

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

univ. bacc. ing. techn. aliment. Ivana Papaik
univ. bacc. ing. biotechn. Veronika Gunjević

**ZELENI PRISTUPI U EKSTRAKCIJI
I IZOLACIJI ANTOCIJANA IZ
KOMINE GROŽĐA**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološko fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016/2017. Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta br. 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Principi zelene ekstrakcije	2
1.1.1. Obnovljivi izvori sirovina	4
1.1.1.1. Komina grožđa kao izvor biološki aktivnih spojeva	6
1.1.2. Alternativna otapala	9
1.1.2.1. Eutektička otapala	12
1.1.3. Alternativni izvori i ušteda energije	13
1.1.3.1. Ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem	14
1.1.3.2. Optimizacija procesnih uvjeta metodom odzivnih površina	15
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Komina grožđa	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Laboratorijska oprema	18
3.2. Metode rada	19
3.2.1. Sinteza prirodnog eutektičkog otapala.....	19
3.2.2. Optimizacija ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru	19
3.2.2.1. Plan pokusa za optimiranje ekstrakcije antocijana pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru i obrada podataka metodom odzivnih površina ..	20
.....	20
3.2.3. Optimizacija ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru	22
3.2.3.1. Plan pokusa za optimiranje ekstrakcije antocijana pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru i obrada podataka metodom odzivnih površina	22
3.2.4. Određivanje pojedinačnih i ukupnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	23
3.2.5. Iscrpna ekstrakcija antocijana iz komine grožđa prirodnim eutektičkim otapalima.....	26

3.2.6. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala	26
3.2.7. Usporedba ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a potpomognutih istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem i samostalnim mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom	28
4. REZULTATI	29
4.1. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina	29
4.1.1. Određivanje optimalnih uvjeta i potvrda modela ekstrakcije antocijana NADES-om.....	33
4.2. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina	34
4.2.1. Određivanje optimalnih uvjeta i potvrda modela ekstrakcije antocijana zakiseljenim etanolom.....	40
4.3. Iscrpna ekstrakcija antocijana iz komine grožđa prirodnim eutektičkim otapalom	41
4.4. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala	42
4.5. Usporedba ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a potpomognutih istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem i samostalnim mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom.....	43
5. RASPRAVA	44
5.1. Određivanje optimalnih uvjeta ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije antocijana u NADES-u	45
5.2. Određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije ukupnih antocijana zakiseljenim etanolom	48

5.3. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala	49
6. ZAKLJUČCI	51
7. ZAHVALE	52
8. LITERATURA	53
9. SAŽETAK.....	58
10. SUMMARY.....	60
11. ŽIVOTOPIS.....	62

1. UVOD

Razvoj industrije, s jedne strane donosi poboljšanje kvalitete ljudskog života, no s druge strane uzrokuje onečišćenje okoliša i pretjeranu eksploataciju prirodnih resursa našeg planeta – uglavnom zbog neodrživosti. Ti resursi ne uključuju samo naftu, već i čisti zrak i vodu. Prema tome, postoji istaknuta potreba za pronalaskom novih alternativnih rješenja u industrijskoj i laboratorijskoj praksi. Zelena kemija je vrlo važan alat u održivom razvoju (Kudlak i sur. 2015). Kao sve važnije polje zelene kemije ističe se zelena ekstrakcija (Chemat i sur., 2012). Danas u industriji parfema, kozmetike, hrane, biogoriva, lijekova i finih kemikalija gotovo ne postoji proizvodni proces koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije prirodnih produkata (Chemat i sur., 2012). Konvencionalni procesi ekstrakcije u industrijskom mjerilu imaju velike nedostatke kao što su nepotpuno iskorištenje ekstrakta, uporaba iznimno velike količine organskih otapala te visoka potrošnja energije zbog izrazito dugog vremena ekstrakcije i intenzivnog zagrijavanja i/ili miješanja tijekom ekstrakcije (Rombaut i sur., 2014; Chemat i sur., 2012). Stoga je cilj zelene kemije zamjena tradicionalnih metoda ekstrakcije zelenom ekstrakcijom (Chemat i sur., 2012).

Zbog svojstava kao što su nezapaljivost, biorazgradivost i nehlapljivost, veliku pozornost kao zelena otapala privlače prirodna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Uglavnom su to smjese nabijenog akceptora i nabijenog donora vodika koji se međusobno vežu vodikovim vezama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Pored zelenog karaktera, jedna od istaknutih karakteristika ovih otapala jest mogućnost modifikacije njihove strukture, a time i promjena fizikalno-kemijskih svojstava što posljedično utječe na mogućnost i učinkovitost njihove primjene (Kudlak i sur., 2015). Uz korištenje zelenih otapala, zelena kemija predlaže i korištenje alternativnih izvora energije prilikom ekstrakcije (Chemat i sur., 2012). Tako se među mnogim metodama ekstrakcije ističe ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem. Ovakav način ekstrakcije osigurava skraćanje procesa, smanjenje utroška energije i povećanje prinosa (Mason i sur., 2011).

Ekstrakcija prirodnih produkata najčešće se odnosi na ekstrakciju biološki aktivnih spojeva (Cavalcanti i sur., 2013). Jedni od najznačajnijih biološki aktivnih spojeva su zasigurno antocijani zbog njihove izrazite antioksidativne aktivnosti i drugih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava (Li i sur., 2012). Komina grožđa, otpad iz industrije vina, je bogat izvor antocijana (Yu i Ahmedna, 2012).

Cilj ovog rada je bio primjeniti zelene principe ekstrakcije antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali potpomognute istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem uz primjenu NADES-a kolin klorid:limunska kiselina (ChCit). Također, cilj je bila i usporedba navedene zelene ekstrakcije s ekstrakcijom antocijana iz komine grožđa potpomognute istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem uz primjenu konvencionalnog otapala – etanola. Nadalje, provedena je i izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a ChCit kao i reciklacija istog NADES-a.

1.1. Principi zelene ekstrakcije

Porast ljudske populacije i razvoj industrije sa sobom donose zagađenje okoliša i pretjeranu eksploataciju prirodnih resursa. Stoga je potrebno pronaći nova alternativna rješenja u laboratorijskoj i industrijskoj praksi. Rješenja za održivi razvoj može ponuditi zelena kemija (Kudlak i sur. 2015). Općenito, cilj zelene kemije je pronalaženje, dizajniranje i primjena kemijskih proizvoda i procesa kako bi se postiglo smanjenje ili eliminacija uporabe i tvorbe opasnih supstanci, uz istovremeno povećanje iskorištenja procesa (Kudlak i sur. 2015; Chemat i sur., 2012). Kao sve važnije polje zelene kemije ističe se zelena ekstrakcija (Chemat i sur., 2012).

Danas u mnogim granama industrije gotovo ne postoji proizvodni proces koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije prirodnih produkata (Chemat i sur., 2012). Konvencionalni procesi ekstrakcije u industrijskom mjerilu imaju velike nedostatke kao što su nepotpuno iskorištenje ekstrakta, uporaba iznimno velike količine organskih otapala te visoka potrošnja energije uzrokovana izrazito dugim vremenom ekstrakcije i intenzivnim zagrijavanjem i/ili miješanje tijekom ekstrakcije (Rombaut i sur., 2014; Chemat i sur., 2012). Uz to, širok raspon polarosti i fizikalnih svojstava prirodnih spojeva u sirovinama čini postupak ekstrakcije pomoću organskih otapala u samo jednom koraku gotovo nemogućim (Dai i sur., 2013). Procjenjuje se da otapala koja se koriste tijekom ovakvih procesa ekstrakcije čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih hlapljivih organskih emisija tvari u cijelom svijetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Stoga je cilj zelene kemije zamjena tradicionalnih metoda ekstrakcije zelenom ekstrakcijom.

Definicija zelene ekstrakcije je sljedeća: „Zelena ekstrakcija se temelji na pronalaženju i dizajniranju ekstrakcijskih procesa koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti uporabu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati visokokvalitetan i siguran

ekstrakt, odnosno proizvod. Poznata su tri glavna rješenja za dizajniranje i vođenje laboratorijskih i industrijskih procesa zelene ekstrakcije, kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije, a to su:

1. poboljšanje i optimizacija postojećih procesa,
2. inovacije u procesima i postupcima i
3. inovacije u otkrivanju novih otapala.

S ciljem da se tradicionalni postupci ekstrakcije zamjene zelenom ekstrakcijom u sve većem broju industrijskih postrojenja, osmišljeno je šest principa zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda koji su prihvaćeni kao smjernice za industrijsku uspostavu zelene ekstrakcije. Ovi principi navedeni su u **tablici 1** (Chemat i sur., 2012).

Tablica 1. Šest principa zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2012).

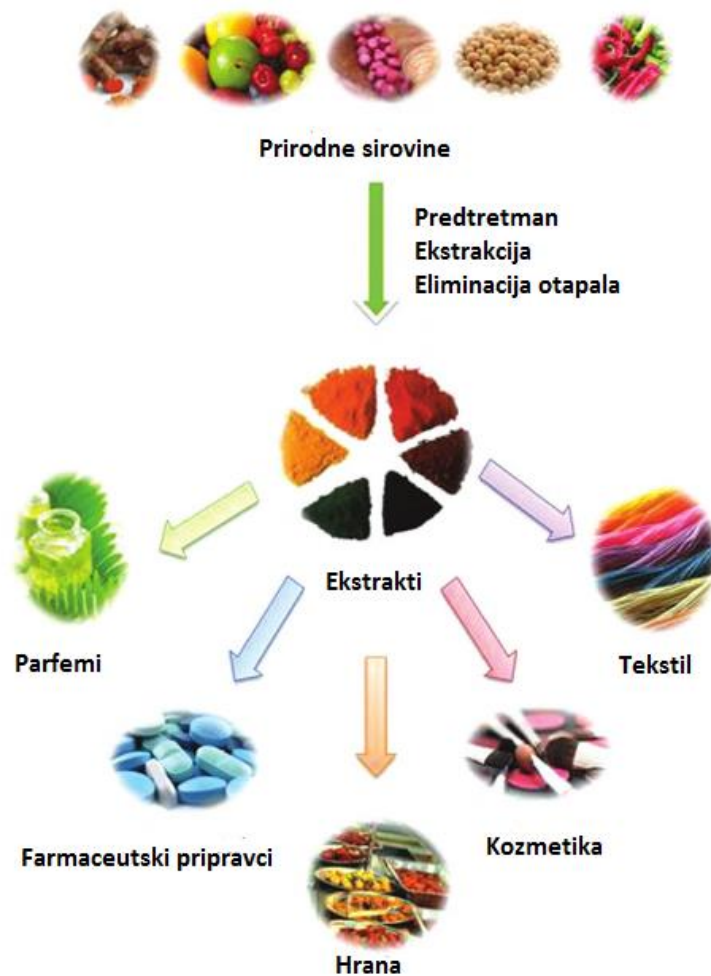
Princip	Opis
1. Pronalazak novih izvora biljnih materijala i uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala	Kod zelene ekstrakcije, poželjna je uporaba potpuno obnovljivih izvora kojima je omogućen intenzivan <i>in vivo</i> ili <i>in vitro</i> uzgoj.
2. Uporaba alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora	Izbor odgovarajućeg otapala temelji se na sigurnosti radnika i procesa, zaštiti okoliša te održivosti procesa, što znači da bi zelena otapala trebala biti kemijski i fizikalno stabilna, niske hlapljivosti, laka za uporabu i jednostavna za reciklaciju. Stoga su u obzir kao zelena otapala uzeti voda, superkritični fluidi (CO ₂ i voda), otapala na bazi organskih soli (ionske tekućine i eutektička otapala) i otapala iz prirodnih izvora (npr. etanol, glicerol, metil esteri masnih kiselina, biljnih ulja, terpeni).
3. Smanjenje potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija	Značajno smanjenje potrošnje energije optimizacijom postojećih procesa, ponovnom uporabom energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, te uporabom potpuno inovativnog izvora energije (npr. upotreba topline oslobođene tijekom kondenzacije para; upotreba pulsirajućeg električnog polja, aktivacija mikrovalovima i/ili ultrazvukom)
4. Proizvodnja nusprodukata umjesto otpada kako bi se obuhvatila bio- i agro-industrija prerade	Ovo je nova zelena strategija u proizvodnji kojom bi se proizvodio niz ciljanih produkata iz određenog izvora, za razliku od tradicionalnog pristupa koji je dizajniran tako da se dobije samo jedan proizvod.
5. Smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa	Kako bi bila konkurentna, industrija koja koristi ekstrakciju prirodnih produkata (industrija parfema, kozmetike, lijekova, hrane i biogoriva) mora poboljšati svoje procese s čistim i sigurnijim protokolom ekstrakcije (integriranje proizvodne jedinice i smanjen broj operacija, štednja energije i sirovina, kontrola sigurnosti procesa, smanjenje otpada i učinka na okoliš).
6. Usmjerenje k proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata	Kako bi se zadovoljili zahtjevi tržišta i propisi, ekstrakt mora zadovoljiti niz kriterija kvalitete; suprotno popularnom mišljenju, „prirodno“ porijeklo ekstrakta nije jamstvo njegove neškodljivosti za čovjeka i okoliš. Ekstrakti moraju biti dobiveni iz precizno identificiranih sirovina; moraju imati točna fizikalno-kemijska svojstva i moraju biti propisno skladišteni; ekstrakt ne bi smio sadržavati onečišćivača kao što su ostaci pesticida, teški metali i mikotoksini.

Gotovo svi gore navedeni principi korišteni su tijekom izrade ovog rada te će detaljnije biti opisani u sljedećim poglavljima.

1.1.1. Obnovljivi izvori sirovina

Znanstveni dokazi o fiziološkim, nutritivnim i ljekovitim svojstvima prirodnih produkata na ljudsko zdravlje, kao i otkrića o mogućim štetnim učincima primjene sintetičkih proizvoda, doveli su do značajnog porasta potrošnje prirodnih sirovina. Ekstrakti iz prirodnih izvora

imaju značajnu ulogu kao dodaci proizvodima ili sami proizvodi industrije hrane, kozmetike, tekstila, parfema i lijekova (**slika 1**).



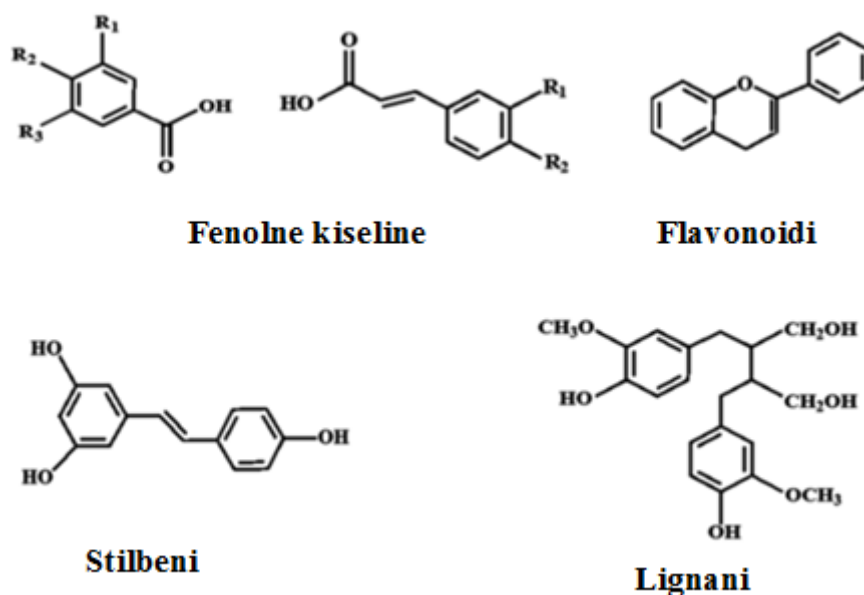
Slika 1. Primjena ekstrakata iz prirodnih izvora (Cavalcanti i sur., 2013).

Ekstrakcija prirodnih komponenti najčešće se povezuje s ekstrakcijom biološki aktivnih spojeva. Biološki aktivni spojevi nisu definirani kao esencijani nutrijenti, ali mogu biti uvelike korisni za ljudsko zdravlje (Cavalcanti i sur., 2013). Međutim, sve veća potražnja za takvim prirodnim proizvodima i ekstraktima dovodi do prekomjerne eksploatacije prirodnih biljnih resursa. Stoga je u svezi sa zelenom ekstrakcijom, prema prvom principu zelene ekstrakcije, potrebno koristiti u potpunosti obnovljive sirovine. Isto tako, četvrti princip zelene ekstrakcije ističe potrebu uporabe otpada iz industrije kao izvora različitih prirodnih komponenti (Chemat i sur., 2012). Prema ova dva principa zelene ekstrakcije, kao sirovina za ekstrakciju prirodnih komponenti u ovom radu korištena je komina grožđa – otpad iz industrije vina.

1.1.1.1. Komina grožđa kao izvor biološki aktivnih spojeva

Proizvodnja vina ima veliku agroekonomsku važnost. Proizvodnja grožđa u svijetu u 2012. godini premašila je 69 tona te je Europa bila najveći proizvođač vina s 66 % ukupne svjetske proizvodnje. Čvrsti otpad nastao nakon proizvodnje vina čini 25 – 30 % materijala korištenog tijekom proizvodnje vina, a sastoji se uglavnom od komine grožđa. Komina grožđa sadrži sjemenke, pulpu, stabljiku i kožicu (Otero-Pareja i sur., 2015). Dakle, ovaj nusproizvod sastoji se od vode, proteina, lipida, ugljikohidrata, vitamina, minerala te komponenata koje imaju biološku aktivnost kao što su vlakna, vitamin C te polifenolni spojevi (Sousa i sur., 2014). Najvažnije biološki aktivne komponente sadržane u grožđu su zasigurno polifenolni spojevi zbog njihovog pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi (Xia i sur., 2010).

Polifenolini spojevi su raznolika grupa aromatskih sekundarnih biljnih metabolita koji su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Polifenolni spojevi se mogu podijeliti u različite grupe ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže te na temelju strukturnih elemenata koji međusobno povezuju fenolne prstenove. Glavne grupe spojeva su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani. Kemijske strukture navedenih grupa prikazane su na **slici 2** (Cavalcanti i sur., 2013).

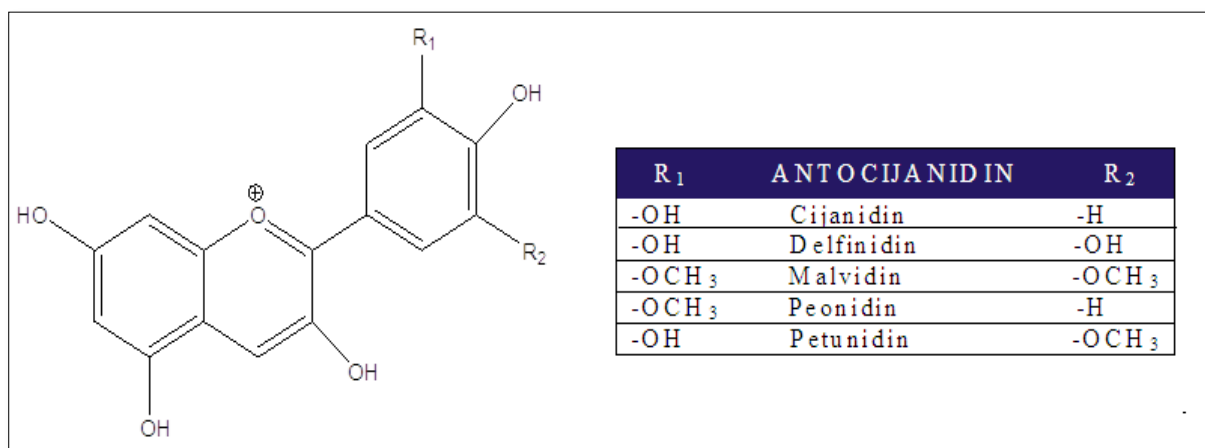


Slika 2. Kemijske strukture grupa polifenolnih spojeva (Pandey i Rizvi, 2009).

Polifenolni spojevi su prisutni u gotovo svim biljnim namirnicama, međutim pojedine namirnice kao što su grožđe, jabuka, borovnica i brusnica su izuzetno bogate ovim bioaktivnim spojevima (Yu i Ahmedna, 2012). Udio i sastav polifenolnih spojeva u grožđu,

pa tako i u komini grožđa, ovisi o vrsti, sorti, godišnjem dobu, te o uvjetima uzgoja i okolišu kao što su klimatski uvjeti, sastav tla i količini usjeva, a naposljetku ovisi i o uvjetima prerade grožđa (Ramirez-Lopez i DeWitt, 2014; Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Čak više od 70 % polifenolnih spojeva sadržanih u grožđu zaostaje u komini grožđa (Georgijev i sur., 2014). Komina grožđa je vrlo bogat izvor flavonoida, katehina, procijanidina, flavonol glikozida, fenolnih kiselina i stilbena. Kožica grožđa u grožđanoj komini izvor je antocijana, hidroksicimetne kiseline, flavanola i flavonol glikozida, dok su sjemenke najčešće izvor galne kiseline i flavanola (Yu i Ahmedna, 2012). Polifenolni spojevi su vrlo važni u tehnologiji crnih vina jer utječu na boju vina i daju karakterističan okus vinu (Jackson, 2008).

Posljednjih nekoliko godina antocijani i proantocijanidin privlače veliku pažnju jer imaju važnu ulogu u senzorskim svojstvima i nutritivnim vrijednostima bobice grožđa i vina (Zhu i sur., 2012), ali i zbog pozitivnog utjecaja u borbi protiv kardiovaskularnih bolesti te brojnih bioloških učinaka (Kruger i sur., 2014). Antocijani su glavne komponente crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata kod većine latica cvijeća, voća i povrća te nekih vrsta žitarica (Tsao, 2010). Pripadaju skupini flavanoida (Li i sur., 2012). Temeljnu strukturu antocijana čini 2-benzil-1-benzopirilium kation čiji su 3', 5', 7' i 4' položaji hidroksilirani. Kemijska struktura im ovisi o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena, te o glikozilaciji različitim šećerima (Tsao i McCallum, 2009). U biljkama se nalaze najčešće u glikoziliranom obliku kojeg čine antocijanidin (aglikon) i šećer (Anderson i Jordheim, 2006). Najčešće identificirani antocijani u komini grožđa su 3-*O*-monoglukozi i 3-*O*-acilirani monoglukozi sastavljeni od 5 najčešćih antocijanidina: delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin (**slika 3**), a najzastupljeniji je malvidin-3-*O*-monoglukoze (Revilla i sur., 2001).



Slika 3. Kemijska struktura antocijana prisutnih u grožđu (Tsao i McCallum, 2010).

Tanini ili proantocijanidini nastaju polimerizacijom flavonola. Tipični flavan-3-oli u grožđu su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat i (-)-epigalokatehin (Jackson, 2008). Tanini su značajni u tehnologiji vina jer utječu na organoleptička svojstva vina tako što pridonose trpkoci i gorčini vina. Molekulska masa tanina je povezana sa trpkocom jer tanini veće molekulske mase više pridonose trpkoci dok mehanizmi povezanosti veličine molekula i gorčine još uvijek nisu u potpunosti istraženi (Gawel, 1998). Također, imaju ulogu u dugoročnoj stabilnosti boje vina jer ulaze u reakcije sa antocijanima kao što su primjerice kopigmentacija ili kondenzacija (Somers, 1971).

U grožđu se iz skupine flavonoida, osim već spomenutih flavan-3-ola i antocijana, mogu nalaziti i flavonoli. Najvažniji flavanoli su: kvercetin, kamferol, miricetin, i sirigentini (Zhu i sur., 2012).

Dokazano je da su polifenolni spojevi iznimno dobri antioksidansi – mogu neutralizirati utjecaj reaktivnih vrsta kisika proizvedenih u tijelu tijekom metaboličkih procesa. Nadalje, epidemiološka istraživanja pokazala su da polifenolni spojevi osiguravaju zaštitu od razvoja nekoliko kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularna oboljenja, rak, dijabetes, astma i mnogih ostalih (**slika 4**) (Pandey i Rizvi, 2009). Veliki napredak je postignut u istraživanjima ekstrakcije, analize i ispitivanja biološke aktivnosti polifenolnih spojeva iz grožđa. Polifenolni spojevi grožđa imaju značajan biološki utjecaj te im se pripisuju antitumorska, protuupalna, antioksidativna, antimikrobna, antivirusna, kardio- i neuroprotektivna svojstva. Zato prisutnost polifenolnih spojeva u velikim koncentracijama u komini grožđa može poslužiti kao novi potencijalni izvor nutritivno visokovrijednih spojeva i funkcionalne hrane (Nile i sur, 2013).



Slika 4. Pozitivni učinci polifenolnih spojeva na zdravlje (Pandey i Rizvi, 2009).

Jedni od najvažnijih i trenutno najpopularnijih polifenolnih spojeva su antocijani zbog njihove visoke antioksidativne vrijednosti i drugih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava (Li i sur., 2012). Zbog toga su u ovom radu ekstrahirani upravo antocijani.

1.1.2. Alternativna otapala

Kao što je već navedeno, gotovo svaki industrijski procesi proizvodnje zahtijeva neku vrstu ekstrakcije prilikom koje se primjenjuju velike količine organskih otapala. Većina organskih otapala je zapaljiva, hlapljiva, a često i toksična te odgovorna za onečišćenje okoliša i efekt staklenika. Dakle, prema drugom principu zelene ekstrakcije, iz sigurnosnih, ekonomskih i ekoloških aspekata, potrebna je zamjena organskih otapala zelenim otapalima. U **tablici 2** nalazi se prikaz alternativnih otapala za zelenu ekstrakciju.

Tablica 2. Alternativna otapala za zelenu ekstrakciju (Chemat i sur., 2012).

Otapalo	Tehnike ekstrakcije (primjena)	Učinkovitost ekstrakcije			Zdravlje i sigurnost	Cijena	Ekološki otisak
		Polarni spojevi	Slabo-polarni spojevi	Nepolarni spojevi			
Bez upotrebe otapala	Mikrovalna ekstrakcija (antioksidansi, esencijalna ulja)	+++	+		+++	+	+++
	Pulsirajuće električno polje (antioksidansi, pigmenti)	+++	+		+++	+	+++
Voda	Destilacija (esencijalna ulja)	++	+		+	++	+
	Destilacija potpomognuta mikrovalovima (esencijalna ulja)	+++	+++	+	+	+	++
	Ekstrakcija superkritičnom vodom (arome)	+	++		+	+	+
CO₂	Ekstrakcija superkritičnim fluidom (dekafeinizacija čaja i kave)	-	+	+++	+	+	+
Ionske tekućine	Amonijeve soli (artemizinin)	-	+	+++	-	-	++
Otapala iz prirodnih izvora	Etanol (pigmenti i antioksidansi)	+	+	-	-	++	+
	Glicerol (polifenolni spojevi)	+	+	-	-	+	+
	Terpeni kao što je <i>d</i> -limonen (ulja i masti)	-	-	++	-	+	+
	Prirodna eutektička otapala (biološki aktivni spojevi)	+++	+	-	+++	++	+++
Petrokemijska otapala	<i>n</i> -heksan (ulja i masti)	-	+	+++	---	++	---

Među zelenim otapalima, otapala iz prirodnih izvora imaju važnu ulogu u zamjeni petrokemijskih otapala. Proizvode se iz sirovina kao što su drvo, škrob, biljna ulja ili voće. Imaju visoku moć otapanja, biorazgradiva su, netoksična i nezapaljiva. Nedostaci ovih otapala su cijena, visoka viskoznost i visoko vrelište. Najčešće korišteno otapalo iz prirodnog izvora je etanol, koji se dobiva fermentacijom materijala bogatih šećerom. Često se koristi u industriji zbog njegove dostupnosti, niske cijene i biorazgradivosti. Međutim, njegove mane su hlapljivost i zapaljivost. Osim ovih otapala, pozornost privlači i voda, koja se može

koristiti u ekstrakciji komponenata topljivih u vodi, kao npr. proteini, šećeri i organske kiseline, te superkritični CO₂. Isto tako, razvijene su i metode ekstrakcije kod kojih se ne upotrebljavaju otapala (Chemat i sur., 2012).

Nadalje, veliku pozornost privlače i ionske tekućine (Paiva i sur., 2014). Ionske tekućine su organske soli s vrlo niskim talištem (ispod 100 °C) (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Veliki potencijal ovih otapala proizlazi iz njihovih posebnih karakteristika, odnosno fizikalno-kemijskih svojstava koja se mogu dizajnirati uporabom različitih aniona i kationa, zbog čega bi se ova otapala mogla upotrebljavati u različitim granama industrije za ekstrakciju različitih spojeva. Međutim, iako posjeduju neke od karakteristika zelenih otapala (nezapaljivost, nehlapljivost, mogućnost reciklacije), u posljednje vrijeme, njihov zeleni karakter je upitan zbog toksičnosti i male biorazgradivosti (Radošević i sur., 2015; Paiva i sur., 2014). Kao alternativa ionskim tekućinama, pronađena su eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES), koja su po svojstvima slična ionskim tekućinama, međutim mnogo prihvatljivija za okoliš. DES-ovi udovoljavaju gotovo svim zahtjevima zelene kemije (**slika 5**) (Paiva i sur., 2014; Kudlak i sur., 2015).

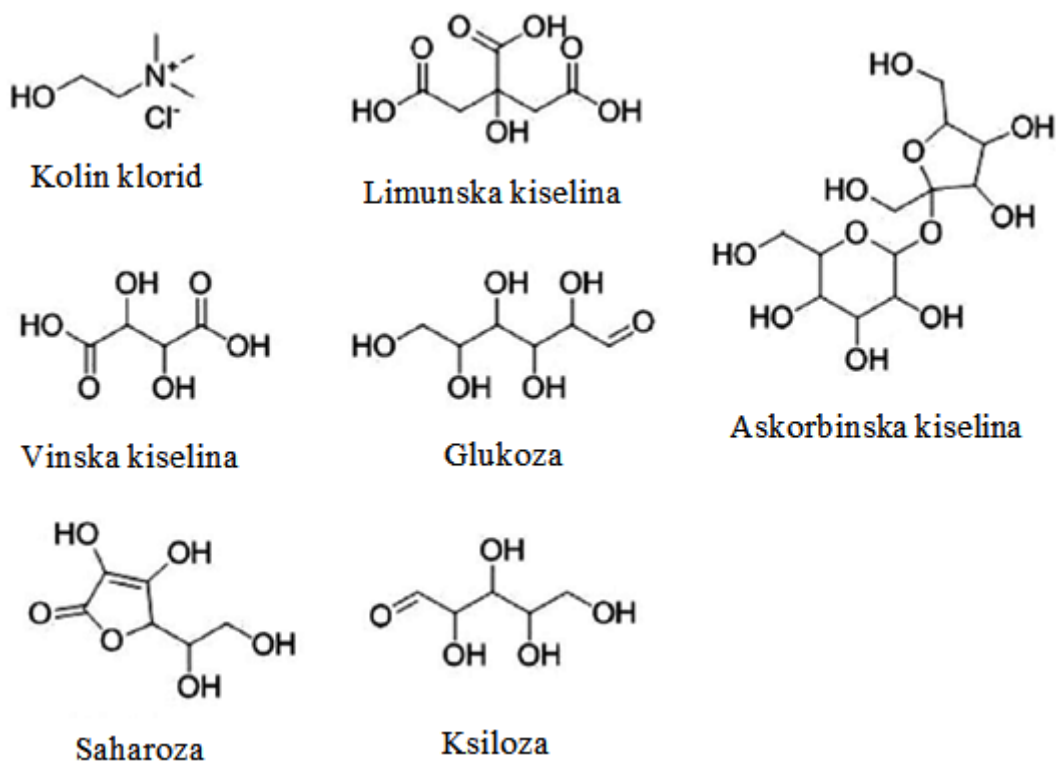


Slika 5. Karakteristike otapala prema zahtjevima zelene kemije i životni ciklus DES-a (Kudlak i sur., 2015).

1.1.2.1. Eutektička otapala

DES-ovi se nazivaju otapalima 21. stoljeća. Uglavnom su to smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće kvaterne amonijeve soli) i donora vodika (npr. amini, šećeri, alkoholi, karboksilne kiseline) koji se međusobno vežu vodikovim vezama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Za pripremu DES-a najčešće se kao donor vodika koristi kolin klorid (Ch), jeftina, biorazgradiva i netoksična kvaterna amonijeva sol, koju je odobrila Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) kao dodatak prehrani bez vremenskog ograničenja (70/524/EEC8) (Radošević i sur., 2015). Talište DES-a je znatno niže od tališta njegovih pojedinačnih ishodišnih komponenti. Općenito, DES-ovi koji se sastoje od kvaternih amonijevih soli (npr. Ch) imaju najniže talište, i to u rasponu od 23 do 25 °C. Delokalizacija naboja koja se javlja miješanjem donora i akceptora vodika dovodi do sniženja tališta, odnosno svojstva eutekličnosti (Radošević i sur., 2015).

Ukoliko se za DES koriste ishodišne sirovine prirodnog porijekla, takvi se DES-ovi nazivaju prirodnim eutekličkim otapalima (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Komponente od kojih se sastoje NADES-ovi su primarni metaboliti, kao što su organske kiseline, aminokiseline i šećeri. Na **slici 6** prikazane su strukture nekoliko spojeva koji se mogu upotrijebiti u pripremi NADES-a (Paiva i sur., 2014).



Slika 6. Strukture nekoliko spojeva koji ulaze u sastav NADES-a (Paiva i sur., 2014).

Ova su otapala, zbog velikog broja komponenti iz kojih se mogu sintetizirati, vrlo raznolika po pitanju fizikalno-kemijskih svojstava. Biorazgradiva su i netoksična (Kudlak i sur., 2015). NADES-ovi zadovoljavaju principe zelene ekstrakcije te se zbog toga, kao i zbog svojih iznimno dobrih fizikalno-kemijskih svojstava, smatraju obećavajućim otapalima za zelene ekstrakcije (Kudlak i sur., 2015).

NADES-ovi se mogu nazvati i „dizajniranim otapalima“ – prilikom sinteze NADES-a moguće je prilagoditi njegova fizikalno-kemijska svojstva ovisno o ekstrakcijskom procesu. Poznato je da fizikalno-kemijska svojstva poput polarnosti, površinske napetosti, viskoznosti, gustoće i dr. imaju značajan utjecaj na proces ekstrakcije, stoga je mogućnost modifikacije fizikalno-kemijskih svojstava otapala jedan od presudnih čimbenika za izbor otapala za ekstrakciju (Tang i sur., 2014). Moguće je podešavanje polarnosti NADES-a što ova otapala čini univerzalnim otapalima za ekstrakciju različitih skupina prirodnih spojeva, polarnih i nepolarnih. NADES-ovi općenito imaju visoku viskoznost koja može dovesti do usporenog prijenosa mase i niskog iskorištenja ekstrakcije. Međutim, njihova viskoznost može se smanjiti dodatkom odgovarajuće količine vode. No, kad udio vode prijeđe 50 % gubi se struktura NADES-a zbog slabljenja veza između komponenta koje ga čine, te se takvo otapalo ne može smatrati NADES-om (Dai i sur., 2015). Na fizikalno-kemijska svojstva kao što su gustoća i viskoznost može se utjecati i promjenom temperature. Povećanje temperature dovodi do veće molekularne aktivnosti i pokretljivosti što povećava molarni volumen otopine i uzrokuje linearno smanjenje gustoće. Uz sve navedeno, potrebno je spomenuti da je glavna značajka NADES-ova kao najboljih ekstrakcijskih otapala njihova sposobnost da doniraju i primaju protone i elektrone zbog čega lako mogu formirati vodikove i π - π veze među molekulama (Hayyan i sur., 2012).

1.1.3. Alternativni izvori i ušteda energije

Klasični postupci ekstrakcije zahtijevaju, kao što je već spomenuto, veliki utrošak energije. Stoga je prema trećem principu zelene ekstrakcije nužno pronaći metode koje bi smanjile utrošak energije, skratile vrijeme ekstrakcije, imale manji utjecaj na okoliš, bile sigurne i jeftine, te uz to i povećale iskorištenje ekstrakcije (Chemat i sur., 2012; Cravotto i Cintas, 2007). Postoje tri načina smanjivanja utroška energije, a to su:

- optimizacija postojećih procesa,
- iskorištavanje energije oslobođene tijekom samog procesa ekstrakcije i

- provođenje potpuno novih procesa uz primjenu inovativnih tehnologija (Chemat i sur., 2012).

U ovom radu primjenjena je inovativna zelena tehnologija ekstrakcije – ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem. Također, kako bi se smanjio utrošak sirovina, otapala i energije, prije postavljanja laboratorijskih procesa, provedeno je optimiranje procesnih parametara metodom odzivnih površina.

1.1.3.1. Ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem

Ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem uključuje djelovanje mikrovalnog zračenja i ultrazvuka, dvije najvažnije zelene tehnike ekstrakcije koje osiguravaju skraćanje vremena ekstrakcije te povećani prinos u odnosu na konvencionalne metode i time dovode do uštede energije (Cravotto i Cintas, 2007).

Mikrovalovi su neionizirani elektromagnetski valovi i obuhvaćaju frekvencije od 300 MHz do 300 GHz. Koriste se prilikom ekstrakcije kod materijala koji su sposobni primljenu energiju elektromagnetskog zračenja djelomično prevesti u toplinu. Za razliku od konvencionalnog zagrijavanja koje sa temelji na kondukciji i konvekciji, pri čemu dolazi do velikog gubitka topline u okoliš, zagrijavanje korištenjem mikrovalnog zračenja je selektivno i ciljano te se zbog toga topline iz sustava gotovo ne gubi (Mandal i sur., 2007). Zagrijavanje se vrši preko dielektričnog mehanizma koji može uključivati ionsku vodljivost i dipolnu polarizaciju (Cravotto i Cintas, 2007). Stoga je vidljivo da se na ovaj način mogu zagrijavati samo materijali i otapala s ionima i trajnim dipolima (Mandal i sur., 2007).

Ultrazvuk, kao i mikrovalovi, uzrokuje zagrijavanje materije, ali prema drugačijem mehanizmu. Učinak ultrazvuka proizlazi iz jedinstvenog fenomena kavitacije. Kavitacija se sastoji u formiranju, rastu i pucanju mjehurića mikrometarske veličine, koji se generiraju zbog sniženja tlaka na kritičnu vrijednost. Implozija mjehurića dovodi do ekstremnih uvjeta – lokalne temperature od nekoliko tisuća kelvina i tlaka od nekoliko stotina atmosfera, praćenih udarnim valovima izrazito kratkog trajanja (Cravotto i Cintas, 2007). Ovaj efekt osim zagrijavanja, osigurava i dovoljno energije za razbijanje stanične stijenke materijala čime se u otapalo otpušta stanični sadržaj.

Provođenjem ekstrakcije potpomognute istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem odnosno, spajanjem mikrovalnog zračenja, koje dovodi do izrazito brzog zagrijavanja, i ultrazvuka, koji omogućava kavitaciju, skraćuje se vrijeme ekstrakcije, troši se

manje otapala, te se posljedično povećava prinos, u odnosu na pojedinačno korištenje mikrovalova i ultrazvuka (Mason i sur., 2011). Pošto ova metoda ekstrakcije zbog svoje prirode zahtijeva korištenje otapala koji sadrže ione i trajne dipole, mogu se koristiti npr. ionske tekućine i njima slična otapala kao što su NADES-ovi (Cravotto i Cintas, 2007).

1.1.3.2. Optimizacija procesnih uvjeta metodom odzivnih površina

Optimizacija općenito podrazumijeva postupak određivanja najboljeg rješenja za određeni proces ili sustav čime dolazi do poboljšanja prinosa (odziva) sustava ili procesa. Općenito se eksperimenti provode na način da je jedan faktor promjenjiv, a ostali faktori ostaju nepromijenjeni. Ova metoda se naziva jedna varijabla u vremenu (engl. *One variable at time*, OVAT). Vremenski je zahtjevnija (jer se svaka varijabla mora pratiti zasebno) i potreban je veliki broj eksperimenata, što dovodi do velikih troškova. Osim toga OVAT ne uključuje interakcije između odabranih parametara.

Danas su zbog svega navedenog sve više u uporabi multivarijantne statističke tehnike, koje omogućavaju značajno smanjenje broja pokusa i u obzir uzimaju interakcije ispitivanih parametara procesa. Jedna od tih tehnika je i metoda odzivnih površina (engl. *Response surface methodology*, RSM). RSM je skup matematičkih tehnika koje opisuju odnos između više nezavisnih varijabli i jednog ili više odziva sustava, a razvili su je Box i Wilson (1951) te od tada ima široku primjenu u dizajniranju eksperimenata. Temelji se na poklapanju matematičkog modela s eksperimentalnim rezultatima dobivenim iz dizajniranih eksperimenata, te na verifikaciji modela pomoću statističkih tehnika (Witek-Krowiak i sur., 2014).

Općenito, odziv sustava kod RSM može se opisati pomoću sljedeće jednadžbe:

$$y = f'(x)\beta + \epsilon \quad [1]$$

gdje je y odziv sustava, x varijabla, $f'(x)$ vektorska funkcija p elemenata i sadrži međusobnu ovisnost varijabli x_1, x_2, \dots, x_k do određenog stupnja d ($d \geq 1$), β vektor p konstantnih koeficijenata za određene parametre, ϵ slučajna eksperimentalna pogreška.

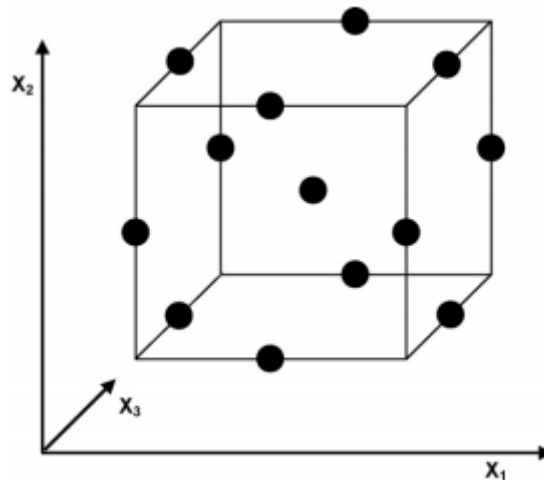
Dva modela koja se najčešće koriste su model prvog reda ($d = 1$),

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \epsilon \quad [2]$$

i model drugog reda ($d > 1$)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \epsilon. \quad [3]$$

Model drugog reda koristi se ako se eksperimentalni podaci ne mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Najčešće primjenjivani model drugog reda, koji je primijenjen i prilikom izrade ovog rada, je Box-Behnken dizajn (engl. *Box-Behnken design*, BBD) (Khuri i Mukhopadhyay, 2010). BBD se koristi u slučaju kada se svaki faktor ili nezavisna varijabla nalaze na jednoj od tri razmaknutih vrijednosti (u programu kodiranih kao -1, 0 i +1). Dizajn bi trebao zadovoljiti kvadratni model što znači da sadrži kvadirane uvjete, produkte dva faktora, linearne uvijete i presjecište. Ovaj kvadratni model prikazan je na **slici 7**.



Slika 7. BBD kvadratni model (Ferreira i sur., 2007).

Broj pokusa (N) potrebnih za razvoj BBD definiran je kao:

$$N = 2k * (k - 1) + C_0 \quad [4]$$

gdje je k broj faktora i C_0 je središnja točka. BBD ne sadrži kombinacije u kojima su faktori na najvišoj ili najnižoj razini tj. nema mogućnosti da se eksperimenti izvode u ekstremnim uvjetima. Vertikale „kocke“ su zanemarene jer se pretpostavlja da odziv na krajnjim točkama sustava ne zadovoljava. Zbog mogućnosti procjene parametara kvadratnog modela, otkrivanja odstupanja modela od eksperimentalnih podataka i mogućnosti izrade sekvencijskih modela, BBD je općenito dobar model za RSM (Ferreira i sur., 2007).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Općenito, cilj ovoga rada bio je predstavljanje efikasne i zelene metode ekstrakcije antocijana iz nusprodukta vinske industrije, komine grožđa sorte Plavac mali, potpomognute inovativnim izvorom energije – istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem, uz uporabu alternativnog, ekološki prihvatljivog zelenog otapala – prirodnog eutektičkog otapala kolin klorid:limunske kiseline.

U ovom radu, naglasak je stavljen na optimizaciju procesnih parametara ove inovativne metode ekstrakcije. Nadalje, ova metoda ekstrakcije antocijana iz komine grožđa uspoređena je s ekstrakcijom antocijana iz komine grožđa potpomognutom istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem uporabom konvencionalnog otapala zakiseljenog etanola. Također, provedena je i izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću ekstrakcije prirodnim eutektičkim otapalom kolin klorid:limunska kiselina na Amberlite XAD-7HP smoli, kao i reciklacija prirodnog eutektičkog otapala kolin klorid:limunska kiselina kako bi se pokazao industrijski potencijal ove tehnologije.

Rezultati ovog istraživanja mogu dati smjernice i biti korišteni u istraživanju primjene drugih nusproizvoda poljoprivredne i prerađivačke industrije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Komina grožda

U eksperimentu je korištena liofilizirana i mehanički usitnjena komina grožda sorte Plavac mali (berba 2012. godine).

3.1.2. Kemikalije

- Amberlite XAD-7HP, Sigma Aldrich, Francuska
- Acetonitrile, J.T. Baker, Nizozemska
- Destilirana voda, PBF, RH
- Deionizirana voda, J.T. Baker, Nizozemska
- Klorovodična kiselina, Kemika, RH
- Kolin klorid ($\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, SAD
- Limunska kiselina, Gram-mol d.o.o., RH
- Mravlja kiselina (98-100%), T.T.T., RH
- 96% etanol, Kefo, Slovenija

Sve kemikalije korištene u eksperimentu bile su analitičke čistoće.

3.1.3. Laboratorijska oprema

- HPLC 1200 Series sustav s binarnom pumpom, autosamplerom, DAD detektorom, Agilent Technologies, SAD
- Centrifuga D-78532, Hettich Zentrifugen, Njemačka
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Magnetska miješalica s grijačem, MM-510, Technica Železnik, Slovenija
- Ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor, MW-ER-01, Lab-Kits, Hong Kong
- Rotacioni-vakuum uparivač, B-485, Buchi Oilbath, Švicarska
- Vakuum uparivač, AS 1000- Automatic environmental SpeedVac, Savant, SAD

3.2. Metode rada

3.2.1. Sinteza prirodnog eutektičkog otapala

Sve kemikalije za sintezu NADES-a korištene su bez prethodnog pročišćavanja, a njihova odvaga se provodila na analitičkoj vagi. NADES kolin klorid:limunska kiselina (ChCit) u molarnom omjeru 2:1, pripravljeno je s 3 različita masena udjela vode (10 %, 30 %, 50 % (w/w)).

Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom tako da se pomiješaju odvagane mase kolin klorida i limunske kiseline, s određenim volumenom vode kako bi se dobio odgovarajući maseni udio vode. Tikvica sa smjesom komponenata NADES-a stavljena je zatim na elektromagnetsku miješalicu s grijačem. Reakcijska smjesa se zagrijava 2 sata na temperaturi od 50 °C uz neprestano miješanje. Reakcija je gotova kada se dobije bistri, tekući NADES.

3.2.2. Optimizacija ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru

Provedena je ekstrakcija antocijana iz komine grožđa s prethodno pripremljenim NADES-ovima ChCit koji su sadržavali različite udjele vode, potpomognuta ultrazvukom i mikrovalnim zračenjem. U 10 mL NADES-a dodana je odvagana masa od 0,3 g liofilizirane i usitnjene komine grožđa, čime je dobivena masena koncentracija uzorka od 30 mg mL⁻¹. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru (**slika 8**), prema planu pokusa dobivenom matematičkim modelom u programu Design Expert 10.0.3. (opisanom u poglavlju 3.2.2.1.), pri postavljenoj temperaturi od 120 °C i snazi ultrazvuka od 50 W (40 KHz), uz promjenu snage mikrovalnog zračenja (od 100 do 300 W), masenog udjela vode u NADES-u (od 10 do 50 %) i trajanja procesa ekstrakcije (od 600 do 900 s). Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt se centrifugira 20 min na 6000 *o* min⁻¹ kako bi se uklonio talog komine grožđa. Zatim se supernat oddekantira u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake istim NADES-om korištenim za ekstrakciju. Dodatno uklanjanje krutog ostatka u ekstraktu vrši se vakuum-filtracijom uz uporabu mikrofiltera veličine pora 0,45 μm. Pripremljeni ekstrakti spremaju se u hladnjak do daljnje analize.



Slika 8. Ultrazvučno-mikrovalni reaktor (vlastita fotografija).

3.2.2.1. Plan pokusa za optimiranje ekstrakcije antocijana pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstratoru i obrada podataka metodom odzivnih površina

U ovom radu Box-Behnkenov plan pokusa korišten je za procjenu utjecaja glavnih procesnih parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem (snaga mikrovalnog zračenja, udio vode u NADES-u i vrijeme ekstrakcije) i njihove interakcije na ekstraktibilnost antocijana komine grožđa (**tablica 3**). Ispitivane varijable su prevedene u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{max} + x_{min})}{2}}{\frac{(x_{max} - x_{min})}{2}} \quad [5]$$

Tablica 3. Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za određivanje ukupnih antocijana ekstrakata komine grožđa

Faktor	Donja aksijalna razina	Centralna razina	Gornja razina
Kodirane varijable	-1	0	1
Snaga mikrovalova (X_1, W)	100	200	300
Vrijeme (X_2, s)	600	750	900
Postotak NADES-a ($X_3, \%$)	50	70	90

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 15 eksperimenata ekstrakcije sa tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja. Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad [6]$$

gdje su :

Y - modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} -koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti).

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatran proces. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametra na promatrane procese, te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametra, provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 10.0.3..

3.2.3. Optimizacija ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru

Provedena je ekstrakcija antocijana iz komine grožđa s prethodno pripremljenim zakiseljenim etanolom koji je sadržavao različite volumne udjele vode i klorovodične kiseline, potpomognuta ultrazvukom i mikrovalnim zračenjem. U 100 mL zakiseljenog etanola dodana je odvagana masa od 3 g liofilizirane i usitnjene komine grožđa, čime je dobivena masena koncentracija uzorka od 30 mg mL⁻¹. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru, prema planu pokusa dobivenom matematičkim modelom u programu Design Expert 10.0.3. (opisanom u poglavlju 3.2.3.1.), pri postavljenoj temperaturi od 120 °C i snazi ultrazvučnih valova od 50 W (40 KHz) uz promjenu snage mikrovalnog zračenja (od 100 do 200 W), postotak etanola (od 40 do 80 %), udjela klorovodične kiseline u etanolu (od 0,1 do 0,8 %) i trajanja procesa ekstrakcije (od 600 do 900 s). Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt se centrifugira 20 min na 6000 *o* min⁻¹ kako bi se uklonio talog komine grožđa. Zatim se supernatant oddekanira u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake istim otapalom korištenim za ekstrakciju. Dodatno uklanjanje krutog ostatka u ekstraktu vrši se vakuum-filtracijom uz uporabu mikrofiltera veličine pora 0,45 μm. Pripremljeni ekstrakti spremaju se u hladnjak do daljnje analize.

3.2.3.1. Plan pokusa za optimiranje ekstrakcije antocijana pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru i obrada podataka metodom odzivnih površina

U ovom radu Box-Behnkenov plan pokusa korišten je za procjenu utjecaja glavnih procesnih parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem (snaga mikrovalova, sastav otapala i vrijeme) i njihove interakcije na ekstraktibilnost antocijana komine grožđa (**tablica 4**). Ispitivane varijable su prevedene u kodirane varijable prema jednadžbi 5.

Tablica 4. Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za određivanje ukupnih antocijana ekstrakata komine grožđa

Faktor	Donja aksijalna razina	Centralna razina	Gornja razina
Kodirane varijable	-1	0	1
Vrijeme (X_1, s)	600	750	900
Snaga mikrovalova (X_2, W)	100	150	200
Postotak etanola ($X_3, \%$)	40	60	80
Udio HCl u etanolu ($X_4, \%$)	0,1	0,45	0,8

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 27 eksperimenata ekstrakcije sa tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja. Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom odzivnih površina prema jednadžbi 6.

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatran proces. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 10.0.3..

3.2.4. Određivanje pojedinačnih i ukupnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza antocijana u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom. Identifikacija i kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda.

Kromatografska analiza:

Kromatografski uvjeti:

Kolona: Phenomenax C18, Kinetex, 150 × 4.6 mm I.D., 2.6 μm

Pokretna faza: A – 5 % otopina mravlje kiseline u vodi

B – 5 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu

Eluiranje: gradijentno

Gradijent:

Vrijeme (min)	Otapalo	
	A (%)	B (%)
0	90	10
15,5	65	35
16	0	100
17	0	100
18	90	10

Injektirani volumen: 10 μL

Temperatura injektiranja: 20 °C

Protok: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 40 °C

Vrijeme analize: 22 min

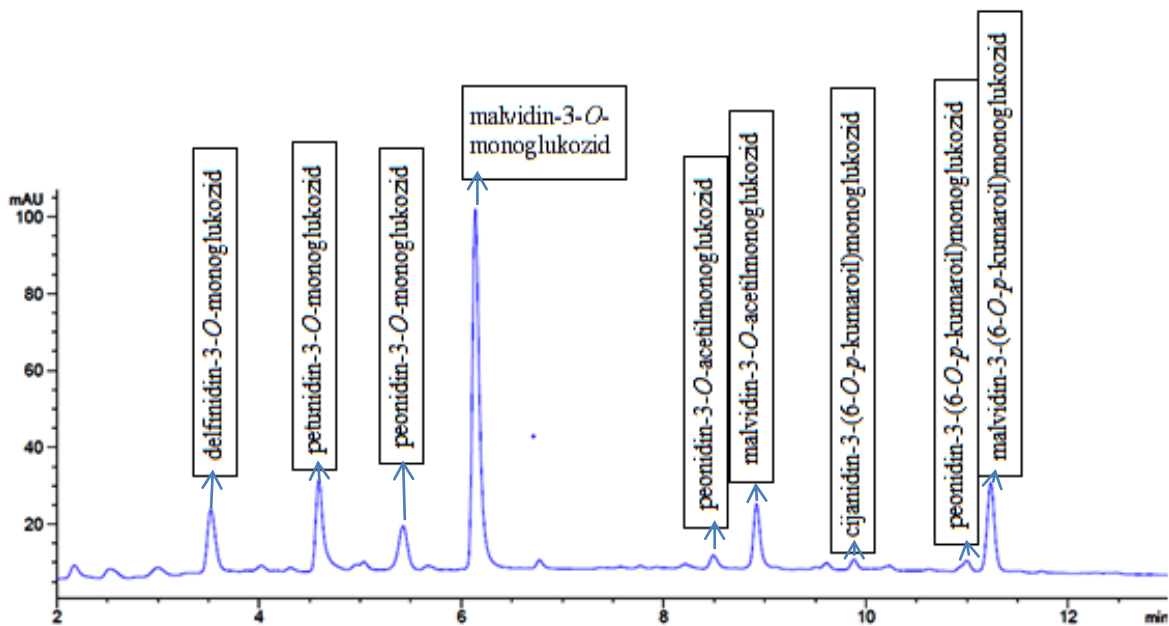
Detektor: Photodiode Array

Priprema uzorka:

Uzorak se profiltrira kroz filter veličine pora 0,25 μm, politetrafluoretilen (Macherey-Nagel Gmb & Co. KG, Njemačka).

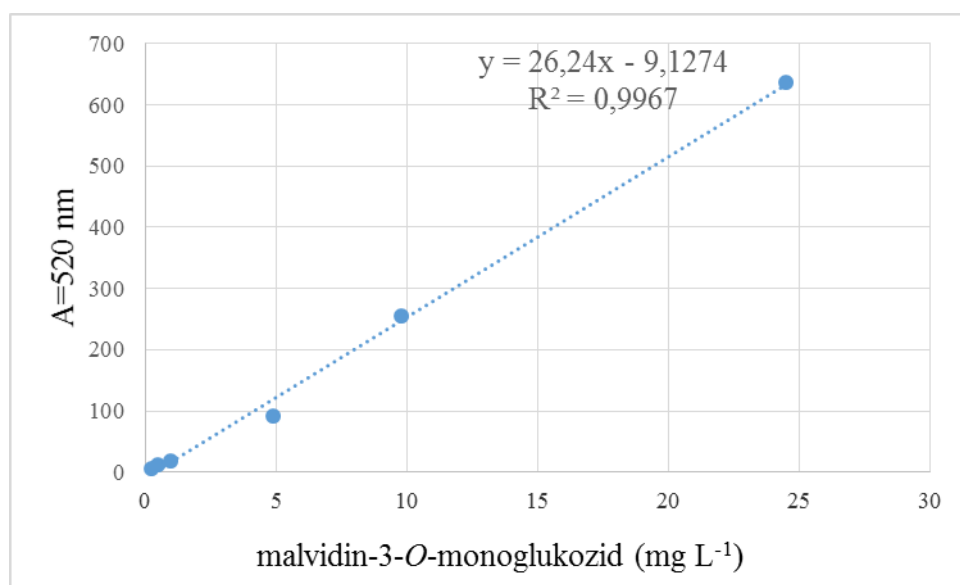
Identifikacija i kvantifikacija:

Kromatogrami antocijana određeni su na 520 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize određivani su spektri u ultraljubičastom području (od 200 do 600 nm). Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektara. Tipični kromatogram ekstrakata antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali dobivenog pomoću NADES-a prikazan je na **slici 9**.



Slika 9. Tipičan kromatogram ekstrakta antocijana iz komine grožđa dobiven pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (snaga mikrovalova – 300 W, vrijeme ekstrakcije – 600 s i postotak NADES-a – 70 %).

Kvantifikacija analiziranih spojeva provedena je primjenom metode vanjskog standarda malvidin-3-*O*-monoglukozyd klorida kao najzastupljenijeg slobodnog antocijana. Iz ovisnosti površine pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtan je baždarni pravac i izračunata pripadajuća jednadžba pravca (**slika 10**). Kvantitativna vrijednost antocijana izračunata je iz jednadžbe baždarnog pravca.



Slika 10. Baždarni dijagram malvidin-3-*O*-monoglukozyd.

Ukupni su antocijani određeni sumom svih kvantificiranih pojedinačnih antocijana, te se dobivena vrijednost koristila za optimizaciju procesa ekstrakcije.

3.2.5. Iscrpna ekstrakcija antocijana iz komine grožđa prirodnim eutektičkim otapalima

Uvjeti tijekom iscrpne ekstrakcije podešeni su na optimalne uvjete dobivene metodom odzivnih površina – snaga mikrovalova 300 W, vrijeme ekstrakcije 600 s te postotak NADES-a ChCit 70%. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran pri 6000 $o \text{ min}^{-1}$, 20 minuta. Supernatant je potom oddekantiran u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjen do oznake 70 %-tnim NADES-om te je dodatno pročišćen od taloga komine vakuum-filtracijom uz uporabu mikrofiltera veličine pora 0,45 μm . Talog komine nakon centrifugiranja i vakuum-filtracije iskorišten je u sljedećem stupnju iscrpne ekstrakcije, pri čemu je talogu ponovno dodano 10 mL 70 %-tnog NADES-a. Postupak se ponavljao sve dok u supernatantu nisu bili identificirani antocijani HPLC-om.

3.2.6. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala

Nakon iscrpne ekstrakcije, provedena je izolacija antocijana iz otapala na Amberlite XAD-7HP smoli, kao i reciklacija otapala. Kolona za izolaciju antocijana i reciklaciju otapala priređena je na način da je 44,71 g smole Amberlite XAD-7HP stavljeno u kolonu promjera 1,74 cm i visine 13,4 cm. Uz pomoć tih podataka izračunat je tzv. radni volumen kolone (engl., *bed volume*, BV) koji govori o ukupnoj sumi volumena polimernog gela u koloni, volumenu pora i „slobodnom“ volumenu između kuglica gela. Radni volumen kolone računa se prema slijedećem izrazu:

$$BV = h(\text{smole}) * r(\text{kolone})^2 * \pi \quad [7]$$

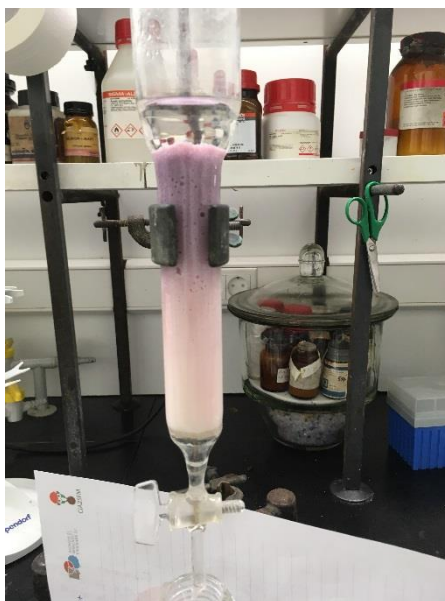
gdje je:

h – visina smole,

r – polumjer kolone.

Radni volumen kolone je iznosio 127 mL. Priprema kolone je provedena u tri stupnja na način da je prvo isprana s 5 BV (635 mL) vode, zatim s 3 BV (381 mL) etanola te ponovno s 5 BV vode.

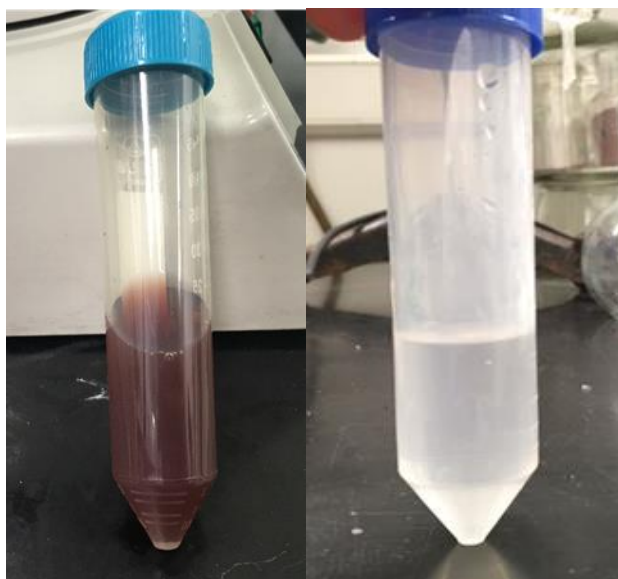
Na kolonu je nanoseno 36 mL ekstrakta. Kolona je zatim isprana sa 5 BV vode. Na taj način uklonjen je NADES s kolone, a na koloni ostaju adsorbirani antocijani (**slika 11**). Vodena faza koja sadržava NADES uparena je do željenog volumena pomoću vakuum-uparivača. Na taj način je provedena reciklacija NADES-a.



Slika 11. Kolona s adsorbiranim antocijanima (vlastita fotografija).

Elucija antocijana s kolone provedena je s 3 BV etanola. Otopina etanola koja je sadržavala antocijane je uparena do željenog volumena pomoću vakuum-uparivača te je podvrgnuta HPLC analizi kako bi utvrdili koncentraciju antocijana nakon procesa izolacije.

Naposljetku, kolona je regenerirana s 5 BV vode, 3 BV etanola te ponovno s 5 BV vode. Na **slici 12** prikazan je ekstrakt prije izolacije antocijana, te reciklirani NADES-a.



Slika 12. Ekstrakt prije pročišćavanja i NADES nakon pročišćavanja (vlastita fotografija).

3.2.7. Usporedba ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a potpomognutih istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem i samostalnim mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom

Ekstrakcije antocijana iz komine grožđa potpomognute samostalnim mikrovalnom zračenjem i ultrazvukom pomoću NADES-a ChCit provedene su pri uvjetima koji su se pokazali optimalnima za ekstrakciju potpomognutu istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem – snaga mikrovalova 300 W, vrijeme ekstrakcije 600 s te postotak NADES-a ChCit 70 %. Sam protokol ekstrakcije bio je identičan protokolu za ekstrakciju potpomognutu istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem.

4. REZULTATI

4.1. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina

U radu je ispitan utjecaj snage mikrovalnog zračenja, vremena ekstrakcije te masenog udjela vode u NADES-u ChCit, na ekstraktibilnost ukupnih antocijana iz komine grožđa (tablica 5). Procjena ispitivanih uvjeta na promatran proces, te njihovo optimiranje provedeno je primjenom softverskog paketa Design Expert 10.0.3., metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

Tablica 5. Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih antocijana ($\text{mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u ekstraktima dobivenih pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (snaga – P , vrijeme – t , postotak NADES-a - %NADES) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom.

Broj eksperimenta	Faktor X_1	Faktor X_2	Faktor X_3	Odziv 1
	P [W]	t [s]	%NADES [% w/w]	w [TA] [$\text{mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$]
1	100	600	70	0,76
2	100	900	70	1,41
3	300	600	70	1,76
4	300	900	70	1,53
5	200	600	50	1,14
6	200	900	50	0,95
7	200	600	90	0,1
8	200	900	90	0,63
9	100	750	50	0,67
10	300	750	50	1,14
11	100	750	90	0,05
12	300	750	90	0,5
13	200	750	70	1,15
14	200	750	70	1,09
15	200	750	70	1,19

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom drugog reda) prema jednadžbi [6] dobivena je funkcionalna ovisnosti sadržaja

antocijana (Y_1) o ispitivanim parametrima i njihovoj interakciji. U obzir su uzeti samo koeficijenti koji su statistički značajni, a prikazani su u **tablici 6**.

Tablica 6. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih antocijana u komini grožđa polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	p-value Prob>F
Model	3,39	9	0,38	135,46	<0,0001
X_1 – snaga	0,064	1	0,064	23,05	0,0049
X_2 – vrijeme	0,54	1	0,54	195,19	<0,0001
X_3 – postotak NADES-a	0,85	1	0,85	306,56	<0,0001
$X_1 X_2$	0,21	1	0,21	76,76	0,0003
$X_1 X_3$	0,13	1	0,13	46,68	0,001
$X_2 X_3$	0,0001	1	0,0001	0,036	0,8571
X_1^2	0,11	1	0,11	39,67	0,0015
X_2^2	0,012	1	0,012	4,48	0,088
X_3^2	1,38	1	1,38	495,55	<0,0001
Ostatak	0,014	5	0,00278		
Nedostatak modela	0,00886	3	0,00295	1,17	0,4919
Pogreška	0,00505	2	0,00253		
Ukupno	3,41	14			

SS - suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti;

df - stupnjevi slobode;

MS -varijanca

Dobivena jednadžba glasi:

$$Y_1 = 1,142972 + 0,089539 * X_1 + 0,260531 * X_2 - 0,326508 * X_3 - 0,231062 * X_1 * X_2 + 0,180178 * X_1 * X_3 - 0,005 * X_2 * X_3 + 0,172894 * X_1^2 + 0,058072 * X_2^2 - 0,611044 * X_3^2 \quad [8]$$

Gdje je:

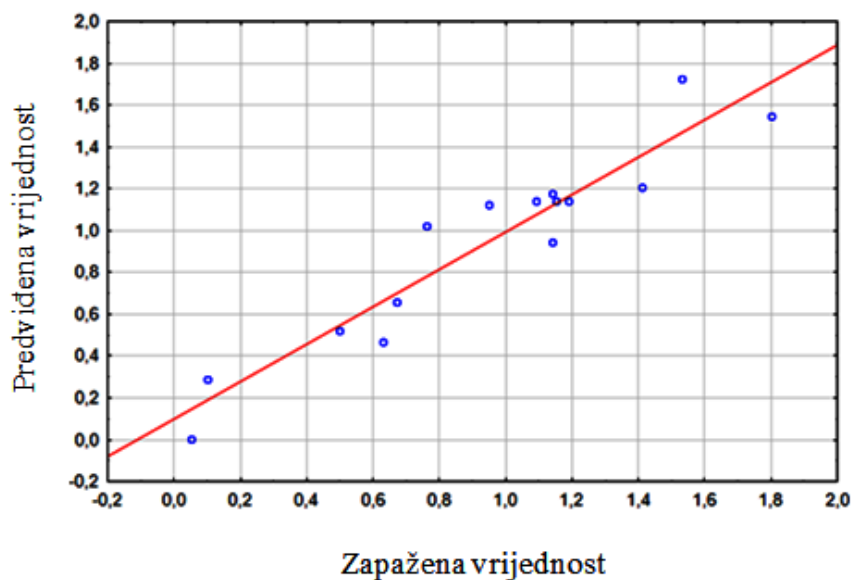
Y_1 - modelom predviđen maseni udio ukupnih antocijana [$\text{mg g}_{\text{s.tv}}^{-1}$]

X_1 - ispitivana snaga mikrovalnog zračenja [W]

X_2 - ispitivano vrijeme ekstrakcije [s]

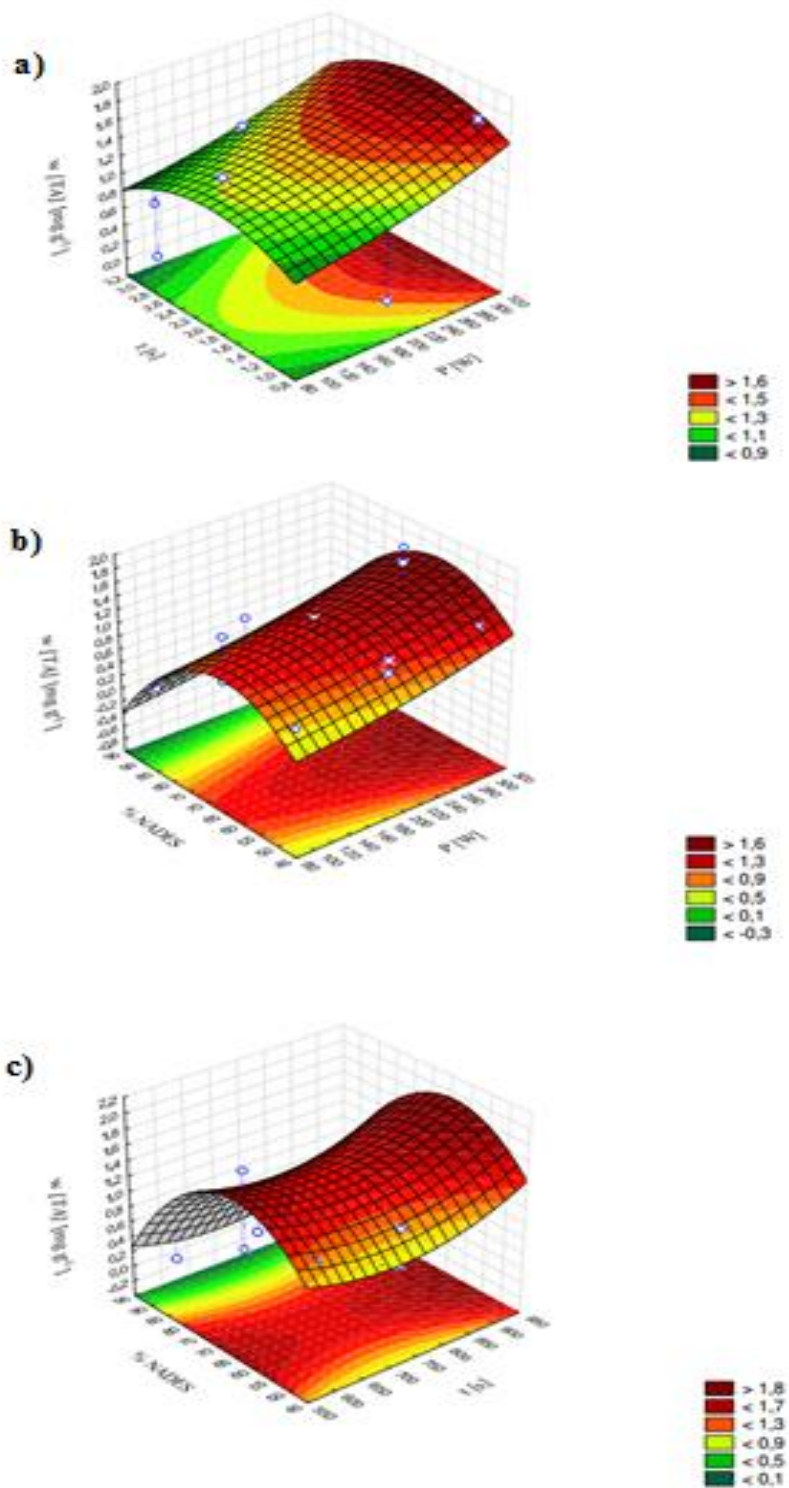
X_3 - postotak NADES-a ChCit [%, w/w]

Na **slici 13** prikazan je graf međusobne ovisnosti masenih udjela ukupnih antocijana predviđenih prema aproksimacijskom modelu o zapaženim masenim udjelima ukupnih antocijana.



Slika 13. Međusobna ovisnost masenih udjela ukupnih antocijana predviđenih prema aproksimacijskom modelu o zapaženim masenim udjelima ukupnih antocijana.

Na **slici 14** nalazi se prikaz trodimenzionalnih dijagrama odzivne površine za prinos ukupnih antocijana ($w[TA]$) u ovisnosti o snazi mikrovalnog zračenja (P) i postotku NADES-a ($\%NADES$) i vremenu ekstrakcije.



Slika 14. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih antocijana ($w[TA]$) u ovisnosti o: **a)** snazi mikrovalnog zračenja (P) i vremenu ekstrakcije (t) pri konstantnom postotku NADES-a ChCit od 70 %; **b)** snazi mikrovalnog zračenja (P) i postotku NADES-a ChCit ($\%NADES$) pri konstantnom vremenu ekstrakcije od 600 s; **c)** postotku NADES-a ChCit ($\%NADES$) i vremenu ekstrakcije (t) pri konstantnoj snazi mikrovalnog zračenja od 300 W.

4.1.1. Određivanje optimalnih uvjeta i potvrda modela ekstrakcije antocijana NADES-om

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos ukupnih antocijana komine grožđa za ispitivano eksperimentalno područje, provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 10.0.3. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja, odnosno kombinacija ispitivanih varijabli, međutim kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (engl. *Desirability*), kao kriterij za optimalno provođenje procesa, iznosila 1.

Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih antocijana iz komine grožđa primjenom NADES-a uz poželjnost 1 su: snaga mikrovalnog zračenja 300 W, postotak NADES-a ChCit 70 %, w/w, te vrijeme 600 sekundi. Pri navedenim uvjetima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni maseni udio ukupnih antocijana iz komine grožđa od 1,78 mg g_{s.tv.}⁻¹.

Parametri modela su primijenjeni u praksi uz dobiveni maseni udio antocijana od 1,76 mg g_{s.tv.}⁻¹. Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti identificirano je 9 različitih antocijana. Maseni udjeli pojedinačnih antocijana prikazani su u **tablici 7**.

Tablica 7. Maseni udjeli pojedinačnih antocijana u ekstraktu komine grožđa Plavca malog ekstrahirani s NADES-om pri optimalnim uvjetima (snaga mikrovalova – 300 W, vrijeme ekstrakcije – 600 s, postotak NADES-a – 70 %)

Antocijan	Maseni udio pojedinačnih antocijana [mg g _{s.tv.} ⁻¹]
delfinidin-3- <i>O</i> -monoglukozid	0,18±0,00
petunidin-3- <i>O</i> -monoglukozid	0,22±0,00
peonidin-3- <i>O</i> -monoglukozid	0,13±0,00
malvidin-3- <i>O</i> -monoglukozid	0,77±0,00
peonidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozid	0,05±0,00
malvidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozid	0,14±0,00
cijanidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monoglukozid	0,03±0,00
peonidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monoglukozid	0,04±0,00
malvidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monoglukozid	0,20±0,00

4.2. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću zakiseljenog etanola u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina

U radu je ispitan utjecaj snage mikrovalnog zračenja, vremena ekstrakcije, volumnog udjela vode u zakiseljenom etanolu te volumnog udjela klorovodične kiseline u zakiseljenom etanolu, na ekstraktibilnost ukupnih antocijana iz komine grožđa (**tablica 8**). Procjena ispitivanih uvjeta na promatran proces te njihovo optimiranje, provedeno je uz primjenu programa Design Expert 10.0.3., metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

Tablica 8. Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih antocijana ($\text{mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u ekstraktima dobivenih pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (snaga – P , vrijeme – t , postotak etanola - $\%EtOH$, udio klorovodične kiseline u etanolu - $\%HCl$) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom.

Broj eksperimenta	Faktor X_1	Faktor X_2	Faktor X_3	Faktor X_4	Odziv 1
	t	P	$\% EtOH$	$\% HCl$	$w [TA]$
	[s]	[W]	[% , v/v]	[% , v/v]	$[\text{mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}]$
1	750	150	60	0,45	1,23
2	900	150	60	0,8	1,41
3	900	150	40	0,45	1,32
4	750	100	40	0,45	1,19
5	750	200	80	0,45	0,99
6	900	100	60	0,45	0,98
7	900	150	80	0,45	1,02
8	600	150	60	0,1	0,94
9	750	150	60	0,45	1,18
10	750	150	40	0,1	1,11
11	750	150	80	0,8	1,20
12	600	150	80	0,45	1,07
13	750	200	60	0,1	1,13
14	600	150	40	0,45	1,34
15	750	100	60	0,8	1,32
16	600	100	60	0,45	1,08
17	750	200	60	0,8	1,55
18	900	200	60	0,45	1,28
19	750	200	40	0,45	1,42
20	600	200	60	0,45	1,37
21	750	150	80	0,1	0,70
22	600	150	60	0,8	1,47
23	750	150	40	0,8	1,53
24	750	100	60	0,1	0,73
25	750	100	80	0,45	0,90
26	750	150	60	0,45	1,23
27	900	150	60	0,1	0,89

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom drugog reda) prema jednadžbi [6] dobivena je funkcionalna ovisnosti sadržaja

antocijana (Y_1) o ispitivanim parametrima i njihovoj interakciji. U obzir su uzeti samo koeficijenti koji su statistički značajni, a prikazani su u **tablici 9**.

Tablica 9. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih antocijana u komini grožđa polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	p-value Prob>F
Model	1,35	14	0,096	33,43	<0,0001
X_1 – vrijeme	0,011	1	0,011	3,96	0,0699
X_2 – snaga	0,21	1	0,21	72,17	<0,0001
X_3 – postotak etanola	0,34	1	0,34	119,13	<0,0001
X_4 – udio HCl	0,76	1	0,76	263,66	<0,0001
$X_1 X_2$	0,000025	1	0,000025	0,008673	0,9273
$X_1 X_3$	0,000225	1	0,000225	0,078	0,7847
$X_1 X_4$	0,000025	1	0,000025	0,008673	0,9273
$X_2 X_3$	0,0049	1	0,0049	1,7	0,2168
$X_2 X_4$	0,004225	1	0,004225	1,47	0,2493
$X_3 X_4$	0,0016	1	0,0016	0,56	0,4706
X_1^2	0,000008333	1	0,000008333	0,002891	0,958
X_2^2	0,003333	1	0,003333	1,16	0,3034
X_3^2	0,013	1	0,013	4,4	0,0579
X_4^2	0,002133	1	0,002133	0,74	0,4065
Ostatak	0,035	12	0,002883		
Nedostatak modela	0,033	10	0,003293	3,95	0,2188
Pogreška	0,001667	2	0,0008333		
Ukupno	1,38	26			

SS - suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti;

df - stupnjevi slobode;

MS –varijanica

Dobivena jednadžba glasi:

$$Y_1 = 1,21 - 0,031 * X_1 + 0,13 * X_2 - 0,17 * X_3 + 0,25 * X_4 + 0,0025 * X_1 * X_2 - 0,0075 * X_1 * X_3 - 0,0025 * X_1 * X_4 - 0,035 * X_2 * X_3 - 0,032 * X_2 * X_4 + 0,02 * X_3 * X_4 - 0,00125 * X_1^2 - 0,025 * X_2^2 - 0,049 * X_3^2 - 0,02 * X_4^2 \quad [9]$$

Gdje je:

Y_1 – modelom predviđen maseni udio ukupnih antocijana [$\text{mg g}_{\text{s.tv}}^{-1}$]

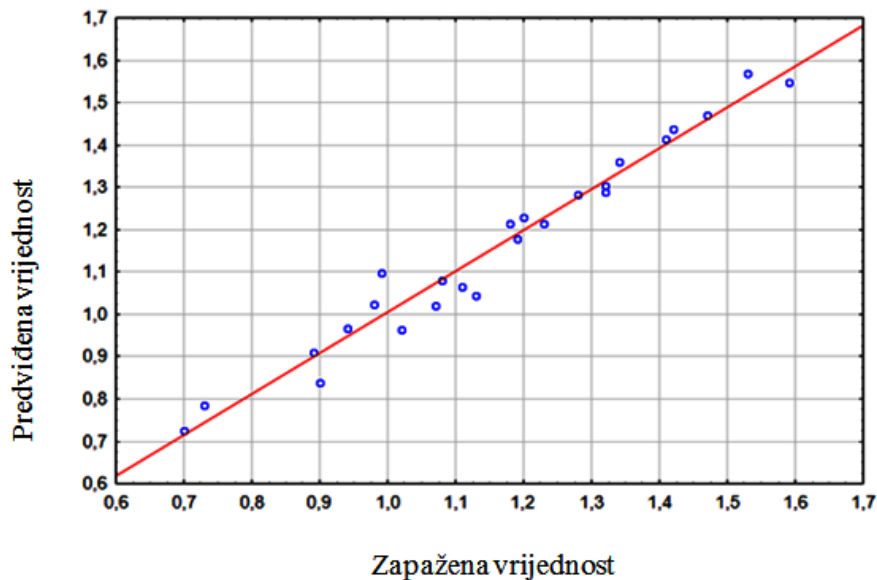
X_1 – ispitivano vrijeme ekstrakcije [s]

X_2 – ispitivana snaga mikrovalnog zračenja [W]

X_3 – ispitivani postotak etanola [% , vol/vol]

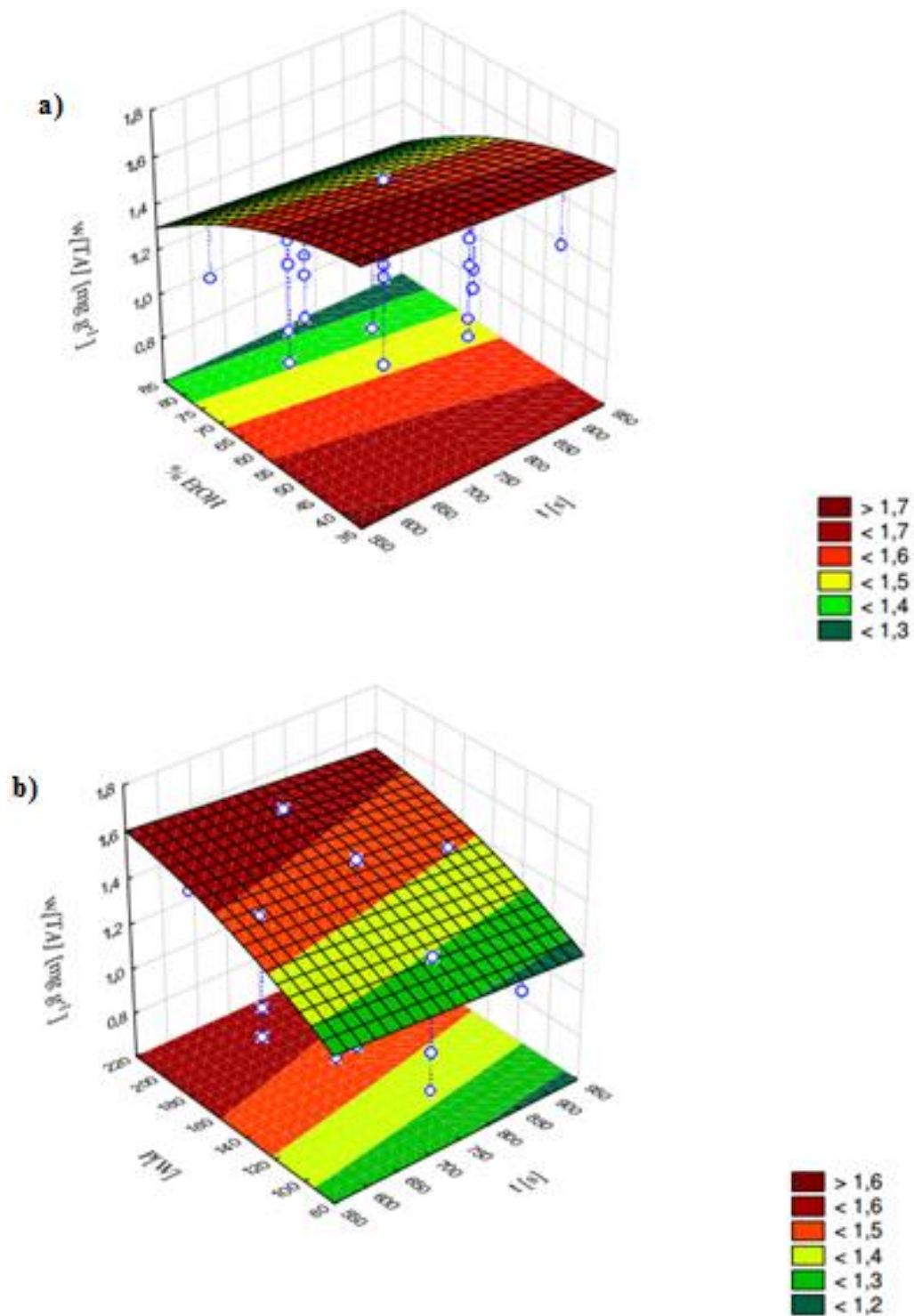
X_4 – ispitivani udio klorovodične kiseline u etanolu [% , vol/vol]

Na **slici 15** prikazan je graf međusobne ovisnosti masenih udjela ukupnih antocijana predviđenih prema aproksimacijskom modelu o zapaženim masenim udjelima ukupnih antocijana.

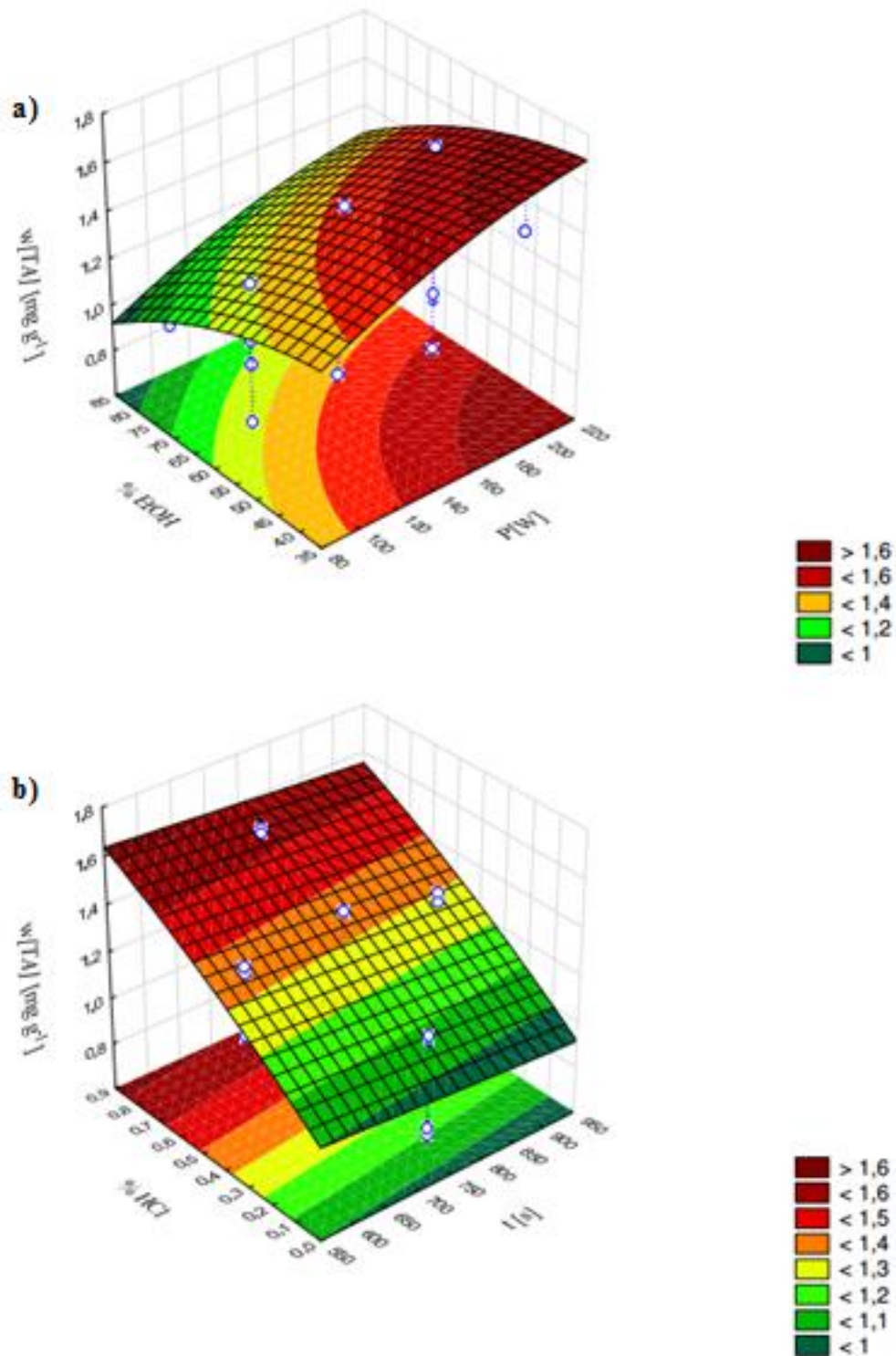


Slika 15. Međusobna ovisnost masenih udjela ukupnih antocijana predviđenih prema aproksimacijskom modelu o zapaženim masenim udjelima ukupnih antocijana.

Na **slikama 16 i 17** nalazi se prikaz trodimenzionalnih dijagrama odzivne površine za prinos ukupnih antocijana ($w[TA]$) u ovisnosti o snazi mikrovalnog zračenja (P) i postotku etanola ($\%EtOH$), udjelu klorovodične kiseline u etanolu ($\%HCl$) i vremenu ekstrakcije (t).



Slika 16. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih antocijana ($w[TA]$) u ovisnosti o: **a)** vremenu trajanja ekstrakcije (t) i postotku etanola ($\%EtOH$) pri konstantnom udjelu HCl u etanolu od 0,8 % i snazi mikrovalnog zračenja od 200 W; **b)** vremenu trajanja ekstrakcije (t) i snazi mikrovalnog zračenja (P) pri konstantnom udjelu HCl u etanolu od 0,8 % i postotku etanola od 60 %.



Slika 17. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih antocijana ($w[TA]$) u ovisnosti o: **a)** snazi mikrovalnog zračenja (P) i postotku etanola ($\%EtOH$) pri konstantnom udjelu HCl u etanolu od 0,8 % i vremenu ekstrakcije od 750 s; **b)** vremenu trajanja ekstrakcije (t) i udjelu klorovodične kiseline u etanola ($\%HCl$) pri konstantnoj snazi mikrovalnog zračenja od 200 W i postotku etanola od 60 %.

4.2.1. Određivanje optimalnih uvjeta i potvrda modela ekstrakcije antocijana zakiseljenim etanolom

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos ukupnih antocijana komine grožđa za ispitivano eksperimentalno područje, provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 10.0.3. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja, odnosno kombinacija ispitivanih varijabli, međutim kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (engl. *Desirability*), kao kriterij za optimalno provođenje procesa, iznosila 1.

Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih antocijana iz komine grožđa primjenom zakiseljenog etanola uz poželjnost 1 su: snaga mikrovalnog zračenja 200 W, postotak etanola 60 %, udio klorovodične kiseline u etanolu 0,8 %, te vrijeme 750 sekundi. Pri navedenim uvjetima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos ukupnih antocijana iz komine grožđa od 1,55 mg g_{s.tv.}⁻¹.

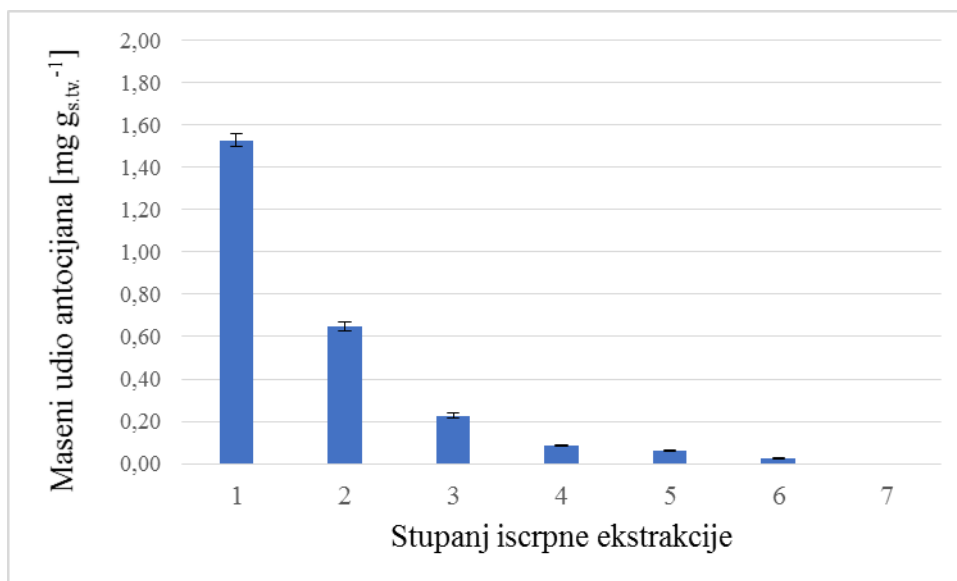
Parametri modela su primijenjeni u praksi uz dobiveni maseni udio antocijana od 1,55 mg g_{s.tv.}⁻¹. Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti identificirano je 9 različitih antocijana. Maseni udjeli pojedinačnih antocijana prikazani su u **tablici 10**.

Tablica 10. Maseni udjeli pojedinačnih antocijana, u ekstraktu komine grožđa Plavca malog, ekstrahiranih sa zakiseljenim etanolom pri optimalnim uvjetima (vrijeme ekstrakcije – 750 s, snaga mikrovalova – 200 W, postotak etanola – 60 %, udio HCl u etanolu – 0,8 %)

Antocijan	Maseni udio pojedinačnih antocijana [mg g _{s.tv.} ⁻¹]
delfinidin-3- <i>O</i> -monogluko ^z id	0,03±0,00
petunidin-3- <i>O</i> -monogluko ^z id	0,06±0,00
peonidin-3- <i>O</i> -monogluko ^z id	0,48±0,00
malvidin-3- <i>O</i> -monogluko ^z id	0,05±0,05
peonidin-3- <i>O</i> -acetilmonogluko ^z id	0,06±0,14
malvidin-3- <i>O</i> -acetilmonogluko ^z id	0,06±0,04
cijanidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monogluko ^z id	0,08±0,04
peonidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monogluko ^z id	0,06±0,25
malvidin-3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)monogluko ^z id	0,67±0,25

4.3. Iscrpna ekstrakcija antocijana iz komine grožđa prirodnim eutektičkim otapalom

Iscrpna ekstrakcija je provedena pod uvjetima koji su se prema modelu pokazali optimalnima (snaga mikrovalnog zračenja 300 W, vrijeme ekstrakcije 600 s te postotak NADES-a ChCit od 70 %). Na **slici 18** prikazan je maseni udio ukupnih antocijana u ekstraktu određenog stupnja ekstrakcije u ovisnosti o stupnju iscrpne ekstrakcije.



Slika 18. Maseni udio ukupnih antocijana u ekstraktu određenog stupnja ekstrakcije u ovisnosti o stupnju iscrpne ekstrakcije.

Uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti određen je maseni udio ukupnih antocijana u združenom ekstraktu svih stupnjeva iscrpne ekstrakcije koji je iznosio 2,49 mg g_{st.v.}⁻¹.

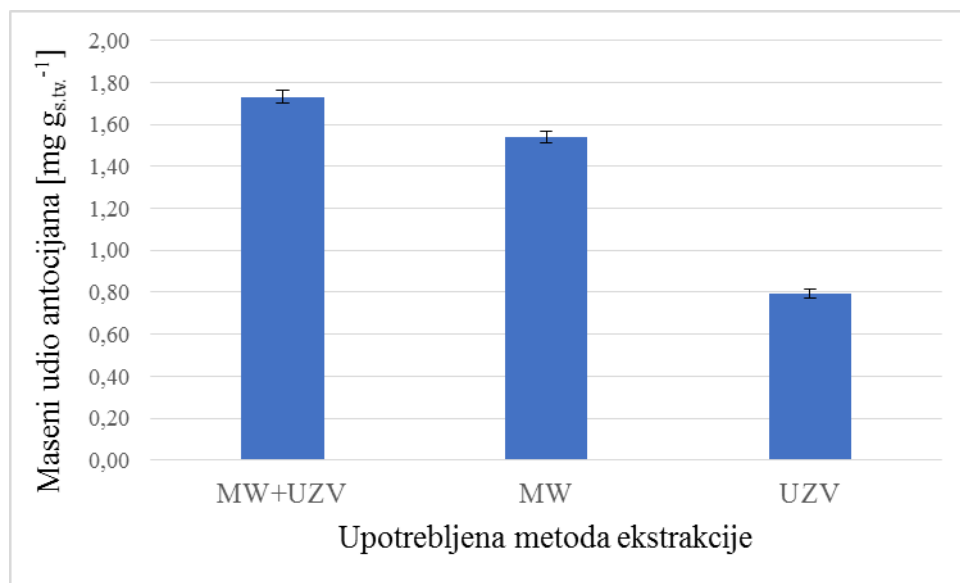
4.4. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala

Prije nanošenja na kolonu, združeni ekstrakt svih stupnjeva iscrpne ekstrakcije sadržavao je 1,83 mg antocijana. Nakon desorpcije antocijana s kolone, u etanolnoj fazi korištenoj za eluciju antocijana sadržaj ukupnih antocijana iznosio je 0,85 mg. Prema tome na koloni je iz ekstrakta izolirano 46,38 % ukupnih antocijana.

Početni volumen NADES-a koji je na kolonu nanesen je volumen ekstrakta – 36 mL. Nakon propuštanja ekstrakta na koloni elucijom s vodenom fazom dobiven je volumen NADES-a od 24,32 mL. Dakle, reciklirano je 67,56 % NADES-a s 70 %-tnim masenim udjelom Ch:Cit.

4.5. Usporedba ekstrakcija antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a potpomognutih istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem i samostalnim mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom

Rezultati usporedbe ekstrakcija antocijana iz komine grožđa potpomognutih istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem te samostalnim mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom pomoću NADES-a ChCit prikazani su na slici 19.



Slika 19. Maseni udio antocijana u ekstraktu komine grožđa u ovisnosti o upotrebljenoj metodi aktivacije prilikom ekstrakcije (MW+UV – ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem; MW – ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem; UZV – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom).

5. RASPRAVA

Industrija vina proizvodi velike količine otpada i nusprodukata, a samo mali broj njih se reciklira ili kompostira. Zbrinjavanje velikih količina otpada potencijalno predstavlja ekološki problem. Jedan od otpada vinske industrije je i komina grožđa (Bosiljkov i sur., 2017). Kako bismo iskoristili i dodali vrijednost komini grožđa kao otpadnom produktu, u ovom radu antocijani su ekstrahirani prirodnim eutektičkim otapalom kolin klorid:limunskom kiselinom.

Konvencionalne metode ekstrakcije biljnih polifenola su obično povezane sa potrošnjom velikih količina organskih otapala, kao i uz veliku potrošnju energije te nedovoljno iskorištenje ekstrakta (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Chemat i sur., 2012). Prema tome, potrebno se je okrenuti principima zelene ekstrakcije. Tijekom izrade ovog rada slijeđena su četiri od šest principa zelene ekstrakcije prema Chemat i sur. (2012), a to su: (1) uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala, (2) uporaba alternativnih otapala, (3) smanjenje utroška energije primjenom alternativnih tehnologija i optimizacija procesa i (4) uporaba nusprodukata kao izvora bioaktivnih komponenti. Kao alternativno otapalo u ovom radu upotrebljen je NADES kolin klorid:limunska kiselina, kao alternativna tehnologija ultrazvučno-mikrovalna ekstrakcija, a kao obnovljivi izvor biljnog materijala - komina grožđa. Antocijani su visokovrijedni proizvodi industrije stoga nam je njihova ekstraktibilnost sa visokom produktivnošću poželjna. Osim antioksidativnog i antitumorskog djelovanja, poznati su i drugi pozitivni učinci antocijana kao što su: detoksifikacijski i protuupalni učinak te inhibicija probavnih enzima čime indirektno mogu utjecati pozitivno na dijabetes tipa II i pretilost (Xia i sur., 2010).

U Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije sintetizirano je više od desetak NADES-ova različitih fizikalno-kemijskih svojstava kako bi se probralo najselektivnije otapalo za antocijane. Cvjetko Bubalo i sur. (2016) u svojim istraživanjima su koristili tri kombinacije NADES-ova za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa, koje sadrže organske kiseline, polialkohole ili šećere kao donore protona. Među ispitanim NADES-ovima kao najučinkovitiji se pokazao NADES kolin klorid:organska kiselina. Spomenuti NADES pokazuje najbolju sposobnost ekstrakcije polifenola pomoću aktivacije ultrazvukom, zatim mikrovalovima, dok je klasična metoda (zakiseljeni metanol) pokazala najslabiju sposobnost ekstrakcije. Rezultati istraživanja utvrdili su mogućnost zamjene klasičnih organskih otapala NADES-ovima kod ekstrakcije polifenola iz pokožice grožđa sorte Plavac mali, odnosno da je optimiranjem procesa ekstrakcije uporabom NADES-a

moгуće razviti ekološki prihvatljivu metodu za ekstrakciju pojedinih klasa polifenolnih spojeva.

Na temelju preliminarnih istraživanja kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju anotacijana odabran je NADES kolin klorid:limunska kiselina koje je najpolarnije od ispitanih otapala i ima pH niži od 2.

Dai i sur., (2013) proučavali su ekstrakciju aromatskih pigmenata sa širokim rasponom polariteta NADES-a. Najmanje polarna otapala pokazuju najnižu učinkovitost pri ekstrakciji polarnih spojeva, što odgovara načelu „slično se otapa u sličnom“. Antocijani su jako polarni spojevi pa ovakvi rezultati nisu iznenađujući. Štoviše, niska pH vrijednost takvih otapala pogoduje stabilnosti i izolaciji antocijana iz komine grožđa (Castaneda-Ovando i sur., 2009, Tsao i sur., 2010).

U ovom radu pokušali smo obuhvatiti što više principa zelene ekstrakcije te usporediti učinkovitost ekstrakcije pomoću NADES-a sa ekstrakcijom zakiseljenim etanolom. Etanol kao otapalo je trenutno najčešće primjenjeno u industriji. Za oba procesa su određeni optimalni parametri ekstrakcije antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali.

5.1. Određivanje optimalnih uvjeta ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije antocijana u NADES-u

Učinkovitost procesa ekstrakcije antocijana istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem ovisi o brojnim parametrima koji mogu djelovati zavisno ili nezavisno. Zbog velikog broja parametara gotovo je nemoguće odrediti i kontrolirati sve, stoga je neophodno odabrati one koji imaju najveći utjecaj na promatrani proces. Proces znatno ovisi o snazi mikrovalnog zračenja, ultrazvuku, temperaturi, volumenu, karakteristikama otapala kao i o vremenu trajanja ekstrakcije (Leonelli i Mason, 2010; Martina i sur., 2016; Cravotto i Cintas, 2007). U našem radu ispitan je utjecaj snage mikrovalnog zračenja (100, 200 i 300 W), vremena trajanja procesa ekstrakcije (600, 750 i 900 sekundi) i sastava otapala (postotka NADES-a ChCit; 50, 70, 90 %, w/w), pri maksimalnoj temperaturi od 120 °C i snazi ultrazvuka od 50 KHz., na ekstraktibilnost ukupnih antocijana (**tablica 5**). Kako bi odredili optimalne uvjete ekstrakcije potrebno je eksperiment provesti u svim mogućim kombinacijama, što zahtijeva velik broj eksperimenata. Međutim, u današnje vrijeme moguć je pristup računalnim programima koji reduciraju broj eksperimenata, a sukladno tome i količinu utrošene energije i sredstava u eksperiment. Metoda odzivnih površina kao skup

matematičkih i statističkih tehnika pokazala se kao praktičan alat u planiranju i reduciranju pokusa.

Optimiranje gore navedenih uvjeta provedeno je uz pomoć programa Design Expert 10.0.3., metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa. Nakon provedenog eksperimenta i naknadne analize ekstrakata komine grožđa dobiven je odziv odnosno maseni udio ukupnih antocijana pri ispitivanim uvjetima. Maseni udio ukupnih antocijana kretao se od 0,1 do 1,76 mg $g_{s.tv}^{-1}$. Kako bi provjerili prikladnost Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije te kako bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije i njihove interakcije, poslužili smo se aproksimacijom eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, tj. polinomom drugog stupnja prema izrazu 6. Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisnih i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora.

Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R), koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Za slučaj ispitivanog procesa ekstrakcije ukupnih antocijana je to kvadratni polinom prikazan jednadžbom 8, a slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka prikazuje **slika 13**. Međutim, često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga je osim koeficijenta korelacije provedena detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su vrijednosti " $Prob > F$ " za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost), ti članovi su značajni. To znači da je vjerojatnost (engl. *Probability*) dobivanja tako velike F vrijednosti uslijed šuma, manja od 5 %. Prema tome, utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti prinosa ukupnih antocijana kvadratnim modelom statistički značajna što znači da je primjena modela opravdana za ispitivano područje. Pored toga statistički parametar "nedostatak modela" (engl. *Lack of fit*) nije bio statistički značajan za $p < 0,05$ (**tablica 6**). Nadalje iz iste tablice je vidljivo da na prinos ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa najveći utjecaj imaju dvije promjenjive varijable tj. postotak NADES-a ($p < 0,0001$) i vrijeme ekstrakcije ($p < 0,0001$) i to kao linearni članovi. Snaga

mikrovalova također kao linearni član nije zanemariva varijabla ($p = 0,0049$). Interakcija ispitivanih parametara je značajna u slučaju kombinacije snage i postotka NADES-a kao i kombinacija snage i vremena. Interakcija vremena i postotka NADES-a pri konstantnoj snazi mikrovalova nije značajan parametar. Iz podataka također možemo vidjeti da funkcija sadrži kvadratni član. Vizualni prikaz parametara koji značajno utječu na prinos ukupnih antocijana dan je 3D dijagramom odzivne površine gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđeni prinos ukupnih antocijana za ispitivane kombinacije. Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 10.0.3. određeni su optimalni uvjeti procesa ekstrakcije za ispitivano eksperimentalno područje. Dobiveni optimalni uvjeti ekstrakcije su: snaga mikrovalova od 300 W, vrijeme ekstrakcije 600 sekundi i maseni postotak NADES-a ChCit 70 %. Uz korištenje navedenih uvjeta, teoretski maksimalni prinos antocijana koji se može ostvariti je $1,78 \text{ mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$. Nadalje, u ekstraktima pri optimalnim uvjetima identificirane su tri klase antocijana iz skupine glukozida, acetata i kumarata koje su prirodno prisutne u komini grožđa sorte *Vitis vinifera*. U našem radu kao i u radu Fracassetti i sur. (2016), sadržaj kumarata je nešto viši od acetata. Visok udio antocijana u pokožici grožđa doprinosi stabilnosti oksidacije prilikom proizvodnje vina te dovodi do specifične i intenzivne boje (Fracassetti i sur., 2016).

Dobroj ekstraktibilnosti je pridonijela upotreba kombinacije ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja čime smo zadovoljili načelo zelene ekstrakcije, a time smo i među prvima koji smo proveli takvu vrstu ekstrakcije. U rezultatima izloženim na **slici 19** vidljivo je da je kombinacija ultrazvuka i mikrovalova puno učinkovitija nego njihova samostalna upotreba. Lianfu and Zelong (2008) usporedili su ekstrakciju likopena iz rajčice potpomognutu istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem s ekstrakcijom potpomognutom samostalnim ultrazvukom. Rezultati rada pokazali su da je primjenom istovremenog ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja povećan prinos likopena za 89,4 % te je značajno skraćeno vrijeme ekstrakcije u odnosu na samostalnu primjenu ultrazvuka. Cravotto i sur. (2008) usporedili su ekstrakciju ulja iz uljarica primjenom istovremenog ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja i samostalnog mikrovalnog zračenja, kao i samostalne uporabe ultrazvuka. Kao najbolja tehnika ekstrakcije pokazala se ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem, dok je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima bila nešto bolja od one potpomognute ultrazvukom.

5.2. Određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije ukupnih antocijana zakiseljenim etanolom

U drugom dijelu eksperimentalnog rada provedeno je ispitivanje utjecaja četiri procesna parametra (udjela klorovodične kiseline u etanolu; 0,1, 0,45 i 0,8 %, v/v, vremena ekstrakcije; 600, 750 i 900 sekundi, snage mikrovalova; 100, 150 i 200 W te volumnog postotka etanola; 40, 60 i 80 %, v/v) na ekstraktibilnost antocijana komine grožđa (**tablica 8**). Vrijednosti za masene udjele antocijana, dobivenim pri ispitivanim kombinacijama procesnih uvjeta, prikazane su u **tablici 10**. Maseni udio antocijana u ekstraktima komine grožđa pri ispitivanim uvjetima kretao se u rasponu od 0,70 do 1,55 mg g_{s.tv.}⁻¹. Za opisivanje utjecaja ispitivanih uvjeta ekstrakcije i njihove interakcije na sadržaj antocijana u komini grožđa, primijenjen je polinom drugog reda prema izrazu 6. Slaganje eksperimentalnih podataka i modelom predviđenih vrijednosti vidljivo je na **slici 15**. Daljnjom analizom utvrđeno je da je kvadratni model za opisivanje utjecaja spomenutih parametara na prinos antocijana (**tablica 9**) statistički opravdan ($F = 33,43$ uz vjerojatnost 0,01% da potječe od šuma). Iz tablice je vidljivo da vrijeme kao linearni član jednadžbe nije statistički značajno ($p = 0,0699$) dok snaga, postotak etanola i udio HCl značajno utječu na konačnu jednadžbu. Interakcije spomenutih parametara nisu statistički značajne kao niti polinomi parametara. Podaci se također mogu vidjeti na **slici 15**, gdje je prikazan trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih antocijana iz čega dodatno možemo vidjeti da samo linearni članovi značajno utječu na proces jer graf ne pokazuje paraboloidnu ovisnost.

Po istom principu kao i za određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije NADES-om, utvrđeni su optimalni uvjeti ekstrakcije zakiseljenim etanolom. Određeni optimalni uvjeti prema jednadžbi 8 za ispitivano eksperimentalno područje, uz poželjnost 1 su: udio klorovodične kiseline u etanolu 0,8 %, v/v, vrijeme ekstrakcije 750 sekundi, snaga mikrovalova 200 W te postotak etanola 60 %, v/v. Pri navedenim uvjetima izračunato je, prema modelu, da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos antocijana iz komine grožđa od, 1,55 mg g_{s.tv.}⁻¹. Primjenom modela u praksi dobiveno je 1,55 mg g_{s.tv.}⁻¹.

U ekstraktima pri optimalnim uvjetima identificirane su 3 klase antocijana kao i kod ekstrakcije s NADES-om. Različiti uvjeti ekstrakcije znatno utječu na ekstraktibilnost antocijana iz komine grožđa. Kvantificirani i kvalificirani antocijani iz sorte grožđa *Plavac mali* nisu ekstrahirani u istoj količini i pojavnosti uz uporabu oba otapala. Iz rezultata je vidljivo da je NADES ChCit dao veći odziv za ekstrakciju većine antocijana.

Posjedovanjem trenutnih saznanja o prirodnim eutektičkim otapalima u vrlo skoroj budućnosti bi ovakva ekstrakcija mogla poprimiti industrijske razmjere. Kako bi NADES uključili u nove i postojeće procese, potrebno je dobro razmotriti ekonomski i ekološki aspekt. Trošak NADES-a usporediv je sa konvencionalnim otapalom, a njihova se proizvodnja može klasificirati kao održivi proces (Paiva i sur., 2014). Ekonomska evaluacija NADES-a pokazuje prosječnu vrijednost od 2 \$ po kg što je u usporedbi sa organskim otapalima nešto skuplje, ali ipak puno jeftinije od komercijalno dostupnih ionskih tekućina. Štoviše fizikalno-kemijska svojstva NADES-a, kao što su viskoznost i tlak pare, imaju velik utjecaj na integraciju tih otapala u industriju (Bosiljkov i sur., 2017).

5.3. Izolacija antocijana iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala

Unatoč gore navedenim prednostima primjene NADES-a, treba uzeti u obzir i nekoliko drugih pitanja, uključujući izolaciju ciljanih spojeva i reciklaciju NADES-a. Tlak pare NADES-a je gotovo jednak nuli pa bi mogao predstavljati problem pri izolaciji ciljanih spojeva. Dosad je opisano nekoliko načina izolacije spojeva iz ekstrakta i reciklacije otapala, kao što su ekstrakcija krute faze i primjena anti-otapala, rekristalizacija i adsorpcijska kromatografija (Nam i sur., 2015.; Dai i sur., 2013.; Jeong i sur., 2015; Huang i sur., 2017). Jeong i sur. (2015) koristili su hidrofilno-lipofilni adsorbens kako bi ekstrahirali ginsenoside iz NADES-a jednostavnim postupkom adsorpcije ekstrakta na kolonu, prethodno ispranu vodom, nakon čega slijedi elucija s etanolom. Uspješna rutinska primjena anti-otapala opisana je u radu Huang i sur. (2017). Anti-otapalo koje su koristili je voda, a NADES su uspjeli reciklirati u postotku od 95,1. Također su proveli iscrpnu ekstrakciju, pri čemu su u prvom stupnju uspjeli reciklirati 92 % NADES-a, u drugom 87 %, a u trećem 81 %.

U našem radu, izolacija antocijana iz NADES-a ChCit provedena je na koloni napunjenoj smolom Amberlite XAD-7HP. Prije izolacije, proveden je proces iscrpne ekstrakcije. Iz rezultata je vidljivo da je iscrpna ekstrakcija provedena kroz 8 serija uz optimalne uvjete. Već nakon 3. ciklusa udjeli antocijana u ekstraktu drastično padaju. U prvom stupnju ekstrakcije maseni udio antocijana je iznosio $1,52 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$, u šestom stupnju ekstrakcije udio je $0,02 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. U sljedećem stupnju udio se spustio na $0 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. Sumaran ekstrakt je podvrgnut HPLC analizi i dobivena je vrijednost udjela antocijana od $2,49 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. Ekstrakti svakog stupnja su skupljeni u jedinstveni ekstrakt i propušteni kroz kolonu napunjenu smolom. Iscrpnom ekstrakcijom iz komine je ekstrahirano maksimalan maseni udio antocijana.

Uspješnost izolacije je prikazana u rezultatima, a uz proces izolacije, provedena je i reciklacija NADES-a ChCit uz zadovoljavajući postotak.

Upotreba NADES-a u ekstrakcijskim procesima može rezultirati većom produktivnošću i razvitkom ekološki prihvatljivijih metoda ekstrakcije. Također upotrebom kombinacije ultrazvuka i mikrovalova kao alternativnog izvora energije povećali smo učinkovitost čitavog procesa ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva NADES-a, mogućnost dizajniranja vlastitog otapala za određeni proces, nizak ekološki otisak i prihvatljiva cijena, stavljaju NADES-ove u centar interesa znanstvenika kao i inženjera u industriji. Zbog svega navedenog NADES se može smatrati potencijalnim supstituentom hlapljivih, zapaljivih i toksičnih organskih otapala koja se obično koriste u ekstrakcijskim procesima.

Rezultati ostvareni u ovom radu pokazuju nam da se uporabom NADES-a mogu postići vrlo dobri rezultati ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnih materijala, koji bi zbog svojih antioksidativnih i antitumorskih svojstava mogli postati komponente prehrambenih proizvoda, dodataka prehrani ili lijekova, posebno kad su ekstrahirani „zelenim otapalom“ kao što je NADES, siguran za okoliš i ljudsku upotrebu. Količine ekstrahiranih polifenolnih spojeva ne ovise samo o vrsti NADES-a koje se koristi za ekstrakciju, već i o vrsti biljnog materijala tj. o izvoru polifenolnih spojeva. Raznim je istraživanjima postignut vrlo dobar rezultat u ekstrakciji polifenolnih spojeva NADES-om iz raznih biljnih izvora. Tako su NADES-om uspješno ekstrahirani polifenolni spojevi iz biljke šafranike i u usporedbi s klasičnim otapalima postignuti su mnogo bolji rezultati (Dai i sur., 2013). Također je iz kineskog zelenog čaja NADES-om ekstrahirano više katehina i epikatehin galata u usporedbi s klasičnim otapalima (Zhang i sur, 2014).

U zaključku, predloženo istraživanje predstavlja doprinos razvoju novih, konkurentnih i ekološki prihvatljivih procesa u ekstrakciji bioloških aktivnih spojeva, s naglaskom na primjenu prirodnih eutektičkih otapala u izolaciji polifenolnih spojeva. Rezultati ovog istraživanja također mogu dati smjernice i biti korišteni u istraživanju primjene drugih nusproizvoda poljoprivredne i prerađivačke industrije.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti

1. Uspješno je provedena ekstrakcija antocijana iz komine grožđa potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem primjenom NADES-a kolin klorid:limunska kiselina uz optimalne uvjete dobivene modelom.
2. Optimalni uvjeti ekstrakcije za postizanje maksimalnog masenog udjela ukupnih antocijana pri ispitivanim uvjetima su: snaga mikrovalova od 300 W, vrijeme ekstrakcije 600 sekundi i volumni postotak NADES-a 70 %. Uz upotrebu navedenih uvjeta, teoretski maksimalni maseni udio ukupnih antocijana koji se može ostvariti je $1,78 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. Primjenom navedenih optimalnih parametara dobiven je maseni udio ukupnih antocijana od $1,76 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$.
3. Provedbom ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a kolin klorid:limunske kiseline potpomognutih samostalnom uporabom ultrazvuka i mikrovalova, dokazana je veća učinkovitost uporabe istovremenog ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja od samostalne uporabe ultrazvuka i mikrovalova.
4. Također je provedena i ekstrakcija antocijana iz komine grožđa potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem uz uporabu zakiseljenog etanola kao otapala. Teoretski maksimalni maseni udio ukupnih antocijana koji se može ostvariti pri optimalnim uvjetima kod ove ekstrakcije je $1,55 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. U praksi je ostvaren maseni udio ukupnih antocijana od $1,55 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$.
5. Etanol kao najčešće korišteno otapalo u industriji pokazalo se manje učinkovito za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa od NADES-a kolin klorid:limunske kiseline.
6. Provedena je izolacija antocijana iz ekstrakta uz 46,38 %-tnu uspješnost. Također provedena je i reciklacija korištenog NADES-a uz 67,56 %-tnu uspješnost.
7. Rezultati istraživanja utvrdili su mogućnost potencijalne zamjene klasičnih otapala prirodnim eutektskim otapalima u izolaciji antocijana iz komine grožđa.

7. ZAHVALE

Neizmjerne se želimo zahvaliti mentorici prof. dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovog rada, uloženom vremenu, nesebičnoj pomoći te na svemu što nas je naučila prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujemo se i mag. ing. Manuli Panić na iskazanoj pomoći, razumjevanju i strpljenju prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.

Također, zahvaljujemo se i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj radnoj atmosferi, pomoći i brojnim savjetima.

8. LITERATURA

- Andersen, Ø.M., Jordheim, M. (2010) Anthocyanins. John Wiley & Sons, Ltd., Weinheim.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2017) Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* **102**, 195 – 203.
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M.L., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A., Galan-Vidal, C.A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859–871.
- Cavalcanti, R.N., Forster-Carneiro, T., Gomes, M.T.M.S., Rostagno, M.A., Prado, J.M., Meireles, M.A.A. (2013) Uses and Applications of Extracts from Natural Sources. U: *Natural Product Extraction: Principles and Applications* (Rostagno, M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 1 – 46.
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615 – 8627.
- Cravotto, G., Cintas, P. (2007) The combined use of microwaves and ultrasound: Improved tools in process chemistry and organic synthesis. *Chem. Eur. J.* **13**, 1902 – 1909.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 898 – 902.
- Cvjetko Bubalo, M., Čurko, N., Tomašević, M., Ganić, K.K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* **200**, 159 – 166.
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Eco. Tox. Environ. Safe.* **99**, 1 – 12.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631 – 1639.

- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272 – 6278.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **187**, 14 – 19.
- Ferreira, S.L.C, Bruns, R.E, Ferreira H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandao, G.C, da Silva, E.G.P, Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica. Acta.* **597**, 179-186.
- Fracassetti, D., Gabrielli, M., Corona, O., Tirelli, A. (2016) Characterisation of *Vernaccia Nera* (*Vitis vinifera* L.) grapes and wine. *S. Afr. Enol. Vitic.* **38**, 72 – 81.
- Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Winw R.* **4**. 74 – 95.
- Georgijev, V., Ananga, A., Tsoleva, V. (2014) Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391 – 415.
- Hayyan, A., Mjalli, F.S., AlNashef, I.M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y.M., Hashim, M.A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta* **541**, 70 – 75.
- Huang, Y., Feng, F., Jang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., Chen, Z. (2017) Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* **221**, 1400 – 1405.
- Jackson, R.S. (2008) Wine Science, 3.izd., Elsevier, New York.
- Jeong, K.M., Lee, M.S., Nam, M.W., Zhao, J., Jin, Y., Lee, D.K., Kwon, S.W., Jeonh, J.H., Lee, J. (2015) Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. *J. Chromatogr. A* **11**, 1424 – 143.
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. *WIREs Comp. Stat.* **2**, 128 – 149.
- Kruger, M.J., Davies, N., Myburgh, K.H., Lecour, S. (2014) Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Res. Int.* **59**, 41 – 52.

- Kudlak, B., Owczarek, K., Nemieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975 – 11992.
- Leonelli, C., Timothy, J.M. (2010) Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chem. Eng. Process.* **49**, 885 – 900.
- Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J.C., Tsao, R. (2012) Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Res. Int.* **46**, 250 – 259.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731 – 737.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7 – 18.
- Martina, K., Tgliapietra, S., Barge, A., Cravotto, G. (2016) Combined microwaves/ultrasound, a hybrid technology. *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374 – 379.
- Mason, T.J., Chemat, F., Vinatour, M. (2011) The Extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Curr. Org. Chem.* **15**, 237-247.
- Miguel, M.G. (2011) Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *J. App. Pharm.* **1**, 7 – 15.
- Nam, M.W., Zhao, J., Lee, M.S., Jeong, J. H., Lee, J. (2015) Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor- made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Food Chem.* **17**, 1718 – 1727.
- Nile, S.H., Kim, S.H. Ko, E.Y. Park, S.W. (2013) Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1 – 5.
- Otero-Pareja, M.J., Casas, L., Fernández-Ponce, M.T., Mantell, C., Martínez de la Ossa, E.J. (2015) Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules* **20**, 9686 – 9702.

- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.I., Duarte, A.R.C. (2014) Natural deep eutectic solvents – Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063 – 1071.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270 – 278.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46 – 53.
- Ramirez-Lopez, L.M., DeWitt, C.A.M., (2014) Analysis of phenolic compounds in commercial dried grape pomace by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Food Sci. Nutri.* **2**, 470 – 477.
- Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G., Ryan, J.M. (2001) Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A* **915**, 53 – 60.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2000) Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.
- Rombaut, N., Tixier, A.S., Bily, A., Chemat, F. (2014) Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuel. Bioprod. Bior.* **8**, 530 – 544.
- Somers, T.C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **10**, 2175 – 2186.
- Sousa, E.C., Uchoa-Thomaz, A.M.A., Carioca, J.O.B., Maia de Morais, S., Alessandro de Lima, Martins, C.G., Alexandrino, C.D., Ferreria, P.A.T., Rodrigues, A.L.M., Rodrigues, S.P., Silva, J.N., Rodrigues, L.L. (2014) Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Sci. Technol.* **34**, 135 – 142.
- Tang, B., Zhang, H., Row, K.H. (2014) Psychometric evaluation of the simplified chinese version of flourishing scale. *Res. Social Work Prac.* **26**, 591 – 599.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231 – 1246.

Tsao, R., McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavanoids. U: *Fruit and Vegetable Phytochemicals – Chemistry, Nutritional Value, and Stability* (Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Ames, str. 131 – 155.

Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A., Pokomeda, K. (2014) Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresour. Technol.* **160**, 150 – 160.

Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B. (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622-646.

Yu, J., Ahmedna, M. (2012) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**, 221 – 237.

Zhu, L., Zhang, Y., Lu, J. (2012) Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3492 – 3510.

9. SAŽETAK

Ivana Papaik

Veronika Gunjević

Zeleni pristupi u ekstrakciji i izolaciji antocijana iz komine grožđa

Industrija vina proizvodi velike količine nusproizvoda i otpada među kojima je i komina grožđa. Odlaganje komine grožđa kao otpada rezultira zagađenjem okoliša stoga postoji potreba za daljnjim iskorištavanjem ovog nusprodukta. Nadalje, komina crnog grožđa je iznimno bogata polifenolnim spojevima, a ponajviše antocijanima. Antocijani djeluju kao snažni antioksidansi, imaju antibakterijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje te mnoge druge pozitivne utjecaje na ljudsko zdravlje. Kako bi koristili ovu vrijednu skupinu biološki aktivnih spojeva nužna je njihova ekstrakcija, a budući da konvencionalne metode ekstrakcije imaju mnogobrojne nedostatke, potrebno je primijeniti metode zelene ekstrakcije. Stoga je u ovom radu istražena ekstrakcija antocijana iz komine grožđa potpomognuta istovremenom primjenom ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja uz uporabu prirodnog eutektičkog otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES) kolin klorid:limunske kiseline. Optimizacija procesnih parametara ekstrakcije provedena je metodom odzivnih površina. Eksperimentalnom provedbom ekstrakcije pri modelom određenim optimalnim uvjetima, ostvaren je maseni udio ukupnih antocijana u ekstraktu od 1,76 mg $g_{s.tv.}^{-1}$. Navedena zelena ekstrakcija antocijana uspoređena je s ekstrakcijom antocijana iz komine grožđa također potpomognutom istovremenom primjenom ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja, ali pomoću konvencionalnog otapala – zakiseljenog etanola. Pri optimalnim uvjetima eksperimentalnom provedbom ekstrakcije je dobiven maseni udio ukupnih antocijana u ekstraktu od 1,55 mg $g_{s.tv.}^{-1}$. Prema navedenim rezultatima, vidljivo je da se ekstrakcija NADES-om kolin klorid:limunska kiselina pokazala mnogo učinkovitijom za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa od ekstrakcije zakiseljenim etanolom. Nadalje, provedene su i ekstrakcije antocijana iz komine grožđa pomoću NADES-a kolin klorid:limunska kiselina potpomognute samostalnom uporabom ultrazvuka i mikrovalova, te su rezultati ukazali na veću učinkovitost ekstrakcije prilikom istovremene uporabe ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja. Kako bi se omogućila primjena ekstrahiranih antocijana u obliku dodataka prehrani ili lijekova, provedena je izolacija antocijana iz ekstrakta pripremljenog iscrpnom ekstrakcijom uz istovremenu

ekstrakciju ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem pomoću NADES-a kolin klorid:limunske kiseline. Izolacija je provedena na smoli Amberlite XAD-7HP te je pri tome iz ekstrakta izolirano 46,38 % ukupnih antocijana. Prilikom izolacije antocijana na smoli provedena je i reciklacija NADES-a kolin klorid:limunska kiselina kako bi se pokazao industrijski potencijal ove metode te opravdala održivost i ekonomičnost navedenog procesa. Reciklirano je 67,56 % NADES-a. Rezultati izolacije antocijana i reciklacije korištenog otapala su zadovoljavajući i obećavajući, no za daljnje poboljšanje učinkovitosti procesa nužna je optimizacija i daljnja istraživanja.

Priloženi rad predstavlja doprinos razvoju novih, konkurentnih i ekološki prihvatljivih procesa u ekstrakciji bioloških aktivnih spojeva iz nusprodukata prehrambene industrije, s naglaskom na primjenu NADES-a i istovremenog ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja u izolaciji antocijana. Također, rezultati ovog istraživanja mogu dati smjernice i biti korišteni u istraživanjima iskorištavanja i primjene drugih nusproizvoda poljoprivredne i prerađivačke industrije.

Ključne riječi: antocijani, prirodna eutektička otapala, makroporozna smola, ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija

10. SUMMARY

Ivana Papaik

Veronika Gunjević

Green approaches in extraction and isolation of anthocyanins from grape pomace

The wine industry produces large amounts of by-products and wastes, including grape pomace, disposal of which can result in environmental pollution. Therefore, there is a need for further exploitation of this by-product. The grape pomace is extremely rich in polyphenol compounds, mostly anthocyanins, that act as powerful antioxidants and have antibacterial, anti-inflammatory and anticancer activity, to name a few possible positive effects on human health. To use this valuable biologically active group of components, extraction is necessary. Since conventional extraction methods have many drawbacks, especially if we consider their effect on the environment, green extraction methods present an environment-friendly alternative. Thus, in this paper, extraction of anthocyanins from grape pomace assisted by simultaneous ultrasonic and microwave irradiation using natural deep eutectic solvent (NADES) choline chloride: citric acid is presented. The optimization of the process parameters of the extraction was carried out by the Response surface methodology. By performing extraction under optimal conditions determined by the model, a mass fraction of total anthocyanins of $1.76 \text{ mg g}_{\text{d.m.}}^{-1}$ in extract was obtained. The aforementioned green extraction of anthocyanins was also compared with the standard extraction of anthocyanins from the grape pomace assisted by simultaneous ultrasonic and microwave irradiation, by using conventional solvent – acidified ethanol. Under the optimal conditions of extraction, a mass fraction of total anthocyanins of $1.55 \text{ mg g}_{\text{d.m.}}^{-1}$ in ethanol extract was obtained. According to the results, it is evident that the extraction with NADES choline chloride: citric acid is more effective for the extraction of anthocyanins from grape pomace than extraction with acidified ethanol. Furthermore, extraction of anthocyanins from grape pomace using NADES choline chloride: citric acid assisted by separated ultrasound and microwave irradiation was performed, and the results indicated a higher efficiency of extraction when using ultrasonic and microwave irradiation simultaneously. In order to enable the use of extracted anthocyanins in the form of dietary supplements or medications, anthocyanins obtained by extensive extraction assisted by simultaneous ultrasound and microwave irradiation using

NADES choline chloride: citric acid were isolated. Isolation was performed on Amberlite XAD-7HP resin and 46.38% of total anthocyanins was isolated from the extract. During the anthocyanins isolation on the resin, recycling of NADES choline chloride: citric acid was also performed to show the industrial potential of this technology and justify the sustainability and cost-effectiveness of the process. 67.56% of NADES was recycled. The results of the isolation of the anthocyanins and the recycling of the solvent are satisfactory and promising, but to further improve the efficiency of the process, it is necessary to conduct further research and optimization.

Presented paper contributes to the development of new, competitive and environmentally acceptable processes in the extraction of biologically active compounds from by-products of food industry, focusing on the application of NADES and simultaneous ultrasonic and microwave irradiation in the isolation of anthocyanins. The results of this research could be also used as a guidance in exploitation and application of other by-products of the agricultural and processing industry.

Keywords: anthocyanins, natural deep eutectic solvents, macroporus resin, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Papaik

Rođena sam 22.11.1993. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala sam u Lipiku u Osnovnoj školi Lipik, a školovanje nastavljam u Općoj gimnaziji Pakrac u Pakracu.

2012. godine upisujem Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, smjer Prehrambena tehnologija, nakon kojeg sam stekla zvanje sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije sa osvojenim 181 ECTS bodom.

2013. godine odradila sam stručnu praksu na Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, a tijekom ljeta 2015. godine uključila sam se u projekt istraživanja mikrobioloških i biokemijskih promjena tijekom procesa fermentacije crnih maslina na Sveučilištu u Ateni, gdje sam također odradila stručnu praksu.

2015. godine upisujem diplomski studij Bioproceno inženjerstvo na istom fakultetu, a 2016. godine odradila sam stručnu praksu u Plivi. Trenutno sam studentica 2. godine diplomskog studija.

Veronika Gunjević

Rođena sam u Zadru 31.05.1993. godine. Pohađala sam Osnovnu školu u Sukošanu, a 2008. godine upisujem Opću gimnaziju Vladimira Nazora u Zadru.

Godine 2012. upisala sam Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biotehnologija. Tijekom preddiplomskog studija stekla sam B2 razinu poznavanja engleskog jezika.

2015. godine stekla sam zvanje prvostupnice inženjerke biotehnologije. Iste godine upisujem diplomski studij Bioproceno inženjerstvo na istom fakultetu. Trenutno sam studentica druge godine diplomskog studija s prosjekom ocjena 4,455. Ove godine dobila sam certifikat nakon pohađanja radionice „Toksikološka procjena rizika kancerogenih i nekancerogenih tvari iz okoliša“.