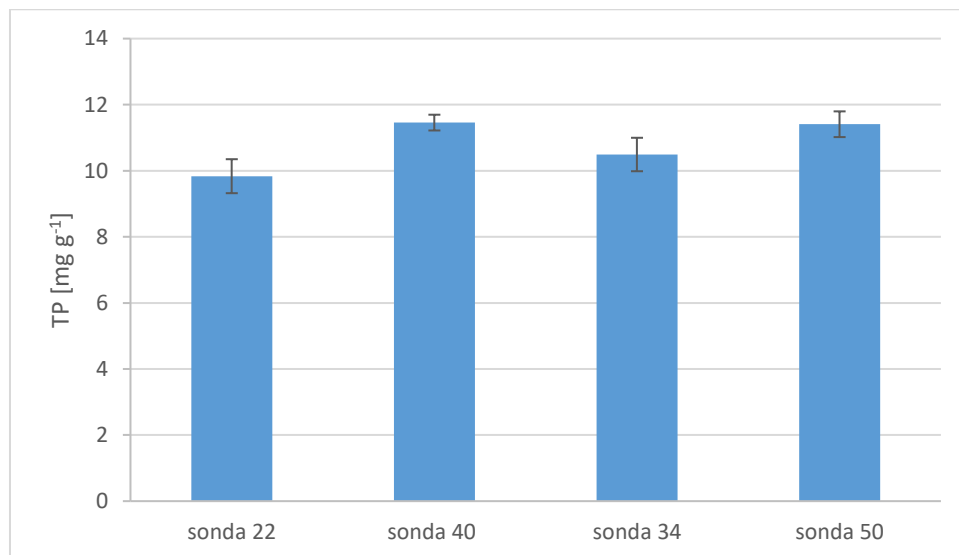


Slika 8. Učinkovitost ekstrakcije polifenola iz otpada grožđa s vodom uz različite metode ekstrakcije.

Ekstrakcije miješanjem bez zagrijavanja, u ultrazvučnoj kupelji i šaržna ekstrakcija pomoću ultrazvuka sa sondom promjera 34 mm provodile su se tijekom 15 min uz uzorkovanje svake minute. Kontinuirana ekstrakcija pomoću ultrazvuka sa sondom promjera 34 mm provodila se tijekom 30 min uz uzorkovanje svake 2 min. Ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su se provodile uz jačinu amplitude od 90 %. Prikazani rezultati (slika 8) su vrijednosti koncentracija ukupnih polifenola dobivene na kraju procesa, u 15. min za ekstrakcije miješanjem bez zagrijavanja, u ultrazvučnoj kupelji i šaržnim postupkom uz sondu promjera 34 mm, odnosno u 30. minuti za kontinuiranu ekstrakciju uz sondu promjera 34 mm. Sadržaji polifenola su ekstrahirani sljedećim redoslijedom, od najvišeg prema najnižem, sonda 34, šaržno > UZV kupelj > sonda 34, kontinuirano > miješanje bez zagrijavanja (slika 8). Stoga je zračenje UZV odabrano kao metoda ekstrakcije.

Nekonvencionalne metode primjenjuju se u prehrambenoj industriji zbog velike učinkovitosti i uštede energije. UZV omogućava ekstrakciju ciljane komponente uglavnom kroz fenomen kavitacije (Leonelli i Mason, 2010). Da Porto i sur., (2013) usporedili su prinose ulja i polifenola iz sjemenki grožđa Soxhletovom ekstrakcijom i UZV ekstrakcijom. Prinos ulja UZV ekstrakcijom pri 20 kHz, 150 W, tijekom 30 min, sličan je prinosu ekstrakcije po Soxhletu koja se provodila 6 sati. Saini i sur., (2019) u svom radu, dokazali su učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u odnosu na postupak maceracije. UZV ekstrakcijom postignuta je maksimalna koncentracija fenolnih spojeva od 28,30 mg g⁻¹ iz kore mandarine i 21,79 mg g⁻¹ iz

kore slatke limete. Ukupni sadržaj fenolnih spojeva primjenom maceracije iznosi 23 mg g^{-1} iz kore mandarine i 19 mg g^{-1} iz kore slatke limete.

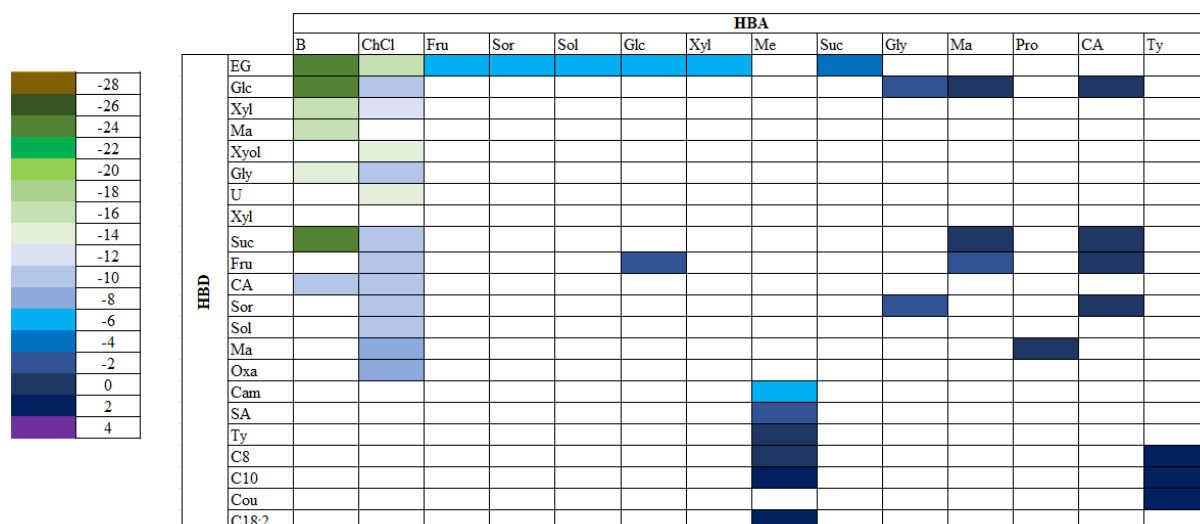


Slika 9. Učinkovitost ekstrakcije polifenola iz otpada grožđa s vodom. Ekstrakcija se provodila šaržnim postupkom uz različite promjere sonde (22 mm, 40 mm, 34 mm i 50 mm).

Ekstrakcije polifenola vodom, uz različite promjere sonde (22, 34, 40 i 50 mm), provodile su se tako da se 6 g osušene komine doda u 0,3 L vode. Jačina amplitude je 90 %. Koncentracija ukupnih polifenola pratila se tijekom 15 minuta uz uzorkovanje svake minute. Prikazana je koncentracija ukupnih polifenola u 15. minuti. Odabrana je sonda 50 kao optimalna te su za nju optimirani uvjeti ekstrakcije (poglavlje 4.2.).

4.1.3. Utjecaj otapala

U ovom radu kao ekstrakcijsko otapalo primijenjen je DES. Kako bi se odredio optimalni NADES za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa, ispitana je topljivost katehina pomoću softvera COSMOtherm. Katehin je najzastupljeniji polifenol u graševini ($21,04 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 10. Predviđene vrijednosti $\ln(\gamma)$ otopljenog katehina u NADES-ima na 60 °C pomoću COSMO-RS

**B*-betain; *ChCl*- kolin-klorid; *Fru*-fruktoza; *Sor*-sorboza; *Glc*-glukoza; *Xyl*-ksiloza; *Me*- *L*-mentol; *Suc*-saharoza; *Gly*-glicerol; *Ma*-jabučna kiselina; *Pro*-prolin; *CA*-limunska kiselina; *Ty*-timol; *Xyl*-ksilitol; *U*-urea; *Sol*-sorbitol; *Oxa*-oksalna kiselina; *Cam*-*L*-kamfor; *SA*-salicilna kiselina; *C8*- oktanska kiselina; *C10*-dekanska kiselina; *Cou*-kumarin; *C18:2*-linolna kiselina.

Nakon dobivenih rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da su najviše vrijednosti $\ln(\gamma)$ za kombinaciju NADES-a *Ty*:*C10* i *Ty*:*C8*. Visoke vrijednosti $\ln(\gamma)$ znače da katehin nije dobro topljiv u tim NADES-ima. Najniže vrijednosti $\ln(\gamma)$ dobivene su za kombinacije NADES-a *B*:*EG*, *B*:*Glc* i *B*:*Suc*.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola (mg g⁻¹ suhe mase) u pripremljenom ekstraktu. Specifični sadržaj polifenola i ukupni sadržaj polifenola izraženi su kao srednje vrijednosti (n=3) ± S.D.

Ekstrakti ¹					
Komponente	GPBGlc	GPBSuc	GPBEG	GPTyC10	GPEtOH
Ukupni polifenoli²	26,07±0,16 ^a	6,64±1,04 ^c	8,72±1,52 ^b	0,5±0,07 ^d	26,06±1,59 ^a

¹*GPBGlc*- ekstrakt komine grožđa u NADES-u *BGlc* (70 %, v/v); *GPBSuc* - ekstrakt komine grožđa u NADES-u *BScu* (70 %, v/v); *GPBEG*- ekstrakt komine grožđa u NADES-u *BSEG* (70

%, v/v); *GPTyC10*- ekstrakt komine grožđa u *NADES*-u *Ty:C10* (70 %, v/v); *GPEtOH*- ekstrakt komine grožđa u otopini etanola (70 %, v/v).

² prikazane vrijednosti iza kojih slijede različita mala slova (a-d) značajno se razlikuju ($p < 0,05$) mjerene su Tukey-ovim HSD testom.

Najveći prinos ukupnih polifenola dobiven je ekstrakcijom komine grožđa s B:Glc (26,07 mg g⁻¹ suhe mase) što je analogno prinosu ekstrakcije s etanolom, referentnim otapalom, (26,06 mg g⁻¹ suhe mase). Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da *NADES* B:Glc ima potencijal zamijeniti konvekcionalno otapalo etanol. Iako se etanol smatra zelenim otapalom, hlapljiv je i zapaljiv, te je poželjno zamijeniti ga nehlapljivim i nezapaljivim otapalom koje ima istu učinkovitost ekstrakcije. Sadržaji polifenola su ekstrahirani sljedećim redoslijedom, od najvišeg prema najnižem, B:Glc > B:EG > B:Scu > *Ty:C10*. Sadržaj ukupnih polifenola kretao se od 0,5 do 26,07 mg g⁻¹ suhe mase. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da su rezultati ln (γ) dobiveni upotrebom COSMOtherm sofvera dobri parametri za odabir *NADES*-a za ekstrakciju. Učinkovitost ekstrakcije s *Ty:C10* je najmanja, a vrijednost ln(γ) prema COSMOtherm softveru je najviša, dok je učinkovitost ekstrakcije s B:Glc najveća, a vrijednost ln (γ) je najmanja (Panić i sur., 2021).

4.2. OPTIMIZACIJA LABORATORIJSKIH PARAMETARA PROCESA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE ULTRAZVUKOM

Primijenjena je metodologija površine odgovora kako bi se optimizirale neovisne varijable – sadržaj vode u *NADES*-u, jačina amplitude, vrijeme ekstrakcije i omjer mase i otapala u smjesi betain:glukoza (BGlc) kako bi se postigao najveći utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Ove četiri neovisne varijable kodirane su na jednoj razini, što je rezultiralo eksperimentalnim dizajnom prikazanim u tablici 4.

Tablica 4. Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa

Broj eksperimenta	Faktor 1 % NADES [% w/w]	Faktor 2 A [%]	Faktor 3 t [min]	Faktor 4 Masa/otapalo [g mL⁻¹]	Odziv TP [mg g⁻¹]
1	35,00	100,00	8,50	0,02	12,47
2	35,00	100,00	8,50	0,10	8,88
3	0,00	60,00	15,00	0,06	13,87

Tablica 4. Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa- nastavak

4	35,00	60,00	15,00	0,10	8,95
5	70,00	60,00	2,00	0,06	19,14
6	35,00	20,00	8,50	0,02	11,40
7	35,00	60,00	8,50	0,06	13,52
8	35,00	20,00	2,00	0,06	16,28
9	0,00	60,00	2,00	0,06	11,00
10	35,00	100,00	2,00	0,06	8,84
11	35,00	100,00	15,00	0,06	12,19
12	70,00	20,00	8,50	0,06	20,18
13	35,00	20,00	15,00	0,06	17,89
14	35,00	60,00	2,00	0,02	11,78
15	35,00	60,00	8,50	0,06	14,34
16	35,00	60,00	15,00	0,02	16,54
17	0,00	100,00	8,50	0,06	12,22
18	35,00	60,00	8,50	0,06	15,73
19	0,00	20,00	8,50	0,06	7,61
20	35,00	20,00	8,50	0,10	10,78
21	35,00	60,00	2,00	0,10	12,55
22	0,00	60,00	8,50	0,02	14,11
23	70,00	60,00	15,00	0,06	20,94
24	70,00	60,00	8,50	0,10	12,59
25	0,00	60,00	8,50	0,10	7,86
26	70,00	60,00	8,50	0,02	14,42
27	70,00	100,00	8,50	0,06	6,64

*udio BGlc- % NADES, amplituda- A, vrijeme- t, TP-ukupni sadržaj polifenola

Prema dobivenim rezultatima, prikazanim na slici 11, vidljivo je da je najviša koncentracija ukupnih polifenola postignuta u eksperimentu 23. Primijenjen je NADES betain:glukoza (1:1) s 30 % vode. Ekstrakcija je provedena pri amplitudi 60 %, tijekom 8,5 minuta i omjeru mase i volumena 0,06. Najniža koncentracija polifenola postignuta je u

eksperimentu 27., prilikom kojeg je korišten NADES s 30 % vode, jačine amplitude 100 %, tijekom 8,5 minuta i omjerom mase i volumena 0,06.

Sadržaj ukupnih polifenola kretao se od 6,64 do 20,94 mg g⁻¹ suhe mase.

Također, RSM model je procijenjen i ANOVA je korištena kako bi se izračunala statistička značajnost kvadratnog modela, kao i regresijski koeficijenti modela za svaki odgovor, a rezultati su sažeti u tablici 5.

Tablica 5. Statistička analiza (ANOVA)

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	p-vrijednost Prob>F
Model	324.4735	14	23.17667679	5.560253391	0.0025
A-udio NADES-a	61.8348	1	61.8348	14.83461842	0.0023
B-jačina amplitude	43.73901	1	43.73900833	10.49330634	0.0071
C-vrijeme	9.702008	1	9.702008333	2.327582389	0.1530
D-masa/otapalo	30.46453	1	30.46453333	7.308663202	0.0192
AB	82.355625	1	82.355625	19.75771364	0.0008
AC	0.286225	1	0.286225	0.06866746	0.7977
AD	4.8841	1	4.8841	1.171731126	0.3003
BC	0.7569	1	0.7569	0.181585817	0.6776
BD	2.2201	1	2.2201	0.532618143	0.4795
CD	17.4724	1	17.4724	4.191755886	0.0632
A²	0.028033	1	0.028033333	0.006725401	0.9360
B²	20.77701	1	20.77700833	4.984555469	0.0454
C²	6.468008333	1	6.468008333	1.551722259	0.2367
D²	29.5788	1	29.5788	7.096169331	0.0206
Ostatak	50.01933	12	4.168277083		
Nedostatak modela	47.523125	10	4.7523125	3.807637609	0.2258
Pogreška	2.4962	2	1.2481		
Ukupno	374.4928	26			

**suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti, stupnjevi slobode-df, varijanca-MS*

Jednadžba:

$$\text{TPC} = 14,53 + 2,27 \cdot A - 1,90917 \cdot B + 0,899167 \cdot C - 1,59333 \cdot D - 4,5375 \cdot AB - 0,2675 \cdot AC + 1,105 \cdot AD + 0,435 \cdot BC - 0,745 \cdot BD - 2,09 \cdot CD - 0,0725 \cdot A^2 - 1,97375 \cdot B^2 + 1,10125 \cdot C^2 - 2,355 \cdot D^2$$

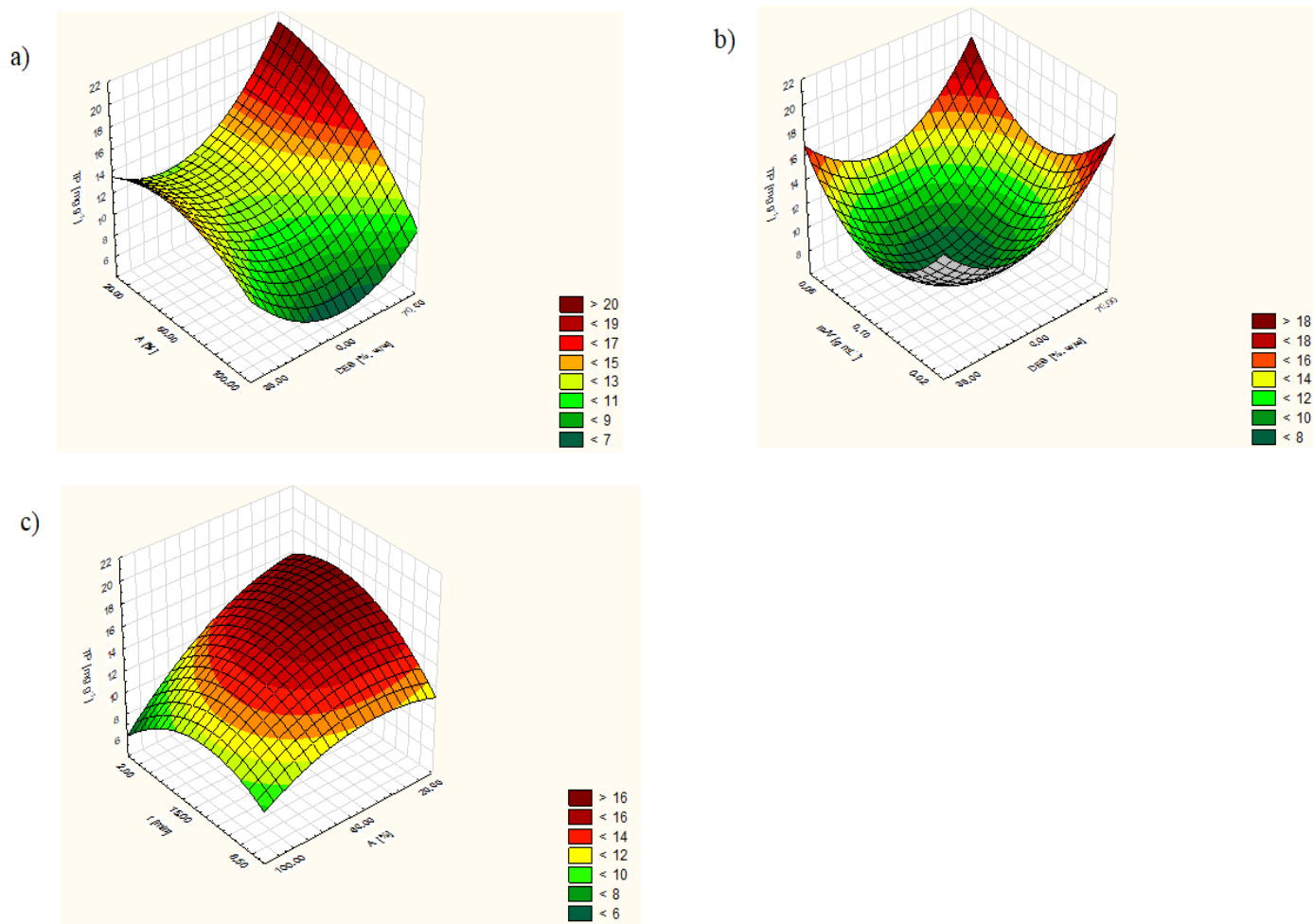
* ukupni sadržaj polifenola-TPC, udio NADES-a - A, jačina amplitude-B, vrijeme-C, masa/otapalo-D

Određeni optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa pomoću NADES-a betain:glukoza (1:1) su: udio NADES-a 70 %, jačina amplitude od 28,13 %, vrijeme ekstrakcije 13,21 min i omjer mase i otapala iznosi 0,04. Dobivena koncentracija ukupnih polifenola nakon ekstrakcije pri optimalnim uvjetima iznosi 21,6 mg g⁻¹.

Slično, prema istraživanju Bosiljkov i sur. (2017) NADES, ChMa (kolin-klorid:jabučna kiselina), se pokazao kao prigodno otapalo za ekstrakciju antocijana iz vinskog taloga. Optimalno vrijeme ekstrakcije iznosi 30,6 min. Optimalna snaga ultrazvuka iznosi 341,5 W, a optimalni udio vode u NADES-u iznosi 35,4 % (v/v). Kao optimalno otapalo za ekstrakciju polifenola iz pokožice grožđa, prema Cvjetko Bubalo i sur. (2016), odabran je NADES ChOa (kolin-klorid: oksalna kiselina) sa 25 % vode. Pri uvjetima u ovom radu, smanjeno je vrijeme optimalne ekstrakcije na 13,21 min, dok je optimalan udio vode u optimalnom NADES-u 30 % (w/w) kao i u gore prikazanim istraživanjima.

4.3. 3 D DIJAGRAMI

Prikupljeni eksperimentalni podaci primijenjeni su za izradu trodimenzionalnih dijagrama odzivne površine za prinos ukupnih polifenola (TP) u ovisnosti o udjelu NADES-a, vremenu, jačini amplitude i omjeru mase i otapala.



Slika 11. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih polifenola (TP) u ovisnosti o: a) jačini amplitude (A) i postotku NADES-a BGlc (DES); b) omjeru mase i volumena (m/V) i postotku NADES-a BGlc (DES); c) vremenu (t) i jačini amplitude (A)

3D dijagrami odzivne površine omogućuju nam vizualni prikaz parametara koji značajno utječu na prinos ukupnih polifenola. Prema dijagramima prikazanim na slici 11 vidljivo je da koncentracija ukupnih polifenola raste s povećanjem udjela NADES-a u otapalu. Najviše koncentracije su postignute pri udjelu NADES-a od 70 %, a najmanje su postignute kada se ekstrakcija provodila vodom. Na prinos ukupnih polifenola imaju utjecaja i vrijeme ekstrakcije, jačina amplitude te omjer mase i volumena. Prinos ukupnih polifenola raste smanjenjem jačine amplitude te smanjenjem omjera mase i volumena. Vrijeme trajanja ekstrakcije nema značajan utjecaj na ekstrakciju polifenola.

Prema istraživanju Jovanović i sur. (2017) koncentracija ukupnih polifenola, dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom poljskog timijana, raste smanjenjem omjera mase i volumena, a vrijeme nema značajan utjecaj na promjenu koncentracije. Oroian i sur. (2020) ispitali su

utjecaj vremena i jačine amplitude na ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz propolisa. Porastom amplitude, od 20 % do 100 %, koncentracija ukupnih polifenola porasla je za 17,5 %. Također, i u ovom radu, vrijeme nije imalo značajan utjecaj na ekstrakciju polifenola. Prema istraživanju Jaeschke i sur. (2017) viša koncentracija ekstrahiranih karotenoida dobivena je pri nižoj amplitudi, 50 %, u odnosu na koncentraciju dobivenu pri amplitudi od 100 %. Mitar i sur. (2019) u svom radu, ispitali su utjecaj vode na ekstrakciju polifenola. Provedena je ekstrakcija polifenola iz NADES-a, jabučna kiselina:fruktoza:glicerol, s 20 %, 30 %, 50 % i 70% vode te ekstrakcija iz čiste vode. Najveća koncentracija ekstrahiranih polifenola dobivena je ekstrakcijom NADES-a s manjim udjelom vode, odnosno s udjelom vode od 30 %.

5. ZAKLJUČAK

1. Uz optimalne uvjete određene modelom postignuta je uspješna ultrazvučna ekstrakcija polifenola iz komine grožđa uz primjenu NADES-a betain:glukoza.
2. Usporedbom rezultata dobivenih ekstrakcijom miješanjem bez zagrijavanja i ekstrakcijom potpomognutoj ultrazvukom dokazana je veća učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.
3. Veće koncentracije polifenolnih spojeva dobivene su šaržnom ultrazvučnom ekstrakcijom u odnosu na rezultate dobivene kontinuiranom ultrazvučnom ekstrakcijom.
4. Optimalni uvjeti za ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz komine grožđa su: udio NADES-a 70 %, jačina amplitude od 28,13 %, vrijeme ekstrakcije 13,21 min i omjer mase i otapala iznosi 0,04. Dobivena koncentracija ukupnih polifenola nakon ekstrakcije pri optimalnim uvjetima iznosi 21,6 mg g⁻¹.

6. LITERATURA

Abd El-Ghany WA, & Babazadeh D (2022) Betaine: A potential nutritional metabolite in the poultry industry. *Animals*, **12**(19), 2624. <https://doi.org/10.3390/ani12192624>

Antonić B, Jančíková, S Dordević, D, Tremlová B (2020) Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods*, **9**(11), 1627 <https://doi.org/10.3390/foods9111627>

Antoniolli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R (2015) Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem* **178**, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>

Arumugam, MK, Paal, MC, Donohue Jr, TM, Ganesan, M, Osna, NA, & Kharbanda, KK (2021) Beneficial effects of betaine: A comprehensive review. *Biology* **10**(6), 456. <https://doi.org/10.3390/biology10060456>

Bizzi, CA, Santos, D, Iop, GD, & Flores, EM (2021) Biomass Processing Assisted by Ultrasound. *Biomass Valorization: Sustainable Methods for the Production of Chemicals*, 315–341.

Blekić, M, Režek Jambrak A, & Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *J Food Sci Technol* **3**(1), 32-47.

Bosiljkov T, Dujmić F, Cvjetko Bubalo M, Hribar J, Vidrih R, Brnčić M, Jokić S (2017) Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod Process* **102**, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005>

Brnčić M, Tripalo, B, Penava A, Karlović D, Ježek D, Topić DV, Bosiljkov T (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4** (1-2), 32-37. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/49942>

Carreira-Casais A, Lourenço-Lopes C, Otero P, Carpena Rodriguez M, Gonzalez Pereira A, Echave J, i sur. (2022) Application of Green Extraction Techniques for Natural Additives Production. In: *Natural Food Additives*. IntechOpen

Castro-Puyana M, Marina ML, Plaza M (2017) Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Curr Opin Green Sustain Chem*. **5**, 31-36. <https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2017.03.009>

- Chajra H, Salwinski A, Guillaumin A, Mignard B, Hannewald P, Durriot L. Bourgaud, F. i sur. (2020) Plant milking technology—an innovative and sustainable process to produce highly active extracts from plant roots. *Molecules*, **25**. <https://doi.org/10.3390/molecules25184162>
- Chemat F, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Strube J, Uhlenbrock L, Gunjevic V, Cravotto G (2019) Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *Trends Anall Chem* **118**, 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci* **13**(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Cvjetko Bubalo M, Ćurko N, Tomašević M, Kovačević Ganić K, Radojčić Redovniković I (2016) *Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. Food Chem* **200**, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biot* **90**, 1631-1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* **109**, 52-73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- Da Porto C, Porretto E, Decorti, D (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*, **20**(4), 1076-1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- Flores EM, Cravotto G, Bizzi CA, Santos D, Iop GD (2021) Ultrasound-assisted biomass valorization to industrial interesting products: state-of-the-art, perspectives and challenges. *Ultras. Sonochem.* **72** <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105455>
- Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein J M, Sangoro JR (2021) Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chem Rev.* **121**(3), 1232-1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
- Jaeschke DP, Rech R, Marczak LDF, Mercali GD (2017) Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresour Technol* **224**, 753-757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.107>

Jokić S, Aladić K, Šubarić D (2017) Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Godišnjak Akademije tehničkih znanosti Hrvatske*, **2017**(1), 247-258.

Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, Bugarski BM (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Sep Purif Technol* **179**, 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>

Khadhraoui B, Fabiano-Tixier AS, Robinet P, Imbert R, Chemat F (2019) Ultrasound technology for food processing, preservation, and extraction. *Green Food Processing Techniques*, 23–56.

Leonelli C, Mason TJ (2010) Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chem Eng Process: Process Intensif* **49**(9), 885-900. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.05.006>

Makris DP, Lalas S (2020) Glycerol and glycerol-based deep eutectic mixtures as emerging green solvents for polyphenol extraction: The evidence so far. *Molecules*, **25**(24), 5842. <https://doi.org/10.3390/molecules25245842>

Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R, Choi YH (2020) The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**(15), 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Mitar A, Kučić Grgić D, Prlić Kardum J (2019) Ekstrakcija i ispitivanje stabilnosti polifenola komine masline u prirodnim eutektičkim otapalima. *Kem Ind* **68**, 407-414. <https://doi.org/10.15255/kui.2019.039>

Ong VZ, Wu TY (2020) An application of ultrasonication in lignocellulosic biomass valorisation into bio-energy and bio-based products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **132**, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109924>

Oroian M, Ursachi F, Dranca F (2020) Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrason. Sonochem.* **64**, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105021>

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL (2014) Natural deep eutectic solvents solvents for 21st century. *ACS Sustain Chem Eng.* **2**, 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>

Panić M, Drakula S, Cravotto G, Verpoorte R, Hruškar M, Radojčić Redovniković I, Radošević K (2020) Biological activity and sensory evaluation of cocoa by-products NADES extracts used in food fortification. *Innov Food Sci Emerg Technol* **66**, 102514. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102514>

Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Redovniković IR (2021) Cosmotherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready-to-use extracts from Graševina grape pomace. *Molecules*, **26**(16) <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Patrauanu OA, Lazar L, Popa VI, Volf I(2019) Influence of particle size and size distribution on kinetic mechanism of spruce bark polyphenols extraction. *Cellul Chem Technol*, **53** (1-2), 71-78.

Pejković P (2016) *Paklitaksel-od biljke do lijeka*. Specijalistički rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.

Picot-Allain C, Mahomoodally MF, Ak G, Zengin G (2021) Conventional versus green extraction techniques—A comparative perspective. *Curr Opin Food Sci* **40**, 144-156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>

Raj B, John S, Chandrakala V, Kumari GH (2022) Green Extraction Techniques for Phytoconstituents from Natural Products. *Medicinal Plants*.

Rente D, Bubalo MC, Panić M, Paiva A, Caprin B, Redovniković IR, Duarte ARC(2022). Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. *J Clean Prod* **380** <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135147>

Saini A, Panesar PS, Bera MB (2019) Comparative Study on the Extraction and Quantification of Polyphenols from Citrus Peels using Maceration and Ultrasonic Technique. *Curr Res Nutr Food Sci* **7**(3). <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.3.08>

Sander A (2012) Ionske kapljevine u službi zelene kemije. *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, **33**(3-4), 127-129.

Santana-Mayor Á, Rodríguez-Ramos R, Herrera-Herrera AV, Socas-Rodríguez B, Rodríguez-Delgado MÁ (2021) Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry. *TrAC*, **134** <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Sousa EC, Uchôa-Thomaz AMA, Carioca JOB, Morais SMD, Lima AD, Martins CG, Rodrigues LL (2014) Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Sci Technol* **34**, 135-142. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100020>

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC*, **71**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Torre E, Iviglia G, Cassinelli C, Morra M, Russo N (2020) Polyphenols from grape pomace induce osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.*, **45**(6), 1721-1734. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4556>

Virot M, Tomao V, Ginies C, Visinoni F, Chemat F (2008) Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J Chromatogr A* **1196-1997**, 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.035>

Wittenauer J, Mäckle S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R (2015) *Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity.* *Fitoterapia*, **101**, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.005>

Yu D, Xue Z, Mu T (2022) Deep eutectic solvents as a green toolbox for synthesis. *Cell Rep Phys Sci* **3** <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2022.100809>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANAMARIJA MLINAC 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.

Vlastoručni potpis