

# Analitičke metode izolacije funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda kave

---

**Petek, Andreja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:169075>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij biotehnologija**

**Andreja Petek**

7282/BT

**Analitičke metode izolacije funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda kave**  
**Završni rad**

**Predmet:** Analitička kemija

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

**Zagreb, 2020.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Analitičke metode izolacije funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda kave**

**Andreja Petek, 0058209132**

**Sažetak:** Kava spada među najpopularnija pića današnjice. Tijekom proizvodnje kave i konzumacijom napitaka od kave gomila se velika količina nusproizvoda diljem svijeta. Glavni nusproizvodi su srebrna pokožica i talog zaostao nakon konzumacije napitka. Navedeni nusproizvodi bogati su izvor ugljikohidrata, lipida, proteina, fenolnih spojeva te minerala.

S ciljem valorizacije nusproizvoda i smanjenja količine otpada nusproizvodi su pronašli primjenu u raznim industrijama, a uglavnom se koriste za ekstrakciju različitih funkcionalnih spojeva. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, mikrovalovima i ultrazvukom samo su neke od, u ovom radu, opisanih metoda njihove izolacije. Osim ekstrakcijskih tehnika opisane su i analitičke metode određivanja istih, a to su UV-Vis spektrofotometrija, plinska kromatografija, visoko specifična tekućinska kromatografija te atomska apsorpcijska spektrofotometrija.

**Ključne riječi:** *analitičke metode, funkcionalni spojevi, metode ekstrakcije, nusproizvodi kave*

**Rad sadrži:** 29 stranica, 6 slika, 2 tablice, 62 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 15. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory of Analytical Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Analytical methods of isolation of functional ingredients from coffee by-products**

**Andreja Petek, 0058209132**

**Abstract:** Coffee is one of the most popular drinks nowadays. During coffee production and consumption of coffee beverages a large amount of by-products are accumulated all around the world. The main by-products of coffee are silverskin and spent coffee ground. These by-products are a rich source of carbohydrates, lipids, proteins, phenolic compounds and minerals.

With the aim of valorizing these by-products and reducing the amount of waste, by-products have found application in various industries and are mainly used for the extraction of different functional compounds. Solid-liquid extraction, Soxhlet extraction, supercritical fluid extraction, microwave- and ultrasound- assisted extractions are some of them described in this work for their isolation. Besides extraction techniques, the analytical methods for their determination are also describes, *e.g.* UV-Vis spectrophotometry, gas chromatography, high-performance liquid chromatography and atomic absorption spectrophotometry.

**Key words:** *analytical methods, functional compounds, extraction methods, coffee by-products*

**Thesis contains:** 29 pages, 6 figures, 2 tables, 62 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Assistant Professor, PhD, *Antonela Ninčević Grassino*

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Kava .....	2
2.1.1. Struktura ploda i kemijski sastav kave .....	2
2.2. Nusproizvodi industrije kave.....	3
2.2.1. Ljuska kave/pulpa.....	4
2.2.2. Srebrna pokožica .....	4
2.2.3. Otpad (talog) zaostao konzumiranjem kave.....	5
2.3. Primjena nusproizvoda industrije kave .....	6
2.3.1. Proizvodnja gljiva.....	6
2.3.2. Proizvodnja enzima.....	7
2.3.3. Proizvodnja bioetanola.....	7
2.3.4. Proizvodnja organskih kiselina.....	8
2.4. Ekstrakcija funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda industrije kave.....	8
2.4.1. Polifenoli.....	8
2.4.2. Flavonoidi.....	9
2.4.3. Lipidi .....	9
2.4.4. Kofein.....	10
2.5. Metode ekstrakcije funkcionalnih spojeva .....	10
2.5.1. Konvencionalne metode.....	11
2.5.1.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito .....	11
2.5.1.2. Soxhlet ekstrakcija .....	11
2.5.2. Nekonvencionalne metode .....	12
2.5.2.1. Ekstrakcija superkričnim fluidima .....	12
2.5.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	13
2.5.2.3. Ekstrakcija ultrazvukom.....	15
2.6. Analitičke metode detekcije funkcionalnih sastojaka.....	15
2.6.1. UV-Vis spektrofotometrija .....	15
2.6.2. Plinska kromatografija.....	17
2.6.3. Visoko specifična tekućinska kromatografija .....	18
2.6.4. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija .....	20

<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	23
<b>4. LITERATURA</b> .....	24

## 1. UVOD

Proizvodnja kave, jednog od najkonzumiranijih napitaka, zahtijeva skup tehnoloških procesa od uzgoja pa sve do pripreme napitka. Tijekom cijelog niza postupaka generiraju se nusproizvodi industrije kave koje možemo podijeliti u dvije kategorije: one nastale u zemlji proizvodnje kave, koji predstavljaju više od 50 % mase ploda kave i uključuju srebrnu pokožicu i ljuske kave, te nusproizvode proizvedene u zemljama potrošačima u koje spada talog kave zaostao nakon konzumacije napitka (Cruz i sur., 2012).

Tijekom godina, porast količine otpada izravno je povezan s porastom potrošnje kave u svijetu. Budući da su ti nusproizvodi izvrstan izvor bioaktivnih spojeva, njihova valorizacija i upotreba mogu biti od interesa za različite industrije kao što su prehrambena, farmaceutska ili kozmetička (Alves i sur., 2017). Isto tako navedeni nusproizvodi koriste se u svrhu proizvodnje gljiva, enzima, biogoriva, organskih kiselina, ali i za ekstrakciju funkcionalnih spojeva (Janissen i Huynh, 2018). Nusproizvodi industrije kave sadrže značajne količine polisaharida, proteina, minerala, lipida te polifenola (Cruz i sur., 2012).

S obzirom na mnoštvo različitih funkcionalnih spojeva sadržanih u nusproizvodima kave, u ovom radu je dan pregled metoda njihove izolacije kao i opis analitičkih metoda detekcije istih.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kava

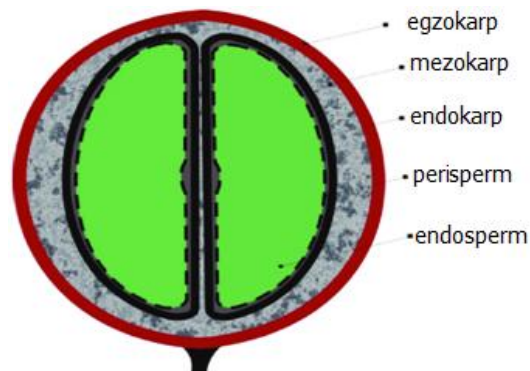
Prema Alves i sur. (2017) dolazimo do spoznaje da je kava jedno od najkonzumiranijih pića današnjice te se ističe njena važnost u cijelom svijetu. Rod *Coffea* pripada porodici Rubiaceae, te obuhvaća dvije najvažnije vrste, *Coffea arabica* L. i *Coffea canephora* Pierre poznatije kao Arabica i Robusta.

*Coffea arabica* L., s obzirom na različite sorte, zauzima oko 65 do 70 % svjetske proizvodnje kave, autogamna je biljka, a potječe iz Etiopije. *Coffea canephora* Pierre porijeklom je iz područja Gvineje pa sve do Ugande, a njen uzgoj bio je proširen na Aziju i jug Amerike. Alogamna je vrsta koja čini oko 10 do 25 % svjetske proizvodnje kave (Ferrão, 2009; Alves i sur., 2011; Alves i sur., 2017).

Najrasprostranjenija biljka kave je *Coffea arabica* koja se uzgaja na nadmorskim visinama od 900 do 1800 metara. Na nižim nadmorskim visinama uspijeva *Coffea canephora*, otporna biljka kave visokih prinosa pa je time proizvodnja jeftinija (Perry, 2013).

#### 2.1.1. Struktura ploda i kemijski sastav kave

Zrno kave (Slika 1) sastoji se od vanjske kože (egzokarp), pulpe (mezokarp), tankog polisaharidnog pokrova (endokarp), srebrne pokožice (perisperm) i dva sjemena eliptičnog oblika (Pérez-Sariñana i Saldaña-Trinidad, 2017). Zrna kave sastoje se uglavnom od endosperma koji sadrži 0,8 - 2,5 % kofeina, koji je jedan od glavnih razloga za uzgoj biljaka kave (Oliveira i sur., 2008).



**Slika 1.** Struktura ploda kave (Pérez-Sariñana i Saldaña-Trinidad, 2017).



Zelena zrno kave je plod dobiven sa stabala roda *Coffea*. Sastav sirove zelene kave obuhvaća vodu, kofein, bjelančevine, lipide, topljive ugljikohidrate, netopljive polisaharide, kiseline, trigonelin, aminokiseline i minerale (Pérez-Sariñana i Saldaña-Trinidad, 2017). Trigonelin (N-metilnikotinska kiselina) je u zelenoj kavi prisutan u količinama do 0,6 % (Belitz i sur., 2009).

Isto tako, kao i većina biljnih tkiva, zelena kava sadrži netopljive polisaharide poput celuloze i hemiceluloze (približno 50 % *w/w*). Uz to sadrži topljive ugljikohidrate, kao što su monosaharidi glukoza, fruktoza, galaktoza i arabinoza, oligosaharidi saharoze (čine više od 90 % oligosaharida u zrnu zelene kave), stahioza i rafinoza, te polimeri glukoze, manoze, arabinoze i galaktoze. Nadalje, zelena kava sadrži nehlapive alifatske kiseline (limunska i jabučna kiselina) i hlapljive kiseline kao što su propionska, octena, izovalerična, butanska, heksanska i dekanska kiselina. U važne komponente sastava ubrajaju se i ulja i voskovi (8 - 18 % suhe mase) te proteini i slobodne amino kiseline (9 - 12 % *w/w*) i minerali (3 - 5 % *w/w*) (Arya i Rao, 2007; Esquivel i Jiménez, 2012). Od minerala prevladava kalij koji je prisutan u količini od oko 1,1 %, zatim kalcij (0,2 %) i magnezij (0,2 %) (Belitz i sur., 2009). Fenolni spojevi su uglavnom pronađeni u obliku klorogenične kiseline, to jest, estera trans-cimetne kiseline i kininske kiseline (Belitz i sur., 2009; Esquivel i Jiménez, 2012). Ostali fenolni spojevi kao što su tanini, lignani i antocijanini nalaze se u manjim količinama u sjemenkama zelene kave (Farah i Donangelo, 2006; Esquivel i Jiménez, 2012). Od lipida u zelenim zrnima kave se uglavnom nalaze triacilgliceroli, steroli i tokoferoli (Speer i Kölling-Speer, 2006).

## **2.2. Nusproizvodi industrije kave**

Nusproizvodi kave uključuju proizvode dobivene obradom plodova kave nakon berbe, pečenjem kave te konzumiranjem kave (Slika 2). U navedene spadaju nezreli plodovi kave, koža i pulpa, tanki polisaharidni pokrov, srebrna pokožica i talog zaostao konzumiranjem kave (Alves i sur., 2017). Isto tako nusproizvodi sadrže velike količine organskih spojeva (masnih kiselina, lignina, celuloze, hemiceluloze i drugih polisaharida) koji opravdavaju njihovu valorizaciju (Pujol i sur., 2013).



**Slika 2.** Obrada sirovih zrna kave i generirani nusproizvodi (Alves i sur., 2017).

### 2.2.1. Ljuska kave

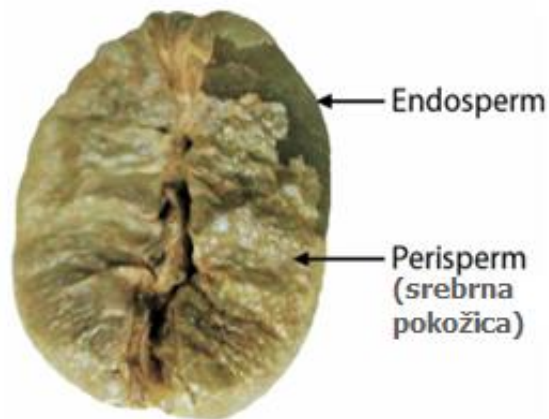
Ljuska kave je čvrsti ostatak zaostao nakon suhog postupka obrade kave, a sadrži osušenu kožu, pulpu i tanki polisaharidni pokrov u jednoj zajedničkoj frakciji (Esquivel i Jiménez, 2012; Alves i sur., 2017). Navedeni nusproizvodi su bogati ugljikohidratima (35 %), proteinima (5,2 %), vlaknima (30,8 %) i mineralima (10,7 %) (Brand i sur., 2001; Esquivel i sur. 2012). Prema Pérez-Sariñana i Saldaña-Trinidad (2017) pulpa suhe tvari od 92 % sadrži sirova vlakna (20,8 %), eterični ekstrakt (2,6 %), sirove proteine (10,7 %), dušik (49,2 %), pepeo (8,8 %), organske kiseline (12 %), tanine, kofein i trigonelin (1,8 %).

### 2.2.2. Srebrna pokožica

Srebrna pokožica (Slika 3) čini tanak sloj koji je u izravnom kontaktu sa zrnom kave te je glavni nusproizvod industrije prženja kave (Alves i sur., 2017). Srebrna pokožica, koja se naziva i perisperm, građena je od stanica sklerenhima. Smatra se da služi za nakupljanje i transport biokemijskih spojeva od perikarpa do endosperma, iako nije u potpunosti poznato koji se spojevi prenose i kako se to događa. Kako plod sazrijeva, endosperm se povećava, a perisperm postaje tanka pokožica koja se nakon sušenja, kod vrste *C. arabica*, može

djelomično odvojiti. S druge strane kod *C. canephora*, srebrna pokožica je ljepljiva i smeđe boje (Ferreira i sur., 2019).

Srebrna pokožica je bogata proteinima (19 %) i vlaknima (62 %), posebno topljivim vlaknima (86 % ukupnih prehrambenih vlakana) (Borrelli i sur., 2004). Nadalje, sadrži 18 % celuloze i 13 % hemiceluloze (Carneiro i sur., 2009; Alves i sur, 2017). Prema Napolitano i sur. (2007) sadržaj masti se kreće u rasponu od 1,6 do 3,3 % te kofeina u rasponu od 0,8 do 1,4 % (Alves i sur., 2017). Ballesteros i sur. (2014) navode da je srebrna pokožica zanimljiv izvor minerala (5 % pepela) od kojih sadrži uglavnom kalij (21100 mg/kg suhe srebrne pokožice), kalcij (9400 mg/kg), magnezij (3100 mg/kg), sumpor (2800 mg/kg), fosfor (1200 mg/kg) i željezo (843 mg/kg) uz prisutnost i ostalih.



**Slika 3.** Srebrna pokožica na zrnu *C. arabica* L. (Ferreira i sur., 2019).

### 2.2.3. Otpad (talog) zaostao konzumiranjem kave

Zrno kave čini otprilike 50 % ploda kave. Njegovom uporabom zaostaje talog, jedan od glavnih nusproizvoda u industriji kave. Talog nastaje tijekom proizvodnje napitka od kave, pri čemu se pržena mljevena zrna kave termički ili parno obrađuju kako bi se proizveo ekstrakt kave za konzumaciju. Ostatak zaostao nakon ekstrakcije je talog (Janissen i Huynh, 2017; Mussatto i sur., 2011).

Ballesteros i sur. (2014) ističu da najveći udio u talogu zauzimaju polisaharidi, točnije celuloza i hemiceluloza, koje čine oko 50 % suhe mase taloga. Manoza, galaktoza i arabinoza su glavne komponente šećera hemiceluloze, dok je glukoza glavna komponenta celuloze. Nadalje, talog je bogat ligninom i proteinima koji čine otprilike 20 % suhe mase. Talog također sadrži značajnu količinu ulja, više od 15 % suhe mase, a ostale komponente koje se

nalaze u manjim količinama su pepeo, fenolni spojevi, minerali, kofein i tanini. Također talog pokazuje i znatnu antioksidacijsku aktivnost, pri čemu se većina antioksidacijske aktivnosti pripisuje fenolnim spojevima. Klorogenična i kofeinska kiselina su najvažnije fenolne komponente ovog nusproizvoda (Maydata, 2002; Alves i sur., 2017). Isto tako među fenolnim spojevima prevladavaju kofeoil, feruloil i p-kumaroil kininske kiseline i miješani diesteri kofeinske i ferulinske kiseline s kininskom kiselinom (Farah i Donangelo, 2006; Esquivel i Jiménez, 2012).

### **2.3. Primjena nusproizvoda industrije kave**

Provedena su razna istraživanja u kojima je otpad dobiven tijekom proizvodnje kave služio kao izvor različitih biološki vrijednih spojeva. Sukladno tome trenutne primjene nusproizvoda industrije kave uključuju proizvodnju gljiva, enzima, organskih kiselina, biogoriva i gnojiva (Janissen i Huynh, 2018). Isto tako provedena su istraživanja uporabe srebrne pokožice u kozmetičkoj industriji pa je dokazano pomoću in vitro i in vivo ispitivanja da ekstrakti srebrne pokožice ne djeluju iritirajuće te se kao takvi mogu smatrati sigurnima za vanjsku primjenu (Rodrigues i sur., 2015; Alves i sur., 2017). Stoga su Rodrigues i sur. (2016) dokazali uspješnu uporabu srebrne pokožice kao kozmetički aktivnog sastojka koji daje slične rezultate kao hijaluronska kiselina u poboljšanju hidratacije i čvrstoće kože (Alves i sur., 2017). Kofein i fenolni spojevi u talogu kave, ako se odbaci u odlagališta otpada ili koristi kao gnojivo, mogu djelovati ekotoksično. Međutim izolacija istih omogućuje njihovu upotrebu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a samim time se povećava vrijednost ovog nusproizvoda kave (Cruz i sur., 2012).

#### **2.3.1. Proizvodnja gljiva**

Kod proizvodnje gljiva početni nusproizvod koji je bio od interesa za uzgoj *Flammulina velutipes* je talog zaostao proizvodnjom napitka od kave (Song i sur., 1993; Leifa i sur., 2001). Kasnije se istraživanje proširilo i na upotrebu drugih nusproizvoda, poput ljuske kave i pulpe, bogatim organskim spojevima, biološke učinkovitosti između 125 i 138 % (Leifa i sur., 2001; Velazquez-Cedeno i sur., 2002; Janissen i Huynh, 2018). Nadalje, tijekom uzgoja *F. velutipes* došlo je do povećanja sadržaja proteina u talogu kave te ljuskama (Leifa i sur., 2001) dok se, s druge strane, sadržaj kofeina i tanina smanjio bez ikakvih dokaza njihove prisutnosti u gljivama, što znači da je tijekom uzgoja došlo do njihove razgradnje. Kako kofein i tanin u prevelikim koncentracijama imaju toksično djelovanje, detoksikacija

ljuske i taloga kave je važna jer ovi spojevi ograničavaju njihovu primjenu u stočnoj hrani i bioprocima (Martínez-Carrera i sur., 2000). Prema Martínez-Carrera i sur. (2000) približno 73 % supstrata se iskoristi tijekom uzgoja gljiva, a preostali supstrat može se dalje koristiti kao kompost za proizvodnju gnojiva za tlo.

### **2.3.2. Proizvodnja enzima**

Fermentacija u čvrstom stanju (*engl.* solid-state fermentation, SSF) i potopljena fermentacija (*engl.* submerged fermentation, SmF), najčešće su metode u industrijskoj proizvodnji enzima. Inertni materijali poput industrijskih ostataka kao što su nusproizvodi industrije kave mogu se koristiti kao čvrsti nosači tijekom SSF-a. SSF je metoda koja se primjenjuje kod uzgoja gljiva, a nusproizvodi navedene metode služe kao izvor ugljika za proizvodnju enzima (Torres-Mancera i sur., 2011). Buntić i sur. (2016) ističu da proizvodnja celuloze u *Paenibacillus chitinolyticus* postiže prinos od 71 % u optimalnim uvjetima, a kao supstrat korišten je talog zaostao proizvodnjom napitka od kave. Jedan od najranijih pristupa primjene pulpe i ljuske kave bio je proizvodnja enzima kao što su pektinaza, tanaza i kofeinaza (Pandey i sur., 2000). Tako su Boccas i sur. (1994) proveli SSF koristeći pulpu kave za proizvodnju pektinaze. U soju, *Aspergillus niger* V22B35, došlo je do proizvodnje četiri puta više enzima nego u referentnom soju *A. niger* CH4.

### **2.3.3. Proizvodnja bioetanola**

Nusproizvodi industrije kave imaju odličnu primjenu u proizvodnji bioetanola. Oni čine važnu biomasu u njegovoj proizvodnji jer većinom sadrže fermentirajuće šećere kao što su manozu, glukozu i galaktozu (Choi i sur., 2012) koji su potrebni za djelovanje *Saccharomyces cerevisiae*. Tako je Machado (2009) proveo kiselinsku hidrolizu taloga zaostalog proizvodnjom napitka od kave te fermentaciju hidrolizata sa *Saccharomyces cerevisiae* postižući prinos bioetanola od 50 %. Nadalje, učinkovito iskorištenje lignoceluloze zahtijeva početni korak predobrade kako bi sirovina bila pripremljena za učinkovitu enzimsku hidrolizu. Postupak predobrade također je potreban kod nusproizvoda industrije kave jer oni sadrže visoke koncentracije hemiceluloze i lignina (Redgwell i sur., 2002; Choi, 2012).

### **2.3.4. Proizvodnja organskih kiselina**

Organske kiseline, limunska kiselina i giberelične kiseline (biljni hormon), mogu biti proizvedene korištenjem nusproizvoda industrije kave kao supstrata. Shankaranand i Lonsane (1994) koristili su SSF te mikroorganizam *Aspergillus niger* za proizvodnju limunske kiseline, a prinos je iznosio čak 82 % (Janissen i Huynh, 2018). Prema Machado i sur. (1999) dolazimo do spoznaje da je ljuska kave korištena kao izvor ugljika za proizvodnju giberelina, a primjenjene metode su SmF i SSF (Pandey i sur., 2000). Kao radni mikroorganizmi korišteno je pet sojeva *Gibberella Fujikuroi* te kao usporedba sojevi *Fusarium moniliforme*. Rezultati su pokazali proizvodnju giberelične kiseline u svim fermentiranim uzorcima (Pandey i sur., 2000).

## **2.4. Ekstrakcija funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda industrije kave**

Glavni nusproizvodi industrije kave sadrže mnoge funkcionalne spojeve pa je tako pokožica, glavni nusproizvod industrije kave, bogata fenolnim spojevima, posebno klorogeničnom kiselinom, kofeinom te melanoidinom (Mesías i sur., 2014; Martinez-Saeza i del Castillo, 2018), dok su od lipida najzastupljeniji triacilgliceroli (Toschi i sur., 2014; Alves i sur., 2017). Sljedeći vrlo važan nusproizvod je talog zaostao konzumiranjem napitka od kave čiji sastav obuhvaća polisaharide, minerale, bjelančevine i masti (Martinez-Saeza i del Castillo, 2018) u kojima prevladavaju palmitinska i linolna masna kiselina, te među fenolima klorogenična i kofeinska kiselina (Alves i sur., 2017).

### **2.4.1. Polifenoli**

Fenoli spadaju među značajne spojeve zbog njihovog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Istraživanja su pokazala da je djelovanje fenolnih spojeva povezano s njihovim antioksidacijskim svojstvima jer štite organizam od kroničnih degenerativnih bolesti poput raka te dijabetesa (Ballesteros i sur., 2014). Raznolikost fenolnih spojeva prisutnih u biljkama dovelo je do raznih načina kategorizacije fenola pa se kao takvi klasificiraju prema izvoru iz kojeg dolaze, kemijskoj strukturi te biološkim funkcijama. Prema strukturi aglikona fenolne spojeve možemo podijeliti na: flavonoide, fenolne kiseline, polifenolne amide te ostale polifenole (Tsao, 2010). Fenolni spojevi se u biljkama mogu pojaviti u topljivom obliku, ali i zajedno s dijelovima stanične stijenke kao vezani polifenoli. Kao jedan od najčešćih fenolnih spojeva u nusproizvodima industrije kave pojavljuje se klorogenična kiselina koja uz

antioksidacijsko djelovanje posjeduje i hipoglikemijska, antibakterijska, antivirusna, protuupalna i hepatoprotektivna svojstva (Mussatto i sur., 2011).

#### **2.4.2. Flavonoidi**

Flavonoidi su velika skupina strukturno srodnih heterocikličkih spojeva s fenilnim supstituentom na položaju C2 ili C3. Flavonoidi su često hidroksilirani u položajima 3, 5, 7, 3', 4' i/ili 5', a često su jedna ili više hidroksilnih skupina metilirane, acetilirane, prenilirane ili sulfatirane. U biljkama su flavonoidi često prisutni kao O- ili C- glikozidi s time da je O vezivanje flavonoida mnogo češće nego C vezivanje (de Rijke i sur., 2006). Spadaju među jednu od najvećih skupina sekundarnih metabolita te kod biljaka imaju važnu ulogu kao obrambene i signalne molekule u reprodukciji, patogenezi i simbiozi (Barz i sur., 1990; de Rijke i sur., 2006). Isto tako biljni flavonoidi su uključeni u mehanizme reakcije protiv stresa koji može biti uzrokovan povišenim UV-B zračenjem, infekcijom mikroorganizmima ili napadom biljojeda. Između ostalog utječu i na ljudsko zdravlje te zdravlje životinja zbog njihove uloge u prehrani koja se pripisuje antioksidativnim učincima te širokom rasponu antimikrobnih i farmakoloških učinaka. Mnogi različiti enzimi koji su uključeni u intracelularne signale mogu biti pod utjecajem flavonoida a osobito su zanimljivi učinci flavonoida na protein kinaze jer one izravno utječu na imunološke funkcije u domaćinu (de Rijke i sur., 2006).

#### **2.4.3. Lipidi**

Lipidi su organske molekule, a čine ih voskovi, fosfolipidi, masti i ulja i steroidi. Oni imaju brojne funkcije, a neke od njih su da služe kao skladište energije, nalaze se u sastavu staničnih membrana živih bića te učestvuju u brojnim procesima koji su važni za prijenos signala između stanica. Prema Deuel (1951) lipide dijelimo na jednostavne lipide (masti i voskovi), složene lipide (fosfolipidi, glikolipidi, sulfolipidi i aminolipidi) i derivate lipida (masne kiseline, aldehidi, ketoni, masni alkoholi, steroli, vitamini A, E, K, D, te ostali).

U jednostavne lipide spadaju ulja i masti (triacilgliceroli masnih kiselina) i voskovi (esteri viših masnih kiselina i viših masnih alkohola). Uz jednostavne lipide najčešće nailazimo i na složene lipide u koje spadaju fosfolipidi koji sadrže molekulu glicerola na koju su zatim na prvu i drugu hidroksilnu skupinu vezane dvije masne kiseline, a na trećoj je vezan fosfat na koji je vezana organska skupina. U derivate lipida spadaju masne kiseline koje nastaju kao proizvod cijepanja neutralnih lipida ili služe kao supstrat za sintezu istih,

steroli, lipokromi, vitamini (A, K, D i E), nositelji mirisa (ketoni, aldehidi, alkoholi i ugljikovodici) (Dominković, 2015). Couto i sur. (2009) spominju da su palmitinska i linolna kiseline glavne masne kiseline i svaka zauzimaju oko 35 % ukupnog sadržaja masnih kiselina u ekstrahiranom ulju iz nusproizvoda industrije kave. Isto tako u lipidnom ekstraktu nusproizvoda kave nalaze se značajne količine u mastima topivog vitamina E, tj.  $\alpha$  i  $\beta$ - tokoferola (Alves i sur., 2017).

#### **2.4.4. Kofein**

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) je alkaloid iz skupine ksantina (Tello i sur., 2011). Ovaj alkaloid je stabilan pri višim temperaturama, a njegova koncentracija u *C. canephora* približno je dvostruko veća od one u *C. arabica*. Kofein kao antagonist adenozin-receptora djeluje kao stimulans središnjeg živčanog sustava. Iako je konzumiranje kofeina povezano s povišenim kolesterolom u krvi te koronarnim bolestima postoje istraživanja koja govore da njegova konzumacija može smanjiti učestalost samoubojstava i ciroze jetre. Niski do umjereni unos kofeina uglavnom je povezan s povećanom budnošću, sposobnošću učenja te boljim raspoloženjem, ali velike doze kofeina kod osjetljivih pojedinaca mogu dovesti do negativnih učinaka (npr. anksioznost, tahikardija i nesаница) (Farah, 2012). U nusproizvodima kave kofein nalazimo u srebrnoj pokožici s vrijednostima od 0,8 do 1,4 % (Napolitano i sur., 2007) pulpi i ljuskama kave s vrijednosti oko 1,3 % suhe mase (Pandey i sur., 2000) te talogu zaostalom nakon konzumacije napitka od kave (194,0 do 787,7 mg/100 g suhe mase) (Cruz i sur., 2012).

#### **2.5. Metode ekstrakcije funkcionalnih spojeva**

Ekstrakcija je metoda razdvajanja, pročišćavanja te koncentriranja tvari, a temelj provedbe ekstrakcije iz homogenih smjesa je različita topljivost tvari u dva različita otapala koja se ne miješaju međusobno. Tvar je nakon ekstrakcije potrebno dodatno izdvojiti iz dobivene otopine otparavanjem ili kristalizacijom (Lianfu i Zelong, 2008; Blekić i sur., 2011). Kod ekstrakcije krutih tvari vrijedi da je potrebno povećati površinu djelovanja među fazama, a to se postiže homogenizacijom i usitnjavanjem. Isto tako je potrebno povećati brzinu gibanja faza te ako se poveća količina tvari potrebno je ekstrakciju voditi kroz duže vrijeme trajanja (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Podjela ekstrakcija je na konvencionalne i nekonvencionalne metode (Blekić i sur., 2011).



## **2.5.1. Konvencionalne metode**

### **2.5.1.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito**

Ekstrakcija čvrsto-kapljevito (izluživanje) znači uklanjanje sastojaka iz smjese krutih tvari dovođenjem krutog materijala u dodir s tekućim otapalom u kojemu se određeni sastojci otapaju (Andrasi i sur., 2011; Patel i sur., 2019). Svakodnevni primjer izluživanja je priprema napitka od kave pri čemu je mljevena kava čvrsta faza, a voda univerzalno otapalo (Clarke, 1987; Petracco, 2001; Lingle, 2011; Bladyka, 2014). Tijekom ekstrakcije dolazi do procesa u kojem spojevi topljivi u otapalu prelaze iz čvrste faze u otapalo, pri čemu njihova topljivost ovisi o temperaturi i vremenu ekstrakcije te agitaciji. Procesi koji se javljaju tijekom ekstrakcije su otapanje, hidroliza i difuzija (Bladyka, 2014). Mehanizam izluživanja uključuje dva koraka. Prvi korak, kontakt krutine s otapalom u kojem dolazi do otapanja sastojaka topljivih u otapalu te drugi korak, odvajanje tekućine od krutine (Patel i sur., 2019).

Tako su ovom metodom Bravo i sur. (2013) ekstrahirali fenolne spojeve iz taloga kave koristeći vodu zagrijanu na 80 °C uz vrijeme od 10 min. S druge strane Mussatto i sur. (2011) proveli su ekstrakciju čvrsto-kapljevito upotrebom metanola, a iz taloga nastalog pripremanjem napitka od kave došlo je do ekstrakcije fenolnih spojeva (klorogenične i protokatehnične kiseline) i flavonoida. Za usporedbu uspješnosti ekstrakcije koristili su vodu te zaključili da je metanol efikasnije otapalo zbog bolje topljivosti fenolnih spojeva u organskim otapalima.

### **2.5.1.2. Soxhlet ekstrakcija**

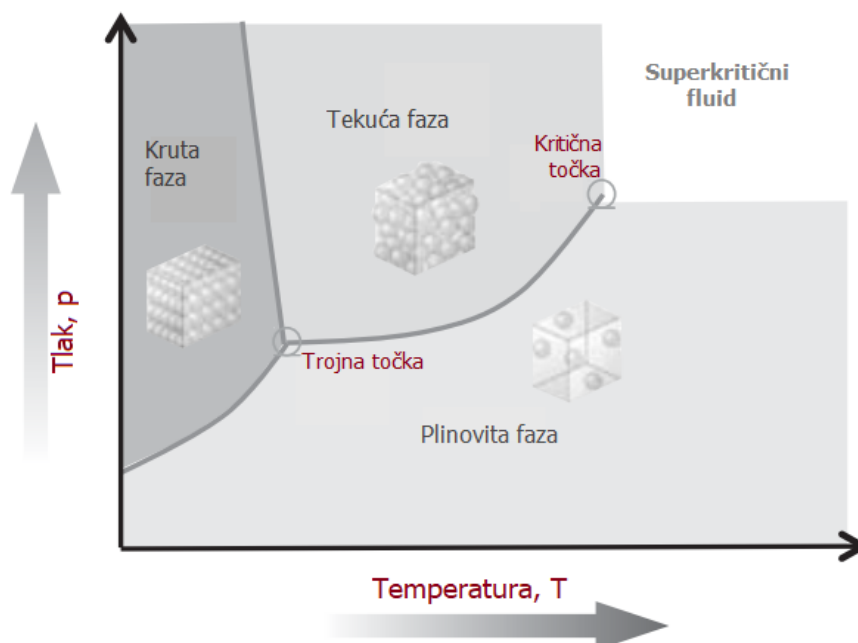
Soxhlet ekstrakcija koristi se za ekstrakciju organskih spojeva uključujući pesticide, policikličke aromatične ugljikovodike i fenole iz uzoraka (tla, povrća, biljaka) (Dean, 2009). Čvrsti materijal iz kojeg se vrši ekstrakcija spojeva stavlja se u papirnatu čahuru koja je izrađena od materijala koji zadržava čvrste tvari, ali istovremeno omogućava prolazak tekućine (djeluje kao filter papir). Papirnata čahura postavlja se u ekstraktor, a potom se organsko otapalo kao ekstrakcijsko sredstvo zagrijava, stvarajući paru, koja se prolaskom kroz hladilo kondenzira i kapa na uzorak u papirnatu čahuru. Organsko otapalo cirkulira sve dok se ne ekstrahiraju željeni spojevi iz uzorka (Patel i sur., 2019). Vremenski period provođenja Soxhlet ekstrakcije može se kretati između 8 i 48 sata, a ekstrakcija zahtijeva velike količine otapala (oko 500 mL) (Letellier i Budzinski, 1999).

Toschi i sur. (2014) proveli su ekstrakciju lipida iz srebrne pokožice, jednog od glavnih nusproizvoda industrije kave. Provedena je klasična Soxhlet ekstrakcija s n-heksanom, a kao glavni spojevi među lipidima bili su triacilgliceroli (48 % od ukupnih lipida) potom slobodne masne kiseline (21 %), esterificirani steroli (15 %), slobodni steroli (13 %) i diacilgliceroli (4 %). Što se tiče profila masnih kiselina, najzastupljenije su C18:2n-6 (29 %) i C16:0 (28 %), a zatim C22:0 i C20:0 (11 %). Osim masnih kiselina, Soxhlet ekstrakcijom su izolirani i fenolni spojevi iz taloga kave koristeći vodu na temperaturi od 100 °C u vremenu od 60 minuta (Bravo i sur., 2013).

## 2.5.2. Nekonvencionalne metode

### 2.5.2.1. Ekstrakcija superkričnim fluidima

Izraz "superkrični fluid" odnosi se na svaku tvar iznad svog kritičnog tlaka i kritične temperature (Dean, 2009). Na faznom dijagramu (Slika 4) mogu se jasno razlikovati tri regije koje odgovaraju trima agregatnim stanjima: kruto, tekuće i plinovito. Također su na dijagramu vidljive dvije karakteristične točke, a to su trojna točka gdje su čvrsta, tekuća i plinska faza u termodinamičkoj ravnoteži te kritična točka koja se nalazi na kraju krivulje isparavanja i koju karakterizira kritični tlak i temperatura (Mantell i sur., 2013).



**Slika 4.** Dijagram ovisnosti tlaka o temperaturi čiste tvari (Mantell i sur., 2013).

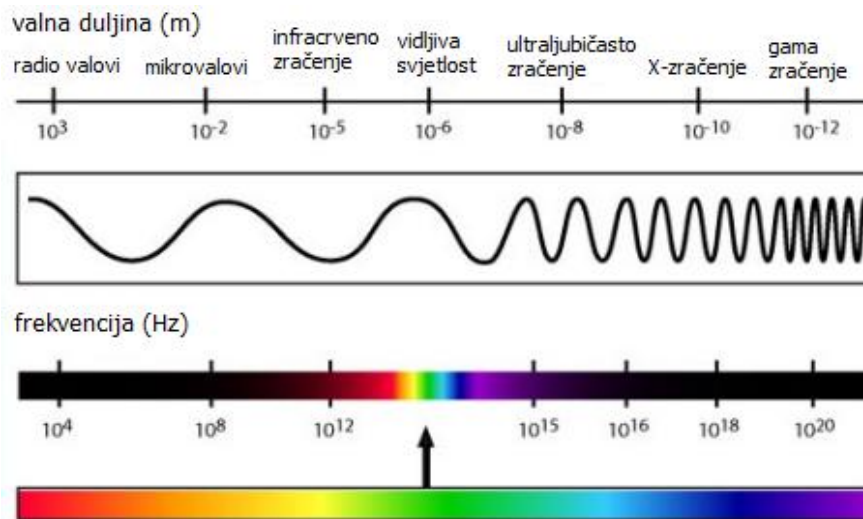
Ekstrakcija superkričnim fluidima (*engl.* Supercritical fluid extraction, SFE) je postupak razdvajanja jedne komponente iz smjese koristeći superkrični fluid kao otapalo za

ekstrakciju, a većinom se koristi za ekstrakciju sastojaka u čvrstim uzorcima. Kao superkritični fluid najviše se koristi ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>), koji ponekad može biti modificiran dodatkom etanola ili metanola. Uvjeti ekstrakcije za superkritični CO<sub>2</sub> su iznad kritične temperature od 305 K i kritičnog tlaka od 78 bara, međutim dodavanje modifikatora može neznatno izmijeniti navedene uvijete. Ugljični dioksid je siguran, jeftin, nezapaljiv i netoksičan (Arai i sur., 2002; Gupta i Shim, 2007; Ahangari i Sargolzaei, 2013). Vrijeme potrebno za provođenje ekstrakcije superkritičnim fluidima je oko 30 do 60 minuta po uzorku, što je 1/3 do 1/4 vremena potrebnog za ekstrakciju konvencionalnim metodama (Patel i sur., 2019).

Couto i sur. (2009) su primijenili ekstrakciju superkritičnim fluidima za izolaciju lipida iz taloga nastalog pripremanjem napitka od kave. Ekstrakciju su provodili pri različitim vrijednostima tlaka (15,0 do 30,0 MPa) i temperature (313 do 333 K) radi praćenja utjecaja navedenih parametara na brzinu ekstrakcije lipida i njihov sastav. Uporabom SFE došlo je do izdvajanja 15,4 % lipida iz taloga nakon 3 sata ekstrakcije. Među najzastupljenijim masnim kiselinama u lipidnom ekstraktu bile su linolna i palmitinska kiselina. Superkritični CO<sub>2</sub> koristili su i Tello i sur. (2011) za ekstrakciju kofeina iz ljusaka Robusta kave.

#### **2.5.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima primjenjuje se kod različitih vrsta uzoraka (tlo, sedimenti, biljke, uzorci uzeti iz mora) za izolaciju organskih spojeva (Dean, 2009). Isto tako primjenjuje se za ekstrakciju spojeva koji predstavljaju organska onečišćenja kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, poliklorobifenili, pesticidi, herbicidi kao i ostali organski zagađivači. Mikrovalovi spadaju u elektromagnetsko zračenje (Slika 5) u rasponu frekvencija od 300 MHz do 300 GHz. Sastoje se od dva okomito oscilirajuća polja, električnog i magnetskog polja (Letellier i Budzinski, 1999).



**Slika 5.** Spektar elektromagnetskog zračenja (Anonimus).

Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima važan je odabir organskog otapala. Otapalo mora apsorbirati mikrovalno zračenje pri čemu dolazi do zagrijavanja. Efikasnost ekstrakcije i primjene otapala kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima može biti procijenjena uz pomoć vrijednosti njegove dielektrične konstante ( $\epsilon$ ) pa tako što je veća vrijednost dielektrične konstante, to je bolja sposobnost organskog otapala da se zagrije (Dean, 2009).

Za ekstrakciju se koristi sušeni biljni materijal koji iako je osušen sadrži i određeni udio vlage. Usred djelovanja mikrovalova dolazi do zagrijavanja vlage te do povećanja pritiska unutar biljne stanice. Kako tlak raste stvara se sve veći pritisak na staničnu stijenkku i daljnje povećanje tlaka dovodi do pucanja stanice, a uslijed toga sastojci stanice se izlučuju u otapalo (Patel i sur., 2019). Prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su kratko vrijeme ekstrakcije (nekoliko minuta), mogućnost korištenja polarnih i nepolarnih otapala, upotreba manjih količina otapala te visoka učinkovitost ekstrakcije (Blekić i sur., 2011).

Tako su Pavlović i sur. (2013) proveli ekstrakciju antioksidansa iz taloga kave pomoću mikrovalova uz korištenje etanola. Maksimalan i ukupan polifenolni sadržaj od 398,95 mg (ekvivalent galne kiseline)/g ekstrakta, dobiven nakon samo 40 sekundi mikrovalnog zračenja potvrdio je učinkovitost ove ekstrakcijske metode.

### **2.5.2.3. Ekstrakcija ultrazvukom**

Ekstrakcija ultrazvukom uključuje upotrebu ultrazvuka čije su frekvencije u rasponu od 20 do 2000 KHz (Patel i sur., 2019). Ultrazvuk se dijeli na dijagnostički ultrazvuk kojeg karakteriziraju ultrazvučni valovi visoke frekvencije, niskog intenziteta i niske snage te ultrazvuk visoke snage kod kojeg su ultrazvučni valovi niske frekvencije, visokog intenziteta i visoke snage. Uporabom dijagnostičkog ultrazvuka ne dolazi do fizičkih i kemijskih oštećenja materijala, a primjenjuje se u analitičke svrhe (određivanje sastava, viskoznosti ili strukture hrane) (Chemat i sur., 2004b; Krešić i sur., 2008; Blekić i sur., 2011; Drmić i Režek Jambrak, 2011). Kod upotrebe ultrazvuka dolazi do nastajanja kavitacija koje djeluju na stanične stijenke tako da omogućuju veći prolazak otapala u stanice uzorka, a prilikom pucanja staničnih stijenki sadržaj stanice stupa u direktni kontakt s otapalom (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Vinatoru, 2001).

Postoje istraživanja primjene ultrazvuka pri ekstrakciji pojedinih spojeva iz nusproizvoda industrije kave. Tako su Al-Dhabi i sur. (2016) proveli ekstrakciju fenola, flavonoida, klorogenične kiseline i protokatehnične kiseline iz taloga kave. Michail i sur. (2015) su koristili ekstrakciju ultrazvukom za izolaciju polifenola iz taloga kave djelovanjem smjese vode i glicerola, a Wen i sur. (2019) su ekstrahirali bioaktivne komponente iz srebrne pokožice vodenom otopinom metanola.

## **2.6. Analitičke metode detekcije funkcionalnih sastojaka**

### **2.6.1. UV-Vis spektrofotometrija**

Apsorpcija svjetlosti može se koristiti u analitičkoj kemiji za karakterizaciju i kvantitativno određivanje tvari. UV-Vis spektrofotometrija je tehnika koja se temelji na apsorpciji svjetlosti nepoznate tvari ili uzorka. Uzorak je osvijetljen elektromagnetskim zrakama različitih valnih duljina u vidljivom (Vis) i ultraljubičastom (UV) dijelu spektra, a ovisno o tvari dio svjetlosti se apsorbira dok se svjetlost koja nije apsorbirana prepoznaje pomoću detektora i bilježi kao funkcija valne duljine dajući UV-Vis spektar uzorka. Shodno tomu svaka tvar apsorbira svjetlost na drugačiji način te postoji jedinstven i specifičan odnos između tvari i njezinog UV-Vis spektra koji se zatim može koristiti za identificiranje ili kvantificiranje neke tvari. Kod UV-Vis spektrofotometrije koristi se spektrofotometar koji mjeri intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz otopinu uzorka u kiveti i uspoređuje ga s intenzitetom svjetlosti prije nego što prođe kroz uzorak. Glavne komponente UV-Vis

spektrofotometra su izvor svjetlosti, držač uzorka, disperzivni uređaj za odvajanje različitih valnih duljina svjetlosti (monokromator) te prikladni detektor. Detektor mjeri intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak. Svjetlost koja je prošla kroz uzorak zove se transmitirana svjetlost, a omjer intenziteta transmitirane svjetlosti ( $I$ ) i ulazne svjetlosti ( $I_0$ ) je transmitancija ( $T$ ) (1). Negativan logaritam transmitancije predstavlja apsorbanciju ( $A$ ) (2).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

$$A = -\log(T) \quad (2)$$

Nadalje, pri prolasku kroz prozirnu kivetu u kojoj se nalazi uzorak, intenzitet svjetlosti se smanjuje proporcionalno koncentraciji uzorka stoga Lambert-Beerov zakon (3) omogućuje određivanje koncentracije analita pomoću izmjerene vrijednosti apsorbancije.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b} \quad (3)$$

U navedenom zakonu  $c$  označava množinsku koncentraciju uzorka,  $b$  debljinu sloja otopine, a  $\varepsilon$  predstavlja molarni apsorpcijski koeficijent (De Caro, 2015).

Elektromagnetsko zračenje ne apsorbiraju sve vrste analita, stoga je neophodno koristiti kromogene reagense čija je zadaća takve analite prevesti u oblik pogodan za spektrofotometrijsko određivanje. Neki od kromogenih reagensa su fenol (određivanje ukupnih šećera), bakrov sulfat (određivanja ukupnih proteina), Folin-Ciocalteu reagens (određivanje fenola) te aluminijev klorid (određivanje flavonoida) (Šušić, 2020).

Bravo i sur. (2013) su prema Folin-Ciocalteu testu odredili ukupan sadržaj fenola u tekućim ekstraktima taloga kave UV-Vis spektrofotometrijom pri valnoj duljini od 765 nm, koristeći galnu kiselinu kao standard. Folin Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koje se, oksidirajući fenole, reduciraju i pri tome nastaje plavo obojenje čiji intenzitet je proporcionalan koncentraciji fenola (Singleton i sur., 1999). Rezultati su pokazali da se sadržaj ukupnih fenola u talogu kave nalazi u rasponu od 10,20 do 17,44 mg GAE (ekvivalent galne kiseline)/g suhe mase. Istim principom mjerenja, Costa i sur. (2014), odredili su da ukupan sadržaj fenola u ekstraktima srebrne pokožice iznosi 130 mg GAE/g ekstrakta. Nadalje, Andrade i sur. (2012) odredili su sadržaj fenola u ekstraktima srebrne pokožice, a vrijednosti su bile u rasponu od 0,61 do 15,1 % dok su Iriundo-DeHond i sur. (2019) odredili da maseni udio ukupnih fenola u srebrnoj pokožici iznosi 1,56 %. S

druge strane vrijednosti fenola u ekstraktima taloga kave kreću se u rasponu od 0,6 do 1,82 % (Mussatto i sur., 2011) te 0,17 do 4,54 % (Pujol i sur., 2013), što ovisi o izboru otapala za ekstrakciju. Murthy i Naidu (2010) su UV-Vis spektrofotometrijom odredili da se sadržaj polifenola u talogu kave, srebrnoj pokožici, ljuskama kave i pulpi nalazi u rasponu od 1 do 1,5 %.

Ukupan sadržaj tanina u uzorcima ekstrahiranim iz taloga nastalog konzumacijom napitka kave određen je, nakon izdvajanja tanina taloženjem s 0,04 % otopinom metil celuloze, te mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm, koristeći galnu kiselinu kao standard. Razlika između ukupnog sadržaja polifenola i polifenola određenih nakon taloženja metil celulozom odgovara frakciji tanina. Ukupan sadržaj tanina u ekstraktima taloga kave ovisi o otapalu korištenom za ekstrakciju, pa tako etanolni ekstrakt ima 0,97 % (*w/w*), vodeni ekstrakt 0,34 % (*w/w*) a ekstrakt u kojem je korišten NaOH 2,47 % (*w/w*) tanina (Pujol i sur., 2013).

## 2.6.2. Plinska kromatografija

Prvi koncept plinske kromatografije, 1941. godine, su predstavili Martin i Synge (Skoog i sur., 2013), a zbog svoje jednostavnosti, osjetljivosti i učinkovitosti opravdava svoje mjesto kao jedan od najvažnijih alata u kemiji (Rahman i sur., 2015).

Plinska kromatografija (*engl.* gas chromatography, GC) jedna je od najčešće korištenih tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. U plinskoj kromatografiji komponente isparenog uzorka se razdvajaju tijekom raspodjeljivanja između pokretne plinovite faze i tekuće ili čvrste stacionarne faze koja se nalazi u stupcu. Razlika između plinske kromatografije i većine drugih vrsta kromatografije bazira se na činjenici da mobilna faza ne stupa u interakciju s molekulama analita već je njena funkcija prijenos analita kroz kolonu (Skoog i sur., 2013).

Postoje dvije vrste plinske kromatografije, plinsko-tekuća kromatografija (*engl.* gas-liquid chromatography, GLC) koja ima široku upotrebu u svima znanstvenim područjima pa se njeno ime obično skraćuje na GC i plinsko-kruta kromatografija (*engl.* gas-solid chromatography, GSC). Kod plinsko-tekuće kromatografije mobilna faza je plin, a stacionarna faza je tekućina koja je adsorbirana na površini inertne krutine ili je na nju vezana kemijskim vezama. S druge strane kod plinsko-krate kromatografije mobilna faza je plin, a stacionarna faza je kruta tvar koja zadržava analit fizičkom adsorpcijom (Skoog i sur., 2013).

Glavne komponente sustava plinske kromatografije uključuju sustav plina nosioca, sustav za unošenje uzorka, kolone na kojoj se vrši razdvajanje i detektora. Plin koji služi kao

mobilna faza naziva se plin nosioc i on mora biti kemijski inertan. Najčešće se koristi helij, a zatim argon, dušik te vodik. Navedeni plinovi dostupni su u spremnicima koji se nalaze pod tlakom, a tijekom plinske kromatografije u sustavu plina nosioca koriste se regulatori tlaka i mjerači protoka za regulaciju protoka plina nosioca (Skoog i sur., 2013). Postupak plinske kromatografije započinje unošenjem uzorka u uređaj pomoću mikroinjektora ili automatskog injektora (*engl.* autosampler). Na samom ulazu uzorak se prevodi u plinovito stanje, miješa s mobilnom fazom te se odvodi na kolonu gdje dolazi do razdvajanja sastojaka, a zatim i njihove detekcije. Postoje različite vrste detektora koji se koriste u plinskoj kromatografiji, a to su plameno ionizacijski detektor, detektor toplinske vodljivosti te detektor zarobljavanja elektrona (Skoog i sur., 2013).

Couto i sur. (2009) primijenili su plinsku kromatografiju za određivanje sastava masnih kiselina u lipidnom ekstraktu taloga kave nakon transesterifikacije lipida na odgovarajuće metilne estere. Analizom je ustanovljeno da su najzastupljenije masne kiseline linolna i palmitinska. Šango (2020) određuje sadržaj i sastav masnih kiselina u srebrnoj pokožici, jednom od glavnih nusproizvoda industrije kave. Primijenjena metoda određivanja navedenih spojeva je plinska kromatografija koja je provedena nakon transesterifikacije ekstrakata srebrne pokožice u metilne estere masnih kiselina. Rezultati su pokazali prisutnost zasićenih masnih kiselina i to u vrijednostima 0,90 % (miristinska), 0,20 % (pentadekanska), 18,96 % (heksadekanska ili palmitinska kiselina), 0,24 % (heptadekanska), 5,13 % (stearinska kiselina), 18,43 % (eikosanoidna ili arahidska kiselina), 0,39 % (heneikozanska), 20,90 % (dokosanoidna ili behenijska kiselina), 0,39 % (heneikozanska), 0,60 % (trikožanska) te 5,10 % (lignocerinska). Nezasićene masne kiseline prisutne su u sljedećim masenim udjelima: 7,12 % (oleinska), 0,24 % (gondoična), 0,19 % (palmitoleinska), 16,03 % (linolna) te 0,67 % (linolenska).

### **2.6.3. Visoko specifična tekućinska kromatografija**

Visoko specifična tekućinska kromatografija (*engl.* High performance liquid chromatography, HPLC) je tehnika koja se koristi za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva u različitim smjesama (Kumar i sur., 2018). Koristi se u raznim područjima, u farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji, u forenzici te kliničkoj medicini za determinaciju spojeva poput antibiotika, aminokiselina, masnih kiselina, anorganskih iona, droga, otrova, metabolita u urinu i ostalih (Choudhury, 2014; Lipka i sur., 2015; Kumar i sur., 2018). HPLC je vrsta kromatografije na stupcu u kojoj otapalo teče pod visokim tlakom kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom. Razdvajanje komponenata uzorka koji prolazi



kroz kolonu zajedno sa mobilnom fazom vrši se na temelju razlika u pokretljivosti sastojaka, odnosno specifičnosti interakcija sa stacionarnom, odnosno mobilnom fazom. Postoji više izvedbi visoko specifične tekućinske kromatografije, a često se klasificiraju prema mehanizmu razdvajanja ili prema tipu stacionarne faze. Dijele se na kromatografiju tekuće-tekuće čiji je mehanizam odjeljivanja razdioba, kromatografiju tekuće-kruto kod koje je mehanizam odjeljivanja adsorpcija, ionsku kromatografiju, kromatografiju pri kojoj je mehanizam odjeljivanja razlika u veličini čestica, afinitetnu kromatografiju te kiralnu kromatografiju (Skoog i sur., 2013).

Glavni dijelovi instrumenta za provođenje visoko specifične tekućinske kromatografije uključuju spremnik mobilne faze, pumpu, injektor, kolonu, detektor i sustav za prikaz podataka (Kumar i sur., 2018). Detektor je vrlo važan dio instrumenta za HPLC jer učinkovitost visoko specifične tekućinske kromatografije ovisi o tehnici detekcije. Stoga postoje UV-Vis, fluorometrijski, elektrokemijski detektori, detektor indeksa loma te detektor s nizom fotodioda. U Tablici 1 prikazani su neki od detektora te vrste spojeva koji mogu biti detektirani s njima.

**Tablica 1.** Vrste detektora (Stubbs i sur., 1990; Kumar i sur., 2018).

Redni broj	Detektor	Vrste spojeva koji mogu biti detektirani
1.	UV-Vis i detektor s nizom fotodioda	Spojevi sa kromofornim skupinama, kao što su aromatični prstenovi ili skupina sa nizom konjugiranih dvostrukih veza
2.	Fluorometrijski detektor	Fluorescentni spojevi, obično sa spojenim prstenovima ili visoko konjugirani planarni sustavi
3.	Detektor provodljivosti	Nabijeni spojevi kao što su anorganski ioni i organske kiseline
4.	Elektrokemijski detektor	Lako oksidirajući spojevi poput kinona ili amina

Kako je kod ove metode, za postizanje razumnih brzina protoka kroz stacionarnu fazu, potrebno koristiti tlak vrijednosti i do nekoliko stotina atmosfera, aparatura je znatno

složenija te je izrađena od čvršćih materijala i skuplja za razliku od aparature korištene kod drugih vrsta kromatografija (Skoog i sur., 2013).

Visoko specifična tekućinska kromatografija korištena je kao metoda identifikacije fenola u pulpi kave. Fenolni spojevi prisutni u ovom nusproizvodu su klorogenična kiselina (5-kofeoilkinska kiselina) (42,2 % od ukupno utvrđenih fenolnih spojeva), epikatehin (21,6 %), 3,4-dikafeoilkininska kiselina, (5,7 %), 3,5-dikafeoilkinovska kiselina (19,3 %), 4,5-dikafeoilkinolinska kiselina (4,4 %), katehin (2,2 %), rutin (2,1 %), protokatehuinska kiselina (1,6 %) i ferulinska kiselina (1,0 %) (Ramirez-Martinez, 1988; Esquivel i Jiménez, 2012).

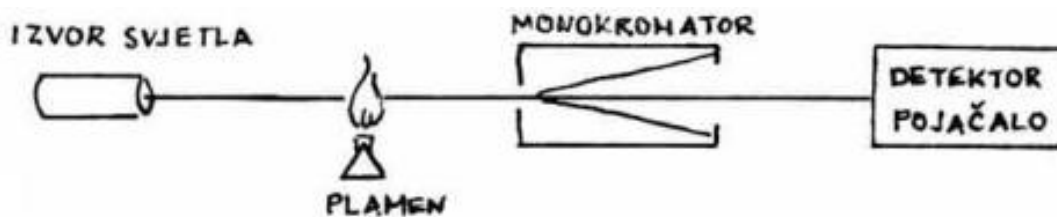
Isto tako Murthy i Naidu (2010) su koristili HPLC za identifikaciju fenola u ekstraktima pulpe, srebrne pokožice i taloga kave vodenom otopinom izopropanola. Rezultati su pokazali da je među identificiranim polifenolima najzastupljenija klorogenična kiselina s vrijednostima od 10 - 23 %. Mussatto i sur. (2011) su upotrijebili HPLC za određivanje glukoze, arabinoze, manoze, galaktoze te ksiloze u talogu kave. Navedenom metodom je određeno 46,8 % manoze, 30,4 % galaktoze, 19,0 % glukoze i 3,8 % arabinoze. S druge strane prisutnost ksiloze u talogu kave nije dokazana. Tello i sur. (2011) su koristili HPLC metodu za određivanje kofeina ekstrahiranog iz ljuske kave Robusta superkričnim CO<sub>2</sub>. Rezultati su pokazali da udio kofeina u ljuskama kave nakon ekstrakcije superkričnim CO<sub>2</sub> iznosi 1,1 %. Cruz i sur. (2012) HPLC analizom odredili su količinu kofeina i klorogenične kiseline u talogu espresso kave. Količina kofeina u uzorku iznosila je 452,6 mg/100 g suhe mase dok je količina klorogenične kiseline bila u rasponu od 212,1 do 765,6 mg/100 g suhe mase od kojih je 5-O-kafeoil kininska kiselina pojedinačno kvantificirana te se njena količina kreće u rasponu od 39,7 do 264,2 mg/100 g suhe mase tvari.

#### **2.6.4. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija**

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) je analitička metoda koja se koristi za određivanje kemijskih elemenata u uzorku. Atom, ion ili molekula prelaze u pobuđeno stanje kada se dovede određena količina energije pri kojoj prelaze s niže na višu energetska razinu. U slučaju kada je takvo stanje nestabilno višak energije će se osloboditi u obliku zračenja, a različite frekvencije zračenja dati će emisijski spektar koji je karakterističan za neku supstancu. S druge strane, ako je viša energetska razina stabilnija u odnosu na nižu tada će se apsorbirati određene frekvencije energije koja je dovedena i time će se dobiti apsorpcijski spektar supstance (Đorđević i Maćej, 1982). Osjetljivost metode je u području „dijelova na bilijun“ (ppb). Tijekom atomske apsorpcije mjeri se količina apsorbirane svjetlosti određene valne duljine dok svjetlost prolazi kroz atomsku paru. Atomska para potrebna za mjerenje

atomske apsorpcije dobiva se dovođenjem dovoljne količine toplinske energije do uzorka, pri čemu dolazi do disocijacije kemijskih spojeva u slobodne atome. Kako se broj atoma povećava, tako se povećava i količina apsorbirane svjetlosti te se time može kvantitativno odrediti količina kemijskog elementa u uzorku (Beaty i Kerber, 1993).

Uređaj u kojemu se provodi AAS metoda naziva se atomski apsorpcijski spektrofotometar (Slika 6) čiji su glavni dijelovi izvor zračenja, plamenik, monokromator i detektor.



**Slika 6.** Shema atomsko apsorpcijskog spektrofotometra (Đorđević i Maćej, 1982).

Princip rada temelji se da izvor svjetlosti (lampa sa šupljom katodom) emitira svjetlost koja zatim prolazi kroz plamenik dok se u isto vrijeme u plamenik usisava ispitivani uzorak. Uzorak se zatim, pod utjecajem visoke temperature, disocira na atome koji mogu apsorbirati dio emitirane energije. Iza plamenika nalazi se monokromator koji propušta određeni dio zračenja što se zatim registrira na detektoru (Đorđević i Maćej, 1982).

Pujol i sur. (2013) primijenili su atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju u određivanju kemijskih elemenata u dva različita uzorka taloga (Talog 1 i Talog 2) zaostalog nakon konzumiranja kave. Prije provedbe AAS određen je udio pepela (anorganski ostatak koji ostaje nakon spaljivanja ili potpune oksidacije organske tvari u namirnici) u talozima, a zatim je pepelu dodana 3 M klorovodična kiselina. Udio minerala određenih AAS prema Pujol i sur. (2013) prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Maseni udio kemijskih elemenata u talogu kave prema Pujol i sur. (2013).

Mineral	Talag 1 (g/kg)	Talag 2 (g/kg)
Ca	0,771	0,498
Mg	0,178	0,073
K	0,253	0,215
Na	0,329	0,627
Fe	0,326	0,147
Cu	0,046	0,039
Zn	0,012	0,010
Mn	0,033	0,029

Osim AAS danas se za potrebe multielementne analize koriste i neke druge analitičke tehnike, a među njima valja naglasiti spektrometriju masa uz induktivno spregnutu plazmu (*engl.* Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES) i optičko emisijsku spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (*engl.* Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES).

Tako su Conde i Mussatto (2016) ICP-AES analizom odredili kalij, fosfor, magnezij, sumpor i kalcij u talogu kave te srebrnoj pokožici. Pri tome je utvrđeno da je kalij najzastupljeniji element u srebrnoj pokožici (17,84 mg/g suhe tvari) i talogu kave (9,84 mg/g suhe tvari). U istraživanju, Šušić (2020) primjenom spektrometrije masa visoke razlučivosti (*engl.* High resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, HR-ICP-MS), je pokazano da su kalij i magnezij najzastupljeniji elementi u srebrnoj pokožici i talogu kave. Srebrna pokožica sadrži kalij s vrijednosti od 35 993 mg/kg i magnezij s vrijednosti od 5 298 mg/kg. Maseni udio kalija u talogu zaostalom nakon pripreme espresso kave „Karoma“ (mješavina robuste i arabike) iznosi 2 387 mg/kg te magnezija 1 263 mg/kg.

### 3. ZAKLJUČAK

1. Povećanom proizvodnjom i konzumacijom kave nakuplja se značajna količina nusproizvoda među kojima su glavni srebrna pokožica i talog zaostao konzumacijom napitka od kave.
2. Povećanje vrijednosti nusproizvoda te smanjenje količine otpada i koncentracije sastojaka koji mogu djelovati ekotoksično postiže se primjenom nusproizvoda u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.
3. Nusproizvodi kave su bogat izvor funkcionalnih spojeva, poput ugljikohidrata, proteina, lipida, fenolnih spojeva, minerala, kofeina i tanina.
4. Ekstrakcija funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda može se provesti konvencionalnim i nekonvencionalnim metodama. Zbog kraćeg vremena trajanja ekstrakcije, upotrebe manje količine otapala, mogućnosti korištenja polarnih i nepolarnih otapala te bolje učinkovitosti danas se prednost daje nekonvencionalnim metodama.
5. Osim odabira ekstrakcijske tehnike i odabir analitičke metode ima značajnu ulogu u kvalitativnom i kvantitativnom prikazu učinkovitosti ekstrakcije i izolacije ciljanog (ih) analita.
6. Tako je UV-Vis spektrofotometrijom moguće odrediti ukupan sadržaj fenola i tanina u talogu kave.
7. Plinskom kromatografijom moguće je provesti identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina u lipidnom ekstraktu taloga kave te srebrnoj pokožici.
8. HPLC tehnikom moguće je identificirati fenole u ekstraktima pulpe, srebrne pokožice i taloga kave te kofeina u ljuskama i talogu kave. Istu tehniku moguće je primijeniti i kod kvantifikacije fenolnih spojeva, među kojima valja istaknuti najzastupljeniju klorogeničnu kiselinu.
9. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija moguće je koristiti za određivanje kemijskih elemenata u srebrnoj pokožici i talogu zaostalom nakon konzumiranja napitka kave, a za potrebe multielementne analize ovih nusproizvoda moguće je upotrijebiti ICP-AES i ICP-OES analize.

#### 4. POPIS LITERATURE

- Ahangari B., Sargolzaei J. (2013) Extraction of lipids from spent coffee grounds using organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Journal of food processing and preservation* **37**: 1 - 8.
- Al-Dhabi N. A., Ponmurugan K., Maran P. (2016) Development and Validation of Ultrasound-Assisted Solid-Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Waste Spent Coffee Grounds. *Ultrasonics sonochemistry* **34**: 1 - 27.
- Alves R. C., Rodrigues F., Nunes M. A., Vinha A. F., Oliveira M. B. P. P. (2017) State of the art in coffee processing by-products. U: Handbook of Coffee Processing ByProducts, 1. izd., Galanakis C. M., ur., Academic Press, Cambridge, str. 1 - 25.
- Andrade K. S., Gonçalves R. T., Maraschin M., Ribeiro-do-Valle R. M, Martínez J., Ferreira S. R. (2012) Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta* **88**: 544 - 552.
- Anonimus, < <https://www.rfwireless-world.com/Terminology/Advantages-and-Disadvantages-of-Microwave-Frequency.html> > Pristupljeno 13. kolovoza 2020.
- Ballesteros L. F., Teixeira J. A., Mussatto S. I. (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and bioprocess technology* **7**: 3493 - 3503.
- Beaty R. D., Kerber J. D. (1993) Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry, 2. izd., The Perkin-Elmer Corporation, str. 3.
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009) Coffee, Tea, Cocoa. U: Food Chemistry, 4. izd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, str. 938 - 970.
- Bladyka E. (2014) Coffee brewing: Wetting, hydrolysis & extraction revisited, 1. izd., Specialty Coffee Association of America, str. 1 - 7.
- Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **3**: 32 - 47.
- Borrelli R. C., Esposito F., Napolitano A., Ritieni A., Fogliano V. (2004) Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 1338 - 1343.
- Bravo J., Monente C., Juániz I., De Peña M. P., Cid C. (2013) Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International* **50**: 610 - 616.

- Buntić A. V., Pavlović M. D., Antonović D. G., Šiler-Marinković S. S., Dimitrijević-Branković S. I. (2016) Utilization of spent coffee grounds for isolation and stabilization of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 cellulase by immobilization. *Heliyon* **2**: 1 - 17.
- Choi I. S., Wi S. G., Kim S. B., Bae H. J. (2012) Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresource technology* **125**: 132 - 137.
- Conde T., Mussatto S. I. (2016) Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **46**: 406 – 409.
- Couto R. M., Fernandes J., da Silva M. D. R. G., Simões P. C. (2009) Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *The Journal of supercritical fluids* **51**: 159 - 166.
- Cruz R., Cardoso M. M., Fernandes L., Oliveira M., Mendes E., Baptista P., Morais S., Casal S. (2012) Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**: 7777 - 7784.
- De Caro C. A. (2015) UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications, 1. izd., Mettler-Toledo Publication, str. 1 - 50.
- de Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**: 31 – 63.
- Dean J. R. (2009) Extraction techniques in analytical sciences, 1. izd., Wiley, str. 49 - 182.
- Deuel H. J. (1951) Chemistry of Lipids. U: The lipids: their chemistry and biochemistry, 1. izd., Interscience Publishers, str. 89 - 106.
- Dominković I. (2015) Utjecaj mikrovalnog zagrijavanja i dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ulja pistacije. Diplomski rad, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek.
- Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **2**: 22 - 33.
- Đorđević J., Maćej O. (1982) Atomska apsorpcijska spektrofotometrija i njena primjena u određivanju mineralnog sastava mlijeka. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **32**: 233 - 243.
- Esquivel P., Jiménez V. M. (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food research international* **46**: 488 - 495.

- Farah A. (2012) Coffee Constituents. U: Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, 1. izd., Chu Y. F., ur., John Wiley & Sons, str. 21 - 58.
- Farah A., Donangelo C. M. (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 23 - 26.
- Ferreira T., Shulerb J., Guimarãesb R., Farah A. (2019) Introduction to Coffee Plant and Genetics. U: Coffee: Production, Quality and Chemistry, 1. izd., Farah A., ur., The Royal Society of Chemistry, str. 3 - 25.
- Iriondo-DeHond A., Aparicio García N., Fernandez-Gomez B., Guisantes-Batan E., Velázquez Escobar F., Blanch G. P., San Andres M. I., Sanchez-Fortun S., del Castillo M. D. (2019) Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative food science & emerging technologies* **51**: 194 - 204.
- Janissen B, Huynh T. (2018) Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. *Resources, conservation and recycling* **128**: 110 - 117.
- Kumar Y., Mumtaz S. D., Ahmad M. (2018) HPLC: Principle and Maintenance with Application. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development* **2**: 1618 - 1626.
- Leifa F., Pandey A., Soccol C. R. (2001) Production of Flammulina velutipes on Coffee Husk and Coffee Spent-ground. *Brazilian archives of biology and technology* **44**: 205 - 212.
- Letellier M., Budzinski H. (1999) Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* **27**: 259 - 271.
- Mantell C., Casas L., Rodriguez M., Martinez de la Ossa E. (2013) Supercritical Fluid Extraction. U: Separation and Purification Technologies in Biorefineries, 1. izd., Ramaswamy S., Huang H. J., Ramarao B. V., ur., John Wiley & Sons, str. 79 - 100.
- Martinez-Carrera D., Aguilar A., Martinez W., Bonilla M., Morales P., Sobal M. (2000) Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. U: Coffee biotechnology and quality, 1. izd., Sera T., Soccol C., Pandey A., Roussos S., ur., Kluwer Academic Publisher, str. 471 - 488.
- Martinez-Saeza N., del Castillo M. D. (2018) Development of Sustainable Novel Foods and Beverages Based on Coffee By-Products for Chronic Diseases. U: Encyclopedia of Food Security and Sustainability, 1. izd., Ferranti P, Berry E. M., Anderson J. R., ur., Elsevier Inc, str. 307 - 315.



- Michail A., Sigala P., Grigorakisb S., Makris D. P. (2015) Kinetics of Ultrasound-Assisted Polyphenol Extraction from Spent Filter Coffee Using Aqueous Glycerol. *Chemical engineering communications* **203**: 1 - 28.
- Murthy P. S., Naidu M. M. (2010) Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and bioprocess technology* **5**: 897 - 903.
- Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2011) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and purification technology* **83**: 173 - 179.
- Mussatto S. I., Carneiro L. M., Silva J. P. A., Roberto I. C., Teixeira J. A. (2011) A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate polymers* **83**: 368 - 374.
- Mussatto S. I., Machado E. M., Martins S., Teixeira J. A. (2011) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 661 - 672.
- Napolitano A., Fogliano V., Tafuri A., Ritieni A. (2007) Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10499 - 10504.
- Oliveira L. S., Franca A. S., Camargos R. R. S., Ferraz V. P. (2008) Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology* **99**: 3244 - 3250.
- Pandey A., Soccol C. R., Nigamc P., Brand D., Mohan R., Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical engineering journal* **6**: 153 - 162.
- Patel K., Panchal N., Ingle P. (2019) Extraction Methods: Microwave, Ultrasonic, Pressurized Fluid, Soxhlet Extraction, Etc. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science* **6**: 6 - 21.
- Pavlović M. D., Buntić A. V., Šiler-Marinković S. S., Dimitrijević –Branković S. I. (2013) Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separation and purification technology* **118**: 503 - 510.
- Pérez-Sariñana B. Y., Saldaña-Trinidad S. (2017) Chemistry and Biotransformation of Coffee ByProducts to Biofuels. U: The Question of Caffeine, 1. izd., Latosińska J. N., Latosińska M., ur., IntechOpen, str. 143 - 168.

- Perry S. (2013) Knjiga o kavi , 1. izd., Algoritam. str. 16.
- Pujol D., Liua C., Gominhoc J., Olivella M. À., Fiol N., Villaescusa I., Pereirac H. (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops & Products* **50**: 423 - 429.
- Rahman M., El-Aty A. M. A., Choi J. H., Shin H. C., Shin S. C., Shim J. H. (2015) Basic Overview on Gas Chromatography Columns. U: *Analytical Separation Science*, 1. izd., Anderson J. L., Berthod A., Estévez V. P., Stalcup A. M., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 823 – 834.
- Ramirez-Martinez J. R. (1988) Phenolic Compounds in Coffee Pulp: Quantitative Determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **43**: 135 - 144.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Ravent R. M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. U: *Methods in Enzymology*, 1. izd., Elsevier Science & Technology, str. 152 – 178.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouc S. R. (2013) High-Performance Liquid Chromatography. U: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9. izd., Simpson C., Kiselica S., Landsberg A., Berardy Schwartz R., ur., Springer Berlin Heidelberg, str. 912 - 934.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouc S. R. (2013) Gas Chromatography. U: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9. izd., Simpson C., Kiselica S., Landsberg A., Berardy Schwartz R., ur., Springer Berlin Heidelberg, str. 887 - 911.
- Speer K., Kölling-Speer I. (2006) The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 201 - 216.
- Šango M. (2020) Karakterizacija funkcionalnih spojeva izoliranih iz espresso kave „Karoma“ i srebrne pokožice kao njenog nusproizvoda. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Šušić I. (2020) Kemijski sastav „Karoma“ kave i njenih nusproizvoda. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Tello J., Viguera M., Calvo L. (2011) Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *The Journal of supercritical fluids* **59**: 53 - 60.
- Torres-Mancera M. T., Cordova-López J., Rodríguez-Serrano G., Roussos S., Ramírez-Coronel M. A., Favela-Torres E., Saucedo-Castañeda G. (2011) Enzymatic Extraction

of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp. *Food technology and biotechnology* **49**: 369 - 373.

- Toschi T. G., Cardenia V., Bonaga G., Mandrioli M., Rodriguez-Estrada M. T. (2014) Coffee Silverskin: Characterization, Possible Uses, and Safety Aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 1 - 9.
- Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231 - 1246.
- Wen L., Zhang Z., Rai D., Sun D. W., Tiwari B. K. (2019) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics. *Journal of food process engineering* **42**: 1 - 11.

## **Izjava o izvornosti**

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

  
\_\_\_\_\_

Andreja Petek