

# Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda borovnice primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

---

Kobeščak, Mateja

Master's thesis / Diplomski 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:159:146053>

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

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, srpanj 2019.

Mateja Kobeščak

910/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH  
SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA  
BOROVNICE PRIMJENOM  
UBRZANE EKSTRAKCIJE  
OTAPALIMA PRI POVIŠENOM  
TLAKU**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz mentorstvo doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, poslijedoktoranda.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svima koji su svojom podrškom pridonijeli izradi ovog rada. Posebno hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na strpljenju, podršci, vremenu, profesionalnosti, i najviše od svega, prijateljskim savjetima koji su mi olakšali izradu ovog rada i uljepšali završetak diplomskog studija.*

*Hvala i svim mojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i učinili moj studentski život toliko zabavnim i ugodnim.*

*I na kraju, najveće hvala zaslužuju moji roditelji, moja najveća podrška i najbolji prijatelji koji su uvijek uz mene i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.*

*Veliko hvala i mom bratu i psu koji su mi svaki dan opuštali živce, a to je isto jako bitno!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA BOROVNICE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

*Mateja Kobeščak, 910/PI*

**Sažetak:** Tijekom prerade borovnice u sok, nusproizvod (otpad) koji zaostane predstavlja vrijedan alternativni izvor različitih bioaktivnih spojeva. U novije se vrijeme istražuju ekološki prihvatljive metode ekstrakcije ovih spojeva iz različitih nusproizvoda kako bi se prerada i proizvodnja približile održivom konceptu. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost primjene ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE ekstrakcija) uz vodu kao otapalo u vrednovanju nusproizvoda borovnice *Vaccinium myrtillus* L. zaostalog nakon proizvodnje soka. ASE ekstrakcija je provedena variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5, 10, 15 min), temperature (40 °C, 80 °C, 120 °C) te broja ciklusa (1, 2, 3). U dobivenim ekstraktima provedena je HPLC-DAD analiza s ciljem određivanja sastavnica fenolnih spojeva. Ukupno su identificirane i kvantificirane tri strukture flavonoida (katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-galaktozid) te četiri strukture hidroksicimetnih kiselina (klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska). Dobiveni rezultati pokazuju da su derivati kvercetina dominantni polifenolni spojevi nusproizvoda borovnice (62 %). Multivarijantnom statističkom analizom utvrđeni su optimalni parametri provedbe ASE ekstrakcije s ciljem najvećeg prinosa fenolnih spojeva kako slijedi: za ukupne fenole i hidroksicimetne kiseline - temperatura 40 °C, statičko vrijeme 5 min kroz jedan ciklus, za flavonoide također statičko vrijeme 5 min kroz jedan ciklus, ali uz temperaturu 59,74 °C ( $p \leq 0,05$ ).

**Ključne riječi:** borovnica, nusproizvod, ASE ekstrakcija, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline

**Rad sadrži:** 45 stranica, 8 slika, 10 tablica, 81 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Predrag Putnik, poslijedoktorand*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*
4. Doc. dr. sc. *Davor Valinger (zamjena)*

**Datum obrane:** 16. srpanj 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology  
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

### ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUEBERRY POMACE

*Mateja Kobeščak, 910/PI*

**Abstract:** Blueberry pomace, retained during blueberry juice production, represents a valuable alternative source of various bioactive compounds (BACs). More recently, green extraction methods, based on the concept to be environmentally sustainable, have been developed to extract BACs from various fruit by-products. Therefore, the aim of this paper was to evaluate the use of green extraction procedure such as Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the valorisation of the pomace generated from *Vaccinium myrtillus* L. after pressing the juice. ASE was performed with water as a solvent by varying the static extraction time (5, 10, 15 min), temperature (40 °C, 80 °C, 120 °C) and the number of cycles (1, 2, 3). HPLC-DAD analysis was performed in order to profile phenolic compounds from blueberry pomace aqueous extracts. Total of three flavonoids (catechin, quercetin 3-rutinoside and quercetin-3-galactoside) and four hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, *p*-coumaric and ferulic) were identified and quantified. Obtained results revealed that quercetin derivatives were predominant (62 %) polyphenolic compounds found in the blueberry pomace extracts. In order to optimize ASE parameters with highest BACs yields, a multivariate statistical analysis was performed. The optimum ASE parameters were found as follows: for total phenols and hydroxycinnamic acids – temperature 40 °C, static time 5 min with one cycle, while for flavonoids - static time 5 min with one cycle and temperature 59.74 °C ( $p \leq 0.05$ ).

**Keywords:** blueberry, pomace, ASE extraction, flavonoids, hydroxycinnamic acids

**Thesis contains:** 45 pages, 8 figures, 10 tables, 81 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD *Predrag Putnik*, postdoc

**Reviewers:**

1. PhD *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
3. PhD *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
4. PhD *Davor Valinger*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** July 16<sup>th</sup> 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Borovnica ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.).....	2
2.1.1. Kemijski sastav borovnice .....	3
2.1.2. Fenolni sastav borovnice.....	4
2.1.2.1. Flavonoidi borovnice.....	6
2.1.2.2. Fenolne kiseline borovnice.....	8
2.1.3. Nusproizvod borovnice kao izor nutrijenata .....	9
2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz borovnice i nusproizvoda borovnice.....	11
2.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE).....	14
2.2.2. Izolacija bioaktivnih spojeva borovnice primjenom ASE ekstrakcije .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. Materijali.....	17
3.1.1. Priprema nusproizvoda od borovnice.....	17
3.1.2. Otapala i reagensi.....	17
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. Metode rada.....	19
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva primjenom ASE ekstrakcije .....	19
3.2.2. Odeđivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju .....	21
3.2.3. Statistička analiza.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. Fenolni sastav vodenih ekstrakata nusproizvoda borovnice .....	25
4.2. Utjecaj parametara ASE ekstrakcije na fenolni sastav vodenih ekstrakata nusproizvoda borovnice ...	28
4.3. Optimiranje postupka ASE ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda borovnice ..	34
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>38</b>



# 1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je višegodišnji listopadni grm čiji plodovi su malene sočne bobice tamnoplave do ljubičaste boje. Prodaje se u obliku svježih, smrznutih ili sušenih bobica, ali i u obliku želiranih proizvoda, sokova, tekućih i praškastih dodataka prehrani. Borovnica se među ostalim bobičastim voćem posebno izdvaja udjelom i sastavom fenolnih spojeva, produkata sekundarnog biljnog metabolizma sa važnom ulogom u rastu i razvoju biljke. Fenolni spojevi borovnice u najvećoj su mjeri prisutni u pokožici i sjemenkama, stoga nusproizvod (otpad) koji zaostaje nakon prerade predstavlja vrijednu sirovinu za izolaciju ovih spojeva koji ponovnom ugradnjom u hranu pridonose povećanju ponude nutritivno vrijedne hrane na tržištu.

Budući je do danas identificirano preko 8000 različitih struktura fenolnih spojeva, intenzivno se istražuju inovativne tehnologije ekstrakcije koje bi omogućile proizvodnju ekstrakata visokog stupnja iskorištenja. Tradicionalne metode do sada korištene, poput maceracije i ekstrakcije otapalima, koriste velike količine otapala, dugotrajne su, viših troškova te ne rezultiraju uvijek visokom kvalitetom ekstrakta i zadovoljavajućim prinosom. Stoga se danas prednost daje eko-prihvatljivim i ekonomičnim tehnologijama koje omogućavaju brzu i selektivnu ekstrakciju s manjim utroškom otapala kako bi se osigurali vrijedni ekstrakti za daljnju upotrebu. Jedna od takvih tehnika koja se danas uspješno primjenjuje za ekstrakciju fenolnih spojeva iz prirodnih materijala jest ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (*eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE*). ASE ekstrakcija je posve automatizirana tehnika ekstrakcije koja kombinira visoki tlak s tekućim otapalom uz različito statičko vrijeme ekstrakcije te različit broj ekstrakcijskih ciklusa. Prednosti ASE ekstrakcije spram drugih tehnika uključuju primjenu ekološki prihvatljivih otapala, značajno smanjenje količine otapala, širok raspon primjene, veći prinos bioaktivnih spojeva, uštedu energije, te jednostavnost upotrebe.

Nastavno na sve navedeno, cilj ovog rada je bio ispitati učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz nusproizvoda borovnice primjenom ASE ekstrakcije variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5, 10, 15 min), temperature ekstrakcije (40 °C, 80 °C, 120 °C) te broja ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3) uz vodu kao otapalo. U dobivenim ekstraktima HPLC-DAD analizom određeni su maseni udjeli sastavnica fenolnih spojeva iz skupina flavonoida, i hidrokscimetnih kiselina te su na temelju dobivenih rezultata određeni optimalni parametri ASE ekstrakcije pri kojima se postižu najveći prinosi svih određivanih skupina fenolnih spojeva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BOROVNICA (*Vaccinium myrtillus* L.)

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) (Slika 1) je višegodišnji listopadni grm visine 20-50 cm (Dujmović Purgar i sur., 2007) čiji rast je karakterističan za vlažne šume i livade, ali moguć i u suhim planinskim šumama. Porijeklom je iz sjeverne Europe, ali danas se može pronaći i u dijelovima Sjeverne Amerike i Azije.

Biljka pripada rodu *Vaccinium* koji sadrži više od 200 morfološki različitih vrsta uključujući mnoge komercijalno važne. *Vaccinium myrtillus* L. poznata je i kao Europska borovnica, a često je se zamjenjuje s *Vaccinium corymbosum* L. Ona je poznata kao Američka borovnica te je od 20. stoljeća raširena i u Europi (Nestby i sur., 2011). Dok obje vrste karakterizira sličan okus, Europska borovnica je otprilike tri puta manja (Hidalgo i Almajano, 2017), te sadrži 2 do 3 puta više polifenola od Američke (Fidaleo i sur., 2016). Prema FAOSTAT podacima (FAOSTAT, 2019), najveći proizvođač borovnica u svijetu je SAD, gdje se od 2007. do 2017. bilježi proizvodnja od približno 210 tisuća tona godišnje. Nakon SAD-a, slijedi Kanada s prosječnom godišnjom proizvodnjom od 125 tisuća tona, čime Sjeverna Amerika čini preko 80 % ukupne svjetske proizvodnje borovnica. S prosječnom godišnjom proizvodnjom od 13 tisuća tona, Španjolska je treći svjetski, a najveći europski proizvođač borovnica. Uz Španjolsku, drugi najveći europski proizvođač je Francuska, a treći Poljska. Proizvodnja borovnica u Europi je od 2007. do 2017. godine porasla za gotovo 50 tisuća tona, a u 2017. godini, proizvedeno je čak 19 tisuća tona borovnica više u odnosu na 2016. Bez obzira na porast proizvodnje, površina voćnjaka je ostala jednaka, iako je u nekim godinama uočen trend smanjivanja. Danas je vidljivo da unazad deset godina u Europi, povećanje prinosa



borovnica ne prati nužno i trend povećanja površina za uzgoj borovnica, te je u 2017. na 16 486 ha ostvaren urod od 100 304 t borovnica.

Iako rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta, u Hrvatskoj su native samo tri (*Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis-idaea* i *Vaccinium uliginosum*), dok je *Vaccinium corymbosum* kultivirana vrsta.

**Slika 1.** Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) (USDA

<https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/vacmyr/all.html>)

Najraširenija vrsta je *Vaccinium myrtillus* koja kod nas najviše raste u Gorskom Kotaru i na Velebitu, no ima je i na Medvednici, Samoborskom gorju, Žumberku, Papuku, Psunju, Plitvicama, Dinari i u Hrvatskom Zagorju (Dujmović Purgar i sur., 2007). Ipak, zbog relativno nepovoljnih uvjeta uzgoja, može se zaključiti da rod *Vaccinium* nije zastupljen u značajnijim količinama u Hrvatskoj.

Borovnica u zadnjih nekoliko godina predstavlja veoma poželjnu voćnu vrstu, kako u ljudskoj prehrani, tako i u prerađivačkoj industriji. Popularnost je stekla prvenstveno zbog dokazanih antioksidacijskih svojstava i brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje, a za koja su u najvećoj mjeri odgovorni polifenolni spojevi (Ting i sur., 2017, Shi i sur., 2017, Rodriguez-Mateos i sur., 2014). Osim polifenola, karotenoidi su također prisutni u značajnijim količinama, te tako rezultati istraživanja Tumbas Šaponjac i sur. (2014) pokazali su učinkovitost ekstrakta borovnice na poboljšanje vida odraslih osoba koje velik dio vremena provode pred računalom. Također, navode kako konzumiranje borovnica potiče genetsko signaliziranje u prevenciji raznih bolesti te ima pozitivan učinak na kardiovaskularne i degenerativne bolesti. Osim toga, rezultati nedavno provedenog istraživanja pokazali su da ekstrakt borovnica ima pozitivno djelovanje u prevenciji ulcerativnog kolitisa i Alzheimerove bolesti te da redovna konzumacija borovnica može ublažiti metabolički sindrom povezan s pretilosti i dijabetesom tipa II (Zoratti i sur., 2016).

### 2.1.1. Kemijski sastav borovnice

Različiti uvjeti rasta, osobito duljina dana, intenzitet svjetla i temperatura, razlog su varijacija kemijskog sastava borovnica (Ulberg i sur., 2012). Poput ostalog bobičastog voća, karakterizira ih niska energetska u odnosu na visoku nutritivnu vrijednost (Zoratti i sur., 2016) te visok udio vlakana (3-5 %) (Michalska i Łysiak, 2015). Kim i sur. (2013) u istraživanju 45 različitih kultivara borovnica uzgojenih u Koreji utvrdili su da masa plodova varira od 0.9 do 3.6 g, topljiva suha tvar od 8.3 do 14.3 °Brix, a ukupna kiselost određena titracijski od 0.8 % do 3.6 % (Michalska i Łysiak, 2015). Prema podacima USDA (2018), 100 g borovnice sadrži 84,21 g vode, 0,74 g proteina, 0,33 g masti, te 9,96 g šećera od kojih je 4,97 g fruktoze, 4,88 g glukoze i 0,11 g saharoze.

Borovnice posjeduju dobar sastav masnih kiselina, iako su istraživanja na tom području i dalje rijetka (Zoratti i sur., 2016). Istraživanje Bunea i sur. (2012) u kojemu su analizirane masne kiseline *Vaccinium myrtillus* u usporedbi s *Vaccinium corymbosum* borovnicama

kultiviranim u Rumunjskoj, pokazalo je vrlo sličan sastav među vrstama. Ipak, uz oleinsku, linolnu i linolensku kiselinu, veće razine polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina detektirane su u vrsti *Vaccinium myrtillus*. Međutim, najveći udio masnih kiselina borovnice nalazi se u sjemenkama. Ulje sjemenki sadrži visok udio nezasićenih kiselina, kao što su oleinska (21,8 %), linolna (35,9 %), linolenska (36,1 %) i vakcenska (omega-7-masna kiselina) (0,6 %), te također sadrži  $\alpha$ -tokotrienole (10 mg/100 g) i  $\gamma$ -tokotrienole (30 mg/100 g) (Yang i sur., 2011). Osim toga, borovnice sadrže i sterole, prekursore vitamina topljivih u mastima. Među njima dominira  $\beta$ -sitosterol, no njihov sadržaj znatno varira ovisno o podneblju rasta (Zoratti i sur., 2016).

Najzastupljeniji minerali su kalij, kalcij, magnezij i fosfor, dok su ostali minerali prisutni u znatno manjim količinama (USDA, 2018). Zoratti i sur. (2016) donose pregled mineralnog sastava borovnica različitog geografskog porijekla. Iako je mineralni sastav prilično ujednačen, najviša razina kalcija, kalija i fosfora prisutna je u talijanskim, a najniža u češkim borovnicama. Borovnice u usporedbi s ostalim bobičastim voćem predstavljaju umjereni izvor vitamina C. Njegov maseni udio varira od 8 do 44 mg/100 g, pri čemu se razlike u koncentraciji osim vrste, pripisuju uvjetima uzgoja, skladišnim uvjetima te metodama analize, koje mogu dovesti značajnih razlika u njegovoj koncentraciji (Zoratti i sur., 2016). Osim navedenog, borovnica je bogata karotenoidima, posebno luteinom koji djeluje zaštitno na zdravlje očiju (Grover i Samson, 2013). U već spomenutom istraživanju Bunea i suradnika (2012) analiziran je karotenoidni sastav borovnice *Vaccinium myrtillus* u usporedbi s kultiviranom *Vaccinium corymbosum*. Glavi identificirani karotenoidi su bili lutein,  $\beta$ -kriptoksantin i  $\beta$ -karoten, a prosječan ukupni sadržaj karotenoida iznosio je 266  $\mu$ g/100 g. Sadržaj pojedinačnih i ukupnih karotenoida bio je veći u *Vaccinium myrtillus*, pri čemu je sadržaj ukupnih iznosio 307-317  $\mu$ g/100 g.

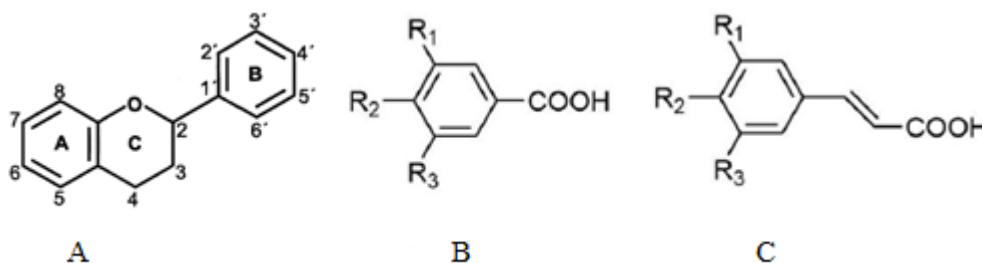
Udio aminokiselina nije značajan, a u 100 g ploda najzastupljenije su glutaminska kiselina (0,091 g), asparaginska kiselina (0,057 g), arginin (0,037 g) te leucin (0,044 g) (USDA, 2018). Glavna organska kiselina je limunska, dok se u nižim koncentracijama mogu detektirati i jabučna, fumarinska te šikiminksa kiselina (Mikulic-Petkovsek i sur., 2014).

### 2.1.2. Fenolni sastav borovnice

Fenolni spojevi su produkti sekundarnog biljnog metabolizma sa vrlo važnom ulogom u rastu, reprodukciji te zaštiti biljaka od patogena i grabežljivaca. Pronašli su i svoju

industrijsku primjenu u proizvodnji boja, papira, kozmetičkih proizvoda, te u prehrambenoj industriji kao aditivi (prirodna bojila i konzervansi) (Bravo, 1998). Na prisutnost polifenola u biljkama najvećim dijelom utječu genetski čimbenici i okolišni uvjeti, ali čimbenici poput stupnja zrelosti, sortimenta, te načina prerade i skladištenja također imaju važnu ulogu (Cardeñosa i sur., 2016, Zorić i sur., 2016, Bursać Kovačević i sur., 2015). U istraživanju Mallika i Hamiltona (2017) određeno je da termin berbe (kraj kolovoza naspram početak kolovoza), kao i temperatura skladištenja (-15 °C, 2 °C i 21 °C) tijekom 12 dana značajno utječu na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet borovnica *V. angustifolium*, *V. angustifolium* var. *Nigrum* i *V. myrtilloides* uzgojenih u Kanadi. Rezultati ove studije navode da kasniji termin berbe i niža temperatura skladištenja (14 dana na 2 °C i 90 dana na -15 °C) značajno utječu na povećanje ukupnih fenola (50.44 %) i antioksidacijskog kapaciteta (45 %) u borovnicama *V. myrtilloides*.

Najčešća klasifikacija fenolnih spojeva prema kemijskoj strukturi razlikuje flavonoidne i neflavonoidne spojeve. Flavonoidi su spojevi niske molekulske mase čiju strukturu čine dva aromatska prstena, A i B, povezana pomoću tri ugljikova atoma koja tvore prsten C (Slika 2). Dijele se na flavonole, flavone, flavanone, flavan-3-ole, izoflavone i antocijanidine, a u prirodi se obično pojavljuju vezani sa šećerom u obliku glikozida.



**Slika 2.** Osnovna kemijska struktura flavonoida (A), hidroksibenzojevih kiselina (B) i hidroksicimetnih kiselina (C) (Bravo, 1998, Hidalgo i Almajano, 2017)

Skupina neflavonoidnih spojeva uključuje fenolne kiseline, lignane, stilbene, tanine i lignine (Działo i sur., 2016). Fenolne kiseline se dijele na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne (Slika 2). Najčešći derivati hidroksibenzojevih kiselina u voću i voćnim proizvodima uključuju npr. galnu, vanilinsku i elaginsku kiselinu, a od hidroksicimetnih primjerice *p*-kumarinsku, kafeinsku i ferulinsku (Hidalgo i Almajano, 2017). Borovnice se smatraju odličnim izvorom fenolnih spojeva, a razlike u njihovom udjelu i profilu odraz su brojnih endogenih i egzogenih

čimbenika. Sadržaj ukupnih fenola u 28 različitih kultivara borovnica uzgojenih u Turskoj varirao je od 76,20 do 215,12 mg GAE/100 g. Rezultati brojnih istraživanja utvrdili su sadržaj ukupnih fenola borovnice, njezinih proizvoda kao i nusproizvoda (eng. berry pomace), a neki od rezultata novijih istraživanja prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sadržaj ukupnih polifenola u plodovima i nusproizvodima borovnice (mg GAE/g svježeg ploda)

Uzorak	Ukupni polifenoli	Porijeklo uzorka	Literatura
Borovnica – <i>V. myrtillus</i>	26,86 ± 0,07	Turska	Colak i sur., 2016
Borovnica – <i>V. myrtillus</i>	4,54 ± 0,14	Poljska	Drózdž i sur., 2017
Borovnica – <i>V. myrtillus</i>	34,73 ± 1,4*	Rumunjska	Bujor i sur., 2016
Borovnica – <i>V. myrtillus</i>	2,36 ± 0,17	Brazil	Rocha i sur., 2018
Borovnica – <i>V. myrtillus</i>	5,64 ± 0,11	Norveška	Aaby i sur., 2013
Otpad borovnice – <i>V. myrtillus</i>	14,47 ± 0,33	Norveška	Aaby i sur., 2013
Otpad borovnice – <i>V. myrtillus</i>	11,9 ± 1,2	Italija	Fidaleo i sur., 2016
Otpad borovnice – <i>V. myrtillus</i>	5,51 ± 0,33*	Brazil	Machado i sur., 2017
Borovnica – <i>V. uliginosum</i>	23,22 ± 0,05	Koreja	Kim i sur., 2017
Borovnica – <i>V. darrowii</i>	5,98 ± 0,28	Texas	Yuan i sur., 2011

\*mg GAE/g suhog ploda

#### 2.1.2.1. Flavonoidi borovnice

Okan i sur. (2018) su u 28 različitih kultivara borovnica odredili sadržaj ukupnih flavonoida od 30,44 do 91,69 mg kvercetin ekvivalenata (QE)/100 g, stoga se borovnice smatraju odličnim izvorom ovih spojeva. Od prisutnih flavonoida u borovnici, antocijani, kao nosioci plave i ljubičaste boje, predstavljaju dominantnu podskupinu tj. čine 90 % udjela u ukupnom fenolnom sastavu (Zoratti i sur., 2016). Posjeduju antikancerogeno, protuupalno i antimikrobno djelovanje, te pozitivno djeluju na dijabetes, pretilost i prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Khoo, 2017). Prosječan udio antocijana u borovnicama iznosi oko 212 mg/100 g svježeg voća, a pretežno se nalaze u glikoliziranoj formi, najčešće vezani za molekule šećera poput glukoze, galaktoze ili arabinoze (Baby i sur., 2017). Cho i suradnici (2004) su za pet različitih kultivara odredili sadržaj ukupnih antocijana od 143,52 do 822,73 mg/100 mg, a identificirali su čak 26 različitih struktura antocijana, a u borovnicama su najzastupljeniji delfinidin (56,6 %), malvidin (30,6 %), petunidin (7,9 %) i cijanidin (4,2 %) (Kalt i sur., 1999; Szajdek i Borowska, 2008; Yuan, 2011).

Ovisno o vrsti, uvjetima rasta i stupnju zrelosti ploda, sadržaj ukupnih antocijana u borovnici varira u rasponu od 2,46 do 12,01 mg/g svježeg voća (Zoratti i sur., 2016). Dróždž i sur. (2017) su u svome istraživanju odredili  $3,14 \pm 0,2$  mg ukupnih antocijana izraženih kao ekvivalenti cijanidin-3-glukozida po gramu (C3G) svježe borovnice *V. myrtillus*, što je činilo 70 % ukupnih polifenola.

Aaby i sur. (2013) su također odredili sadržaj ukupnih antocijana koji je iznosio od 2,96 mg C3G/g svježeg ploda te 4,58 mg C3G/g u nusproizvodu *V. Myrtillus*, zaostalom nakon prerade. Iako je u nusproizvodu borovnice određena veća količina antocijana, oni su činili svega 32 % ukupnih polifenola što je naznaka da svježiji plod borovnice i njen otpad u visokim koncentracijama sadrže različite fenolne spojeve.

Cesa i sur. (2017) su u kašama borovnice odredili galaktozide i arabinozide delfinidina, petunidina i malvidina kao glavne antocijane (92 %), te u manjim udjelima cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid i malvidin-3-glukozid. Također su korelirali udio antocijana s parametrima boje (CIELa\*b\*) te zaključili da ton boje ( $H^\circ$ ) negativno korelira sa sadržajem delfinidin glikozida (Del-3-G), dok je visoka pozitivna korelacija određena za  $H^\circ$  vrijednost i malvidin glikozide (Mal-3-G), a najveća korelacija je određena za  $H^\circ$  vrijednost i Del-3-G/Mal-3-G ( $q = -0.94$ ). Ovi rezultati jasno potvrđuju da tristimulusna kolorimetrija može poslužiti kao jeftin i pouzdan alat u procjeni udjela antocijana borovnice i njezinih proizvoda.

Prema USDA (2018), od flavan-3-ola u 100 g ploda, svježa borovnica sadrži 5,3 mg katehina, 0,7 mg epigalokatehina, 0,6 mg epikatehina i 0,1 mg galokatehina. Osim toga, u 100 g ploda od flavona sadrži 0,2 mg luteolina, a od flavonola 7,7 mg kvercetina, 1,7 mg kampferola i 1,3 mg miricetina.

U 9 različitih kultivara borovnice proječan udio flavonol glikozida iznosio je od 137 do 272 mg/kg, a identificirane su ukupno 23 strukture. Kvercetin je određen kao najzastupljeniji (59,4 %), dok su ostali flavonol glikozidi poput derivata miricetina, laricitina, kampferola, siringetina i izoramnetina iznosili prosječno od 1,6 do 16,3 %. HPLC-DAD-ESI-MS metodom su galaktozidi određeni kao dominantni konjugirani šećerni oblici identificiranih fenolnih spojeva (35,8-72,1 %), a drugi najčešći oblik šećernih formi zauzimaju glukozidi (12,1-27,1 %) (Vrhovsek i sur., 2012).

### 2.1.2.2. Fenolne kiseline borovnice

U borovnicama *V. arctostaphylos* i *V. myrtillus* određeni su derivati hidoksicimetnih (HCK) i hidroksibenzojevih kiselina (HBK) uglavnom u formi estera i glikozida. Od HBK jedino je protokatehinska kiselina određena u slobodnoj formi, a od HCK kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. U borovnici *V. myrtillus* zastupljenije su HCK (251,77 µg/g svježih plodova) u usporedbi s HBK (63,47 µg/g svježih plodova) i to u esterskom obliku, dok je glikozidnih oblika ovih kiselina manje za 90 % (HBK) i 75 % (HCK) u odnosu na njihove esterske forme. Od hidoksicimetnih, u *V. myrtillus* je dominirala *p*-kumarinska, a slijedi ju kafeinska, dok je u *V. arctostaphylos* dominirala kafeinska kiselina s devet puta većom koncentracijom od *p*-kumarinske. Razmotri li se profil hidroksibenzojevih, u obje vrste je zabilježena prisutnost galne, siringinske, protokatehinske, vanilinske, te u manjim količinama salicilne i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (Colak i sur., 2016). Fenolne kiseline određene u borovnici *V. myrtillus* prikazane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Prosječan sadržaj fenolnih kiselina (glikozidni i esterski oblici) u borovnici *V. myrtillus* (µg/g svježeg ploda) (Colak i sur., 2016)

Hidoksicimetne kiseline		Hidroksibenzojeve kiseline	
Kafeinska	143,61	Galna	15,3
<i>p</i> -kumarinska	156,14	Siringinska	27,04
Ferulinska	6,84	Protokatehinska	22,51
Klorogenska	8,94	Vanilinska	3,43

U liofiliziranim borovnicama *V. angustifolium* i *V. corymbosum*, klorogenska kiselina je određena kao najzastupljenija s masenim udjelima od 0,44 mg/g svježeg ploda i 0,13 mg/g svježeg ploda (Kang i sur., 2014). Iako je klorogenska kiselina najzastupljenija HCK u plodovima borovnice, Aaby i sur. (2013) su proučavajući njezinu stabilnost tijekom prerade borovnice *V. myrtillus* u sok utvrdili da se udio ove kiseline značajno smanjivao uslijed prešanja (za 35 %), bistenja (za 45 %) i filtracije (za 56 %) u odnosu na početni udio (71 µg/g), tako da je sadržaj klorogenske kiseline u gotovom proizvodu iznosio manje od polovice početnog (3,9 µg/g). Autori su također odredili da je koncentracija HCK veća u svježim plodovima borovnice, no u nusproizvodu zaostalom uslijed prerade, za razliku od ukupnih fenola, antocijana i flavonola čija je koncentracija bila veća u nusproizvodu.



### 2.1.3. Nusproizvod borovnice kao izvor nutrijenata

Posljednjih godina, briga za okoliš i važnost održivog razvoja potaknuli su niz aktivnosti koje vode prema razvijanju odgovarajućih strategija za učinkovito gospodarenje agroindustrijskim otpadom (Djekic i sur., 2018). Agroindustrijski otpad se najčešće koristi u svrhu kompostiranja, proizvodnje energije ili proizvodnje hrane za životinje. Međutim, prisutnost nutritivno vrijednih sastojaka čini ga vrlo vrijednom sirovinom za ponovno korištenje u prehrambenoj industriji (Fidaleo i sur., 2016).

Raspodjela fenolnih spojeva u plodovima borovnica je prilično neujednačena, pa je tako svega 10 % fenola zastupljeno u mezokarpu, 28–35 % u pokožici, a čak 60–70 % fenola nalazi se u sjemenkama (Heinonen, 2007). Stoga, nusproizvod borovnice zaostao nakon prerade, a sačinjen od pokožice i sjemenki, predstavlja izvrsnu sirovinsku bazu za potencijalno iskorištenje u vidu izolacije biološki aktivnih spojeva. S druge strane, zbrinjavanje nusproizvoda je zahtjevno zbog niskog pH te prisutnosti šećera i drugih organskih sastojaka, a nizak sadržaj proteina je razlog ograničenog korištenja u ishrani za životinje. Osim toga, visoka antimikrobna aktivnost sprječava njegovo korištenje za kompostiranje (Davis i sur., 2018). Stoga, zbog visokog udjela bioaktivnih spojeva i vlakana, nusproizvod borovnice se smatra važnim izvorom nutrijenata. Nusproizvod također zadržava značajnu količinu pigmenta i aromatskih spojeva, stoga može pružiti poželjne senzorske karakteristike različitim prehrambenim proizvodima. Iako brojna istraživanja navode korištenje nusproizvoda nastalih nakon prerade različitog voća i povrća u pekarskim, mliječnim i mesnim proizvodima, ispitivanja primjene nusproizvoda borovnice i dalje su rijetka (Davis i sur., 2018, Struck i sur., 2016).

Tijekom prerade borovnice u sok, sjemenke i pokožica kao vrijedan izvor polifenola se odbacuju, što dovodi do znatno niže koncentracije polifenola u soku u odnosu na njihov ukupni sadržaj u cijelom plodu. Čak i kada se primjenom enzima nastoji povećati njihov prinos u soku, značajne količine i dalje zaostaju u nusproizvodu. Fenolni spojevi zaostali u nusproizvodu se mogu ekstrahirati u zasebnom koraku. Otapala koja se najčešće pritom koriste su vodene otopine metanola ili acetona uz dodatak kiseline. Međutim, u preradi hrane poželjna je upotreba otapala poput vode ili etanola. Tijekom vodene ekstrakcije, najveći prinos fenolnih spojeva iz nusproizvoda borovnice ostvaren je primjenom visoke temperature (80 °C) (Aaby i sur., 2013). U istom istraživanju autori su u nusproizvodu borovnice zaostalom nakon proizvodnje soka odredili sadržaj ukupnih fenola od  $14,47 \pm 0,33$  mg GAE/g te sadržaj monomernih antocijana

od  $4,58 \pm 0,02$  mg C3G/g što je bilo gotovo tri puta više nego u svježem plodu. Klavins i suradnici (2018) su u osušenom ekstraktu dobivenom od nusproizvoda borovnice odredili  $84,12 \pm 4,08$  mg/g ukupnih antocijana, dok je u istraživanju Kerbstadta i sur. (2015) ta vrijednost bila u rasponu od  $13,67 \pm 0,25$  mg/g do  $43,66 \pm 0,79$  mg/g. Međutim, bioaktivne komponente borovnice podliježu degradaciji prilikom izloženosti visokoj temperaturi, svjetlu i kisiku (Correia i sur., 2017). Degradaciju polifenola borovnice u svojim su istraživanjima uočili i Hglund i suradnici (2018) određivši 3,5 puta manju koncentraciju ukupnih polifenola u osušenom, za razliku od neosušenog nusproizvoda borovnice.

Budući da su borovnice sezonsko voće s kratkim rokom trajanja, cilj brojnih istraživanja usmjeren je na pronalazak novih načina prerade koji bi omogućili povećanje njihove komercijalne vrijednosti, smanjenje količine otpada te tako doprinijeli održivoj proizvodnji (Hglund i sur., 2018). Ugradnja bioaktivnih spojeva izoliranih iz nusproizvoda borovnice u hranu pridonosi povećanju ponude nutritivno vrijedne hrane na tržištu. Obzirom da informacije o zdravstvenom učinku hrane značajno utječu na kupovne namjere potrošača, osmišljavanje novih proizvoda obogaćenih ili dobivenih iz nusproizvoda može povećati raspon prerađene hrane koja služi kao dio adekvatne prehrane.

Obzirom da su borovnice drugo najpopularnije bobičasto voće u većini zemalja svijeta te su potrošačima dobro poznate kao „supervoće“ (Medina, 2011), uključivanje njihovih bioaktivnih spojeva izoliranih iz nusproizvoda u različite prehrambene proizvode vjerojatno bi bilo dobro prihvaćeno od strane potrošača. Kako bi se smanjilo odbacivanje nusproizvoda duž prehrambenog lanca, potrebno je povećati svijest potrošača prema proizvodima koji su se do sada smatrali otpadom. Literaturni podaci donose nekoliko primjera primjene nusproizvoda borovnice. Npr. Luchese i sur. (2018) su koristili liofilizirani nusproizvod borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) zaostao nakon proizvodnje soka (14,0 % vlažnosti, 17,9 % topljivih vlakana, 35,6 % netopljivih vlakana, 9,6 % proteina) u proizvodnji škrobnih filmova s poboljšanim svojstvima. Dodatak nusproizvoda borovnice je rezultirao smanjenom topljivosti filma te povećanjem UV zaštite što je važno kada se filmovi koriste kao ambalaža koja štiti hranu od oksidacije uzrokovane svjetlom.

Nadalje, Perez i sur. (2018) su nusproizvod borovnice, osušen na 40 °C do konstantne mase i samljeven u laboratorijskom mlinu, koristili kao sastojak u proizvodnji keksa uz dodatak od 37,14 % (w/w). Rezultati su pokazali dobru biodostupnost i bioraspoloživost bioaktivnih komponenata nusproizvoda, te povećanje nutritivnih i funkcionalnih karakteristika proizvoda.

Osim toga, autori navode da razvoj ovakvog oblika proizvoda predstavlja inovativnu strategiju za održiviji rast industrije voćnih sokova. Šarić i sur. (2015) su nusproizvod borovnice sušili 20 h na 45 °C, a potom samljeli na mlinu ( $a_w=0,45$ ) do veličine čestica 0,8 mm te isti dodavali u udjelu 30 % (w/w) zajedno s nusproizvodom maline u proizvodnji bezglutenskih keksa. U keksima obogaćenim nusproizvodom borovnice i maline je pored povećanja sadržaja fenolnih spojeva, prehrambenih vlakana i minerala, postignuto i smanjenje sadržaja masti i poboljšanje sastava masnih kiselina.

Davis i sur. (2018) su svježi nusproizvod borovnice i brusnica dodavali u Dijon-senf u udjelima od 15 %, 20 %, i 25 % (w/w) te su pored sadržaja vlakana i bioaktivnih spojeva, također određivali i senzorsku prihvatljivost od strane informiranih i neinformiranih potrošača. Dobiveni rezultati upućuju da su senfovi uz dodatak nusproizvoda borovnice značajno bolje ocijenjeni u svojstvima izgleda i boje od strane informiranih potrošača čime se jednoznačno potvrđuje da uz pravovaljan marketinški management, nusproizvod borovnice može naći svoju svekoliku primjenu u prehrambenim proizvodima.

Iako istraživanje Salaheen i sur. (2014) nije bazirano na formulaciji novog proizvoda primjenom nusproizvoda borovnice, donijelo je vrlo zanimljivi zaključak. Naime, rezultati upućuju da ekstrakti iz nusproizvoda borovnice korišteni kao dodaci vodi ili hrani za perad mogu značajno smanjiti razinu kolonizacije bakterije *Campylobacter jejuni* te kao prirodni konzervansi mogu kontrolirati rast patogena u mesu i mesnim proizvodima.

## **2.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ BOROVNICE I NUSPROIZVODA BOROVNICE**

Izolaciju fenolnih spojeva iz nekog materijala, a sa svrhom daljnje primjene, čine priprema sirovine, postupak ekstrakcije, pročišćavanje ekstrakta, kvalitativna i kvantitativna analiza dobivenog ekstrakta te po potrebi, sušenje dobivenog ekstrakta (Panja, 2017). Učinkovitost ekstrakcije fenola iz nekog supstrata ovisit će o kemijskom sastavu samog materijala, primijenjenom postupku ekstrakcije, kao i polarnosti upotrijebljenih otapala. Biljni materijali mogu sadržavati različite fenolne spojeve, od jednostavnih (npr. fenolne kiseline, antocijane) do visoko polimeriziranih tvari (npr. tanine) u različitim količinama. Osim toga, fenoli se mogu povezivati s drugim biljnim komponentama kao što su ugljikohidrati i proteini. Stoga, ne postoji univerzalni postupak ekstrakcije pogodan za ekstrakciju svih biljnih fenola iz nekog materijala (Dai i Mumper, 2010).

Tradicionalno, postoje dva tipa ekstrakcije, maceracija i ekstrakcija otapalima. Maceracija je postupak ekstrahiranja tvari iz biljnog matriksa u otapalo tijekom duljeg vremenskog perioda, bez primjene topline. Ekstrakcija otapalima, poput maceracije također podrazumijeva fenomen prijenosa mase, ali zbog primjene topline zahtjeva manje vremena. Kontinuirano miješanje uzorka i otapala se obično koristi kao sredstvo za povećanje prijenosa mase. Najčešće korištena otapala za obje metode su voda, etanol, metanol i aceton, ili smjesa alkohola ili acetona s vodom. Otapala se mogu zakiseliti, uglavnom dodatkom 1 % klorovodične, octene ili druge kiseline, kako bi se poboljšao proces ekstrakcije (Hidalgo i Almajano, 2017). U pripremi fenolnih ekstrakata bogatih antocijanima koristi se organsko otapalo, najčešće metanol ili etanol, uz dodatak kiseline. Ovaj sustav otapala denaturira stanične membrane te istovremeno otapa antocijane i stabilizira ih. Međutim, dodatak viška kiseline može hidrolizirati osjetljive komponente (Dai i Mumper, 2010).

Tradicionalne metode ekstrakcije zahtijevaju jednostavnu opremu, ali koriste velike količine otapala i dugotrajne su, često rezultiraju visokom cijenom poradi energetske troškova, a kao rezultat ne ostvare uvijek visoku kvalitetu ekstrakta i zadovoljavajući prinos. Ukupni troškovi procesa se značajno smanjuju uvođenjem naprednijih tehnologija koje omogućavaju brzu i selektivnu ekstrakciju s manjom količinom upotrijebljenog otapala (Panja, 2017). Ekstrakcijske metode danas najčešće korištene u ekstrakciji bioaktivnih tvari iz biljnog materijala te njihov princip, prednosti i nedostaci su prikazane u Tablici 3.

Kako bi svaka od ovih tehnologija ekstrakcije osigurala visoke prinose ciljanih spojeva te općenito proizvodnju visokovrijednih ekstrakata, potrebno je parametre ekstrakcije prethodno optimizirati. Nezavisne varijable svake pojedine ekstrakcijske tehnike povezuju se statistički i/ili matematički sa izlaznim zavisnim varijablama, koje najčešće predstavljaju rezultate spektroskopskih, kromatografskih ili drugih mjerenja. Danas se u ovu svrhu sve više primjenjuju kemometrijske metode, koje koriste matematičke i statističke metode kako bi se putem modeliranja optimizirao eksperiment i omogućilo dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka, a sve sa svrhom iznalaska potencijalne praktične primjene (Granato i sur., 2018).

**Tablica 3.** Primjeri najčešće korištenih naprednih ekstrakcijskih metoda u izolaciji bioaktivnih tvari iz biljnog materijala

<b>Metoda</b>	<b>Princip</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>	<b>Literatura</b>
<b>Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)</b>	Ultrazvuk frekvencije $\geq 20$ kHz uzrokuje kavitaciju koja dovodi do narušavanja stanične stijenke nakon čega se molekule lakše oslobađaju iz unutrašnjosti stanice.	Veća učinkovitost (kraće vrijeme ekstrakcije i manja potrošnja otapala). Dobro očuvanje termolabilnih spojeva.	Skupa prilagodba u industrijski razmjer.	Ameer i sur., (2017), Hidalgo i Almajano (2017)
<b>Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)</b>	Vlaga iz stanice isparava zbog topline mikrovalova. Pritisak formiran u stanici mijenja poroznost i inducira migraciju otapala u stanicu.	Brže zagrijavanje. Smanjena veličina opreme. U nekim izvedbama moguća je ekstrakcija bez primjene otapala (SFME).	Može doći do spaljivanja uzorka.	Chemat i sur. (2012); Nagarajan i sur., (2017), Putnik i sur. (2016), Ameer i sur., (2017)
<b>Ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (ASE ili PLE)</b>	Uz povišeni tlak i temperature od 20 °C do 200 °C otapala mijenjaju svoja fizikalno-kemijska svojstva te tako postaju učinkovitija u ekstrakcijskim prinosima.	Potpuno automatizirana tehnika. Ekstrakcija u ciklusima uz varijaciju statičkog vremena, čime se značajno skraćuje vrijeme i ušteda otapala. Dobar izbor za izolaciju termolabilnih spojeva.	Troškovi uređaja.	Bursać Kovačević i sur. (2018); Putnik i sur. (2017), Ameer i sur., (2017)
<b>Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (PEF)</b>	Biljne stanice su uništene zbog izloženosti električnog polja visokog intenziteta puštenog preko otapala.	Visoki prinos.	Selektivna elektro-degradacija bioaktivnih spojeva. Potrebna vrlo specijalizirana oprema.	Hidalgo i Almajano, (2017); Nagarajan i sur. (2017), Ameer i sur., (2017)
<b>Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE)</b>	Tehnika djeluje pri vrlo visokoj temperaturi i tlaku (superkritični uvjeti). To omogućuje velike brzine prijenosa mase koje je teško postići tekućim otapalima.	Visoka selektivnost, kraća ekstrakcija, netoksično organsko otapalo.	Skupa prilagodba u industrijski razmjer.	Hidalgo i Almajano, (2017); Nagarajan i sur. (2017), Ameer i sur., (2017)
<b>Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HHP)</b>	Tlak 50-100 MPa, pri 0 - 100 °C uzrokuje narušavanje stanične strukture čime povećava permeabilnost i brzinu prijenosa mase, a smanjuje se difuzija sekundarnih metabolita.	Kraća ekstrakcija, dobro zadržavanje fizikalno-kemijskih i nutritivnih karakteristika materijala. Pogodno za termolabilne spojeve.	Šaržni rad.	Tokusoglu (2016) Khan i sur. (2018)

Učinkovitost ekstrakcije primjenom visokog hidrostatskog tlaka (HHP), mikrovalova (MAE), ultrazvuka (UAE), te toplinske ekstrakcije, pri dobivanju ekstrakta osušenog nusproizvoda borovnice *Vaccinium ashei* usporedili su Zhang i sur. (2017). Kao otapalo za sve metode koristili su 60 % etanol i 12M HCl. Najviši prinos antocijana ( $44,2 \pm 5,76$  mg/100 g) i ukupnih fenola ( $70,26 \pm 5,63$ ) dobiven je primjenom HHP uz značajnu ( $p < 0,05$ ) razliku u postignutom prinosu antocijana između HHP i toplinske ekstrakcije. Osim toga, ekstrakti dobiveni primjenom HHP imali su i najmanji stupanj posmeđivanja te najveću sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala. Silva i sur. (2017) su pak istražili utjecaj različitih otapala pri ekstrakciji antocijana i ukupnih fenola borovnice *Vaccinium corymbosum*, korištenjem ekstrakcije kruto-tekuće. Koristili su četiri različita otapala, vodu, etanol, metanol i aceton, sa i bez dodatka kiseline. Dobiveni rezultati su pokazali da je etanol s 0,01% HCl bio vrlo učinkovito otapalo za ekstrakciju i fenolnih spojeva i antocijana, dok je aceton bio značajno učinkovitiji u ekstrakciji fenolnih spojeva nego antocijana.

#### 2.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalom (*eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE ili Pressurized Liquid Extraction, PLE*) (dalje: ASE ekstrakcija) je automatizirana tehnika ekstrakcije koja kombinira visoki tlak s tekućim otapalom uz različito statičko vrijeme ekstrakcije te različit broj ekstrakcijskih ciklusa (Putnik i sur., 2017; Hidalgo i Almajano, 2017). Primjena visokog tlaka (~10 MPa) pri visokim temperaturama (do 200 °C) omogućava zadržavanje otapala u tekućem stanju iznad njegove točke vrelišta, pa je tako voda, kao zeleno otapalo, pri 160 °C vrlo učinkovito ekstrakcijsko otapalo u tekućem stanju, što niti jedna druga ekstrakcijska tehnika ne omogućava (Bursać Kovačević i sur, 2018). Ovaj tip ASE ekstrakcije gdje se kao otapalo koristi voda naziva se PHWE ekstrakcija (*eng. Pressurized Hot Water Extraction, PHWE*). PHWE je obećavajuća tehnika ekstrakcije iz više razloga; voda je jeftina i ekološki prihvatljiva, može se koristiti kao univerzalno otapalo što znači da se osim za ekstrakciju polarnih može koristiti i za ekstrakciju manje polarnih spojeva zbog promjene polarnosti do koje dolazi uslijed promjene temperature. Niska viskoznost i površinska napetost poboljšavaju prijenos mase, a učinkovitost PHWE se može dodatno poboljšati dodatkom drugih otapala i promjenom pH vode dodatkom kiseline (Panja, 2017).

Ipak, većina ASE ekstrakcija se provodi u temperaturnom području 75-125 °C. Porast temperature pospješuje brzinu difuzije analita prema otapalu te smanjuje viskoznost, zbog čega

otapalo lakše prodire kroz pore materijala, te povećava topljivost tvari u otapalu. Stoga, kombinacija povišene temperature i tlaka može omogućiti učinkovitu, brzu i potpunu ekstrakciju (Mottaleb i Sarker, 2012). Tlakovi koji se koriste su daleko iznad pragova potrebnih za održavanje otapala u njihovom tekućem stanju, stoga prilagodbe tlaka nisu potrebne. Većina ekstrakcija se provodi primjenom tlaka od 10 MPa, a njegova promjena imat će vrlo mali utjecaj na prinos analita i obično se ne smatra kritičnim parametrom metode. Ekstrakcija uglavnom traje 15-25 minuta pri čemu se iskoristi samo 15-45 mL otapala (Mottaleb i Sarker, 2012).

Prednosti ASE ekstrakcije spram drugih tehnika uključuju ekstrakciju uzorka mase 1-100 g u svega nekoliko minuta, značajno smanjenje količine otapala, širok raspon primjene, veći prinos bioaktivnih spojeva, uštedu energije, upotrebu ekološki prihvatljivih otapala te jednostavnost upotrebe (Alexandre i sur., 2017; Ameer i sur., 2017).

#### 2.2.2. Izolacija bioaktivnih spojeva borovnice primjenom ASE ekstrakcije

U istraživanju Heffels i sur. (2015) uspoređen je utjecaj ASE ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) na prinos antocijana iz svježih i liofiliziranih borovnica *Vaccinium myrtillus* L. Parametri ASE ekstrakcije uključivali su statičko vrijeme od 5 min, 3 ekstrakcijska ciklusa, temperaturu od 40 °C i 100 % udio utrošenog volumena otapala. UAE ekstrakcija provedena je u ultrazvučnoj kupelji (1100 W) tijekom 10 min. U obje ekstrakcijske tehnike korišteno je otapalo sastavljeno od metanola/vode/octene kiseline u omjerima: 20:75:5 (v/v/v) te 80:15:5 (v/v/v). Nakon provedenih ekstrakcija, identificirano je i kvantificirano sveukupno 15 pojedinačnih antocijana, a za liofilizirane uzorke znatno veći prinos je postignut primjenom ASE ekstrakcije u odnosu na UAE ekstrakciju, pri čemu je određena količina antocijana bila oko 2 puta veća u ASE ekstraktima. Neovisno o tipu ekstrakcije, veći prinosi antocijana ostvareni su uz otapalo koje je sadržavalo 80 % metanola.

Utjecaj ekstrakcijskih metoda ASE i UAE te njihove kombinacije (UAE+ASE) na prinos antocijana i ukupnih fenola iz nusproizvoda borovnice *V. myrtillus* istraživali su Machado i sur. (2017). Ekstrakcije su provedene sa 50 % i 70 % vodenim otopinama etanola (v/v) te sa zakiseljenom vodom (pH 2.0). Parametri ASE ekstrakcije uključivali su: tlak 10 MPa, temperaturu 80 °C i statičko vrijeme ekstrakcije 30 min. UAE je proveden u ultrazvučnoj kupelji frekvencije 37 kHz i snage 580 W tijekom 90 min pri 80 °C. Za provedbu kombinirane ekstrakcije, prvotno je provedena UAE ekstrakcija tijekom 8 min pri 80 °C, a zatim ASE ekstrakcija kako je prethodno navedeno. Dobiveni rezultati pokazuju da je najveći prinos

ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta ostvaren primjenom kombinirane ekstrakcije (UAE+ASE), zatim ASE ekstrakcije te najniži prinos primjenom UAE ekstrakcije. Za izolaciju antocijana, najboljom se pak pokazala UAE ekstrakcija, potom kombinirana ekstrakcija (UAE+ASE), dok je ASE ekstrakcija dala najniže prinose. Nadalje, vodene otopine etanola bile su učinkovitija otapala od zakiseljene vode za izolaciju ukupnih fenola, kao i antocijana, primjenom sve tri ekstrakcijske tehnike. Iako literaturni podaci (Ruenroengklin i sur., 2008) pokazuju da se u kiselim medijima dobivaju veći prinosi antocijana, to nije opaženo u ovom radu u kojem je primjenom zakiseljene vode pH 2,0 dobivena najmanja koncentracija antocijana. Autori sugeriraju nekoliko pojašnjenja: (i) obzirom da je voda visoko polarno otapalo, za razliku od antocijana, čija je polarnost značajno niža, njihova učinkovitija izolacija ostvaruje se u vodenim otopinama alkohola (Machado i sur., 2015; Mustafa i Turner, 2011); (ii) antocijani uslijed uvjeta ekstrakcije mogu konvertirati u druge spojeve, posebice tijekom UAE ekstrakcije, gdje se poradi kavitacije generiraju  $\text{OH}^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji mogu narušiti nativnu kemijsku strukturu antocijana (Tiwari i sur., 2010).

Učinak ASE i SFE metoda na ekstrakciju fenolnih spojeva i antocijana iz nusproizvoda borovnice *V. myrtillus* istraživali su Paes i sur. (2014). Istraživanje su proveli na svježem, liofiliziranom, te nusproizvodu borovnice osušenom u pećnici. Za ASE ekstrakcije, kao otapala su se koristili voda, etanol i aceton u različitim omjerima, dok su prilikom SFE ekstrakcije, kao modifikatori koristili voda, zakiseljena voda i etanol. Općenito, liofilizirani uzorci i uzorci osušeni u pećnici su imali veći sadržaj ukupnih fenola od svježih, pri čemu su liofilizirani imali veći sadržaj UF od uzoraka osušenih u pećnici, a razlog tomu je gubitak funkcionalnih komponenata pri povišenoj temperaturi. ASE ekstrakcija je dala najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti te najveću koncentraciju UF kada se kao otapalo koristio 100 % etanol, a kao sirovina liofilizirani uzorak. Najveća koncentracija antocijana je pak postignuta korištenjem zakiseljene vode, zbog veće stabilnosti antocijana u kiselim uvjetima, iako je i kombinacija etanola i vode (50:50) pokazala vrlo dobre rezultate. Što se tiče rezultata dobivenih SFE metodom, za ekstrakciju svih funkcionalnih komponenti, najbolja kombinacija bila je 90 %  $\text{CO}_2$ , 5 % vode i 5 % etanola, te svježiji uzorak kao sirovina. Koncentracije UF dobivene SFE metodom bile su u širokom rasponu za različite procesne uvjete, no najveća postignuta vrijednost je ipak bila veća od najveće vrijednosti postignute ASE metodom. Najveća koncentracija antocijana je također dobivena SFE metodom, dok je najveća antioksidacijska aktivnost postignuta ASE metodom.



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

Za izradu eksperimentalnog dijela, odnosno za pripremu nusproizvoda od borovnice korištene su zamrznute borovnice (*V. myrtillus*) nabavljene putem tvrtke Ledo d.o.o. (zemlja porijekla: Kanada, LOT: L 180709 06:38) (Slika 3). Do trenutka obrade, borovnice su skladištene u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C.



**Slika 3.** Smrznuti plodovi borovnice korišteni za proizvodnju nusproizvoda (Vlastita fotografija)

#### 3.1.1. Priprema nusproizvoda od borovnice

Za pripremu nusproizvoda od borovnice, plodove borovnice je potrebno prethodno odmrznuti na sobnoj temperaturi i preraditi u sok hladnim prešanjem. U pripremi soka od borovnice korišten je sokovnik TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 snage 300 W, brzine okretaja 80 o/min i promjera filtera sita 0,3 mm. Princip rada sokovnika bazira se na sporo rotirajućem mehanizmu koji omogućava lagan pritisak voćnog tkiva na sita, čime se osigurava kontinuirano prešanje. Izvedba sokovnika omogućava razdvajanje čvrstog nusproizvoda od prešanog soka, koji je po završetku postupka prešanja preuzet i kao takav korišten u daljnjem postupku ekstrakcije.

#### 3.1.2. Otapala i reagensi

1. Acetonitril HPLC čistoće, Prolabo, Velika Britanija
2. Metanol HPLC čistoće, Prolabo, Velika Britanija

3. Mravlja kiselina p.a., Prolabo, Velika Britanija
4. Standardi fenolnih spojeva:
  - o *p*-kumarinska kiselina, Mr=164,16 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska
  - o ferulinska kiselina, Mr=194,2 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska
  - o kafeinska kiselina, Mr=180,16 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska
  - o klorogenska kiselina, Mr=354,38 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska
  - o kvercetin-3-β-D-glukozid, Mr=464,38 g mol<sup>-1</sup>, Sigma, Njemačka
  - o kvercetin-3-O-rutinozid, Mr=610,53 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska
  - o (+)-katehin hidrat, Mr = 290,28 g mol<sup>-1</sup>, Extrasynthese, Francuska

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Agilent 1260 Infinity HPLC sustav koji se sastoji od: 1260 kvaterne pumpe, 1260 autosamplera, 1260 termostiranog kućišta za kolonu, 1260 UV/Vis PDA detektora te softwera „OpenLAB ChemStation Workstation“
- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Termostirana kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (VWR UV-PC Spectrophotometer, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

#### Pribor:

- Glass Fiber filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Dijatomejska zemlja (Thermo Scientific, DE P/N 062819)
- RP-HPLC kolona, Nucleosil 100-5C18, 5μm (250 × 4,6 mm I.D.)
- Ultrazvučna vodena kupelj (Elmasonic 40H, Elma, Njemčka)
- Viale 2 mL
- Filter 0,45 μm
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Standardno laboratorijsko stakleno i plastično posuđe volumena 0-1000 mL (čaše, odmjerne tikvice, menzure, pipete, falkon kivete), lijevci, epruvete, lađice za vaganje i štapići za miješanje.

## 3.2. METODE RADA

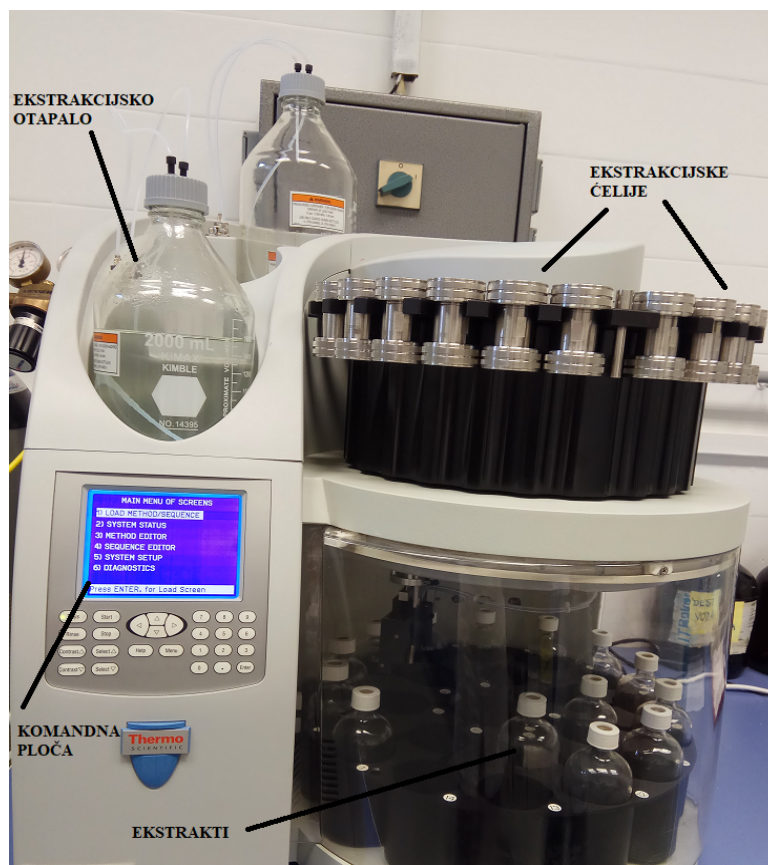
Postupak ekstrakcije fenolnih spojeva iz nusproizvoda borovnice proveden je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (dalje: ASE ekstrakcija) te destilirane vode kao ekstrakcijskog otapala. U dobivenim ekstraktima provedeno je određivanje fenolnog sastava primjenom HPLC-DAD metode.

### 3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva primjenom ASE ekstrakcije

Nusproizvod borovnice proizveden je netom prije provedbe postupka ekstrakcije na način kako je prethodno opisano u potpoglavlju 3.1.1. Tako pripremljen uzorak nusproizvoda borovnice se izvaže na analitičkoj vagi u plastičnoj lađici ( $3 \text{ g} \pm 0,0001$ ) te se postavi u ekstrakcijsku ćeliju, u koju je prethodno postavljen Glass fiber filter te približno 2 g dijatomejske zemlje. Sve se lagano promiješa sa staklenim štapićem, nakon čega se ponovno dodaje dijatomejska zemlja, do približno 5 mm ispod gornjeg ruba ćelije, koja se potom ručno zatvara. Tako pripremljeni uzorci postavljaju se u uređaj Ase Dionex 350® (Slika 4). Destilirana voda, prethodno odzračena na ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 min, korištena je kao ekstrakcijsko otapalo, a nezavisne varijable ekstrakcije uključivale su: broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 ili 3 ciklusa), vrijeme trajanja ciklusa (5, 10 i 15 min) i temperaturu ekstrakcije (40, 80 i 120 °C). Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc) (Tablica 4). Po završetku ekstrakcije, ekstrakti se kvantitativno pomoću staklenog lijevka prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL, nadopune do oznake destiliranom vodom, prenesu u plastične kivete volumena 50 mL te skladište na 4 °C do provođenja analiza.

**Tablica 4.** Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak iz nusproizvoda borovnice

Statičko vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura (°C)	Broj ciklusa ekstrakcije
5	40	1
		2
		3
	80	1
		2
		3
	120	1
		2
		3
10	40	1
		2
		3
	80	1
		2
		3
	120	1
		2
		3
15	40	1
		2
		3
	80	1
		2
		3
	120	1
		2
		3



**Slika 4.** Uređaj Ase Dionex 350® korišten za ekstrakcije (Vlastita fotografija)

### 3.2.2. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju

Određivanje fenolnih spojeva u ispitivanim ekstraktima provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/VIS DAD detekciju. Na nepolarnoj stacionarnoj fazi elucijom polarnim otapalima mobilne faze provedena je analiza fenolnih spojeva na temelju različitosti u polarosti razdvojenih komponenata. Uvjeti kromatografskog određivanja preuzeti su iz literature (Mitić i sur., 2012) uz određene modifikacije. Udio mravlje kiseline u mobilnim fazama je umjesto 5 %, iznosio 3 %, te je izmijenjeni gradijent dan u Tablici 5. Prije kromatografske analize svi uzorci su profiltrirani kroz 0,45  $\mu\text{m}$  Millipore filter (Nylon Membranes, Supelco, Inc. Bellefonte, PA, USA), a na kromatografsku kolonu injektirano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka.

### ***Uvjeti kromatografskog određivanja fenolnih spojeva:***

<b>Kolona:</b>	Nucleosil 100-5C18, 5 $\mu$ m (250 $\times$ 4,6 mm I.D.)
<b>Pokretna faza:</b>	otapalo A: 3 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 3 % mravlja kiselina u 80 %-tnoj vodenoj otopini acetonitrila
<b>Protok:</b>	0,8 mL min <sup>-1</sup>
<b>Eluiranje:</b>	gradijentno; gradijent prikazan u Tablici 5.
<b>Detektor:</b>	UV/VIS-Photo Diode Array ( $\lambda$ =240-770 nm)
<b>Temperatura:</b>	sobna
<b>Vrijeme trajanja:</b>	50 min
<b>Injektirani volumen:</b>	20 $\mu$ L
<b>Vrijeme uravnoteženja kolone:</b>	1 min

**Tablica 5.** Gradijent za HPLC-UV/VIS/PDA analizu fenolnih spojeva modificiran prema Mitić i sur. (2012)

t (min)	Otapalo A	Otapalo B	Protok (mL/min)
0	95	5	0,8
28	75	25	0,8
35	50	50	0,8
40	20	80	0,8
45	75	25	0,8
50	95	5	0,8

Za provođenje kvalitativne identifikacije i kvantitativnog određivanja korištena je metoda vanjskog standarda pri kojoj se spoj u standardnom uzorku, poznate koncentracije i volumena, analizira odvojeno od nepoznatog uzorka pod jednakim uvjetima. Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja ( $R_t$ ) standarda s vremenima zadržavanja razdvojenih pikova dobivenih HPLC analizom i karakterističnih UV-spektara, pri čemu su flavonol glikozidi identificirani na 340 nm, a fenolne kiseline na 280 nm. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih fenolnih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva. U tu svrhu, u 100 %-tnom metanolu HPLC čistoće otopljeni su i pripremljeni slijedeći standardi:

- *p*-kumarinska kiselina (350 mg L<sup>-1</sup>);
- ferulinska kiselina (350 mg L<sup>-1</sup>);
- kafeinska kiselina (350 mg L<sup>-1</sup>);

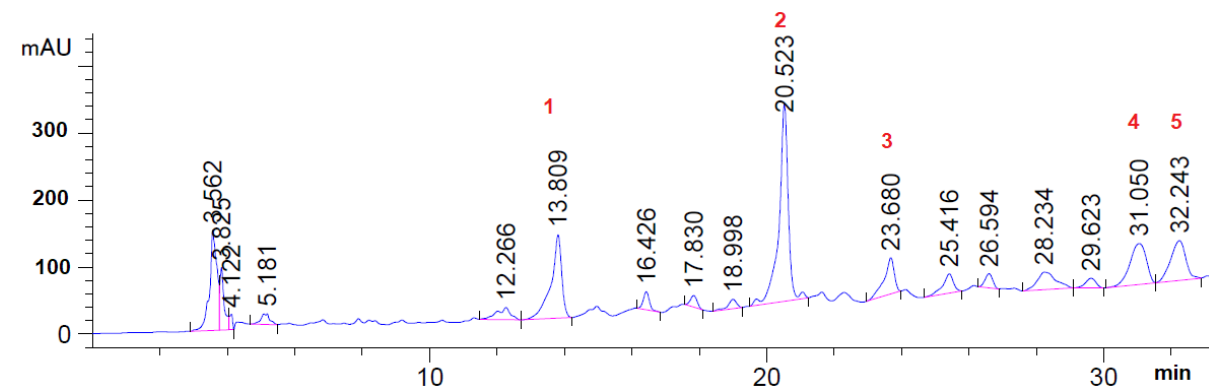
- klorogenska kiselina (350 mg L<sup>-1</sup>);
- kvercetin-3-glukozid (400 mg L<sup>-1</sup>);
- kvercetin-3-rutinozid (350 mg L<sup>-1</sup>);
- katehin (400 mg L<sup>-1</sup>).

Od svake otopine standarda pripravljena su još 4 razrjeđenja (25, 50, 100, 250 mg L<sup>-1</sup>) te se u konačnici pet različitih koncentracija svakog standarda kromatografski analizira, pri čemu su površine pikova očitane pri 280 nm (*p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, katehin) (Slika 5) i pri 340 nm (kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid). Iz površine pikova i masenih koncentracija spojeva crtaju su baždarni pravci i izračunaju pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard (Tablica 6).

**Tablica 6.** Jednadžbe baždarnih pravaca za standarde fenolnih spojeva

<b>Standardi</b>	<b>Jednadžba baždarnog pravca</b>	<b>Koeficijent determinacije</b>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 0,048x + 81,827$	$R^2 = 0,9985$
ferulinska kiselina	$y = 0,1336x + 60,887$	$R^2 = 0,9942$
kafeinska kiselina	$y = 0,281x + 45,322$	$R^2 = 0,9993$
klorogenska kiselina	$y = 0,1017x + 55,82$	$R^2 = 0,9986$
kvercetin-3-glukozid	$y = 0,1318x + 51,152$	$R^2 = 0,9988$
kvercetin-3-rutinozid	$y = 0,6812x + 25,478$	$R^2 = 0,9963$
katehin	$y = 0,1913x + 10,055$	$R^2 = 0,9988$

\**y*-površina pika; *x*-koncentracija fenolnog spoja (mg/L)



**Slika 5.** RP-HPLC kromatogram fenolnih spojeva nusproizvoda borovnice identificiranih pri 280 nm (1-katehin, 2-klorogenska kiselina, 3-kafeinska kiselina, 4-*p*-kumarinska kiselina, 5-ferulinska kiselina)

### 3.2.3. Statistička analiza

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara tretmana) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su parametri ASE ekstrakcije (broj ciklusa, statičko vrijeme ekstrakcije, temperatura). Svi dobiveni rezultati uzeti su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  STDEV, dok su rezultati multivarijantne analize prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  SE (Tablice 7 i 8).

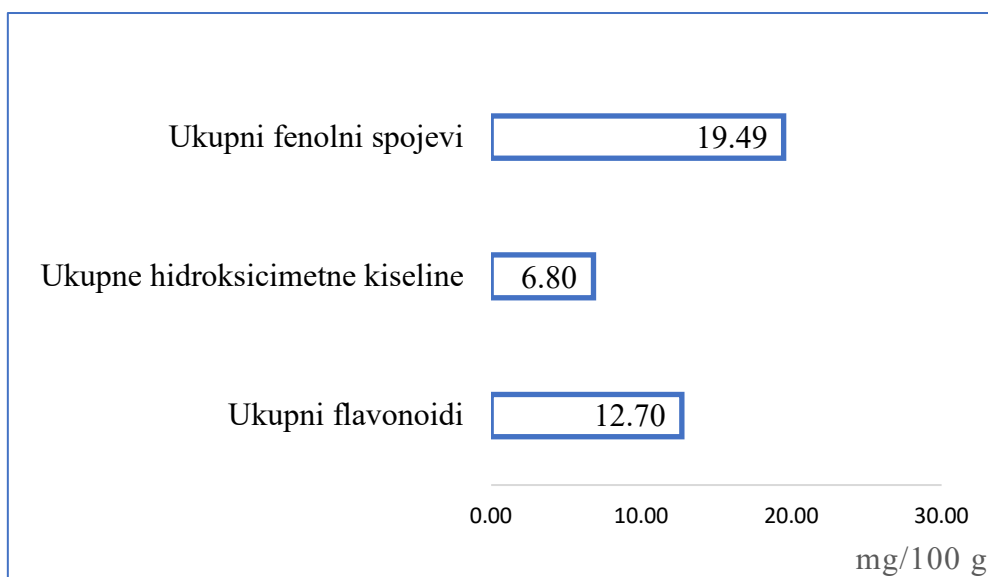


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

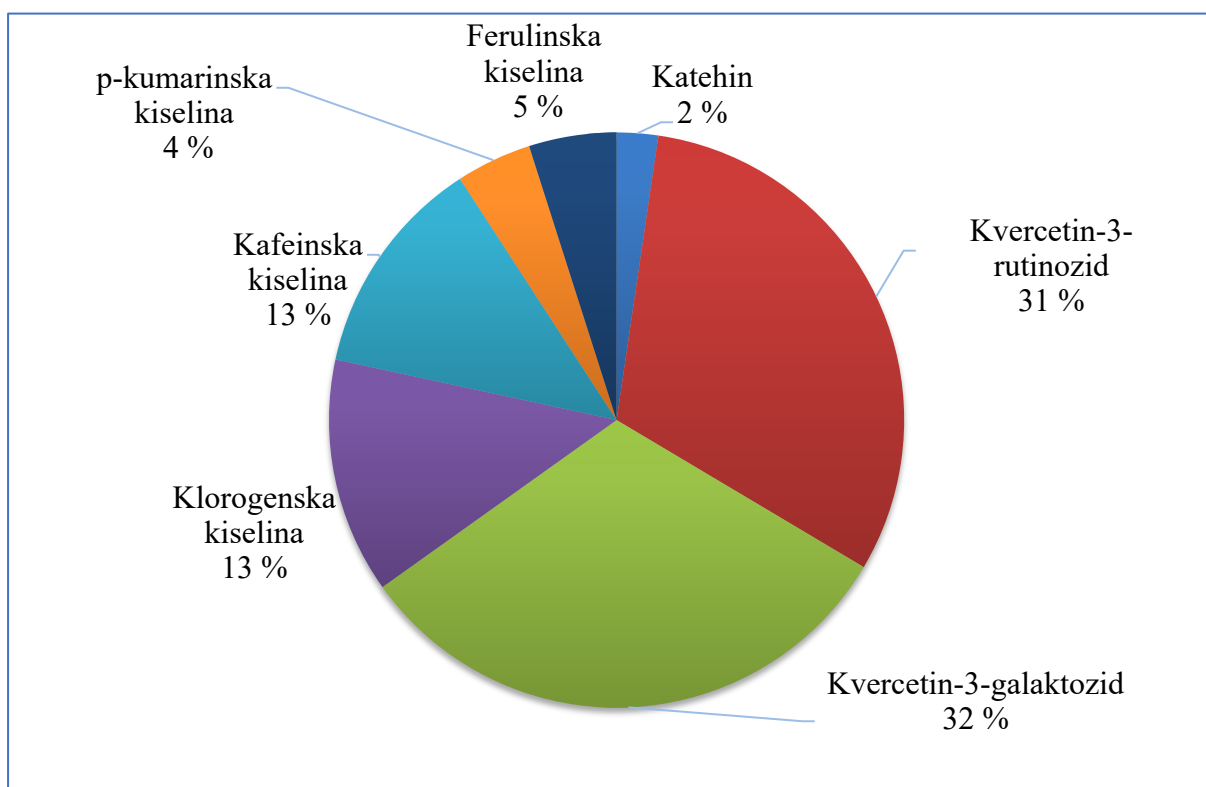
### 4.1. FENOLNI SASTAV VODENIH EKSTRAKATA NUSPROIZVODA BOROVNICE

U vodenim ekstraktima nusproizvoda borovnice dobivenih ASE ekstrakcijom, identificirane su i kvantificirane tri strukture flavonoida: katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-galaktozid, te četiri strukture hidroksicimetnih kiselina: klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Iako su u ovom radu određivani pojedinačni fenolni spojevi, u obradi rezultata korištene su njihove sume tj. prosječni maseni udjeli pojedinih podskupina (Slika 6). Neovisno o uvjetima ekstrakcije, određen je prosječni maseni udio ukupnih flavonoida od 12,70 mg/100 g, te ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 6,80 mg/100 g nusproizvoda. Određen je i prosječan maseni udio ukupnih fenola, prikazan kao zbroj ukupnih flavonoida i hidroksicimetnih kiselina, od 19,49 mg/100 g. Dobiveni udio ukupnih fenola u ovom radu znatno je manji od masenih udjela ukupnih fenola nusproizvoda borovnice koje su u svojim istraživanjima odredili Aaby i sur. (2013), Fidaleo i sur. (2016) te Machado i sur. (2017), a čije vrijednosti su prikazane u Tablici 1. Dobivena vrijednost manja je i od one koju su u svježim borovnicama kvantificirali Okan i sur. (2018): 76.20 – 215.12 mg GAE/100 g, Kim i sur. (2013): 170.9 – 434.5 mg GAE/100 g, te Kim i sur. (2017): 2,322.3±5.7 mg GAE/100 g. Kao razlog ovog odstupanja svakako se može smatrati primjena različitih otapala, obzirom da u gore navedenim publikacijama nije korištena voda kao otapalo, a također su korištene i različite metode ekstrakcije.

U većini istraživanja koja se bave valorizacijom nusproizvoda borovnice koriste se 50-85 %-tne vodene otopine alkohola etanola i metanola (Struck i sur., 2016), otapala za koja je utvrđena veća ekstrakcijska učinkovitost u izolaciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala, no svrha ovog rada bila je ispitati vodu kao zeleno otapalo u potencijalu iskorištenja ovog nusproizvoda.



**Slika 6.** Prosječni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva te ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiseline u ekstraktima nusproizvoda borovnice (mg/100 g)



**Slika 7.** Prosječan udio pojedinačnih flavonoida i fenolnih kiselina određenih u ekstraktima nusproizvoda borovnice

Promotre li se pojedinačni fenolni spojevi izolirani iz nusproizvoda borovnice (Slika 7), dobiveni rezultati pokazuju da su derivati kvercetina dominantni spojevi u vodenim ekstraktima nusproizvoda borovnice, pri čemu čak 63% ukupnih fenola zajedno čine kvercetin-3-galaktozid i kvercetin-3-rutinozid. Općenito, kvercetin-3-galaktozid čini 49,6 %, kvercetin-3-rutinozid 48,6 %, a flavan-3-ol katehin 3,7 % od ukupno identificiranih i kvantificiranih flavonoida (rezultati nisu prikazani). Slične rezultate dobili su i Vrhovsek i sur. (2012) u svom istraživanju. Kroz četiri godine istraživanja, HPLC analizom su odredili prosječni sastav flavonola u devet različitih kultivara borovnice te utvrdili da je od ukupnih flavonola najzastupljeniji kvercetin s  $59,4 \pm 8,7$  % udjela. Do sličnog zaključka su došli i Cho i sur. (2005) koji su u svom istraživanju na dva kultivara borovnice, HPLC analizom također utvrdili da su derivati kvercetina dominantni flavonoli borovnice. Kvercetin glikozidi činili su više od 75 % ukupnih flavonola borovnice, a u najvećoj mjeri kvantificiran je kvercetin-3-galaktozid, što je u skladu s rezultatom dobivenim u ovom istraživanju.

Od hidroksicimetnih kiselina izoliranih iz nusproizvoda borovnice, najzastupljenije su klorogenska i kafeinska, svaka sa po 13 % udjela ukupnih fenola. Osim navedenih, identificirane su i kvantificirane ferulinska i *p*-kumarinska kiselina. Colak i sur. (2016) ispitali su fenolni sastav dvaju kultivara borovnice, *V. arctostaphylos* L. i *V. myrtillus* L., ubranih na području Turske. UPLC-MS/MS analizom su identificirali i kvantificirali šest hidroksibenzojevih i četiri hidroksicimetne kiseline u oba kultivara. Općenito, ukupnih fenolnih kiselina je bilo više u *V. arctostaphylos* L. (125,2 mg/100 g) nego u *V. myrtillus* L. (38,4 mg/100 g), a u oba kultivara dominirale su hidroksicimetne u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. Od hidroksicimetnih kiselina, u *V. myrtillus* L. najzastupljenija je bila *p*-kumarinska (15,6 mg/100 g), a potom kafeinska (14,4 mg/100g), dok je u *V. arctostaphylos* L. najzastupljenija bila kafeinska (99,4 mg/100 g), zatim *p*-kumarinska (14,3 mg/100 g). U oba kultivara najmanje je bila zastupljena ferulinska kiselina.

Ekstrakte uzoraka borovnice *V. myrtillus* L. ispitali su u svom istraživanju i Aaby i sur. (2013). Oni su analizirali uzorke borovnice iz različitih faza proizvodnje soka, što je podrazumijevalo plod borovnice, enzimski tretiranu kašu, nusproizvod nakon prešanja, sirovi sok, bistri sok te filtrirani sok. Postupak ekstrakcije uključivao je ispitivanje slijedećih parametara: temperatura (22-100 °C) i vremena ekstrakcije (4-45 min) uz ekstrakcijsko otapalo aceton/voda (70/30, v/v). Po završetku ekstrakcije aceton je otparen i dalje u analizi korišteni su vodeni ekstrakti. Nakon provedene analize pomoću HPLC-DAD-ESI-MS sustava, uočili su da usitnjavanje plodova borovnice i enzimski predtretman dobivene kaše dovode do porasta

koncentracije flavonola za 50 % u odnosu na svježi plod borovnice. Osim toga, koncentracija flavonola se tijekom daljnjih koraka prerade nije mijenjala, što ukazuje na njihovu dobru stabilnost. Nadalje, u nusproizvodu borovnice određena je 4,5 puta veća koncentracija flavonola, nego u svježem plodu, a vodeći flavonol je i u ovome istraživanju bio kvercetin-3-galaktozid. Koncentracija derivata hidroksicimetnih kiselina je u nusproizvodu bila niža nego u svježem plodu, zbog lakšeg oslobađanja ovih spojeva u sok te posljedično manjeg zaostajanja istih u nusproizvodu. Općenito, flavonoli i derivati hidroksicimetnih kiselina su imali najveći doprinos u ukupnom sadržaju fenola, flavonoli s 50 % i derivati hidroksicimetnih kiselina s 18 % udjela, što je u skladu i sa rezultatima ovog istraživanja. Ipak, općenito se može zaključiti da su u navedenim istraživanjima određene veće koncentracije hidroksicimetnih kiselina nego u ovom istraživanju.

#### **4.2. UTJECAJ PARAMETARA ASE EKSTRAKCIJE NA FENOLNI SASTAV VODENIH EKSTRAKATA NUSPROIZVODA BOROVNICE**

Nekoliko istraživanja je do sada analiziralo primjenu različitih alternativnih tehnika u mogućnosti iskorištenja nusproizvoda borovnice, pri tome nastojeći optimizirati procesne parametre ekstrakcije poput vrste otapala, temperature i vremena ekstrakcije. Zhang i sur. (2017) su u svom istraživanju uz vodenu otopinu etanola (60 %, v/v) ispitali mogućnost primjene ekstrakcije potpomognute visokim tlakom, ultrazvukom i mikrovalovima s ciljem usporedbe učinkovitosti obzirom na izolaciju fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima klasične ekstrakcije te je zaključeno da se ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (500 MPa, 3 min, sobna temperatura) pokazala daleko najučinkovitijom u potencijalu iskorištenja nusproizvoda borovnice, stoga je i u ovom istraživanju odabrana ASE ekstrakcija. Kako bi se iznašli parametri ASE ekstrakcije koji će pogodovati najboljem iskorištenju nusproizvoda borovnice, ispitani su slijedeći ekstrakcijski parametri: temperatura (40, 80, 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10, 15 min) te broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3). Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ovih parametara na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida te ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g) izoliranih iz nusproizvoda borovnice primjenom ASE ekstrakcije prikazani su u Tablici 7.

Ukupni fenolni (UF) spojevi u nusproizvodu borovnice određeni su u rasponu od 12,06 mg/100 g do 29,60 mg/100 g (rezultati srednjih vrijednosti nisu prikazane u ovom radu) s prosječnom vrijednošću od  $20,57 \pm 0,21$  mg/100 g. Rezultati statističke analize pokazuju da su na sadržaj UF u nusproizvodima borovnice značajno utjecali svi ispitivani parametri: temperatura, vrijeme ekstrakcije, kao i broj ciklusa ekstrakcije ( $p \leq 0,01$ ). Ako se razmotri utjecaj temperature, najveći prinos UF postignut je pri temperaturi ekstrakcije od 40 °C, značajno manji prinos pri temperaturi od 80 °C, te najmanji pri 120 °C. Sličan utjecaj temperature na prinos UF u listu masline potvrđen je u radu Putnik i sur. (2017) gdje su autori pri ASE ekstrakciji uz 60, 80 i 100 °C najniži udio UF odredili u ekstraktima pri najvišim temperaturama. Autori pojašnjavaju da se porastom temperature dio fenolnih spojeva i razgradi što u konačnici rezultira njihovim gubitkom. Ovdje valja spomenuti i istraživanje Barbe i sur. (2016) koji navode kako temperature iznad 100 °C rezultiraju smanjenjem prinosa UF.

Statičko vrijeme ekstrakcije također je značajno utjecalo na prinos UF, pa je tako najniže iskorištenje uočeno pri statičkom vremenu od 15 minuta, dok se prinosi ostvareni u statičkim vremenima od 5 i 10 minuta nisu značajno razlikovali. Utjecaj broja ciklusa jednak je utjecaju temperature, odnosno, s povećanjem broja ciklusa, značajno se smanjuje prinos UF.

Mottaleb i Sarker (2012) su u svom istraživanju utvrdili da je u ASE ekstrakciji temperatura od kritične važnosti za procjenu ekstrakcijske učinkovitosti. Kao razlog navode značajno smanjenje viskoznosti otapala s povećanjem temperature što rezultira uspješnijim otapanjem ciljanih analita. Osim toga, toplinska energija pridonosi pucanju veza između ciljanog analita i matriksa u kojem se on nalazi i tako potiče difuziju analita u otapalo. Osvrćući se nadalje u svojim rezultatima na broj ciklusa ekstrakcije, ističu da je veći broj ciklusa pogodan za uzorke s visokom koncentracijom analita, obzirom da se pri svakom novom ciklusu u sustav uvodi nova količina otapala.

U ekstraktima nusproizvoda borovnice dobivenih ASE ekstrakcijom, maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) određeni su u rasponu od 6,85 mg/100 g do 19,04 mg/100 g (rezultati srednjih vrijednosti nisu prikazane u ovom radu), s prosječnom vrijednošću od  $12,41 \pm 0,70$  mg/100 g. Slično kako i kod UF, i ovdje su svi ASE ekstrakcijski parametri imali značajan utjecaj na prinos UFL ( $p \leq 0,01$ ). Povećanjem temperature i statičkog vremena ekstrakcije značajno se smanjuje prinos UFL. Što se tiče broja ciklusa, najveći prinos se postiže pri jednom ciklusu ekstrakcije, a najmanji pri dva ciklusa ekstrakcije.

**Tablica 7.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida te ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g) izoliranih iz nusproizvoda borovnice primjenom ASE ekstrakcije

Parametri ekstrakcije	n	Ukupni fenolni spojevi	Ukupni flavonoidi	Ukupne hidroksicimetne kiseline
Temperatura (°C)		p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>
40	18	25.79±0.36 <sup>a</sup>	15.31±0.12 <sup>a</sup>	8.87±0.05 <sup>a</sup>
80	18	21.60±0.36 <sup>b</sup>	12.11±0.12 <sup>b</sup>	6.93±0.05 <sup>b</sup>
120	18	14.34±0.36 <sup>c</sup>	9.80±0.12 <sup>c</sup>	4.53±0.05 <sup>c</sup>
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>
5	18	22.70±0.36 <sup>a</sup>	13.74±0.12 <sup>a</sup>	6.89±0.05 <sup>a</sup>
10	18	21.75±0.36 <sup>a</sup>	13.23±0.12 <sup>b</sup>	6.42±0.05 <sup>b</sup>
15	18	17.27±0.36 <sup>b</sup>	10.25±0.12 <sup>c</sup>	7.02±0.05 <sup>a</sup>
Broj ciklusa		p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>
1	18	22.87±0.36 <sup>a</sup>	12.83±0.12 <sup>a</sup>	7.23±0.05 <sup>a</sup>
2	18	20.36±0.36 <sup>b</sup>	11.95±0.12 <sup>b</sup>	7.05±0.05 <sup>b</sup>
3	18	18.49±0.36 <sup>c</sup>	12.44±0.12 <sup>c</sup>	6.05±0.05 <sup>c</sup>

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,01$

Prema rezultatima u Tablici 7. vidljivo je da su parametri ASE ekstrakcije značajno utjecali i na prinos hidroksicimetnih kiselina (HCK). Slično kao i za UF i UFL, povećanjem temperature i broja ciklusa značajno se smanjuje prinos HCK. Pri statičkom vremenu ekstrakcije od 15 minuta postignut je najveći prinos, dok je najmanji udio HCK određen pri statičkom vremenu od 10 minuta.

Plaza i sur. (2015) proučavali su utjecaj temperature prilikom ASE ekstrakcije kada se kao otapalo koristi voda. Povećanje temperature, slabljenjem veza između analita i matriksa, posebice vodikovih i drugih dipol-dipol veza, pogoduje kinetici prijenosa mase čime se olakšava početna desorpcija analita iz matriksa uzorka. Viša temperatura rezultira i bržom difuzijom te boljom topljivošću analita u vodi. Međutim, povišena temperatura ima i svojih nedostataka, a jedan od njih je smanjenje selektivnosti ekstrakcije. Naime, što je temperatura viša, ekstrahirat će se i više neželjenih spojeva što dovodi do povećane potrebe za daljnjim

pročišćavanjem ekstrakta. Također, pri povišenoj temperaturi može doći do degradacije analita, a u matriksu uzorka se mogu odvijati i druge kemijske reakcije. Prema Plazi i suradnicima (2015) prilikom ASE ekstrakcije fenolnih spojeva uz vodu kao otapalo, najčešće se primjenjuju temperature u rasponu od 80 °C do 150 °C u trajanju od 1 do 60 minuta.

Bozan i Altinay (2014) odredili su utjecaj temperature, vremena ekstrakcije i broja ciklusa na prinos flavan-3-ola iz osušenih i usitnjenih sjemenki grožđa prilikom ASE ekstrakcije (Dionex ASE© 100). Između različitih ispitivanih otapala, 70 %-tna vodena otopina acetona je dala najviši prinos flavan-3-ola, te su daljnja ispitivanja izvršena koristeći upravo to otapalo. Temperature koje su proučavali bile su 50 °C, 80 °C i 120 °C, vremena 5, 10, 20 i 30 minuta, te 1, 2, 3, 4 i 5 ciklusa ekstrakcije. Uočili su pozitivan učinak temperature na prinos flavan-3-ola. Naime, dok je s povećanjem temperature s 50 °C na 80 °C prinos katehina bio 15 %, a epikatehina 57 % veći, daljnjim povećanjem temperature na 120 °C prinos katehina bio je čak 2,5 puta, a epikatehina 1,5 puta veći u odnosu na prinos postignut pri 80 °C. Vrijeme ekstrakcije, koje se u ASE metodi definira kao razdoblje tijekom kojeg je uzorak u interakciji s otapalom, u ovom je istraživanju također odigralo važnu ulogu u povećanju prinosa flavan-3-ola. Povećanjem vremena ekstrakcije do 20 minuta, povećao se i prinos flavan-3-ola. Utjecaj broja ciklusa bio je značajan samo do dva ciklusa kada je postignuta najveća koncentracija flavan-3-ola, dok se koncentracija dobivena nakon dva ciklusa nije značajno razlikovala od onih dobivenih pri više ciklusa.

Studija Hossaina i sur. (2011) donosi optimiranje uvjeta ASE ekstrakcije fenolnih spojeva iz tri osušena i usitnjena začina: ružmarina, origana i mažurana. Eksperiment je proveden pomoću uređaja Dionex ASE 200, u temperaturnom rasponu od 66 °C do 129 °C uz 32 % do 88 %-tni metanol kao otapalo. Najbolje otapalo bio je 50-60 %-tni metanol, no utvrđeno je da je ipak temperatura bila dominantan čimbenik pri povećavanju sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Preciznije, prinos ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet povećavali su se s povećanjem temperature u slučaju sva tri začina, s maksimalnom vrijednošću postignutom pri 129 °C.

Temperatura ekstrakcije bila je ključan čimbenik i prilikom ekstrakcije karotenoida iz liofilizirane mrkve u istraživanju Sahe i sur. (2015) provedenom na instrumentu ASE Dionex 350. Oni su ispitivali utjecaj temperatura od 40 °C, 50 °C i 60 °C, te statičkih vremena od 5, 10 i 15 minuta. Najviša temperatura te najduže vrijeme ekstrakcije rezultirali su najvećim prinosom karotenoida.

Navedeni literaturni podaci navode potpuno suprotan trend od onoga koji je utvrđen u našem istraživanju gdje su niže temperature te kraće vrijeme ekstrakcije rezultirali većim prinosima. Obzirom da se jasno vidi da je temperatura najznačajniji faktor utjecaja, u Tablici 9. prikazani su rezultati multifaktorske analize o utjecaju kombiniranih ekstrakcijskih parametara (temperature i statičkog vremena ekstrakcije te temperature i broja ciklusa) na masene udjele fenolnih spojeva izoliranih iz nusproizvoda borovnice primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak.

Ako se razmotri utjecaj temperature ASE ekstrakcije u kombinaciji sa statičkim vremenima, dobiveni rezultati pokazuju da su značajno manji prinosi postignuti kada se pri istoj temperaturi statičko vrijeme povećalo. Preciznije, najveći prinosi UF, UFL i HCK postignuti su pri kombinaciji temperature od 40 °C i statičkog vremena od 5 minuta. Kada je pri 40 °C statičko vrijeme bilo 10 minuta, nije uočena značajna razlika u prinosu UFL i HCK, no prinos UF je bio značajno manji. Nadalje, 15 minuta statičkog vremena pri 40 °C rezultiralo je najmanjim prinosima UF, UFL i HCK. Sličan trend uočen je i pri 80 °C, odnosno, najveći prinosi ASE ekstrakcije provedene na 80 °C postignuti su kada je statičko vrijeme bilo najkraće. Povećanjem statičkog vremena na 10 minuta, prinos UF i HCK se značajno smanjio, dok značajne razlike nije bilo u prinosu UFL. Pri 120 °C, prinos je ponovno bio najveći uz statičko vrijeme od 5 minuta za UF i UFL, zatim se značajno smanjivao povećanjem statičkog vremena na 10 te 15 minuta. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Putnik i suradnici (2017). U ovom istraživanju, jedina razlika od navedenog trenda smanjivanja prinosa povećanjem statičkog vremena uočena je za HCK pri temperaturi od 120 °C, gdje je najveći prinos postignut kada je statičko vrijeme bilo 15 minuta. Uočeno smanjenje prinosa ukupnih fenola s povećanjem vremena ekstrakcije objasnili su većom mogućnosti pojave hidrolizacijskih i oksidacijskih reakcija pri duljoj izloženosti spojeva povišenoj temperaturi.

Kao i u slučaju kombinacije temperature i statičkog vremena, najveći prinosi UF, UFL i HCK postignuti su pri kombinaciji temperature od 40 °C i najmanjeg broja ciklusa (jedan ciklus). Povećanjem broja ciklusa, u većini slučajeva se prinos UF, UFL i HCK smanjio. Međutim, iznimke se primjećuju pri 40 °C gdje broj ciklusa nije imao signifikantan utjecaj na prinos UF.

Ponovno valja spomenuti istraživanje Bozan i Altinay (2014) u kojemu je vrijeme ekstrakcije odigralo važnu ulogu u povećanju prinosa flavan-3-ola. Naime, povećanjem vremena ekstrakcije do 20 minuta, povećao se i prinos flavan-3-ola, što nije u skladu s rezultatima dobivenima u našem istraživanju. Utjecaj broja ciklusa bio je značajan samo do dva



ciklusa kada je postignuta najveća koncentracija flavan-3-ola, dok se koncentracija dobivena nakon dva ciklusa nije značajno razlikovala od onih dobivenih pri više ciklusa. Utjecaj broja ciklusa u skladu je s našim istraživanjem. Budući da povećanje temperature može dovesti do potpunog uništenja biljne stanice i tako postići maksimalni transfer mase, povećanje broja ciklusa ne igra značajnu ulogu kada je stanica već potpuno uništena (Koubaa i sur., 2015).

**Tablica 8.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju kombiniranih ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida te ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g) izoliranih iz nusproizvoda borovnice primjenom ASE ekstrakcije

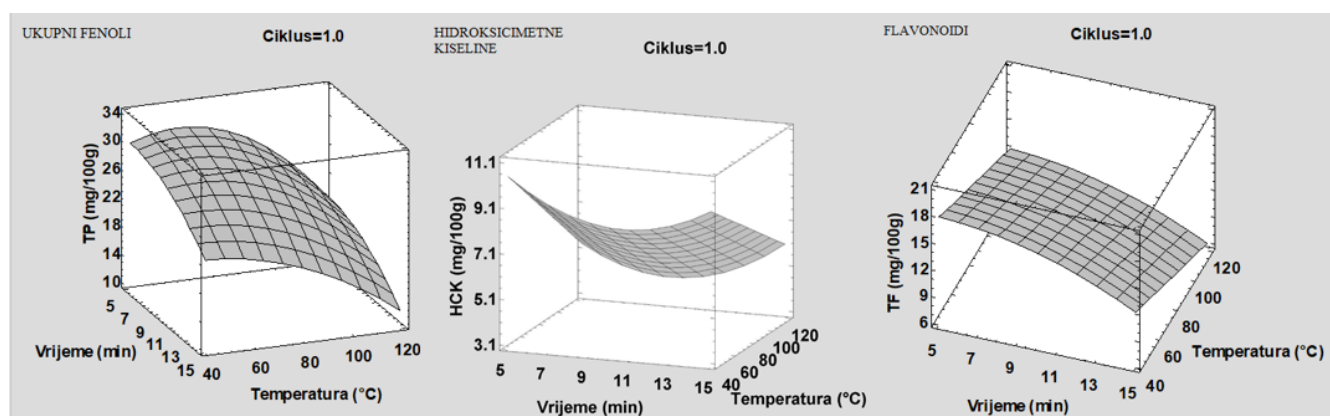
<b>Kombinirani ekstrakcijski parametri</b>	<b>n</b>	<b>Ukupni fenolni spojevi</b>	<b>Ukupni flavonoidi</b>	<b>Ukupne hidroksicimetne kiseline</b>
Temperatura (°C) × statičko vrijeme (min)		p=0.02 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>
40,5	6	27.79±0.84 <sup>a</sup>	16.08±0.21 <sup>a</sup>	9.05±0.08 <sup>a</sup>
40,10	6	27.38±0.84 <sup>b</sup>	16.27±0.21 <sup>a</sup>	8.92±0.08 <sup>a</sup>
40,15	6	22.20±0.84 <sup>c</sup>	13.57±0.21 <sup>b</sup>	8.63±0.08 <sup>b</sup>
80,5	6	24.37±1.81 <sup>a</sup>	13.29±0.28 <sup>a</sup>	7.54±0.12 <sup>a</sup>
80,10	6	23.32±1.81 <sup>b</sup>	13.19±0.28 <sup>a</sup>	5.99±0.12 <sup>b</sup>
80,15	6	17.09±1.81 <sup>c</sup>	9.84±0.28 <sup>b</sup>	7.25±0.12 <sup>a</sup>
120,5	6	15.93±0.66 <sup>a</sup>	11.85±0.10 <sup>a</sup>	4.08±0.05 <sup>b</sup>
120,10	6	14.56±0.66 <sup>b</sup>	10.23±0.10 <sup>b</sup>	4.34±0.05 <sup>b</sup>
120,15	6	12.51±0.66 <sup>c</sup>	7.33±0.10 <sup>c</sup>	5.18±0.05 <sup>a</sup>
Temperatura (°C) × broj ciklusa		p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>	p≤0.01 <sup>†</sup>
40,1	6	27.16±0.62 <sup>a</sup>	15.98±0.21 <sup>a</sup>	9.00±0.09 <sup>b</sup>
40,2	6	26.49±0.62 <sup>a</sup>	14.53±0.21 <sup>b</sup>	9.30±0.09 <sup>a</sup>
40,3	6	23.72±0.62 <sup>a</sup>	15.42±0.21 <sup>a</sup>	8.30±0.09 <sup>c</sup>
80,1	6	25.47±1.87 <sup>a</sup>	11.7±0.28 <sup>b</sup>	7.51±0.09 <sup>a</sup>
80,2	6	21.27±1.87 <sup>a,b</sup>	12.77±0.28 <sup>a</sup>	7.08±0.09 <sup>b</sup>
80,3	6	18.05±1.87 <sup>b</sup>	11.86±0.28 <sup>b</sup>	6.19±0.09 <sup>c</sup>
120,1	6	15.98±0.74 <sup>a</sup>	10.81±0.10 <sup>a</sup>	5.17±0.09 <sup>a</sup>
120,2	6	13.32±0.74 <sup>b</sup>	8.56±0.10 <sup>c</sup>	4.77±0.09 <sup>b</sup>
120,3	6	13.70±0.74 <sup>b</sup>	10.04±0.10 <sup>b</sup>	3.66±0.09 <sup>c</sup>
Mean ± SE*	54	20.57±0.21	12.41±0.70	6.77±0.03

\*srednje vrijednosti ± standardna greška

Dobiveni rezultati u skladu su i s rezultatima istraživanja Putnika i sur. (2017) koji su u interakcijama temperatura×statičko vrijeme i temperatura×broj ciklusa također utvrdili trend smanjenja prinosa fenolnih spojeva izoliranih ASE ekstrakcijom iz lista masline uz porast vrijednosti navedenih ekstrakcijskih parametara.

#### 4.3. OPTIMIRANJE POSTUPKA ASE EKSTRAKCIJE ZA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA BOROVICE

Na temelju provedene statističke analize primjenom linearne regresije, pristupilo se postupku optimiranja postupka ASE ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda borovnice metodom odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, *RSM*) (Slika 8). Ovom metodom moguće je istovremeno razmatrati utjecaje više varijabli, pri čemu se odziv sustava odnosi na glavne utjecaje i međusobnu interakciju faktora. Tako se mogu iznaći empirijske zakonitosti koje u najmanjoj ili najvećoj mjeri utječu na sam odziv sustava (Tablica 9). Po provedenoj RSM analizi utvrđena je signifikantnost faktora (parametri ASE ekstrakcije) te odnos između odziva (ukupni fenoli, ukupne hidroksicimetne kiseline, ukupni flavonoidi), tj. pronađena je optimalna kombinacija faktora koja ishoduje najveći ili najmanji odziv.



**Slika 8.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za prinose ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonoida u ovisnosti o parametrima ASE ekstrakcije

**Tablica 9.** Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenti determinacije za ukupne fenole, hidroksicimet nusproizvoda borovnice dobivenih ASE ekstrakcijom

Varijabla	Model
UF	$3.71111 + 1.20783 \cdot \text{Vrijeme} + 12.7151 \cdot \text{Ciklus} + 0.851668 \cdot \text{Temperatura} - 0.0708154 \cdot \text{Vrijeme}^2 + 0.296419 \cdot \text{Ciklus}^2 + 0.0278092 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Temperatura} - 2.56547 \cdot \text{Ciklus}^2 - 0.356493 \cdot \text{Ciklus} \cdot \text{Temperatura} - 0.0055497 \cdot \text{Temperatura}^2 + 0.0320683 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Ciklus} \cdot \text{Temperatura} + 0.000173807 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Temperatura}^2 + 0.0 \cdot \text{Ciklus}^2 \cdot \text{Temperatura} + 0.00142637 \cdot \text{Ciklus} \cdot \text{Temperatura}^2$
HCK	$22.0079 - 2.10012 \cdot \text{Vrijeme} - 3.79478 \cdot \text{Ciklus} - 0.0731053 \cdot \text{Temperatura} + 0.0974393 \cdot \text{Vrijeme}^2 + 0.758957 \cdot \text{Ciklus}^2 + 0.00189167 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Temperatura} + 0.0 \cdot \text{Vrijeme}^2 \cdot \text{Ciklus} - 0.0379478 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Ciklus} \cdot \text{Temperatura}$
FL	$29.1108 - 0.543591 \cdot \text{Vrijeme} - 12.1011 \cdot \text{Ciklus} - 0.0688243 \cdot \text{Temperatura} - 0.0493858 \cdot \text{Vrijeme}^2 + 1.21011 \cdot \text{Ciklus}^2 + 2.65265 \cdot \text{Ciklus}^2 - 0.265265 \cdot \text{Vrijeme} \cdot \text{Ciklus}^2$

UF = ukupni fenoli (mg/100 g)

HCK = hidroksicimetne kiseline (mg/100 g)

FL=flavonoidi (mg/100 g)

**Tablica 10.** Optimalni uvjeti ASE ekstrakcije za proizvodnju ekstrakata nusproizvoda borovnice s najvećim masenim udjelima ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonoida (mg/100 g)

Parametri ASE ekstrakcije	Optimalni uvjeti ASE ekstrakcije			
	Optimalni prinos	Ukupni fenoli	Hidroksicimetne kiseline	Flavonoidi
Statičko vrijeme	5	5	5	5
Ciklus ekstrakcije	1	1	1	1
Temperatura	40	40	40	59,74
Optimalni maseni udio (mg/100 g)	31.19	10.45	10.45	17.68

Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da su optimalni uvjeti ASE ekstrakcije za dobivanje ekstrakta nusproizvoda borovnice najvišeg udjela ukupnih fenola (31,19 mg/100 g) i hidroksicimetnih kiselina (10,45 mg/100 g) podrazumijevali temperaturu od 40 °C, statičko vrijeme od 5 min te jedan ekstrakcijski ciklus (Tablica 10). Ipak, za dobivanje ASE ekstrakata nusproizvoda borovnice najvišeg udjela flavonoidnih spojeva, ASE ekstrakciju je potrebno provoditi pri višoj temperaturi (59,74 °C) također uz statičko vrijeme od 5 minuta te jedan ekstrakcijski ciklus. Obzirom da nusproizvod borovnice obiluje različitim spojevima iz skupine flavonoida, te da su oni kudikamo zastupljeniji od hidroksicimetnih kiselina, viša temperatura ASE ekstrakcije vjerojatno pogoduje/rezultira i bržom difuzijom te boljom topljivošću šireg spektra analita u vodi, stoga je vjerojatno da je za bolju izolaciju flavonoida ASE ekstrakcijom pogodovala viša temperatura (Plaza i sur., 2015).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE ekstrakcije) iz nusproizvoda borovnice *Vaccinium myrtillus* L., zaostalog nakon proizvodnje soka, izolirani su fenolni spojevi te su HPLC-DAD metodom identificirani i kvantificirani spojevi iz skupina flavonoida (katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-galaktozid) i hidroksicimetnih kiselina (klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska).
2. U vodenim ekstraktima nusproizvoda borovnice flavonoidi su bili gotovo dvostruko više zastupljeni u usporedbi s hidroksicimetnim kiselinama (12,70 mg/1000 g naspram 6,80 mg/100 g).
3. Derivati kvercetina određeni su u najvećim udjelima (kvercetin-3-galaktozid 32 % i kvercetin-3-rutinozid 31 %), zatim klorogenska i kafeinska kiselina u istim udjelima (13 %), dok su preostali spojevi zastupljeni u niskim udjelima (ferulinska kiselina 5 %, *p*-kumarinska kiselina 4 %, katehin 2 %).
4. Multivarijantnom statističkom analizom pokazano je da se povećanjem temperature, statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije značajno smanjuje prinos svih fenolnih spojeva (promatanih kao suma svih kvantificiranih fenolnih spojeva, kao suma svih kvantificiranih spojeva iz skupine flavonoida te kao suma svih kvantificiranih spojeva iz skupine hidroksicimetnih kiselina) ( $p \leq 0,05$ ).
5. Optimalni uvjeti ASE ekstrakcije koji rezultiraju vodenim ekstraktima nusproizvoda borovnice najvišeg udjela ukupnih fenola (31,19 mg/100 g) i hidroksicimetnih kiselina (10,45 mg/100 g) uključivali su slijedeće parametre ekstrakcije: temperatura 40 °C, statičko vrijeme 5 min te jedan ekstrakcijski ciklus. Optimalni uvjeti ASE ekstrakcije za dobivanje ekstrakata najvišeg udjela flavonoida uključivali su isto statičko vrijeme i ciklus ekstrakcije, no višu temperaturu (59,74 °C) ( $p \leq 0,05$ ).
6. ASE ekstrakcija uz destiliranu vodu kao ekstrakcijsko otapalo pokazala se dobrom ekstrakcijskom tehnikom za valorizaciju nusproizvoda borovnice.

## 6. LITERATURA

1. Aaby, K., Grimmer, S., Holtung, L. (2013) Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *Food Sci. Tech.* **54**, 257-264.
2. Alexandre, E. M. C., Castro, L. M. G., Moreira, S. A., Pintado, M., Saraiva, J. A. (2017) Comparison of emerging technologies to extract high-added value compounds from fruit residues: Pressure- and electro-based technologies. *Food Eng. Rev.* **9** (3), 190-212.
3. Ameer, K., Shahbaz, H. M., Kwon, J.-H. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci.* **16** (2), 295-315.
4. Baby, B., Antony, P., Vijayan, R. (2017) Antioxidant and anticancer properties of berries. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi: 10.1080/10408398.2017.1329198
5. Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., de Souza Sant'Ana, A., Orlie, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **49**, 96–109.
6. Bozan, B., Altinay, R. C. (2014) Accelerated solvent extraction of flavan-3-ol derivatives from grape seeds. *Food Sci. Technol. Res.* **20** (2), 409-414.
7. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56** (11), 317-333.
8. Bujor, O.-C., Le Bourvellec, C., Volf, I., Popa, V. I., Dufour, C. (2016) Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chem.* **213**, 58-68.
9. Bunea, A. B., Rugina, D., Pintea, A., Andrei, S., Bunea, C., Pop, R., Bele, C. (2012) Carotenoid and fatty acids profiles of bilberries and cultivated blueberries from Romania. *Chem. Pap.* **66**, 935–939.
10. Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., Putnik, P. (2018) Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **254**, 150-157.
11. Cardeñosa, V., Girones-Vilaplana, A., Muriel, J.L., Moreno, D.A., Moreno-Rojas, J.M. (2016) Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chem.* **202**, 276-283.

12. Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., Paolicelli, P. (2017) Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chem.* **232**, 114-123.
13. Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., Paolicelli, P. (2017) Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chem.* **232**, 114-123.
14. Chemat, F., Huma, Z., Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **18** (4), 813-835.
15. Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., Clark, J. R. (2005) Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agr.* **84** (13), 1771-1782.
16. Colak, N., Torun, H., Gruz, J., Strnad, M., Subrtova, M., Inceer, H., Ayaz, F. A. (2016) Comparison of phenolics and phenolic acid profiles in conjunction with oxygen radical absorbing capacity (ORAC) in berries of *Vaccinium arctostaphylos* L. and *V. myrtillus* L. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **66** (2), 85-91.
17. Correia, R., Grace, M. H., Esposito, D., Lila, M. A. (2017) Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: Comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food Chem.* **235**, 76-85.
18. Da Fonseca Machado, A. P., Duarte Pereira, A. L., Fernández Barbero, G., Martínez, J. (2017) Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chem.* **231**, 1-10.
19. Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.
20. Davis, L., Jung, J., Colonna, A., Hasenbeck, A., Gouw, V., Zhao, Y. (2018) Quality and consumer acceptance of berry fruit pomace–fortified specialty mustard. *J. Food Sci.* **83** (7), 1921-1932.
21. de Cássia Gomes Rocha, J., Ramalho Procopio, F., Corrêa Mendonca, A., Marques Vieira, L., Tuler Perrone, Í, Ribeiro de Barrosi, F. A., Stringheta, P. C. (2018)

- Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis M.*) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Sci. Tech.* **38** (1), 45-53.
22. Djekic, I., Sanjuán, N., Clemente, G., Jambrak, A. R., Djukić-Vuković, A., Vrablič Brodnjak, U., Pop, E., Thomopoulos, R., Tonda, A. (2018) Review on environmental models in the food chain - current status and future perspectives. *J. Clean Prod.* **176**, 1012-1025.
  23. Drózdź, P., Šežienė, V., Pyrzynska, K. (2017) Phytochemical properties and antioxidant activities of extracts from wild blueberries and lingonberries. *Plant Foods Hum. Nutr.* **72** (4), 360-364.
  24. Dujmović Purgar, D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S., Duralija, B. (2007) Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Polmologia Croatica* **13** (4), 219-228.
  25. Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A. (2016) The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2):160. doi:10.3390/ijms17020160
  26. Fidaleo, M., Lavecchia, R., Zuorro, A. (2016) Extraction of bioactive polyphenols with high antioxidant activity from bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) processing waste. *Orient. J. Chem.* **32** (2), 759-767.
  27. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018) FAOSTAT Data Base <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>, Pristupljeno 16. veljače 2019.
  28. Gook Kim, J., Kim, H. L., Kim, S. J., Park, K.-S. (2013) Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea. *J. Zhejiang Univ-Sc. A.* **14** (9), 793-799.
  29. Granato, D., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Sousa Santos, J., Calado, V., Silva Rocha, R., Gomes Da Cruz, A., Jarvis, B., Ye Rodionova, O., Pomerantsev, A. (2018) Trends in chemometrics: Food authentication, microbiology, and effects of processing. *Compr. Rev. Food Sci.* **17** (3), 663-677.
  30. Grover, A. K., Samson, S. E. (2013) Antioxidants and vision health: facts and fiction. *Mol. Cell. Biochem.* **388**, 173-183.
  31. Heffels, P., Weber, F., Schieber, A. (2015) Influence of accelerated solvent extraction and ultrasound-assisted extraction on the anthocyanin profile of different *Vaccinium* species in the context of statistical models for authentication. *J. Agric. Food Chem.* **63** (34), 7532-7538.



32. Heinonen, M. (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* **51** (6), 684-691.
33. Hidalgo, G.-I., Almajano, M. P. (2017) Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A Review. *Antioxidants* **6** (7), 1-27. doi:10.3390/antiox6010007
34. Höglund, E., Eliasson, L., Oliveira, G., Almlı, V. L., Sozer, N., Alming, M. (2018) Effect of drying and extrusion processing on physical and nutritional characteristics of bilberry press cake extrudates. *Food Sci. Techn.* **92**, 422-428.
35. Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**, 339-346.
36. Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
37. Kalt, W., McDonald, J. E., Ricker, R. D., Lu, X. (1999) Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. *Can. J. Plant Sci.* **79** (4), 617-623.
38. Kerbstadt, S., Eliasson, L., Mustafa, A., Ahrné, L. (2015) Effect of novel drying techniques on the extraction of anthocyanins from bilberry press cake using supercritical carbon dioxide. *Innov. Food Sci. Emerg.* **29**, 209-214.
39. Khan, S. A., Aslam, R., Makroo, H. A. (2018) High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J. Food Process. Eng.* **42** (1): e12896
40. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **61** (1):1361779.
41. Kim, J. G., Kim, H. L., Kim, S. J., Park, K.-S. (2013) Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea. *J. Zhejiang Univ-Sci. B (Biomed & Biotechnol)* **14** (9), 793-799.
42. Kim, M. K., Kim, M.-Y., Lee, K.-G. (2017) Categorization of fruits according to their content of polyphenols and vitamin C, antiradical activity, and quality parameters. *J. Food Process. Pres.* e13421.
43. Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Barba, F. J. (2015) Current and new insights in the sustainable and green

- recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Agr. Food Chem.*, **63** (31), 6835–6846.
44. Luchese, C. L., Uranga, J., Corralo Spada, J., Tessaro, I. C., de la Caba, K. (2018) Valorisation of blueberry waste and use of compression to manufacture sustainable starch films with enhanced properties. *Int. J. Biol. Macromol.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.162
  45. Malik, A. U., Hamilton, J. (2017) Harvest date and storage effect on fruit size, phenolic content and antioxidant capacity of wild blueberries of NW Ontario, Canada. *J. Food Sci. Tech.* **54** (6), 1545-1554.
  46. Medina, M. B. (2011) Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J. Funct. Foods.* **3** (2), 79-87.
  47. Michalska, A., Łysiak, G. (2015) Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *Int. J. Mol. Sci.* **16** (8), 18642-18663.
  48. Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2014) A comparison of fruit quality parameters of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) growing at different locations. *J. Sci. Food Agric.* doi: 10.1002/jsfa.6897
  49. Mitić, M. N., Obradović, M. V., Kostić, D. A., Micić R. J., Pecev, E. T. (2012). Polyphenol content and antioxidant activity of sour cherries from Serbia. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quart.* **18** (1), 53-62.
  50. Mottaleb, M.A., Sarker, S.D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, 3.izd., (Sarker, S.D., Nahar, L., ured.), Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87.
  51. Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta.* **703** (1), 8-18.
  52. Nagarajan, J., Ramanan, R. N., Raghunandan, M. E., Galanakis, C. M. (2017) Carotenoids. U: Nutraceutical and Functional Food Components. Effects of Innovative Processing Techniques (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press, str. 259–296.
  53. Nestby, R., Percival, D., Martinussen, I., Opstad, N., Rohloff, J. (2011) The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation. A Review. *The Eur. J. Plant. Sci. and Biotechnol.* **5** (1), 5-16.

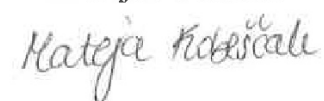
54. Okan, O. T., Deniz, I., Yayli, N., Şat, I. G., Öz, M., Hatipoglu Serdar, G. (2018) Antioxidant activity, sugar content and phenolic profiling of blueberries cultivars: a comprehensive comparison. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **46** (2), 639-652.
55. Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F., Martínez, J. (2014) Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. *J. Supercrit. Fluid.* **95**, 8-16.
56. Panja, P. (2017) Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Curr. Opin. Food Sci.* **23**, 173-182.
57. Perez, C., Tagliani, C., Arcia, P., Cozzano, S., Curutchet, A. (2017) Blueberry by-product used as an ingredient in the development of functional cookies. *Food Sci. Technol. Int.* **24** (4), 301-308.
58. Plaza, M., Turner, C. (2015) Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trend. Anal. Chem.* **71**, 39-54.
59. Putnik, P., Barba, F. J. Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food. Bioprod. Process.* **106**, 19-28.
60. Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Penić, M., Fegeš, M., Dragović-Uzelac, V. (2016) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian sage leaves for the optimal yield of polyphenols: HPLC-DAD identification and quantification. *Food Anal. Method.* **9** (8), 2385-2394.
61. Rodriguez-Mateos, A., Heiss, C., Borges, G., Crozier, A. (2014) Berry (poly)phenols and cardiovascular health. *J. Agric. Food Chem.* **62** (18), 3842–3851.
62. Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J., Jiang, Y. (2008) Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* **9** (7), 1333-1341.
63. Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R. K. (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Chem.* **177**, 369-375.
64. Salaheen, S., Nguyen, C., Hewes, D., Biswas, D. (2014) Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Control.* **46**, 174-181.
65. Shahid, M., Yusuf, M., Mohammad, F. (2015) Plant phenolics: A Review on modern extraction techniques. U: *Recent Progress in Medicinal Plants: Vol. 41- Analytical and*

- Processing Techniques (Govil, J. N., Pathak, M., ured.) Studium Press LLC, USA, str. 265-287.
66. Shi, M., Loftus, H., McAinch, A.J., Su, X.Q. (2017) Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. *J. Funct. Foods.* **30**, 16-29.
67. Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., Pintado, M. M. E. (2017) Production of a food grade blueberry extract rich in anthocyanins: selection of solvents, extraction conditions and purification method. *J. Food Meas. Charact.* **11** (3), 1248-1253.
68. Struck, S., Plaza, M., Turner, C., Rohm, H. (2016) Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *Int. J. Food Sci. Techn.* **51**, 1305-1318.
69. Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A. (2012) Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *J Chromatogr. A.* **1237**, 1-23.
70. Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008) Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **63** (4), 147-156.
71. Ting, X., Zhenghong, G., Baoshan, S., Yuging, Z. (2017) identification of anthocyanins from four kinds of berries and their inhibition activity to  $\alpha$ -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B by HPLC–FT-ICR MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **65** (30), 6211-6221.
72. Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason. Sonochem.* **17** (3), 598-604.
73. Tokuşoğlu, Ö. (2016) Effect of high hydrostatic pressure processing strategies on retention of antioxidant phenolic bioactives in foods and beverages – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **66** (4), 243-251.
74. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2018) USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy Release <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2166?fgcd=&man=&facet=&count=&max=35&sort=&qlookup=09050&offset=&format=Full&new=&measureby=>>>, Pristupljeno 20. listopada 2018.
75. U.S. Department of Agriculture, Index of Species Information (2018) USDA <<https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/vacmyr/all.html>>, Pristupljeno 20. listopada, 2018.

76. Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Trost, K., Junttila, O., Haggman, H., Martinussen, I. (2012) Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *J. Agr. Food Chem.* **60**, 10406–10414.
77. Vrhovsek, U., Masuero, D., Palmieri, L., Mattivi, F. (2012) Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **25**, 9-16.
78. Yang, B., Ahotupa, M., Määttä, P., Kallio, H. (2011) Composition and antioxidative activities of supercritical CO<sub>2</sub>-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res. Int.* **44**, 2009–2017.
79. Yuan, W. (2011) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of *Vaccinium* L. in Texas, USA. *Pharm. Crop.* **2** (1), 11-23.
80. Zhang, H., Tchabo, W., Ma, Y. (2017) Quality of extracts from blueberry pomace by high hydrostatic pressure, ultrasonic, microwave and heating extraction: A comparison study. *Emir. J. Food. Agr.* **29** (10), 815-819.
81. Zoratti, L., Klemettilä, H., Jaakola, L. (2016) Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Ecotypes. U: *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (S. J. Simmonds, M., Preedy, P. V., ured.), Elsevier Inc., Oxford, str. 83-97

*Izjavlujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Mateja Kobeščak

A handwritten signature in black ink, reading "Mateja Kobeščak". The signature is written in a cursive style with a distinct loop at the end of the last name.