

Karakterizacija pektinskih biofilmova obogaćenih polifenolnim ekstraktima izoliranim iz otpada espresso kave

Ban, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:033656>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Ban

7316/BT

**KARAKTERIZACIJA PEKTINSKIH BIOFILMOVA OBOGAĆENIH POLIFENOLNIM
EKSTRAKTIMA IZOLIRANIM IZ OTPADA ESPRESSO KAVE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

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

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Karakterizacija pektinskih biofilmova obogaćenih polifenolnim ekstraktima izoliranim iz otpada espresso kave

Lucija Ban, 0058209314

Sažetak: U ovom radu je određen sadržaj fenola i flavonoida u uzorcima espresso kave i otpada, jeftinog i ekološki prihvatljivog biosupstrata, zaostalog nakon njene pripreme. Spektrofotometrijskom analizom je pokazano da espresso kava sadrži 225 do 298 mg g⁻¹, a otpad 10 do 24 mg g⁻¹ ukupnih fenola. Utvrđeno je da početna odvaga otpada od 1,5 g, volumni udio etanola od 70 % i vrijeme od 60 minuta pogoduju njihovoj učinkovitoj ekstrakciji, pa su navedeni parametri upotrebljeni pri pripremi ekstrakata (5, 10 i 20 %) inkorporiranih u pektinske biofilmove.

Karakterizacijom boje biofilmova utvrđeno je da uzorci sa inkorporiranim ekstraktima otpada kave jesu tamniji od standarda (1 i 2 % pektin), dok je analizom teksuralnih svojstava pokazano da biofilm priređen otapanjem 2 %-tnog pektina u 20 %-tnom etanolnom ekstraktu otpada kave ima najveću čvrstoću.

Ključne riječi: *biofilmovi, otpad espresso kave, pektin, polifenoli*

Rad sadrži: 35 stranica, 7 slika, 11 tablica, 31 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory of Analitical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Characterization of pectin biofilms enriched with polyphenolic extracts isolated from
espresso coffee waste**

Lucija Ban, 0058209314

Abstract: In this work the content of phenols and flavonoids is determined in the samples of espresso coffee and waste, as a cheap and environmentally acceptable bio-substrate, which was remained after coffee preparation. Spectrophotometric analysis showed that espresso coffee contained 225 to 298 mg g⁻¹, and waste 10 to 24 mg g⁻¹ of total phenols. It has been found that the initial weigh of waste of 1,5 g, 70 % volume fraction of ethanol and time of 60 min provided their efficient extraction, therefore the mentioned parameters have been used for preparation of extracts (5, 10 and 20 %) incorporated in pectin biofilms.

By characterization of biofilms color is found that samples with incorporated waste extracts are darker than standard samples (1 and 2 % pectin), while analysis of textural properties showed that biofilm prepared by dissolving of 2 % pectin in 20 % of ethanol extract has the maximum strength.

Key words: *biofilms, espresso coffee waste, pectin, polyphenols*

Thesis contains: 35 pages, 7 figures, 11 tables, 31 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Defence date:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kava i otpad nastao konzumiranjem kave	2
2.1.1. Kemijski sastav kave	3
2.1.2. Kemijski sastav otpada kave	4
2.2. Fenolni spojevi.....	5
2.2.1. Fenolne kiseline.....	5
2.2.2. Flavonoidi	5
2.3. UV/Vis spektrofotometrija	6
2.4. Pektin	7
2.5. Biofilmovi	8
2.6. Kolorimetrija.....	9
2.7. Teksturna svojstva	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijal.....	11
3.2. Kemikalije	11
3.3. Aparatura i pribor	11
3.4. Metode rada	12
3.4.1. Ekstrakcije polifenola iz espresso kave i taloga refluksiranjem	12
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	13
3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola.....	14
3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline.....	14
3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola (unijeti ovo poglavlje u sadržaj).....	14
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.....	15
3.4.3.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih flavonoida.....	15
3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina.....	15
3.4.3.3. Postupak određivanja ukupnih flavonoida	16
3.4.4. Priprema biofilmova na bazi pektina sa i bez refluksiranog ekstrakta otpada espresso kave.....	17
3.4.5. Kolorimetrija	18
3.4.6. Određivanje teksture biofilmova	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	20
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	23

4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave namijenjenim za izradu biofilmova	28
4.4. Karakterizacija biofilmova	29
4.4.1. Određivanje parametara boje	29
4.4.2. Određivanje teksture biofilmova	30
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33

1. UVOD

Kava je jedna od najviše konzumiranih napitaka u svijetu, a čvrsti ostatak zaostao tijekom njene proizvodnje je glavni otpad u industriji kave, s godišnjim iznosom od 6 milijuna tona (Mussato i sur., 2011a). Uzevši u obzir ogromne količine otpada proizvedene diljem svijeta, ponovno korištenje tog materijala postaje sve češća tema različitih znanstvenih istraživanja. Iako su provedena neka od ispitivanja ponovnog korištenja otpada kave, niti jedna analiza nije službeno uvedena te većina otpada ostaje neupotrijebljena (Mussato i sur., 2011a).

Najznačajnija komponenta zrna kave je kafein, a može naći u rasponu od 0,8 do 1,4 %. Međutim zrno kave je građeno i od drugih komponenti kao što su celuloza, minerali, šećeri, lipidi, tanini i polifenoli. Zrno kave još sadrži vitamine B skupine te klorogensku kiselinu u rasponu od 7 do 12 %. Priprema espresso kave vodi do promjene kemijskog sastava kave. Tako espresso kava sadrži do 160 mg lipida, dok udio kafeina varira ovisno o korištenom procesu pripreme (Mussato i sur., 2011b).

Otpad kave sadrži organske komponente (masne kiseline, lignin, celulozu, itd.), bogat je šećerima osobito hemicelulozom, mineralima i aminokiselinama (Pujol i sur., 2013). Zbog važnosti različitih kemijskih spojeva prisutnih u otpadu kave, njihova izolacija i primjena zauzima značajno mjesto u podizanju vrijednosti tog alternativnog agro-industrijskog biosupstrata.

Budući da se u današnje vrijeme sve veći broj istraživanja bavi zbrinjavanjem različitih nusproizvoda prehrambene industrije radi izolacije visokovrijednih funkcionalnih sastojaka kao i razvojem novih materijala, biofilmova koji bi zaštitili hranu, osnovni cilj ovog rada bio je:

- provesti ekstrakciju espresso kave i otpada nastalog njenim konzumiranjem
- dobivene ekstrakte otpada (taloga) upotrijebiti kod izrade biofilmova na bazi pektina
- provesti analizu boje i teksture pripremljenih biofilmova.

Korištenjem ekološki prihvatljivih bio-materijala poput pektina sa inkorporiranim fenolnim ekstraktima otpada espresso kave dobio bi se uvid o mogućoj primjeni otpada kave kao jeftinog biosupstrata ne samo pri zaštiti određene namirnice, već i poboljšanju njene kvalitete i funkcionalnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kava i otpad nastao konzumiranjem kave

Kava se konzumira više od 1000 godina i danas je najkonzumiranije piće u svijetu, s više od 400 milijardi ispijenih šalica godišnje (Slika 1). Kava, kakvu konzumiramo danas, prvi put je pripremljena u 16. stoljeću u Perziji (Mussatto i sur., 2011b). Prema ICO (International Coffee Organization) najveći svjetski proizvođač kave je Brazil (Tablica 1).

Tablica 1. Svjetska proizvodnja kave u tisućama vreća od 60 kg (ICO).

Godina žetve	2013./14.	2014./15.	2015./16.	2016./17.	2017./18.
Brazil	54.698	52.299	52.426	56.764	51.000
Indonezija	12.818	10.862	12.535	11.491	10.902
Peru	4.106	2.883	3.304	4.223	4.280
Kolumbija	12.163	13.339	14.009	14.634	14.000
Etiopija	6.427	6.575	6.714	7.297	7.650
Honduras	4.583	5.268	5.786	7.457	8.349
Indija	5.075	5.450	5.800	5.200	5.840
Meksiko	3.916	3.591	2.903	3.781	4.000
Uganda	3.633	3.744	3.650	4.962	5.100
Vijetnam	27.610	26.500	28.737	25.540	29.500
Ukupno	154.066	148.559	153.561	159.047	158.560

Stablo ili grm kave pripada porodici *Rubiaceae*. Zrna kave proizvode se od biljke *Coffea* L., kojoj pripada više od 70 vrsta (Mussatto i sur., 2011b; Farah, 2012). Međutim, samo dvije vrste pokazuju veliku komercijalnu važnost. To su *Coffea Arabica* (Arabika) i *Coffea Canephora* (Robusta) (Mussatto i sur., 2011b; Perez-Hernandez i sur., 2012; Farah 2012.). Arabika se smatra najplemenitijom od svih biljaka kave i ona čini 75 % svjetske proizvodnje, dok se Robusta smatra kiselom vrstom i čini 25 % svjetske proizvodnje (Mussatto i sur., 2011b).

S obzirom na metaboličku i fiziološku aktivnost, kava je poznata po svojim imunostimulativnim svojstvima, čime aktivira živčani sustav, poboljšava percepciju te smanjuje umor. Većina tih svojstava se povezuje s kofeinom (Perez-Hernandez i sur., 2012).

Poznato je da kava ima antioksidacijska svojstva koja imaju ulogu u prevenciji dijabetesa, arterioskleroze, mentalnih bolesti i karcinoma. Izvori oksidacijske aktivnosti u kavi su fenolne komponente, prvenstveno klorogenska kiselina (Perez-Hernandez i sur., 2012).



Slika 1. Napitak od kave (Anonimus 1).

Velika svjetska proizvodnja i konzumacija kave vodi do nakupljanja velike količine otpada. Tako, za svaku tonu proizvedene kave zaostaje 4,5 tona otpada sa otprilike 80 % vlage (Andrade i sur., 2012).

Dakle, industrija kave je odgovorna za stvaranje znatnih količina otpada, koji ukoliko su odbačeni u okoliš predstavljaju moguću opasnost od zagađenja (Iriondo-DeHond i sur., 2019).

Unatoč velikim količinama otpada, samo je mali postotak iskorišten, ponajprije zbog nedostatka znanja vezanih za energetske potencijal otpada te zbog nedostatka primjerene opreme za daljnje iskorištenje i primjenu (Andrade i sur., 2012). Stoga, budućnost proizvodnje kave (Iriondo-DeHond i sur. 2019), a time i stvaranja kvalitetna otpada ovisi o poboljšanju uvjeta uzgoja, reciklacije pakirnog materijala, redukcija emisije, razvoja ekološki prihvatljivih postrojenja i osmišljanje novih proizvoda od kave.

2.1.1. Kemijski sastav kave

Kemijski sastav zelene kave prvenstveno ovisi o genetičkim aspektima, osobito o vrstama te o fiziološkim čimbenicima, kao što je stupanj dozrelosti. (Farah, 2012). Također, u manjoj mjeri, na kemijski sastav utječu i vanjski čimbenici, kao sastav tla, klima, uvjeti skladištenja te način uzgoja (Farah, 2012).

Zelena kava se sastoji od vode, ugljikohidrata i vlakana, proteina i slobodnih aminokiselina, masti, minerala, organskih kiselina, klorogenih kiselina, trigonelina i kofeina (Farah, 2012).

Najpoznatija komponenta zrna kave je kofein. Kofein je metilksantin sa gorkim karakteristikama (Farah, 2012). U sirovoj kavi, vrste Arabika, udio kofeina je od 0,8 do 1,4 % dok je kod vrste Robusta u rasponu od 1,7 do 4,0 % (Mussatto i sur., 2011a).

Od minerala nađeni su kalcij, magnezij, kalij, natrij, željezo, mangan, cink, bakar, stroncij, krom, vanadij, barij, molibden, titan i kadmij (Mussatto i sur., 2011a). Od šećera prisutni su saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza i manoza (Mussatto i sur., 2011a), a od aminokiselina alanin, arginin, asparagin, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin i valin (Mussatto i sur., 2011a). Osim navedenih spojeva, zrna kave sadrže i vitamine B kompleksa, u omjerima koji mogu varirati od 7 do 12 % (Mussatto i sur., 2011a).

Od kemijskih spojeva prisutnih u sastavu kave, jedino je kofein termostabilan te se ne može razgraditi prženjem zrna kave. Ostali spojevi, poput šećera, proteina, klorogenske kiseline i masti podliježu razgradnji, te istovremenom prevođenju u reaktivne spojeve (Mussatto i sur., 2011a).

2.1.2. Kemijski sastav otpada kave

Otpad kave sadrži veliku količinu organskih komponenti kao što su masne kiseline, lignin, celuloza, hemiceluloza i drugi polisaharidi. Otpad je bogat šećerima (manoza, galaktoza, glukoza i arabinoza), polimeriziranima u celulozu i hemicelulozu (45,3 %, masa suhe tvari), mananima i proteinima (12,6 %) (Mussatto i sur., 2011a).

Otpad sadrži kalij, fosfor i magnezij, te aspartatnu i glutaminsku kiselinu, serin, histidin, glicin, treonin, alanin, arginin, tirozin, cistein, valin, metionin, fenilalanin, izoleucin, leucin, lizin i prolin (Mussatto i sur., 2011a).

Uzorci otpada, ocjeđeni i osušeni nakon ekstrakcije kave imaju i visoku koncentraciju ugljika (> od 58 %), te nisku koncentraciju dušika (2 %) i pepela (1 %) (Pujol i sur., 2013).

Također, otpad je pogodna sirovina za proizvodnju biogoriva, a može se koristiti kao prekursor za proizvodnju aktivnog ugljena i kao kompost (Pujol i sur., 2013).

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi široko rasprostranjeni u biljkama smatraju se njenim prirodnim obrambenim sustavom od ultravioletnog zračenja, te napada patogena (Farah i sur., 2006). U nešto višim koncentracijama nađeni su u listovima i zelenim stabljikama, a njihova koncentracija ovisi o fiziološkim svojstvima biljke, okolišnim čimbenicima, geografskom položaju, genetskim faktorima i evoluciji (Martins i sur., 2011).

Nekoliko tisuća fenolnih spojeva može se razvrstati u različite skupine, na temelju njihove osnovne kemijske strukture, te u različite podskupine, na temelju specifičnih supstitucija u osnovnoj strukturi (Farah i sur., 2006).

Zahvaljujući svojoj antioksidacijskoj aktivnosti, fenolni spojevi imaju djelotvorna ljekovita svojstva, a njihovo zaštitno djelovanje na ljudski organizam je zapaženo u slučajevima kroničnih bolesti, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti. Fenolni spojevi pokazuju još i hipoglikemijsko, antiviralno i antispazmatično djelovanje (Farah i sur., 2006).

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne skupine:

- Derivati hidroksicimetne kiseline
- Derivati hidroksibenzojeve kiseline

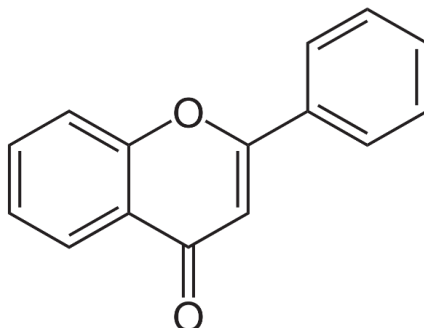
Derivati hidroksicimetne kiseline se rijetko nalaze u slobodnom obliku, uglavnom dolaze u različitim konjugiranim oblicima i kao esteri. Najvažnije hidroksicimetne kiseline su *p* - kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapinska kiselina.

Derivati hidroksibenzojeve kiseline nastaju direktno iz benzojeve kiseline i nalaze se uglavnom u slobodnom obliku, ali se povezuju i s konjugiranim šećerima i organskim kiselinama. Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska i elaginska (Bravo i sur., 1998).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su velika skupina spojeva, prisutnih u biljkama, koji se uglavnom pojavljuju kao glikozidi. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida (Kazazić, 2004). Osnovna

struktura flavonoida je fenilbenzopiranska (Slika 2) koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana s tri ugljikova atoma, koji sa kisikom tvore heterocikličku strukturu (Rice-Evans i sur., 1997).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Anonimus 2).

Flavonoide možemo podijeliti u nekoliko skupina, a čine ih flavonoli, flavoni, flavanoli, izoflavoni. Navedeni spojevi često se pojavljuju kao glikozidi. Glikozilacija čini molekulu manje reaktivnom u odnosu na slobodne radikale te topljivijom u vodi (Rice-Evans i sur., 1997).

Flavonoidi se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Flavonoidima se pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane (Kazazić, 2004).

2.3. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je tehnika koja se temelji na apsorpcij elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) dijelu spektra. Koristi se pri identifikaciji i određivanju različitih organskih i anorganskih kemijskih vrsta koje apsorbiraju ili emitiraju elektromagnetsko zračenje u UV/Vis području. Ultraljubičasto zračenje se nalazi u području valnih duljina od 200 do 400 nm, a vidljivo od 400 do 800 nm.

Tijekom izlaganja tvari UV/Vis elektromagnetskom zračenju dolazi do pobuđivanja elektrona, odnosno prelaska elektrona u više energetske stanje. Elektroni koji su sposobni apsorbirati elektromagnetsko zračenje i prijeći u pobuđeno stanje nazivaju se nevezni ili π -elektroni, a karakteristični su za nezasićene sustave i konjugirane molekule.

Odnos između apsorbiranog elektromagnetnog zračenja i koncentracije analizirane vrste definira se Lambert-Beerovim zakonom (1), koji predstavlja temelj spektrofotometrijske kvantitativne analize,

$$A = \log_{10} (I_0/I) = \varepsilon b c \quad (1)$$

pri čemu I_0 i I predstavljaju intenzitete ulazne, odnosno izlazne zrake, A apsorbanciju, ε molarni apsorpcijski koeficijent, b debljinu sloja, a c množinsku koncentraciju analita.

Analiza se provodi spektrofotometrom koji se sastoji od izvora zračenja, selektora valnih duljina (filteri, monokromatori), držača uzoraka, detektora, sustav za obradu i prikaz podataka (Penner, 2010).

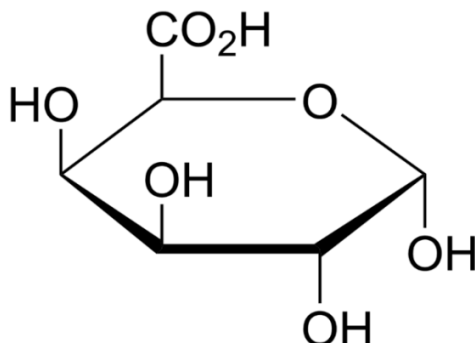
2.4. Pektin

Pektin je važan strukturni dio staničnih stjenki gotovo svih biljaka i vjerojatno najkompleksnija makromolekula u prirodi (Willats i sur., 2006; Voragen i sur., 2009). Ekstrahirani pektin je rasprostranjen kao sastojak funkcionalne hrane te se godišnja potrošnja pektina, kao sastojka hrane, procjenjuje na 45 milijuna kilograma, na svjetskoj razini. Riječ pektin potječe od grčke riječi „pektikos“ koja znači očvrnuti, smrznuti se. U prehrambenoj industriji pektin je prvenstveno poznat kao gelirajući agens i koristi se u proizvodnji džema, želea, voćnih sokova, bombona i pekarskih punjenja. Također, pektin se u velikoj mjeri upotrebljava za stabilizaciju jogurta i mliječnih proizvoda. Trenutno, najveći izvori ekstrahiranog pektina su kora naranče i limuna te trop jabuke, dok ostali potencijalni izvori ostaju neiskorišteni zbog nepoželjnih strukturalnih svojstava (Willats i sur., 2006).

Pektin ima važnu ulogu u obrambenom mehanizmu biljaka, gdje štiti biljke od patogena i ranjavanja. Kao sastavni dio biljnih staničnih stijenki i zbog svoje anionske prirode, pektični polisaharidi su uključeni u regulaciju ionskog transporta, poroznosti stijenki i na taj način kontroliraju permeabilnost stanične stijenke za enzime (Voragen i sur., 2009).

Glavna strukturalna komponenta pektina je α -(1,4)-D-galakturonska kiselina (Slika 3). D-galakturonska kiselina može biti djelomično metil i acetil esterificirana na C6-položaju. Ovisno o stupnju esterifikacije mijenjaju se i funkcionalna svojstva pektina. Postoje tri glavne skupine pektina: homogalakturon, ramnogalakturon I te ramnogalakturon II. Svaka od tih skupina

sadrži D-galakturonsku kiselinu u većoj ili manjoj mjeri. Sve tri skupine pektina međusobno su povezane kovalentnim vezama i tako formiraju pektinski matriks (Thakur i sur., 1997).



Slika 3. α -(1,4)-D-galakturonska kiselina (Anonimus 3).

2.5. Biofilmovi

Biofilmovi su definirani kao fleksibilni filmovi, pripremljeni od bioloških materijala biljnog ili životinjskog podrijetla. Čine ih polisaharidi, proteini i lipidi koji djeluju kao prepreke vanjskim elementima, a jednom otpušteni u okoliš, pretvaraju se u jednostavne spojeve koji nemaju štetan utjecaj na biosustav.

Zbog svoje raznolikosti i sastava primjenjuju se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te u medicini, a načini njihove upotrebe ovise o mehaničkim svojstvima, poput čvrstoće i elastičnosti, kao i svojstvima propusnosti (npr. vodena para) i topljivosti u vodi (Seixas i sur., 2013).

Za pripremu biofilмова može se koristiti pektin, polisaharid koji se ekstrahira iz kore agruma, te alginat, ugljikohidrat koji se ekstrahira iz raznih vrsta algi roda *Phaeophyceae*. Niski troškovi pripreme, visoka stabilnost, dobra gelirajuća svojstva, biokompatibilnost, netoksičnost te jednostavnost kemijskih ili biokemijskih modifikacija su osnovni razlozi njihove primjene (Seixas i sur., 2013).

Kod izrade biofilмова osnovnom polimernom materijalu dodaje se još i plastifikator, te sredstvo za umrežavanje. Plastifikatori služe za poboljšavanje fleksibilnosti premaza, a najčešće se koriste glicerol ili sorbitol. Sredstva za umrežavanje potrebna su za reakcije stvaranja čvrste polimerne matrice na površini supstrata, a najčešće se koristi kalcijev klorid.

Biofilmovi građeni isključivo od pektina pokazuju izrazitu topivost u vodi i slaba mehanička svojstva pa je kod njihove izrade nužan dodatak sredstva za umrežavanje kako bi se povećala kohezivnost i smanjila topljivost (Espitia i sur., 2014).

2.6. Kolorimetrija

Percepcija boje kod čovjeka ovisi o stimulaciji receptora za crvenu, zelenu i plavu komponentu. Zbog toga su potrebne tri vrijednosti kako bi se opisale sve moguće boje. Ako se zamisli da su primarne boje na osima trodimenzionalnog sustava, dobije se sustav boja.

Najrašireniji sustavi boja koji se primjenjuju su XYZ i CIE $L^*a^*b^*$ sustav. U XYZ sustavu boja primjenjuju se X, Y i Z oznake za komponente boje pri čemu X i Y označavaju koordinate boje, a Z svjetlinu. Navedenim sustavom moguće je lako definirati položaj boje unutar prostora boja, no nije moguće odrediti koliko se boje razlikuju jer prostor boja nije percepcijski jednoličan.

CIE $L^*a^*b^*$ sustav boja zasnovan je na suprotnoj teoriji boja (Anonimus 4). Funkcija svjetlina L^* daje skalu neutralne boje od crne do bijele (od 0 do 100) jedinica svjetline, a kromatičnost boje definira se u odnosu na neutralnu os koja ima vrijednost 0 kromatičnosti. CIE a^* je koordinata za crvenu-zelenu, a CIE b^* za žutu-plavu. CIE $L^*a^*b^*$ svoju primjenu pronalazi u procesnoj kontroli i kontroli kvalitete.

Moguće je izračunati i Δ (ΔL^* , Δa^* i Δb^*) vrijednosti koristeći navedeni sustav. Te vrijednosti ukazuju za koliko se neki uzorak razlikuje od standarda prema L^* , a^* ili b^* parametru. Ako je ΔL^* vrijednost pozitivna, uzorak je svjetliji od standarda, a ako je ta vrijednost negativna, uzorak je tamniji od standarda.

2.7. Teksturna svojstva

Teksturna svojstva ubrajaju se u fizikalna svojstva koja proizlaze iz strukture hrane. Mehanički utjecaj na promjenu fizikalnih svojstava hrane primjenom odgovarajuće sile tumači znanost pod nazivom reologija. Reologija nam pomaže u razumijevanju osnovnih načela i procesa mjerenja teksturnih svojstava hrane (Renfu i sur., 2004). Teksturna

svojstva uključuju niz parametara, a neki od njih su čvrstoća, tvrdoća, elastičnost i kohezivnost.

Osnovne varijable koje se koriste kod proučavanja mehaničkih deformacija hrane su sila (N), vrijeme (s) i deformacija (mm; %). Odnos sile i deformacije ovisi o vremenu. Svaki materijal koji je podvrgnut djelovanju vanjske sile mijenja položaj i oblik, a veličina promjene ovisi o unutarnjim svojstvima materijala. Postoje dva ekstrema, savršeno elastični materijali i savršeno plastični materijali. Savršeno elastični materijali su oni koji se pod utjecajem vanjske sile deformiraju, a prestankom djelovanja vanjske sile vraćaju se u prvobitan oblik. Savršeno plastični materijali su oni koji i nakon prestanka djelovanja vanjske sile zadržavaju deformirani oblik (Renfu i sur., 2004).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

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

3.2. Kemikalije

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin - Ciocalteu (FC) reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Glicerol (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Pektin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Analizator teksture TA.HDPlus (Stable Mycro System, Engleska)
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- CM - 3500d kolorimetar (Konica - Minolta, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)

- Falcon kivete za čuvanje uzoraka
- Filter papir
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25, 50 i 100 mL
- Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Staklene čaše od 50, 100 i 250 mL
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapići
- Tikvice s okruglim dnom od 250 mL
- Tikvice s ravnim dnom od 250 mL

3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su slijedeće metode:

- Ekstrakcija polifenola iz kave i njena otpada refluksiranjem
- UV/Vis spektrofotometrija pri određivanju ukupnih fenola i flavonoida iz refluksiranih ekstrakata
- Kolorimetrija, tj. određivanje boja uzoraka biofilmova
- Određivanje teksture biofilmova

3.4.1. Ekstrakcije polifenola iz espresso kave i taloga refluksiranjem

Ekstrakcija refluksiranjem provedena je na uzorcima espresso kave „Kimbo“ i talogu zaostalom nakon konzumiranja kave. U tu svrhu odvagano je 1,5 i 3 g uzorka kave i taloga u tikvicu s okruglim dnom od 250 mL. Potom je dodano 50 mL odgovarajuće vodene otopine etanola volumnog udjela 50 i 70 %. Ekstrakcija je provedena refluksiranjem u trajanju od 30 i 60 min. U Tablici 2 prikazani su upotrebljeni ekstrakcijski parametri (volumni udio etanola,

vrijeme ekstrakcije te masa espresso kave, odnosno zaostalog taloga) te pripadajuće oznake uzoraka. Nakon završene ekstrakcije uzorci su filtrirani preko grubog filter papira u Falcon kivete. Priređeni ekstrakti su čuvani u hladnjaku na +4°C.

Tablica 2. Ekstrakcijski parametri sa pripadajućim oznakama uzoraka.

Oznaka uzorka	Uzorak	m (uzorak)/g	φ (etanol)/%	t /min
1 LB	Kava	1,5	50	30
2 LB		1,5	50	60
3 LB		1,5	70	30
4 LB		1,5	70	60
5 LB		3	50	30
6 LB		3	50	60
7 LB		3	70	30
8 LB		3	70	60
9 LB	Talog	1,5	50	30
10 LB		1,5	50	60
11 LB		1,5	70	30
12 LB		1,5	70	60
13 LB		3	50	30
14 LB		3	50	60
15 LB		3	70	30
16 LB		3	70	60

3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima espresso kave i otpada dobivenog njenim konzumiranjem određen je Folin-Ciocalteu metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom, koji se sastoji od fosfomolibdenske i fosfomolibdenske kiseline. U spomenutoj reakciji dolazi do oksidacije fenola i redukcije FC reagensa do volfram i molibden oksida koji daju plavo obojenje (Singleton i sur., 1999). Intenzitet nastalog obojenja mjeri se na valnoj duljini od 760 nm.

3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$): u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 2,5 mL FC reagensa ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) i do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Otopina natrijeva karbonata (20%, w/v): odvaži se 200 g krutog natrijevog karbonata te se otopi u 800 mL vruće, ključale destilirane vode. Nakon hlađenja doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata te se sadržaj profiltrira nakon 24 h.

3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline

S ciljem izrade baždarnog dijagrama za određivanje nepoznatih masenih koncentracija ukupnih fenola u uzorcima kave i njenog otpada, pripremljene su pojedinačne standardne otopine galne kiseline. Ishodna otopina galne kiseline, koncentracije 5 g L^{-1} , pripremljena je vaganjem 0,5 g galne kiseline te njenim otapanjem u 10 mL 96 %-tnog etanola. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Pojedinačne standardne otopine galne kiseline, koncentracija 10, 30, 50, 130 i 180 mg L^{-1} , pripremljene su pipetiranjem 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 2,6, te 3,6 mL alikvota ishodne otopine u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetiran je 1 mL pojedinačne standardne otopine galne kiseline ($\gamma = 10, 30, 50, 100, 130, 180 \text{ mg L}^{-1}$), a zatim je dodano 10 mL destilirane vode i 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Nakon 5 min dodano je i 3,75 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata, a zatim je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Priređene otopine su čuvane 2 h na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu. Tako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija na 760 nm te se na temelju izmjerenih apsorbancija i poznatih masenih koncentracija standardnih otopina konstruira baždarni dijagram. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL deionizirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada (Tablica 2) s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih fenola, pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine, ali

umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzeto je 0,1 mL razrijeđenog ekstrakta „Kimbo“ kave, odnosno 0,05 mL ekstrakta njenog otpada.

Razrijeđeni ekstrakt espresso kave „Kimbo“ priređen je tako da su 2 mL ekstrakta espresso kave, dobivena postupkom refluksiranja, otpipetirana u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je zatim nadopunjena deioniziranom vodom do oznake.

Iz izmjerenih apsorbancija i poznatih masenih koncentracija standardnih otopina galne kiseline konstruira se baždarni dijagram, a zatim se iz dobivene jednadžbe pravca izračuna nepoznata masena koncentracija te u konačnici i maseni udio fenola u uzorcima kave i njenog otpada.

3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Metoda se temelji na formiranju stabilnog aluminij-flavonoid kompleksa u reakciji aluminija i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola (Chang i sur., 2002). Intenzitet obojenja formiranog kompleksa mjeri se pri valnoj duljini od 510 nm.

3.4.3.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- Otopina natrijeva nitrita (5 % *w/v*): odvagano je 5 g krutog NaNO_2 i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijeva klorida (10 % *w/v*): odvagano je 10 g krutog AlCl_3 i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$): odvagano je 4 g natrijeva hidroksida i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.

3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina

S ciljem izrade baždarnog dijagrama pripremljena je ishodna otopina rutina, masene koncentracije 1 g L^{-1} , vaganjem 0,1 g rutina u čaši od 50 mL te otapanjem u 10 mL 96 %-tnog metanola. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena metanolom do oznake. Iz ishodne otopine pripremljene su pojedinačne standardne otopine,

koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 te 180 mg L⁻¹, pipetiranjem 1, 3, 5, 10, 13 te 18 mL alikvota ishodne otopine u odmjerne tikvice od 100 mL koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

3.4.3.3. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira se 1 mL prethodno opisanih pojedinačnih otopina standarda, doda se 2 mL deionizirane vode te 0,3 mL 5 %-tne otopine natrijeva nitrita. Nakon 5 min stajanja dodano je 0,5 mL 10 %-tne otopine aluminijeva klorida. Reakcijska smjesa se ostavi stajati još 6 min nakon čega se doda 2 mL otopine natrijeva hidroksida, koncentracije 1 mol L⁻¹. Odmjerne tikvice se nadopune deioniziranom vodom do oznake, a potom se intenzitet obojenja mjeri na 510 nm.

Na isti način priprema se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standardne otopine uzima se odgovarajući volumen deionizirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada, s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih flavonoida, pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzeto je 0,1 mL razrijeđenog ekstrakta espresso kave te 0,05 mL refluksiranog ekstrakta otpada espresso kave.

Također, proveden je postupak određivanja ukupnih flavonoida u većem mjerilu, volumenu od 25 mL, pri čemu je uzet 1 mL razrijeđenog ekstrakta espresso kave te 0,3 mL refluksiranog ekstrakta otpada espresso kave. Prethodno navedene reakcijske otopine dodane su u istim količinama kao i kod pripreme otopina standarda.

Postupak pripreme razrijeđenog ekstrakta kave opisan je u poglavlju 3.4.2.3.

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.

3.4.4. Priprema biofilmova na bazi pektina sa i bez refluksiranog ekstrakta otpada espresso kave

Biofilmovi na bazi pektina pripremljeni su otapanjem pektina u deioniziranoj vodi, odnosno ekstraktima taloga espresso kave.

Ekstrakti taloga espresso kave „Kimbo“ pripremljeni su refluksiranjem 3 g taloga kave u 100 mL 70 %-tnog etanola. Ekstrahirani uzorci su filtrirani preko filter papira u odmjerne tikvice od 100 mL te su tikvice nadopunjene sa 70 %-tnim etanolom do oznake. Iz pripremljenih 70 %-tnih otopina ekstrakata otpipetirani su alikvoti od 3, 6, 7,1 i 14,3 mL u odmjerne tikvice od 50 mL te do oznake nadopunjeni deioniziranom vodom, kako bi se dobile 5, 10 i 20 %-tne vodene otopine etanola. Tako pripremljene otopine korištene su za otapanje pektina kod pripreme biofilmova.

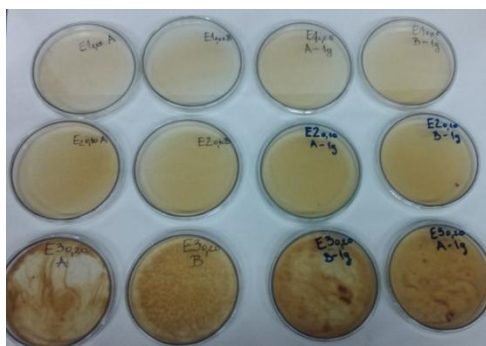
Za izradu biofilmova, uz pektin (1 i 2 %, *w/w*) kao glavni sastojak, upotrijebljeni su još i glicerol (50 %, *w/w*) kao plastifikator i kalcijev klorid (2 %, *w/w*) kao umreživač. Maseni udjeli pektina, glicerola i CaCl₂ te njihove odvage upotrijebljene pri izradi biofilmova prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav otopina upotrijebljenih za izradu biofilmova na bazi pektina uz dodatak ekstrakata taloga espresso kave „Kimbo“.

Biofilm*	Pektin	Glicerol	CaCl ₂	H ₂ O	Ekstrakt
	<i>w</i> = 1 %	<i>w</i> = 50 %	<i>w</i> = 2 %	<i>V</i> = 50 mL	
1 EO	0,50 g	0,25 g	0,01 g	+	
1 E1_{0,05}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
1 E2_{0,10}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
1 E3_{0,20}	0,50 g	0,25 g	0,01 g		+
	<i>w</i> = 2 %	<i>w</i> = 50 %	<i>w</i> = 2 %	<i>V</i> = 50 mL	
2 EO	1,0 g	0,50 g	0,02 g	+	
2 E1_{0,05}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+
2 E2_{0,10}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+
2 E3_{0,20}	1,0 g	0,50 g	0,02 g		+

*Indeksi 0,05, 0,10, 0,20 označavaju volumni udio etanola u otopinama ekstrakata.

Odvagane mase pektina, glicerola i CaCl_2 otopljene su i homogenizirane u vodi ili ekstraktima taloga espresso kave tijekom 1,5 h miješanja na magnetskoj miješalici. U završnoj fazi, nakon otapanja svih sastojaka, homogenizirane otopine su zagrijane na 60 °C, 15 min, a zatim prebačene u Petrijeve zdjelice. Nakon sušenja na zraku tijekom dva dana priređenim biofilmovima (Slika 4) određena je boja i tekstura.



Slika 4. Pripripremljeni uzorci biofilmova nakon sušenja.¹

3.4.5. Kolorimetrija

Boja uzoraka biofilma određena je pomoću uređaja CM - 3500d. Određivanje parametara boje provedeno je tako da se mali dio uzorak biofilma izreže, namjesti na površinu otvora uređaja te se zatvori poklopcem, kako vanjsko svjetlo ne bi utjecalo na rezultate.

Pomoću računalnog programa „SpectraMagic™ NX Ver 1.7“ su očitane L , a , b , C i h vrijednosti. Iz očitanih podataka izračunata je ΔL vrijednost.

3.4.6. Određivanje teksture biofilmova

Mehaničko određivanje čvrstoće pektinskih biofilmova provedeno je pomoću analizatora teksture TA.HDPlus. Analiza je obavljena primjenom takozvanog „utega“ koji definira maksimalnu silu otpora materijala u ovisnosti o njegovim fizikalnim karakteristikama. Na analizator se postavlja uteg koji definira maksimalno moguće opterećenje od 750 kg sa pripadajućim čeljustima. Put razvlačenja iznosi 5 mm, dok je početna brzina 0,3 mm sec⁻¹,

¹ Slike nastale izvorno u Laboratoriju za analitičku kemiju.

brzina provođenja testa $0,1 \text{ mm sec}^{-1}$, a povrat čeljusti događa se pri brzini od $0,5 \text{ mm sec}^{-1}$.

Uzorak biofilma (dimenzija $5 \times 1 \text{ cm}$) postavlja se okomito između dvije čeljusti koje su razmaknute 10 mm . Donja čeljust je statična, a gornja se pomiče prema gore. Tijekom pomicanja gornje čeljusti dolazi do rastezanja uzorka biofilma i u konačnici do pucanja. Nakon pucanja uzorka dobiva se dijagram ovisnosti maksimalne sile o vremenu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu opisan je postupak izolacije polifenola iz espresso kave i njenog taloga primjenom ekstrakcije refluksiranjem. Ispitan je utjecaj odnosa odvage uzoraka (1,5 i 3 g) i volumnog udjela etanola (50 i 70 %), te vremena ekstrakcije (30 i 60 min) na efikasnost ekstrakcije polifenola iz kave i otpada.

Analizom ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima otpada kave utvrđeni su optimalni procesni parametri ekstrakcije refluksiranjem, koji su potom primjenjeni za dobivanje polifenolnih ekstrakata inkapsuliranih u pektinske biofilme. U konačnici pripremljenim biofilmovima određena je tekstura, te karakterizirana boja.

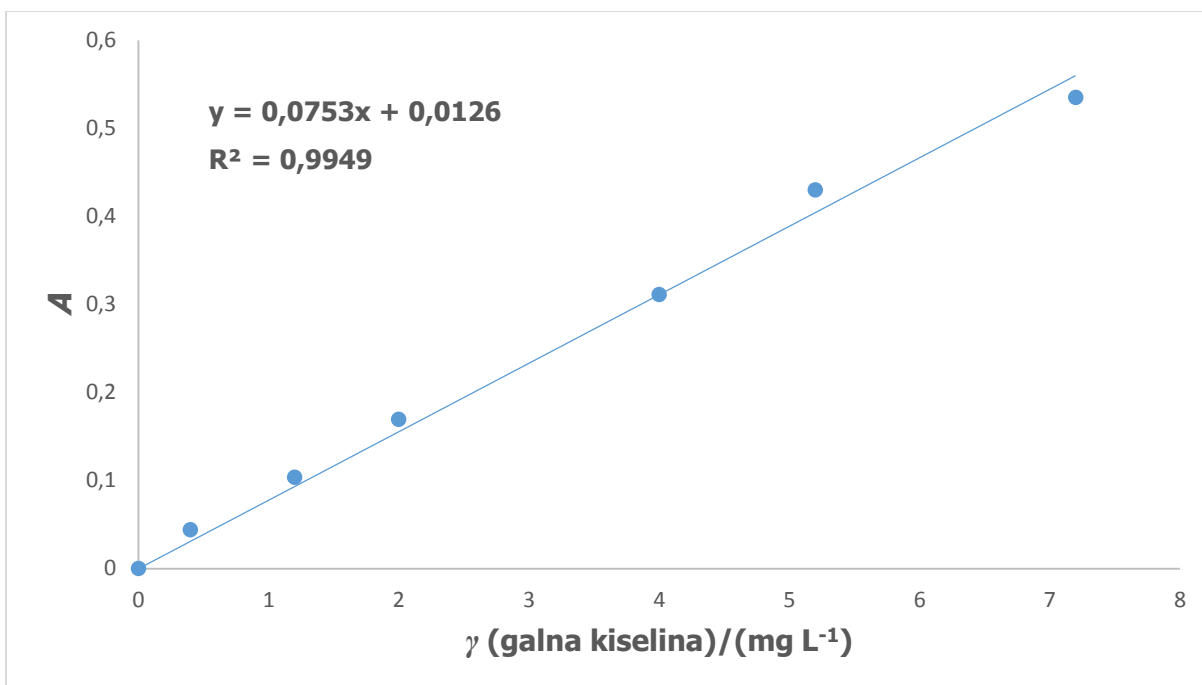
4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

U Tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline izmjerene UV/Vis spektrofotometrom. Iz navedenih podataka konstruiran je baždarni dijagram (Slika 5), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima espresso kave i njenog taloga (Tablica 5).

Tablica 4. Masene koncentracije pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline s pripadajućim vrijednostima apsorbancija, izmjerenih spektrofotometrom pri 760 nm.

γ (galna kiselina)/(mg L ⁻¹)	A±SD
0	0,0000±0,0000
10	0,0440±0,0000
30	0,1035±0,0015
50	0,1695±0,0005
100	0,3110±0,0010
130	0,4300±0,0000
180	0,5350±0,0000

N = 2, SD = standardna devijacija



Slika 6. Baždarni dijagram galne kiseline.

Prema dobivenim rezultatima, maseni udjeli ukupnih fenola u uzorcima espresso kave (1 - 8 LB) kreću se u rasponu od 225 do 298 mg g⁻¹. Najviša vrijednost ukupnih fenola dobivena je kod uzorka 2 LB, koji je ekstrahiran iz početne mase espresso kave od 1,5 g u 50 %-tnom etanolu, 60 minuta. Najniža vrijednost masene koncentracije dobivena je ekstrakcijom 3 g espresso kave u 70 %-tnom etanolu, 30 minuta (uzorak 7 LB).

Na temelju navedenog može se zaključiti da kava sa početnom masom od 1,5 g daje nešto veće masene udjele ukupnih fenola u odnosu na uzorke kave s početnom masom od 3 g.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije (30 i 60 min) na prinos ukupnih fenola može se uočiti da vrijeme od 60 min doprinosi njihovoj učinkovitijoj izolaciji. Izuzeci su uzorci 3 LB i 4 LB s nešto većim vrijednostima fenola kod 30 minutne ekstrakcije.

Budući da su kod uzoraka s početnom ekstrahiranom masom od 3 g dobivene niže vrijednosti fenola kod njih bi se moglo provesti refluksiranje u vremenu dužem od 60 minuta, čime bi se provjerilo je li vrijeme od 60 minuta optimalno za njihovu ekstrakciju ili je nužno produljiti vrijeme refluksiranja.

Uspoređujući utjecaj otapala, odnosno volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos fenola iz uzoraka kave vidi se kako su bolji rezultati dobiveni upotrebom 50 %-tnog etanola, što

znači da niži udio etanola doprinosi njihovoj efikasnijoj ekstrakciji. No, izuzetke od navedenog čine uzorci 1 i 3 LB, s nešto višom vrijednosti (273 mg g⁻¹) nađenom kod 70 % etanola.

Za usporedbu, Vignoli i sur. (2011) su ekstrakcijom kave s vodom dobili rezultate u rasponu od 12 do 37 mg g⁻¹, što je otprilike 10 puta manje u odnosu na uzorke ekstrahirane u ovom radu.

Tablica 5. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njenog konzumiranja.

Uzorak	A±SD	w(UF)/(mg g⁻¹)±SD
1 LB	0,0610±0,0010	267,82±5,53
2 LB	0,0665±0,0015	298,25±8,30
3 LB	0,0620±0,0000	273,35±0,00
4 LB	0,0600±0,0000	262,29±0,00
5 LB	0,1020±0,0000	247,34±0,00
6 LB	0,1085±0,0005	265,33±1,38
7 LB	0,0940±0,0020	225,21±5,53
8 LB	0,1035±0,0005	251,49±1,38
9 LB	0,0610±0,0010	10,71±0,22
10 LB	0,0590±0,0010	10,27±0,22
11 LB	0,1120±0,0020	22,01±0,44
12 LB	0,1210±0,0010	23,99±0,22
13 LB	0,1040±0,0020	10,12±0,22
14 LB	0,1020±0,0020	9,89±0,22
15 LB	0,1050±0,0010	10,23±0,11
16 LB	0,1200±0,0000	11,89±0,00

N = 2, SD = standardna devijacija

Rezultati masenih udjela ukupnih fenola za otpad espresso kave kreću se u rasponu od 10 do 24 mg g⁻¹. Bravo i sur. (2013) su u otpadu Guatemala Arabica kave dobili prosječnu vrijednost ukupnih fenola od 17,44 mg g⁻¹ iz čega se vidi da rezultati dobiveni u ovom radu ne odstupaju znatno od navedenog istraživanja.

Najbolji prinos fenola postignut je kod uzorka 12 LB, koji je ekstrahiran iz otpada početne mase od 1,5 g, 60 min, korištenjem 70 %-tnog etanola. Najniža vrijednost nađena je kod uzorka 14 LB ekstrahiranog iz 3 g otpada, tijekom 60 minuta uz 50 %-tni etanol.

Dakle, analogno uzorcima espresso kave i kod njenog otpada početnih masa od 1,5 g zabilježeni su bolji prinosi fenola u odnosu na one početnih masa od 3 g.

Što se tiče vremena ekstrakcije (30 i 60 min) neznatno više vrijednosti fenola su dobivene u vremenu od 60 minuta. Izuzetke predstavljaju 10 i 14 LB uzorci s nešto nižim masenim udjelima u odnosu na one ekstrahirane na 30 °C (9 i 13 LB).

Istraživanje Mussatto i sur. (2011c) je pokazalo da vrijeme ekstrakcije od 30, 60 i 90 min značajno utječe na prinos fenola u otpadu. Najbolji rezultati su postignuti kod 90 min ekstrakcije. Budući da je u ovom istraživanju ekstrakcija provedena do najviše 60 minuta, jedna od mogućnosti za optimiranje rezultata bila bi provedba ekstrakcije u vremenu od 90 minuta.

Ako se usporede prinosi fenola s obzirom na volumni udio etanola od 50 i 70 %, može se uočiti da su bolji rezultati postignuti korištenjem 70 %-tnog etanola. Dobiveni rezultati odstupaju od rezultata Pavlović i sur. (2013), koji najviše vrijednosti fenola dobivaju pri najnižem volumnom udjelu etanola od 20 %.

Uspoređujući rezultate ukupnih fenola u uzorcima espresso kave i njenog otpada, vidi se da je udio UF u otpadu kave manji otprilike 25 puta u odnosu na espresso kavu. Iako su vrijednosti ukupnih fenola u otpadu manje, ovaj biosupstrat ipak bi se mogao iskoristiti za ekstrakciju fenola, imajući na umu činjenicu kako smanjiti količinu otpada kave koji se bezpotrebno baca i zagađuje okoliš.

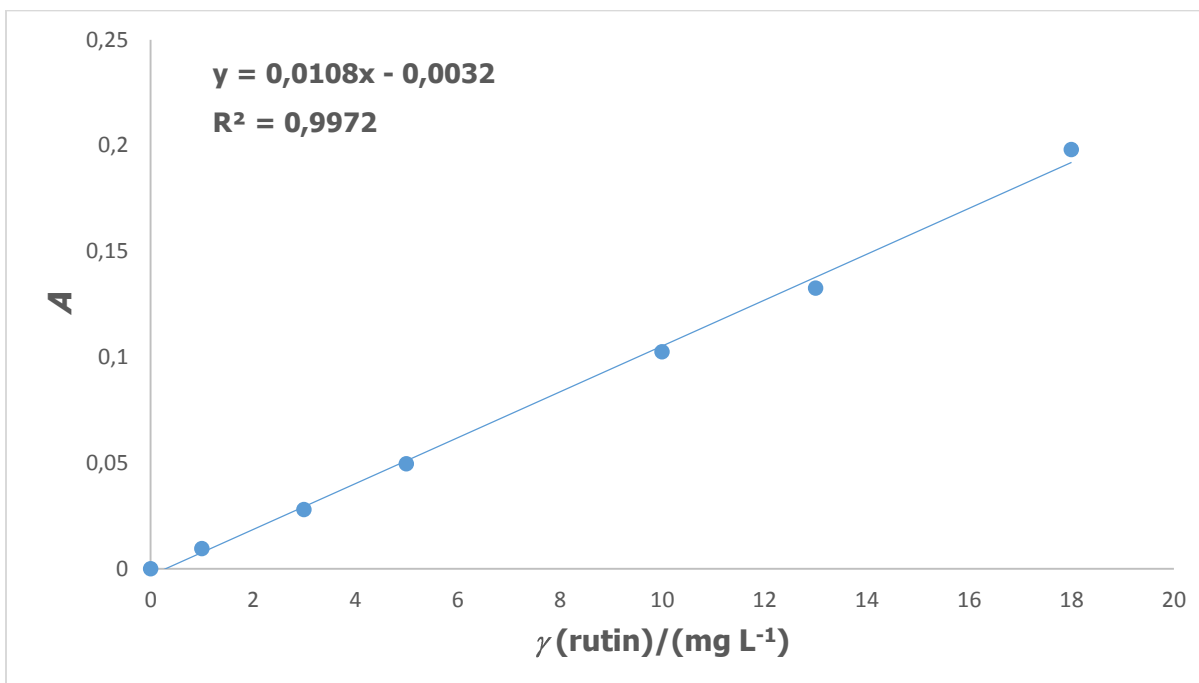
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Pripremljenim otopinama standarda i uzoraka (poglavlje 3.4.3.3.) izmjerena je apsorbancija pomoću UV/Vis spektrofotometra. Izmjerene vrijednosti apsorbancija i pripadajuće masene koncentracije standarda prikazane su u Tablici 6. Iz navedenih podataka konstruiran je baždarni dijagram (Slika 6), a iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) u ekstrahiranim uzorcima espresso kave i njenog taloga (Tablice 7 i 8).

Tablica 6. Masene koncentracije pojedinačnih standardnih otopina rutina s pripadajućim vrijednostima apsorbancija, izmjerenih spektrofotometrom pri 510 nm.

γ (rutin)/(mg L ⁻¹)	$A \pm SD$
0	0,0000±0,0000
10	0,0095±0,0005
30	0,0280±0,0000
50	0,0495±0,0005
100	0,1025±0,0005
130	0,1325±0,0005
180	0,1980±0,0020

$N = 2$, SD = standardna devijacija



Slika 7. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 7. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njenog konzumiranja.

Uzorak	$A \pm SD$	w (UFL) $\pm SD / (mg\ g^{-1})$
1 LB	0,0300 \pm 0,0010	512,35 \pm 15,44
2 LB	0,0295 \pm 0,0005	504,63 \pm 7,87
3 LB	0,0225 \pm 0,0005	396,61 \pm 7,72
4 LB	0,0235 \pm 0,0015	412,04 \pm 23,15
5 LB	0,0480 \pm 0,0000	395,06 \pm 0,00
6 LB	0,0535 \pm 0,0015	437,50 \pm 11,57
7 LB	0,0430 \pm 0,0010	356,48 \pm 7,71
8 LB	0,0420 \pm 0,0010	348,77 \pm 7,72
9 LB	0,0290 \pm 0,0010	19,88 \pm 0,62
10 LB	0,0300 \pm 0,0000	20,49 \pm 0,00
11 LB	0,0640 \pm 0,0010	41,48 \pm 1,23
12 LB	0,0750 \pm 0,0000	48,27 \pm 0,00
13 LB	0,0430 \pm 0,0010	14,25 \pm 0,30
14 LB	0,0390 \pm 0,0010	13,02 \pm 0,30
15 LB	0,0710 \pm 0,0000	22,90 \pm 0,00
16 LB	0,0780 \pm 0,0000	25,06 \pm 0,00

$N = 2$, SD = standardna devijacija

Dobiveni rezultati masenih udjela ukupnih flavonoida u ekstraktima espresso kave kreću se u rasponu od 349 do 512 mg g⁻¹. Najveći maseni udio UFL ima uzorak 1 LB, koji je ekstrahiran iz kave početne mase 1,5 g, u 50 %-tnom etanolu, 30 min. Najmanja vrijednost ukupnih flavonoida dobivena je u uzorku 8 LB, ekstrahiranom iz kave početne mase 3 g, u vremenu od 60 minuta u 70 %-tnom etanolu.

Hečimović i sur. (2011) ekstrahirajući kavu s vodom dobivaju vrijednosti u rasponu od 12,33 do 20,58 mg g⁻¹, što je znatno manje od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Dakle, može se zaključiti kako je ekstrakcija upotrebom etanola puno efikasnija.

Uspoređujući dobivene vrijednosti flavonoida za različita vremena ekstrakcije (30 i 60

minuta) može se uočiti da su kod nekih uzoraka (1 i 7 LB) dobiveni veći maseni udjeli UFL u vremenu od 30 minuta, dok je kod drugih (uzorci 4 i 6 LB) bolja ekstrakcija postignuta u vremenu od 60 minuta.

Uzimajući u obzir utjecaj volumnih udjela etanola od 50 i 70 % na prinos flavonoida, može se uočiti da su više vrijednosti postignute korištenjem 50 %-tnog etanola. No, u istraživanju koje su proveli Diem Do i sur. (2014) uz različite volumne udjele etanola (50 i 75 %), boli prinosi flavonoida su postignuti upotrebom 75 %-tnog etanola.

U odnosu na kavu, maseni udjeli flavonoida u talogu su znatno manji i kreću se u rasponu od 13 do 48 mg g⁻¹. Najveći maseni udio flavonoida pokazuje uzorak 12 LB, ekstrahiran iz otpada početne mase 1,5 g, u 70 %-tnom etanolu, 60 min. Najmanju vrijednost ukupnih flavonoida pokazuje uzorak 14 LB, pripremljen ekstrakcijom 3 g taloga u 70 %-tnom etanolu u vremenu od 60 minuta. Dakle, kao i kod određivanja fenola veći prinos flavonoida je postignut kod taloga početne mase od 1,5 g. Dobiveni rezultati su otprilike 8 - 10 puta veći u usporedbi s istraživanjem Iriondo-DeHond i sur. (2019), koji dobivaju vrijednosti flavonoida u rasponu od 0,9 do 6,3 mg g⁻¹.

Uspoređujući vremena ekstrakcije na prinos flavonoida, vidi se da su bolji rezultati dobiveni kod ekstrakcije u trajanju od 60 minuta. Dakle, kao i kod određivanja fenola, potrebno bi bilo provesti ekstrakcije pri vremenima dužim od 60 minuta, kako bi se utvrdili da li je vrijeme od 60 min zaista optimalno.

Uzimajući u obzir utjecaj volumnog udjela etanola (50 i 70 %) na prinos flavonoida može se uočiti da su bolji rezultati postignuti korištenjem 70 %-tnog etanola što je u skladu i sa istraživanjem Diem Doa i sur. (2014).

S obzirom da su dobivene vrijednosti ukupnih flavonoida (Tablica 7) dva puta veće u odnosu na vrijednosti ukupnih fenola (Tablica 5), provedeno je i određivanje UFL kod većeg razrjeđenja uzoraka ($V = 25$ mL). Dobiveni rezultati su prikazani su u Tablici 8.

Maseni udjeli ukupnih flavonoida su niži od vrijednosti dobivenih za ukupne fenole i to samo u slučaju espresso kave. Vrijednosti ukupnih flavonoida u otpadu kave i dalje pokazuju više vrijednosti u odnosu na one prikazane u Tablici 5.

Jedan od mogućih razloga dobivanja ovako visokih vrijednosti može biti činjenica da tijekom ekstrakcije otpada dolazi do kompleksiranja ne samo flavonoida, već i drugih prisutnih kemijski aktivnih spojeva s aluminijevim kloridom. Oni zajedno doprinose ukupnom povećanju apsorbancije, a time i masenog udjela flavonoida. S obzirom na ovako dobivene vrijednosti

flavonoida trebalo bi pronaći reagense selektivnije za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida, čime bi se dobio potpuniji uvid u valjanost ove ili neke druge upotrebljene analitičke metode.

No, bez obzira na veće dobivene vrijednosti flavonoida u odnosu na fenole, bilo da se radi o nižim (Tablica 5) ili višim (Tablica 8) razrjeđenjima, ponovo se može uočiti isti trend optimalnih ekstrakcijskih uvjeta (početne masa od 1,5 g, vrijeme od 60 min i 70 %-tni etanol).

Tablica 8. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njenog konzumiranja - mjerenja provedena u većem mjerilu, 25 mL.

Uzorak	A±SD	w(UFL)±SD/(mg g⁻¹)
1 LB	0,0360±0,0000	151,23±0,00
2 LB	0,0370±0,0010	155,09±3,86
3 LB	0,0350±0,0010	147,38±3,86
4 LB	0,0375±0,0005	157,02±1,93
5 LB	0,0690±0,0010	139,28±1,93
6 LB	0,0710±0,0010	143,13±1,93
7 LB	0,0610±0,0010	123,84±1,93
8 LB	0,0585±0,0005	119,02±0,92
9 LB	0,1040±0,0030	27,57±0,77
10 LB	0,1155±0,0005	30,52±0,13
11 LB	0,1275±0,0005	33,61±0,13
12 LB	0,1380±0,0000	36,31±0,00
13 LB	0,1660±0,0000	21,75±0,00
14 LB	0,1720±0,0000	22,53±0,00
15 LB	0,1810±0,0010	23,68±0,13
16 LB	0,1910±0,0000	24,97±0,00

N = 2, SD = standardna devijacija

4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima otpada kave namijenjenim za izradu biofilmova

Ekstraktima otpada kave (5, 10 i 20 %) određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, a potom su isti korišteni kod pripreme biofilmova, odnosno otapanja pektina (1 i 2 %) (poglavlje 3.4.4., Tablica 3). Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u 5, 10 i 20 %-tnim ekstraktima otpada kave.

Etanolni ekstrakt otpada kave φ (etanol)/%	$A \pm SD$	$w \pm SD / (\text{mg g}^{-1})$
Ukupni fenoli		
5	0,0440 \pm 0,0000	24,13 \pm 0,00
10	0,0815 \pm 0,0005	26,85 \pm 0,19
20	0,1550 \pm 0,0000	27,55 \pm 0,00
Ukupni flavonoidi		
5	0,0245 \pm 0,0005	49,12 \pm 1,07
10	0,0420 \pm 0,0000	52,72 \pm 0,00
20	0,0945 \pm 0,0035	59,68 \pm 1,89

$N = 2$, SD = standardna devijacija

Prema priloženoj tablici može se uočiti da su masenu udjeli ukupnih flavonoida viši u odnosu na ukupne fenole, što je i u skladu sa rezultatima dobivenim i za otpad kave. Razlozi dobivanja tako viših vrijednosti flavonoida opisani su u poglavlju 4.2.

4.4. Karakterizacija biofilmova

4.4.1. Određivanje parametara boje

Boja pektinskih biofilmova bez i sa dodatkom 5, 10 i 20 %-tnih etanolnih ekstrakata taloga kave, odnosno L , a i b parametri određeni pomoću kolorimetra (poglavlje 3.4.5.) prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Parametri boje određeni u uzorcima biofilmova.

Biofilm*	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$	$C^*(D65)$	$h^*(D65)$	ΔL
1 EO	32,32	-0,01	3,18	-	-	-
1 E1_{0,05}	31,17	0,1	4,12	4,12	88,67	-1,15
1 E2_{0,10}	30,92	0,3	4,67	4,68	86,36	-1,91
1 E3_{0,20}	29,79	1,16	6,1	6,21	79,2	-2,53
2 EO	32,83	-0,15	1,98	-	-	-
2 E1_{0,05}	31,39	0,22	4,34	4,35	87,15	-1,44
2 E2_{0,10}	30,89	0,27	4,59	4,6	86,59	-1,94
2 E3_{0,20}	29,47	1,57	5,56	5,78	74,22	-3,36

*Indeksi 0,05, 0,10, 0,20 označavaju volumni udio etanola u otopinama ekstrakata.

Kod biofilmova pripremljenih sa 1 %-tnim pektinom, 50 %-tnim glicerolom i 2 % CaCl_2 može se uočiti da ΔL vrijednost raste s porastom volumnog udjela etanola korištenog za otapanje pektina. Tako uzorak 1 E1_{0,05}, kod kojeg je korišten 5 %-tni etanol, pokazuje najmanju ΔL vrijednost od -1,15, a uzorak 1 E3_{0,20}, kod kojeg je korišten 20 %-tni etanol najvišu vrijednost od -2,53.

Također, kod uzoraka sa 2 %-tnim pektinom, te istim udjelima glicerola (50 %) i CaCl_2 (2 %), može se uočiti isti trend porasta ΔL vrijednosti kao i kod uzoraka s 1 %-tnim pektinom. Tako najnižu ΔL vrijednost pokazuje uzorak 2 E1_{0,05} od -1,44, a najvišu uzorak 2 E3_{0,20} (-3,36).

Budući da uzorci sa 2 %-tnim pektinom pokazuju i više ΔL vrijednosti može se zaključiti da veći udio pektina u biofilmovima daje tamniju boju uzorcima što potvrđuju a i b vrijednosti. Drugim riječima s porastom udjela fenola u ekstraktima rastu a i b vrijednosti. Kod 2 %-tnih pektinskih biofilmova a vrijednosti su nađene u području od 0,22 do 1,57, a kod 1 %-tnih

pektinskih filmova od 0,1 do 1,16. S druge pak strane b vrijednosti za 2 %-tne pektinske biofilme su nešto niže (4,34 do 5,56) u odnosu na 1 %-tne biofilme (4,12 do 6,1), uz 2 E1_{0,05} kao izuzetak.

4.4.2. Određivanje teksture biofilmova

Priređenim biofilmovima određena je mehanička čvrstoća analizatorom teksture, a na temelju dobivenih dijagrama ovisnosti maksimalne upotrijebljene sile (F_{\max}) o vremenu potrebnom za kidanje uzorka (t) izračunate su slijedeće vrijednosti (Tablica 11):

- Sila na granici elastičnosti, F_e
- Produljenje na granici elastičnosti, Δl_e
- Postotna deformacija na granici elastičnosti, ε
- Snaga potrebna za kidanje uzorka, P
- Rad potreban za kidanje, W

Tablica 11. Vrijednosti dobivene na temelju izmjerene maksimalne upotrijebljene sile i vremena potrebnog za pucanje uzorka.

Biofilm*	F_{\max} / N	F_e / N	$\Delta l_e / \text{mm}$	$\varepsilon / \%$	W / J	t / s	P / W
1 EO	28,1549	16,6305	0,088	0,88	0,003	1,835	0,0016
1 E1_{0,05}	31,2576	14,2015	0,204	2,04	0,051	22,635	0,0023
1 E2_{0,10}	19,3077	10,0351	0,397	3,97	0,022	17,110	0,0013
1 E3_{0,20}	20,6375	16,9851	0,580	5,80	0,008	7,645	0,0011
2 EO	32,8178	21,2935	0,16	1,6	0,006	3,245	0,0018
2 E1_{0,05}	11,3648	8,3153	0,182	1,82	0,001	2,325	0,0004
2 E2_{0,10}	39,2537	25,2827	0,502	5,02	0,051	18,500	0,0028
2 E3_{0,20}	50,8667	32,4632	0,231	2,31	0,038	9,990	0,0038

*Indeksi 0,05, 0,10, 0,20 označavaju volumni udio etanola u otopinama ekstrakata.

Prema rezultatima dobivenima u Tablici 11 najveća vrijednost maksimalne sile upotrijebljena je za kidanje uzorka 2 E3_{0,20} (50,8667 N), dok je najmanja maksimalna sila

upotrijebljena kod uzorka 2 E1_{0,05} (11,3648 N). Također, visoke vrijednosti maksimalne sile mogu se uočiti i kod uzoraka 1 E1_{0,05} (31,2576 N), te 2 E3_{0,10} (39,2537 N).

Usporedbom biofilmova priređenih s različitim udjelima pektina (1 i 2 %), može se uočiti da su više vrijednosti maksimalne sile postignute kod uzoraka sa masenim udjelom pektina od 2 %. Iako izuzetke od navedenog pravila čine uzorci 1 E0_{0,05} (31,2576 N) i 2 E0_{0,05} (11,3648) N ipak se može zaključiti da su biofilmovi s dodatkom 2 % pektina čvršći u odnosu na one s dodatkom 1 % pektina.

Praćenjem utjecaja inkorporiranih etanolnih ekstrakata otpada u pektinske biofilmove može se uočiti da dodatak ekstrakta utječe na pripremu biofilmova na način da viši volumni udio etanola dovodi do povećanja čvrstoće biofilmova kod biofilmova sa masenim udjelom pektina od 2 %. Isti zaključak se može izvesti i kod biofilmova s 1 % pektina, no ipak svi uzorci ne slijede navedeno pravilo. Naime, 1 E1_{0,05} uzorak pripremljen sa najmanjim volumnim udjelom etanola daje najvišu vrijednost maksimalne sile, tj. pokazuje najveću čvrstoću.

Sile na granici elastičnosti su u korelaciji s vrijednostima maksimalnih sila, pa tako primjerice uzorci s većom F_{max} daju i veće F_e vrijednosti. Snaga potrebna za kidanje uzoraka prati dinamiku maksimalnih sila, pa su tako visoke vrijednosti postignute kod uzoraka 2 E3_{0,20} i 2 E2_{0,10} te 1 E1_{0,05}.

S druge pak strane rad upotrijebljen za prekid uzoraka nije u korelaciji s upotrijebljenom silom. Najviša vrijednost od 0,051 J je postignuta kod uzoraka 1 E1_{0,05} te 2 E2_{0,10}. Uzorcima kod kojih je utrošen veći rad za kidanje, potrebno je i duže vrijeme za prekid uzorka. Tako su najveće vrijednosti vremena od 22,635 s i 18,500 s potrebne za prekid 1 E1_{0,05} te 2 E2_{0,10} biofilmova.

Dakle, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su biofilmovi pripremljeni sa višim volumnim udjelom etanola (10 i 20 %) čvršći, pogotovo ako se koristi 2 %-tni pektin, pa bi se u ovoj formuli, uz 50 %-tni glicerol i 2 % kalcijev klorid mogli preporučiti za daljnju izvedbu i upotrebu.

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom je pokazano da se otpad espresso kave nastao nakon njena konzumiranja može učinkovito iskoristiti kao jeftina i ekološki prihvatljiva biomasa pri izolaciji polifenola i njihovoj inkorporaciji u jestive, biorazgradive filmove na bazi pektina.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja polifenola su pokazali da espresso kava sadrži znatno više ukupnih fenola i flavonoida, u odnosu na otpad nastao nakon njenog konzumiranja.

Kod ekstrakcije kave najveći prinosi fenola i flavonoida su postignuti upotrebom 50 %-tnog etanola, početne odvage uzorka od 1,5 g i vremena od 60 minuta. Kod otpada kave optimalni parametri ekstrakcije su 70 %-tni etanol, vrijeme od 60 minuta i početna masa taloga od 1,5 g.

Kolorimetrijska karakterizacija biofilmova je pokazala da su uzorci sa ekstraktima otpada kave tamniji od uzorka standarda. Intenzitet obojenja se povećavao s povećanjem volumnog udjela etanola (5, 10 i 20 %), te je najviša ΔL vrijednost primijećena kod biofilmova otopljenih u 20 %-tnom etanolu. Nadalje, usporedbom biofilmova s različitim udjelima pektina (1 i 2 %), primijećeno je da je intenzitet boje veći u uzorcima s masenim udjelom pektina od 2 %.

Analiza teksturalnih svojstava biofilmova je pokazala da uzorak 2 E_{2,20}, priređen otapanjem 2 % pektina, 50 %-tnog glicerola i 2 %-tnog kalcijeva klorida u 20 %-tnom etanolnom ekstraktu otpada konzumirane kave pokazuje najveću čvrstoću s obzirom na maksimalnu upotrebljenu silu.

Osim izdvojenog 2 E_{2,20} uzorka i ostali biofilmovi su pokazali primjerenu čvrstoću i elastičnost, te bi se mogli upotrijebiti ovisno o konačnoj namjeni, npr. zaštitna, nutritivna, itd.

6. LITERATURA

1. Anonimus 1, Slika napitka kave
<<https://sjevorni.info/ne-bacajte-talog-od-kave-koristit-ce-vama-biljkama-namjestaju/>>
Pristupljeno 24. svibnja 2019.
2. Anonimus 2, Slika osnovne strukture flavonoida
<<https://repozitorij.mefst.unist.hr/islandora/object/mefst%3A652/datastream/PDF/view>>
> Pristupljeno 24. svibnja 2019.
3. Anonimus 3, Slika α -(1,4)-D-galakturonske kiseline
< https://sh.wikipedia.org/wiki/D-Galakturonska_kiselina > Pristupljeno 24. svibnja 2019.
4. Anonimus 4, Slika CIE $L^*a^*b^*$ sustava
<https://eprints.grf.unizg.hr/2318/1/Z617_Komugovi%c4%87_Ana.pdf> Pristupljeno 30. svibnja 2019.
5. Andrade K. S., Goncalvez R. T., Maraschin M., Ribeiro-do-Valle R. M., Martinez J., Ferreira S. R. S. (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.
6. Bravo J., Monente C., Juárez I., Paz De Peña M., Cid C. (2013) Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International* **50**: 610 - 616.
7. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**: 178 - 182.
8. Diem Do Q., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E., Ismadji S., Ju Y. H. (2014.) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* **22**: 296 - 302.
9. Espitia P. J. P., Du W. X., Avena-Bustillos R. J., Soares N. F. F., McHugh T. H. (2013) Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids* **30**: 1 - 10.
10. Farah A. (2012) Coffee constituents. U: Coffee: Emerging Health Effects and Disease

- Prevention, 1. izd., Chu Y. F., ur., John Wiley & Sons, Inc. str. 1 - 38.
11. Farah A., Donangelo C. M. (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 23 - 36.
 12. Hečimović I., Belščak-Cvitanović A., Horžić D., Komes D. (2011) Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry* **129**: 991 - 1000.
 13. ICO (2019) International Coffee Organization. <<http://www.ico.org/>>Pristupljeno 26. svibnja, 2019.
 14. Iriondo-DeHond A., Garcia N. A., Fernandez-Gomez B., Guisantes-Batan E., Escobar F. V., Blanch G. P., San Andres M. I., Sanchez-Fortun S., Castillo M. D. (2019) Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **51**: 194 - 204.
 15. Kazazić S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **55**: 279 - 290.
 16. Martins S., Mussatto S. I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C. N., Teixeira J. A. (2011) Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* **29**: 365 - 373.
 17. Mussatto S. I., Carniero L. M., Silva J. P. A., Roberto I. C., Teixeira J. A. (2011a) A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* **83**: 368 - 374.
 18. Mussatto S. I., Machado E. M., Martins S., Teixeira J. A. (2011b) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 661 - 672.
 19. Mussato S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2011c) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology* **83**: 173 - 179.
 20. Pavlović M. D., Buntić A. V., Šiler-Marinković S. S., Dimitrijević-Branković S. I. (2013) Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separation and Purification Technology* **118**: 503 - 510.
 21. Penner M. H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy. U: Food analysis (Nielsen S., ur.), Springer science+Business Media, LLC, str. 375 - 385.
 22. Pérez-Hernández L. M., Chávez-Quiroz K., Medina-Juárez L. A., Meza N. G. (2012)

Phenolic Characterization, Melanoidins, and Antioxidant Activity of Some Commercial Coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of Mexican Chemical Society* **56**: 430 - 435.

23. Pujol D., Liu C., Gominho J., Olivella M. À, Fiol N., Villaescusa I., Pereira H. (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products* **50**: 423 - 429.
24. Renfu Lu & Abbott J. A. (2004) USDA Agricultural Research Service, USA. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
25. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science, reviews* **2**: 152 - 159.
26. Seixas F. L., Turbiani F. R. B., Salomão P. G., Souza R. P., Gimenes M. L. (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chemical Engineering Transactions* **32**: 1693 - 1698.
27. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin - Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 - 178.
28. Thakur B. R., Singh R. K., Handa A. K., Rao M. A. (1997) Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **37**: 47 - 73.
29. Vignoli J. A., Bassoli D. G., Benassi M. T. (2011) Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry* **124**: 863 - 868.
30. Voragen A. G. J., Coenen G. J., Verhoef R. P., Schols H. A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **20**: 263 - 275.
31. Willats W. G. T., Knox J. P., Mikkelsen J. D. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 97 - 104.

Izjava o izvornosti

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

ime i prezime studenta