

Utjecaj ultrazvučne ekstrakcije na prinos flavonoida iz osušene kore rajčice

Mlinarić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:368642>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Martina Mlinarić
0058218196**

**UTJECAJ ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE NA
PRINOS FLAVONOIDA IZ OSUŠENE KORE RAJČICE**

ZAVRŠNI RAD

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:
PRIMA H2020 GA2032, FunTomP – Functionalized Tomato Products**

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2022.

Ovaj rad financiran je sredstvima projekta PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>). FunTomP je multidisciplinarni projekt koji uključuje 16 zemalja, a koji ima za cilj preformulirati tradicionalne mediteranske proizvode od rajčice, u različite funkcionalne namirnice koristeći proteine lista (nusproizvodi prerade šećerne repe) i maslina u prahu. U projektu se koriste i nove, te ekološki prihvatljive tehnologije prerade koje će minimalno utjecati na hranjive tvari, s dodatnim zdravstvenim prednostima uz održavanje održivog ciklusa proizvoda i procesa te valoriziranjem poljoprivrednog otpada.

This work was financed by the ongoing project PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>), a multidisciplinary project involving 16 countries, that aims to reformulate traditional Mediterranean tomato products into different functional foods using leaf proteins (by-products of sugar beet processing) and olive powder and novel and eco-friendly processing technologies that will minimally affect nutrients, with extra health benefits while keeping a sustainable product and process cycle and by valorising agricultural waste.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za opće programe
Laboratorij za održiv razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj ultrazvučne ekstrakcije na prinos flavonoida iz osušene kore rajčice

Martina Mlinarić, 0058218196

Sažetak:

U ovom završnom radu ekstrahirani su flavonoidi kore rajčice primjenom ultrazvuka i toplinskih metoda pri 60 °C. Kao ekstrakcijsko otapalo koristila se deionizirana voda, 25 %-tni i 50 %-tni etanol. Udio flavonoida određivao se spektrofotometrijskim metodama. Optimizacijom uvjeta ekstrakcije ispitani su utjecaji amplitude (50, 75 i 100 %), vremena (3, 6 i 9 min) te ekstrakcijskog otapala (deionizirana voda, 25 %-tni etanol, 50 %-tni etanol) na udio ekstrahiranih flavonoida. Provedena je statistička analiza pomoću programa STATGRAPHICS. Statistički značajni ($p < 0,05$) parametri za ultrazvuk pokazali su se vrijeme i koncentracija etanola, dok se za toplinske procese ni jedan parametar nije pokazao statistički značajan. Optimalni parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dobivene su pri amplitudi od 76,23 %, vremenu 9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala, dok kod toplinskih procesa pri vremenu 7,9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola. Prinos flavonoida bio je veći korištenjem ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

Ključne riječi: kora rajčice, ultrazvuk, flavonoidi, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, toplinske metode

Rad sadrži: 29 stranica, 11 slika, 13 tablica, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Josipa Dukić, mag. ing.

Datum obrane: 11. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department for General Programmes
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Influence of ultrasound-assisted extraction on flavonoid yield from dried tomato peel

Martina Mlinarić, 0085218196

Abstract:

In this undergraduate thesis, flavonoids from tomato peel were extracted using ultrasound-assisted extraction and thermal methods at 60 °C. Deionized water, 25% and 50% ethanol were used as extraction solvent. The effects of amplitude (50, 75 and 100%), time (3, 6 and 9 min) and solvent on the content of extracted flavonoids were investigated by optimizing the extraction conditions. Statistical analysis was performed using the STATGRAPHICS program. Statistically significant ($p < 0.05$) parameters for ultrasound-assisted extraction were time and ethanol concentration, while for thermal methods none of the parameters proved to be statistically significant. Optimal ultrasonic-assisted extraction parameters were obtained at an amplitude of 76,23%, time 9 minutes and using 50% ethanol as extraction solvent, while in thermal methods optimal parameters were time 7,9 minutes and using 50% ethanol. Flavonoid yields were higher using ultrasound-assisted extraction.

Keywords: tomato peel, ultrasound, flavonoids, ultrasound-assisted extraction, thermal methods

Thesis contains: 29 pages, 11 figures, 13 tables, 25 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD

Technical support and assistance: Josipa Dukić, mag. ing.

Thesis defended: July 11, 2022

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	RAJČICA.....	2
2.2.	FLAVONOIDI.....	3
2.3.	ULTRAZVUK.....	4
2.4.	EKSTRAKCIJA.....	5
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	6
3.1.	MATERIJALI	6
3.1.1.	UZORCI	6
3.1.2.	REAGENSI	6
3.1.3.	LABORATORIJSKI UREĐAJI I PRIBOR.....	6
3.2.	METODE RADA	7
3.2.1.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM	7
3.2.2.	EKSTRAKCIJA TOPLINSKIM PROCESIMA	9
3.2.3.	METODA ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOIDA.....	9
3.2.4.	ODREĐIVANJE SUHE TVARI	11
3.2.5.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	11
4.	REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1.	REZULTATI	13
4.2.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I OPTIMIRANJE PARAMETARA.....	14
4.2.1.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM - FLAVONOIDI 0. DAN.....	14
4.2.2.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM - FLAVONOIDI 7. DAN.....	18
4.2.3.	TOPLINSKE METODE - FLAVONOIDI 0. DAN	20
4.2.4.	TOPLINSKE METODE - FLAVONOIDI 7. DAN	23
5.	ZAKLJUČCI.....	26
6.	POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Nusproizvod u prehrambenoj industriji čini dio sirovine koji zaostaje i ne koristi se za proizvodnju konačnog proizvoda. Velika količina nusproizvoda ostaje neiskorištena te završi u otpadu zbog čega je prehrambena industrija drugi po redu zagađivač okoliša, odmah nakon otpadnih voda iz kućanstva (Sharma i sur., 2021). Kod prerade voća i povrća nusproizvodi uglavnom sadrže dio kože ili koru, sjemenke i kominu. Oni su bogati izvori proteina, peptida, dijetalnih vlakana, bioaktivnih tvari poput polifenola i drugih nutritivno vrijednih sastojaka (Pattnaik i sur., 2021). Iako u svom sastavu imaju brojne nutritivno vrijedne sastojke često ostaju nedovoljno iskorištene. Grana prehrambene industrije koja se bavi preradom rajčice je također zahvaćena ovim problemom. Nusproizvod prerade rajčice čini sjemenke i koru koji se trenutno koriste kao hrana za životinje, gnojivo ili se šalju na odlagalište. Međutim još uvijek je bogata nutritivno vrijednim sastojcima kao što su karotenoidi, likopen, fenolni spojevi i flavonoidi pa bi se stoga mogli koristiti za formulaciju funkcionalne hrane, u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji umjesto kemijski sintetiziranih molekula (Trombino i sur., 2021).

Jedna od novijih metoda koja se posljednjih godina sve više koristi u prehrambenoj industriji pa tako i kod ekstrakcije je ultrazvuk. Glavne prednosti ove metode su povećanje prinosa ekstrakcije, smanjen utrošak energije i količina otapala za ekstrakciju te smanjenje vremena ekstrakcije.

Cilj ovog završnog rada bio je izolirati flavonoide primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije konvencionalnim toplinskim metodama pri 60 °C iz osušene kore rajčice te odrediti njihov udio koristeći spektrofotometrijske metode. Također će se istražiti utjecaj parametara amplitude (50 %, 75 % i 100 %), vremena (3, 6 i 9 min) i ekstrakcijskog otapala (deionizirana voda, 25 %-tni etanol i 50 %-tni etanol) na udio ukupnih flavonoida te će se utvrditi optimalni parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Rajčica

Rajčica (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je jednogodišnja biljka koja ima jestivi okrugli plod (Slika 1.) te je jedna od najrasprostranjenijih povrća na svijetu (Popović, 2018). Boja ploda varira od zelene do žute koja dalje prelazi u narančastu te crvenu, ovisno o fazi zrelosti (Ademosun i sur., 2021). Pulpa rajčice se koristi u prehrambenoj industriji kako bi se proizveo koncentrat rajčice koji dalje služi kao sirovina za proizvodnju sokova, juha od rajčica, ketchupa i brojnih drugih prehrambenih proizvoda, dok sjemenka, kora te ostatci pulpe se ne iskorištavaju i čine industrijski biootpad (Popović, 2018).



Slika 1. Svježa rajčica (Ademosun, 2021)

Najveći udio rajčice čini voda, i to čak do 93% (Wambugu, 2020). Suha tvar čini 5-10% rajčice te se pretežito sastoji od vitamina, minerala i dijetalnih vlakana. Od ugljikohidrata najzastupljeniji su glukoza i fruktoza (Wu i sur., 2022). Rajčica također sadrži brojne bioaktivne komponente od kojih su najzastupljeniji likopen i β -karoten, te polifenoli i flavonoidi (Kumar i sur., 2021).

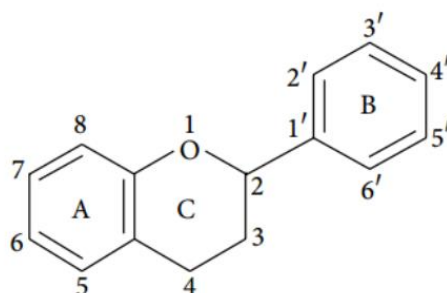
Iako industrijski biootpad rajčice nema nikakvu komercijalnu vrijednost izrazito je bogat izvor hranjivih tvari i biološki aktivnih spojeva koji su prikazani u Tablici 1 (Nour i sur., 2018). Utvrđeno je da je kora rajčice bogatiji izvor likopena i polifenolnih spojeva u odnosu na pulpu (George i sur., 2004). Sjemenke rajčice sadrže veći udio karotenoida, proteina, polifenola, mineralnih tvari i vlakna u odnosu na pulpu (Persia i sur., 2003).

Tablica 1. Udio ukupnih fenola, flavonoida, likopena i β -karotena u osušenom otpadu rajčice (Nour i sur., 2018)

Komponenta	Osušeni otpad rajčice (kora + sjemenke)
Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	1229,5 \pm 55,5
Ukupni flavonoidi (mg GAE/kg)	415,3 \pm 18,2
Likopen (mg/kg)	510,6 \pm 21,1
β -karoten (mg/kg)	95,6 \pm 3,3

2.2. Flavonoidi

Flavonoidi (slika 2.) su skupina polifenolnih spojeva koji se sastoje od 15 ugljikovih atoma koji čine dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem (Morović, 2018). Flavonoide možemo podijeliti u različite podskupine ovisno o C ugljiku na koji je vezan B prsten, stupnju nezasićenosti i oksidacije C prstena. Flavonoidi kod kojih je B prsten vezan na poziciji C3 prstena nazivaju se izoflavoni. Oni u kojima je B prsten vezan na poziciji C2 se mogu dalje podijeliti u nekoliko podskupina na temelju strukturnih značajki C prstena; te podskupine su flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli ili antocijanini (Panche i sur., 2016).



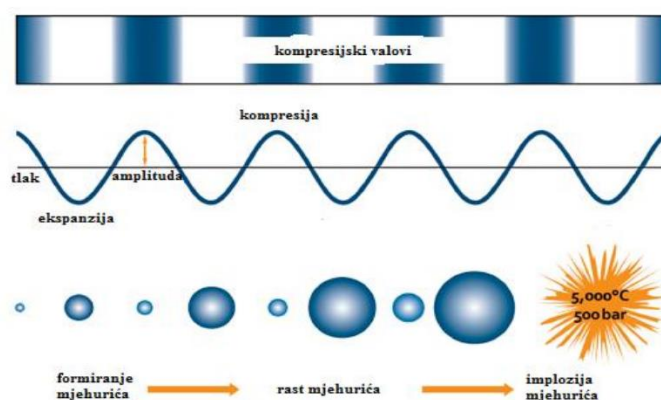
Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Morović, 2018)

Flavonoidi su odgovorni za boju i aromu nekih biljaka, oni su također sekundarni metaboliti biljaka, štite je od biotičkog ili abiotičkog stresa, kao obrana protiv nekih štetočina ili biljojeda. Zbog antioksidativnog djelovanja flavonoidi su pokazali pozitivne učinke na ljudsko zdravlje u prevenciji nekih bolesti kao što su dijabetes, Alzheimerova bolest, rak i brojne druge (Panche i sur., 2016).

2.3. Ultrazvuk

Ultrazvuk je dio zvučnog spektra čija je frekvencija iznad 18 kHz te ga naše ljudsko uho ne može detektirati (Režek Jambrak i sur, 2010). Možemo ga podijeliti u dvije kategorije: ultrazvuk niske snage te ultrazvuk visoke snage. Ultrazvuk niske snage karakteriziraju frekvencije više od 100 kHz, dok ultrazvuk visoke snage frekvencije između 18 i 100 kHz. U prehrambenoj industriji najčešće se koristi ultrazvuk visoke snage, dok se ultrazvuk niske snage koristi za ispitivanje značajki i strukture prehrambenih sustava prilikom obrade (Režek Jambrak, 2008).

Mehanizam djelovanja ultrazvuka (Slika 3.) temelji se na pojavi koja se naziva kavitacija. Ona nastaje prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij gdje nastaju longitudinalni valovi i stvaraju se područja kompresije i ekspanzije mjehurića. Mjehurići se pod utjecajem negativnog tlaka proširuju, a pod utjecajem pozitivnog tlaka naglo implodiraju (Grudenić, 2021).



Slika 3. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implzijom kavitacijskog mjehurića (Šimić, 2015)

Ultrazvuk se može generirati pomoću piezoelektričnih ili magnetostruktivnih pretvarača koji stvaraju visokoenergetske vibracije. Magnetstruktivni pretvarači rade na principu magnetostrikcije, to je svojstvo neke tvari da se uslijed svoje magnetizacije steže. Osnovni princip piezoelektričnog pretvarača je stvaranje električnih naboja na površini materijala koji je podvrgnut sili (Bhargava i sur., 2020).

Ultrazvučni uređaji mogu biti izvedeni u obliku sonde i ultrazvučne kupelji (Grudenić, 2021). Sonda se sastoji se od jednog ili više metalnih klinova koji su vezani na pretvarač. Pretvarač

osigurava intenzitet visoke snage, a klinovi su oblikovani na način da rezoniraju pri istoj frekvenciji kao i pretvarač te služe kao produžetci koji prenose zvučnu energiju (Režek Jambrak, 2008). Kod ultrazvučne kupelji ultrazvuk se generira pomoću niza ultrazvučnih pretvarača koji mogu biti pričvršćeni sa strane ili ispod dna spremnika ili može biti u obliku kutija s pojedinačnim pretvaračima (Grudenić, 2021). Ultrazvuk ima visoku primjenu u prehrambenoj industriji pri općim i specifičnim operacijama poput rezanja, filtracije, zamrzavanja, sušenja, emulgiranja, homogeniziranja (Bhargava i sur. 2020). Također djeluje na staničnu stijenkku izazivajući stres kod mikrobiološke vrste, ali bez oštećenja membrane. Međutim, dugotrajni i intenzivniji tretmani mogu izazvati kolaps mjehurića i poremetiti membranu, pridonoseći oslobađanje unutarstaničnog materijala. Zbog toga se ultrazvuk može primijeniti i kod inaktivacije mikroorganizama i enzima (Guimarães i sur., 2021).

2.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija pri kojoj se djelomično ili potpuno odjeljuju tvari koje imaju različitu topljivost u različitim otapalima. Osnovni princip ekstrakcije je pojava prijenosa mase odnosno izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari sustava koji dođu u međusobni dodir (Grudenić, 2021).

Konvencionalne metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva koje se koriste u prehrambenoj industriji koriste odgovarajuće otapalo u kombinaciji s toplinom ili miješanjem (Šimić, 2015). Najčešća otapala koja se koriste za ekstrakciju flavonoida su etanol sa različitim udjelom vode (Kumar i sur., 2020).

Sve je veća primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji pa tako i kod ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom koristi ultrazvučne valove koji uzrokuju poremećaj u biljnom tkivu. Uslijed urušavanja kavitacijskih mjehurića dolazi do fragmentacije, stvaranja pora, povećanog bubrenja u biljnim stanicama te se time lakše ekstrahiraju željene komponente iz stanice i otapalo lakše prodire u stanicu (Kumar i sur., 2020.). Na uspješnost ekstrakcije utječu brojni parametri poput amplitude, vremena ekstrakcije, količine otapala, temperature, veličine čestica i brojni drugi (Grudenić, 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja korištena je osušena i liofilizirana kora rajčice dobivena od voditelja projekta FunTomP. Podaci pripreme uzorka poznati su samo voditelju projekta te ih nije moguće javno objaviti. Uzorak se prije ekstrakcije usitnio te skladištio u laboratorijskim čašama prekrivenim aluminijskom folijom.

3.1.2. Reagensi

Za pripremu uzoraka koristili smo deioniziranu vodu, 25 %-tni etanol i 50 %-tni etanol. Za izradu baždarnog pravca korištene su standardne otopine rutina masenih koncentracija 20, 40, 60, 80 i 100 mg/L.

Reagensi koji su korišteni za određivanje ukupnih flavonoida su sljedeći: 5 %-tna otopina NaNO_2 ,

10 %-tna otopina AlCl_3 , otopina NaOH ($c=1 \text{ mol/L}$).

3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Korišteni su sljedeći uređaji:

Sjeckalica povrća

Analitička vaga (NBL-254i, Adam Equipment, Oxford, UK)

Ultrazvuk (Q700 Sonicator, Qsonica, Newtown, SAD)

Vakuum pumpa (Rocker 300, Witeg, Njemačka)

Vortex tresilica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)

Laboratorijska centrifuga (Hettich Rotofix 32A, Tuttlingen, Njemačka)

Spektrofotometar (Shimadzu UV/Vis 1700, Shimadzu Suzhou Instruments, Kina)

Ultrazvučna kupelj s grijanjem (DT 100 H, Bandelin, Njemačka)

Stakleno posuđe:

- menzure
- lijevak
- staklene čaše
- odsisna boca
- epruvete

Porculanski pribor:

- Büchnerov lijevak

Ostali pribor:

- filter papir
- automatske pipete
- kvarcne kivete
- stalak za epruvete
- alumijska folija
- špatule
- metalne žlice
- falkonice
- plastične Petrijeve posudice

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija je provedena s uređajem Ultrasonic processor Q700, SAD. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je deionizirana voda, 25 %-tni etanol i 50 %-tni etanol. Zadani su parametri ekstrakcije: amplitude (50 %, 75 % i 100 %) te vrijeme (3 min, 6 min i 9 min). Dizajn ovog eksperimenta (Tablica 2.) napravljen je u programu Statgraphics Centurion (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, Warrenton, USA). Ekstrakcija se provodi u dvije paralele te se eksperiment time sastoji se od 54 uzoraka. Eksperiment je dizajniran u multifaktoralnom dizajnu. Promatra se utjecaj varijabli (amplitude, konc. etanola i vrijeme tretmana) na udio ukupnih flavonoida.

Tablica 2. Eksperimentalni dizajn

<i>uzorak</i>	<i>vrijeme tretiranja [min]</i>	<i>amplituda [%]</i>	<i>udio etanola [%]</i>
TU1	6	50	25
TU2	3	100	25
TU3	9	50	0
TU4	3	75	25
TU5	6	75	50
TU6	3	100	50
TU7	3	50	0
TU8	3	100	0
TU9	9	75	50
TU10	3	50	50
TU11	9	100	25
TU12	6	100	0
TU13	6	100	25
TU14	6	75	0
TU15	3	50	25
TU16	6	50	50
TU17	9	50	25
TU18	9	100	0
TU19	9	50	50
TU20	9	75	0
TU21	6	75	25
TU22	3	75	0
TU23	9	75	25
TU24	9	100	50
TU25	6	50	0
TU26	6	100	50
TU27	3	75	50

Postupak ekstrakcije:

U laboratorijsku čašu od 250 mL odvagano je 4 g osušenog i usitnjenog uzorka kore rajčice. U čašu s uzorkom dodano je menzutom 100 mL ekstrakcijskog otapala. Laboratorijska čaša s pripremljenim uzorkom stavi se u podnožje ultrazvučne sonde uređaja. Ultrazvučna sonda uroni se na sredinu uzorka te se mora nalaziti otprilike 2 cm ispod površine uzorka. U uzorak se uroni termo-članak pomoću kojeg se mjeri temperatura. Na kraju se zatvore vratašca izolacijske kutije u kojoj je smještena ultrazvučna sonda iz sigurnosnih razloga.

Nakon tretiranja dobivena suspenzija se profiltrira preko Büchnerovog lijevka uz pomoć vakuum pumpe te se filtrat prebaci u prethodno označenu falkonicu od 50 mL.

3.2.2. Ekstrakcija toplinskim procesima

Za tretiranje uzorka rajčice toplinskim procesima korištena je ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem. Ekstrakcija je provedena pri 60 °C te se promatraju parametri vrijeme i udio etanola na koncentraciju flavonoida (tablica 3.). Dizajn ovog eksperimenta također je napravljen u programu Statgraphics Centurion (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, Warrenton ,USA). Ekstrakcija se provodi u dvije paralele te se eksperiment time sastoji se od 9 uzoraka.

Tablica 3. Eksperimentalni dizajn toplinskih procesa

<i>Uzorak</i>	<i>Vrijeme tretiranja [min]</i>	<i>Udio etanola [%]</i>
<i>TU0/3</i>	3	0
<i>TU0/6</i>	6	0
<i>TU0/9</i>	9	0
<i>TU25/3</i>	3	25
<i>TU25/6</i>	6	25
<i>TU25/9</i>	9	25
<i>TU50/3</i>	3	50
<i>TU50/6</i>	6	50
<i>TU50/9</i>	9	50

Postupak ekstrakcije:

Uzorak koji je pripremljen na isti način kao pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom stavi se u ultrazvučnu kupelj na 60 °C te se ostavi u kupelji zadano vrijeme.

Nakon provedenog tretmana dobivena suspenzija profiltrira se preko Büchnerovog lijevka te se filtrat također prebaci u prethodno označenu falkonicu od 50 mL.

3.2.3. Metoda određivanja ukupnih flavonoida

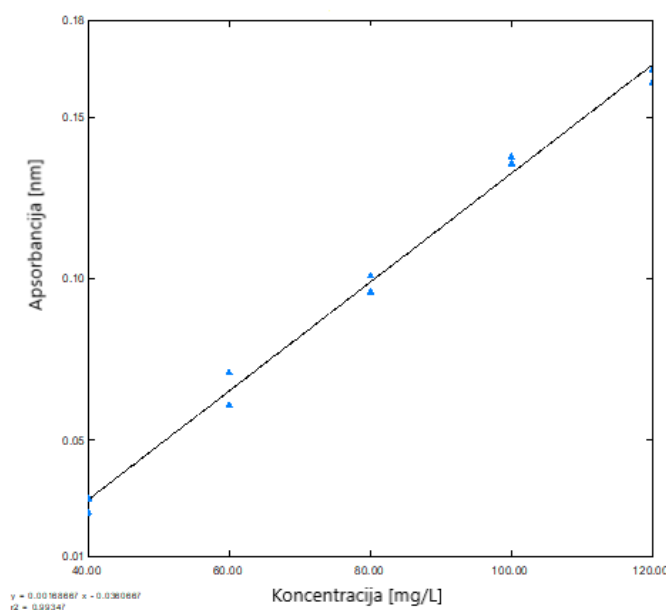
Za određivanje udjela ukupnih flavonoida korištena je modificirana kolorimetrijska metoda (Pallab i sur., 2013.). Metoda se temelji na svojstvu da flavonoidi tvore kompleks s aluminijevim kloridom te daju žuto obojenje. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji flavonoida (Pekal i Pyszynska, 2014.).

Postupak određivanja

U falkonicu od 15 mL se otpipetira 1 mL ekstrakta, 2 mL deionizirane vode te se doda 0,3 mL 5 %-tne otopine natrijeva nitrita (pripremljenog dodatkom 8,75 g soli NaNO_3 u 175 mL deionizirane vode). Nakon 5 minuta doda se 0,5 mL 10 %-tne otopine aluminijskoga klorida (pripremljene dodatkom 27,5 g AlCl_3 u 275 mL deionizirane vode) te nakon 6 minuta se dodaje 2 mL 1M otopine natrijeva hidroksida čime se zaustavlja reakcija. Sve se dobro promiješa na Vorteksu te se centrifugira 15 min na 4000^o/min. Na isti način priprema se slijepa proba samo što se umjesto uzorka stavlja deionizirana voda. Nakon centrifugiranja dobiveni uzorak se filtrira te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izražena je u mg ekvivalenta otopine rutina po litri ekstrakta pomoću baždarnog pravca standardne otopine rutina koji je prethodno izrađen

Izrada baždarnog pravca

Otopina rutina razrijeđena je s 96 %-tnim metanolom tako da su dobivene koncentracije od 20, 40, 60, 80 i 100 mg/L. Na apscisu se nanese vrijednosti koncentracije rutina (mg/mL) dok se na ordinatu nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije (Slika 1.). Na temelju jednadžbe kalibracijskog pravca određuje se koncentracija flavonoida.



Slika 1. Baždarni pravac otopine rutina

3.2.4. Određivanje suhe tvari

Nakon što je izmjerena koncentracija udjela ukupnih flavonoida u mg/L standardne otopine rutina potrebno je izmjerenu vrijednost pretvoriti u mg/g suhe tvari. Da bismo odredili ovu vrijednost potrebno je prvo izračunati udio ukupne suhe tvari u našem uzorku. Ona se određuje gravimetrijski sušenjem do konstantne mase pri 105 °C. Staklena posudica se osuši u testnoj komori na 105 °C. Osušena posudica se izvadi i ohladi u eksikatoru oko 20 minuta te joj se izvaže masa s točnošću od $\pm 0,0002\text{g}$. U ohlađenu i izvaganu posudicu izvaže se otprilike 2,5 g uzorka i stavi se u testnu komoru na $105^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sat vremena. Nakon sušenja posudica s uzorkom se hladi u eksikatoru oko 20 minuta te se važe. Nakon vaganja se ponovno stavlja na sušenje te se postupak ponavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001g. Suha tvar se izračuna prema sljedećoj formuli:

$$\text{Suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 – masa prazne posudice

m_1 – masa posudice s uzorkom prije sušenja

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja

Naš uzorak je imao udio suhe tvari 94,39 %. Nakon što je dobivena vrijednost za ukupni udio suhe tvari izračunava se masena koncentracija flavonoida u 100 mL ekstrakcijske otopine (mg u 100 mL) na način da se izračuna aritmetička sredina dvaju mjerenja te se preračuna u odgovarajuću mjernu jedinicu. Dobivena vrijednost dijeli s udjelom suhe tvari te se time dobiva vrijednost mg/ g suhe tvari.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je u programu Statgraphics. Mjerenja su provedena u dvije paralele te je rezultat izražen kao srednja vrijednost dvaju mjerenja \pm standardna devijacija. Za statističku obradu koristili smo Multivarijantnu analizu varijance (*eng. Multivariate analysis of variance, MANOVA*) sa značajnom razlikom na razini $p < 0,05$. Rezultati su također prikazani pomoću Paretoovog grafa. Za određivanje optimalnih uvjeta koristimo Polinom optimizacije te dijagram odzivne površine.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog djela ovog rada je odrediti utjecaj ultrazvuka visoke snage na učinak ekstrakcije flavonoida iz osušene kore rajčice u odnosu na konvencionalne toplinske metode pri 60 °C. Nezavisne varijable u ovom eksperimentu su amplituda, vrijeme i koncentracija etanola dok je zavisna varijabla udio ukupnih flavonoida izražen kao mg/g suhe tvari. Statističkom analizom promatrali su se parametri koji utječu na uspješnost ekstrakcije te se odabiru optimalni. Prilikom optimiranja parametara bitno je voditi računa o odabiru otapala, na uspješnost ekstrakcije flavonoida pokazalo se dobro koristiti neka od polarnih otapala kao što su etanol i deionizirana voda (Sharmin i sur., 2016). Vrijeme ekstrakcije je također jedan od bitnih parametara, prolongiranom ekstrakcijom može doći do degradacije flavonoida čime se smanjuje prinos (Sheng i sur., 2013). Amplituda je jedan od parametara koji određuje zvučni val, promjene amplitude označavaju promjene udaljenosti između susjednih maksimuma vala te to utječe na prolazak ultrazvučnog vala kroz tretirani materijal (Režek Jambrak, 2008).

4.1. Rezultati

Tablica 4. Rezultati mjerenja masene koncentracije ukupnih flavonoida za ultrazvuk

uzorak	vrijeme tretiranja [min]	amplituda [%]	udio etanola [%]	ukupni flavonoidi 0. dan [mg/g suhe tvari]	ukupni flavonoidi 7. dan [mg/g suhe tvari]
TU1	6	50	25	0,68±0,00	2,39±0,01
TU2	3	100	25	0,86±0,08	2,25±0,03
TU3	9	50	0	2,19±0,16	2,14±0,03
TU4	3	75	25	2,43±0,18	1,16±0,03
TU5	6	75	50	2,74±0,08	1,50±0,14
TU6	3	100	50	2,15±0,07	0,92±0,01
TU7	3	50	0	2,04±0,11	1,74±0,04
TU8	3	100	0	2,10±0,18	1,91±0,10
TU9	9	75	50	3,21±0,01	1,27±0,04
TU10	3	50	50	2,00±0,01	0,65±0,01
TU11	9	100	25	0,99±0,02	0,91±0,04
TU12	6	100	0	2,36±0,07	2,39±0,10
TU13	6	100	25	1,04±0,07	1,10±0,04
TU14	6	75	0	2,21±0,04	2,06±0,00
TU15	3	50	25	1,85±0,09	1,03±0,01
TU16	6	50	50	2,43±0,11	0,93±0,04
TU17	9	50	25	0,97±0,01	1,01±0,03
TU18	9	100	0	0,79±0,08	2,14±0,09
TU19	9	50	50	2,48±0,00	1,31±0,03
TU20	9	75	0	0,90±0,06	2,01±0,02
TU21	6	75	25	0,96±0,07	0,94±0,00
TU22	3	75	0	2,01±0,00	1,75±0,01
TU23	9	75	25	2,64±0,02	1,47±0,06
TU24	9	100	50	2,67±0,02	1,38±0,01
TU25	6	50	0	2,19±0,03	1,80±0,01
TU26	6	100	50	2,58±0,01	1,12±0,03
TU27	3	75	50	2,03±0,02	0,79±0,01

Iz rezultata koji su prikazani u tablici 4. možemo vidjeti da je najveći udio flavonoida u uzorku TU9 (3,21±0,01 mg/g suhe tvari) koji je za ekstrakcijsko otapalo imao 50 %-tni etanol te je tretiran ultrazvukom 9 minuta amplitudom od 75 %. Najmanju vrijednost ima uzorak TU1 (0,68±0,00 mg/g suhe tvari) koji je kao ekstrakcijsko otapalo imao 25 %-tni etanol te je tretiran ultrazvukom 6 minuta amplitudom od 50 %. Prinos flavonoida je različit ukoliko se koriste otapala različitih polarnosti odnosno različitih dipolnih momenta (Sharmin i sur., 2016). U našem slučaju pokazalo se da je 50 %-tni etanol bolje ekstrakcijsko otapalo u usporedbi s 25

%-tnih etanolom i deioniziranom vodom.

Tijekom skladištenja udio ukupnih flavonoida opada zbog degradacije (Sharmin i sur., 2016). Kod nekih uzoraka vidljiv je porast ukupnih flavonoida što nije u skladu s očekivanim. Do toga je moglo doći zbog pogreške prilikom pripreme uzoraka na način da filtracija nije dobro provedena te je time uzorak zaostao na filter papiru; također je moguće da prije analize uzorak nije bio dobro homogeniziran te je uzet pri dnu gdje je veći udio. Moguće je da je nakon 7 dana zaostao sediment te se i dalje odvijala ekstrakcija u otapalu.

4.2. Statistička obrada podataka i optimiranje parametara

4.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom - flavonoidi 0. dan

Tablica 5. Analiza varijanci za udio ukupnih flavonoida 0. dan

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Amplituda	0,094	1	0,094	0,29	0,600
B:Vrijeme tretiranja	0,022	1	0,022	0,07	0,800
C:EtOH	1,675	1	1,675	5,07	0,038
AA	0,642	1	0,642	1,94	0,181
AB	0,014	1	0,014	0,04	0,840
AC	0,231	1	0,231	0,70	0,415
BB	0,00003	1	0,00003	0,00	0,992
BC	1,645	1	1,645	4,98	0,039
CC	3,784	1	3,784	11,46	0,004
Ukupna pogreška	5,615	17	0,330	-	-
Ukupna (ispravljeno)	13,722	26	-	-	-

R-kvadrat = **59,0802 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = **37,4168 %**

Standardna pogreška, procjena = **0,574706**

Srednja apsolutna greška = **0,359289**

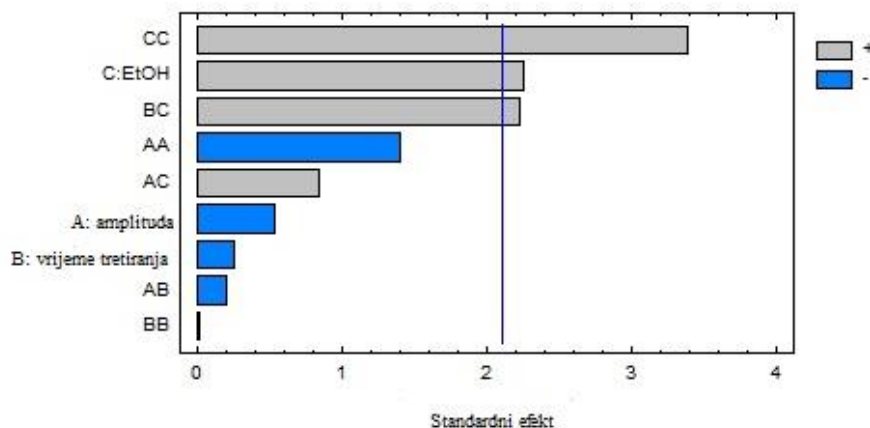
Durbin-Watson statistika = 1,59507 (P=0,1383)

Lag 1 residual autokorelacija = 0,152827

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti (p<0,05)

AA= utjecaj amplitude i amplitude
 AB= utjecaj amplitude i vremena tretiranja
 AC= utjecaj amplitude i udjela etanola
 BB= utjecaj vremena tretiranja i vremena tretiranja
 BC= utjecaj vremena tretiranja i udjela etanola
 CC= utjecaj udjela etanola i udjela etanola

ANOVA test (tablica 5.) dijeli varijabilnost udjela ukupnih flavonoida za svaki od faktora. Zatim testira statističku značajnost svakog faktora uspoređujući srednji kvadrat s procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju 3 faktora imaju p-vrijednost manju od 0,05 što ukazuje da se značajno razlikuju od nule na pouzdanoj razini od 95 %. To su udio etanola koji ima p-vrijednost 0,038, utjecaj vremena tretiranja i udjela etanola koji iznosi 0,039 te utjecaj udjela etanola i udjela etanola koji iznosi 0,004. R-kvadrat statistika objašnjava da dizajnirani model ima utjecaj od 59,0802 % na prinos ukupnih flavonoida. R-kvadrat, prilagođeno za stupnjeve slobode iznosi 37,4168 %. Procjena standardne pogreške pokazuje da je standardna devijacija reziduala 0,574706. Srednja apsolutna greška iznosi 0,359289. Durbin-Watson statistika testira rezidue kako bi utvrdila postoji li značajna korelacija na temelju redoslijeda eksperimenta. Budući da je p-vrijednost veća od 5,0 %, nema naznaka serijske autokorelacije u rezidualima na razini značajnosti od 5,0 %.



Slika 4. Pareto graf za udio ukupnih flavonoida 0. dan

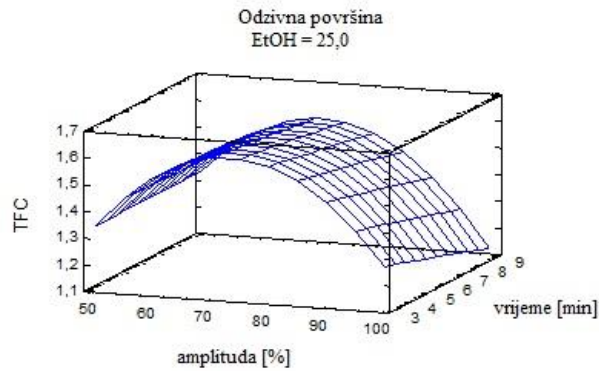
Pareto graf (slika 4.) vizualno prikazuje statističku značajnost zadanih vrijednosti. Plava linija dijeli statistički značajne vrijednosti od onih koje nisu statistički značajne. Sve što se nalazi desno od linije smatra se statistički značajnim, dok sve što se nalazi lijevo od linije nije statistički značajno. U ovom slučaju statistički značajni parametri su udio etanola, utjecaj

vremena tretiranja i udjela etanola te utjecaj udjela etanola i udjela etanola.

Tablica 6. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih flavonoida i rezultati optimizacije

<i>Udio ukupnih flavonoida</i>	<i>Polinom i predviđena vrijednost</i>	<i>Rezultati optimizacije</i>																																																
	$\begin{aligned} \text{Udio flavonoida} = & 0,372982 * \text{amplituda} - \\ & 0,0976883 * \text{vrijeme tretiranja} - \\ & 0,0975959 * \text{EtOH} - 0,000523499 * \text{Amplituda}^2 \\ & - 0,00045325 * \text{Amplituda} * \text{vrijeme tretiranja} + \\ & 0,000221951 * \text{Amplituda} * \text{EtOH} - \\ & 0,000280132 * \text{vrijeme tretiranja}^2 + \\ & 0,00493711 * \text{vrijeme tretiranja} * \text{EtOH} + \\ & 0,00127055 * \text{EtOH}^2 \end{aligned}$	Optimalna vrijednost																																																
	<table border="1" data-bbox="284 779 877 1155"> <thead> <tr> <th colspan="3"></th> <th>Predviđeno</th> </tr> <tr> <th>Amplituda (%)</th> <th>Vrijeme (min)</th> <th>EtOH (%)</th> <th>Udio (mg/g suhe tvari)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75,0</td> <td>6,000</td> <td>25,000</td> <td>1,599</td> </tr> <tr> <td>76,0</td> <td>6,072</td> <td>22,546</td> <td>1,571</td> </tr> <tr> <td>77,0</td> <td>6,148</td> <td>21,494</td> <td>1,558</td> </tr> <tr> <td>78,0</td> <td>6,219</td> <td>20,880</td> <td>1,547</td> </tr> <tr> <td>79,0</td> <td>6,285</td> <td>20,458</td> <td>1,536</td> </tr> <tr> <td>80,0</td> <td>6,345</td> <td>20,138</td> <td>1,524</td> </tr> </tbody> </table>				Predviđeno	Amplituda (%)	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g suhe tvari)	75,0	6,000	25,000	1,599	76,0	6,072	22,546	1,571	77,0	6,148	21,494	1,558	78,0	6,219	20,880	1,547	79,0	6,285	20,458	1,536	80,0	6,345	20,138	1,524	<table border="1" data-bbox="906 517 1476 719"> <thead> <tr> <th>Faktor</th> <th>Najniži</th> <th>Najviši</th> <th>Optimalan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>amplituda</td> <td>50,0</td> <td>100,0</td> <td>76,234</td> </tr> <tr> <td>vrijeme</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>9,0</td> </tr> <tr> <td>EtOH</td> <td>0,0</td> <td>50,0</td> <td>50,0</td> </tr> </tbody> </table>	Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan	amplituda	50,0	100,0	76,234	vrijeme	3,0	9,0	9,0	EtOH	0,0	50,0	50,0
			Predviđeno																																															
Amplituda (%)	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g suhe tvari)																																															
75,0	6,000	25,000	1,599																																															
76,0	6,072	22,546	1,571																																															
77,0	6,148	21,494	1,558																																															
78,0	6,219	20,880	1,547																																															
79,0	6,285	20,458	1,536																																															
80,0	6,345	20,138	1,524																																															
Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan																																															
amplituda	50,0	100,0	76,234																																															
vrijeme	3,0	9,0	9,0																																															
EtOH	0,0	50,0	50,0																																															
		=3,032 mg/g suhe tvari																																																

Polinom optimizacije (tablica 6.) uzima u obzir zadane parametre te izračunava točni udio flavonoida. Moguće je predvidjeti okvirnu vrijednost ukupnih flavonoida. Pomoću ove opcije moguće je ovisno o željenim rezultatima kontrolirati parametre procesa. U ovom slučaju optimalna amplituda je 76,234 %, vrijeme 9 minuta te koncentracija etanola 50 % gdje dobivamo udio flavonoida od 3,032 mg/g suhe tvari. Budući da amplituda nema statistički značaj ne treba se koristiti njena maksimalna vrijednost da bi dobili optimalnu vrijednost pa možemo uštedjeti na potrošenoj energiji i očuvati ultrazvučnu sondu koja se troši svakim tretmanom.



Slika 5. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih flavonoida 0. dan

Dijagram odzivne površine (slika 5.) prikazuje utjecaj zadanih parametara na uspješnost ekstrakcije. Udio etanola od 25 % je fiksni parametar te se prati utjecaj vremena i amplitude na prinos flavonoida. Najviša točka na grafu označava najveći prinos flavonoida i on iznosi $2,64 \pm 0,02$ mg/g suhe tvari te se nalazi pri amplitudi od 75 %. Pošto se vrijednost ne razlikuje značajno od udjela flavonoida korištenjem 50 %-tnog etanola može se koristiti manja koncentraciju etanola te time možemo uštedjeti na otapalu. Iako amplituda nije statistički značajna za udio flavonoida ipak ima utjecaj na prinos ekstrakcije. Može se vidjeti da povećanjem amplitude dolazi do povećanja prinosa ekstrakcije te je najveća vrijednost na amplitudi od oko 75 %. Daljnjim povećanjem amplitude dolazi do smanjenja prinosa ekstrakcije te je na amplitudi od 100 % on najmanji.

4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom - flavonoidi 7. dan

Tablica 7. Analiza varijanci za udio ukupnih flavonoida 7. dan

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Amplituda	0,068	1	0,068	0,38	0,544
B:Vrijeme tretiranja	0,115	1	0,115	0,65	0,432
C:EtOH	3,616	1	3,616	20,40	0,0003
AA	0,028	1	0,028	0,16	0,696
AB	0,242	1	0,242	1,36	0,259
AC	0,004	1	0,004	0,02	0,878
BB	0,128	1	0,128	0,72	0,407
BC	0,042	1	0,042	0,23	0,634
CC	0,199	1	0,199	1,12	0,304
Ukupna pogreška	3,013	17	0,177	-	-
Ukupna (ispravljeno)	7,455	26	-	-	-

R-kvadrat = **59,5824 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = **38,1849 %**

Standardna pogreška, procjena = **0,420993**

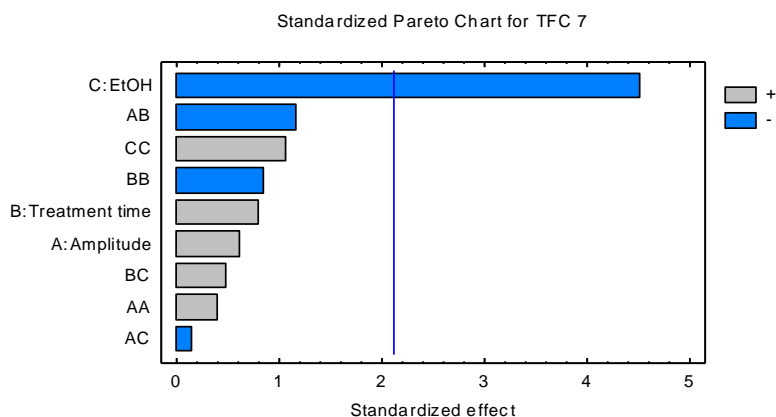
Srednja apsolutna greška = **0,241338**

Durbin-Watson statistika = 1,28167 (P=**0,0202**)

Lag 1 residual autokorelacija = 0,201068

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednost ($p < 0,05$)

Kao što se vidi iz tablice 7. samo je jedna vrijednost statistički značajna i to je udio etanola koji ima P-vrijednost od 0,0003. To se također može vidjeti na Paretovom grafu (slika 6.) gdje se samo koncentracija etanola nalazi desno od plave linije. Iz toga zaključujemo kako udio etanola najviše utječe na prinos flavonoida prilikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Stoga je potrebno obratiti pažnju na udio etanola prilikom optimiranja parametara kako bi se postigli optimalni rezultati ekstrakcije.

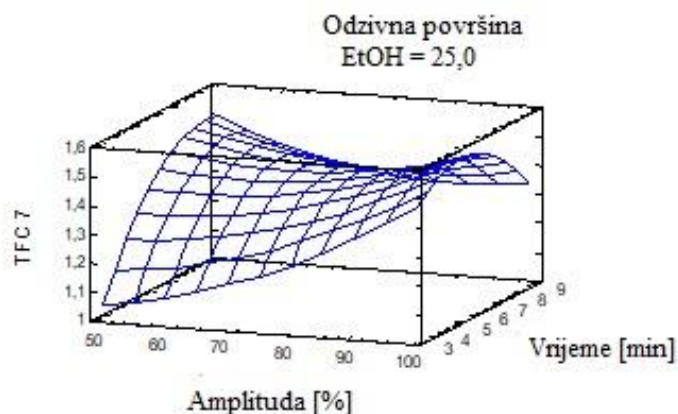


Slika 6. Pareto graf za udio ukupnih flavonoida 7. dan

Tablica 8. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih flavonoida i rezultati optimizacije

Polinom i predviđena vrijednost		Rezultati optimizacije																																		
Udio ukupnih flavonoida	Udio flavonoida = $0,942543 - 0,00185143 \cdot \text{Amplituda} + 0,343652 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 0,034937 \cdot \text{EtOH} + 0,000109473 \cdot \text{Amplituda}^2 - 0,001892 \cdot \text{Amplitudea} \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 0,00003035 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{EtOH} - 0,0162301 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,000784963 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{EtOH} + 0,000291499 \cdot \text{EtOH}^2$	Optimalna vrijednost																																		
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Faktor</th> <th>Najniži</th> <th>Najviši</th> <th>Optimalan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>amplituda</td> <td>50,0</td> <td>100,0</td> <td>99,959</td> </tr> <tr> <td>vrijeme</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>4,785</td> </tr> <tr> <td>EtOH</td> <td>0,0</td> <td>50,0</td> <td>3,639E-7</td> </tr> </tbody> </table> <p>=2,219 mg/g suhe tvari</p>	Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan	amplituda	50,0	100,0	99,959	vrijeme	3,0	9,0	4,785	EtOH	0,0	50,0	3,639E-7																		
Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan																																	
amplituda	50,0	100,0	99,959																																	
vrijeme	3,0	9,0	4,785																																	
EtOH	0,0	50,0	3,639E-7																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3"></th> <th>Predviđeno</th> </tr> <tr> <th>Amplituda (%)</th> <th>Vrijeme (min)</th> <th>EtOH (%)</th> <th>Udio (mg/g suhe tvari)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75,0</td> <td>6,0</td> <td>25,000</td> <td>1,415</td> </tr> <tr> <td>76,0</td> <td>6,116</td> <td>17,163</td> <td>1,579</td> </tr> <tr> <td>77,0</td> <td>6,165</td> <td>8,522</td> <td>1,797</td> </tr> <tr> <td>78,0</td> <td>6,165</td> <td>-0,525</td> <td>2,073</td> </tr> <tr> <td>79,0</td> <td>6,134</td> <td>-9,730</td> <td>2,404</td> </tr> <tr> <td>80,0</td> <td>6,081</td> <td>-18,958</td> <td>2,787</td> </tr> </tbody> </table>				Predviđeno	Amplituda (%)	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g suhe tvari)	75,0	6,0	25,000	1,415	76,0	6,116	17,163	1,579	77,0	6,165	8,522	1,797	78,0	6,165	-0,525	2,073	79,0	6,134	-9,730	2,404	80,0	6,081	-18,958	2,787			
			Predviđeno																																	
Amplituda (%)	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g suhe tvari)																																	
75,0	6,0	25,000	1,415																																	
76,0	6,116	17,163	1,579																																	
77,0	6,165	8,522	1,797																																	
78,0	6,165	-0,525	2,073																																	
79,0	6,134	-9,730	2,404																																	
80,0	6,081	-18,958	2,787																																	

Najveći prinos kod optimalnih parametara je 2,219 mg/g suhe tvari (tablica 8.). Polinom optimizacije je funkcionalan do amplitude od 77 %, a nakon nje pokazuje negativne vrijednosti. Pošto je udio etanola jedini statistički značajan parametar nije potrebno tretirati uzorke dulje od 4 minute ni koristiti amplitudu od 99,959 %.



Slika 7. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih flavonoida 7. dan

Iz dijagrama odzivne površine za udio ukupnih flavonoida 7. dan (slika 7.) vidljivo je da vrijeme ima utjecaj na uspješnost ekstrakcije te je optimalno pri 4 minuta, dok je optimalna amplituda blizu 100 % te iznosi $2,25 \pm 0,03$ mg/g suhe tvari.

4.2.3. Toplinske metode - flavonoidi 0. dan

Tablica 9. Rezultati ekstrakcije toplinskim procesima

uzorak	vrijeme tretiranja [min]	amplituda [%]	udio etanola [%]	ukupni flavonoidi 0. dan [mg/g suhe tvari]	ukupni flavonoidi 7. dan [mg/g suhe tvari]
TU0/3	3	-	0	$1,18 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02$
TU0/6	6	-	0	$1,30 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,02$
TU0/9	9	-	0	$0,84 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,00$
TU25/3	3	-	25	$0,94 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02$
TU25/6	6	-	25	$1,23 \pm 0,00$	$0,54 \pm 0,01$
TU25/9	9	-	25	$1,17 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,02$
TU50/3	3	-	50	$1,26 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02$
TU50/6	6	-	50	$1,39 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,02$
TU50/9	9	-	50	$1,55 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,02$

Kod toplinskih procesa odabrana je temperatura od 60 °C jer sve temperature više od 70 °C mogu uzrokovati degradaciju flavonoida (Ramić i sur., 2014). Udio ukupnih flavonoida kod toplinskih procesa (tablica 9.) kreće se u rasponu od $0,84 \pm 0,03$ mg/g suhe tvari pa do $1,55 \pm 0,03$ mg/g suhe tvari što je znatno manje u odnosu na ekstrakciju potpomognuto ultrazvukom. To je

zbog implozija mjehurića kod tretiranja ultrazvukom koje uzrokuje mehaničko oštećenje stanice i željene komponente se lakše izdvajaju (Režek Jambrak , 2008). Najmanju vrijednost ima uzorak TU0/9 (0,84±0,03 mg/g suhe tvari) koji se tretirao 9 minuta te kao ekstrakcijsko otapalo koristio deioniziranu vodu. Najveću vrijednost ima TU50/9 (1,55±0,03 mg/g suhe tvari) koji se tretirao 9 minuta te kao ekstrakcijsko otapalo koristio 50 %-tni etanol. Također je vidljivo kako se nakon 7. dana prinos flavonoida znatno smanjio kod svakog uzorka.

Tablica 10. Analiza varijanci za udio ukupnih flavonoida 0. dan

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednos t kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Vrijeme	0,005	1	0,005	0,32	0,612
B:EtOH	0,129	1	0,129	7,55	0,071
AA	0,044	1	0,044	2,56	0,208
AB	0,099	1	0,099	5,78	0,096
BB	0,039	1	0,039	2,26	0,230
Ukupna pogreška	0,051	3	0,017	-	-
Ukupna (ispravljeno)	0,366	8	-	-	-

R-kvadrat = **86,0299 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = **62,7465 %**

Standardna pogreška, procjena = **0,130585**

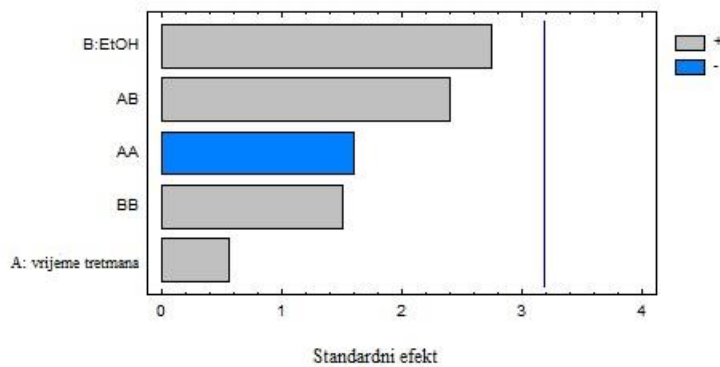
Srednja apsolutna greška = **0,0643659**

Durbin-Watson statistika = 2,18396 (P=0,2581)

Lag 1 residual autokorelacija = -0,0934218

*Podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednost (p<0,05)

Analizirani parametri u ovom slučaju (tablica 10.) nemaju statistički značajan utjecaj jer im je svima p-vrijednost veća od 0,05 što se jasno vidi i na Paretovu grafu (slika 8.).

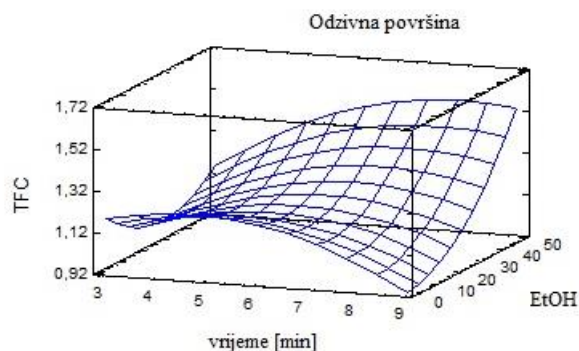


Slika 8. Pareto graf za udio ukupnih flavonoida kod toplinskih procesa 0. dan

Tablica 11. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih flavonoida i rezultati optimizacije

	<i>Polinom i predviđena vrijednost</i>	<i>Rezultati optimizacije</i>																							
<i>Udio ukupnih flavonoida</i>	$\text{Udio flavonoida} = 0,866632 + 0,154789 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 0,0178004 \cdot \text{EtOH} - 0,0164256 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,0020935 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{EtOH} + 0,000221997 \cdot \text{EtOH}^2$	<p style="text-align: center;">Optimalna vrijednost</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Faktor</th> <th>Najniži</th> <th>Najviši</th> <th>Optimalan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vrijeme</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>7,898</td> </tr> <tr> <td>EtOH</td> <td>0,0</td> <td>50,0</td> <td>50,0</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">=1,556 mg/g suhe tvari</p>	Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan	Vrijeme	3,0	9,0	7,898	EtOH	0,0	50,0	50,0											
		Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan																				
Vrijeme	3,0	9,0	7,898																						
EtOH	0,0	50,0	50,0																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>Predviđeno</th> </tr> <tr> <th>Vrijeme (min)</th> <th>EtOH (%)</th> <th>Udio (mg/g s.tv.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6,0</td> <td>25,000</td> <td>1,212</td> </tr> <tr> <td>7,0</td> <td>59,368</td> <td>1,741</td> </tr> <tr> <td>8,0</td> <td>92,152</td> <td>2,841</td> </tr> <tr> <td>9,0</td> <td>124,797</td> <td>4,517</td> </tr> <tr> <td>10,0</td> <td>157,399</td> <td>6,765</td> </tr> <tr> <td>11,0</td> <td>189,982</td> <td>9,588</td> </tr> </tbody> </table>			Predviđeno	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g s.tv.)	6,0	25,000	1,212	7,0	59,368	1,741	8,0	92,152	2,841	9,0	124,797	4,517	10,0	157,399	6,765	11,0	189,982	9,588	
		Predviđeno																							
Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g s.tv.)																							
6,0	25,000	1,212																							
7,0	59,368	1,741																							
8,0	92,152	2,841																							
9,0	124,797	4,517																							
10,0	157,399	6,765																							
11,0	189,982	9,588																							

Optimalna vrijednost parametara kod toplinskih procesa pri 60 °C (tablica 11) su vrijeme od 7,8981 minuta te koncentracija etanola 50 %. Vrijednost ukupnih flavonoida pri ovim uvjetima je 1,556 mg/g suhe tvari. Pokazalo se da veće koncentracije etanola daju veći prinos ukupnih flavonoida.



Slika 9. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih flavonoida 0. dan

Iako ni vrijeme ni koncentracija etanola nisu statistički značajni, iz dijagrama (slika 9.) je vidljivo kako koncentracija etanola ima velik utjecaj na uspješnost ekstrakcije te ima najveću vrijednost pri koncentraciji od 50 %. Vrijeme također utječe na uspješnost ekstrakcije te je najveći prinos flavonoida pri tretiranju 9 minuta te je vrijednost $1,55 \pm 0,03$ mg/g suhe tvari.

4.2.4. Toplinske metode - flavonoidi 7. dan

Tablica 12. Analiza varijanci za udio ukupnih flavonoida 7. dan

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Vrijeme	0,005	1	0,005	3,46	0,160
B:EtOH	0,013	1	0,013	9,28	0,056
AA	0,004	1	0,004	2,44	0,216
AB	0,016	1	0,016	11,00	0,045
BB	0,0003	1	0,0003	0,24	0,658
Ukupna greška	0,004	3	0,001	-	-
Ukupna (ispravljeno)	0,042	8	-	-	-

R-kvadrat = **89,807 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = **72,8186 %**

Standardna pogreška, procjena = **0,0378646**

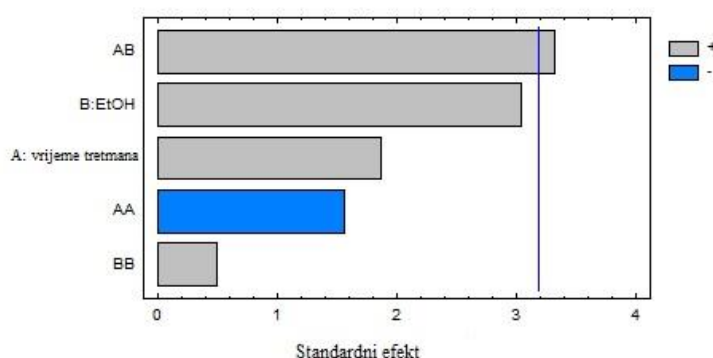
Srednja apsolutna greška = **0,0189981**

Durbin-Watson statistika = 2,71037 (P=0,5233)

Lag 1 residual autokorelacija = -0,514593

*Podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednost ($p < 0,05$)

Iz tablice 12. je vidljivo da samo jedna vrijednost ima statistički značaj pri $p < 0,05$ i to je utjecaj vremena i udjela etanola te iznosi 0,045 što je vidljivo i na Paretovu grafu (slika 10.).

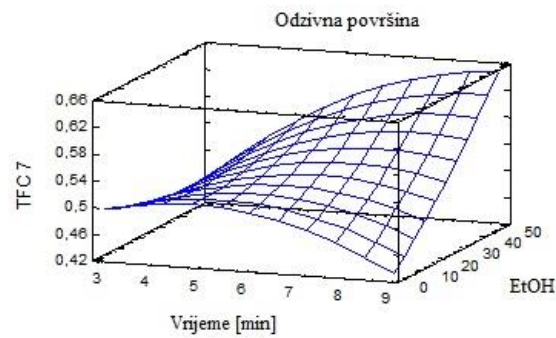


Slika 10. Pareto graf za udio ukupnih flavonoida kod toplinskih procesa 7. dan

Tablica 13. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih flavonoida i rezultati optimizacije

	<i>Polinom i predviđena vrijednost</i>	<i>Rezultati optimizacije</i>																								
<i>Udio ukupnih flavonoida</i>	$\text{Udio flavonoida} = 0,405907 + 0,0444669 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 0,00418911 \cdot \text{EtOH} - 0,00465094 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,000837389 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{EtOH} + 0,0000209665 \cdot \text{EtOH}^2$	<p>Optimalna vrijednost</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Faktor</th> <th>Najniži</th> <th>Najviši</th> <th>Optimalan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vrijeme</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>9,0</td> </tr> <tr> <td>EtOH</td> <td>0,0</td> <td>50,0</td> <td>50,0</td> </tr> </tbody> </table> <p>=0,649 mg/g suhe tvari</p>	Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan	Vrijeme	3,0	9,0	9,0	EtOH	0,0	50,0	50,0												
		Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan																					
Vrijeme	3,0	9,0	9,0																							
EtOH	0,0	50,0	50,0																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>Predviđeno</th> </tr> <tr> <th>Vrijeme (min)</th> <th>EtOH (%)</th> <th>Udio (mg/g s.tv.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6,0</td> <td>25,000</td> <td>0,539</td> </tr> <tr> <td>7,0</td> <td>40,969</td> <td>0,593</td> </tr> <tr> <td>8,0</td> <td>58,709</td> <td>0,684</td> </tr> <tr> <td>9,0</td> <td>76,844</td> <td>0,810</td> </tr> <tr> <td>10,0</td> <td>95,101</td> <td>0,973</td> </tr> <tr> <td>11,0</td> <td>113,408</td> <td>1,172</td> </tr> </tbody> </table>			Predviđeno	Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g s.tv.)	6,0	25,000	0,539	7,0	40,969	0,593	8,0	58,709	0,684	9,0	76,844	0,810	10,0	95,101	0,973	11,0	113,408	1,172	
		Predviđeno																								
Vrijeme (min)	EtOH (%)	Udio (mg/g s.tv.)																								
6,0	25,000	0,539																								
7,0	40,969	0,593																								
8,0	58,709	0,684																								
9,0	76,844	0,810																								
10,0	95,101	0,973																								
11,0	113,408	1,172																								

Optimalne vrijednosti (tablica 13.) u ovom slučaju su 9 minuta i koncentracija etanola 50 % te udio ukupnih flavonoida iznosi 0,649 mg/g suhe tvari.



Slika 11. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih flavonoida 7. dan

Iz dijagrama odzivne površine (slika 11.) vidljivo je da i vrijeme i koncentracija etanola znatno imaju utjecaj na uspješnost ekstrakcije. Uspješnost ekstrakcije povećava se povećavanjem koncentracije etanola te je najveći prinos pri udjelu od 50 % i vremenu od 9 minuta te iznosi $0,68 \pm 0,02$ mg/g suhe tvari.

5. ZAKLJUČCI

1. Najviši prinos ukupnih flavonoida iznosio je $3,21 \pm 0,01$ mg/g suhe tvari pomoću ultrazvukom potpomognute ekstrakcije primjenom amplitude od 75 %, vremenu od 9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijsko otapalo. Statističkom obradom rezultata utvrdilo se da koncentracija etanola i vrijeme imaju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$).
2. Optimalni parametri ultrazvukom potpomognute ekstrakcije su amplituda od 76,23 % , vrijeme tretiranja od 9 minuta te koncentracija etanola 50 %.
3. Najviši prinos flavonoida kod toplinskih metoda bio je $1,55 \pm 0,03$ mg/g suhe tvari tretiranjem 9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola. Statističkom obradom rezultata utvrdilo se da ni jedan od parametara nema statistički značajan utjecaj.
4. Optimalni parametri ekstrakcije konvencionalnim toplinskim metodama su vrijeme tretiranja od 7,9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola.
5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pokazala se boljom metodom u odnosu na konvencionalne toplinske metode te je prinos ukupnih flavonoida bio znatno veći.
6. Prilikom skladištenja dolazi do smanjenja udjela ukupnih flavonoida zbog njihove degradacije. Nekoliko uzoraka kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pokazale su porast ukupnih flavonoida nakon skladištenja 7 dana, što nije u skladu s očekivanim te jedan od mogućih razloga je nepravilno pripremljen uzorak koji je uzet na analizu.

6. POPIS LITERATURE

Ademosun OT, Adebayo AH, & Ajanaku KO (2021) Solanum lycopersicum and Daucus carota: effective anticancer agents (a mini review). *Journal of Physics: Conference Series*, 1943(1), 012169. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1943/1/012169>

Bhargava N, Mor RS, Kumar K, & Sharanagat SV (2020) Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 105293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>

George B, Kaur C, Khurdiya DS, & Kapoor HC (2004) Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 84, 45–51. doi:10.1016/S0308-8146(03)00165-1

Grudenić A (2021) Održiva obrada nusproizvoda iz proizvodnje kave ultrazvukom visoke snage (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Guimarães JT, Scudino H, Ramos GL, Oliveira GA, Margalho LP, Costa LE i sur. (2021) Current applications of high-intensity ultrasound with microbial inactivation or stimulation purposes in dairy products. *Current Opinion in Food Science*. doi:10.1016/j.cofs.2021.06.004

Jambrak AR, Herceg Z, Šubarić D, Babić J, Brnčić M, Brnčić SR, Gelo J i sur. (2010) Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 91–100. doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.051

Kumar K, Srivastav S, & Sharanagat VS (2020) Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By-Products: A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Kumar M, Tomar M, Bhuyan DJ, Punia S, Grasso S, Sá AGA i sur. (2021) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112018. doi:10.1016/j.biopha.2021.112018

Morović M (2018) Flavonoidi: Metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Split

Nour V, Panaite TD, Ropota M, Turcu R, Trandafir I, & Corbu AR (2018) Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 222–229. doi:10.1080/19476337.2017.1383514

Pallab K, Tapan KB, Tapas KP, Ramen K (2013) Estimation of total flavonoids content (TFC) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 3: 33 – 37

Panche AN, Diwan AD & Chandra SR (2016) “Flavonoids: an overview,” *Journal of Nutritional Science*. Cambridge University Press, 5, p. e47. doi: 10.1017/jns.2016.41.

Pattnaik M, Pandey P, Martin GJO, Mishra HN, Ashokkumar M (2021) Innovative Technologies for Extraction and Microencapsulation of Bioactives from Plant-Based Food Waste and Their Applications in Functional Food Development. *Foods*, 10, 279. <https://doi.org/10.3390/foods10020279>

Pekal A, Pyrzynska K (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* 7: 1776 - 1782

Persia ME, Parsons CM, Schang M, & Azcona, J (2003) Nutritional evaluation of dried tomato seeds. *Poultry Science*, 82, 141–146. doi:10.1093/ps/82.1.141

Popović R (2018) Izolacija karotenoida iz biootpada kore sušene rajčice uporabom različitih otapala (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Ramić M, Vidović S, Zeković Z, Vladić J, Cvejic A, & Pavlić B (2015) Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360–368. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.10.002

Režek Jambrak A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirotke, (disertacija), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sharma M, Usmani Z, Gupta VK, & Bhat R (2021) Valorization of fruits and vegetable wastes and byproducts to produce natural pigments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 535-563. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873240>

Sharmin T, Ahmed N, Hossain A, Hosain MM, Mondal SC, Haque R, Siddik A i sur. (2016) Extraction of bioactive compound from some fruits and vegetables (pomegranate peel, carrot and tomato). *American Journal of Food and Nutrition*, 4(1), 8-19. doi: 10.12691/ajfn-4-1-2

Sheng Z-L, Wan P-F, Dong C-L, & Li Y-H (2013) Optimization of total flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 43, 778–786. doi:10.1016/j.indcrop.2012.08.020

Šimić I (2015) Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja (diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Trombino S, Cassano R, Procopio D, Di Gioia M L, Barone E (2021) Valorization of Tomato Waste as a Source of Carotenoids. *Molecules*, 26, 5062. <https://doi.org/10.3390/molecules26165062>

Wambugu RM (2020) Pretreatment and drying effect on the antioxidant, color, rehydration properties and microbial quality of four tomato varieties (Doctoral dissertation, JKUAT-AGRICULTURE).

Wu X, Yu L, & Pehrsson PR (2022) Are processed tomato products as nutritious as fresh tomatoes? Scoping review on the effects of industrial processing on nutrients and bioactive compounds in tomatoes. *Advances in Nutrition*, 13(1), 138-151. doi: 10.1093/advances/nmab109

Izjava o izvornosti

Ja Martina Mlinarić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Martina Mlinarić

Vlastoručni potpis