

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

MARIJA ZORIĆ I IVAN MAGNABOSCA

VALORIZACIJA KOMINE ARONIJE PRIMJENOM  
NAPREDNIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I MLJEVENJA

ZAGREB, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Repajić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.



Rad je izrađen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ NoWaBerry, IP-2022-10-5499), voditeljice prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aronija .....	1
1.2 Komina aronije .....	2
1.3 Kemijski sastav ploda i komine aronije.....	2
1.3.1 Fenolni spojevi u plodu i komini aronije .....	3
1.3.2 Antocijani u plodu i komini aronije .....	4
1.3.3 Antioksidacijski kapacitet ploda i komine aronije.....	6
1.4 Ekstrakcija .....	8
1.4.1 PLE .....	9
1.4.2 MAE.....	11
1.4.3 UAE .....	13
1.5 Kriogeno mljevenje .....	15
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>19</b>
3.1 Materijal.....	19
3.1.1 Komina aronije.....	19
3.1.2 Kemikalije i standardi .....	19
3.1.3 Aparatura i pribor.....	22
3.2 Metode rada .....	24
3.2.1 Priprema uzorka .....	24
3.2.2 Kriogeno mljevenje.....	25
3.2.3 Određivanje ukupne suhe tvari .....	25
3.2.4 Ekstrakcija.....	25
3.2.4.1 PLE .....	25
3.2.4.2 MAE .....	27
3.2.4.3 UAE.....	29
3.2.4.4 Refluks.....	31
3.2.5 Određivanje udjela ukupnih fenola .....	31
3.2.6 Određivanje udjela monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom.....	33
3.2.7 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom .....	34
3.2.8 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	35
3.2.9 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	37
3.2.10 Određivanje veličine čestica .....	38

3.2.11	Određivanje individualnih fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz tandemsku spektrometriju masa.....	38
3.2.12	Eksperimentalni dizajn i obrada podataka .....	39
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>41</b>
4.1	PLE .....	41
4.2	MAE .....	43
4.3	UAE.....	45
4.4	PCA .....	47
4.5	Usporedba učinkovitosti PLE, MAE, UAE i ekstrakcije refluksom .....	48
4.6	Kriogeno mljevenje .....	49
4.7	Kemijski profil fenolnih spojeva .....	51
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>52</b>
5.1	PLE .....	52
5.1.1	Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom PLE .....	52
5.1.2	Utjecaj parametara PLE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije .....	55
5.2	MAE .....	57
5.2.1	Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom MAE.....	57
5.2.2	Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije .....	59
5.3	UAE.....	61
5.3.1	Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom UAE .....	61
5.3.2	Utjecaj parametara UAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije .....	63
5.4	PCA .....	65
5.5	Usporedba učinkovitosti PLE, MAE, UAE i ekstrakcije refluksom .....	66
5.6	Kriogeno mljevenje .....	68
5.6.1	Veličina čestica uzoraka komine aronije usitnjenih kriogenim i konvencionalnim mljevenjem.....	68
5.6.2	Utjecaj vremena kriogenog mljevenja na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije .....	71
5.7	Kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije.....	73
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>77</b>

<b>7. ZAHVALA .....</b>	<b>79</b>
<b>8. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>80</b>
<b>Sažetak .....</b>	<b>93</b>
<b>Summary.....</b>	<b>94</b>

## 1. UVOD

### 1.1 Aronija

Aronija (*Aronia melanocarpa* L.) je višegodišnji listopadni grm iz obitelji Rosaceae. U Europu je prenesena početkom 20. stoljeća iz istočnih dijelova Sjeverne Amerike (Chrubasik i Li, 2010). Mladi grmovi aronije su kompaktni, dok stariji grmovi imaju oblik raširenog stabla s ovalnim listovima koji prekrivaju grane. Listovi su zeleni tijekom proljeća i ljeta, dok u jesen postaju crvenkasto smeđi. Krajem kolovoza i u rujnu, grozdasti plodovi aronije su potpuno zreli. Zreli plodovi, na vanjskom i poprečnom presjeku, crne su i plave boje.

Najčešće uzgajana sorta u Europi je crnoplodna aronija, a dvije glavne podsorte koje čine 80 % europskih plantaža su „Nero“ i „Viking“ (Milić, 2012). Grm sorte „Nero“ doseže visinu od 2 m i širinu od 2,5 m, rastući uspravnije od drugih sorti. Njegove grane su guste i razgranate, cvjetovi su blago ružičasti, a grozdovi se sastoje od 10 do 20 pojedinačnih cvatova. Plodovi sorte „Nero“ su relativno veliki, promjera do 12 mm, okrugli i ljubičasto-crne boje (slika 1). Svaki plod je obavijen voštanom ovojnicom i težak je od 1 do 1,5 g, s vrlo čvrstim mesom i slatkastim okusom. Sorta „Viking“ potječe iz Finske. Kod ove sorte, plodovi rastu na vrhovima grančica, zbog čega grančice vise prema dolje. Plodovi teže oko 1,5 g, sfernog su oblika, a njihov promjer se kreće od 6,1 do 17,8 mm, dok im se masa kreće od 32 do 111,7 g, ponekad čak i oko 280 g (Ochmian i sur., 2012).



**Slika 1.** Aronija (prema Anonymus 1)

Zahvaljujući otpornosti na niske temperature i mraz, aronija se može uzgajati diljem kontinentalne Hrvatske, gdje su uvjeti za njezin uzgoj izvrsni, posebice u pogledu količine oborina i temperature (Milić, 2012). Jedna od velikih prednosti aronije je ta što je vrlo pogodna

za ekološki uzgoj, jer prirodno nema mnogo nametnika zahvaljujući svom sastavu. U svijetu aronija zauzima oko 20 000 ha površine, s godišnjom proizvodnjom do 200 000 t (Tomić i sur., 2016).

Aronija je poznata po intenzivnom, jakom kiselkasto-trpkom okusu zbog kojeg se najčešće prerađuje u druge proizvode (Kulling i Rawel, 2008). Jedan od najčešćih proizvoda od aronije je matični sok dobiven prešanjem plodova. Nakon proizvodnje soka, kao nusproizvod zaostaje komina koja sadrži više od 50 % ukupnog sadržaja antocijana (Oszmanski i Wojdylo, 2005).

## **1.2 Komina aronije**

Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda, svjetska proizvodnja voća premašila je jednu milijardu t u 2017. godini, pri čemu je generirala velike količine nusproizvoda i otpada (FAO, 2017). U Europi, otpad od proizvodnje soka čini oko 3 % ukupnog otpada hrane, što ga čini petim najvećim doprinositeljem. Jedan od ključnih koraka prema smanjenju stvaranja otpada i ostvarivanju principa kružne ekonomije i održivosti je valorizacija otpada. U kontekstu prehrambeno-agronomske industrije valoriziraju se nusproizvodi i odbačeni materijali za koje se prvotno smatralo da su višak (Ben-Othman i sur., 2020; Fava i sur., 2015), stoga značajnu pozornost privlače bioaktivni spojevi iz nusproizvoda poput komine, koji imaju potencijalne nutritivne i nutraceutske primjene, prvenstveno zbog svojih zdravstvenih prednosti (Coman i sur., 2020). Komina koja zaostaje nakon prešanja plodova obično se sastoji od sjemenki, kožice i peteljki te predstavlja značajan izvor polifenola, karotenoida, dijetalnih vlakana, vitamina, enzima i ulja (Ben-Othman i sur., 2020; Fava i sur., 2015).

S obzirom na bogatstvo antocijana u komini aronije, u posljednjih nekoliko godina istražuju se nove mogućnosti njezine primjene uz korištenje konvencionalnih i naprednih tehnika ekstrakcije. Cilj je maksimalno iskoristiti potencijal ovog vrijednog nusproizvoda te smanjiti negativne utjecaje na okoliš (Sagar i sur., 2018).

## **1.3 Kemijski sastav ploda i komine aronije**

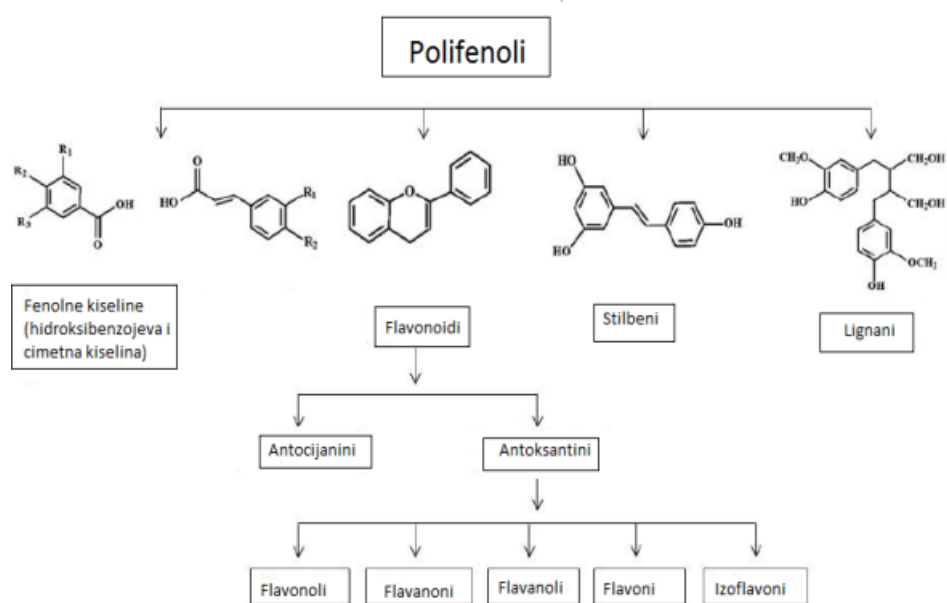
Kemijski sastav i nutritivna vrijednost ploda aronije ovisi o mnogim čimbenicima, npr. sorti, zrelosti te ekološkim i klimatskim uvjetima. Prema istraživanju Pieszka i sur. (2015), ukupni udio suhe tvari u komine aronije iznosio je 90,21 %, a udio proteina 10,77 %, masti 5,15 %, vlakana 21,79 % te topljivih šećera 0,35 %.



Aronija sadrži aminokiseline poput arginina, tirozina, histidina, lizina, cisteina, alanina, asparagina, serina, glutaminske kiseline i treonina, a većina ovih aminokiselina prisutna je i u komini aronije. Osim toga, aronija je bogata makroelementima (K, Ca, P, Mg i Na), esencijalnim elementima u tragovima (Zn, Fe, Se, Cu, Mo, Cr) i elementima u tragovima (Mn, Si, Ni, B, V) (Boncheva i sur., 2013; Červenka, 2011; Borycka i Stachowiak, 2008).

### 1.3.1 Fenolni spojevi u plodu i komini aronije

Fenoli i polifenoli su biološki aktivni sekundarni produkti metabolizma biljaka. Smatraju se neesencijalnim za ljudski organizam. Osim što daju karakterističnu poželjnu boju voću, vrše i mnogobrojne korisne funkcije u samoj biljci. Fenoli sadrže jedan aromatski prsten na koji je vezana barem jedna hidroksilna skupina, dok polifenoli sadrže više aromatskih prstenova, a samim time i više hidroksilnih skupina. Fenolne spojeve najčešće dijelimo u četiri skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (slika 2) (Ghani, 2020; Manach, 2024).



**Slika 2.** Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura (Prema Manach i sur., 2004)

Bobičasto voće je poznato kao biljni materijal vrlo bogat fenolima. Bobičasto voće i plodovi sadrže širok spektar flavonoida i fenolnih kiselina koje pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Glavne podgrupe flavonoida u bobičastom voću i plodovima su antocijanini, proantocijani,

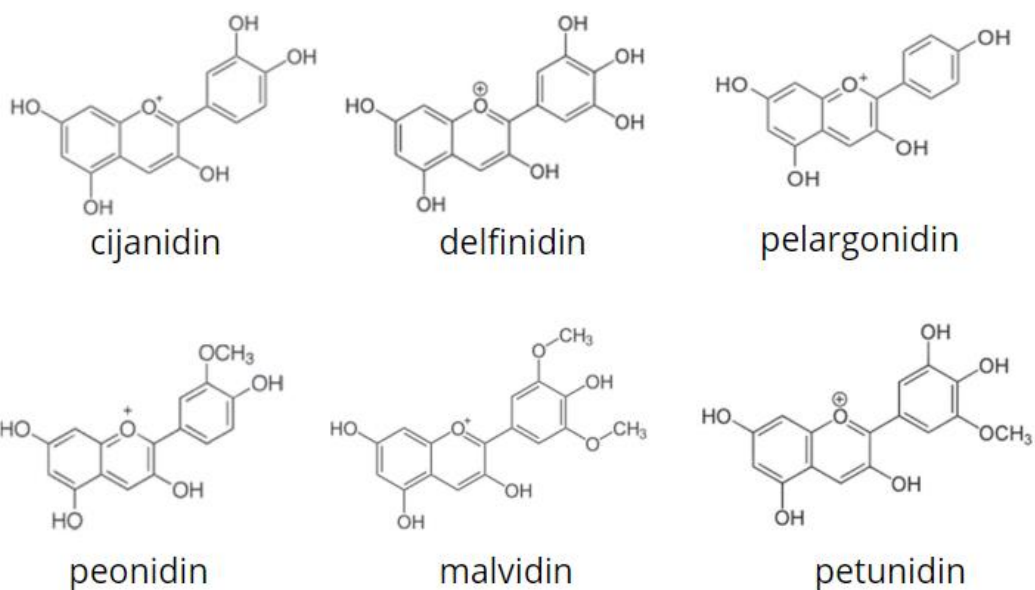
flavonoli i katehini. Fenolne kiseline prisutne u bobičastom voću i plodovima su hidroksilirani derivati benzojeve kiseline (*p*-hidrokisibenzojeva kiselina, siringinska, galna i elaginska) i cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska) (Macheix, 1990).

Velik dio fenolnih spojeva iz ploda nalazi se u soku aronije, ali je i meso plodova koje zaostaje u procesu proizvodnje soka bogato ovim bioaktivnim spojevima (Mayer-Miebach i sur., 2012). Prema istraživanju Oszmiański i Wojdyło (2005), udio ukupnih fenola u plodovima aronije iznosio je 7849,21 mg/100 g suhe tvari, soku aronije 3729,07 mg/100 g suhe tvari, a komini aronije 10583,27 mg/100 g suhe tvari. Slične rezultate navode Sójka i sur. (2013) koji su proveli istraživanje na komini aronije, gdje je udio ukupnih fenola iznosio 8044-15058 mg/100 g suhe tvari, dok Oszmiański i Lachowicz (2016) navode viši sadržaj udjela ukupnih fenola u prahu liofilizirane komine aronije koji iznosi 15607,48–24447,77 g/100 g suhe tvari.

Plod aronije bogat je procijanidinima, antocijanima te fenolnim kiselinama. Sójka i sur. (2013) u svome istraživanju otkrili su da su glavni polifenoli bili flavanoli, koji su činili od 88,2 % do 90,5 % ukupnog sadržaja polifenola. U grupi flavanola dominirali su proantocijanidini, čiji je sadržaj određen u rasponu od 7274 do 12,93 mg/100 g suhe tvari. Hidroksicimetne kiseline kao i flavonoli bili su prisutni u komini u znatno manjim količinama. Sadržaj kiselina, ovisno o frakciji, iznosio je 58-152 mg/100 g suhe tvari, dok je količina flavanola iznosila od 57 do 127 mg/100 g suhe tvari. U istraživanju Mayer-Miebach i sur. (2012) autori su također uočili visok udio proantocijanidina koji je iznosio 800-17800 mg/100 g suhe tvari u plodovima aronije, 470-900 mg/100 mL u soku aronije te 3100-6300 mg/100 g suhe tvari u komini aronije.

### **1.3.2 Antocijani u plodu i komini aronije**

Antocijani, podskupina flavonoida, su plavi, crveni ili ljubičasti pigmenti koji se nalaze u biljkama, posebno u cvijeću, voću i gomoljima. U kiselim uvjetima, antocijani se pojavljuju kao crveni pigment, dok plavi pigment antocijana postoji u alkalnim uvjetima. Najčešći antocijani su cijanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin i petunidin (Khoo i sur. 2017). Njihova kemijska struktura prikazana je na slici 3.



**Slika 3.** Kemijska struktura nekih antocijana (prema Khoo i sur., 2017)

Plod aronije ima tamnoplavu boju zbog visoke razine antocijana koji uključuju cijanidin-3-glukozid, 3-galaktozid, 3-ksilozid i 3-arabinozid. Osim navedenih, prisutni su i pelargonidin-3-galaktozid te pelargonidin-3-arabinozid u nižim koncentracijama (Kim i sur., 2013). Cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid su dominantni predstavnici s kumulativnim sadržajem u plodovima aronije većim od 90 %. Ukupna količina antocijana u svježim plodovima varira u rasponu od 357 do 1790 mg/100 g svježih plodova (Oszmianski i Wojdyło, 2005).

Prema istraživanju Roda-Serrat i sur. (2021), sadržaj antocijana u komini aronije varira od 5 do 20 mg/g suhe tvari, s iznimkama koje dosežu čak 115 mg/g suhe tvari. Prema Sójka i sur. (2013), antocijani su bila druga skupina polifenola prisutnih u komini, pri čemu je njihov sadržaj bio u rasponu od 7,7 - 9,3 % ukupnih polifenola, odnosno bio je u rasponu od 616 - 1239 mg/100 g. Glavni predstavnici antocijana bili su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid, koji su zajedno činili više od 90 % ove skupine spojeva. Kapci i sur. (2013) su proveli istraživanje na proizvodima od aronije i odredili njihov antioksidacijski kapacitet te se pokazalo kako je upravo komina aronije sadržavala najveći udio antocijana u usporedbi s plodovima i ostalim uzorcima. Također glavni predstavnici, kao i u istraživanju Sójka i sur. (2013), bili su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid, koji su činili 93,1 % ukupnih antocijana, a uz njih još su bili prisutni i cijanidin-3-glukozid te cijanidin-3-kxilozid.

S obzirom da je struktura antocijana karakterizirana nezasićenim dvostrukim vezama i lako

oksidirajućim skupinama, vrlo su podložni degradacijskim promjenama uzrokovanih vanjskim čimbenicima poput pH, temperature, prisutnosti kisika, svjetlosti i iona metala (Tan i sur., 2022). Iz tog razloga, njihova ekstrakcija iz plodova je ključan korak za njihovu daljnju primjenu. Općenito, antocijani se ekstrahiraju vodom ili alkoholom, poput etanola i metanola, ili mješavinama vode i alkohola te njihovim zakiseljenim varijantama zbog povećane stabilnosti antocijana u kiselom mediju. Za zakiseljavanje otapala preporučuje se upotreba slabih kiselina (npr. mravlje, limunske ili octene kiseline), budući da upotreba jakih koncentriranih kiselina može dovesti do destabilizacije molekule antocijana. S obzirom na polarnu strukturu antocijana, dodavanje vode u smjesu otapala može poboljšati prinos ekstrakcije (Tena i Asuero, 2022).

### 1.3.3 Antioksidacijski kapacitet ploda i komine aronije

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva koji su skloni oksidaciji, donirajući elektrone ili atome vodika. Na taj način u biološkim sustavima neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kada su prisutni u štetno velikim količinama, tj. kada je koncentracija slobodnih radikala viša od one potrebne za normalne fiziološke procese. Antioksidansi inaktiviraju slobodne radikale, čime prekidaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Osim što sprječavaju nepoželjne procese oksidacije, antioksidansi mogu pomoći u smanjenju oštećenja uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala (Krishnaiah i sur., 2011).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se razne *in vitro* metode koje se temelje na redukciji radikala ABTS+ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), kao i metoda za mjerenje antioksidacijske snage redukcijom željeza (FRAP; engl. *ferric reducing/antioxidant power*). Zbog složenosti oksidacijskih procesa, preporučuje se istovremeno korištenje više metoda, jer rezultati dobiveni samo jednom metodom ne mogu biti točno interpretirani. Metode koje se temelje na redukciji radikala (ABTS i DPPH) te metoda za mjerenje antioksidacijske snage redukcijom željeza (FRAP) su široko rasprostranjene i često se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnog materijala. Ove metode se baziraju na prijenosu elektrona iz uzorka na reaktivni radikal, a promjena boje se mjeri spektrofotometrijski. Dok se metode ABTS i DPPH temelje na redukciji slobodnih radikala dodatkom antioksidativnih spojeva prisutnih u uzorku, metodom FRAP se mjeri redukcija  $Fe^{3+}$  iona koji se iz  $Fe^{3+}$ -TPTZ kompleksa (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reduciraju

do Fe<sup>2+</sup> iona djelovanjem antioksidativnih spojeva iz uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021).

Uz navedene metode, za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste se i druge metode poput ORAC (engl. *oxygen radical absorbance capacity*) metode. Ova metoda mjeri sposobnost antioksidansa da inhibiraju oksidaciju izazvanu slobodnim radikalima, obično pomoću fluoresceina kao markera. Promjena fluorescencije se prati spektrofotometrijski kako bi se odredila sposobnost uzorka da neutralizira peroksil radikale, što daje kvantitativnu procjenu ukupnog antioksidacijskog kapaciteta uzorka. ORAC metoda je vrlo korisna jer uzima u obzir kinetiku reakcije i stabilnost radikala tijekom vremena, pružajući tako detaljniju sliku antioksidacijske aktivnosti uzorka (Dávalos i sur., 2004).

Polifenoli prisutni u aroniji značajno doprinose njenom visokom antioksidacijskom potencijalu, koji je obično viši od ostalih analiziranih biljnih materijala (Strugała i sur., 2016). Pored plodova aronije, i proizvodi od aronije, kao i nusproizvodi koji nastaju nakon prerade, također pokazuju antioksidacijski potencijal. Prema istraživanju Oszmiański i Wojdyło (2005), antioksidacijski kapacitet komine aronije (301,89 µM Trolox/100 g suhe tvari mjeren DPPH metodom; 779,58 µM Trolox/100 g suhe tvari mjeren ABTS metodom) znatno je veći od onog u plodu aronije (279,38 µM Trolox/100 g suhe tvari mjeren DPPH metodom; 439,49 µM Trolox/100 g suhe tvari mjeren ABTS metodom) i soku aronije (127,45 µM Trolox/100 g suhe tvari mjeren DPPH metodom; 314,05 µM Trolox/100g suhe tvari mjeren ABTS metodom).

Antioksidacijsko djelovanje aronije započinje u gastrointestinalnom traktu gdje antocijani mogu služiti kao hvatači slobodnih radikala. Mehanizmi *in vivo* antioksidacijske aktivnosti polifenola aronije nakon apsorpcije uključuju suzbijanje stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) te obnavljanje antioksidativnih enzima. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli točni mehanizmi antioksidacijskog djelovanja aronije *in vivo* (Denev i sur., 2019). Mnoge studije su potvrdile korisne učinke konzumiranja aronije na visoki krvni tlak, poremećaje metabolizma glukoze, dislipidemiju, upalna stanja te smanjenje faktora rizika od metaboličkog sindroma. Također, istraživanja su pokazala mogući potencijal aronije za inhibiranje razvoja određenih vrsta raka (Sidor i Gramza-Michałowska, 2019). *In vitro* istraživanja su pokazala da aronija pokazuje zaštitni učinak i kod bolesti raka crijeva. Bitno je napomenuti da još uvijek ne postoji literatura o nepoželjnim ili toksičnim učincima ploda aronije, soka ili drugih proizvoda (Kulling i Rawel, 2008). Aroniju karakterizira najviša zabilježena ORAC vrijednost, čak nekoliko puta viša od ostalog bobičastog voća (tablica 1) (Kulling i Rawel, 2008).

**Tablica 1.** Antioksidacijski kapacitet bobičastog voća (određena ORAC metodom) (prema Kulling i Rawel, 2008)

Vrsta bobičastog voća	Antioksidacijski kapacitet ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ svježeg voća)
Borovnica ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	44,6
Kupina ( <i>Rubus fruticosus</i> )	14,8 – 22,6
Ribizl ( <i>Ribes nigrum</i> )	36,9 – 93,1
Aronija ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	160,2
Brusnica ( <i>Vaccinium macrocarpa</i> )	8,2 – 14,1
Grožđe ( <i>Vitis vinifera</i> )	7,39
Malina ( <i>Rubus idaeus</i> )	18,49
Jagoda ( <i>Fragaria ananassa</i> )	15,36

#### 1.4 Ekstrakcija

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda za odvajanje i koncentriranje tvari te se u prehrambenoj industriji definira kao prijenos jedne ili više bioloških tvari iz materijala u tekuću fazu (Lloyd i van Wyk, 2012). Ona predstavlja osnovni korak za izolaciju željenih spojeva iz biljnog materijala prije daljnje upotrebe ili analize. Pri odabiru odgovarajuće metode, potrebno je uzeti u obzir prirodu biljnog materijala, temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija, vrstu i pH otapala, omjer otapala i uzorka, trajanje ekstrakcije, primjenu konačnih proizvoda. Pri odabiru prikladne metode ekstrakcije treba uzeti u obzir lipofilnost/hidrofilnost spojeva te prema tome odabrati odgovarajuće otapalo. Za ekstrakciju polarnih spojeva koriste se polarna otapala poput vode i etanola, dok se za ekstrakciju nepolarnih spojeva koriste nepolarni heksan ili diklormetan (Abubakar i Haque, 2020).

U laboratorijskim uvjetima i prehrambenoj industriji za ekstrakciju se uglavnom koriste konvencionalne metode kruto-tekuće ekstrakcije, poput Soxhlet ekstrakcije, maceracije i vodene destilacije. Kako bi se omogućilo oslobađanje željenih komponenti iz kompleksnih staničnih struktura, svaka metoda ekstrakcije prvo zahtijeva mehaničko razaranje stanica. Klasično razaranje provodi se mehaničkim metodama (npr. mljevenjem i drobljenjem) ili toplinskim i kemijskim tretmanima, što može oštetiti ili smanjiti kvalitetu ekstrahiranih proizvoda (Chemat i sur., 2020). Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije uključuju

korištenje velikih količina toksičnih organskih otapala, visoku potrošnju energije, dugotrajnost postupka ekstrakcije, nisku selektivnost, nižu kvalitetu i prinos konačnog proizvoda te rizik za okoliš (Alexandre i sur., 2017).

Modifikacijom konvencionalnih metoda ekstrakcije razvile su se napredne tehnike koje omogućuju brzu obradu uzoraka, jednostavnu automatizaciju, visoku ponovljivost i korištenje minimalnih količina organskih otapala, što je u skladu s načelima „zelene kemije“ (Saha i sur., 2018). Brojna istraživanja su pokazala da etanol ima najveći afinitet prema fenolnim spojevima, zbog čega je najčešće korišten za njihovu ekstrakciju iz voća i povrća. Osim toga, etanol je poželjno otapalo zbog svoje pristupačnosti, obnovljivog izvora (šććerna trska) te GRAS (engl. *generally recognized as safe*; općenito prepoznat kao sigurno) statusa (Kumar i sur., 2021). Za poboljšanje ekstrakcije fenolnih spojeva, koji su stabilniji pri nižim pH vrijednostima, otapala se mogu zakiseliti obično dodavanjem 1 % kiseline (v/v) poput klorovodične i octene kiseline ili drugih kiselina (Petreska Stanoeva i sur., 2020).

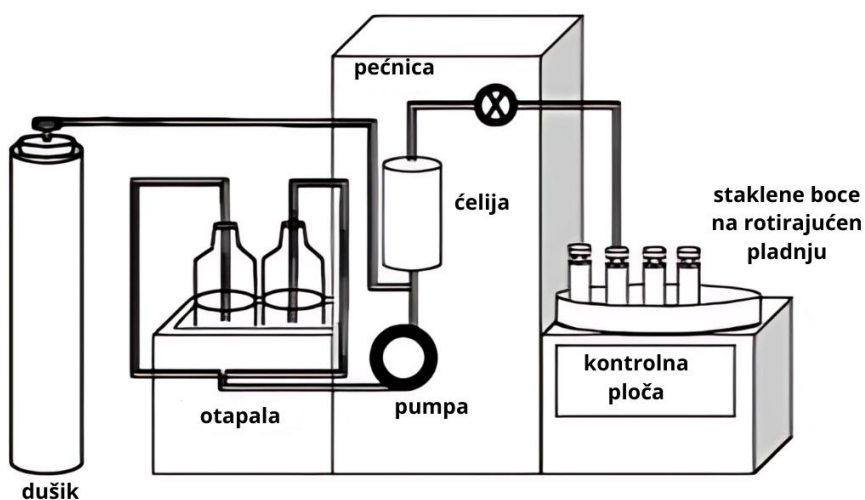
Neke od najčešćih naprednih tehnika su: ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (engl. *pressurized liquid extraction*; PLE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assistend extraction*; MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasonic-assisted extractions*; UAE) te ekstrakcija potpomognuta plazmom (engl. *plasma assisted extractions*; PAE) (Azmir i sur., 2013). Glavna prednost korištenja naprednih tehnika ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije je ta što su napredne tehnike većinom netoplinske. To dovodi do očuvanja termolabilnih komponenti prisutnih u hrani i povećava prinos i kvalitetu dobivenog ekstrakta. Sam proces ima nisku potrošnju energije i otapala, što ga čini ekološki prihvatljivim (Martínez i sur., 2018). Ipak, visoka početna ulaganja u potrebnu opremu i visoki operativni troškovi predstavljaju izazov za njihovu implementaciju i primjenu.

#### **1.4.1 PLE**

PLE je brza tehnika koja omogućuje dobivanje ekstrakata iz krutih i polukrutih uzoraka uz minimalnu potrošnju otapala u vrlo kratkom vremenu. Radi se o automatiziranoj tehnici koja se temelji na ekstrakciji otapalom pri povišenoj temperaturi i tlaku, posebno pogodnoj za ekstrakciju spojeva osjetljivih na visoke koncentracije kisika. Povišena temperatura poboljšava topljivost analita u otapalu i ubrzava difuziju, što omogućuje brže kretanje analita iz matriksa u otapalo. Viša temperatura također smanjuje viskoznost, olakšavajući prodiranje otapala u

pore matriksa, i prekida jake interakcije između otopljene tvari i matriksa. Kombinacija povišene temperature i tlaka omogućuje učinkovitiju, bržu i potpuniju ekstrakciju, jer povišeni tlak pomaže otapalu da bolje prodre u matriks uzorka i postigne bliži kontakt s analitima, unatoč relativno niskim točkama vrenja mnogih organskih otapala. Upravo zbog povišenog tlaka, otapalo ostaje u tekućem stanju i iznad svog vrelišta, što omogućuje bolje prodiranje u matriks, povećavajući učinkovitost ekstrakcije (Mottaleb i Sarker, 2012). Osim navedenih radnih parametara za PLE, treba spomenuti i broj ciklusa ekstrakcija, statičko vrijeme ekstrakcije, veličinu čestica, volumen ispiranja i otapalo za ekstrakciju (Alvarez-Riviera i sur., 2020).

Postupak ekstrakcije (slika 4) kombinira dinamički i statički protok otapala kroz zagrijanu ekstrakcijsku ćeliju koja sadrži uzorak. Volumen ćelije varira od 1 do 100 mL. Uzorak u ćeliji je zajedno sa specijalnim filterom i adsorbentom kako bi se povećala površina uzorka i brzina protoka, čime se poboljšava učinkovitost ekstrakcije. Za učinkovitu ekstrakciju, veličina čestica uzorka treba biti manja od 1 mm (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Ekstrakcijska ćelija se smješta u rotirajući utor uređaja i prenosi u pećnicu, gdje se puni otapalom, zagrijava i podešava tlak iznad praga potrebnog za održavanje otapala u tekućem stanju. Nakon postizanja toplinske ravnoteže, ćelija ostaje u pećnici određeno vrijeme pod konstantnom temperaturom i tlakom, omogućujući difuziju analita iz matriksa u otapalo. Ekstrakti se skupljaju u staklenu bocu volumena od 40 do 250 mL na rotirajućem pladnju. Nakon završetka ekstrakcije, ćelija se vraća u početni položaj i uređaj je spreman za novu ekstrakciju (Mottaleb i Sarker, 2012).



**Slika 4.** Shema postupka PLE (prema De la Guardia i Armenta, 2011)



Za ovu tehniku ekstrakcije obično se koriste organska otapala različitih polariteta, od *n*-heksana do metanola. Prema Alvarez-Rivera i sur. (2020), vodena otopina etanola (EtOH > 50 %), bila zakiseljena ili ne, pokazala se kao pogodno otapalo za ekstrakciju polifenola iz različitih izvora kao što su hrana, biljni proizvodi, morski proizvodi i agroindustrijski nusproizvodi PLE tehnikom.

U usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, PLE tehnika nudi brojne prednosti. Vrijeme ekstrakcije kraće je nego kod konvencionalnih tehnika, također volumen korištenih otapala može biti 10-20 puta manji, što smanjuje količinu otpadnih tvari i čini metodu ekološki prihvatljivijom. PLE uređaj štiti spojeve osjetljive na kisik i svjetlost, a tehnika je učinkovita i potpuno automatizirana, zahtijevajući manje radne snage i pružajući veću reproducibilnost (Raut i sur., 2015). Ipak, cijena opreme i troškovi rada s visokim temperaturama i tlakovima su visoki. Ako PLE parametri nisu pravilno postavljeni, može doći do smanjenja prinosa termolabilnih spojeva, a visoke temperature i tlakovi mogu uzrokovati otapanje komponenti matriksa koje bi inače ostale netopljive kod standardne ekstrakcije, stoga je vrlo važno optimirati uvjete ekstrakcije kako bi se postigli najbolji rezultati (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Grunovaitė i sur. (2016) zabilježili su kako je primjenom PLE tehnike postignut visok prinos bioaktivnih spojeva u ekstraktima iz komete aronije, s rasponom prinosa između 3 i 48 %, ovisno o korištenom otapalu i uvjetima ekstrakcije. Najviši prinos i značajni antioksidacijski kapacitet pokazali su ekstrakti dobiveni pri 130 °C uz metanol kao ekstrakcijsko otapalo. Pri nešto višim vrijednostima temperature od 165 °C i korištenjem 46 %-tne vodene otopine etanola s dodatkom 1,8 % mravlje kiseline postignut je visok prinos bioaktivnih spojeva u istraživanju kojeg su proveli Brazdauskas i sur. (2016) na komini aronije pomoću PLE.

#### **1.4.2 MAE**

MAE predstavlja modernu, nekonvencionalnu tehniku koja se uspješno koristi za izdvajanje mnogih biološki aktivnih spojeva iz različitih prirodnih izvora (Rodriguez-Jasso et al., 2011). Ova tehnika posebno je pogodna za ekstrakciju funkcionalnih sastojaka hrane i aktivnih farmaceutskih spojeva iz biomaterijala (Sosa-Hernández et al., 2018) te je često primjenjivana za ekstrakciju fenolnih spojeva (Xu i sur., 2017).

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi s frekvencijama između 300 MHz i 300 GHz, valnih duljina od 1 mm do 30 cm. Nalaze se u elektromagnetskom spektru između X-zraka i infracrvenih zraka te se sastoje od dva oscilirajuća polja: magnetskog i električnog polja koje je odgovorno za zagrijavanje (Mandal i sur., 2007). Kao neionizirajuće zračenje, njihova energija od 0,0001 eV nije dovoljna za razbijanje vodikovih veza pa ne mijenjaju strukturu tvari. Umjesto toga, uzrokuju intenzivnije titranje molekula i značajno povećanje temperature, a za razliku od ionizirajućeg zračenja, nisu štetni za ljudsko zdravlje (Pedroza i sur., 2015). Najčešće korištene frekvencije u industrijskim, znanstvenim i medicinskim istraživanjima su 0,915 i 2,45 GHz (Blekić i sur., 2011).

MAE se može provoditi u otvorenim ili zatvorenim sustavima, kao što je prikazano na slici 5. U zatvorenom sustavu, ekstrakcija se odvija u zatvorenom spremniku, gdje se mogu regulirati tlak i temperatura. Zahvaljujući mogućnosti povišenja tlaka, ekstrakcija se može provoditi pri temperaturama višim od vrelišta odabranog otapala. Ovaj sustav je posebno pogodan za ekstrakciju termostabilnih spojeva. Obično se ekstrakcija provodi pri temperaturi dva do tri puta višoj od vrelišta otapala, dok se u otvorenom sustavu provodi pri atmosferskom tlaku i temperaturi vrelišta otapala (Uzel, 2018).



**Slika 5.** Shematski prikaz zatvorenog i otvorenog sustava MAE (prema Uzel, 2018)

Princip mikrovalnog zagrijavanja temelji se na dva osnovna mehanizma: ionskoj vodljivosti i dipolnoj rotaciji, koji često djeluju istovremeno. Ionska vodljivost se manifestira kroz migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja, pri čemu otopina pruža otpor, što rezultira trenjem i posljedičnim zagrijavanjem otopine. Dipolna rotacija uključuje kretanje dipolnih molekula koje prate brze promjene električnog polja, što dovodi do zagrijavanja na frekvenciji od 2450 MHz. Dipolne molekule nastoje se uskladiti s električnim poljem, ali ako se električno polje mijenja prebrzo, molekule ne uspijevaju održati korak, što uzrokuje njihovu vibraciju, trenje i generiranje topline (Mandal i sur., 2007). Za razliku od konvencionalnih metoda, gdje se velik dio toplinske energije gubi i odlazi u okoliš, kod upotrebe mikrovalova dolazi do ciljanog i selektivnog zagrijavanja zbog čega nema gubitka topline. Osim očuvanja topline, bitno je istaknuti i druge prednosti poput visoke učinkovitosti ekstrakcije i male potrošnje otapala.

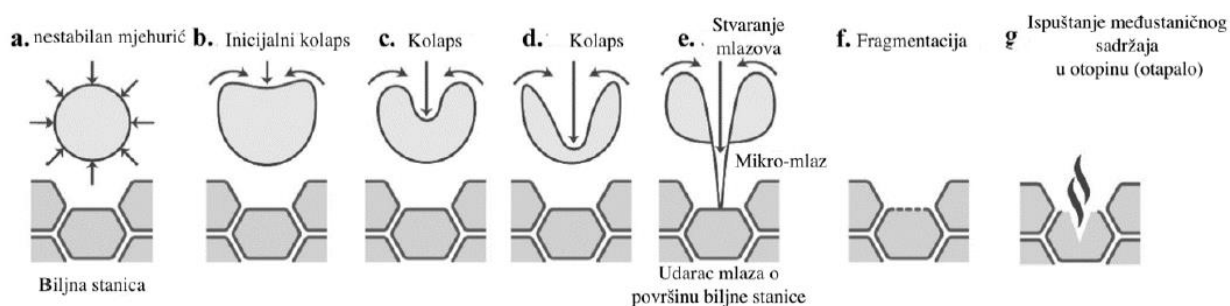
Jedno od ključnih svojstava mikrovalova je faktor rasipanja ( $\tan \delta$ ), koji mjeri sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i prenese je kao toplinu na okolne molekule. Otapala koja su dovoljno polarna da bi se mogla zagrijati energijom mikrovalova su: etanol, metanol i voda (Blekić i sur., 2011). Lovrić i sur. (2017) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj parametara ekstrakcije tijekom MAE na ukupni sadržaj fenola u cvjetovima trnine. Ispitivani parametri ekstrakcije bili su: vrsta otapala i volumen alkohola u otapalu, vrijeme i temperatura ekstrakcije te snaga mikrovalova. Rezultati su pokazali kako je vodena otopina etanola prikladnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva od vodene otopine metanola. Simić i sur. (2016) proveli su istraživanje u kojem su optimizirali parametre MAE na aroniji te se pokazalo kako povećanjem snage mikrovalova i vremena ekstrakcije značajno povećava prinos polifenola. Također je utvrđeno da koncentracija etanola od 50 % daje najbolji prinos, dok veće koncentracije etanola smanjuju učinkovitost ekstrakcije. Slične rezultate dobili su Elez Garofulić i sur. (2023) u svom istraživanju na komini arovije u kojem su rezultati pokazali da povećanje temperature pozitivno utječe na sadržaj ukupnih antocijana te da se optimalni rezultati postižu korištenjem 50 %-tne vodene otopine etanola uz dodatak 1 % mravlje kiseline kao otapala.

### **1.4.3 UAE**

UAE je napredna tehnika koja koristi zvučne valove određenih frekvencija i amplituda za ubrzavanje prijenosa mase i topline. Ova tehnika povećava propusnost staničnih stijenki i

membrana, čime se stimulira oslobađanje staničnog sadržaja, što rezultira boljim prinosom i kraćim vremenom ekstrakcije.

Sonokemijski učinci ultrazvučnih valova, kao rezultat fenomena akustične kavitacije, ključni su za UAE. Kavitacija uključuje stvaranje, širenje i imploziju mjehurića plina, što je uzrokovano promjenama tlaka zbog ekspanzije i kompresije uzrokovane ultrazvučnim valovima u tekućem mediju (Chemat i sur., 2004). Tijekom implozije mjehurića, temperature mogu doseći približno 5226 °C, a tlakovi oko 50 MPa, što uzrokuje brojne kemijske reakcije u okolini mjehurića. Ove pojave stvaraju udarne valove, mikro-mlazove, turbulencije i posmične sile koje razaraju stanične strukture, kao što je prikazano na slici 6 (Wang i Weller, 2006).



**Slika 6.** Utjecaj kavitacijskog mjehurića na biljnu stanicu (prema Martinez-Solano i sur., 2020)

UAE se sve više koristi u prehrambenoj industriji za povećanje ekstrakcije polifenola, antocijana i aromatskih tvari (Drmić i Režek Jambrak, 2011). Proces se provodi u ultrazvučnoj kupelji ili pomoću sonde pri frekvencijama od 20 kHz do 2000 kHz. Prednosti UAE uključuju veće prinose, niže temperature procesa, smanjenje količine otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i niže troškove u odnosu na konvencionalne metode (Drmić i Režek Jambrak, 2011; Wang i Weller, 2006).

Kod UAE važno je optimirati proces uz pravilan odabir sljedećih parametara: frekvencija (kHz), amplituda (%), ciklus (%), nazivna izlazna snaga (W) i geometrijski parametri sonde (dužina i promjer – mm) (Wang i Weller, 2006).

Intenzitet ultrazvuka proporcionalan je amplitudi vibracija ultrazvučnog izvora; povećanje amplitude vibracija povećava intenzitet vibracija i sonikacijski učinak. Međutim, za postizanje praga kavitacije potreban je minimalni intenzitet pa veće amplitude nisu uvijek nužne za postizanje željenih rezultata. Visoke amplitude ultrazvuka mogu oštetiti ultrazvučnu sondu, što

može dovesti do agitacije tekućeg medija umjesto kavitacije i lošeg prijenosa ultrazvuka. Amplituda ultrazvuka treba biti veća za uzorke visoke viskoznosti i za dobivanje mehaničkih vibracija koje potiču kavitaciju (Chemat i sur., 2004).

Otapalo koje se koristi za ultrazvučnu ekstrakciju treba biti pažljivo odabrano. Većina aplikacija izvodi se u vodi, ali ovisno o namjeni mogu se koristiti i druge manje polarne tekućine, poput nekih organskih otapala. Viskoznost otapala i površinska napetost utječu na kavitaciju; teže je postići kavitaciju u tekućinama s visokom viskoznošću i visokom površinskom napetošću (Chemat i sur., 2004). Odabir prikladnog otapala značajno utječe na prinos fenolnih spojeva, pri čemu su najčešća otapala alkoholi (etanol, metanol), voda i aceton.

Bamba i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su ispitivali utjecaj uvjeta UAE na ostacima borovnice za izolaciju bioaktivnih spojeva i određivanje njihovog antioksidacijskog kapaciteta. Prema navedenom istraživanju, najviše koncentracije fenolnih spojeva postignute su u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola te ukupni fenolni spojevi, ukupni flavonoidi i ukupni antocijani u etanolnim ekstraktima bili su u prosjeku oko 5, 3 i 1,5 puta veći, redom, nego u vodenim ekstraktima. U istraživanju kojeg su proveli Galván D'Alessandro i sur. (2014) na komini aronije detaljno su proučeni parametri poput: vremena ekstrakcije, temperature, sastava otapala i snage ultrazvuka na prinos antocijana te na antioksidacijski kapacitet ekstrakata. Više temperature i veći udio etanola u otapalu značajno su poboljšali prinos ekstrakata te su najbolji rezultati postignuti pri temperaturi od 70 °C i korištenjem 50 %-tne vodene otopine etanola kao otapala, što je rezultiralo najvećim prinosima antocijana. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Galván i sur. (2012) na aroniji, gdje su optimalni uvjeti za UAE uključivali temperaturu 60 °C i korištenje 50 %-tne vodene otopine etanola kao otapala.

## **1.5 Kriogeno mljevenje**

Mljevenje je jedna od najstarijih metoda za procesiranje hrane koja se koristi za smanjenje veličine čestica materijala. Tradicionalno mljevenje uzrokuje porast temperature zbog trenja, što može dovesti do nepoželjnih promjena u materijalu i gubitka nutritivno vrijednih sastojaka. Zbog toga je razvijeno mljevenje uz hlađenje kriogenicima, koje sprječava porast temperature i povećava krhkost materijala, omogućujući postizanje manjih čestica (Kaur i Srivastar, 2018). Kriogeno mljevenje predstavlja učinkovitu tehniku za proizvodnju praha uz hlađenje kriogenicima poput tekućeg dušika ili ugljikovog (IV) oksida (CO<sub>2</sub>) pri vrlo niskoj temperaturi od -196 °C i atmosferskom tlaku. Ova tehnika koristi se za mljevenje prehrambenih proizvoda

poput kave, začina, bilja, kaka, sjemenki i orašastih plodova, kao i hrane koja je sklona promjeni okusa i gubitku arome tijekom tradicionalnog mljevenja (Wilczek i sur., 2004).

Princip rada uređaja zasniva se na horizontalnim oscilacijama posude za mljevenje, pri čemu čelične kuglice, zbog sile inercije, udaraju u uzorak velikom energijom. Ova kombinacija udara i trenja čini uzorak vrlo lomljivim i krhkim te se na kraju on usitnjava na vrlo male čestice. Gustoća i težina materijala od kojeg su kuglice izrađene direktno utječu na energiju usitnjavanja (Retsch, 2017).

Kriogeno mljevenje ima nekoliko prednosti u usporedbi s mljevenjem pri sobnoj temperaturi. Smanjena je aglomeracija uzorka i lijepljenje proizvoda za stijenke opreme rezultira učinkovitijim mljevenjem, boljim iskorištenjem i poboljšanjem mikrostrukture. Oksidacijske reakcije su reducirane zbog dušičnog okoliša. Kriogeno mljevenje omogućuje postizanje veličine čestica od oko 50  $\mu\text{m}$  te je vrijeme mljevenja potrebno za postizanje nanostrukture značajno smanjeno (Lavernia i Schoenung, 2008). Mikronizacija omogućuje razgradnju materijala bez upotrebe kemikalija, što otvara mogućnost istraživanja na sub-staničnoj razini. Primjena vrlo niskih temperatura, ispod  $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smanjuje rastezljivost slojeva i povećava njihovu krhkost. Mikronizacija također rezultira oslobađanjem bioaktivnih komponenti iz staničnih stijenki zbog oštećenja staničnih struktura. Osim toga, povećava aktivnu površinu, čime spojevi s antioksidacijskim djelovanjem postaju mnogo dostupniji za ekstrakciju ili ulazak u reakcije (Mondragón i sur., 2013). No, uz navedene prednosti, treba uzeti u obzir i visoku cijenu uređaja za kriogeno mljevenje (Wilczek i sur., 2004). Kaur i Srivastav (2018) proveli su istraživanje u kojem su pratili učinak kriogenog mljevenja na morfološke karakteristike praha kore manga. Rezultati su pokazali kako je kriogeno mljevenje omogućilo bolje zadržavanje bioaktivnih spojeva uključujući ukupne fenole i flavonoide, što je rezultat smanjenog utjecaja topline tijekom mljevenja čime su se očuvali termolabilni spojevi. Također je uočeno kako je kriogeno mljevenje rezultiralo glatkim i finim homogenim česticama s poroznom strukturom te su analize pokazale kako su sve čestice dobivene kriogenim mljevenjem imale ujednačenu veličinu i oblik u usporedbi s konvencionalnim postupcima mljevenja. Slične prednosti uočene su u istraživanju Saxena i sur. (2018), u kojem su autori ispitivali učinak kriogenog mljevenja na poboljšanje kvalitete i zadržavanje arome indijskih začina. Pokazalo se kako kriogeno mljevenje značajno doprinosi očuvanju aroma i eteričnih ulja u začinima. Eterična ulja u crnom papru činila su 2,61 % u kriogeno mljevenim uzorcima, u usporedbi s 1,15 % u uzorcima mljevenim konvencionalnim postupkom. Također je uočeno

smanjenje gubitka eteričnih ulja i ukupnog ulja u začinima, gdje su gubici eteričnih ulja kod tradicionalnog mljevenja iznosili do 40 %, dok je kod kriogenog mljevenja taj gubitak minimalan. Ovom tehnologijom zadržava se izvorna boja začina i sprječavaju se promjene njihovih organoleptičkih svojstava.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada bio je ispitati bioaktivni potencijal komine aronije primjenom naprednih tehnika ekstrakcije i mljevenja u svrhu njezine valorizacije kao vrijednog nusproizvoda koji zaostaje u proizvodnji soka prateći načela kružne ekonomije i održivosti s ciljem smanjenja prehrambenog otpada i evaluiranja mogućnosti njegove ponovne upotrebe.

U tu svrhu postavljeni su sljedeći specifični ciljevi rada:

- Ispitati utjecaj procesnih uvjeta različitih naprednih tehnika ekstrakcije (PLE, MAE i UAE) na prinos fenolnih spojeva i antocijana izoliranih iz liofilizirane komine aronije te odrediti antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata primjenom različitih *in vitro* metoda (FRAP, DPPH i ABTS) pri čemu će se definirati optimalni procesni uvjeti za svaku primijenjenu naprednu tehniku ekstrakcije pri kojima se postiže maksimalni prinos fenolnih spojeva i antocijana te antioksidacijski kapacitet
- Međusobno usporediti učinkovitost svih primijenjenih naprednih tehnika ekstrakcije i ekstrakcije refluksom kao konvencionalne tehnike ekstrakcije
- Ispitati potencijal kriogenog mljevenja kao predtretmana za poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije; procijeniti kako duljina trajanja kriogenog mljevenja utječe na veličinu čestica usitnjene komine aronije i prinos fenolnih spojeva i antocijana te antioksidacijski kapacitet, te dodatno usporediti učinkovitost kriogenog mljevenja s konvencionalnim postupkom mljevenja
- Odrediti kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijal

##### 3.1.1 Komina aronije

U ovom istraživanju korištena je komina aronije (*A. melanocarpa* L.) dobivena kao nusprodukt prešanja plodova aronije nakon proizvodnje soka. Plodovi aronije ustupljeni su od tvrtke Terra Food d.o.o. (Koprivnica, Hrvatska). Korišteni plodovi aronije bili su sorte „Nero“ iz organskog uzgoja, ubrani sredinom rujna 2023. godine. Nakon berbe, plodovi su zamrznuti i pohranjeni pri -18 °C.

##### 3.1.2 Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Mravlja kiselina, 98%-tna
- Acetonitril, HPLC čistoće (Honeywell Riedel-de-Haën, Njemačka)
- 50 %-tna vodena otopina etanola

Priprema: S obzirom na potrebni volumen 50 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a odmjerne tikvice se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 50 %-tna vodena otopina etanola s dodatkom 1 % mravlje kiseline (1 % HCOOH/50 % EtOH)

Priprema: 10,2 mL 98 %-tne mravlje kiseline otpipetira se u odmjernu tikvicu volumena od 1 L te se napuni do oznake 50 %-tnom vodenom otopinom etanola

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjernoj tikvici od 1000 mL i filtrira nakon 24 h.

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg/mL

Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 1,86 g kalijeva klorida (KCl) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te se doda 980 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podese na vrijednost 1,0 ( $\pm 0,05$ ) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 6,3 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvažuje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\times 3\text{H}_2\text{O}$ ) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te se doda 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podese na vrijednost 4,5 ( $\pm 0,05$ ) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 20 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

Priprema: odvažuje se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330  $\mu\text{L}$  37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3\times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3\times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: odvažuje se 0,541 g željezo (III)-klorid heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- 100 %-tni metanol
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. Odvaga 500 mg Troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

- 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

Priprema: 0,1892 g  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  izvažuje se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.

- 7mM ABTS otopina

Priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- stabilna  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  otopina

Priprema: 88  $\mu\text{L}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  pri tome je 2,45 mmol/L.

- na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+

Priprema: 1000  $\mu\text{L}$  ABTS•+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

- Tekući dušik (Messer Croatia Plin d.o.o., Hrvatska)
- Dušik (99,999%, Messer Croatia Plin d.o.o., Hrvatska)
- Mobilna faza - otapalo A (0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi) i otapalo B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu)

Priprema: 1,02 mL 98 %-tne mravlje kiseline otpipetira se u odmjernu tikvicu volumena od 1 L te se napuni do oznake redestiliranom vodom, odnosno acetonitrilom.

- Komercijalni standardi fenolnih spojeva: cijanidin-3-glukozid klorid, kvercetin-3-glukozid, luteolin-6-C-glukozid, kamferol-3-O-glukozid, katehin i klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich, SAD)

### 3.1.3 Aparatura i pribor

Aparatura:

- Sokovnik Hurom HU-100 (Ver Vita d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M (Kern, Njemačka)
- Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01$  g) (Mettler Toledo, SAD)
- Vortex uređaj MS2 Minishaker IKA (IKA, Staufen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj DT 512 H (Bandelin Electronic, Berlin, Njemačka)
- Sušionik (Heratherm OMH100, Thermo Scientific, Dreieich, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, Pennsylvania, SAD)
- Električni mlinac (Waring WSG30, Sprzęt Laboratoryjny i Medyczny Labpartner KBS, Poljska)
- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE Ethos Easy, Sorisole (BG), Italija)
- Termička kupelj (BÜCHI, Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)

- Ultrazvuk (Heilscher, UP200Ht ultrasonic processor, Teltow, Njemačka) s maksimalnom nazivnom izlaznom snagom 200 W i ultrazvučnom frekvencijom od 26 kHz; sonda od titanija, Ø 14 mm, (154 mm<sup>2</sup>), duljine cca. 80 mm, vanjski naboj M6×0,75, za uzorke od 50 mL do 1000 mL, omjer amplitude cca. 1:1,2
- Kriomlin SPEX 6875D (SPEX SamplePrep, Metuchen, New Jersey)
- Liofilizator Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, Velika Britanija)
- Analizator vlage (Ohaus MB25, Parsippany, New Jersey)
- Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (Agilent series 1290 RRLC instrument) spojen s detektorom MS/MS trostruki kvadropol (Agilent 6430 QqQ) (Agilent, SAD)

#### Pribor:

- Plastične kivete (Falcon), volumena 50 mL
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 5, 10, 25, 100, 500, 1000 i 2000 mL
- Menzura, volumena 50, 100 i 1000 mL
- Staklene čaše, volumena 25, 50, 100 200 i 500 mL
- Stakleni lijevci
- Plastična žličica
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Tikvica s okruglim dnom
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100, 1000 i 5000 µL
- Dijatomejska zemlja
- Celulozni filteri
- Tikvice s ravnim dnom, volumena 25 mL
- Povratno hladilo
- Polipropilenske vrećice
- Parafilm
- Plinski plamenik
- Tronožac

- Keramička mrežica
- Stakleni štapić
- Metalna špatula
- Spremnik s dušikom
- Plastična posudica s poklopcem
- Staklene boce
- Nastavci za mikropipete Eppendorf
- Erlenmeyerova tikvica
- Kist
- Filter papir
- Ekstrakcijske ćelije
- Magnetni štapić
- Magnetni za miješanje
- Metalna posudica
- Kivete za spektrofotometriju
- Membranski filter, 0,45 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 100 × 2.1 mm I.D.) (Agilent, SAD)

## **3.2 Metode rada**

### **3.2.1 Priprema uzorka**

Za provedbu ovog istraživanja, zamrznuti plodovi aronije su odmrznuti pri sobnoj temperaturi te prešani u sokovniku prilikom čega je dobivena komina. Komina je zamrznuta pri -80 °C tijekom 24 h, a potom liofilizirana 48 h pri -55 °C, nakon čega je zapakirana u polipropilenske vrećice, hermetički zatvorena i skladištena pri sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcija. Neposredno prije ekstrakcije, liofilizirana komina koja se koristila za određivanje optimalnih PLE, MAE i UAE procesnih uvjeta te za ekstrakciju refluksom usitnjena je konvencionalnim mljevenjem u električnom mlincu, dok je liofilizirana komina korištena za određivanje utjecaja kriogenog mljevenja usitnjena u kriomlinu uz primjenu tekućeg dušika.

### **3.2.2 Kriogeno mljevenje**

Za predtretman kriogenim mljevenjem potrebno je odvagati 15 g liofilizirane komine aronije u ćeliju za mljevenje (50 mL) koja se postavi u kriomlin. Svaki uzorak se prije mljevenja prethodno ohladi 2 min u struji tekućeg dušika. Uzorak komine se zatim melje 1, 3, 5, 7 i 9 min brzinom od 14 ciklusa u sekundi. Dobiveni prah se sakupi u Falcon epruvetu i skladišti pri -18 °C do postupka ekstrakcije.

### **3.2.3 Određivanje ukupne suhe tvari**

Ukupna suha tvar liofilizirane komine aronije odredi se pomoću analizatora vlage. Za određivanje suhe tvari, 3 g usitnjenog uzorka se postavi u posudicu analizatora, pri čemu je potrebno da se uzorak pravilno rasporedi po cijeloj površini posudice, te se pokrene mjerenje. Nakon završetka mjerenja, očita se vrijednost ukupne suhe tvari uzorka.

### **3.2.4 Ekstrakcija**

#### **3.2.4.1 PLE**

Optimiranje uvjeta PLE za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije provodi se prema zadanom planu eksperimenta (tablica 2) uz primjenu 1 % HCOOH/50 % EtOH kao ekstrakcijskog otapala koje se prethodno odzrači u ultrazvučnoj kupelji.

**Tablica 2.** Plan eksperimenta PLE

<b>UZORAK</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>STATIČKO VRIJEME (min)</b>	<b>OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)</b>
1	100	5	1:40
2	100	5	1:60
3	100	5	1:80
4	100	10	1:40
5	100	10	1:60
6	100	10	1:80
7	125	5	1:40
8	125	5	1:60
9	125	5	1:80
10	125	10	1:40
11	125	10	1:60
12	125	10	1:80
13	150	5	1:40
14	150	5	1:60
15	150	5	1:80
16	150	10	1:40
17	150	10	1:60
18	150	10	1:80

Prije postupka ekstrakcije potrebno je usitnjeni uzorak odvagati u staklenu čašu prema zadanom omjeru uzorka i otapala (g/mL): 1:40 = 1,25 g; 1:60 = 0,83 g; 1:80 = 0,63 g. U odvagani uzorak se doda mjerica dijatomejske zemlje (~0,5 g) i dobro se izmiješa. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (34 mL) postavje se dva celulozna filtera, doda smjesa uzorka i dijatomejske zemlje te se nadoda na vrhu još dijatomejske zemlje i postavi jedan celulozni filter. Staklena boca za ekstrakciju, zajedno sa zatvorenom ćelijom, postavlja se na predviđeno mjesto na ekstraktoru, kao što je prikazano na slici 7.





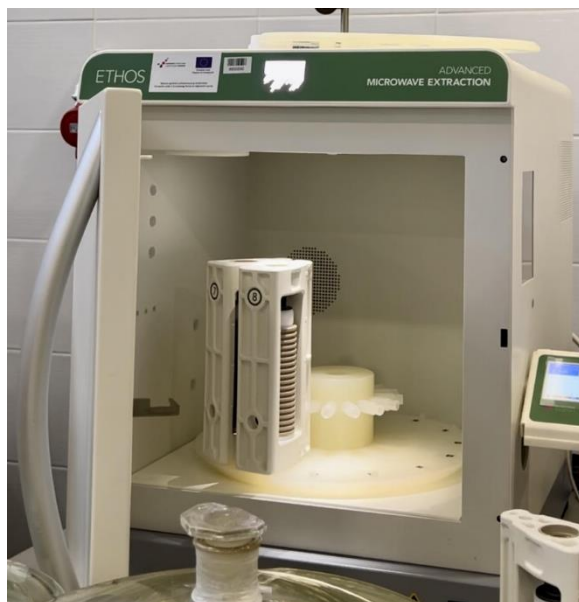
**Slika 7.** Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima Dionex 3500® (*vlastita fotografija*)

Fiksni uvjeti ekstrakcije su: tlak 10,34 MPa, volumen ispiranja 30 %, volumen propuhivanja dušikom 30 s i broj ciklusa 3, dok su promjenjivi parametri temperatura (100, 125 i 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer uzorka i otapala (1:40, 1:60 i 1:80 g/mL) (tablica 1). Dobiveni ekstrakti se profiltriraju u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopune do oznake ekstrakcijskim otapalom. Tako pripremljeni ekstrakti prebace se u plastične epruvete i skladište pri +4 °C do provođenja analiza. Dobiveni ekstrakti se koriste za određivanje udjela ukupnih fenola i monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodama.

#### **3.2.4.2 MAE**

Optimiranje uvjeta MAE za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije provodi se prema zadanom planu eksperimenta (tablica 3) uz primjenu 1 % HCOOH/50 % EtOH kao ekstrakcijskog otapala.

MAE fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije provodi se tako da se odvaži potrebna odvaga usitnjenog uzorka prema zadanom omjeru uzorka i otapala (g/mL): 1:40 = 0,63 g; 1:60 = 0,42 g; 1:80 = 0,31 g (tablica 2) u ćeliju za ekstrakciju te se doda 20 mL ekstrakcijskog otapala i magnetni mješač. Ekstrakcijska ćelija sa smjesom se postavlja u reaktor (slika 8) te se ekstrakcija provodi prema planu eksperimenta gdje se variraju temperatura (40, 60 i 80 °C) i vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer uzorka i otapala (1:40, 1:60 i 1:80 g/mL) (tablica 3), uz konstantne parametre: snaga mikrovalova 400 W, snaga miješanja 50 %, vrijeme zagrijavanja do željene temperature 2 min za 40 °C, 4 min za 60 °C te 6 min za 80 °C, ventilacija i hlađenje nakon ekstrakcije 2 min, a temperatura se održava konstantnom tijekom postupka ekstrakcije.



**Slika 8.** Mikrovalni reaktor MILESTONE Ethos Easy (*vlastita fotografija*)

Po završetku ekstrakcije, smjesa se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Tako pripremljeni ekstrakti prebace se u plastične epruvete i do provođenja analiza skladište pri +4 °C. Dobiveni ekstrakti se koriste za određivanje udjela ukupnih fenola i monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodama.

**Tablica 3.** Plan eksperimenta MAE

<b>UZORAK</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VRIJEME (min)</b>	<b>OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)</b>
1	40	5	1:40
2	40	5	1:60
3	40	5	1:80
4	40	10	1:40
5	40	10	1:60
6	40	10	1:80
7	60	5	1:40
8	60	5	1:60
9	60	5	1:80
10	60	10	1:40
11	60	10	1:60
12	60	10	1:80
13	80	5	1:40
14	80	5	1:60
15	80	5	1:80
16	80	10	1:40
17	80	10	1:60
18	80	10	1:80

### 3.2.4.3 UAE

Optimiranje uvjeta UAE za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije provodi se prema zadanom planu eksperimenta (tablica 4) uz primjenu 1 % HCOOH/50 % EtOH kao ekstrakcijskog otapala. Sve ekstrakcije su provedene pri konstantnoj frekvenciji (26 kHz) i snazi ultrazvuka (200 W).

**Tablica 4.** Plan eksperimenta UAE

<b>UZORAK</b>	<b>AMPLITUDA (%)</b>	<b>VRIJEME (min)</b>	<b>OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)</b>
1	50	5	1:40
2	50	5	1:60
3	50	5	1:80
4	50	10	1:40
5	50	10	1:60
6	50	10	1:80
7	75	5	1:40
8	75	5	1:60
9	75	5	1:80
10	75	10	1:40
11	75	10	1:60
12	75	10	1:80
13	100	5	1:40
14	100	5	1:60
15	100	5	1:80
16	100	10	1:40
17	100	10	1:60
18	100	10	1:80

UAE fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije provodi se tako da se odvaži potrebna odvaga usitnjenog uzorka prema zadanom omjeru uzorka i otapala (g/mL): 1:40 = 0,63 g; 1:60 = 0,42 g; 1:80 = 0,31 g u staklenu čašu te se doda 20 mL ekstrakcijskog otapala. Smjesa se izmiješa te se ekstrakcija provodi pomoću ultrazvučne sonde prema planu eksperimenta (tablica 4) uz održavanje temperature  $\leq 30$  °C pomoću hladne kupke, kao što je prikazano na slici 9. Varirani parametri prilikom ekstrakcije bili su amplituda (50, 75 i 100 °C), vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer uzorka i otapala (1:40, 1:60 i 1:80 g/mL) (tablica 4). Po završetku ekstrakcije, smjesa se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopuni otapalom do oznake. Tako pripremljeni ekstrakti prebace se u plastične epruvete i do provođenja analiza skladište pri +4 °C. Dobiveni ekstrakti se koriste za određivanje udjela

ukupnih fenola i monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodama.



**Slika 9.** Laboratorijski ultrazvuk Hielscher Ultrasonic Processor UP200Ht (*vlastita fotografija*)

#### **3.2.4.4 Refluks**

Za konvencionalnu toplinsku ekstrakciju refluksom odvaže se 0,5 g usitnjenog uzorka liofilizirane kornjeke u tikvicu s okruglim dnom i pomiješa s 40 mL ekstrakcijskog otapala (1 % HCOOH/50 % EtOH). Tikvica se postavi na povratno hladilo i zagrijava na plamenu 30 min od početka vrenja. Dobiveni ekstrakt se zatim profiltrira u odmjernu tikvicu (50 mL), nadopuni otapalom do oznake i prenese u Falcon epruvetu. Tako pripremljeni ekstrakt skladišti se do provođenja analiza pri +4 °C. Dobiveni ekstrakt se koristi za određivanje udjela ukupnih fenola i monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodama.

#### **3.2.5 Određivanje udjela ukupnih fenola**

*Princip određivanja:*

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Navedene kiseline se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u wolframov oksid i

molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka, a plavo obojenje, čiji intenzitet je veći ukoliko je u uzorku prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

*Priprema uzoraka:*

Za određivanje udjela ukupnih fenola ekstrakte liofilizirane komine aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 10 puta.

*Postupak određivanja:*

U 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta dodaje se redom 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon 3 min 1 mL otopine natrijeva karbonata (20 %, w/v). Nakon miješanja pomoću Vortex miješalice pripremljeni uzorci se termostatiraju 25 min pri 50 °C, a zatim slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, a umjesto ekstrakta uzima se 100  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog otapala.

*Izrada baždarnog pravca:*

Pripremljena otopina galne kiseline (5 mg/L) razrijedi se destiliranom vodom u više razrjeđenja: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 100  $\mu\text{L}$  galne kiseline određene koncentracije te se redom dodaje 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode, a nakon 3 min 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba umjesto galne kiseline sadrži 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortexa i termostatiraju u vodenoj kupelji 25 min pri 50 °C. Nakon toga se pri valnoj duljini od 765 nm mjeri apsorbancija, a iz izmjerenih vrijednosti se pomoću programa Microsoft Excel crta baždarni pravac. Na apscisu baždarnog pravca nanose se koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola [1]:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad (R^2 = 0,9997) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

$R^2$  – koeficijent determinacije

Udio ukupnih fenola izražen je u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

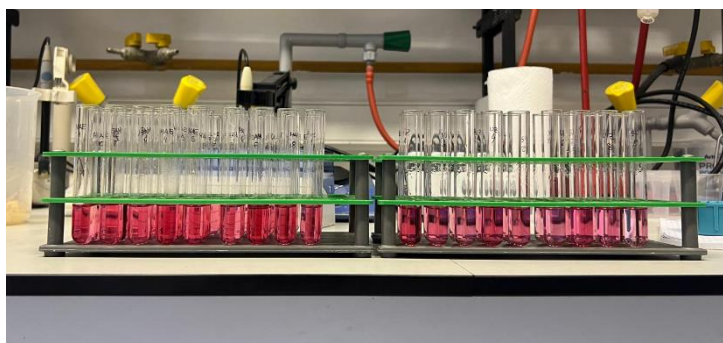
### 3.2.6 Određivanje udjela monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom

#### *Pincip određivanja*

Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju strukturu pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorpcija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC 2005.02).

#### *Priprema uzoraka:*

Za određivanje udjela monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom ekstrakte liofilizirane komine aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 10 puta (slika 10).



**Slika 10.** Razrijeđeni uzorci ekstrakata liofilizirane komine aronije (*vlastita fotografija*)

#### *Postupak određivanja:*

Za mjerenje jednog uzorka reakcija se postavlja u dvije epruvete: u jednu epruvetu se uzima 1 mL ekstrakta te se doda 4 mL pufera pH 1,0, a u drugu epruvetu se uzima 1 mL ekstrakta te se doda 4 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 min, pripremljenim reakcijskim otopinama se mjeri apsorpcija pri 520 nm i 700 nm, uz odgovarajuće pufere kao slijepu probu (Lee i sur., 2005).

#### *Račun:*

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli [2]:

$$\frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \quad [2]$$

gdje je:

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 g/mol)

DF = faktor razrijeđenja

$10^3$  = faktor za preračunavanje g u mg

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid 26900 L/mol cm)

l = debljina kivete (1 cm)

Udio ukupnih monomernih antocijana izražen je u mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida (C-3-GE)/g suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.7 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

*Princip određivanja:*

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko  $\text{FeSO}_4$ , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

*Priprema uzoraka:*

Ekstrakte liofilizirane komine aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 50 puta.

*Postupak određivanja:*

Za mjerenje apsorpcije uzoraka u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  uzorka i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP



reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

*Izrada baždarnog pravca:*

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjernoj tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Na taj način dobije se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrjeđenja na sljedeći način: u tikvice se redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjavaju 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznose 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 µmol/L. Nakon toga se u staklene epruvete otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL otopine Troloxa određene koncentracije i 2080 µL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice izmješaju, a zatim se termostatiraju pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80 µL 96 %-tnog etanola. Slijedi mjerenje apsorbancije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa (µmol/L), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [3]:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad (R^2 = 0,9995) \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) (µmol/L)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom izražen je u µmol ekvivalenata Troloxa (TE)/g suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### **3.2.8 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom**

*Princip određivanja:*

Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

*Priprema uzorka:*

Ekstrakte liofilizirane komine aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 50 puta.

*Postupak određivanja:*

Postupak određivanja provodi se prema metodi Shortle i sur. (2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

*Izrada baždarnog pravca:*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernej tikvici od 100 mL. Od 1mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150  $\mu$ M. Zatim se u epruvetu otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Iz dobivenih vrijednosti nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ( $\mu$ mol/L), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 517 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [4]:

$$y = -0,008 \cdot X + 1,3476 \quad (R^2 = 0,9948) \quad [4]$$

gdje je:

Y = apsorbancija uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{mol/L}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom izražen je u  $\mu\text{mol/TE}$  g suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.9 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

*Princip određivanja:*

Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidanasa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ). U prisutnosti antioksidanasa stabilni  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Vrijednosti dobivene za apsorbanciju uzorka izmjerenih  $\text{ABTS}^+$  metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

*Priprema uzorka:*

Ekstrakte liofilizirane komine aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 50 puta.

*Postupak određivanja:*

160  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka pomiješa se s 2 mL 1 %-tnog  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu koristi se etanol 96 %-tni.

*Izrada baždarnog pravca:*

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 0,02 mol/L standardna otopina Troloxa na način da se u plastičnoj lađici izvaže 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200  $\mu\text{mol/L}$  pipetiranjem redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se zatim do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom. U epruvetu se stavi 160  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa i pomiješa s 2 mL 1 %-tnog  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac tako što se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 734 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [5]:

$$Y = -0,002 \cdot X + 0,6204 \quad (R^2=0,998) \quad [5]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine ( $\mu\text{mol/L}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom izražen je u  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.10 Određivanje veličine čestica

Veličina čestica prahova analizira se laserskom difrakcijom na uređaju Malvern Panalytical Mastersizer 2000, gdje se mjerenje veličine čestica temelji na metodi raspršivanja laserskog svjetla u području od 20 nm do 2 mm te obradom rezultata pomoću software-a Mastersizer 2000 (verzija 5.61). Mjerenje se provedi pomoću suhe (Scirocco) disperzijske jedinice na način da se prije početka mjerenja metalnom žličicom uzme potrebna količina praha i stavi se u kadicu unutar mjerne ćelije. Nakon toga pokreće se programski paket i vrši mjerenje. Podaci o veličini čestica dobiveni su u digitalnom obliku na računalu, a za prikaz rezultata uzete su vrijednosti veličine 10, 50 i 90 % čestica ( $d_{10}$ ,  $d_{50}$  i  $d_{90}$ ,  $\mu\text{m}$ ) te raspon distribucije veličine čestica koji se računa prema formuli [6]:

$$Raspon = \frac{d_{90}-d_{10}}{d_{50}} \quad [6]$$

### 3.2.11 Određivanje individualnih fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz tandemsku spektrometriju masa

Kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije analiziran je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz tandemsku spektrometriju masa (eng. *ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, UPLC-MS<sup>2</sup>). Analiza je provedena prema metodi koju su prethodno opisali Elez Garofulić i sur. (2018) na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti spojenim s MS/MS trostrukim

kvadropol masenim detektorom i opremljenim binarnom pumpom, autosamplerom i termostatiranim odjeljkom za kolonu. Prije injektiranja ekstrakt je profiltriran kroz 0,45  $\mu$ m membranski filter. Volumen injektiranja bio je 2,5  $\mu$ L, a razdvajanje spojeva je provedeno na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 m, 100  $\times$  2,1 mm I.D.) termostatiranoj pri 35  $^{\circ}$ C uz gradijentno eluiranje (mobilna faza: otapalo A - 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi i otapalo B - 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu; protok 0,3 mL/min): 0-10 min 95 % A i 5 % B, 10-10,1 min 65 % A i 35 % B, 10,1-11,1 min 20 % A i 80 % B, 11,1-12,5 min 95 % A i 5 % B. Ionizacija je provedena u ESI pozitivnom i negativnom načinu rada dušikom (inducirajući konus i kolizijski plin) pod sljedećim parametrima izvora ionizacije: temperatura plina 300  $^{\circ}$ C, brzina protoka 11 L/h, tlak raspršivača 40 psi, i pozitivni/negativni napon na kapilari +4000/-3500 V. Kvalitativni i kvantitativni podaci dobiveni su u MRM načinu ( $m/z$  100-1000). Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je program Agilent MassHunter Workstation (ver. B.04.01). Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena i spektra masa autentičnih standarda, a za spojeve za koje ne postoje standardi, prekursor i fragment ioni te polaritet određeni su prema literaturnim podacima. Kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva u uzorcima provedena je na osnovu jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva, pri čemu su standardi fenolnih spojeva otopljeni u metanolu u koncentraciji 100 mg/mL, a točke kalibracije bile su u rasponu od 0,10 do 50 mg/mL. Za kvantifikaciju spojeva za koje ne postoje standardi korištene su jednadžbe pravaca spojeva iz iste grupe fenolnih spojeva. Koncentracije fenolnih spojeva izražene su u mg/g suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### **3.2.12 Eksperimentalni dizajn i obrada podataka**

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). U prvom dijelu istraživanja, odnosno tijekom optimiranja uvjeta PLE, MAE i UAE, svi eksperimenti su dizajnirani kao mješoviti puni faktorijski dizajn, pri čemu su u svakoj tehnici ekstrakcije promatrane tri nezavisne varijable (faktora) na dvije (vrijeme ekstrakcije), odnosno tri razine (temperatura ekstrakcije odnosno amplituda te omjer uzorka i otapala), dok su zavisne varijable bile udio ukupnih fenola (mg GAE/g suhe tvari) i ukupnih monomernih antocijana (mg C-3-GE/g suhe tvari) te antioksidacijski kapacitet (FRAP, DPPH, ABTS;  $\mu$ mol TE/g suhe tvari). Normalnost i homogenost raspodjele ostataka vrijednosti podataka su provjerene Shapiro-Wilks i Levene testovima, pri čemu su normalno distribuirani i homogeni podaci analizirani parametrijskim

testom, odnosno multifaktorskom analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) te je usporedba marginalnih prosjeka provedena post-hoc Tukey testom. Podaci s odstupanjem od normalne distribucije i nehomogeni analizirani su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. Rezultati ove statističke analize su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Također, u svrhu ispitivanja mogućeg izdvajanja uzoraka prema tehnici ekstrakcije, primijenjena je analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) na korelacijsku matricu koja je uključivala 54 uzorka te podatke za udio ukupnih fenola i ukupnih antocijana te antioksidacijski kapacitet određen FRAP, DPPH i ABTS metodama (ukupno 270 podatkovnih točaka), pri čemu su razmatrane glavne komponente sa svojstvenom vrijednošću  $> 1$ , a u analizu su uključene varijable s komunalitetnom vrijednosti  $\geq 0,5$ .

U drugom dijelu istraživanja, odnosno tijekom usporedbe učinkovitosti PLE, MAE, UAE i ekstrakcije refluksom te učinkovitosti duljine trajanja kriogenog mljevenja, eksperimenti su dizajnirani kao jednofaktorski dizajn, pri čemu je promatrana jedna nezavisna varijabla (faktor) na četiri (PLE, MAE, UAE i refluks), odnosno pet razina (1, 3, 5, 7, i 9 min) uz iste zavisne varijable kao u prvom dijelu istraživanja uz parametre veličine čestica ( $d_{10}$ ,  $d_{50}$  i  $d_{90}$ ,  $\mu\text{m}$ ). Utjecaj tehnike ekstrakcije i duljine trajanja kriogenog mljevenja na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva i antocijana te antioksidacijski kapacitet analiziran je jednosmjernom ANOVA-om, a usporedba podataka provedena je post-hoc Tukey testom. Isti testovi su primijenjeni i za ispitivanje utjecaja duljine trajanja kriogenog mljevenja na parametre veličine čestica. Rezultati ove statističke analize su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

U svim statističkim testovima primijenjena je razina značajnosti  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti).

## 4. REZULTATI

### 4.1 PLE

**Tablica 5.** Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom PLE

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP (μmol TE/g st)	DPPH (μmol TE/g st)	ABTS (μmol TE/g st)
1	100	5	1:40	86,04±0,17	22,48±0,14	861,17±15,56	292,54±1,08	517,27±1,44
2	100	5	1:60	101,58±1,62	24,08±0,04	1079,76±20,09	382,51±4,08	593,18±0,00
3	100	5	1:80	113,05±4,59	23,93±0,34	1139,82±108,05	454,87±7,17	711,29±21,50
4	100	10	1:40	99,18±4,63	22,36±0,14	1216,41±118,98	303,87±0,54	580,50±6,51
5	100	10	1:60	108,58±5,60	21,45±0,47	1364,60±118,84	390,84±5,17	610,66±7,62
6	100	10	1:80	118,11±6,72	20,56±0,14	1168,63±11,03	433,35±5,02	568,74±14,34
7	125	5	1:40	101,34±8,67	19,27±0,17	1052,07±48,93	297,10±2,53	519,17±9,40
8	125	5	1:60	97,55±2,98	18,20±0,29	1096,73±88,68	398,77±4,08	628,90±25,01
9	125	5	1:80	115,57±0,82	18,70±0,10	1058,02±97,10	451,93±0,36	662,15±17,21
10	125	10	1:40	110,37±4,38	15,01±0,02	968,25±92,33	299,75±3,62	558,70±13,01
11	125	10	1:60	119,19±3,35	15,61±0,44	1002,66±66,89	391,42±6,52	623,14±10,87
12	125	10	1:80	108,65±0,98	16,18±0,10	987,01±81,59	452,33±14,33	658,58±15,77
13	150	5	1:40	119,81±1,32	13,67±0,31	1153,83±73,36	301,07±1,45	593,04±7,23
14	150	5	1:60	123,12±4,97	14,06±0,11	1252,47±113,84	407,67±3,81	653,13±2,18
15	150	5	1:80	128,71±0,16	13,37±0,05	1076,06±22,05	467,61±10,75	735,73±7,17
16	150	10	1:40	126,24±4,21	11,98±0,01	1133,94±11,12	305,30±2,17	594,86±5,06
17	150	10	1:60	123,94±3,86	12,26±0,18	1083,44±38,51	420,66±1,36	690,23±4,35
18	150	10	1:80	132,46±7,37	8,20±0,10	1067,04±13,24	447,73±6,09	787,68±20,08

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 6.** Utjecaj procesnih uvjeta PLE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet liofilizirane komine aronije

IZVOR VARIJACIJE	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )
<b>TEMPERATURA (°C)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p=0,059	p=0,848	p=0,022*
100	104,42±3,29 <sup>a</sup>	22,48±0,38 <sup>c</sup>	1138,40±49,06 <sup>a</sup>	376,33±18,26 <sup>a</sup>	596,94±17,87 <sup>a</sup>
125	108,78±2,45 <sup>a</sup>	17,26±0,52 <sup>b</sup>	1027,46±21,94 <sup>a</sup>	381,88±19,20 <sup>a</sup>	608,44±16,17 <sup>ab</sup>
150	125,71±1,54 <sup>b</sup>	12,26±0,59 <sup>a</sup>	1127,80±22,99 <sup>a</sup>	391,67±19,76 <sup>a</sup>	675,78±21,50 <sup>b</sup>
<b>STATIČKO VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)</b>	p=0,155	p=0,070	p=0,559	p=0,964	p=0,788
5	109,64±3,23 <sup>a</sup>	18,71±0,98 <sup>a</sup>	1085,55±27,22 <sup>a</sup>	383,79±16,23 <sup>a</sup>	623,76±17,62 <sup>a</sup>
10	116,30±2,54 <sup>a</sup>	15,96±1,09 <sup>a</sup>	1110,22±31,76 <sup>a</sup>	382,81±14,57 <sup>a</sup>	630,34±16,74 <sup>a</sup>
<b>OMJER UZORKA I OTAPALA (g/mL)</b>	p=0,053	p=0,953	p=0,240	p<0,001*	p<0,001*
1:40	107,16±4,17 <sup>a</sup>	17,46±1,25 <sup>a</sup>	1064,28±39,32 <sup>a</sup>	299,94±1,36 <sup>a</sup>	560,59±9,86 <sup>a</sup>
1:60	112,33±3,24 <sup>a</sup>	17,71±1,25 <sup>a</sup>	1146,61±41,02 <sup>a</sup>	398,64±3,89 <sup>b</sup>	633,21±9,76 <sup>b</sup>
1:80	119,42±2,73 <sup>a</sup>	16,82±1,53 <sup>a</sup>	1082,76±23,02 <sup>a</sup>	451,30±3,55 <sup>c</sup>	687,36±21,09 <sup>b</sup>

GAE = ekvivalenti galne kiseline; st = suha tvar; C-3-GE = ekvivalenti cijanidin-3-glukoziida; TE = ekvivalenti Troloxa

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ .



## 4.2 MAE

**Tablica 7.** Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom MAE

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP (μmol TE/g st)	DPPH (μmol TE/g st)	ABTS (μmol TE/g st)
1	40	5	1:40	58,46±1,47	20,69±0,36	586,69±3,31	247,93±3,76	367,57±3,58
2	40	5	1:60	69,32±5,90	23,66±0,22	627,99±21,50	313,98±5,11	456,69±8,60
3	40	5	1:80	75,54±1,00	25,86±0,68	817,28±26,88	340,56±0,73	519,70±20,38
4	40	10	1:40	63,52±0,41	23,13±1,32	757,68±59,53	247,92±6,45	426,02±7,17
5	40	10	1:60	72,68±2,09	24,28±0,83	822,90±3,31	263,49±4,30	504,34±29,01
6	40	10	1:80	79,76±1,83	26,57±0,00	850,75±62,62	517,58±3,27	493,17±4,36
7	60	5	1:40	65,44±1,72	20,83±0,10	637,46±51,86	221,91±0,54	394,47±12,19
8	60	5	1:60	72,83±1,84	24,53±0,54	731,55±59,50	275,77±6,18	516,37±5,37
9	60	5	1:80	81,30±4,49	24,52±0,05	829,95±40,32	373,77±8,37	592,80±24,75
10	60	10	1:40	70,62±0,00	22,67±0,19	706,01±17,63	274,56±3,04	455,77±3,58
11	60	10	1:60	75,49±2,70	23,76±0,54	767,41±67,73	326,13±7,25	492,59±12,88
12	60	10	1:80	90,13±4,33	25,55±0,24	826,78±62,72	369,13±4,73	590,74±4,37
13	80	5	1:40	68,90±0,82	20,27±0,24	731,06±19,84	271,18±2,15	453,30±15,76
14	80	5	1:60	84,69±1,96	22,34±0,47	730,03±21,47	340,18±0,81	513,85±19,33
15	80	5	1:80	82,44±6,66	24,78±0,10	925,88±13,45	409,94±13,12	670,66±0,00
16	80	10	1:40	76,12±1,23	22,67±0,24	785,05±13,24	278,75±3,05	441,71±10,04
17	80	10	1:60	95,74±6,52	25,18±0,40	979,76±8,28	378,76±1,08	586,47±10,76
18	80	10	1:80	94,83±8,32	24,03±0,53	983,59±60,48	420,35±8,01	681,33±24,75

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 8.** Utjecaj procesnih uvjeta MAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet liofilizirane komine aronije

IZVOR VARIJACIJE	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )
<b>TEMPERATURA (°C)</b>	p=0,003*	p=0,552	p=0,020*	p=0,370	p=0,019*
40	69,88±2,24 <sup>a</sup>	24,03±0,60 <sup>a</sup>	743,88±31,56 <sup>a</sup>	321,91±28,37 <sup>a</sup>	461,25±16,07 <sup>a</sup>
60	75,97±2,48 <sup>ab</sup>	23,64±0,47 <sup>a</sup>	749,86±23,31 <sup>a</sup>	306,88±16,54 <sup>a</sup>	507,12±21,48 <sup>ab</sup>
80	83,79±3,09 <sup>b</sup>	23,21±0,51 <sup>a</sup>	855,89±33,81 <sup>b</sup>	349,86±17,79 <sup>a</sup>	557,89±29,10 <sup>b</sup>
<b>VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)</b>	p=0,050*	p=0,054	p=0,009*	p=0,214	p=0,481
5	73,21±2,07 <sup>a</sup>	23,05±0,48 <sup>a</sup>	735,32±25,60 <sup>a</sup>	310,58±14,09 <sup>a</sup>	498,38±21,73 <sup>a</sup>
10	79,88±2,67 <sup>b</sup>	24,20±0,32 <sup>a</sup>	831,10±23,31 <sup>b</sup>	341,85±20,29 <sup>a</sup>	519,13±19,34 <sup>a</sup>
<b>OMJER UZORKA I OTAPALA (g/mL)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
1:40	67,18±1,70 <sup>a</sup>	21,71±0,36 <sup>a</sup>	700,66±21,98 <sup>a</sup>	257,04±6,05 <sup>a</sup>	423,14±9,94 <sup>a</sup>
1:60	78,46±2,87 <sup>b</sup>	23,96±0,29 <sup>b</sup>	776,61±33,56 <sup>a</sup>	316,38±11,72 <sup>b</sup>	511,72±12,22 <sup>b</sup>
1:80	84,00±2,24 <sup>b</sup>	25,22±0,27 <sup>c</sup>	872,37±21,19 <sup>b</sup>	405,22±17,20 <sup>c</sup>	591,40±21,32 <sup>c</sup>

GAE = ekvivalenti galne kiseline; st = suha tvar; C-3-GE = ekvivalenti cijanidin-3-glukozida; TE = ekvivalenti Troloxa

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ .

### 4.3 UAE

**Tablica 9.** Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom UAE

UZORAK	AMPLITUDA (%)	STATIČKO VRIJEME (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP (μmol TE/g st)	DPPH (μmol TE/g st)	ABTS (μmol TE/g st)
1	50	5	1:40	65,22±2,21	20,92±0,65	547,82±4,41	257,07±6,10	416,34±4,30
2	50	5	1:60	79,92±2,70	23,23±0,90	637,35±28,12	315,69±3,22	461,25±15,05
3	50	5	1:80	75,21±1,50	22,43±0,39	581,47±56,02	319,05±16,75	479,70±33,50
4	50	10	1:40	69,74±0,98	20,77±0,12	597,29±15,44	256,61±2,51	418,55±17,92
5	50	10	1:60	74,41±4,30	20,40±0,07	573,92±51,24	300,72±2,15	593,23±55,87
6	50	10	1:80	73,87±1,83	20,45±0,49	518,59±24,67	338,68±2,55	500,79±16,04
7	75	5	1:40	70,55±2,79	21,65±0,17	685,40±34,18	268,14±6,99	445,92±9,32
8	75	5	1:60	75,32±6,63	20,97±0,11	580,52±31,39	319,87±8,05	512,33±2,15
9	75	5	1:80	74,27±1,17	21,46±0,29	565,63±38,09	332,44±9,47	538,41±20,39
10	75	10	1:40	66,71±0,98	21,00±0,07	554,23±16,54	266,29±4,12	386,49±1,43
11	75	10	1:60	71,72±1,60	22,59±0,32	649,51±38,07	297,46±2,96	431,91±9,68
12	75	10	1:80	84,07±2,16	21,89±0,05	660,05±42,53	323,88±2,91	479,24±1,46
13	100	5	1:40	64,84±2,21	20,20±0,12	535,08±15,44	239,08±1,97	387,25±2,15
14	100	5	1:60	75,65±3,56	22,54±0,36	641,87±51,26	300,79±5,37	513,58±16,12
15	100	5	1:80	74,64±5,66	21,26±0,10	588,00±29,14	267,13±18,94	464,41±8,74
16	100	10	1:40	63,11±0,41	19,92±1,29	574,17±33,10	242,54±10,40	383,76±4,30
17	100	10	1:60	69,81±5,65	18,65±0,18	702,50±67,78	270,33±16,12	414,69±29,01
18	100	10	1:80	88,92±2,00	22,20±0,10	536,76±24,63	316,01±1,09	548,35±37,84

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 10.** Utjecaj procesnih uvjeta UAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet liofilizirane komine aronije

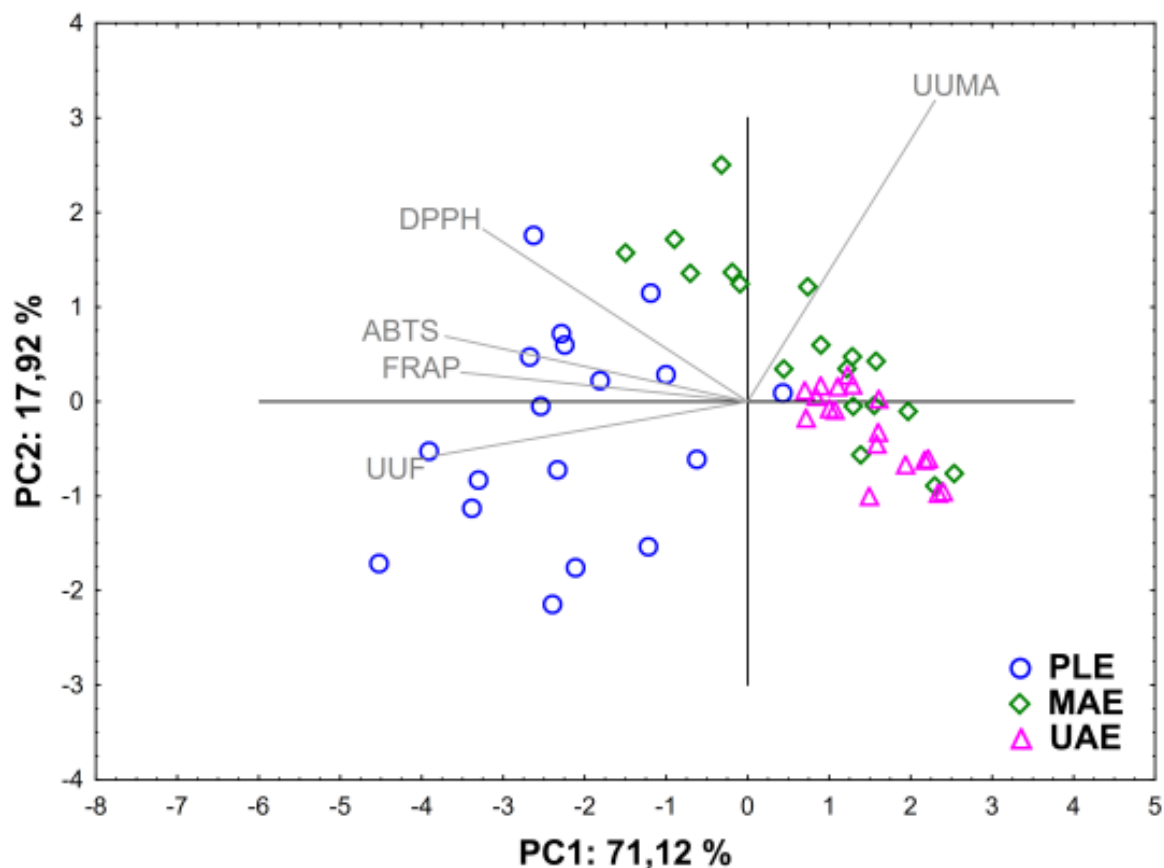
IZVOR VARIJACIJE	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )
<b>AMPLITUDA (%)</b>	p=0,944	p=0,228	p=0,268	p=0,055	p=0,643
50	73,06 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	21,37 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	576,07 $\pm$ 13,51 <sup>a</sup>	297,97 $\pm$ 9,52 <sup>a</sup>	478,31 $\pm$ 19,05 <sup>a</sup>
75	73,77 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	21,59 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	615,89 $\pm$ 16,99 <sup>a</sup>	301,35 $\pm$ 8,06 <sup>a</sup>	465,72 $\pm$ 15,45 <sup>a</sup>
100	72,83 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>	20,80 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	596,40 $\pm$ 19,93 <sup>a</sup>	272,65 $\pm$ 8,81 <sup>a</sup>	452,00 $\pm$ 19,38 <sup>a</sup>
<b>VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)</b>	p=0,749	p=0,050*	p=0,983	p=0,950	p=0,742
5	72,85 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	21,63 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	595,90 $\pm$ 12,76 <sup>a</sup>	291,03 $\pm$ 7,86 <sup>a</sup>	468,80 $\pm$ 11,43 <sup>a</sup>
10	73,60 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>	20,87 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	596,34 $\pm$ 15,59 <sup>a</sup>	290,28 $\pm$ 7,62 <sup>a</sup>	461,89 $\pm$ 17,41 <sup>a</sup>
<b>OMJER UZORKA I OTAPALA (g/mL)</b>	p<0,001*	p=0,161	p=0,044*	p<0,001*	p<0,001*
1:40	66,69 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	20,74 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	582,33 $\pm$ 15,88 <sup>a</sup>	254,95 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	406,38 $\pm$ 7,08 <sup>a</sup>
1:60	74,47 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	21,40 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	630,95 $\pm$ 16,49 <sup>b</sup>	300,81 $\pm$ 5,10 <sup>b</sup>	487,83 $\pm$ 19,00 <sup>b</sup>
1:80	78,50 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>	21,62 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	575,08 $\pm$ 15,77 <sup>a</sup>	316,20 $\pm$ 7,40 <sup>b</sup>	501,82 $\pm$ 10,70 <sup>b</sup>

GAE = ekvivalenti galne kiseline; st = suha tvar; C-3-GE = ekvivalenti cijanidin-3-glukoziida; TE = ekvivalenti Trolox

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$

#### 4.4 PCA



**Slika 11.** Distribucija ekstrakata liofilizirane komine aronije u prostoru određenom prvim dvjema glavnim komponentama (PC1 i PC2) s obzirom na udio ukupnih fenola (UUF) i ukupnih monomernih antocijana (UUMA) te antioksidacijski kapacitet (FRAP, DPPH i ABTS) u ovisnosti o primijenjenoj tehnici ekstrakcije (PLE = ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku; MAE = ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; UAE = ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom)

#### 4.5 Usporedba učinkovitosti PLE, MAE, UAE i ekstrakcije refluksom

**Tablica 11.** Usporedba učinkovitosti PLE, MAE i UAE pri optimalnim uvjetima te ekstrakcije refluksom u izolaciji fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije te antioksidacijskom kapacitetu

TEHNIKA EKSTRAKCIJE	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g st}$ )
	p=0,002*	p=0,004*	p=0,006*	p=0,001*	p<0,001*
<b>PLE</b>	115,57±0,82 <sup>b</sup>	18,70±0,10 <sup>a</sup>	1058,02±97,10 <sup>b</sup>	451,93±0,36 <sup>b</sup>	662,15±17,21 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	94,83±8,32 <sup>a</sup>	24,03±0,53 <sup>b</sup>	983,59±60,48 <sup>b</sup>	420,35±8,01 <sup>b</sup>	681,33±24,75 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	79,92±2,70 <sup>a</sup>	23,23±0,90 <sup>b</sup>	637,35±28,12 <sup>a</sup>	315,69±3,22 <sup>a</sup>	461,25±15,05 <sup>a</sup>
<b>REFLUKS</b>	120,84±0,83 <sup>b</sup>	22,90±0,78 <sup>b</sup>	1033,37±16,67 <sup>b</sup>	472,86±25,28 <sup>b</sup>	790,19±14,45 <sup>c</sup>

PLE = ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku; MAE = ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; UAE = ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; GAE = ekvivalenti galne kiseline; st = suha tvar; C-3-GE = ekvivalenti cijanidin-3-glukozida; TE = ekvivalenti Trolox

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ .

#### 4.6 Kriogeno mljevenje

**Tablica 12.** Rezultati mjerenja veličine čestica liofilizirane komine aronije usitnjene kriogenim mljevenjem

UZORAK	VRIJEME KRIOGENOG MLJEVENJA (min)	d(0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d(0,5) ( $\mu\text{m}$ )	d(0,9) ( $\mu\text{m}$ )	Raspon distribucije veličine čestica
		p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
0	0	37,00±2,84 <sup>b</sup>	238,12±10,85 <sup>d</sup>	712,90±43,42 <sup>c</sup>	2,84±0,04 <sup>a</sup>
1	1	4,98±0,15 <sup>a</sup>	75,33±2,31 <sup>c</sup>	455,64±17,33 <sup>b</sup>	5,98±0,04 <sup>b</sup>
2	3	3,72±0,07 <sup>a</sup>	53,07±4,24 <sup>b</sup>	419,69±70,06 <sup>b</sup>	7,81±0,70 <sup>bc</sup>
3	5	2,59±0,03 <sup>a</sup>	24,94±1,12 <sup>a</sup>	245,06±29,22 <sup>a</sup>	9,71±0,73 <sup>c</sup>
4	7	2,32±0,04 <sup>a</sup>	19,38±0,72 <sup>a</sup>	186,65±19,77 <sup>a</sup>	9,50±0,67 <sup>c</sup>
5	9	2,06±0,04 <sup>a</sup>	15,38±0,76 <sup>a</sup>	135,61±13,54 <sup>a</sup>	8,67±0,45 <sup>c</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ .

**Tablica 13.** Utjecaj vremena kriogenog mljevenja na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom MAE pri optimalnim uvjetima (80 °C/10 min/1:80 g/mL)

UZORAK	VRIJEME KRIOGENOG MLJEVENJA (min)	UDIO UKUPNIH FENOLA (mg GAE/g st)	UDIO UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA (mg C-3-GE/g st)	FRAP (μmol TE/g st)	DPPH (μmol TE/g st)	ABTS (μmol TE/g st)
		p=0,001*	p=0,980	p=0,003*	p=0,046*	p=0,004*
1	1	115,06±0,17 <sup>b</sup>	21,96±0,68 <sup>a</sup>	816,48±6,73 <sup>ab</sup>	380,31±3,28 <sup>a</sup>	631,50±11,66 <sup>a</sup>
2	3	103,40±0,67 <sup>a</sup>	22,27±0,92 <sup>a</sup>	822,83±2,24 <sup>ab</sup>	395,25±4,74 <sup>ab</sup>	634,59±7,29 <sup>a</sup>
3	5	100,73±2,50 <sup>a</sup>	22,17±0,88 <sup>a</sup>	945,21±13,46 <sup>c</sup>	403,89±4,37 <sup>ab</sup>	651,29±16,04 <sup>ab</sup>
4	7	99,08±0,17 <sup>a</sup>	22,38±0,68 <sup>a</sup>	786,61±22,43 <sup>a</sup>	401,31±13,12 <sup>ab</sup>	688,40±13,12 <sup>bc</sup>
5	9	104,23±2,50 <sup>a</sup>	22,10±0,39 <sup>a</sup>	881,49±35,87 <sup>bc</sup>	411,74±5,47 <sup>b</sup>	718,06±14,57 <sup>c</sup>

GAE = ekvivalenti galne kiseline; st = suha tvar; C-3-GE = ekvivalenti cijanidin-3-glukozida; TE = ekvivalenti Troloxa

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

\*Statistički značajna varijacija pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ .



#### 4.7 Kemijski profil fenolnih spojeva

**Tablica 14.** Kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije dobivenom primjenom MAE pri optimalnim uvjetima (80 °C/10 min/1:80 g/mL) uz predtretman kriogenim mljevenjem (1 min)

Identificirani spoj	Prekursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	mg/g st
<i>Antocijani</i>			
Cijanidin-3-heksozid-(epi)katehin	737	575, 423, 287	0,015±0,001
Cijanidin-3-pentozid-(epi)katehin	707	557, 329, 287	0,002±0,001
Cijanidin-3-O-galaktozid	449	287	20,667±0,004
Cijanidin-3-O-glukozid	449	287	20,808±0,003
Cijanidin-3-O-arabinozid	419	287	11,369±0,005
Cijanidin-3-O-ksilozid	419	287	11,313±0,004
Ukupno			64,192
<i>Fenolne kiseline</i>			
Izoklorogenska kiselina A	515	353	0,699±0,004
Klorogenska kiselina	353	191	0,801±0,005
Neoklorogenska kiselina	353	191	0,913±0,003
Ukupno			2,413
<i>Flavonoli</i>			
Kvercetin-3-O-diheksozid	627	303	0,150±0,002
Izoramnetin-3-rutinozid	625	317	0,058±0,001
Kvercetin-3-O-rutinozid	611	303	0,914±0,003
Izoramnetin-pentozilheksozid	611	317	0,021±0,002
Kvercetin-3-O-vicianozid	597	434, 303	0,161±0,001
Kamferol-3-rutinozid	595	287	0,027±0,003
Izoramnetin-3-O-glukuronid	491	315	0,002±0,001
Izoramnetin-3-O-glukozid	479	317	0,022±0,002
Kvercetin-3-O-glukuronid	479	303	0,029±0,002
Izoramnetin-3-O-galaktozid	479	317	0,020±0,002
Kvercetin-3-O-galaktozid	465	303	1,536±0,003
Kvercetin-3-glukozid	465	303	1,614±0,003
Kamferol-3-O-glukuronid	463	287	0,004±0,001
Kamferol-3-glukozid	449	287	24,530±0,003
Ukupno			29,106
<i>Flavoni</i>			
Luteolin-7-O-rutinozid	595	287	0,004±0,001
Luteolin-7-O-glukuronid	463	287	0,002±0,001
Ukupno			0,006
<i>Flavan-3-oli i procijanidini</i>			
Epikatehin	291	139, 123	0,217±0,005
Procijanidin B2	577	289	0,042±0,004
Ukupno			0,259
Ukupni fenolni spojevi			95,976

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

## 5. RASPRAVA

U ovom radu provedeno je ispitivanje utjecaja procesnih parametara PLE, MAE i UAE na prinos ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te na antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine aronije, pri čemu su definirani optimalni uvjeti ekstrakcije za svaku navedenu tehniku ekstrakcije. Nadalje, učinkovitost svake tehnike ekstrakcije (PLE, MAE i UAE) pri definiranim optimalnim uvjetima uspoređena je međusobno te s ekstrakcijom uz primjenu refluksa, kao konvencionalnom tehnikom ekstrakcije. Također, ispitan je i utjecaj kriogenog mljevenja kao predtretmana na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te na antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane komine dobivenim primjenom odabrane tehnike ekstrakcije koja je pokazala najveću učinkovitost. Dodatno, uspoređena je i učinkovitost kriogenog mljevenja s konvencionalnim postupkom mljevenja.

Ukupna suha tvar liofilizirane komine aronije, korištene u ovom istraživanju, iznosila je 97,79 % te su vrijednosti udjela ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana, antioksidacijskog kapaciteta (FRAP, ABTS i DPPH metodama) te pojedinačnih fenolnih spojeva izražene na gram suhe tvari.

### 5.1 PLE

#### 5.1.1 Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom PLE

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom PLE prikazani su u tablici 5.

Udio ukupnih fenola kretao se u rasponu od  $86,04 \pm 0,17$  do  $132,46 \pm 7,37$  mg GAE/g suhe tvari. Najviša vrijednost ukupnih fenola zabilježena je u uzorku 18 dobivenom pri  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost određena u uzorku 1 dobivenom pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Woźniak i sur. (2017) odredili su udio ukupnih fenola iz komine aronije koristeći naprednu tehniku ekstrakcije primjenom superkritičnog ugljikovog dioksida i etanola pri temperaturama  $35, 50$  i  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tlakovima 7,5, 10 i 125 MPa te udjelu etanola 20, 50, i 80 %. Udio ukupnih fenola određen je u rasponu od 11,68 do 15,27 mg GAE/100 g komine. Najviša vrijednost ukupnih fenola zabilježena je u uzorku dobivenom pri  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 10 MPa uz 80 % etanola kao kootapala, dok je najniža vrijednost određena u uzorku dobivenom pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$

i 7,5 MPa uz 20 % etanola. Uspoređujući rezultate dobivene u ovom radu s rezultatima koje su dobili Woźniak i sur. (2017), vidljive su više vrijednosti dobivene primjenom PLE iz čega se može zaključiti da je PLE učinkovitija tehnika ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine aronije u odnosu na ekstrakciju superkritičnim ugljikovim dioksidom.

Udio ukupnih monomernih antocijana kretao se u rasponu od  $8,20 \pm 0,10$  do  $24,08 \pm 0,04$  mg C-3-GE/g suhe tvari. Najviša vrijednost određena je u uzorku 2, dobivenom pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku 18, dobivenom pri  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL.

Roda-Serrat i sur. (2022) proveli su ekstrakciju antocijana iz komine aronije koristeći ekstrakciju potpomognutu enzimima uz primjenu četiri komercijalne pektinaze (Rohapect, Fructozym BE, Fructozym Flash-C, i Fructozym Flux) pri uvjetima  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 min te pH 3,0. U dobivenim ekstraktima izoliran je udio ukupnih monomernih antocijana u rasponu od  $2,34 \pm 0,25$  do  $3,32 \pm 0,61$  mg C-3-GE/g suhe tvari. Najviša vrijednost dobivena je korištenjem Fructozym Flux enzima pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 min, a najniža vrijednost zabilježena je u kontrolnom uzorku bez upotrebe enzima, također pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 min. Vidljivo je kako su vrijednosti iz rada Roda-Serrat i sur. (2022) znatno niže u usporedbi s vrijednostima dobivenih u ovom radu, što je moguće objasniti činjenicom da se antocijani u plodovima uglavnom nalaze zarobljeni u staničnim vakuolama, a ne ugrađenim u stanične stijenke. Kraemer-Schafhalter i sur. (1999) smatraju da enzimska razgradnja staničnih stijenki pomaže u oslobađanju fenolnih spojeva vezanih za vakuole i stanične stijenke, no za neke biljke, mehaničko smanjenje veličine može biti učinkovitije za ekstrakciju. Kada su krute i tekuće faze u ravnoteži, daljnja razgradnja stanica ne povećava ekstrakciju antocijana. Nadalje, nakon što se oslobode iz vakuola, antocijani dolaze u kontakt s komponentama staničnih stijenki biljke i endogenim enzimima prisutnim u suspenziji. Kraemer-Schafhalter i sur. (1999) također navode da se oslobođeni antocijani vežu celulozu i celulozno-pektinske kompozite putem ionskih i hidrofobnih interakcija, što rezultira smanjenjem udjela antocijana u otopini. Ovaj učinak bi u principu mogao prikriti povećanje ekstraktibilnosti antocijana (ako ga ima) zbog povećane površine vezivanja polisaharida koja je dostupna. No svakako treba istaknuti kako su procesni uvjeti PLE korišteni u ovom radu daleko više invazivniji u odnosu na procesne uvjete ekstrakcije potpomognute enzimima, što je pridonijelo većem prinosu antocijana u odnosu na one dobivene u radu Roda-Serrat i sur. (2022).

Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom određen je u rasponu od  $861,17 \pm 15,56$  do  $1364,60 \pm 118,84$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 5, dobivenom pri  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok je najniža vrijednost karakterizirala uzorak 1, dobiven pri  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Tolić i sur. (2015) proveli su ekstrakciju tekuće-tekuće na različitim proizvodima od aronije (prahovi, kapsule, voćni čaj i sušeni plodovi) uz mješavinu 95 %-tne vodene otopine metanola uz dodatak 2 %-tne klorovodične kiseline (5 %) kao ekstrakcijskog otapala i statičkom vremenu ekstrakcije 60 min. U dobivenim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet FRAP metodom te su vrijednosti zabilježene u rasponu od  $135,00 \pm 2,01$  do  $686,00 \pm 5,58$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost dobivena je u uzorku voćnog čaja, dok je najniža vrijednost zabilježena u prahu. Dobivene vrijednosti u radu Tolić i sur. (2015) znatno su niže od vrijednosti dobivenih u ovom radu, što se može objasniti primjenom različite tehnike ekstrakcije i ekstrakcijskog otapala.

Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom određen je u rasponu od  $292,54 \pm 1,08$  do  $467,61 \pm 10,75$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost određena je u uzorku 15, dobivenom pri  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku 1, dobivenom pri  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom određen je u rasponu od  $517,27 \pm 1,44$  do  $787,68 \pm 20,08$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 18, dobivenom pri  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost određena u uzorku 1, dobivenom pri  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Nešto niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjenog DPPH i ABTS metodama od onih dobivenih u ovom radu dobili su Grunovaite i sur. (2015) u svom istraživanju. Grunovaite i sur. (2015) također su proveli su PLE na komini aronije te su ispitali utjecaj različitih parametra poput vrste otapala i različitih temperatura na antioksidacijski kapacitet te kemijski sastav dobivenih ekstrakata. Koristeći 80 %-tnu vodenu otopinu metanola kao ekstrakcijsko otapalo, najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerena DPPH metodom određena je u ekstraktu dobivenom pri  $130\text{ }^\circ\text{C}$  te je iznosila  $240,00 \pm 3,51$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari, a najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerena ABTS metodom određena je u ekstraktu

također dobivenom pri 130 °C i iznosila je  $194,00 \pm 1,49$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Uspoređujući vrijednosti dobivene u ovom radu s onima u radu Grunovaite i sur. (2015), može se uvidjeti kako je primjena PLE uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola uz dodatak 1 % mravlje kiseline u odnosu na 80 %-tnu vodenu otopinu metanola uz primjenu viših temperatura rezultirala dobivanjem viših vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjerenog DPPH i ABTS metodama.

### **5.1.2 Utjecaj parametara PLE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije**

Rezultati statističke analize utjecaja parametara PLE na udio ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom PLE prikazani su u tablici 6.

Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je temperatura imala statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola, udio ukupnih monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom, dok nije bilo statistički značajnog utjecaja na antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP i DPPH metodama.

Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola postignuta je u ekstraktu dobivenom pri 150 °C, dok nije bilo statistički značajne razlike u udjelu ukupnih fenola izoliranim pri 100 i 125 °C, što pokazuje da uspješna ekstrakcija fenolnih spojeva iz liofilizirane komine aronije favorizira primjenu viših temperatura. Pereira i sur. (2019) proveli su PLE na komini grožđa pri temperaturama od 40, 60, 80 i 100 °C, uz različita otapala te vremenu ekstrakcije od 4 h. Koristeći 50 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo uočili su da povišenje temperature rezultirala značajnim porastom udjela ukupnih fenola. U radu Dobroslavić i sur. (2022) također je uočen porast udjela ukupnih fenola s porastom temperature. Dobroslavić i sur. (2022) proveli su PLE na lovorovom listu pri temperaturama 90, 120 i 150 °C te su zaključili da je udio ukupnih fenola rastao proporcionalno s porastom temperature.

Pri ekstrakciji antocijana može se primijetiti obrnuti trend. Najviša prosječna vrijednost ukupnih monomernih antocijana zabilježena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C, a svakim daljnjim povišenjem temperature njihov udio opada te je najniži u ekstraktu dobivenom pri 150 °C. Prema već spomenutom radu Pereira i sur. (2019), porastom temperature PLE s 40 na 100

°C također je došlo do smanjenja udjela ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima komete grožđa. Ovaj trend sugerira da povišenje temperature iznad 100 °C negativno utječe na prinos antocijana, što je i razumljivo s obzirom da su antocijani termolabilni, odnosno degradiraju pri primjeni povišenih temperatura (Pereira i sur., 2019).

Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjenog ABTS metodom bila je najviša u ekstraktu dobivenom pri 150 °C, a najniža u ekstraktu dobivenom pri 100 °C. Zanimljivo je da se prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog u ekstraktu dobivenom pri 125 °C nije statistički značajno razlikovala od onih određenih u ekstraktima dobivenim pri 100 i 150 °C. Ovo pokazuje da povišenje temperature ipak povoljno utječe na antioksidacijski kapacitet, koji prati i trend povećanja udjela ukupnih fenola. Također, moguće je da je povišena temperatura pospješila ekstrakciju i drugih bioaktivnih spojeva, uz fenolne spojeve, i time pridonijela višoj vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

Slične rezultate dobili su Ju i Howard (2003) u svom istraživanju u kojem su proveli PLE na osušenoj pokožici grožđa pri temperaturama 20-140 °C upotrebom različitih otapala. U slučaju kad su kao ekstrakcijsko otapalo koristili 60 %-tnu vodenu otopinu etanola uz dodatak 0,1 %-tne klorovodične kiseline, udio ukupnih monomernih antocijana se smanjio s povišenjem temperature, dok se udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet (ORAC vrijednost) povisio. Da Fonseca Machado i sur. (2015) proveli su PLE na komini kupine uz upotrebu različitih otapala pri 60, 80 i 100 °C. U svom istraživanju također su zabilježili kako porastom temperature raste udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet (DPPH i ABTS), dok se udio ukupnih monomernih antocijana smanjuje. Razliku između gubitka antocijana pri povišenim temperaturama ekstrakcije i povećanog prinosa ukupnih fenola su objasnili većom ekstrakcijom termostabilnijih procijanidina i fenolnih kiselina. Također neki autori navode da ekstrakcija pri visokim temperaturama može pogodovati povećanju antioksidacijskog kapaciteta zbog formiranja antioksidativnih spojeva proizašlih iz Maillardovih reakcija (García-Marino i sur., 2006; Plaza i sur., 2010; Vergara-Salinas i sur., 2013).

Statičko vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj na niti jednu od promatranih zavisnih varijabli. Dobroslavić i sur. (2022) su u svom istraživanju o primjeni PLE na lovorov list također primijetili da statičko vrijeme PLE nije imalo statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet mjen FRAP, DPPH i ORAC metodama. Dobiveni rezultati ukazuju da je kraće statičko vrijeme ekstrakcije, a time i ukupno vrijeme ekstrakcije dovoljno učinkovito za ekstrakciju fenolnih spojeva, antocijana i ostalih spojeva s

antioksidacijskim svojstvima, čime se postiže i energetska te ekonomska učinkovitost s obzirom da kraće vrijeme ekstrakcije zahtijeva manji utrošak energije i vremena.

Omjer uzorka i otapala imao je statistički značajan utjecaj jedino na antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH i ABTS metodama, dok na ostale promatrane zavisne varijable nije bilo statistički značajnog utjecaja.

Najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog DPPH metodom postignuta je u ekstraktu dobivenom pri omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža bila u ekstraktu dobivenom pri omjeru 1:40 g/mL. Dobiveni rezultati pokazuju da povećanje volumena otapala pri PLE povoljno utječe na ekstrakciju spojeva s antioksidacijskim svojstvima. Slično tome, najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog ABTS metodom također je postignuta u ekstraktu dobivenom pri omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža bile u ekstraktu dobivenom pri omjeru 1:40 g/mL. Povećanjem omjera uzorka i otapala, povećava se koncentracijski gradijent između krute tvari i tekuće mase, što djeluje kao pokretačka sila tijekom prijenosa mase te rezultira većom količinom izoliranih spojeva (Pinelo i sur., 2005). Ipak, nije pokazana statistički značajna razlika između primjene omjera 1:60 i 1:80 g/mL, što sugerira da daljnje povećanje omjera uzorka i otapala nakon omjera 1:60 g/mL ne dovodi do značajnog povećanja antioksidacijskog kapaciteta mjerenog ABTS metodom.

Uzevši u obzir rezultate statističke analize svih promatranih zavisnih varijabli, temperatura 125 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL mogu se definirati kao optimalni PLE parametri za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije, čime se postigla ekstrakcija  $115,57 \pm 0,82$  mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola,  $18,70 \pm 0,10$  mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednostima  $1058,02 \pm 97,10$  (FRAP),  $451,93 \pm 0,36$  (DPPH) i  $662,15 \pm 17,21$  (ABTS)  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari.

## **5.2 MAE**

### **5.2.1 Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom MAE**

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom MAE prikazani su u tablici 7.

Udio ukupnih fenola određen je u rasponu od  $58,46 \pm 1,47$  do  $95,74 \pm 6,52$  mg GAE/g suhe tvari. Najviša vrijednost određena je u uzorku 17, dobivenom pri  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku 1, dobivenom pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Simić i sur. (2016) pratili su utjecaj procesnih parametara MAE na udio ukupnih fenola u plodovima aronije koristeći 50 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo pri vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 min. Udio ukupnih fenola u njihovom istraživanju određen je u rasponu od 3,73 do 4,58 mg GAE/g suhe tvari što je znatno niže od onog zabilježenog u komini aronije u ovom radu. Najviši udio ukupnih fenola Simić i sur. (2016) odredili su pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 15 min.

Udio ukupnih monomernih antocijana određen je u rasponu od  $20,27 \pm 0,24$  do  $26,57 \pm 0,00$  mg C-3-GE/g suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 6, dobivenom pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost određena u uzorku 13, dobivenom pri  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

U istraživanju Elez Garofulić i sur. (2023), u kojem je također provedena MAE na komini aronije, udio ukupnih monomernih antocijana određen je u znatno nižem rasponu ( $3,35 \pm 0,04$  do  $5,53 \pm 0,01$  mg/g), primjenjujući vrijeme ekstrakcije 4, 6, 8 i 10 min te temperaturu  $40$ ,  $60$  i  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Najvišu vrijednost zabilježili su pri uvjetima ekstrakcije  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 10 min, dok je najniža vrijednost određena u ekstraktu dobivenom pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 8 min.

Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom određen je u rasponu od  $586,69 \pm 3,31$  do  $983,59 \pm 60,48$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 18, dobivenom pri  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost određena u uzorku 1, dobivenom pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom određen je u rasponu od  $221,91 \pm 0,54$  do  $420,35 \pm 8,01$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost određena je u uzorku 18, dobivenom pri  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku 7, dobivenom pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.



Antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom određen je u rasponu od  $367,57 \pm 3,58$  do  $681,33 \pm 24,75$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je kod uzoraka 18, dobivenog pri  $80^\circ\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok je najniža vrijednost određena za uzorak 1, dobiven pri  $40^\circ\text{C}$ , vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Ovdje treba napomenuti kako dobivene rezultate za antioksidacijski kapacitet nije bilo moguće usporediti s literaturnim podacima s obzirom da u dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o antioksidacijskom kapacitetu određenom FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktu komine ili plodova aronije dobivenom primjenom MAE.

### **5.2.2 Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije**

Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodom u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom MAE prikazani su u tablici 8.

Temperatura je pokazala statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola, antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom i antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom.

Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola postignuta je pri  $80^\circ\text{C}$ . Ova vrijednost je statistički značajno viša od vrijednosti postignutih pri  $40^\circ\text{C}$ , ali nije statistički značajno različita od vrijednosti postignutih pri  $60^\circ\text{C}$ , što pokazuje da daljnje povišenje temperature iznad  $60^\circ\text{C}$  nije značajno utjecalo na udio ukupnih fenola.

Wu i sur. (2012) su istraživali primjenu MAE za izolaciju fenolnih spojeva iz krumpira koristeći temperature  $50, 60, 70$  i  $80^\circ\text{C}$  te su primijetili značajan porast koncentracije ukupnih fenola s povišenjem temperature. Sličan obrazac zabilježili su Jokić i sur. (2012) tijekom optimizacije MAE fenolnih spojeva iz brokule. U njihovom istraživanju, koncentracija ekstrahiranih fenola povećavala se s porastom temperature s  $50$  na  $73^\circ\text{C}$ , dok je daljnje povišenje temperature do  $90^\circ\text{C}$  rezultiralo smanjenjem sadržaja fenola. Zhao i sur. (2018) također su uočili sličan trend primjenom MAE na *Melastoma sanguineum*. Povišenjem temperature s  $20$  na  $50^\circ\text{C}$  došlo je do značajnog povećanja udjela ukupnih fenola, dok daljnje povišenje temperature do  $70^\circ\text{C}$  nije imalo statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola.

Najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP metodom bilježi se pri 80 °C, dok primjena 40 i 60 °C ne donosi statistički značajne razlike u antioksidacijskom kapacitetu mjenog FRAP metodom. Ovaj trend pokazuje da povišenje temperature povoljno utječe na ekstrakciju spojeva s antioksidacijskom aktivnošću. Sličan trend se bilježi i kod vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjenog ABTS metodom.

Vrijeme ekstrakcije pokazalo je statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet mjen FRAP metodom, ali nije pokazalo statistički značajan utjecaj na ostale promatrane zavisne varijable. Produljenje vremena ekstrakcije s 5 na 10 min rezultiralo je povećanjem udjela ukupnih fenola kao i antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP metodom. U već prethodnom spomenutom radu Zhao i sur. (2018) promatrali su i utjecaj vremena MAE na prinos ukupnih fenola. Iako su koristili puno duža vremena ekstrakcije nego što je to u ovom radu, također su uočili da produljenje vremena ekstrakcije s 15 na 45 min povoljno utječe na prinos ukupnih fenola. Ipak, primijetili su da daljnje produljenje vremena ekstrakcije na 60 min uzrokuje blago smanjenje udjela ukupnih fenola.

Omjer uzorka i otapala imao je statistički značajan utjecaj na sve promatrane zavisne varijable, pri čemu su najviše prosječne vrijednosti udjela ukupnih fenola, udjela ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP, DPPH i ABTS metodama postignute pri primjeni omjera uzorka i otapala 1:80 g/mL. Najniže prosječne vrijednosti za sve promatrane zavisne varijable zabilježene su pri primjeni omjera 1:40 g/mL. No, treba napomenuti kako statistička analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u udjelu ukupnih fenola pri primjeni omjera 1:60 i 1:80 g/mL, što sugerira da je i primjena omjera 1:60 g/mL dovoljna za učinkovitu ekstrakciju fenolnih spojeva iz liofilizirane komine aronije primjenom MAE.

Isti trend kao u ovom radu uočen je i u istraživanju Wen i sur. (2015) koji su provodili MAE na plodovima kupine. Uočili su da povećanjem omjera uzorka i otapala (1:15, 1:20 i 1:25 g/mL) također dolazi i do porasta vrijednosti udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i ABTS). Pap i sur. (2014) u svom istraživanju na crnom ribizu također su primijetili da povećanje omjera uzorka i otapala (s 1:10 na 1:20 g/mL) povoljno utječe na ekstrakciju antocijana primjenom MAE.

Sličan trend utjecaja omjera uzorka i otapala na prinos ukupnih fenola zabilježen je i u istraživanju Zhao i sur. (2018) primjenom MAE na *M. sanguineum*. Povećanjem omjera uzorka i otapala (1:10, 1:20 i 1:30 g/mL) primijećen je značajan rast udjela ukupnih fenola. Ipak, autori

su uočili da daljnjim povećanjem omjera uzorka i otapala (1:40, 1:50, 1:60 g/mL) dolazi do blagog smanjenja udjela ukupnih fenola, čime zaključuju da je pri omjeru 1:30 g/mL vjerojatno dostignuta ravnoteža prijenosa tvari.

Konačno, uzevši u obzir rezultate statističke analize za sve promatrane zavisne varijable, optimalni parametri za učinkovitu MAE za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije su temperatura 80 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL, što je omogućilo ekstrakciju 94,83±8,32 mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola, 24,03±0,53 mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednostima 983,59±60,48 (FRAP), 420,35±8,01 (DPPH) i 681,33±24,75 (ABTS) μmol TE/g suhe tvari.

## 5.3 UAE

### 5.3.1 Udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije dobivenih primjenom UAE

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodom u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom UAE prikazani su u tablici 9.

Udio ukupnih fenola određen je u rasponu od 63,11±0,41 do 88,92±2,00 mg GAE/g suhe tvari. Najviša vrijednost određena je u uzorku 18, dobivenom pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL. Najniža vrijednost određena je u uzorku 16, dobivenom pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Slične vrijednosti onima dobivenima u ovom radu zabilježili su Galván D'Alessandro i sur. (2014). Određivali su udio ukupnih fenola u ekstraktima komine aronije dobivenim uz UAE uz primjenu vode te 25 i 50 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijsko otapalo, pri amplitudama 50 i 100 % te temperaturama 20, 45 i 70 °C. U dobivenim ekstraktima udio ukupnih fenola određen je u rasponu od 20,58±1,45 do 74,28±3,69 mg GAE/g suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u ekstraktima dobivenim pri amplitudi 100 %, 70 °C uz 50 %-tnu vodenu otopinu etanola, a najniža vrijednost zabilježena je uz primjenu amplitude 100 %, 20 °C te vode kao ekstrakcijskog otapala.

Udio ukupnih monomernih antocijana određen je u rasponu od  $18,65 \pm 0,18$  do  $23,23 \pm 0,90$  mg C-3-GE/g suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 2, dobivenom pri amplitudi 50 %, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL. Najniža određena vrijednost karakterizirala je uzorak 17, dobiven pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Elez Garofulić i sur. (2023) odredili su udio ukupnih monomernih antocijana izoliranih iz komine aronije koristeći UAE pri amplitudama 25, 50 i 75 %, vremenu ekstrakcije 4, 6, 8 i 10 min, uz 50 %-tnu vodenu otopinu etanola i 50 %-tnu vodenu otopinu etanola uz dodatak 1 % mravlje kiseline kao ekstrakcijsko otapalo. U ekstraktima koji su dobiveni primjenom 50 %-tne vodene otopine etanola raspon udjela ukupnih monomernih antocijana bio je od  $2,53 \pm 0,03$  do  $4,91 \pm 0,13$  mg C-3-GE/g suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je pri amplitudi 50 % i vremenu ekstrakcije 8 min, dok je najniža vrijednost zabilježena pri amplitudi 25 % i vremenu ekstrakcije 6 min. U ekstraktima koji su dobiveni uz 50 %-tnu vodenu otopinu etanola uz dodatak 1 % mravlje kiseline raspon udjela ukupnih monomernih antocijana bio je nešto viši ( $3,89 \pm 0,16$  do  $5,67 \pm 0,02$  mg C-3-GE/g suhe tvari). Najviša vrijednost dobivena je primjenom amplitude 75 % i vremena ekstrakcije 10 min, dok je najniža vrijednost zabilježena pri primjeni amplitude 25 % i vremena ekstrakcije 4 min. Dobivene vrijednosti u radu Elez Garofulić i sur. (2023) nešto su niže od onih dobivenih u ovom radu, no valja spomenuti da su oni koristili omjer uzorka i otapala 1:100 g/mL te niže amplitude.

Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom određen je u rasponu od  $518,59 \pm 24,67$  do  $702,50 \pm 67,78$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 17, dobivenom pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL. Najniža vrijednost određena je u uzorku 6, dobivenom pri amplitudi 50 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL. Oszmianski i Lachowicz (2016) odredili su antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenim primjenom ultrazvučne kupelji uz otopinu metanola s dodatkom 2 % mravlje kiseline kao ekstrakcijskog otapala te vremenu ekstrakcije 20 min. Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom iznosio je  $522,20 \pm 2,00$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari, što odgovara vrijednostima dobivenih u ovom radu.

Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom određen je u rasponu od  $239,08 \pm 1,97$  do  $338,68 \pm 2,55$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost karakterizirala je uzorak 6, dobiven pri amplitudi 50 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:80 g/mL. Najniža

vrijednost zabilježena je u uzorku 13, dobivenom pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Oszmianski i Wojdylo (2015) odredili su antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom na uzorcima plodova, soka i komine aronije koristeći ultrazvučnu kupelj uz otopinu metanola s dodatkom 1 % klorovodične kiseline kao ekstrakcijskog otapala i vremenu ekstrakcije 20 min. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom bile su u rasponu 127,45 do 301,89  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najniža vrijednost određena je u soku aronije, dok je najviša određena u komini aronije. Dobivena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta za kominu aronije iz rada Oszmianski i Wojdylo (2015) u skladu je s vrijednostima dobivenim u ovom radu.

Antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom određen je u rasponu od  $383,76 \pm 4,30$  do  $593,23 \pm 55,87$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku 5, dobivenom pri amplitudi 50 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL. Najniža vrijednost izmjerena je u uzorku 16, dobivenom pri amplitudi 100 %, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Piasecka i sur. (2022) odredili su antioksidacijski kapacitet ABTS metodom u ekstraktima komine aronije dobivenim primjenom UAE uz vodu kao ekstrakcijsko otapalo, pri amplitudama 30, 55 i 80 % te vremenu ekstrakcije 2, 6 i 10 min. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom određen je u rasponu od  $99,00 \pm 4,50$  do  $205,50 \pm 1,50$   $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari, gdje je najviša vrijednost zabilježena u ekstraktu dobivenom pri amplitudi 80 % i vremenu ekstrakcije 10 min, a najniža vrijednost zabilježena je u ekstraktu dobivenom pri amplitudi 30 % i vremenu ekstrakcije 2 min. Nešto niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u radu Piasecka i sur. (2022) mogu biti rezultat primjene različitog ekstrakcijskog otapala, što upućuje kako je voda slabije ekstrakcijsko otapalo u odnosu na 50 %-tnu vodenu otopinu etanola s dodatkom 1 % mravlje kiseline.

### **5.3.2 Utjecaj parametara UAE na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet komine aronije**

Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na udio ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktima liofilizirane komine aronije dobivenih primjenom UAE prikazani su u tablici 10.

Amplituda nije imala statistički značajan utjecaj niti na jednu od promatranih zavisnih varijabli te su vrijednosti za sve varijable bile podjednake neovisno o primijenjenoj amplitudi. Prema

već spomenutom radu Elez Garofulić i sur. (2023) na komini aronije, povećanje amplitude s 25 na 75 % nije pokazalo statistički značajnu razliku u prinosu ukupnih monomernih antocijana. Borrás-Enríquez i sur. (2021) koji su proveli UAE na nusproizvodima manga, također su zabilježili kako povećanjem amplitude (30-90 %) nije došlo do statistički značajnih razlika u udjelu ukupnih fenola niti u antioksidacijskom kapacitetu određenim ABTS i DPPH metodama.

Vrijeme ekstrakcije pokazalo je statistički značajan utjecaj samo na udio ukupnih monomernih antocijana, pri čemu se kraće vrijeme ekstrakcije (5 min) pokazalo učinkovitijim za ekstrakciju antocijana. José Aliaño González i sur. (2021) istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije (2-25 min) na prinos ukupnih monomernih antocijana iz crnog ribiza primjenom UAE. Rezultati su također pokazali kako se kraće vrijeme (5 min) pokazalo učinkovitije za ekstrakciju antocijana, dok je pri dužem vremenu (između 10 i 20 min) došlo do smanjenja prinosa udjela ukupnih monomernih antocijana.

Omjer uzorka i otapala imao je statistički značajan utjecaj na sve promatrane zavisne varijable, osim na udio ukupnih monomernih antocijana. Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola postignuta je pri omjerima uzorka i otapala 1:60 i 1:80 g/mL, dok je pri omjeru 1:40 g/mL prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola bila najniža. To pokazuje da veći volumen otapala poboljšava ekstrakciju fenola, no daljnje povećanje omjera uzorka i otapala nakon 1:60 g/mL nije dovelo do značajnog povećanja prinosa fenolnih spojeva. Isti trend zabilježili su He i sur. (2016) koji su proveli UAE na komini borovnice te su pratili utjecaj omjera uzorka i otapala na udio ukupnih fenola. Primijetili su kako povećanjem omjera uzorka i otapala s 1:15 na 1:20 g/mL prinos udjela ukupnih fenola se povećao, dok omjer 1:25 g/mL nije doveo do značajnog prinosa fenolnih spojeva. Isti trend kao u ovom radu uočen je i u istraživanju D'Alessandro i sur. (2012) koji su primijenili UAE na komini aronije. Uočili su da povećanje omjera uzorka i otapala s 1:10 na 1:20 g/mL rezultira povećanim prinosom udjela ukupnih fenola, dok daljnje povećanje omjera uzorka i otapala na 1:40 g/mL nije dovelo do značajnog povećanja prinosa fenolnih spojeva.

Najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog FRAP metodom postignuta je pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok su pri omjerima 1:40 i 1:80 g/mL one bile niže.

Nadalje, statistički značajan utjecaj omjera uzorka i otapala primijećen je i u odnosu na antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom. Najviša prosječna vrijednost karakterizirala

je primjenu omjera uzorka i otapala 1:60 i 1:80 g/mL, dok je najniža obilježila primjenu omjera 1:40 g/mL. Obzirom da nije bilo statički značajne razlike između omjera 1:60 i 1:80 g/mL, omjer 1:60 g/mL se može uzeti kao učinkovit obzirom da donosi određenu uštedu otapala u odnosu na omjer 1:80 g/mL. Sličan trend primijetili su Koraqi i sur. (2023) koji su proveli UAE na jagodi. Uočili su da povećanjem omjera uzorka i otapala s 1:10 na 1:30 g/mL rastu vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP i DPPH metodama, dok povećanje omjera na 1:50 g/mL nije pokazalo statistički značajnu razliku. Isti trend se pokazao i pri antioksidacijskom kapacitetu određenom ABTS metodom.

U konačnici, amplituda 50 %, vrijeme ekstrakcije 5 min te udio uzorka i otapala 1:60 g/mL mogu se smatrati optimalnim UAE parametrima kada se uzmu u obzir rezultati statističke analizu za sve promatrane zavisne varijable. Ekstrakt komete aronije dobiven pri ovim uvjetima sadržavao je  $79,92 \pm 2,70$  mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola,  $23,23 \pm 0,90$  mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednosti  $637,35 \pm 28,12$  (FRAP),  $315,69 \pm 3,22$  (DPPH) i  $461,25 \pm 15,05$  (ABTS)  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari.

#### 5.4 PCA

Kako bi se ispitaio odnos između uzoraka ekstrakata liofilizirane komete aronije i njihovo moguće izdvajanje prema udjelu ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskom kapacitetu (FRAP, DPPH i ABTS) s obzirom na primijenjenu tehniku ekstrakcije, provedena je PCA te su dobiveni rezultati prikazani na slici 11. Također, u analizu su bile uključene sve promatrane varijable (udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet (FRAP, DPPH i ABTS)) s obzirom da je njihova komunalitetna vrijednost bila  $> 0,5$ , a distribucija uzoraka je promatrana u prostoru određenom prvim dvjema glavnim komponentama (PC1 i PC2), koje su imale svojstvenu vrijednost  $> 1$ .

Glavne komponente PC1 i PC2 objašnjavaju 89,04 % ukupne varijance između podataka za sve uzorke. Vrlo jaka korelacija ( $r > 0,812$ ) opisuje odnos glavne komponente PC1 sa svim varijablama uključenim u analizu, izuzev udjela ukupnih monomernih antocijana, čija je korelacija s glavnom komponentom PC1 bila umjerena ( $r = 0,575$ ). Što se tiče glavne komponente PC2, korelacija s udjelom ukupnih monomernih antocijana pokazala se jakom ( $r = 0,795$ ), no s ostalim uključenim varijablama korelacija je bila vrlo slaba do umjerena ( $0,077 < r < 0,456$ ).

Dobiveni rezultati pokazuju jasno grupiranje uzoraka ekstrakata prema tehnici ekstrakcije. Gotovo svi uzorci ekstrakata dobiveni primjenom PLE smjestili su se u prostoru negativnih vrijednosti glavne komponente PC1 pri čemu su bili karakterizirani visokim vrijednostima za udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet određen svim trima metodama (FRAP, DPPH i ABTS). S druge strane, većina uzoraka ekstrakata dobivenih primjenom MAE smjestili su se u prostoru pozitivnih vrijednosti glavne komponente PC2, pri čemu ih su ih obilježile visoke vrijednosti za udio ukupnih monomernih antocijana. Uzorci ekstrakata dobiveni primjenom UAE smjestili su se u prostoru pozitivnih vrijednosti glavne komponente PC1, a opisuju ih niže vrijednosti za sve varijable uključene u analizu.

Može se zaključiti kako je PCA potvrdila prethodno diskutirane rezultate i pokazala jasne razlike u učinkovitosti PLE, MAE i UAE u izolaciji fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije, pri čemu PLE pokazuje najvišu učinkovitost u izolaciji fenolnih spojeva što rezultira visokim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta. No, visoka temperatura primijenjena tijekom PLE ( $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ne pogoduje izolaciji antocijana s obzirom na njihovu termolabilnost, što je pak opravdala MAE. Manje invazivni uvjeti primijenjeni tijekom MAE, posebno temperatura (max.  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) su očuvali antocijane uz dovoljno učinkovitu izolaciju fenolnih spojeva pa se ova tehnika ekstrakcije može izdvojiti kao djelotvorno rješenje za dobivanje ekstrakata komine aronije bogatih fenolnim spojevima i antocijanima.

## **5.5 Usporedba učinkovitosti PLE, MAE, UAE i ekstrakcije refluksom**

Nakon definiranja optimalnih uvjeta PLE, MAE i UAE, cilj je bio dodatno usporediti međusobnu učinkovitost ovih naprednih tehnika ekstrakcije u izolaciji fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije te navedenih tehnika s konvencionalnom tehnikom ekstrakcije. U tu svrhu provedena je i ekstrakcija refluksom, a svi dobiveni rezultati su statistički analizirani primjenom jednosmjerne ANOVA-e.

Usporedba učinkovitosti PLE, MAE i UAE pri optimalnim uvjetima te ekstrakcije refluksom u izolaciji fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije te antioksidacijskom kapacitetu prikazana je u tablici 11.

Učinkovitost svih ispitivanih tehnika ekstrakcije se statistički značajno razlikovala u svim promatranim zavisnim varijablama. Gledajući udio ukupnih fenola, PLE i ekstrakcija refluksom su bile najviše učinkovite u izolaciji fenolnih spojeva, dok je nešto niža učinkovitost karakterizirala MAE i UAE. Invazivni uvjeti PLE i ekstrakcije refluksom, naročito povišena



temperatura, pozitivno je utjecala na razaranje stanične stijenke, što je omogućilo oslobađanje fenolnih spojeva i penetraciju otapala, a time i njihovo otapanje u otapalu te uspješnije izdvajanje. Nayak i sur. (2015) su također u svom istraživanju uspoređivali PLE, MAE i UAE za izolaciju fenolnih spojeva iz kore slatke naranče. Za razliku od rezultata dobivenih u ovom radu, rezultati njihovog istraživanja su pokazali kako je primjenom MAE izoliran statistički značajno viši udio ukupnih fenola u usporedbi s PLE i UAE. Veršić Bratinčević i sur. (2023) uspoređivali su efikasnost MAE i PLE te konvencionalne ekstrakcije otapalom na morskom koromaču (*Crithmum maritimum* L.) koristeći 50 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo. U njihovom istraživanju, MAE je pokazala najveću učinkovitost u ekstrakciji fenolnih spojeva s rasponom udjela ukupnih fenola određenim od 25,91 (pri 700 W) do 28,80 mg GAE/g (pri 300 W). Konvencionalna ekstrakcija otapalom pokazala je umjerene rezultate s rasponom udjela ukupnih fenola određenim od 20,61 (pri 25 °C) do 23,41 mg GAE/g (pri 60 °C), dok se UAE pokazala kao najmanje učinkovita za ekstrakciju fenolnih spojeva, sa zabilježenim rasponom ukupnih fenola određenim od 18,46 (pri 40 °C) do 19,97 mg GAE/g (pri 60 °C).

Nadalje, MAE, UAE i ekstrakcija refluksum pokazale su bolju učinkovitost u izolaciji monomernih antocijana u odnosu na PLE. Ova pojava ne iznenađuje, budući da su tijekom PLE primijenjene temperature  $> 100$  °C, što je zasigurno utjecalo na degradaciju antocijana, o čemu je već prethodno diskutirano. Na osnovi ovih rezultata, za buduća slična istraživanja svakako bi trebalo korigirati temperaturni raspon tijekom PLE ukoliko je u cilju ostvariti što veći prinos antocijana. Nadalje, iako je ekstrakcija refluksum bila podjednao učinkovita kao MAE i UAE, prednost se ipak može dati primjeni MAE i UAE zbog znatno kraćeg vremena ekstrakcije, što pridonosi ekonomskoj učinkovitosti procesa. Elez Garofulić i sur. (2023) su u svom istraživanju uspoređivali utjecaj MAE i UAE na izolaciju monomernih antocijana iz komine aronije te su rezultati pokazali kako je MAE osigurala veći prinos monomernih antocijana u usporedbi s UAE, a obje tehnike su pokazale prednosti u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju refluksum. Ovdje valja istaknuti kako je i u ovom radu, unatoč izostanku statistički značajne razlike, MAE brojčano pokazala nešto bolju učinkovitost u izolaciji monomernih antocijana u odnosu na UAE.

Promatrajući vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP, DPPH i ABTS metodama, vidljivo je da su ekstrakti dobiveni primjenom PLE, MAE i ekstrakcijom refluksum pokazali više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na onaj dobiven primjenom UAE. Iz ovih rezultata može se zaključiti kako su fenolni spojevi najviše pridonijeli

antioksidacijskom kapacitetu, budući da su generalno ove tehnike ekstrakcije pokazale i bolju učinkovitost u izolaciji ovih spojeva. UAE ekstrakti su bili karakterizirani s najnižim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta, što je pak u skladu s prethodno diskutiranim rezultatima.

Milić i sur. (2022) u svom su istraživanju uspoređivali učinkovitost PLE, MAE i UAE u izolaciji bioaktivnih spojeva iz crnog i crvenog ribiza, uključujući ukupne fenole, ukupne flavonoide i ukupne monomernu antocijane, kao i antioksidacijski kapacitet (FRAP, DPPH i ABTS). Rezultati su pokazali da je MAE bila najučinkovitija za izolaciju navedenih bioaktivnih spojeva iz crnog ribiza, dok je PLE omogućila najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida iz crvenog ribiza. Ipak, autori impliciraju da su najviši udjeli svih istraživanih bioaktivnih spojeva u crnom i crvenom ribizu postignuti primjenom UAE. Ekstrakti crnog ribiza dobiveni primjenom UAE sadržavali su najviši udio ukupnih flavonoida, dok su ekstrakti crvenog ribiza imali najviši udio monomernih antocijana.

S obzirom da je cilj ovog istraživanja bio proizvesti ekstrakt komine aronije koji će obilovati fenolnim spojevima i antocijanima, time predstavljajući bogat izvor prirodnih antioksidanasa i pigmenta za eventualnu potencijalnu upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, MAE je odabrana za sljedeću fazu istraživanja kao tehnika ekstrakcije koja omogućuje učinkovitu izolaciju navedenih spojeva.

## **5.6 Kriogeno mljevenje**

U posljednjoj fazi ovog istraživanja cilj je bio primijeniti kriogeno mljevenje kao predtretman prije ekstrakcije kako bi se dodatno poboljšao i povećao prinos željenih spojeva. U tu svrhu provedeno je kriogeno mljevenje liofilizirane komine aronije u različitim vremenskim intervalima, nakon čega je tako usitnjeni materijal podrgnut ekstrakciji primjenom MAE pri prethodno definiranim optimalnim uvjetima. Dodatno, uspoređena je učinkovitost kriogenog mljevenja s konvencionalnim postupkom mljevenja.

### **5.6.1 Veličina čestica uzoraka komine aronije usitnjenih kriogenim i konvencionalnim mljevenjem**

Prije ekstrakcije, svim uzorcima liofilizirane komine aronije usitnjenim primjenom kriogenog mljevenja te uzorku usitnjenom konvencionalnim postupkom mljevenja je određena veličina

čestica primjenom metode raspršivanja laserskog svjetla. Rezultati mjerenja veličine čestica prikazani su u tablici 12.

Pri određivanju veličine čestica pomoću metode raspršivanja laserskog svjetla koriste se ključni parametri:  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  i  $d(0,9)$ . Parametar  $d(0,1)$  označava veličinu čestica ispod koje se nalazi 10 % ukupnog volumena čestica, ukazujući na fine čestice. Parametar  $d(0,5)$ , poznat kao medijalni promjer, predstavlja veličinu čestica ispod koje se nalazi 50 % ukupnog volumena čestica, što je središnja vrijednost distribucije. Parametar  $d(0,9)$  označava veličinu čestica ispod koje se nalazi 90 % ukupnog volumena, ukazujući na grube čestice. Raspon distribucije veličine čestica (engl. *span*) mjeri širinu distribucije veličine čestica. Manji raspon ukazuje na ujednačeniju distribuciju čestica, dok veći raspon ukazuje na veću varijaciju u veličini čestica (Malvern Instruments, 2017).

Vrijednosti za parametar  $d(0,1)$  određene su u rasponu od  $2,06 \pm 0,04$  do  $37,00 \pm 2,84$   $\mu\text{m}$ . Očekivano, najviša vrijednost zabilježena je u uzorku koji je usitnjen konvencionalnim postupkom mljevenja, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku nakon 9 min kriogenog mljevenja. Vidljivo je da vrijednosti  $d(0,1)$  opadaju s povećanjem vremena kriogenog mljevenja, što pokazuje učinkovitost kriogenog mljevenja u smanjenju veličine 10 % čestica. Također, već 1 min kriogenog mljevenja je dovoljna za redukciju 10 % čestica za 86,5 % u odnosu na konvencionalan postupak mljevenja. Ipak, daljnja redukcija veličine čestica uslijed povećanja vremena kriogenog mljevenja nije pokazala statistički značajne razlike u vrijednostima  $d(0,1)$  između uzoraka usitnjenih kriogenim mljevenjem. Kraljić i sur. (2023) proveli su kriogeno mljevenje pogače uljane repice u trajanju 2, 4, 8 i 12 min. Najniža vrijednost  $d(0,1)$  je također bila zabilježena kod uzorka koji je najdulje mljeven (12 min), pri čemu se 10 % čestica reduciralo za 89,23 % u odnosu na konvencionalno mljeveni uzorak.

Vrijednosti za parametar  $d(0,5)$  određene su u rasponu od  $15,38 \pm 0,76$  do  $238,12 \pm 10,85$   $\mu\text{m}$ . Ponovo, najviša vrijednost zabilježena je u uzorku usitnjenom konvencionalnim postupkom mljevenja, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku nakon 9 min kriogenog mljevenja. Statistički značajna razlika u parametru  $d(0,5)$  vidljiva je između uzoraka usitnjenom konvencionalnim postupkom mljevenja te onih usitnjenih kriogenim mljevenjem u trajanju 1, 3 i 5 min, odnosno redukcija veličine 50 % čestica iznosila je 68,4; 77,7 i čak 89,5 % nakon 1, 3 i 5 min kriogenog mljevenja. Daljnje produljenje kriogenog mljevenja na 7 ili 9 min nije pokazalo značajnu redukciju veličine 50 % čestica. Kod Kraljić i sur. (2023) također je došlo do smanjenja vrijednosti  $d(0,5)$  duljim kriogenim mljevenjem. Zabilježena je statistički

značajna razlika među svim uzorcima u usporedbi s konvencionalno usitnjenim uzorkom, a redukcija veličine 50 % čestica iznosila je 56,28; 65,09; 76,55 i 84,30 % nakon 2, 4, 8 i 12 min kriogenog mljevenja.

Vrijednosti za parametar  $d(0,9)$  određene su u rasponu od  $135,61 \pm 13,54$  do  $712,90 \pm 43,42$   $\mu\text{m}$ . Veličina 90 % čestica ponovo je pokazala isti trend kao i u prethodno promatranim parametrima veličine čestica, odnosno najviša vrijednost zabilježena je u uzorku usitnjenom konvencionalnim postupkom mljevenja, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku nakon 9 min kriogenog mljevenja. Statistička analiza pokazala je slične rezultate kao za  $d(0,5)$ , osim što se nije pokazala značajna razlika u veličini 90 % čestica u uzorcima usitnjenim kriogenim mljevenjem tijekom 1 i 3 min. Iz rezultata je vidljivo da je redukcija veličine 90 % čestica iznosila 36,0 i 41,1 % nakon 1 i 3 min kriogenog mljevenja u odnosu na konvencionalan postupak mljevenja, a 5 min kriogenog mljevenja je reduciralo veličinu 90 % čestica za 65,6 %. Daljnje produženje kriogenog mljevenja na 7 i 9 min nije pridonijelo statistički značajnoj redukciji veličine 90 % čestica. Za razliku od  $d(0,9)$  vrijednosti dobivenih u ovom radu, sve  $d(0,9)$  vrijednosti u radu Kraljić i sur. (2023) pokazale su statistički značajnu razliku. Najniža vrijednost također je zabilježena u uzorku nakon najduljeg kriogenog mljevenja (12 min), pri čemu se 90 % čestica reduciralo za 83,12 % u odnosu na konvencionalno mljeveni uzorak.

Posljednji promatrani parametar je raspon distribucije veličine čestica, koji opisuje homogenost distribucije veličine čestica te je poželjno da ova vrijednost bude što niža što upućuje na dobru homogenost distribucije veličine čestica. Izračunate vrijednosti raspona distribucije veličine čestica iznosile su od  $2,84 \pm 0,04$  do  $9,71 \pm 0,73$   $\mu\text{m}$ , pri čemu je najviša vrijednost zabilježena u uzorku nakon 5 min kriogenog mljevenja, dok je najniža vrijednost karakterizirala uzorak usitnjen konvencionalnim postupkom mljevenja. S obzirom na visoke vrijednosti raspona distribucije veličine čestica u uzorcima usitnjenim kriogenim mljevenjem, može se utvrditi da distribucija čestica u tim uzorcima nije bila homogena, a najveću homogenost u distribuciji veličine čestica pokazao je uzorak usitnjen konvencionalnim postupkom mljevenja. Kraljić i sur. (2023) zabilježile su najnižu vrijednost parametra raspona u uzorku dobivenom nakon 4 min kriogenog mljevenja, što je ukazivalo na najveću homogenost distribucije veličine čestica u tom uzorku. Nasuprot tome, najmanja homogenost distribucije čestica zabilježena je kod uzorka koji je najdulje mljeven (12 min), što je također potvrđeno i u ovom istraživanju.

Uzevši u obzir sve promatrane parametre veličine čestica, može se zaključiti kako je kriogeno mljevenje vrlo učinkovito za značajnu redukciju veličine čestica komine aronije te je dovoljno maksimalno 5 min ovog predtretmana ili kraće da bi se značajno reducirala veličina čestica komine aronije, a time i potencijalno poboljšala učinkovitost ekstrakcije željenih spojeva.

### **5.6.2 Utjecaj vremena kriogenog mljevenja na udio ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima komine aronije**

Nakon analize veličine čestica uzoraka usitnjenih kriogenim mljevenjem, provedena je izolacija fenolnih spojeva i antocijana iz ovih uzoraka primjenom MAE, kao odabranom učinkovitom tehnikom ekstrakcije, pri prethodno definiranim optimalnim procesnim uvjetima (80 °C/10 min/1:80 g/mL). Tablica 13 prikazuje rezultate određivanja ukupnih fenola, ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodama u ekstraktima liofilizirane komine aronije usitnjene kriogenim mljevenjem.

Vrijeme kriogenog mljevenja imalo je statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola, te antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP, DPPH i ABTS metodama, dok nije bilo statistički značajne razlike u udjelu ukupnih monomernih antocijana između uzoraka s obzirom na duljinu trajanja kriogenog mljevenja. Ovo se može objasniti činjenicom kako se većina antocijana nalazi u pokožici ploda (Chaovanalikit i Wrolstad, 2004) pa se vjerojatno njihova najveća količina oslobodila već i tijekom konvencionalnog mljevenja. Ovo potvrđuju i dobiveni rezultati za udio ukupnih monomernih antocijana izoliranih iz konvencionalno usitnjenog uzorka uz primjenu MAE pri optimalnim uvjetima i prosječne vrijednosti udjela ukupnih monomernih antocijana svih uzoraka usitnjenih kriogenim mljevenjem (24,03 vs. 22,18 mg C-3-GE/g suhe tvari).

Najviši udio ukupnih fenola (115,06±0,17 mg GAE/g suhe tvari) zabilježen je u uzorku usitnjenom tijekom 1 min kriogenog mljevenja, dok je najniži udio (99,08±0,17 mg GAE/g suhe tvari) zabilježen u uzorku tijekom 7 min kriogenog mljevenja. S obzirom da je uzorak usitnjen kriogenim mljevenjem u trajanju 1 min pokazao najviši statistički značajan udio ukupnih fenola u odnosu na sve ostale uzorke, može se zaključiti da je ovaj predtretman kriogenog mljevenja bio najučinkovitiji za izolaciju fenolnih spojeva. Kada se usporede vrijednosti udjela ukupnih fenola u ovom uzorku s onim usitnjenim konvencionalnim mljevenjem, može se vidjeti superiornost kriogenog mljevenja u izolaciji fenolnih spojeva

(115,06 vs. 94,83 mg GAE/g suhe tvari), gdje je predtretman kriogenim mljevenjem pridonio povećanju udjela ukupnih fenola za 17,6 %.

U radu Balbino i sur. (2019) dobiveni su nešto drugačiji rezultati. Balbino i sur. (2019) proveli su kriogeno mljevenje kao predtretman te promatrali njegov učinak na poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih molekula iz pogače sjemenki bundeve. Kriogeno mljevenje trajalo je 4, 8 i 12 min, a rezultati su pokazali da se povećavanjem vremena predtretmana povećavao prinos fenolnih spojeva u odnosu na kontrolni uzorak. Najveći prinos fenolnih spojeva postignut je pri kriogenom mljevenju u trajanju od 12 min. Statistički značajne razlike uočene su između trajanja kriogenog mljevenja 4 i 12 min te 8 i 12 min, dok razlika između 4 i 8 min nije bila značajna za prinos ukupnih fenola. Do ovakvih rezultata moglo je doći zbog razlika u strukturi materijala. Pogača od sjemenki bundeve ima čvršću i vlaknastiju strukturu, koja se učinkovito razbija tijekom kriogenog mljevenja te se oslobađa više fenolnih spojeva koji su inače zarobljeni u staničnoj strukturi (Balbino i sur., 2019), dok je struktura komine aronije nježnija pa dodatno produljenje kriogenog mljevenja ne pridonosi povećanju prinosa željenih spojeva.

Statistički značajno najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta zabilježene su u uzorcima u kojima je kriogeno mljevenje trajalo duže od 5 min. Konkretno, najviši antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom određen je u uzorcima usitnjenim 5 i 9 min, onaj mjeren DPPH metodom u uzorcima usitnjenim tijekom 9 min kriogenog mljevenja, a antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom u uzorcima usitnjenim tijekom 7 i 9 min. Vjerojatno je duže vrijeme kriogenog mljevenja pridonijelo oslobađanju i drugih bioaktivnih spojeva prisutnih u komini aronije koji su pridonijeli višim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta. No, valja primijetiti kako su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjenog svim metodama gotovo podjednake u uzorku usitnjeno konvencionalnim postupkom mljevenja u odnosu na prethodno navedene uzorke usitnjene kriogenim mljevenjem (FRAP 983,59 vs. 945,21  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari, DPPH 420,35 vs. 411,74  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari i ABTS 681,33 vs. 718,06  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari).

U već spomenutom istraživanju Balbino i sur. (2019) na pogači sjemenki bundeve, također je došlo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta mjenog DPPH metodom kod uzorka koji je najdulje mljeven (12 min) u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Rosa i sur. (2013) proveli su istraživanje o povećanju antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata pšeničnih mekinja primjenom kriogenog mljevenja. Uzorci su mljeveni 3, 5, 10, 15 i 20 min, pri čemu je najviši antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom postignut u uzorku nakon 20 min kriogenog

mljevenja, dok je najniži bio u uzorku nakon 3 min kriogenog mljevenja. Rezultati su pokazali statistički značajan porast antioksidacijskog kapaciteta s povećanjem vremena kriogenog mljevenja, slično kao i u ovom istraživanju.

Na kraju se može konstatirati kako se kriogeno mljevenje pokazalo učinkovitim predtretmanom za izolaciju fenolnih spojeva iz komine aronije te je dovoljna 1 min ovog predtretmana da se ostvari maksimalni prinos ovih spojeva.

### **5.7 Kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije**

Ekstrakt liofilizirane komine aronije dobiven pri optimalnim uvjetima MAE (80 °C/10 min/1:80 g/mL) uz predtretman kriogenim mljevenjem u trajanju 1 min dodatno je analiziran s obzirom na sastav individualnih fenolnih spojeva primjenom UPLC/MS<sup>2</sup> metode, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 14.

Ukupno je identificirano 27 fenolnih spojeva, odnosno 6 antocijana, 3 fenolne kiseline, 14 flavonola, 2 flavona, 1 flavan-3-ol i 1 procijanidin. Najzastupljeniju skupinu fenolnih spojeva činili su antocijani (64,192 mg/g suhe tvari, odnosno 66,9 %). Kaloudi i sur. (2022) identificirali su fenolne spojeve u pokožici, mesu s košticama te cijelim plodovima aronije. Udio antocijana u odnosu na druge fenolne spojeve u osušenoj pokožici ploda aronije iznosio je 66 %, u osušenom mesu ploda aronije s košticama 10,8 % a u osušenim cijelim plodovima aronije 27 %. Kaloudi i sur. (2022) svojim su istraživanjem došli do zaključka da se u pokožici ploda aronije nalazi najveći udio antocijana, čak 73 % ukupnih antocijana ploda aronije. U istraživanju Oszmiański i Lachowicz (2016), antocijani su činili 50 % fenolnih spojeva ekstrahiranih iz usitnjene liofilizirane komine aronije, što je nešto niže od udjela antocijana određenih u ovome radu. Do ove razlike moglo je doći zbog korištenja različitih sorti aronije, ali i zbog razlike u postupku dobivanja komine aronije. Autori navode da su koristili sortu Galicjanka te su prilikom prešanja koristili hidrauličku prešu (potisak klipa 15 t/2 min), što u konačnici može rezultirati različitim udjelom same pokožice u komini.

Među identificiranim antocijanima, najzastupljeniji su bili cijanidin-3-*O*-glukoozid i cijanidin 3-*O*-galaktozid (20,808±0,003 i 20,667±0,004 mg/g suhe tvari), a slijedili su ih cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O* ksilozid u podjednakim koncentracijama (11,369±0,005 i 11,313±0,004 mg/g suhe tvari). Cijanidin-3-heksozid-(epi)katehin i cijanidin-3-pentozyd-(epi)katehin detektirani su u najnižim koncentracijama (0,015±0,001 i 0,002±0,001 mg/g suhe

tvari). Istraživanje Oszmiański i Lachowicz (2016) pokazalo je djelomično drugačije rezultate u zastupljenosti pojedinih antocijana u prahu liofilizirane komine aronije. Identificirali su cijanidin 3-*O*-galaktozid kao najzastupljeniji (7961,70 mg/100 g suhe tvari), a cijanidin-3-*O*-arabinozid kao drugi najzastupljeniji antocijan (3116,02±2,28 mg/100 g suhe tvari). Slijedili su cijanidin-3-*O*-ksilozid (275,41±1,26 mg/100 g suhe tvari) i cijanidin-3-*O*-glukozid (220,0±0,01 mg/100 g suhe tvari), dok su u najnižoj koncentraciji određeni cijanidin-3,5-heksozid-(epi)katehin (20,43±0,09 mg/100 g suhe tvari) i cijanidin-3-pentozid-(epi)katehin (10,30±0,05 mg/100 g suhe tvari). Veći broj istraživanja je također potvrdio cijanidin-3-*O*-arabinozid kao drugi najzastupljeniji antocijan u proizvodima od aronije (soku, komini i plodu) (Kaloudi i sur., 2022; Lin i sur., 2022; Slimstad i sur., 2005). No, rezultati istraživanja Elez Garofulić i sur. (2023) su slični rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Naime, autori Elez su također odredili cijanidin-3-*O*-glukozid (124,20-145,60 mg/100 g) i cijanidin 3-*O*-galaktozid (125,76-149,06 mg/100 g) kao najzastupljenije antocijane u komini aronije, dok je cijanidin-3-*O*-arabinozid (46,30 – 80,70 mg/100 g) određen kao tek četvrti najzastupljeniji antocijan, iako u sličnoj koncentraciji kao treći najzastupljeniji cijanidin-3-*O* ksilozid (56,40 – 80,40 mg/100 g). Slično kao i u ovom radu, cijanidin-3-heksozid-(epi)katehin i cijanidin-3-pentozid-(epi)katehin odredili su u najnižim koncentracijama (0,11-0,23 i 0,01 mg/100 g). Ranije navedene razlike u zastupljenosti pojedinih antocijana mogu se objasniti varijacijom u sorti, iako treba navesti kako svi autori ne navode sortu aronije koju su koristili u svom istraživanju. U ovom istraživanju korištena je sorta „Nero“, jednako kao i u istraživanju Elez Garofulić i sur. (2023), dobivena iz istog izvora, što objašnjava sličan sastav antocijana. Ipak, u istraživanju Elez Garofulić i sur. (2023) određena je znatno niža koncentracija ukupnih antocijana (5,36±0,38 mg/g) u odnosu na koncentraciju dobivenu u ovom radu (64,192 mg/g suhe tvari). Ova razlika mogla je proizaći iz toga što je komina iz istraživanja Elez Garofulić i sur. (2023) dobivena prešanjem plodova aronije na industrijskoj preši, čime je pod visokim pritiskom veći udio antocijana mogao preći u sok, a manji je zaostao u komini. Također, važno je naglasiti da je komina korištena u ovom istraživanju liofilizirana, dok su Elez Garofulić i sur. (2023) koristili zamrznutu kominu pa je viša koncentracija dobivena u ovom radu očekivana.

Uspoređujući rezultate udjela ukupnih antocijana određenih spektrofotometrijski i UPLC/MS<sup>2</sup> analizom, može se uočiti određeno odstupanje, odnosno UPLC/MS<sup>2</sup> analizom određeno je 3 puta više antocijana u odnosu na rezultate spektrofotometrijske analize. Ova pojava može se objasniti samom razlikom u metodama. Naime, pH diferencijalnom metodom može se odrediti



samo udio ukupnih monomernih antocijana, dok UPLC/MS<sup>2</sup> analiza, kao višestruko osjetljivija, preciznija i točnija metoda, može detektirati pojedinačne antocijane i kvantificirati njihovu sumu. Slične rezultate dobili su Vagiri i Jensen (2017), u čijem je istraživanju na komini aronije udio ukupnih antocijana bio u prosjeku 2 puta veći od udjela ukupnih monomernih antocijana.

Sljedeća skupina fenolnih spojeva po zastupljenosti bili su flavonoli (29,106 mg/g suhe tvari) koji su činili 30,3 % identificiranih fenolnih spojeva. Najzastupljeniji bio je kamferol-3-glukozid (24,530 mg/g suhe tvari). Može se primijetiti da su kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-*O*-galaktozid također bili u zamjetnim koncentracijama (1,614±0,003 i 1,536±0,003 mg/g suhe tvari), kao i kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-vicianozid te kvercetin-3-*O*-dihexozid (0,914±0,003; 0,161±0,001 i 0,150±0,002 mg/g suhe tvari), dok su ostali identificirani flavonoli bili prisutni u koncentracijama < 0,1 mg/g suhe tvari. Prema istraživanju Sójka i sur. (2013), flavonoli su bili najmanje zastupljeni fenolni spojevi u komini aronije, s udjelom od samo 0,86 %. Kao najzastupljenije flavonole odredili su kvercetin-3-*O*-galaktozid, kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-*O*-rutinozid što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Ipak, Sójka i sur. (2013) nisu identificirali kamferol-3-glukozid u skupini flavonola komine aronije. Oszmiański i Lachowicz (2016) također su odredili znatno niži udio flavonola u komini aronije (1,5 %), s najvećim udjelom kvercetin-3-*O*-galaktozida (1,024±0,005 mg/g suhe tvari), kvercetin-3-glukozida (0,671±0,005 mg/g suhe tvari), kvercetin-3-*O*-rubinozida (0,505±0,002 mg/g suhe tvari) i kvercetin-3-*O*-rutinozida (0,432±0,002 mg/g suhe tvari). Nadalje, Soobrattee i sur. (2005) odredili su antioksidacijsku aktivnost flavonola kao relativno visoku, s redoslijedom antioksidacijske aktivnosti: kvercetin > miricetin > kampferol. Antioksidacijski kapacitet ove skupine fenolnih spojeva Soobrattee i sur. (2005) povezuju s brojem prisutnih hidroksilnih skupina. Niska antioksidacijska aktivnost kampferola među flavonolima može se pripisati prisutnosti samo jedne hidroksilne skupine u B prstenu, koja ima mali doprinos čak i uz prisutnost konjugiranog sustava dvostrukih veza i 3-OH skupine.

Fenolne kiseline činile su 2,5 % identificiranih fenolnih spojeva (2,413 mg/g suhe tvari). Gotovo podjednako zastupljene bile su neoklorogenska i klorogenska kiselina (0,913±0,003 i 0,801±0,005 mg/g suhe tvari), dok je izoklorogenska kiselina A bila prisutna u nešto nižoj koncentraciji (0,699±0,004 mg/g suhe tvari). Slično ovim rezultatima, u istraživanju Sójka i sur. (2013) fenolne kiseline činile su 1,5 % fenolnih spojeva u komini aronije, također gotovo podjednakih koncentracija klorogenske (0,845 mg/g suhe tvari) i neoklorogenske kiseline (0,681 mg/g suhe tvari). Nešto viši udio fenolnih kiselina (7,5 %) odredili su Oszmiański i

Lachowicz (2016), pri čemu su koncentracije klorogenske ( $11,927 \pm 0,035$  mg/g suhe tvari) i neoklorogenske kiseline ( $11,744 \pm 0,044$  mg/g suhe tvari) također bile podjednake.

Flavan-3-oli, procijanidini i flavoni su bili najmanje zastupljeni fenolni spojevi te su činili svega 0,22; 0,04 i 0,01 % ukupnih identificiranih fenolnih spojeva. Iako u malim koncentracijama, flavan-3-oli i procijanidini, prema istraživanju Soobrattee i sur. (2005), zabilježeni su kao jaki antioksidansi te značajno pridonose ukupnom antioksidacijskom kapacitetu biljnih materijala. Soobrattee i sur. (2005) odredili su da antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva opada sljedećim redoslijedom: procijanidinski dimeri > flavan-3-oli > flavonoli > hidroksicimetne kiseline > hidroksibenzojeve kiseline.

Od navedenih spojeva, u najvišoj koncentraciji detektiran je epikatehin ( $0,217 \pm 0,005$  mg/g suhe tvari), slijedio ga je procijanidin B2 ( $0,042 \pm 0,004$  mg/g suhe tvari), dok su luteolin-7-*O*-rutinozid i luteolin-7-*O*-glukuronid detektirani u vrlo niskim koncentracijama ( $0,004 \pm 0,001$  i  $0,002 \pm 0,001$  mg/g suhe tvari). Prema Oszmiański i Lachowicz (2016), flavan-3-oli činili su čak 1,3 % ukupnih fenolnih spojeva, pri čemu je koncentracija epikatehin iznosila  $2,601 \pm 0,012$  mg/g suhe tvari, a procijanidin B2 je određen u znatno nižoj koncentraciji ( $0,421 \pm 0,002$  mg/g).

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Komina aronije predstavlja vrijedan nusprodukt prehrambene industrije zbog visokog sadržaja bioaktivnih spojeva (fenola i antocijana), koji imaju snažno antioksidacijsko djelovanje te se može koristiti za proizvodnju prehrambenih i nutraceutskih proizvoda, čime se smanjuje prehrambeni otpad i doprinosi održivosti proizvodnje.
2. Optimalni PLE uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz komine aronije su: temperatura 125 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL. Ekstrakt komine aronije dobiven pri ovim uvjetima sadržavao je 115,57±0,82 mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola, 18,70±0,10 mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednostima 1058,02±97,10 (FRAP), 451,93±0,36 (DPPH) i 662,15±17,21 (ABTS) μmol TE/g suhe tvari.
3. Optimalni MAE uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz komine aronije su: temperatura 80 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL. Ekstrakt komine aronije dobiven pri ovim uvjetima sadržavao je 94,83±8,32 mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola, 24,03±0,53 mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednostima 983,59±60,48 (FRAP), 420,35±8,01 (DPPH) i 681,33±24,75 (ABTS) μmol TE/g suhe tvari.
4. Optimalni UAE uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz komine aronije su: amplituda 50 %, vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL. Ekstrakt komine aronije dobiven pri ovim uvjetima sadržavao je 79,92±2,70 mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola, 23,23±0,90 mg C-3-GE/g suhe tvari ukupnih monomernih antocijana te antioksidacijski kapacitet u vrijednostima 637,35±28,12 (FRAP), 315,69±3,22 (DPPH) i 461,25±15,05 (ABTS) μmol TE/g suhe tvari.
5. MAE je pokazala najvišu ekstraktibilnu i ekonomsku učinkovitost za proizvodnju ekstrakata komine aronije s visokim sadržajem fenolnih spojeva i antocijana te visokim antioksidacijskim kapacitetom. Iako su se PLE, UAE i ekstrakcija refluksom također pokazale učinkovitima, PLE je primjenom visokih temperatura negativno utjecala na prinos antocijana, UAE je pokazala najmanju učinkovitost u odnosu na ostale primijenjene tehnike ekstrakcije, a ekstrakcija refluksom zahtijeva znatno duže vrijeme ekstrakcije.

6. Predtretman kriogenim mljevenjem se pokazao učinkovitim za značajnu redukciju veličine čestica komine aronije te je 1 min kriogenog mljevenja dovoljna za poboljšanje izolacije fenolnih spojeva iz komine aronije u odnosu na konvencionalni postupak mljevenja, no ne pridonosi značajno izolaciji antocijana.
7. U ekstraktu liofilizirane komine dobivenom primjenom MAE pri optimalnim uvjetima (80 °C/10 min/1:80 g/mL) uz predtretman kriogenim mljevenjem (1 min) identificirano je ukupno 27 fenolnih spojeva, odnosno 6 antocijana, 3 fenolne kiseline, 14 flavonola, 2 flavona, 1 flavan-3-ol i 1 procijanidin. Antocijani su činili 66,9 % identificiranih fenolnih spojeva, slijedili su flavonoli (30,3 %) i fenolne kiseline (2,5 %), dok su najmanje zastupljeni bili flavan-3-oli (0,22 %), procijanidini (0,04 %) i flavoni (0,01 %).
8. Ovo istraživanje je pokazalo da kombinacija MAE i predtretmana kriogenim mljevenjem predstavlja optimalan pristup za valorizaciju komine aronije, omogućujući izolaciju visokog prinosa bioaktivnih spojeva (fenola i antocijana), čime se doprinosi održivosti i ekološkoj prihvatljivosti procesa proizvodnje soka aronije.

## **7. ZAHVALA**

Prvenstveno, želimo izraziti duboku zahvalnost našoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Maji Repajić, čija nas je stručnost i neizmijerna podrška vodila kroz sve faze izrade ovog rada. Njeni dragocjeni savjeti i nesebično izdvojeno vrijeme bili su ključni za naš uspjeh.

Uz to, iskreno zahvaljujemo svim članovima Laboratorija za kemiju i tehnologiju voća i povrća na susretljivosti, stručnoj pomoći i stvaranju ugodne radne atmosfere koja je značajno doprinijela našem istraživanju.

Na kraju, hvala našim obiteljima i prijateljima na motivaciji, bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

## 8. POPIS LITERATURE

- Abubakar AR, Haque M (2020) Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci*, **12(1)**, 1-10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Alexandre EM, Moreira SA, Castro LM, Pintado M, Saraiva JA (2017) Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. *Food Rev Int*, **28**, 1-32. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1359842>
- Alvarez-Rivera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibañez E (2020) Pressurized liquid extraction, Liquid-phase extraction, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 375-398. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>
- Anonymus 1, <https://www.directnativeplants.com/product/black-chokeberry/>. Pristupljeno 12. lipnja 2024.
- AOAC Official Method 2005.02 total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balbino S, Dorić M, Vidaković S, Kraljić K, Škevin D, Drakula S, Voučko B, Čukelj N, Obranović M, Čurić D (2019) Application of cryogenic grinding pretreatment to enhance extractability of bioactive molecules from pumpkin seed cake, *J Food Eng*, **42**, 13300, <https://doi.org/10.1111/jfpe.13300>
- Bamba BSB, Shi J, Tranchant CC, Xue SJ, Forney CF, Lim LT (2018) Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*, **23**, 1685. <https://doi.org/10.3390/molecules23071685>
- Ben-Othman S, Jõudu I, Bhat R (2020) Bioactives from agri-food wastes: Present insights and future challenges. *Molecules*, **25(3)**, 510. <https://doi.org/10.3390/molecules2503051>

- Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem*, **29(2)**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*, **239(1)**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 32-47. <https://hrcak.srce.hr/70918> Pristupljeno 7. lipnja 2024.
- Boncheva M, Georgiev G, Shishkov V (2013) Intake of *Aronia melanocarpa* juice improves medical tests and the feeling of health in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gene Med*, **2**, 21–30. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2019.05.000910>
- Borrás-Enríquez AJ, Reyes-Ventura E, Villanueva-Rodríguez SJ, Moreno-Vilet L (2021) Effect of ultrasound-assisted extraction parameters on total polyphenols and its antioxidant activity from mango residues (*Mangifera indica* L. var. *Manililla*). *Separations*, **8(7)**, 94. <https://doi.org/10.3390/separations8070094>
- Borycka B, Stachowiak J (2008) Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. *Food Chem*, **107(1)**, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.014>
- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod*, **64(7)**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>
- Brazdauskas T, Montero L, Venskutonis P R, Ibañez E, Herrero M (2016) Downstream valorization and comprehensive two-dimensional liquid chromatography-based chemical characterization of bioactives from black chokeberries (*Aronia melanocarpa*) pomace. *J Chromatogr*, **1468**, 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.033>
- Chaovanalikit A, Wrolstad RE (2004) Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J Food Sci*, **69(1)**, 67-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x>

- Chemat F, Vian MA, Fabiano-Tixier AS, Nutrizio M, Režek Jambrak A, Munekata PE, et al. (2020) A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem*, **22**, 2325-2353. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>
- Chemat S, Lagha A, Amar HA, Chemat F (2004) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason Sonochem*, **11**, 5-8. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(03\)00128-7](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(03)00128-7)
- Chrubasik C, George L, Sigrun C (2010) The clinical effectiveness of chokeberry: A systematic review. *Phytother Res*, **24**, 1107-1114. <https://doi.org/10.1002/ptr.3226>
- Coman V, Teleky BE, Mitrea L, Martău GA, Szabo K, Călinoiu LF, Vodnar DC (2020) Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. *Adv Food Nutr Res*, **91**, 157–225. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.07.001>
- Červenka L (2011) Moisture adsorption characteristics of black currant (*Ribes nigrum* L.), black elderberry (*Sambucus nigra* L.) and chokeberry (*Aronia melanocarpa* [minchx] Ell.) samples at different temperatures. *J Food Process*, **34**, 1419–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00507.x>
- Da Fonseca Machado AP, Pasquel-Reátegui JL, Fernández Barbero G, Martínez J (2015) Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Res Int*, **77**, 675-683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2004) Extending the applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay, *J Agri Food Chem*, **52**(1), 48-54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- De la Guardia M, Armenta S (2011) Greening sample treatments. *Compr Anal Chem*, **57**, 87–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53709-6.00005-7>
- Denev P, Číž M, Kratchanova M, Blazheva D (2019) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem*, **284**, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.108>



- Dobrosłavić E, Elez Garofulić I, Šeparović J, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V (2022) Pressurized liquid extraction as a novel technique for the isolation of *Laurus nobilis* L. leaf polyphenols, *Molecules*, **27(16)**, 5099. <https://doi.org/10.3390/molecules27165099>
- Drmić H, Režek Jambrak A (2011) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *J Food Sci Technol*, **2(2)**, 22-33, <https://hrcak.srce.hr/65474>
- Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Brnčić M, Dragović-Uzelac V (2018) UPLC-MS<sup>2</sup> profiling of blackthorn flower polyphenols isolated by ultrasound-assisted extraction. *J Food Sci*, **83**, 2782–2789. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14368>
- Elez Garofulić I, Repajić M, Zorić Z, Jurendić T, Dragović-Uzelac V (2023) Evaluation of microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques for revalorization of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit pomace anthocyanins. *Sustainability*. **15(9)**, 7047. <https://doi.org/10.3390/su15097047>
- Fava F, Totaro G, Diels L, Reis M, Duarte J, Carioca OB, Poggi-Varaldo HM, Ferreira BS (2015) Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. *New Biotechnol* **32(1)**, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.003>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2017) Crop statistics. available online: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC> Pristupljeno: 7. lipnja 2024
- Galván D’Alessandro L, Dimitrov K, Vauchel P, Nikov I (2014) Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem Eng Research Design*, **92(10)**, 1818-1826. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>
- García-Marino M, Rivas-Gonzalo JC, Ibáñez E, García-Moreno C (2006) Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal Chim Acta*, **563**, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.054>
- Ghani U (2020) Alpha-glucosidase inhibitors, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 61–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102779-0.00003-4>.
- Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J (2001) Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory

and practice. *Crit Rev Anal Chem* **31(3)**, 149-165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>

- Gramza-Michałowska A, Sidor A, Kulczyński B (2017) Berries as a potential anti-influenza factor – A review. *J Funct Foods* **37**, 116–137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.050>
- Grunovaitė L, Pukalskienė M, Pukalskas A, Venskutonis PR (2016) Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *J Funct Foods*, **24**, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.018>
- He B, Zhang LL, Yue XY (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem*, **204**, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- Jokić S, Cvjetko M, Božić Đ, Fabek S, Toth N, Vorkapić-Furač J, Radojčić Redovniković I (2012) Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *Int J Food Sci Tech*, **47**, 2613-2619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03143.x>
- José Aliaño González M, Carrera C, Barbero GF, Palma M (2021) A comparison study between ultrasound-assisted and enzyme-assisted extraction of anthocyanins from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Food Chem X*, **13**, 100192. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100192>
- Ju ZY, Howard LR (2003) Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J AgrI Food Chem*, **51(18)**, 5207–5213. <https://doi.org/10.1021/jf0302106>
- Kaloudi T, Tsimogiannis D, Oreopoulou V (2022) *Aronia melanocarpa*: identification and exploitation of its phenolic components. *Molecules*, **27**, 4375. <https://doi.org/10.3390/molecules27144375>
- Kapci B, Neradova E, Čížková H, Voldřich M, Rajchl A, Capanoglu E (2013) Investigation the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *J Food Nutr Res*, **52(4)**, 219–29.

<https://www.researchgate.net/publication/249314007> Investigating the antioxidant potential of chokeberry *Aronia melanocarpa* products Pristupljeno 20. lipnja 2024.

- Kaur B, Srivastav PP (2018) Effect of cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder. *J Food Process Preserv*, **42**, 1-8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13583>
- Kim B, Ku CS, Pham TX, Park Y, Martin DA, Xie L, i sur. (2013) *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutr Res*, **33**, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.03.001>
- Koraqi H, Petkoska AT, Khalid W (2023) Optimization of the extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* Duch.) using response surface methodology. *Food Anal Methods*, **16**, 1030–1042. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02469-6>
- Kraemer-Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W (1998) Solid-phase extraction (SPE)—a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J Sci Food Agric*, **78**: 435-440. <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/authorized-by/Fuchs/Heidrun>
- Kraljić K, Škevin D, Čukelj Mustač N, Benković M, Drakula S, Balbino S, Mandura Jarić A, Mamilović K, Ramljak I, Ćurić D (2023) Influence of cryogenic grinding on the nutritional and antinutritional components of rapeseed cake. *Applied Sci*, **13(10)**, 5841. <https://doi.org/10.3390/app13105841>
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*, **89**, 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Kulling SE, Rawel HM (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*, **74(13)**, 1625-1634. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088306>
- Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

- Lavernia EJ, Schoenung JM (2008) Cryomilled nanostructured materials: Processing and properties. *Mater Sci Eng A*, **493**, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2007.06.099>
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int*, **88(5)**, 1269-1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
- Lin S, Meng X, Tan C, Tong Y, Wan M, Wang M, Zhao Y, Deng H, Kong Y, Ma Y (2022) Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep eutectic solvent extraction method. *Ultrason. Sonochem*, **89**, 106102. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106102>
- Lloyd PJ, van Wyk J (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Lebovka F, Vorobiev N, Chemat E (ured.), Enhancing extraction processes in the food industry, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, str.1-24. <http://dx.doi.org/10.1201/b11241-2>
- Lovrić V, Putnik P, Bursać Kovačević D, Jukić M, Dragović-Uzelac V (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol Biotechnol*, **55(2)**, 243-250. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4687>
- Macheix JJ (1990) Fruit phenolics, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, 360-378. <https://doi.org/10.1201/9781351072175>
- Malvern Instruments, Mastersizer 2000 user manual (MAN0384-1.0) (2017), <https://igc.usp.br/labsed/wp-content/uploads/sites/21/2020/04/mastersizer-2000-2000e-manual-eng1.pdf> Pristupljeno 6. kolovoza 2024.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79(5)**, 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn*

Rev, 1, 7-18. <https://www.phcogrev.com/sites/default/files/PhcogRev-1-1-7.pdf> Pristupljeno 7. lipnja 2024.

- Martínez JM, Delso C, Maza M, Álvarez I, Raso J (2018) Utilising pulsed electric field processing to enhance extraction processes. *Ref Module Food Sci.* 1, 281-287, <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22435-9>
- Martinez-Solano KC, Garcia-Carrera NA, Tejada-Ortigoza V, García-Cayuela T, Garcia-Amezquita LE (2020) Ultrasound application for the extraction and modification of fiber-rich by-products, *Food Eng Rev*, 13(3), 524-543. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09269-2>
- Mayer-Miebach E, Adamiuk M, Behsnilian D (2012) Stability of chokeberry bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product. *Agriculture*, 2(3), 244-258. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030244>
- Milić A, Daničić T, Tepić Horecki A, Šumić Z, Teslić N, Bursać Kovačević D, Putnik P, Pavlić B (2022) Sustainable extractions for maximizing content of antioxidant phytochemicals from black and red currants. *Foods*, 11, 325. <https://doi.org/10.3390/foods11030325>
- Milić M (2012) Priručnik za uzgoj aronije. <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/prirucnik-za-uzgoj-aronije.pdf>  
Pristupljeno: 16. lipnja 2024.
- Mondragón R, Juliá JE, Barba A, Jarque JC (2013) Influence of the particle size on the microstructure and mechanical properties of grains containing mixtures of nanoparticles and microparticles: Levitator tests and pilot-scaled validation. *J Eur Ceram Soc*, 33, 1271–1280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2012.12.017>
- Mottaleb MA, Sarker SD (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. *Methods Mol Biol*, 864, 75-87. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_4)
- Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. *Int J Mol Sci*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

- Nayak B, Dahmoune F, Moussi K (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* **187**, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>
- Ochmian I, Grajkowski J, Smolik M (2012) Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*, **40**, 253-260. <http://dx.doi.org/10.15835/nbha4017181>
- Oszmiański J, Wojdyło A (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, **221**, 809–813. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0002-5>
- Oszmiański, J, Lachowicz S (2016) Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, **21(8)**, 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules21081098>
- Pap N, Beszédes S, Pongrácz E, Myllykoski L, Gábor M, Gyimes E, Keiski R. (2012) Microwave-assisted extraction of anthocyanins from black currant marc. *Food and Bioprocess Technol*, **6(10)**, 2666–2674. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0964-9>
- Pedroza MA, Amendola D, Maggi L, Zalacain A, De Faveri DM, Spigno G (2015) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from dried waste grape skins. *Int J Food Eng*, **11**, 359-370. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0009>
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr*, **133(9)**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Pereira DTV, Tarone AG, Cazarin CBB, Barbero GF, Martínez J (2019) Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *J Food Eng*, **240**, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019>
- Petreska Stanoeva J, Balshikevska E, Stefova M, Tusevski O, Simic SG (2020) Comparison of the effect of acids in solvent mixtures for extraction of phenolic

compounds from *Aronia melanocarpa*. *Nat Prod Commun*, **15(7)**, 1-10. <https://doi.org/10.1177/1934578x20934675>

- Piasecka I, Górka A, Kalisz S, Brzezińska R, Wiktor A (2022) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from black currant and chokeberry pomaces. *Bio Life Sci Forum*, **18(1)**, 14. <https://doi.org/10.3390/Foods2022-12954>
- Pieszka M, Gogol P, Pietras M,(2015) Valuable components of dried pomaces of chokeberry, black currant, strawberry, apple and carrot as a source of natural antioxidants and nutraceuticals in the animal diet. *Ann Anim Sci*, **15(2)**, 475-491. <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0072>
- Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agr Food Chem*, **53(6)**, 2111-2117. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>
- Plaza M, Amigo-Benavent M, del Castillo MD, Ibáñez E, Herrero M (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Res Int*, **43**, 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.036>
- Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, **53(10)**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Raut P, Bhosle D, Janghel A, Deo S, Verma C, Kumar SS, Agrawal M, Amit N, Sharma M, Giri T, Tripathi DK, Ajazuddin, Alexander A (2015) Emerging pressurized liquid extraction (PLE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals. *Res J Pharm Technol*, **8(6)**, 801-812. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00129.8>
- Retsch GmbH (2017) CryoMill Manual: Cryogenic Mixer Mill CryoMill.
- Roda-Serrat MC, Andrade TA, Rindom J, Lund PB, Norddahl B, Errico M (2021) Optimization of the recovery of anthocyanins from chokeberry juice pomace by homogenization in acidified water. *Waste Biomass Valori*, **12(4)**, 1815-1827. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01127-w>



- Rodriguez-Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr Polym*, **86**, 1137-1144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.006>
- Sagar NA, Pareek S, Sharma S, Yahia EM, Lobo MG (2018) Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **17(3)**, 512-531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Saha S, Singh AK, Keshari AK, Raj V, Rai A, Maity S (2018) Modern extraction techniques for drugs and medicinal agents. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) *Ingredients extraction by physicochemical methods in food*, 1. izd., Academic Press, London, str. 65-106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00002-8>
- Saxena SN, Barnwal P, Balasubramanian S, Yadav DN, Lal G, Singh KK (2018) Cryogenic grinding for better aroma retention and improved quality of Indian spices and herbs: A review. *J Food Process Eng*, **42(6)**, 12826. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12826>
- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci*, **98(4)**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Simić VM, Rajković KM, Stojičević SS, Veličković DT, Nikolić NČ, Lazić ML, Karabegović IT (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep Purif Technol*, **160**, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.019>
- Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH (2005) Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J Food Compos Anal*, **18(1)**, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.003>
- Sójka, M, Kołodziejczyk, K, Milala, J (2013) Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Ind Crops Products*, **51**, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.051>



- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res*, **579(1-2)**, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sosa-Hernández JE, Escobedo-Avellaneda Z, Iqbal HMN, Welti-Chanes J (2018) State-of-the-art extraction methodologies for bioactive compounds from algal biome to meet bio-economy challenges and opportunities. *Molecules*, **23**, 2953. <https://doi.org/10.3390/molecules23112953>
- Strugała P, Gładkowski W, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Gabrielska J (2016) Antioxidant activity and anti-inflammatory effect of fruit extracts from blackcurrant, chokeberry, hawthorn, and rosehip, and their mixture with linseed oil on a model lipid membrane. *Eur J Lipid Sci Technol*, **118**, 461-474. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500001>
- Tan J, Han Y, Han B, Qi X, Cai X, Ge S, Xue H (2022) Extraction and purification of anthocyanins. *J Agric Food Res*, **8**, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100306>
- Tena N, Asuero AG (2022) Up-to-date analysis of the extraction methods for anthocyanins: Principles of the techniques, optimization, technical progress, and industrial application. *Antioxidants*, **11(2)**, 286. <https://doi.org/10.3390/antiox11020286>
- Tolić MT, Jurčević IL, Krbavčić IP, Marković K, Vahčić N (2015) Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technol Biotechnol*, **53(2)**, 171-179. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.02.15.3833>
- Tomić A, Tomaz I, Jeromel A (2016) Kemijski sastav voćnih vina od aronije. *Glasnik Zaštite Bilja*, **39(6)**, 63-69. <https://hrcak.srce.hr/172208>
- Uzel RA (2018) Microwave-assisted green extraction technology for sustainable food processing. U: Kok Yeow Y (ured.) Emerging microwave technologies in industrial, agricultural, medical and food processing, IntechOpen, Rijeka, str. 160-178. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76140>
- Vagiri M, Jensen M (2017) Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food Chem*, **217**, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.121>

- Vergara-Salinas JR, Bulnes P, Zúñiga MC, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Mateo Martín ML, Agosin E, Pérez-Correa JR (2013) Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *J Agric Food Chem*, **61**, 6929–6936, <https://doi.org/10.1021/jf4010143>
- Veršić Bratinčević M, Kovačić R, Popović M, Radman S, Generalić Mekinić I (2023) Comparison of conventional and green extraction techniques for the isolation of phenolic antioxidants from sea fennel. *Processes*, **11**, 2172. <https://doi.org/10.3390/pr11072172>
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Techn*, **17**, 300-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wen Y, Chen H, Zhou X, Deng Q, Zhao Y, Zhao C, Gong X (2015) Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, **5(25)**, 19686–19695. <https://doi.org/10.1039/C4RA16396F>
- Wilczek M, Bertling J, Hintemann D (2004) Optimised technologies for cryogenic grinding. *Int J Miner Process*, **74**, 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2004.07.032>
- Woźniak Ł, Marszałek K, Skąpska S, Jędrzejczak R (2017) The application of supercritical carbon dioxide and ethanol for the extraction of phenolic compounds from chokeberry pomace. *Appl Sci*, **7(4)**, 322. <https://doi.org/10.3390/app7040322>
- Wu T, Yan J, Liu R, Marcone MF, Akber Aisa H, Tsao R (2012) Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chem*, **133**, 1292-1298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.002>
- Xu SY, Huang X, Cheong KL (2017) Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Mar Drugs*, **15**, 388. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
- Zhao CN, Zhang JJ, Li Y, Meng X, Li HB (2018) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: Optimization and identification. *Molecules*, **23(10)**, 2498, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136452>

## Sažetak

### Valorizacija komine aronije primjenom naprednih tehnika ekstrakcije i mljevenja

*Marija Zorić i Ivan Magnabosca*

Ovaj rad istražuje mogućnosti valorizacije komine aronije, nusproizvoda nastalog nakon prešanja plodova aronije (*Aronia melanocarpa* L.) u procesu proizvodnje soka. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije otapalom pri povišenom tlaku (PLE), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) na izolaciju fenolnih spojeva i antocijana iz liofilizirane komine aronije te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata. Također, definirani su optimalni uvjeti svake navedene tehnike ekstrakcije, a njihova učinkovitost uspoređena je međusobno te s ekstrakcijom refluksom, kao konvencionalnom tehnikom ekstrakcije. Nadalje, ispitana je duljina trajanja kriogenog mljevenja (1, 3, 5, 7 i 9 min), kao predtretmana za poboljšanje učinkovitosti izolacije fenolnih spojeva i antocijana iz komine aronije, na veličinu čestica usitnjene komine aronije, prinos fenolnih spojeva i antocijana te antioksidacijski kapacitet, a dodatno je uspoređena učinkovitost kriogenog mljevenja s konvencionalnim postupkom mljevenja. Na kraju, određen je kemijski profil fenolnih spojeva u ekstraktu liofilizirane komine aronije primjenom UPLC-MS<sup>2</sup> metode. Dobiveni rezultati su pokazali da komina aronije predstavlja vrijedan nusproizvod prehrambene industrije zbog visokog sadržaja bioaktivnih spojeva (fenola i antocijana), koji imaju snažno antioksidacijsko djelovanje te se može koristiti za proizvodnju prehrambenih i nutraceutskih proizvoda. Optimalni PLE uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva i antocijana pri čemu se postiže visok antioksidacijski kapacitet ekstrakta bili su temperatura 125 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL, za MAE temperatura 80 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min te omjer uzorka i otapala 1:80 g/mL, dok su amplituda 50 %, vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL bili optimalni UAE uvjeti. U usporedbi s PLE, UAE i ekstrakcijom refluksom, MAE je pokazala najvišu ekstraktibilnu i ekonomsku učinkovitost za proizvodnju ekstrakata komine aronije s visokim sadržajem fenolnih spojeva i antocijana te visokim antioksidacijskim kapacitetom. Predtretman kriogenim mljevenjem se pokazao učinkovitim za značajnu redukciju veličine čestica komine aronije te je 1 min kriogenog mljevenja dovoljna za poboljšanje izolacije fenolnih spojeva iz komine aronije u odnosu na konvencionalni postupak mljevenja, no ne pridonosi značajno izolaciji antocijana. U ekstraktu liofilizirane komine aronije dobivenom primjenom MAE pri optimalnim uvjetima uz predtretman kriogenim mljevenjem (1 min) identificirano je ukupno 27 fenolnih spojeva, odnosno 6 antocijana, 3 fenolne kiseline, 14 flavonola, 2 flavona, 1 flavan-3-ol i 1 procijanidin, pri čemu su najzastupljeniji bili antocijani (66,9 %), slijedili su flavonoli (30,3 %) i fenolne kiseline (2,5 %), dok su najmanje zastupljeni bili flavan-3-oli (0,22 %), procijanidini (0,04 %) i flavoni (0,01 %). Ovo istraživanje je pokazalo da kombinacija MAE i predtretmana kriogenim mljevenjem predstavlja optimalan pristup za valorizaciju komine aronije, omogućujući izolaciju visokog prinosa bioaktivnih spojeva (fenola i antocijana), čime se doprinosi održivosti i ekološkoj prihvatljivosti procesa proizvodnje soka aronije.

**Ključne riječi:** komina aronije, napredne tehnike ekstrakcije, kriogeno mljevenje, bioaktivni spojevi, antioksidacijski kapacitet

## Summary

### Valorization of black chokeberry pomace using advanced extraction and milling techniques

*Marija Zorić and Ivan Magnabosca*

The present study investigates the possibilities of valorization of black chokeberry pomace, a by-product obtained during the pressing of black chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.) in juice production. The aim of the study was to investigate the influence of the process conditions of pressurized liquid extraction (PLE), microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) on the isolation of phenolic compounds and anthocyanins from freeze-dried black chokeberry pomace and the antioxidant capacity of the extracts obtained. Furthermore, the optimal conditions for each of the mentioned extraction techniques were defined and their efficiency was compared mutually and with reflux extraction as a conventional extraction technique. In addition, the duration of cryogenic milling (1, 3, 5, 7 and 9 min) as a pretreatment to improve the efficiency of isolation of phenolic compounds and anthocyanins from black chokeberry pomace was examined on the particle size of the cryomilled black chokeberry pomace, the yield of phenolic compounds and anthocyanins, and the antioxidant capacity, and the efficiency of cryogenic milling was additionally compared with the conventional milling method. Finally, the chemical profile of the phenolic compounds in the extract of the freeze-dried black chokeberry pomace was determined using the UPLC-MS<sup>2</sup> method. The results obtained showed that black chokeberry pomace is a valuable by-product of the food industry due to its high content of bioactive compounds (phenolic compounds and anthocyanins), which have a strong antioxidant effect, and can be used for the production of food and nutraceuticals. The optimal PLE conditions for the isolation of phenolic compounds and anthocyanins, at which a high antioxidant capacity of the extract is achieved, were temperature 125 °C, static extraction time 5 min and sample-to-solvent ratio 1:80 g/mL, for MAE temperature 80 °C, extraction time 10 min and sample-to-solvent ratio 1:80 g/mL, while amplitude 50 %, extraction time 5 min and sample-to-solvent ratio 1:60 g/mL were optimal UAE conditions. Compared to PLE, UAE and reflux extraction, MAE showed the highest extractable and economic efficiency for the production of black chokeberry pomace extracts with a high content of phenolic compounds and anthocyanins as well as a high antioxidant capacity. Pretreatment with cryogenic milling was found to be effective in significantly reducing the particle size of chokeberry pomace, and 1 min of cryogenic milling is sufficient to improve the isolation of phenolic compounds from chokeberry pomace compared to the conventional milling method, but does not contribute significantly to the isolation of anthocyanins. A total of 27 phenolic compounds, i.e. 6 anthocyanins, 3 phenolic acids, 14 flavonols, 2 flavones, 1 flavan-3-ol and 1 procyanidin, were identified in the freeze-dried black chokeberry pomace extract obtained by applying MAE under optimal conditions with pretreatment by cryogenic milling (1 min), with anthocyanins being the most abundant (66.9%), followed by flavonols (30.3%) and phenolic acids (2.5%), while flavan-3-ols (0.22%), procyanidins (0.04%) and flavones (0.01%) were the least represented. This study has shown that the combination of MAE and pretreatment by cryogenic milling represents an optimal approach for the valorization of black chokeberry pomace, allowing the isolation of a high yield of bioactive compounds (phenolic compounds and anthocyanins) and thus contributing to the sustainability and environmental friendliness of the black chokeberry juice production process.

**Keywords:** black chokeberry pomace, advanced extraction techniques, cryogenic milling, bioactive compounds, antioxidant capacity