Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom pulsirajućeg električnog polja

Gotal, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:615098

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ana-Marija Gotal

EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA PRIMJENOM PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

Popis oznaka, simbola i kratica

HPLC- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

N- dušik

Zn- cink

RSM- metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*)

UAE- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound Assisted Extraction*)

MAE- ekstrakcija mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraxtion*)

PEP- ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (engl. *Pulsed Electric Field*)

HVED- ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem(engl. *High-voltage Electric Discharge*)

SFE- ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Extraction*)

UV- ultraljubičasto zračenje

PCA- metode analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

HCA- metoda hibridnog staničnog automata (engl. *Hybrid Cellular Automaton*)

ANOVA- analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayer u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnološko projektiranje
Tema rada: je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 30. travnja 2020.

Mentor: *doc. dr. sc. Ante Lončarić*
Komentor: *doc. dr. sc. Krunoslav Aladić*
Pomoć pri izradi: *Marija Banožić, mag.ing.preh.*

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom pulsirajućeg električnog polja

Ana-Marija Gotal,

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost ekstrakcije ciljanih bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada i lista duhana primjenom pulsirajućeg električnog polja. U ovom radu utvrđen je utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije (broj pulseva, jakost polja, vrijeme tretiranja i omjer kruto-tekuće) na svojstva i sastav ekstrakata duhanskog otpada i listova kao polazne sirovine. Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) provedena je identifikacija i kvantifikacija nikotina, kao dominantnog bioaktivnog spoja, te klorogenske kiseline i rutina kao najzastupljenijih fenolnih spojeva, a optimizacija postupka ekstrakcije provedena je primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa Design Expert. Udio fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti utvrđen je pomoću spektrofotometrijskih metoda. Predloženo istraživanje pridonosi maksimalnom iskorištenju industrijskog otpada s ciljem dobivanja ekstrakta koji se mogu koristiti u drugim proizvodima ili procesima.

Ključne riječi: duhanski otpad, pulsirajuće električno polje, ekstrakcija

Rad sadrži: 65 stranica
25 slika
12 tablica
0 priloga
52 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	**Prof.dr.sc. Stela Jokić**	**predsjednik**
2.	**Doc.dr.sc. Ante Lončarić**	**član-mentor**
3.	**Doc.dr.sc. Krunoslav Aladić**	**član**
4.	**Doc.dr.sc Antun Jozinović**	**zamjena člana**

Datum obrane: 29. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Process Design and Construction Materials
Franje Kuhača 20, HR- 31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Course title: Technological design
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VI. held on April 30, 2020

Mentor: *doc. dr. sc. Ante Lončarić*
Komentor: *doc.dr. sc. Krunoslav Aladić*
Techical assistance: *Marija Banožić, MSc*

Pulsed Electric Field Extraction of Biosctive Compounds from Tobacco Waste

Ana-Marija Gotal

Summary:

The objective of this study was to investigate the efficiency of extraction of targeted bioactive compounds from tobacco waste and tobacco leaves. Influence of extraction process parameters (number of pulses, field strength, treatment time and solid-liquid ratio) on the properties and composition of tobacco waste extracts and leaves as starting material was determined. Using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD), the identification and quantification of nicotine, as the dominant bioactive compound, chlorogenic acid and rutin as the most abundant phenolic compounds was performed. Optimization of the extraction process was performed using the response surface method using the Design Expert program. The content of phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity was determined using spectrophotometric methods. The proposed research contributes to the concept of maximum utilization of industrial waste where obtained extracts could be used in other products or processes.

Key words: tobacco waste, extraction, pulsed electric field

Thesis contains: 65 Pages
25 Figures
12 Tables
0 Supplement
52 References

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Stela Jokić, PhD, full prof.* — chair person
2. *Ante Lončarić, PhD, assistant prof.* — supervisor
3. *Krunoslav Aladić, PhD,* — member
4. *Antun Jozinović, Phd, assistant prof* — stand in

Defense date: September 29, 2020.

SADRŽAJ

1.UVOD....1
2. TEORIJSKI DIO....3
2.1 DUHAN....4
2.1.2 Duhanski otpad....5
2.1.3 Bioaktivni spojevi u duhanskom otpadu....7
2.2 EKSTRAKCIJA....12
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem....12
2.3 OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE....15
2.3.1. Box-Behnkenov plan pokusa....18
3. EKSPERIMENTALNI DIO....21
3.1. ZADATAK....22
3.2. MATERIJAL....22
3.2.1. Kemikalije i uređaji....23
3.3 METODE....24
3.3.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada i lista duhana potpomognuta pulsirajućim električnim poljem....24
3.3.2. Određivanje ukupnih fenola....25
3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida....27
3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti....27
3.3.5. Određivanje nikotina i fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)....28
3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada i lista duhana primjenom metode odzivnih površina....29
4. REZULTATI I RASPRAVA....30
4.1 OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA I LISTA DUHANA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA....36
5. Zaključak....56
6.LITERATURA....59

1.UVOD

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.*)* je jedna od najraširenijih i najviše kultiviranih biljaka na svijetu. Uzgaja se u više od 130 zemalja. Iako se uzgaja širom svijeta (Wang i sur., 2015), Kina se izdvaja kao najveći proizvođač i potrošač duhanskih proizvoda. Duhan je zeljasta biljka koja se poglavito uzgaja zbog listova, gdje se osušeni listovi prerađuju u cigarete, cigare i duhan za žvakanje. Najkrupnije lišće je ono koje se razvija u srednjem dijelu stabljike, na koje otpada 45 % listova od ukupne berbe (Gadžo i sur., 2011). Duhan je jedna od ekonomski najvažnijih industrijskih biljaka. Različiti procesi od uzgoja samog duhana, obrade i prerade, tijekom proizvodnje duhanskih proizvoda te konzumacije uzrokuju nastanak duhanskog otpada. Proizvodnim procesom može nastati više od 20 % duhanskog otpada (Zhang i sur., 2012) za čije je zbrinjavanje odgovorna duhanska industrija. Pod pojmom duhanski otpad podrazumijevamo: listove, koji nisu zadovoljili klasifikaciju prema važećim standardima, rebro lista, stabljiku i korijen. Biljka duhana sadrži alkaloid nikotin koji nastaje u korijenu, a nakuplja se u listovima odakle nikotin dospijeva u duhanske proizvode i duhanski otpad. Duhanski otpad sadrži visoke razine nikotina koji je glavni alkaloid i ujedno glavni čimbenik ograničenja odlaganja ovog otpada na odlagalištima, zbog njegove toksičnosti, topljivosti u vodi i potencijalne mogućnosti kontaminacije obližnjih voda (Karačonji i sur., 2005). Brojne studije su istraživale alternativne načine postupanja s duhanskim otpadom, koji bi minimalizirali zahtjeve za odlaganje na odlagalištima, uz mogućnost dodane vrijednosti novog proizvoda. Li i sur. (2011) su predložili ekstrakciju vrijednih fenolnih spojeva kao što je klorogenska kiselina, korištenjem Aldrich-ovih metoda ekstrakcije mikrovalovima. Duhanski otpad navodi se kao značajan izvor polifenola među kojima dominiraju klorogenske kiseline čime duhanski otpad može biti vrijedna sirovina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Wang i sur., 2010). Osim nikotina i fenolnih spojeva, duhanski otpad karakterizira visok sadržaj šećera, uključujući glukozu, fruktozu, saharozu i druge polisaharide, što ga čini poželjnim supstratom.

S druge strane Qi i sur. (2008) predlažu primjenu duhanskog otpada za biosorpciju metala i utvrđuju snažnu učinkovitost vezanja za dvovalentne spojeve kao što su: Pb, Cu, Cd, Zn i Ni. Osim toga, duhanski otpad se može koristiti kao dobar insekticid nakon postupka denikotinizacije. Takvim postupkom, dobiva se organski ostatak koji ne uključuje nikotin te može biti briketiran, upotrijebljen kao organski otpad za kompostiranje ili kao gorivo.

Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost ekstrakcije ciljanih bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada i lista duhana primjenom pulsirajućeg električnog polja te utvrditi utjecaj različitih

procesnih parametara ekstrakcije (vrijeme tretiranja, jakost polja, broj pulseva i omjer kruto-tekuće) na svojstva i sastav ekstrakta duhanskog otpada i lista kao polazne sirovine. Istraživanje pridonosi maksimalnom iskorištenju industrijskog otpada s ciljem dobivanja ekstrakta koji bi doveo do smanjenja količine otpada. U 2005. godini ukupna proizvodnja duhanskog otpada iznosila je više od 1,25 milijuna tona (Liu i sur., 2015), Samo u Kini se proizvede 460 milijuna kilograma duhanskog otpada godišnje. S druge strane trenutno jedna od ključnih područja u znanosti čine zelene održive tehnologije koje imaju za cilj očuvanje okoliša i smanjenje mogućih negativnih učinaka na ljudsko zdravlje. Zelene tehnologije nude nove ekološki prihvatljive tehnike ekstrakcije, kontroliranjem fizikalnih svojstava medija kao što su tlak i temperatura, s ciljem smanjenja upotrebe opasnih kemikalija (Dai i sur., 2013).

2. TEORIJSKI DIO

2.1 DUHAN

Duhan (*lat. Nicotiana)* je samooplodna biljka koja pripada carstvu *Plantae,* diviziji: *Magnoliphyta*, razred: *Solanales*, porodica: *Solanacrae*, te rodu *Nicotiana* koja ima preko 60 vrsta (Goodspeed, 1954). Za pušenje se najviše koristi vrsta *N.tabacum* L. Iako je duhan samooplodna biljna vrsta, stranooplodnja se ponekad (do 2 %) provodi insektima. U proizvodnji su zastupljeni linijski i hibridni kultivari, te autohtone selekcije (Stepić i sur., 2015). U svijetu su poznate čak 64 vrste duhana, od kojih ljudi koriste samo dvije vrste: *Nicotiana rustica* i *Nicotiana tabacum* iz porodice *Solanaceae*, a obje su autohtone američke vrste. *Nicotiana rustica* ima znatno veću koncentraciju nikotina i manje listove za razliku od *Nicotiana tabacum*. Također, duhan obično podrazumijeva obrađeno i osušeno lišće te biljke i nekih produkata koji se dobivaju njegovom preradom to jest "Duhan su listovi kultivirane biljne vrste *Nicotiana tabacum* L. u svim oblicima i stupnjevima uzgoja, obrade i pakiranja koji ne služe krajnjoj potrošnji " (Zakon o duhanu, NN 32/19, članak2., 2019).



Slika 1: Građa biljke *Nicotiana tabacum* (https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcQOWY0ZHtDgH5CYQ4FCCBzOuq876IaqM6Iz8g&usqp=CAU)

Listovi duhana prekriveni su žljezdanim dlačicama u čijim glavicama se nalaze smole i eterična ulja, koja su važna za aromu i kvalitetu duhana. Listovi duhana su zbog različite kvalitete podijeljeni u skupine na osnovi insercije branja: podbir, nadpodbir, srednji listovi, podvršak i ovršak. Cvjetovi duhana su bijele, žute ili ružičaste boje i oblikuju se pojedinačno ili češće u skupovima na vrhu glavne stabljike i zaperaka tvoreći štitac, to jest grozd. Plod je ovalni ili okruga smeđi tobolac u kojem se nalazi više od 1000 sjemenki. Masa 1000 sjemenki iznosi od 0,06-0,1 g, a hektolitarska težina iznosi oko 40-45 kg (Jarnević, 2017) Svi dijelovi biljke, izuzev zdravih i neoštećenih listova, odgovarajuće veličine smatraju se poljoprivrednim otpadom, i obično se odlažu na polju (Banožić i sur., 2019). Kemijski gledano, list duhana je složena mješavina različitih organskih i anorganskih tvari. Kemijski sastav lista duhana mijenja se tijekom sušenja, sazrijevanja, fermentacije, prerade i skladištenja, a uvjetovan je načinom uzgoja, klimatskim uvjetima i sortom. Tijekom procesa sušenja raste udio reducirajućih šećera, a smanjuje se istovremeno udio škroba. Osim toga, tijekom procesa fermentacije smanjuje se udio ugljikohidrata i polifenola (Bhisey, 2012; Kopčić, 2011). Svi ti procesi značajno utječu na kemijski sastav ali i osobine duhana pri pušenju.

2.1.2 Duhanski otpad

Pod pojmom duhanski otpad podrazumijevaju se svi dijelovi biljke osim listova. Duhanski list je sastavljen od srednje žile ili glavnog rebra od kojeg se granaju sekundarna rebra što sve čini nervaturu plojke/lamine (tkiva između rebra). Rebro, kao sastavni dio lista, također se smatra otpadom. Postoje različiti tipovi duhana koji podliježu i različitim načinima prerade, te sukladno tome imaju utjecaj na strukturu i sastav duhanskog otpada. Postoje tri vrste duhanskog otpada: poljoprivredni, industrijski, te potrošački otpad (Novotny i sur., 2015). Poljoprivredni otpad uključuje stabljiku duhana koja ima visoki potencijal kao sirovina za proizvodnju pulpe i papira. Nadalje, uključuje sjemenke duhana koje se mogu koristiti u proizvodnji biodizela zbog značajne količine ulja, a sjemenke kao takve ne sadrže nikotin (Ganapathi i sur., 2004). Tijekom samog procesa prerade lista nastaje više vrsta otpada, koji se razlikuju po mjestu, granulaciji i procesu izdvajanja te udjelu vlažnosti. Ne postoji opća definicija duhanskog otpada. On se obično definira kao kruti otpad, koji nastaje tijekom proizvodnje duhana, te se opisuje kao duhan niske kvalitete i duhanska prašina (Chen i sur.,

2007). Najveća količina duhanskog otpada nastaje tijekom procesa pripreme duhanske mješavine za izradu cigareta dok s druge strane tijekom transporta i manipulacije gotove duhanske mješavine nastaje manja količina duhanske prašine. Tijekom tehnološkog procesa pripreme duhana, izrade i pakiranja cigareta izdvajaju se sljedeći frakcije korisnog otpada: refabrikat (*engl.* scrap) , rebro lista (*engl.* midrib) i prašina (*engl*. dust), tj. čestice veličine do 0,5 mm.



Slika 2: Industrijski duhanski otpad: a) refabrikat, b) rebro lista c)duhanska prašina

(Izvor: Banožić i sur.,2018)

Refabrikat su mali komadići lišća duhana koji su nastali tijekom obrade duhana i nisu prikladni za daljnju obradu. Rebro je dio biljke koji se pruža iz stabljike, te može uzrokovati probleme u obradi cigareta kao što su rupe i promjene u karakteristikama tijekom pušenja (Zielke i sur., 1997).

Ostaci duhana iz primarne proizvodnje i proizvodnje cigareta klasificirani su kao poljoprivredno- industrijski otpad. Nikotin je topiv u vodi te isparljiv i kao takav može ispariti iz duhanskog otpada tijekom nepravilnog skladištenja ili migrirati u okoliš i podzemne vode. Zbog njegovog potencijalno štetnog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje, zbrinjavanje tog otpada postalo je pitanje od javnog interesa (Li i sur.,2011; Zhang i sur., 2012; Chen i sur., 2008). S druge strane, duhanski otpad sadrži niz vrijednih kemijskih sastojaka kao što su: solanesol, sklareol, vitamin E, riboflavin, nikotin, koji se mogu izdvojiti različitim metodama kemijske ekstrakcije i rafiniranja. Također, duhanski otpad se smatra dobrim izvorom bioaktivnih tvari koje se mogu koristiti u farmaceutskim, kemijskim i drugim industrijama (Wang i sur., 2010).

Svi nusproizvodi duhanskog lista pronalaze primjenu u proizvodnji duhanskih proizvoda, najčešće kao sastavnice rekonstituiranog duhan/duhanske folije, ali se na taj način reciklira samo 40 % duhanskog otpada (Li i sur., 2011). Da bi bio iskoristiv, duhanski otpad mora udovoljavati određenim zahtjevima, među kojima je vlažnost ispod 12 % te odsustvo stranih primjesa. Industrijski duhanski otpad je obično vlažan je materijal s pH-vrijednosti od 5,1 do 6,7, omjer C:N je od 17:1 do 21:1 i sadrži znatne količine nikotina (Kopčić, 2011; Vuković i sur., 2012). Nekoliko je načina iskorištenja duhanskog otpada, a neki od njih su proizvodnja energije postupka pirolize, dobivanje bioplina, biodizela ili biostabilizirani materijal za odlaganje, a u novije vrijeme sve se više nameće ekstrakcija bioaktivnih komponenti.

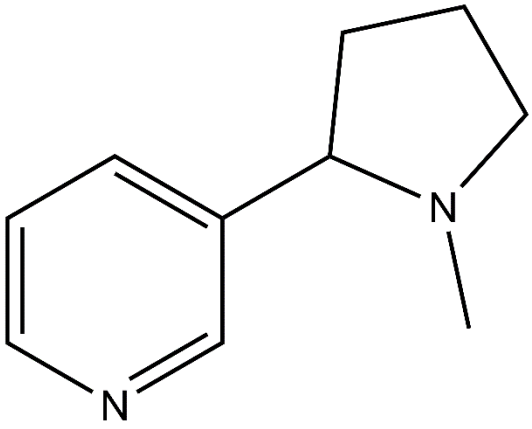
2.1.3 Bioaktivni spojevi u duhanskom otpadu

Iz duhana je izolirano i identificirano više od 40 vrsta alkaloida koji predstavljaju skupinu bioaktivnih komponenti koje su u duhanu i duhanskom otpadu najviše istražene. Bioaktivne komponente su produkti sekundarnog metabolizma biljke koji joj ne trebaju za rast i reprodukcije već za zaštitu i obranu od biotičkih i abiotičkih čimbenika stresa. S druge strane bioaktivne komponente za ljudski organizam imaju funkciju liječenja bolesti ili preventive. Istraživanja su pokazala da bioaktivne komponente mogu imati komplementarne i preklapajući mehanizam djelovanja kao što su:

- Indukcija zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze,
- Antioksidativna aktivnost i vezanje slobodnih radikala,
- Regulacija ekspresije gena kod stanične proliferacije, diferencijacije onkogena i tumor supresor gena,
- Stimulacija imunološkog sustava,
- Modulacija enzimskih aktivnosti u detoksikaciji, oksidaciji i redukciji,
- Regulacija hormonalnog metabolizma,
- Antibakterijski i antivirusni učinci (Liu, 2015).

2.1.3.1 Nikotin

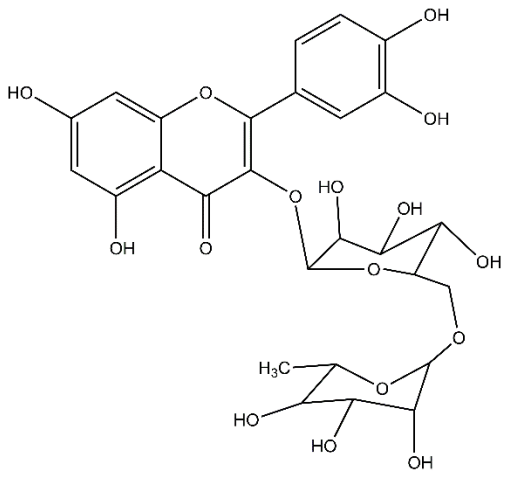
Nikotin u čistom stanju je bezbojna, uljasta tekućina bez mirisa, iako ponekad može biti do svijetlosmeđe boje zbog prisutnih onečišćenja. Glavni je alkaloid lišća duhana i čini preko 95 % sadržaja alkaloida u duhanu. Smrtonosna doza mu je oko 50 mg, a u duhanu za pušenje ima ga između 1 i 3 %. Sadržaj nikotina prvenstveno određuje sorta, ali i uvjeti uzgoja. Manje od 1 % nikotina sadrži slabiji duhan, srednje jaki između 1 i 2 %, a jaki više od 2 %. Nikotin zbog svoje topljivosti u vodi predstavlja značajan ekološki problem kod odlagališta duhanskog otpada, gdje on zajedno s padalinama dospijeva u podzemne vode (Karačonji, 2005; Vuković i sur., 2012). Osim ekoloških problema, nikotin ima akutnu i kroničnu toksičnost te negativan utjecaj na krvožilni, dišni, gastrointestinalni i imunološki sustav čovjeka (Karačonji, 2005). S druge strane nikotin ima široku primjenu od farmaceutske, kemijske industrije, kao i u duhanskoj industriji kao osnovni aditiv za proizvodnju cigareta. Također, dokazano je pozitivno djelovanje nikotina kod bolesnika sa demencijom (White i Levin, 1999), šizofrenijom (Levin i sur., 1996), blagom kognitivnom disfunkcijom (Newhouse i sur., 2012), te dopaminergičkim neuronima i aksonima (Maggio i sur., 1998). Miozmin, nikotirin, nornikotin te anabazin i anatabin su nenikotinski alkaloidi duhanskog otpada, koji zbog svoje kemijske strukture slične nikotinu aktiviraju nikotinske acetilkolinske receptore te se, kao i nikotin, primjenjuju u liječenju različitih neurodegenerativnih bolesti (Clemens i sur., 2009). Zbog svoje visoke toksičnosti nikotin se može koristiti kao pesticid, a upotrebljava se u sintezi niacina i niacinamida.



Slika 3: Kemijska građa alkaloida nikotina (Izvor: Autor)

2.1.3.2 Fenolni spojevi

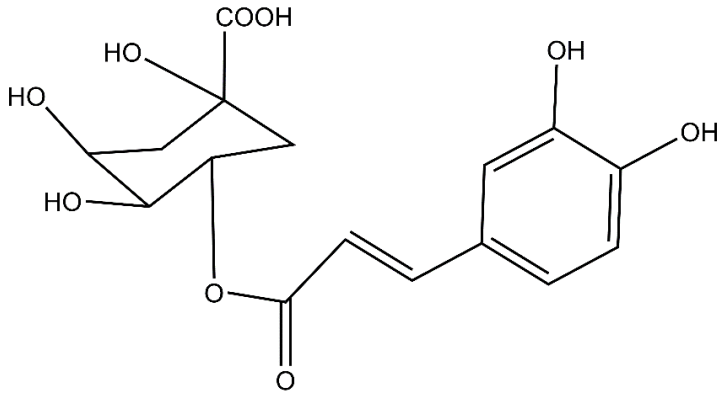
Fenoli su skupina spojeva koja se sastoji od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatski ugljikovodik. Najjednostavniji takav spoj je fenol. Najzastupljeniji fenolni spojevi u duhanu su: klorogenska kiselina i rutin. Rutin je prirodni antioksidans i jedan od medicinski najvažnijih flavonoida. Njegov udio u osušenom duhanu iznosi oko 1 %, što čini duhan dobrim izvorom ovog spoja. Fermentirani listovi duhana sadrže manje rutina (oko 0,5 %) od nefermentiranih (oko 1,5 %). Uzrok tome je da se rutin razgrađuje djelovanjem enzima u procesu fermentacije (Fathiazad i sur., 2006). Rutin djeluje blagotvorno pri liječenju proširenih vena, modrica i varikoznih vena. Nadalje, rutin je dio fitokemijske skupine spojeva čija "zaštitna" svojstva uključuju antimikrobno, antioksidacijsko, antikancerogeno i kardiovaskularno-zaštitno djelovanje (Gobbo-Neto i sur., 2008). Zbog toga je vrlo važno, razviti nove alternativne izvore za njegovo dobivanje. Pri tome je važno osigurati homogenost duhanskog otpada kao i riješiti probleme prilikom njegovog prikupljanja (Fathiazad i sur., 2006; Wang i sur., 2010).



Slika 4: Rutin (Izvor: Autor)

Klorogenska kiselina je jedna od kafeoilkinih kiselina, koje imaju antibakterijska, antioksidativna, antikancerogena i antimutagena svojstva te ima inhibitorno djelovanje na HIV-1 RT, humani herpes simplex virus, virus ptičje gripe (AIV-H5N1) i teški akutni respiratorni sindrom (SARS) (Wang i sur., 2010). Klorogenska kiselina ima široku primjenu u medicini,

prehrambenoj industriji i proizvodnji kemikalija. Dosadašnji izvori klorogenske kiseline su vrlo skupi i teško dostupni, te je vrlo važno pronaći novi izvor za njihovu proizvodnju. Pored klorogenske kiseline, u duhanskom otpadu izolirane su neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina (Wang i sur.,2010). Dosadašnji postupci ekstrakcije su uglavnom podrazumijevali konvencionalne tehnike ekstrakcije no dokazano je da ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom daje puno bolje rezultate od klasične ekstrakcije (Chen i sur.,2 007). Istraživanja *in vitro* pokazala su da klorogenska kiselina (engl. Chlorogenic Acids, CGAs) smanjuje pretilosti, poboljšava osjetljivost na inzulin zbog čega se može primijeniti za prevenciju i liječenje dijabetesa tipa 2 (Ma i sur., 2015). Također, klorogenska kiselina pokazuje antikoagulacijsko djelovanje te smanjuje stvaranje ugrušaka čime prevenira kardiovaskularne bolesti (Fuentes i sur., 2014). Pronalazak najučinkovitije metode za ekstrakciju je otežan jer je CGAs podložna promjenama temperature što rezultira unutarmolekularnom izomerizacijom, transesterifikacijom, ali i degradacijom klorogenskih kiselina (Farah i sur., 2005; Jaiswal i sur., 2012; Xue i sur., 2016).



Slika 5: Kemijska građa klorogenske kiseline (Izvor: Autor)

2.1.3.3 Solanesol

Solanesol je aciklički triseskviterpenski alkohol, koji je otkriven 1956. godine i izoliran upravo iz duhana. Uglavnom se nalazi u dimljenom sušenom duhanu sa sadržajem od 0,5 % do 1 %. Solanesol posjeduje antibakterijska, antioksidacijska i antiupalna svojstva, te u kombinaciji sa nikotinom snažno inhibira rast bakterija kao što su: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i

Micrococcus lysodeikticus. Također, solanesol se koristi u farmaceutskoj industriji za sintezu koenzima Q10 i kao analog vitaminu K (Duan i sur., 2016; Keča i sur., 1997; Hu i sur., 2015). S obzirom da koenzim Q10 prisutan na tržištu u obliku dodatka prehrani i to za olakšavanje bolova izazvanih migrenama (Sandor i sur.,2005), zaštitne uloge kod Parkinsonove te drugih neurodegenerativnih bolesti (Matthews i sur., 1998; Shults i sur., 2002; Müller i sur., 2003), pozitivnog učinka na regulaciju krvnog tlaka te glikemije kod bolesnika s dijabetesom tipa 2 (Hodgson i sur.,2002), potražnja za solanesolom je u porastu (Lipshutz i sur., 2005). S obzirom da je sinteza solanesola vrlo zahtjevna zbog njegove složene kemijske strukture, za njegovo dobivanje najčešće se koristi ekstrakcija iz biljnih sirovina, kao što su duhan, rajčica, krumpir, patlidžan i paprika. Dobivanje ovog spoja iz otpada biljnog podrijetla bilo bi u potpunosti u skladu s principima održive poljoprivrede (Yan i sur., 2015).

2.1.3.4 Ugljikohidrati

Duhan sadrži mnogo polisaharida, uključujući hemicelulozu, celulozu, lignin, itd. Sadržaj ugljikohidrata može doseći do 22 % suhe tvari duhana. Istraživanje je pokazalo da polisaharidi duhana imaju antioksidaciju aktivnost (Xu i sur., 2014). Ugljikohidrati prisutni u duhanu sudjeluju zajedno s aminokiselinama u Maillardovim reakcijama i tako stvaraju karakteristične arome i boju duhana (Banožić i sur., 2018)

2.1.3.5 Ostale bioaktivne komponente u sastavu duhanskog otpada

Jedna od prirodnih fenolnih spojeva široko rasprostranjenih u biljnim materijalima je kofeinska kiselina, a nedavne farmakološke studije pokazale su da kofeinska kiselina im antihiperglikemijski, antioksidativni (Chen i Ho, 1997; Gülçin, 2006), antidepresivni (Takeda i sur., 2002) i antikarcinogeni učinak (Gao i sur .,2000). Wang i sur. (2009) su u svom istraživanju predložili otpad u duhanskoj industriji potencijalnom sirovinom za proizvodnju kofeinske kiseline.

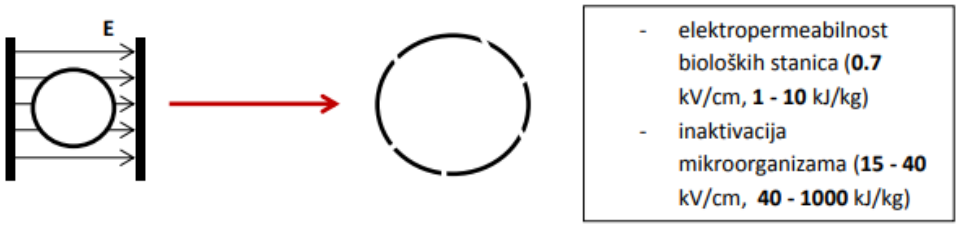
2.2 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz tekuće ili čvrste smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. U svrhu analize određene bioaktivne tvari u nekom uzorku potrebno ih je izolirati, a po potrebi i koncentrirati. Metode izolacije, odnosno ekstrakcije i koncentriranja, mogu biti različite i mogu se kombinirati ovisno o veličini, stabilnosti, polarnosti i naboju molekula i vrsti uzorka. Postoje dvije vrste ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje dviju faza: ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija čvrste-tekuće (izlučivanje). Princip ekstrakcije sadržan je u pojavi molekulske difuzije koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir (Lovrić, 2011). Proces ekstrakcije temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa u dva otapala koja se ne miješaju, gdje dolazi do razdvajanja tvari između dva otapala. Dobiveni ekstrakt mora se pročistiti kako bi izdvojili bioaktivnu tvar u čistom obliku. Pročišćavanje ekstrakta provodi se filtriranjem, odnosno dodatkom aktivne tvari na koje se vežu pojedini sastojci i talože i/ili centrifugiranjem (Liafu i Zelong, 2008). Čimbenici koji utječu na učinkovitost i brzinu ekstrakcije su topljivost tvari u otapalu, temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija (temperature rijetko kada prelaze 100 °C), veličina čestica, gibanje otapala i površina namirnica izloženoj otapalu. Učinkovitija je ekstrakcija na višim temperaturama zbog toga jer dolazi do povećanja brzine otapanja tvari, povećanje brzine difuzije tvari (Raso i sur., 1999). Ekstrakcija superkritičnim fluidom/ima (*engl.* Supercritical Fluid Extraction-SFE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*engl.* Ultrasound Assisted Extraction- UAE), ekstrakcija mikrovalovima (*engl.* Microwave Assisted Extraction-MAE), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (*engl.* Pulsed Electric Field-PEF) te ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (*engl.* High-voltage Electric Discharge -HVED) su nekonvencionalne, inovativne metode koje su učinkovitije, brže, zahtijevaju manju upotrebu otapala i energije te su stoga ekološki prihvatljivije te postupno zamjenjuju konvencionalne metode (Devgun i sur.,2012).

2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

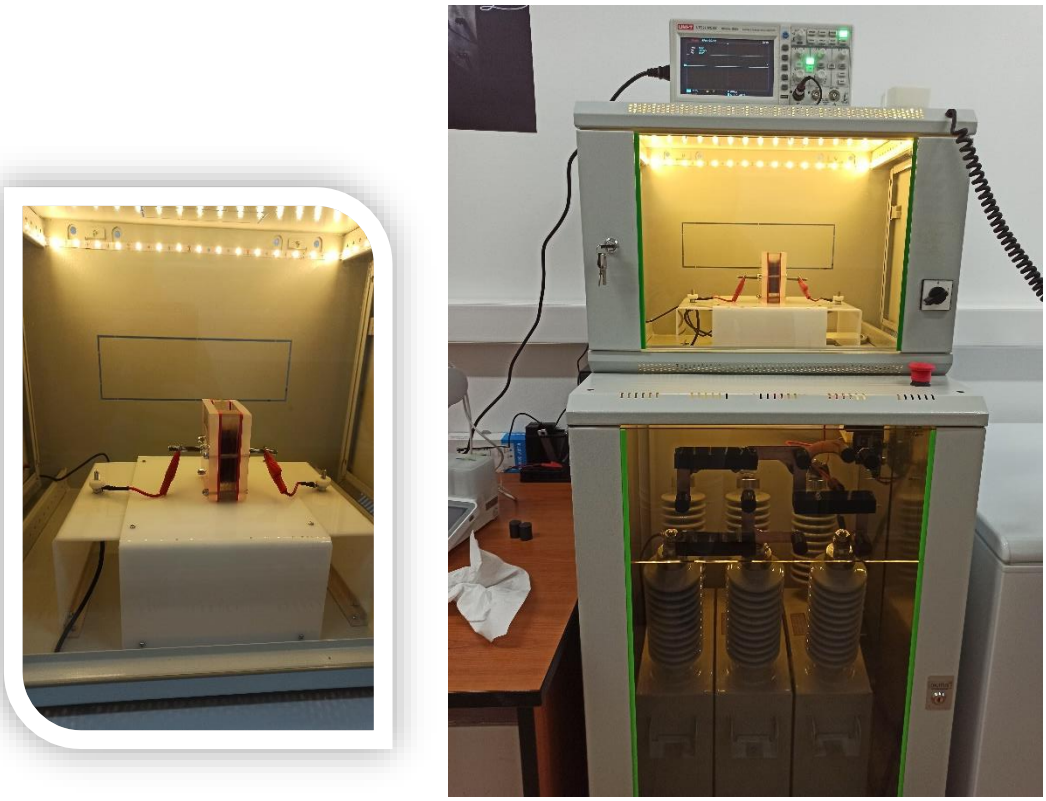
U cilju proizvodnje mikrobiološki ispravnog proizvoda s minimalnim narušavanjem senzorskih i nutritivnih svojstava, stvoren je veliki interes u prehrambenoj industriji za razvoj i primjenu

ne-toplinskih tehnologija poput pulsirajućeg električnog polja (PEP), ultrazvuka, ultraljubičastog zračenja (UV) i drugih. Glavna karakteristika tih metoda je tretiranje namirnice pri sobnoj temperaturi u kratkom vremenu što može rezultirati kraćem trajanju tehnološkog procesa, uštedom energije, a u konačnici se dobiva minimalno procesiran proizvod koji sadrži organoleptička i nutritivna svojstva slična izvornoj sirovini. Iz navedenih činjenica se ne-toplinske tehnike smatraju „zelenim"- „green tehnologijama". Primjena pulsirajućeg električnog polja se temelji na provođenju namirnica između dvije elektrode gdje se stvaraju pulsevi visokih napona. PEP se temelji na punjenu kondenzatora izvorom istosmjerne struje koji se nakon toga prazne u obliku pulseva. Primjenu pulsirajućeg električnog polja (PEP) moguće je provesti na različite načine i to bipolarnim ili oscilirajućim pulsevima, eksponencijalno padajućim ili pravokutnim valovima. Letalni utjecaj na mikroorganizme određuju različiti oblici valova. Primarno mjesto djelovanja pulseva je omotač stanice odnosno stanična stjenka i stanična membrana kod organizama koji posjeduju istu.



Slika 6: Prikaz elektroporacije i jakosti el. polja potrebne za promjene na stanicama (Toepfl i sur.,2006)

Pulsevi visokog napona imaju mogućnost destabilizacije lipidno-proteinskog sloja stanične stjenke, što uzrokuje bubrenje i krajnje pucanje stanične stijenke zbog propuštanja molekula koje inače nisu propusne kroz lipidno-proteinski sloj. Ta pojava se naziva elektroporacija (Sale i Hamilton, 1968). Osim toga, tretman pulsirajućim električnim poljem pokazao se nedovoljnim za inaktivaciju spora u proizvodima (Grahl i Maerkl, 1996).



Slika 7: Prikaz Grom -uređaja za tretiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (Izvor: autor)

Procesiranje hrane pulsirajućim električnim poljem je inovativna tehnika koja omogućava:

- Obradu tekuće i polutekuće hrane, analoga hrane, te modelnih otopina pri kontroliranim uvjetima s mogućnošću povezivanja s ostalim inovativnim ili klasičnim toplinskim procesnim uređajima,
- znanstvena istraživanja s ciljem iskorištavanja potencijala tehnologije koja je bazirana na dezintegraciji tretiranog medija u svrhu ekstrakcije bioaktivnih tvari inaktivaciji mikroorganizama,
- razvoj metoda i određivanje optimalnih uvjeta procesiranja za određeni proizvod te prijenos procesnih parametara iz laboratorijskih mjerila u poluindustrijske/ industrijske sa ili bez umrežavanja sa ostalim klasičnim ili inovativnim procesnim uređajima.

Uređaj za PEP sastoji se od:

- Spremnika energije/ kondenzatora u kojem se energija skladišti, a potom prazni u obliku pulsa unutar komore,

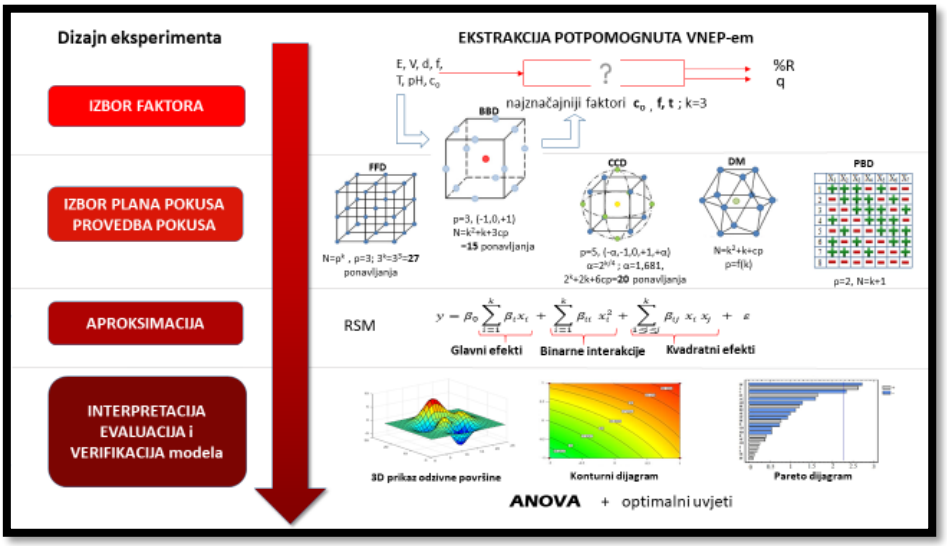
- visokonaponskog generatora koji je izvor visokog istosmjernog napona od 30 kV, te maksimalne snage od 120 W i maksimalnog iznosa struje od 10 mA,
- visokonaponske sklopke koja osigurava pražnjenje spremnika u određenom intervalu,
- komore za tretiranje s paralelnim pločama od nehrđajućeg čelika s razmakom od 1 cm, upravljačkog sklopa za automatsko upravljanje te upravljač pomoću kojega možemo upravljati uređajem sa sigurne udaljenosti, a sastoji se od tipki za pokretanje i zaustavljanje te tipki za podešavanje jakosti, trajanja i broja pulseva (Jelinic i sur.,2020).

2.3 OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

Optimizacija je neizbježan korak u svakoj analitičkoj tehnici i industrijskom procesu koji podrazumijeva podešavanje procesa preko skupa odabranih parametara, uz uvažavanje svih relevantnih procesnih ograničenja s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti uz minimalni eksperimentalni i financijski angažman (Banga i Seider, 1996). Pojam optimizacije je uobičajeno korišten u analitičkoj kemiji kao sredstvo otkrivanja uvjeta u kojima se primjenjuju postupci koji stvaraju najbolji mogući odziv. Optimizacija u analitičkoj kemiji provodi se zbog praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na neki eksperimentalni odziv. Kod ovakve optimizacije jedan faktor je bio podložan promjeni dok se drugi držao na konstantnoj razini (Bezerra, 2008). Nije moguće dobiti stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces budući da većina tehnoloških procesa ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre. Razlog tome je što takav pristup optimizacije zahtjeva veliki broj eksperimenata i veliki utrošak vremena, a ne uzima u obzir interakciju promatranih parametara procesa. Međutim u novije vrijeme sve se više u optimizaciji procesa koriste multi varijantne statičke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa (Liyana-Pathirana, 2005).

Za određivanje optimalnih uvjeta procesa primjenjuju se tzv. multivarijabilne statističke analize koje, za razliku od jednovarijabilnih, uključuju interaktivne efekte među ispitivanim

varijablama, a jedna od najčešće primijenjenih je metoda odzivnih površina (*engl. Response Surface Methodology*, RSM) (Czitrom, 1999). RSM predstavlja skup empirijskih i statističkih tehnika kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nezavisnih varijabli (faktori, procesni parametri) na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja, razvoja i optimiranja procesa. RSM prvi su uveli Box i Wilson sredinom 20. stoljeća, a kasnijoj popularizaciji ove tehnike pridonio je Montgomery (Myers i Montgomery, 1995; Bezerra i sur., 2008; Edwards i Jutan, 1997).



Slika 8: Faze procesa optimizacije primjenom RSM-a (adaptirano prema Witek-Krowiak i sur.,2014)

Osnovni koraci u RSM (prikazano na **slici 8**) kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta su:

- Izbor nezavisnih varijabli koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara,
- izbor plana pokusa i provođenje pokusa prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara,
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko- statičkih metoda,
- evaluacija prikladnosti modela,
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (Bezerra, 2008).

Prije primjene ove metode potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti iz ispitivanog eksperimentalnog područja. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna ploha. Funkcija koja opisuje odzivnu plohu je odzivna funkcija. Ona prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Nadalje, dizajn eksperimenta ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulju odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom samo u tim slučajevima se koristi dizajn eksperimenta za model prvog reda. Tada je dobivena aproksimacija funkcije modela prvog reda (1). Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \ldots \beta_i \cdot x_i + \varepsilon \qquad (1)$$

S druge strane za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine odnosno dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{I} \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^{I} \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i<j} \sum_{i=2} \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \qquad (2)$$

Gdje su:

β_0 -konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

Y- modelom predviđena odzivna funkcija,

β_i -koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ij} -koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

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

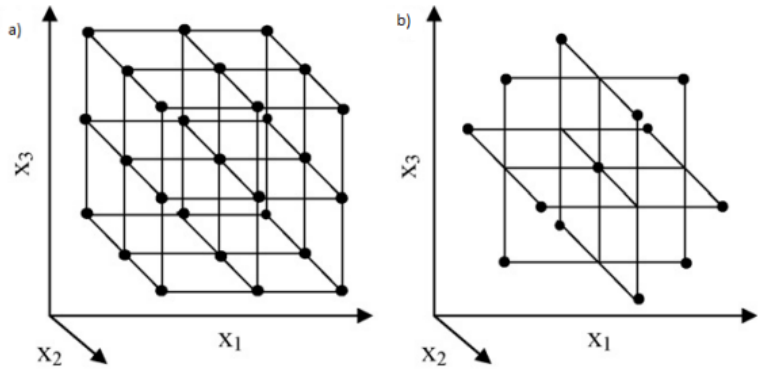
Takvi modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te njihove interakcije, informacije o minimumu i maksimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Nekoliko najčešće korištenih planova pokusa su: plošno centrirani kompozitni

plan (*engl.* Face centred composite design- CCF) , Box-Behnken plan pokusa (*engl.* Box-Behnken design- BBD) , centralno kompozitni plan pokusa (*engl.* Central composite deisgn- CCD) te faktorijalni plan pokusa *(engl.* Full factorial design- FFD). Navedeni planovi razlikuju se prema broju potrebnih pokusa, odabiru eksperimentalnih točaka, te razinu ispitivanih varijabli (Bezzera, 2008).

2.3.1. Box-Behnkenov plan pokusa

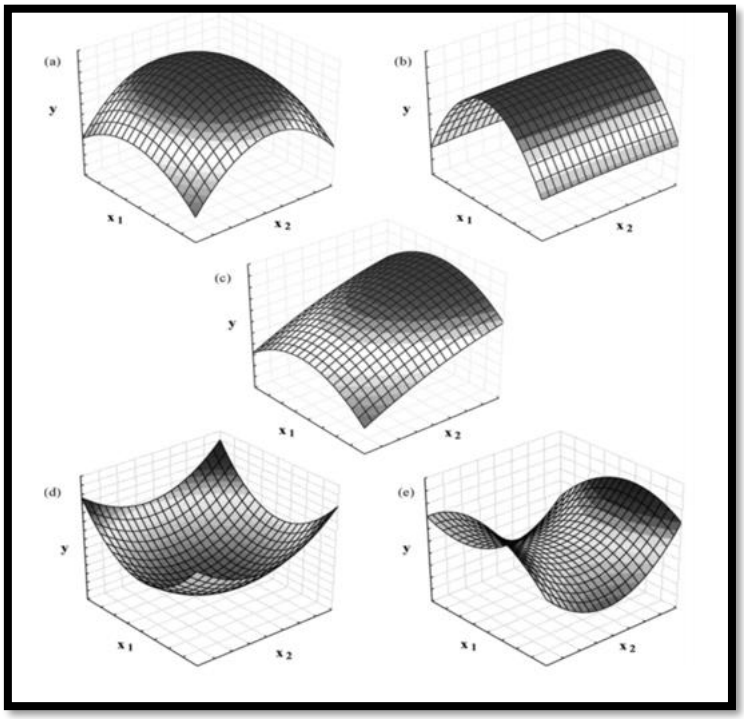
Box- Behnkenov plan pokusa ima prednosti nad ostalima u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broju eksperimenata koje je potrebno izvesti. Ovaj plan pokusa je alat za multivarijabilnu optimizaciju koji se uvrštava u skupinu nezavisnih kvadratnih planova pokusa i koji nije baziran na punom ili djelomičnom faktorskom planu pokusa. Nadalje, dizajn je učinkovit i efikasan zbog mogućnosti ispitivanja većeg broja varijabli i to od 3 do 10. Osnovne karakteristike ovog plana pokusa su sljedeće:

- Sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1,0,1) s jednakim intervalom između razina,
- Zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu: $N= 2^k (k-1)+ C_p$, gdje je k broj faktora, a C_p je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki.



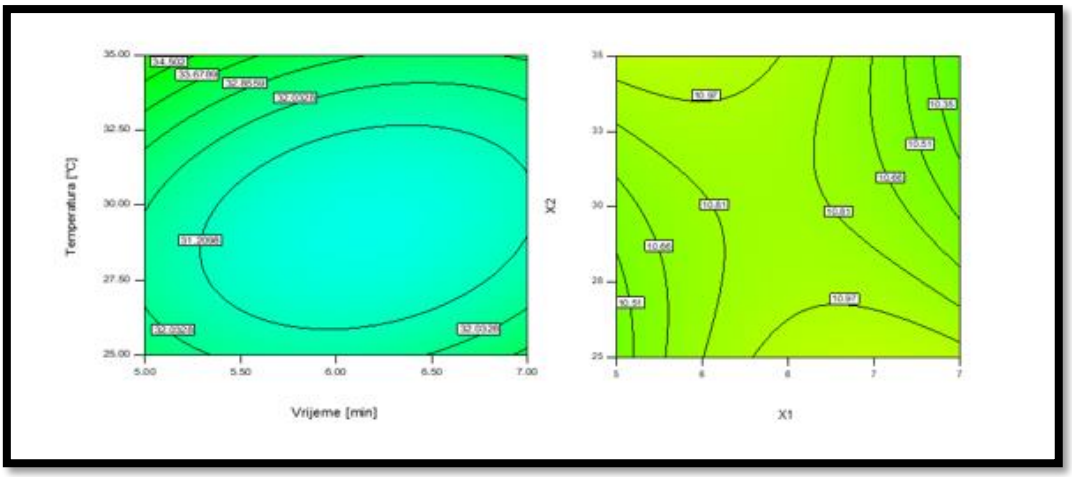
Slika 9: Primjer Box-Behnkenovog dizajna za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka (Bezzera, 2008)

Rezultate promatranog procesa (odziv), moguće je opisati i grafički, odzivnom površinom (plohom). Odzivne površine prikazuju se u cijelom eksperimentalnom području s dvije dimenzije, s tri dimenzije pomoću 3D dijagrama (**Slika 10**) ili kao konturne površine (**Slika 11**) (Cox i Reid,2000; Montgomery i Runger, 2003).



Slika 10: 3D prikaz mogućeg izgleda odzivnih površina (Bezerra,2008)

U većini RSM problem je oblik veze između odzivnih i nezavisnih varijabli nepoznati, **slika 10,** prikazuje moguće oblike te veze. Veza između odziva (Y) i nezavisnih varijabli (x_1 i x_2) može biti opisana nelinearnom ili linearnom funkcijom različitog izgleda (sedlast, sa lokalnim maksimumom ili minimumom , u obliku visoravni i sl.).



Slika 11: Primjer odzivne površine prikazane konturnim dijagramom (s dvije varijable) (Bezerra, 2008)

S druge strane konturni dijagram prikazuje konture odzivne površine, odnosno linije konstantnog odziva. Promjena razine nezavisnih varijabli (X_1 i X_2) rezultira promjenom visine ili oblika promatranog odziva pri čemu nastaju različiti izgled odzivne površine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada realiziran je na Katedri za tehnologiju ugljikohidrata, Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale, Katedri za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode na Prehrambeno- tehnološkom fakultetu Osijeku, u sklopu projekta "Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnog podrijetla" (HRZZ-UIP-2017-05-9909).

3.1. ZADATAK

- Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provesti ekstrakciju suspenzija na uređaju za pulsirajuće električno polje , pri vremenu trajanja pulsa od 22 do 66 s, jakosti polja od 4 do 12 kV/cm, broju pulseva od 10 do 50 i omjeru tekuće/kruto od 10 do 30 mg/g
- određivanje sadržaja ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima,
- određivanje ukupnih flavonoida u dobivenim ekstraktima,
- određivanje antioksidacijske aktivnosti u dobivenim ekstraktima,
- određivanje nikotina i fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u dobivenim ekstraktima,
- provesti optimizaciju procesa ekstrakcije uz primjenu programa Design Expert, metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box- Behnkenovom planu pokusa.

3.2. MATERIJAL

Duhanski otpad i list korišten u eksperimentalnom dijelu ustupila je tvornica za preradu duhana „Fabrika duhana Sarajevo".



Slika 12: Prikaz duhanskog lista i refabrikata (Izvor: autor)

3.2.1. Kemikalije i uređaji

- Metanol (J.T.Baker, SAD),
- Folin-Ciocalteuov reagens (Sigma-Aldrich , SAD),
- Fosforna kiselina (J.T.Baker, SAD),
- DPPH (Sigma-Aldrich, SAD),
- Standard klorogenske kiseline, čistoće 96,63 % (Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka),
- Standard Nikotina, čistoće 97 % (Sigma-Aldrich , SAD),
- Standard Rutina, čistoće 94% (Sigma-Aldrich , SAD),
- $NaCO_3$ (J.T.Baker, SAD).

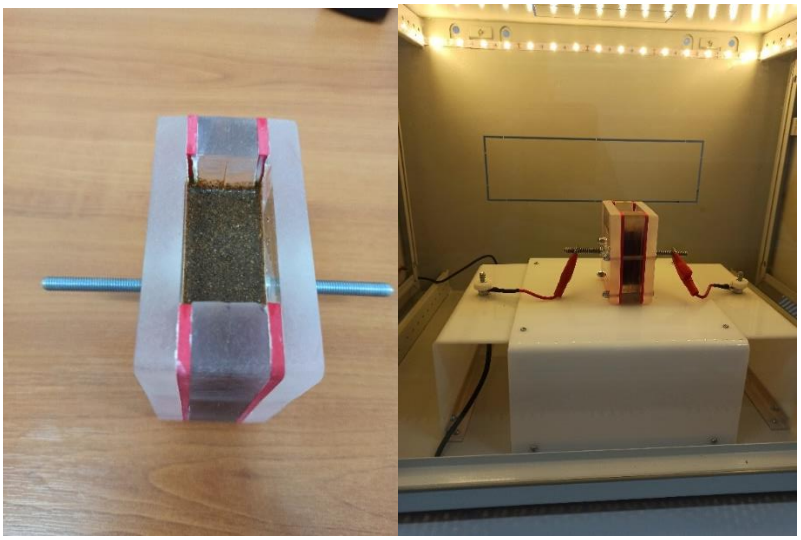
Uređaji:

- Analitička vaga AdventurerPro (Ohaus, SAD),
- Tehnička vaga,
- Spektrofotometar UV-1280 (Shimadzu Japan),
- Spektrofotometar Thermospectronic Heliosy (Thermo Fisher Scientific, SAD),
- Uređaj za visoko tlačnu tekućinsku kromatografiju s DAD detektorom (Agilent Technologies, SAD),
- Grom – uređaj za primjenu pulsirajućeg električnog polja (Osijek, Hrvatska).

3.3 METODE

3.3.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada i lista duhana potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

Pripravljene su suspenzije duhanskog otpada (duhanski list i refabrikat) u destiliranoj vodi različitih omjera tekuće-kruto. Suspenzije su homogenizirane na magnetskoj miješalici, a potom tretirane pulsirajućim električnim poljem pri 4, 8 i 12 V/cm u trajanju od 22, 44 i 66 s prema Box-Behnken-ovom planu pokusa. Tretman ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem proveden je uz pomoć uređaja “Grom“ koji je u suradnji sa fakultetom FERIT, konstruiran na Prehrambeno- tehnološkom fakultetu.



Slika 13: Prikaz homogenizirane suspenzije i unutrašnjosti uređaja “Grom“ (Izvor: autor)

Nakon provedbe samog procesa ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem, uzorci su filtrirani kroz filter papir kako bi razdvojili tekućinu od krutine.



Slika 14: Prikaz uzorka nakon ekstrakcije i filtracije (Izvor: autor)

3.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određivani su metodom po Folin-Ciocalteu, koja je spektrofotometrijska metoda i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenih produkata. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Reducirani Folin- Ciocalteu reagens ima stabilnu plavu boju, dok nereducirani je žute boje. Određivanjem apsorbancije kod 765 nm mjeren je intenzitet obojenja u odnosu na slijepu probu. Reagensi: Folin- Ciocalteu reagens (Folin-Ciocalteuov reagens je smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline) i 20 %-tna otopina natrijeva karbonata (otopljeno 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 L vode kuhanjem).

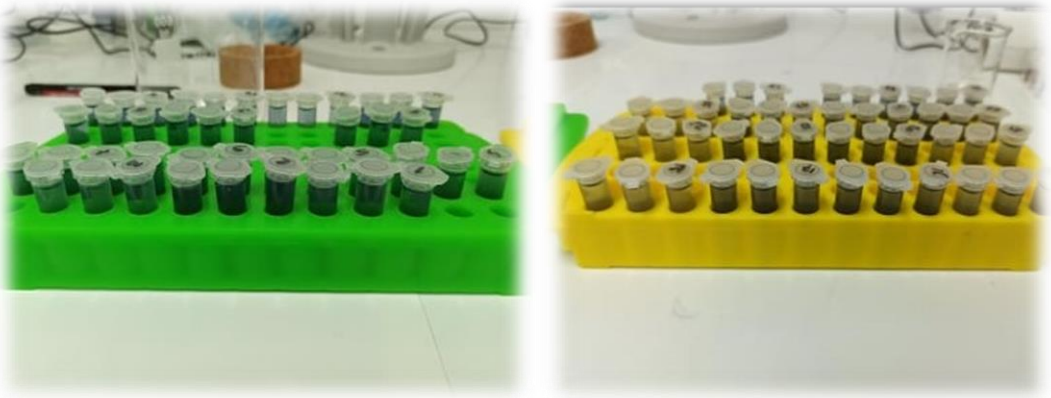
Postupak:

U Eppendorf epruvetu je dodano 20 µL uzorka razrijeđenog na 10 mg/ml te se doda 100 µl Folinovog reagensa, 300 µl 20 %-tnog natrijeva karbonata, zatim 1580 µL mQ vode. Slijepa proba pripravljena je kako slijedi: 100 µL Folinovog reagensa, 300 µl natrijeva karbonata, te 1600 µl mQ vode.



Slika 15: Prikaz postupka pripreme uzorka (Izvor: autor)

Uzorci su u prethodno zagrijanom uređaju za inkubaciju/ termostatiranje termostatirani 30 min na 40°C , nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom na 765 nm u tri paralele. Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama te izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po g suhe tvari.



Slika 16: Promjena obojenja u odnosu na slijepu probu (Izvor: autor)

3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Prije samog određivanja ukupnih flavonoida izrađena je baždarna krivulja kvercetina, koji je korišten kao standard u rasponu koncentracija od 4µg/ml do 200 µg/ml u metanolu. Zatim je određena apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine kvercetina te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji kvercetina. Zatim je pripremljena 2%-tna otopina $AlCl_3$: 2 g $AlCl_3$ + 100 mL MeOH). Postupak određivanja ukupnih flavonoida odrađen je u tri paralele prema radu Marinova i sur., (2005). Određen je udio flavonoida u uzorcima u odnosu na slijepu probu) mjerenjem na valnoj duljini od 420 nm.

3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

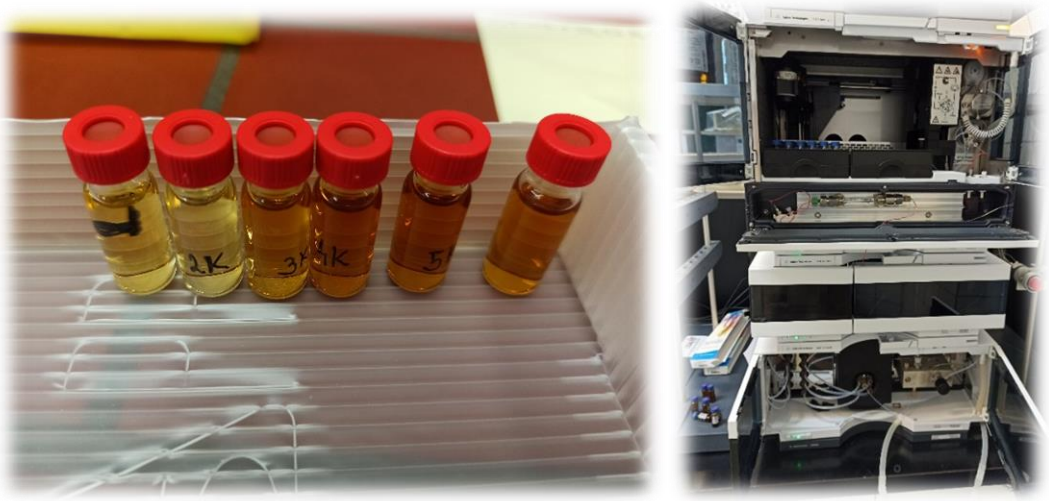
Uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije na 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije sa slobodnim radikalima, kod DPPH testa. Određivanje postotka aktivnosti DPPH uklanjanja radikala provedeno je tako da je 0,5 ml svježe otopine DPPH (0,2 mM) pomiješano sa 1,2 mL uzorak koncentracije 250 µg /mL. Nakon 30 minuta, apsorbancija je određena na 517 nm. Određivanje je izraženo kao % aktivnosti vezanja (%DPPH), a provedeno je u tri ponavljanja. Moć hvatanja slobodnih radikala (RSA) izračunata je prema jednadžbi:

$$\%\ \text{DPPH activity} = \frac{(ADPPH + AB) - AS}{ADPPH} \times 100 \qquad (3)$$

Gdje su : A_{DPPH}- apsorbancija kontrole (umjesto uzorka, dodan je metanol), A_B- apsorbancija uzorka, gdje je umjesto DPPH dodan metanol, A_S- apsorbancija uzorka pomiješanog s otopinom DPPH. Odnosno omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH-a nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH-a kojoj nije dodana otopina uzorka.

3.3.5. Određivanje nikotina i fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sustav se sastoji od kvartarne pumpe, pećnice (temperaturni raspon od +10 do 85 °C), PDA detektora, autosamplera (kapacitet 36 viala) te sakupljača frakcija. Podatci su obrađeni pomoću računalnog programa ChemStation. Korištena je dvokomponentna mobilna faza: A: 1% CH3COOH; B: metanol s gradijentni eluiranjem kako slijedi: 0-5 min, 20 % B; 5-15 min, 40-60 % B; 15-35 min, 80 % B; 35-40min, 60 % B; 40-50 min, 20 % B at 25±0.8 °C kroz 50 min. Korištena je kolona: COSMOSIL 5C18-MS-11 (4,6 x 250 mm, 5 µm). Injektirani volumen je bio 20 µL, a brzina protoka: 1 mL/min. Analiza je praćena pomoću DAD detektora na valnim duljinama od 210, 230, 250, 275, 300, 320 i 360 nm.



Slika 17: Prikaz uzorka i HPLC uređaja (Izvor: autor)

Udio nikotina određen je na istom uređaju ali prema modificiranoj metodi Bansal i sur. (2018).

Analiza je provedena na temperaturi od 35 °C, tlaku s protokom mobilne faze od 1 mL/min na koloni Poroshell infinity, lab 120 C-C18 (4,6 x 150 mm, 4 µm) izokratnom metodom. Kao mobilna faza A korišten je acetonitril, a kao B: 0.03M karbonatni pufer (pH=10) u omjeru 80:20. Analiza je praćena na valnoj duljini od 259 nm kroz 250 minuta. Kvalitativna analiza provedena je usporedbom retencijskog vremena (vrijeme između injektiranja uzorka i pojave odziva na detektoru) fenolnih spojeva u uzorku s retencijskim vremenom standarda poznate koncentracije. Kvantitativna analiza komponenti u uzorcima provedena je određivanjem

površine ispod pikova na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje za svaki spoj koji je analiziran. Prije same HPLC analize svi uzorci su profiltrirani kroz filter (0,45 μm).

3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada i lista duhana primjenom metode odzivnih površina

U ovom radu korišten je Box- Behnken-ov plan pokusa za procjenu utjecaja procesnih parametara na iskorištenje i kvalitetu ekstrakcije; odnosno na udio fenola, udio flavonoida, antioksidacijsku aktivnost, udio nikotina u duhanskom otpadu. Za potrebe ovog istraživanja odabrane su četiri različite nezavisne varijable: vrijeme trajanja pulsa, broj pulseva, omjer tekuće/kruto i jakost polja.

Tablica 1: Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu

Nezavisne varijable	**Oznaka**	**Razina**		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Vrijeme trajanja pulsa	X_1	22	44	66
Broj pulseva	X_2	10	30	50
Omjer tekuće/kruto	X_3	10	20	30
Jakost polja	X_4	4	8	12

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 2: Vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti i nikotina u ekstraktima dobivenim pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije u listu duhana

Run	Vrijeme trajanja pulsa	Broj pulseva	Omjer tekuće/ kruto mL/g	Jakost polja kV/cm	DPPH (%)	Ukupni fenoli (mg/g)	Ukupni flavonoidi (mg/g)	Nikotin (mg/g)	Klorogenska kiselina (mg/g)	Rutin (mg/g)
1	66	10	20	8	87,60	43,37	3,94	2,85	1,32	0,50
2	44	30	20	8	97,15	68,60	3,10	1,41	2,97	0,84
3	44	30	10	12	75,06	31,21	2,59	3,10	2,89	0,70
4	22	10	20	8	92,56	58,21	4,90	2,71	1,81	0,68
5	22	50	20	8	97,72	57,65	4,64	2,68	1,98	0,72
6	66	30	30	8	97,39	44,98	7,36	1,36	2,67	0,72
7	44	10	20	4	96,61	68,08	5,01	2,30	2,43	0,68
8	22	30	30	8	95,43	35,99	6,10	2,44	2,00	0,74
9	22	30	20	12	90,25	55,19	4,72	2,83	2,64	0,50
10	44	30	30	4	93,33	34,84	6,37	1,07	2,39	0,74
11	44	10	30	8	97,14	47,04	5,81	2,32	3,23	0,83
12	66	30	20	12	77,39	33,73	2,06	2,43	1,07	0,25
13	44	30	20	8	96,74	74,83	5,03	2,14	3,25	0,81
14	44	30	20	8	94,45	71,08	4,57	2,19	2,90	0,79
15	22	30	10	8	67,33	35,11	2,58	3,49	2,82	0,48
16	44	50	30	8	74,94	36,65	6,90	1,64	2,38	0,68
17	22	30	20	4	77,57	59,08	4,38	4,27	2,25	0,30
18	66	30	10	8	60,99	30,67	2,62	4,19	1,45	0,19
19	44	30	10	4	61,77	33,80	2,67	3,80	3,00	0,48
20	66	30	20	4	83,07	61,55	4,21	3,60	2,49	0,31
21	44	50	20	12	84,50	53,16	5,12	2,35	2,25	0,31
22	44	10	10	8	61,22	14,06	2,59	3,40	2,74	0,41
23	44	10	20	12	84,03	29,75	5,09	0,67	2,63	0,54
24	44	30	30	12	82,71	17,82	7,13	1,30	2,33	0,46
25	44	30	20	8	82,12	59,67	4,94	2,12	2,64	0,51
26	44	50	10	8	64,85	15,52	2,63	4,29	3,24	0,34
27	44	50	20	4	89,58	27,91	5,07	3,76	2,72	0,53
28	66	50	20	8	95,02	28,14	4,81	3,20	1,75	0,32
29	44	30	20	8	92,76	56,65	4,98	1,90	2,14	0,32

Tablica 2 prikazuje promatrane odzive odnosno vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti i nikotina u ekstraktima dobivenim pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem u listu duhana

Vrijednosti ukupnih fenola u listu duhana su se kretale od 14,06 mg/g za uzorak broj 22 (vrijeme trajanja pulseva 44 s, broj pulseva 10 , omjer tekuće/ kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm) do najviše vrijednosti 74,83 mg/g za uzorak broj 13 (vrijeme trajanja pulseva 44s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenih podataka može se zaključiti da broj pulseva kao i omjer tekuće/ kruto znatno utječu na udio ukupnih fenola.

Dobivene vrijednosti apsorbancija na spektrofotometru za uzorke, preračunati su pomoću jednadžbe(4) i dobiven je postotak (%) aktivnosti vezanja, odnosno uklanjanja DPPH radikala. Vrijednosti ukupnih flavonoida su se kretale od 2,06 mg/g za uzorak broj 12 (vrijeme trajanja pulseva 66s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 12 kV/cm) do najviše vrijednosti 7,36 mg/g za uzorak broj 6 (vrijeme trajanja pulseva 66 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 30 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). S obzirom na uvijete pri kojima je dobivena najmanja i najveća vrijednost može se zaključiti da omjer tekuće/kruto i jakost polja znatno utječu na udio ukupnih flavonoida.

Kao što je vidljivo iz **tablice 2** vrijednosti za udio nikotina su se kretale od 0,67 mg/g za uzorak broj 23 (vrijeme trajanja pulseva 44 s, broj pulseva 10, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 12 kV/cm) do najviše vrijednosti 4,29 mg/g za uzorak broj 26 (vrijeme trajanja pulseva 44 s, broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 10mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenih podataka može se zaključiti da je najveći udio nikotina bio pri trajanju pulseva od 44 s, broju pulseva 50, omjeru tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm, a najmanja vrijednost pri trajanju pulseva od 44s, broj pulseva 10, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 12 kV/cm. Prema tome moglo bi se zaključiti da broj pulseva i jakost polja značajno utječe na udio nikotina u uzorku. Iz **tablice 2** možemo očitati najnižu antioksidacijsku aktivnost koja je bila 60,99 % za uzorak broj 18 (vrijeme trajanja pulseva 66 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm), a najveća vrijednost 97,72 % za uzorak broj 5 (vrijeme trajanja pulseva 22 s, broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenih podataka može se zaključiti da na antioksidacijsku aktivnost značajan utjecaj ima trajanje pulseva i sam broj pulseva.

Prethodna istraživanja pokazala su kako su rutin i klorogenska kiselina, dominantno fenolni spojevi u duhanskom otpadu, Wang i sur. (2010) razvili su HPLC metodu koja je primijenjena za kvalitativno određivanje polifenola u duhanskom otpadu i određivanje sadržaja rutina i klorogenih kiselina u duhanskom otpadu. U njihovoj studiji razvijene su metode analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i metode hibridnog staničnog automata (engl. *Hybrid Cellular Automaton*, HCA) kako bi se duhanski otpad procijenio kao resurs visoke dodane vrijednosti. Ovim istraživanjem je također potvrđeno da su rutin i klorogenska kiselina bili prisutni u svim ekstraktima. Tijekom istraživanja ipak su zabilježene određene razlike među sortama duhana prema izračunima HCA metodom i PCA uzorka.

Razlozi za odstupanja u sadržaju polifenola u duhanskom otpadu mogu biti : podrijetlo duhana, učinak okoliša i/ ili drugim čimbenicima, kao što su sezona prikupljanja, korišteni procesi sušenja, smještaj samog postrojenja itd. Na temelju provedenog istraživanja, HPLC metodom detektirana je prisutnost rutina i klorogenske kiseline te su rezultati izraženi kao mg/g u **tablici 2**. Najveće koncentracije klorogenske kiseline bila je 3,24 uzorku broj 26 (vrijeme trajanja pulseva 44s ,broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm), a najniža vrijednost je 1,072 za uzorak broj 12 (vrijeme trajanja pulseva 66 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 12 kV/cm).

Najveće koncentracije rutina, zabilježene su u uzorku broj 2 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 8 kV/cm), a najniže koncentracije rutina zabilježene su u uzorku broj 18 (vrijeme trajanja pulsa 66 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Najviše rutina ekstrahirano je u uzorku koji je pripravljen pri uvjetima trajanja pulseva 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakosti polja 8 kV/cm, dok su najniže vrijednosti dobivene u vremenu trajanja pulseva od 66 s, broju pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10mL/g i jakosti polja 8 kV/cm, što ukazuje na to da se rutin bolje otopio u većem volumenu vode i pri kraćem vremenu trajanja pulseva od 44 s.

Tablica 3: Vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti i nikotina u ekstraktima dobivenim pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije u duhanskom otpadu

Run	Vrijeme trajanja pulsa	Broj pulseva	Omjer tekuće/ kruto mL/g	Jakost polja kV/cm	DPPH (%)	Ukupni fenoli (mg/g)	Ukupni flavonoidi (mg/g)	Nikotin (mg/g)	Klorogenska kiselina (mg/g)
1	66	10	20	8	58,34	18,39	0,05	3,12	0,27
2	44	30	20	8	64,78	19,47	0,05	1,59	0,25
3	44	30	10	12	50,19	8,83	0,03	4,20	0,240
4	22	10	20	8	62,85	17,01	0,04	3,00	0,23
5	22	50	20	8	65,16	16,01	0,04	1,97	0,22
6	66	30	30	8	65,02	12,60	0,06	1,13	0,26
7	44	10	20	4	64,50	18,01	0,04	3,68	0,27
8	22	30	30	8	63,60	18,82	0,05	2,81	0,24
9	22	30	20	12	60,35	36,91	0,04	3,81	0,25
10	44	30	30	4	62,04	29,52	0,06	1,29	0,32
11	44	10	30	8	64,75	20,76	0,05	2,01	0,23
12	66	30	20	12	51,58	40,44	0,04	1,94	0,27
13	44	30	20	8	65,00	39,62	0,04	2,34	0,29
14	44	30	20	8	63,18	38,62	0,04	1,47	0,25
15	22	30	10	8	57,09	14,91	0,02	5,12	0,24
16	44	50	30	8	57,44	24,86	0,05	2,73	0,30
17	22	30	20	4	52,11	28,85	0,03	1,11	0,19
18	66	30	10	8	41,08	18,67	0,03	4,08	0,34
19	44	30	10	4	41,47	17,47	0,02	4,40	0,3
20	66	30	20	4	55,70	39,01	0,04	4,65	0,28
21	44	50	20	12	56,71	38,75	0,04	1,91	0,24
22	44	10	10	8	40,95	18,93	0,02	4,29	0,34
23	44	10	20	12	56,54	43,39	0,04	4,41	0,32
24	44	30	30	12	56,43	23,79	0,06	0,63	0,27
25	44	30	20	8	55,05	40,01	0,05	1,90	0,28
26	44	50	10	8	43,47	20,32	0,02	4,62	0,39
27	44	50	20	4	62,50	41,42	0,05	1,97	0,29
28	66	50	20	8	63,49	46,03	0,04	2,20	0,34
29	44	30	20	8	62,51	31,91	0,05	1,53	0,37

Tablica 3 prikazuje promatrane odzive odnosno vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, antioksidacijsku aktivnost i nikotin u ekstraktima dobivenim pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem u duhanskom otpadu. Vrijednost ukupnih fenola u duhanskom otpadu su se kretale od 8,83 mg/g za uzorak broj 3 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 12 kV/c) do najveće vrijednosti od 46,03 mg/g za uzorak broj 28 (vrijeme trajanja pulsa 66 s, broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz dobivenih podataka u **tablici 3** može se zaključiti da na udio ukupnih fenola značajan utjecaj ima vrijeme trajanja

pulseva i broj pulseva. Iz **tablice 3** vidljivo je da udio ukupnih flavonoida se kreće od najniže vrijednosti 0,02 mg/g koju smo dobili kod uzoraka broj: 15 (vrijeme trajanja pulsa 22 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm), 19 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 4 kV/cm), 22 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 10, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm) i 26 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenog je vidljivo da pri istim vrijednostima za jakost polja od 8 kV/cm, vremenu trajanja pulseva 44 s, omjer kruto/tekuće 10 mL/g i promjenom broja pulseva dobivamo istu vrijednost od 0,02 mg/g flavonoida. Iz toga slijedi da promjenom broja pulseva nemamo utjecaj na udio flavonoida u uzorku. A najveća vrijednost iznosila je 0,06 mg/g koju smo dobili kod uzoraka broj: 6 (vrijeme trajanja pulsa 66 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 30 mL/g i jakost polja 8 kV/cm), 10 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 30 mL/g i jakost polja 4 kV/cm) i 24 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/ kruto 30 mL/g i jakost polja 12 kV/cm). Udio nikotina kreće se od najniže vrijednosti koja iznosi 0,63 mg/g za uzorak broj 24 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 30 mL/g i jakost polja 12 kV/cm) do najviše vrijednosti 5,12 mg/g za uzorak broj 15 (vrijeme trajanja pulsa 22 s, broj pulseva 30 , omjer tekuće/kruto 10 mL/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenog je vidljivo da pri većem udjelu vode i jakosti polja dobivamo veći udio nikotina.

Iz **tablice 3** vidljivo je da udio klorogenske kiseline se kreće od najniže vrijednosti 0,189 mg/g za uzorak broj 17 (vrijeme trajanja pulsa 22 s, broj pulseva 30, omjer tekuće/kruto 20 mL/g i jakost polja 4 kV/cm) do najviše vrijednosti od 0,394 mg/g za uzorak broj 26 (vrijeme trajanja pulsa 44 s, broj pulseva 50, omjer tekuće/kruto 10 ml/g i jakost polja 8 kV/cm). Iz navedenog se može zaključiti da pri dužem vremenu trajanja pulseva 44 s, većem broju pulseva 50 i većom jakosti polja 8 kV/cm dobivamo veći udio klorogenske kiseline. Udio rutina u duhanskom otpadu pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije iznosi 0 mg/g. Dok s druge strane pri istim uvjetima ekstrakcije kao i za duhanski otpad, u duhanskom listu je detektirana najviši udio od 0,884 mg/g . Iz **tablice 2** i **tablice 3** vidljivo je da su vrijednost (antioksidacijske aktivnosti, ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, nikotina, klorogenske kiseline) bile veće u uzorku lista duhana nego duhanskom otpadu, dok rutin nije opće detektiran u duhanskom otpadu. Razlog tome je što se tijekom procesiranja lista gube fenolni spojevi, flavonoidi,

nikotin, klorogenska kiselina i rutin što potvrđuju i rezultati dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom (Banožić i sur., 2018).

4.1 OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA I LISTA DUHANA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

Kao koristan alat u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa uz smanjen broj potrebnih eksperimenata se pokazala metoda odzivnih površina. Metoda odzivnih površina je skup matematičkih i statističkih tehnika koja omogućava planiranje pokusa tako da se provode samo neki eksperimenti s određenim kombinacijama procesnih parametara na osnovu kojih je moguće odrediti optimalne parametre procesa uz ekonomsku i energetsku uštedu (Carley i sur., 2004). U ovom radu korišten je program *Design Expert 7.1.6* za planiranje pokusa kao i statističku obradu dobivenih podataka i određivanje optimalnih uvjeta, a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Da bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije (vrijeme trajanja, broj pulseva, omjer tekuće/kruto i jakost polja) na zavisne varijable te provjerila priklanost primijenjenog Box-Behnken plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkog modela prema izrazu (2). Statičkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka dobiveni su modeli i njegovi koeficijenti, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisnih i nezavisnih varijabli. Iz navedenog, model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora.

Tablica 4: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za DPPH (refabrikat)

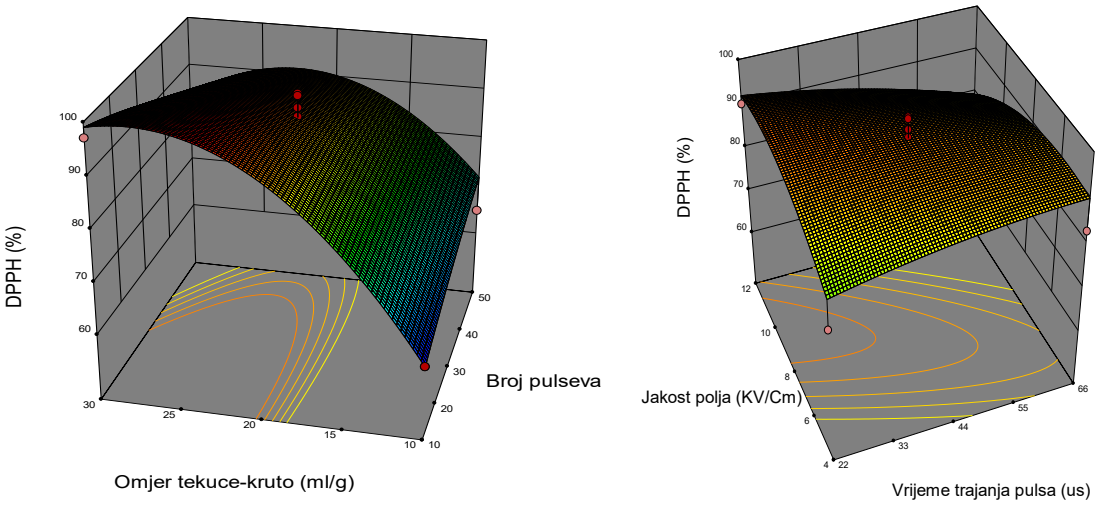
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	1381,28	14	98,66	4,85	0,0028
X_1 – Trajanje pulsa	56,145	1	56,14	2,76	0,1187
X_2 – Broj pulseva	0,0587	1	0,059	0,00888	0,9579
X_3 – Omjer tekuće/kruto	752,467	1	752,47	37,02	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	3,553	1	3,55	0,17	0,6822
X_1X_2	2,02	1	2,02	0,100	0,7570
X_1X_3	75,90	1	75,90	3,73	0,0738
X_1X_4	38,19	1	38,19	1,88	0,1921
X_2X_3	24,14	1	24,14	1,19	0,2943
X_2X_4	1,18	1	1,18	0,058	0,8132
X_3X_4	51,30	1	51,30	2,52	0,1345
X_1^2	1,02	1	1,02	0,050	0,8259
X_2^2	0,82	1	0,82	0,040	0,8440
X_3^2	317,86	1	317,86	15,64	0,0014
X_4^2	87,68	1	87,68	4,31	0,0567
OSTATAK	284,58	14	20,33		
NEDOSTATAK MODELA	217,94	10	21,79	1,31	0,4282
POGREŠKA	66,64	4	16,66		
UKUPNO	1665,86	28			
R^2	0,8292				

Tablica 4 pokazuje regresijske koeficijente dobivene odgovarajućim eksperimentalnim podacima polinomom drugog reda za ispitivane odzive. Koeficijenti se odnose na kodirane varijable. Vjerojatnost ovog regresijskog modela je bila ispod 0,05 (*p*-vrijednost), što ukazuje na to da je veza između nezavisnih varijabli i odzivnih varijabli statistički značajna. Analiza varijance (ANOVA) na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivost modela, prikazana je u **Tablici 4**. Koeficijentom korelacije procjenjuje se stupanj i smjer slaganja varijabli. Koeficijent korelacije R^2 je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1 (Knezović, 2014; Pejić, 2010). Joglekar i May (1987) tvrde da za dobar model vrijednost koeficijenta korelacija treba biti najmanje 0,80. Vrijednost R^2 u našem istraživanju za promatrane odzive je bila veća od 0,80, iznosila je 0,8292 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalnom predviđenim podacima. Iz **Tablice 4** vidljivo je da omjer tekuće/kruto(X_3) ima visoku statističku značajnost (p<0,001). Također, kvadratna vrijednost parametra X_3^2 (p-vrijednost=0,0014) ima značajni utjecaj na DPPH, dok kvadratne vrijednosti X_1^2 (p-vrijednost=0,8259), X_2^2(p-vrijednost=0,8440), X_4^2(p-vrijednost=0,0567) nemaju statističku značajnost.

Model u kodiranim vrijednostima, za DPPH:

$$\textbf{DPPH}=62{,}10-2{,}16X_1+0{,}070X_2+7{,}92X_3-0{,}54X_4+071X_1X_2+4{,}36X_1X_3-3{,}09X_1X_4-2{,}46X_2X_3+0{,}54X_2X_4-3{,}58X_3X_4-0{,}40X_1^2-0{,}35X_2^2-7{,}00X_3^2-3{,}68X_4^2 \quad (4)$$

Najbolji način da se prikaže utjecaj parametara (trajanje pulsa, broj pulsa, omjer tekuće/kruto i jakost polja) na zavisne varijable (DPPH, udio fenola, udio flavonoida, udio nikotina) unutar ispitivanog područja je korištenjem odzivnih površina odnosno 3D dijagramima.



Slika 18: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na DPPH (refabrikat) (Izvor: Autor)

Na **slici 18** vidljivo je da povećanjem omjera tekuće-kruto i jakost polja, raste vrijednost antioksidacijske aktivnosti, dok vrijeme trajanja pulsa i broj pulsa nema značajan utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 5: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za DPPH (list)

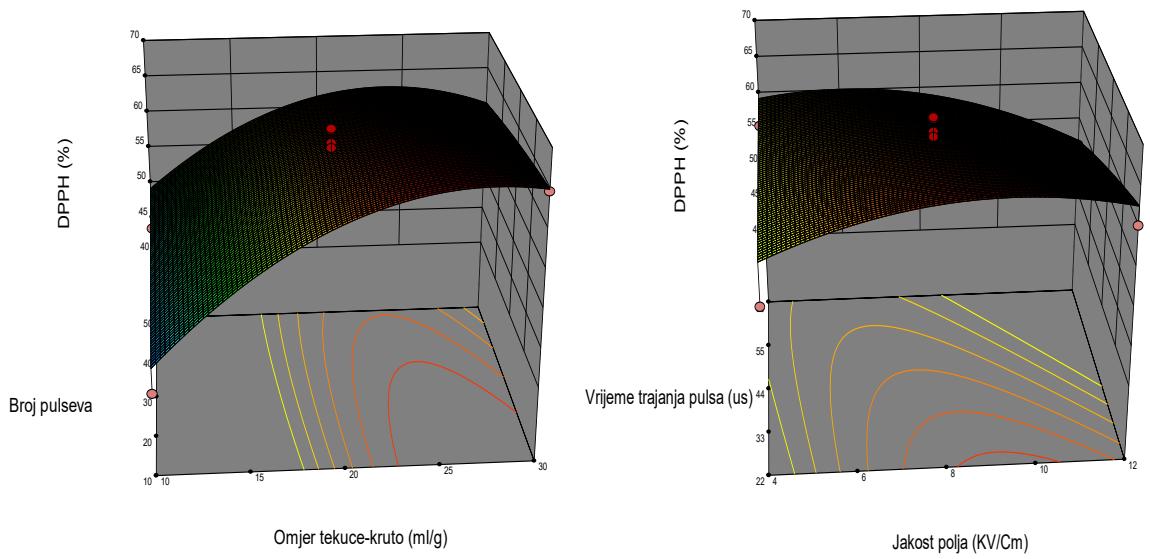
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	3446,64	14	246,19	4,92	0,0026
X_1 – Trajanje pulsa	31,39	1	31,39	0,63	0,4417
X_2 – Broj pulseva	13,10	1	13,10	0,26	0,6170
X_3 – Omjer tekuće/kruto	1867,65	1	1867,65	37,30	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	5,32	1	5,32	0,11	0,7494
X_1X_2	1,27	1	1,27	0,025	0,8756
X_1X_3	17,23	1	17,23	0,34	0,5669
X_1X_4	84,16	1	84,16	1,68	0,2158
X_2X_3	166,72	1	166,72	3,33	0,0895
X_2X_4	14,05	1	14,05	0,28	0,6046
X_3X_4	142,82	1	142,82	2,85	0,1134
X_1^2	12,16	1	12,16	0,24	0,6298
X_2^2	5,70	1	5,70	0,11	0,7409
X_3^2	1035,96	1	1035,96	20,09	0,0005
X_4^2	141,80	1	141,80	2,83	0,1146
OSTATAK	701,05	14	50,08		
NEDOSTATAK MODELA	549,96	10	55,00	1,46	0,3827
POGREŠKA	151,09	4	37,77		
UKUPNO	4147,69	28			
R^2	0,8310				

Iz **tablice 5** možemo vidjeti da je model za DPPH (list) značajan (*p*-vrijednost =0,0026). Omjer tekuće/kruto (X_3) ima visoku statističku značajnost (p<0,0001), dok trajanje pulsa (X_1), broj

pulsa(X_2) i jakost polja (X_4) nemaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (p>0,05). Kvadratna vrijednost omjera tekuće-kruto (X_3^2) ima značajan utjecaj (p-vrijednost= 0,0005), dok ostali parametri nemaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (p>0,05). Vrijednost R^2 za promatrane odzive iznosila je 0,8349 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima.

Model u kodiranim vrijednostima za DPPH:

DPPH=92,65-1,62X_1-1,04X_2+12,48X_3-0,67X_4+0,56X_1X_2+2,08X_1X_3-4,59X_1X_4-6,46X_2X_3+1,87X_2X_4-5,98X_3X_4-1,37X_1^2-0,94X_2^2-12,64X_3^2-4,68X_4^2 (5)



Slika 19: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na antioksidacijsku aktivnost (list) (Izvor:Autor)

Slika 19 prikazuje 3D dijagrame, iz kojih se jasno vidi značajan utjecaj jakosti polja i omjera tekuće-kruto, dok vrijeme trajanja pulsa i broj pulseva nemaju značajan utjecaj na antioksidacijski aktivnost.

Tablica 6 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne fenole (list)

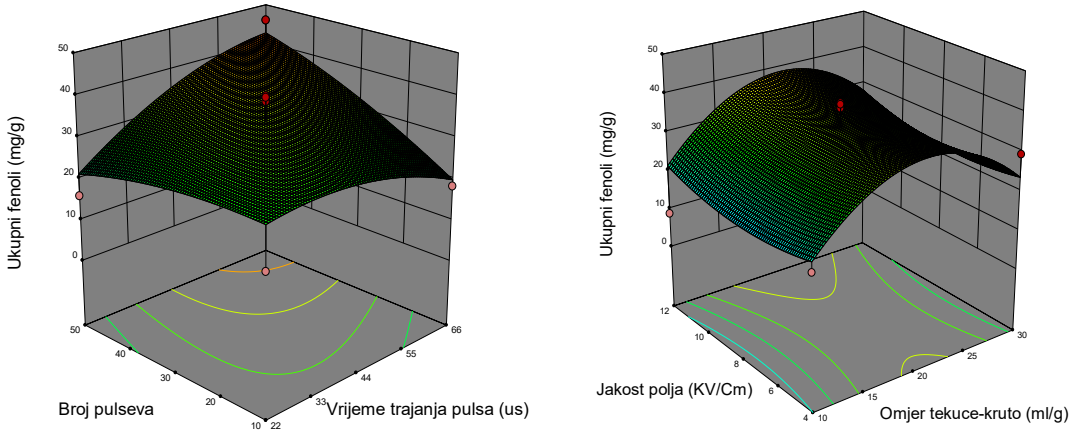
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	6694,16	14	478,15	6,78	0,0004
X_1 – Trajanje pulsa	288,19	1	288,19	4,09	0,0628
X_2 – Broj pulseva	143,45	1	143,45	2,03	0,1758
X_3 – Omjer tekuće/kruto	493,13	1	493,13	6,99	0,0193
X_4 – Jakost polja	164,32	1	164,32	2,33	0,1492
X_1X_2	53,78	1	53,78	0,76	0,3973
X_1X_3	45,05	1	45,05	0,64	0,4376
X_1X_4	143,08	1	143,08	2,03	0,1763
X_2X_3	35,10	1	35,10	0,50	0,4922
X_2X_4	1010,91	1	1010,91	14,33	0,0020
X_3X_4	7,75	1	7,75	0,11	0,7452
X_1^2	209,87	1	209,87	2,98	0,1066
X_2^2	1218,23	1	1218,23	17,27	0,0010
X_3^2	3716,01	1	3716,01	52,68	0,0001
X_4^2	402,90	1	402,90	5,71	0,0315
OSTATAK	987,61	14	70,54		
NEDOSTATAK MODELA	749,75	10	74,98	1,26	0,4442
POGREŠKA	237,86	4	59,46		
UKUPNO	7681,77	28			
R^2	0,8714				

Iz tablice promatranih odziva (**tablica 6**) možemo vidjeti da Omjer tekuće/kruto (X_3) ima značajan utjecaj (p-vrijednost=0,0193), kao i kombinacija parametara X_2X_4 (p-vrijednost= 0,0020), kvadratna vrijednost X_2^2 ,X_3^2 i X_4^2 imaju značajan utjecaj, dok ostali parametri nemaju statistički značaj (p>0,05). R^2 vrijednost govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi 0,8714.

Model u kodiranim vrijednostima, za ukupne fenole (list):

Ukupni fenoli = $66{,}17-4{,}90X_1-3{,}46X_2+6{,}41X_3-3{,}70X_4-3{,}67X_1X_2+3{,}36X_1X_3-5{,}98X_1X_4$

$-2{,}96X_2X_3+15{,}90X_2X_4+1{,}39X_3X_4-5{,}69X_1^2-13{,}70X_2^2-23{,}94X_3^2-7{,}88X_4^2$ (6)



Slika 20: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na udio fenola (list) (Izvor: Autor)

Tablica 7: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne fenole (refabrikat)

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	2433,47	14	173,82	2,51	0,0484
X_1 – Trajanje pulsa	151,58	1	151,58	2,19	0,1614
X_2 –Broj pulseva	215,85	1	215,85	3,11	0,0995
X_3 – Omjer tekuće/kruto	81,29	1	81,29	1,17	0,2972
X_4 – Jakost polja	26,51	1	26,51	0,38	0,5463
X_1X_2	205,08	1	205,08	2,96	0,1075
X_1X_3	24,96	1	24,96	0,36	0,5581
X_1X_4	10,94	1	10,94	0,16	0,6972
X_2X_3	1,84	1	1,84	0,027	0,8729
X_2X_4	196,72	1	196,72	2,84	0,1143
X_3X_4	2,12	1	2,12	0,031	0,8637
X_1^2	107,84	1	107,84	1,56	0,2328
X_2^2	27,22	1	27,22	0,39	0,5411
X_3^2	1244,03	1	1244,03	17,94	0,0008
X_4^2	69,15	1	69,15	1,00	0,3350
OSTATAK	970,87	14	69,35		
NEDOSTATAK MODELA	666,28	10	66,63	0,87	0,6090
POGREŠKA	304,59	4	76,15		
UKUPNO	3404,33	28			
R^2	0,7148				

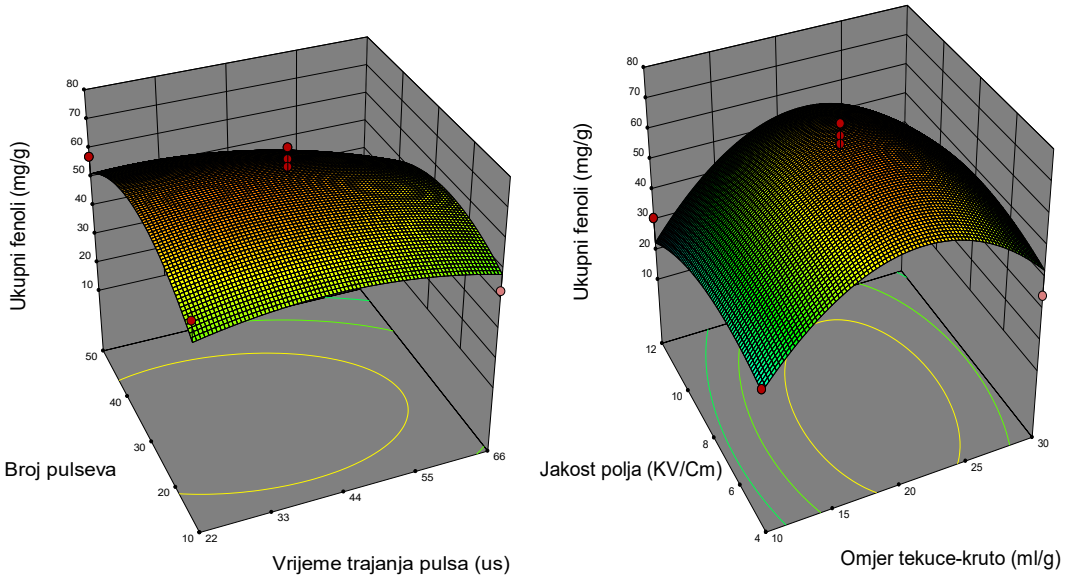
Tablice 7 prikazuje statistički značaj parametara X_2 (broj pulseva) i kvadratna vrijednost X_3^2 (p-vrijednost= 0,0008), dok svi ostali parametri, odnosno njihove kombinacije nemaju statistički značaj (p>0,05) na udio fenola (refabrikat).

R^2 vrijednost govori da primijenjeni regresijski model nije odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi: 0,7148

Model u kodiranim vrijednostima, za ukupne fenole:

Ukupni fenoli= $33,93+3,55X_1+4,24X_2+2,60X_3+1,49X_4+7,16X_1X_2-2,50X_1X_3-1,65X_1X_4+0,68X_2X_3$

$-7,01X_2X_4+0,73X_3X_4-4,08X_1^2-2,05X_2^2-13,85X_3^2+3,27X_4^2$ (7)



Slika 21: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na udio fenola (Izvor:Autor)

Tablica 8: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne flavonoide (refabrikat)

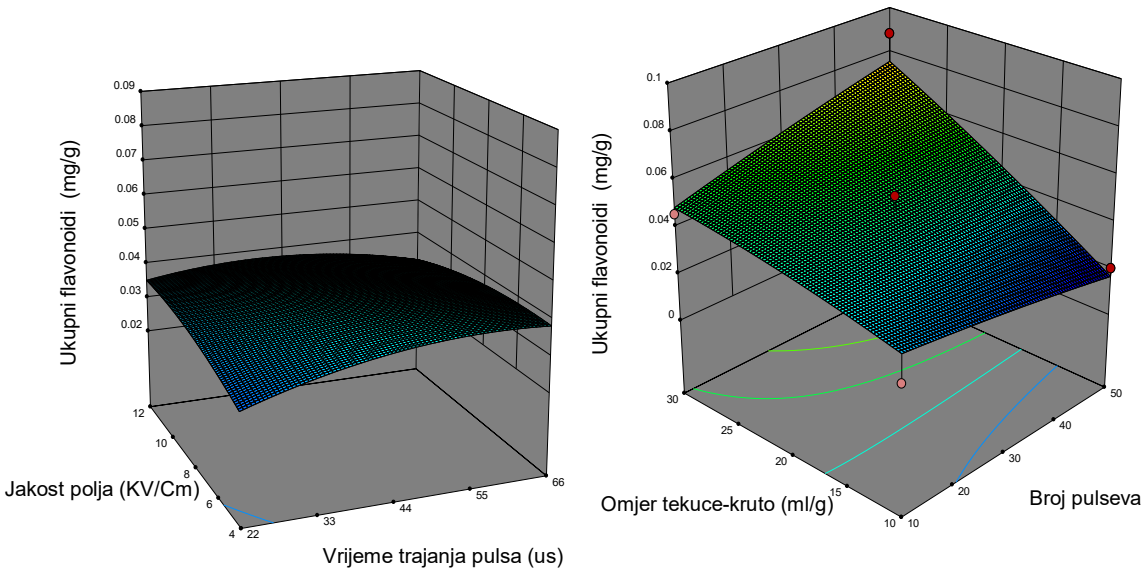
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	52,67	14	3,76	6,64	0,0005
X_1 – Trajanje pulsa	0,45	1	0,45	0,79	0,3884
X_2 – Broj pulseva	0,28	1	0,28	0,49	0,4972
X_3 – Omjer tekuće/kruto	47,97	1	47,97	84,67	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	0,085	1	0,085	0,15	0,7052
X_1X_2	0,32	1	0,32	0,57	0,4644
X_1X_3	0,37	1	0,37	0,66	0,4300
X_1X_4	1,55	1	1,55	2,73	0,1206
X_2X_3	0,27	1	0,27	0,48	0,4978
X_2X_4	3,076E-004	1	3,076E-004	5,429E-004	0,9817
X_3X_4	0,18	1	0,18	0,31	0,5840
X_1^2	0,50	1	0,50	0,87	0,3657
X_2^2	0,41	1	0,41	0,72	0,4114
X_3^2	0,068	1	0,068	0,12	0,7340
X_4^2	1,011E-003	1	1,011E-003	1,785E-003	0,9669
OSTATAK	7,93	14	0,57		
NEDOSTATAK MODELA	5,27	10	0,53	0,79	0,6543
POGREŠKA	2,67	4	0,67		
UKUPNO	60,60	28			
R^2	0,8691				

Iz **tablice 8** vidimo da model ima statističku značajnost (*p*-vrijednost= 0,0005), također i Omjer tekuće/kruto (X_3) (*p*-vrijednost<0,0001), dok ostali parametri i njihove kombinacije nisu statistički značajni. R^2 vrijednost govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi 0,8691.

Model u kodiranim vrijednostima, za udio flavonoida (refabrikat):

Ukupni flavonoidi $=4{,}52-0{,}19X_1+0{,}15X_2+2{,}00X_3-0{,}084X_4+0{,}28X_1X_2+0{,}31X_1X_3$

$-0{,}62X_1X_4+0{,}26X_2X_3-8{,}769E\text{-}003X_2X_4+0{,}21X_3X_4-0{,}28X_1^2+0{,}25X_2^2+0{,}10X_3^2-0{,}012X_4^2$ (8)



Slika 22: 3D dijagram utjecaja ispitivanih varijabli na udio flavonoida (Izvor:Autor)

3D prikaz na **slici 22** pokazuje da porastom omjera tekuće-kruto dolazi do blagog porasta flavonoida, dok broj pulseva, jakost polja i vrijeme trajanja pulsa nema značajan utjecaj na porast flavonoida. Porastom broja pulseva smanjuje se udio flavonoida.

Tablica 9: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne flavonoide (list)

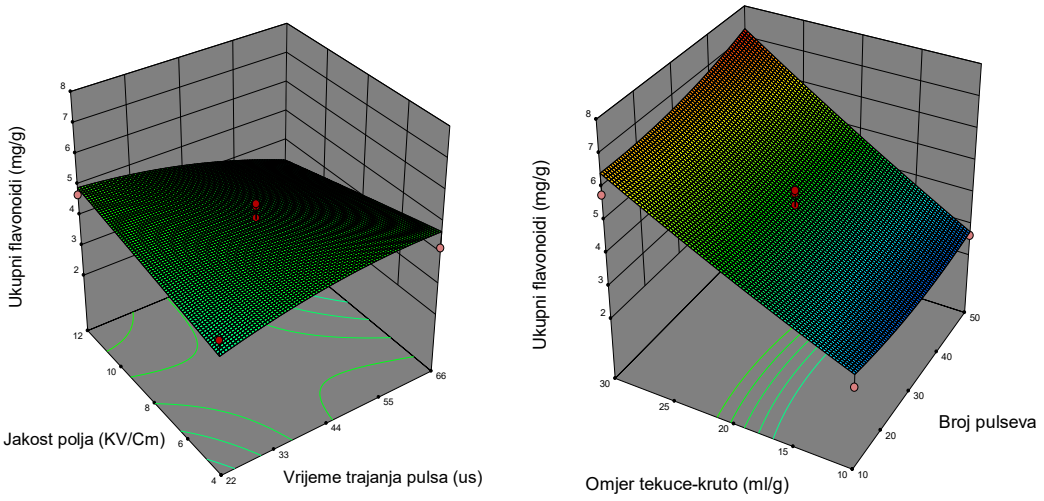
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	5,055E-003	14	3,611E-004	8,88	0,0001
X_1 – Trajanje pulsa	9,581E-005	1	9,581E-005	2,36	0,1470
X_2 –Broj pulseva	8,455E-005	1	8,455E-005	2,08	0,1712
X_3 – Omjer tekuće/kruto	4,164E-003	1	4,164E-003	102,45	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	1,843E-006	1	1,843E-006	0,045	0,8344
X_1X_2	3,361E-008	1	3,361E-008	8,270E-004	0,9775
X_1X_3	2,813E-005	1	2,813E-005	0,69	0,4194
X_1X_4	5,103E-005	1	5,103E-005	1,26	0,2813
X_2X_3	4,754E-004	1	4,754E-004	11,70	0,0041
X_2X_4	1,217E-006	1	1,217E-006	0,030	0,8651
X_3X_4	1,707E-005	1	1,707E-005	0,42	0,5274
X_1^2	1,160E-004	1	1,160E-004	2,85	0,1133
X_2^2	5,403E-006	1	5,403E-006	0,13	0,7209
X_3^2	2,197E-005	1	2,197E-005	0,54	0,4743
X_4^2	3,445E-005	1	3,445E-005	0,85	0,3728
OSTATAK	5,690E-004	14	4,064E-005		
NEDOSTATAK MODELA	5,217E-004	10	5,217E-005	4,41	0,0827
POGREŠKA	4,730E-005	4	1,182E-005		
UKUPNO	5,624E-005	28			
R^2	0,8988				

Analizom promatranih odziva za flavonoide (list), možemo primijetiti da Omjer tekuće/kruto (X_3) (*p*-vrijednost <0,0001) i kombinacija parametara X_2X_3 (*p*-vrijednost= 0,0041) imaju

značajan utjecaj na udio flavonoida, dok ostali parametri i njihove kombinacije nemaju statistički značaj (p>0,05). R^2 vrijednost govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi 0,8988.

Model u kodiranim vrijednostima, za flavonoide:

Ukupni flavonoidi $=0{,}046+2{,}826E\text{-}003X_1+2{,}654E\text{-}003X_2+0{,}019X_3-3{,}919E\text{-}004X_3+9{,}167E\text{-}005X_1X_2+2{,}652E\text{-}003X_1X_3-3{,}572E\text{-}003X_1X_4+0{,}011X_2X_3-5{,}517E\text{-}004X_2X_4-2{,}066E\text{-}003X_3X_4-4{,}228E\text{-}003X_1^2-9{,}126E\text{-}004X_2^2-1{,}841E\text{-}003X_3^2-2{,}305E\text{-}003X_4^2$ (9)



Slika 23: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na udio flavonoida (Izvor:Autor)

3D prikaz na **slici 23** pokazuje nam kako povećanjem vrijednosti omjera tekuće-kruto dolazi do rasta udjela flavonoida tj. vidljivo je da Omjer tekuće/kruto ima visoki statistički značaj (p<0,0001), dok broj pulseva, vrijeme trajanja pulsa i jakost polja nemaju značajan utjecaj na udio flavonoida.

Tablica 10: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za udio nikotina (refabrikat)

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	22,49	14	1,61	4,85	0,0028
X_1 – Trajanje pulsa	0,053	1	0,053	0,16	0,6942
X_2 – Broj pulseva	1,12	1	1,12	3,37	0,0875
X_3 – Omjer tekuće/kruto	12,26	1	12,26	37,05	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	3,12	1	3,12	9,42	0,0083
X_1X_2	0,035	1	0,035	0,11	0,7505
X_1X_3	0,79	1	0,79	2,40	0,1435
X_1X_4	0,018	1	0,018	0,053	0,8206
X_2X_3	0,62	1	0,62	1,87	0,1935
X_2X_4	0,012	1	0,012	0,035	0,8544
X_3X_4	0,22	1	0,22	0,66	0,4298
X_1^2	3,93	1	3,93	11,88	0,0039
X_2^2	0,57	1	0,57	1,71	0,2117
X_3^2	0,68	1	0,68	2,06	0,1733
X_4^2	0,28	1	0,28	0,84	0,3747
OSTATAK	4,63	14	0,33		
NEDOSTATAK MODELA	4,22	10	0,42	4,10	0,0932
POGREŠKA	0,41	4	0,10		
UKUPNO	27,12	28			
R^2	0,8292				

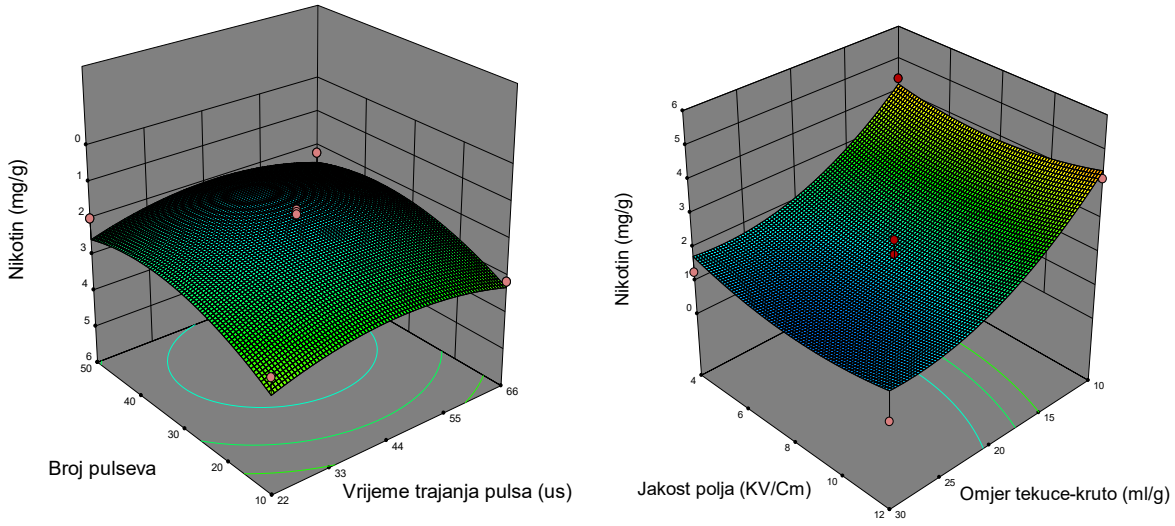
Tablica 10 pokazuje visoki statistički značaj parametra X_3 odnosno omjera tekuće-kruto (p<0,0001), statistički značaj parametara X_4 odnosno jakost polja (p-vrijednost= 0,0083) i

kvadratne vrijednosti parametra trajanja pulsa (X_1^2, *p*-vrijednost= 0,0039). Ostali parametri i njihove kombinacije nemaju statistički značaj ($p>0,05$). R^2 vrijednosti iznosi 0,8292.

Model u kodiranim vrijednostima, za nikotin (refabrikat):

Udio nikotina=1,95-0,067X_1+0,31X_2-1,01X_3-0,51X_4+0,093X_1X_2-0,45X_1X_3+0,066X_1X_4

-0,39X_2X_3+0,054X_2X_4+0,23X_3X_4+0,78X_1^2+0,30X_2^2+0,32X_3^2+0,21X_4^2 (10)



Slika 24: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na nikotin (Izvor: Autor)

Iz 3D dijagrama je vidljivo kako Omjer tekuće/kruto ima visoko statističko značenje, odnosno povećanjem omjera tekuće-kruto dolazi do povećanja udjela nikotina, ujedno i povišenjem jakosti polja. Ostali parametri, broj pulseva i trajanje pulsa nemaju statističko značenje, te ne dolazi do značajnog porasta nikotina njihovim povišenjem.

Tablica 11: Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva udio nikotina (list)

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	38,23	14	2,73	4,17	0,0057
X_1 – Trajanje pulsa	0,041	1	0,041	0,063	0,8049
X_2 – Temperatura	2,16	1	2,16	3,30	0,0907
X_3 – Omjer tekuće/kruto	21,65	1	21,65	33,09	< 0,0001
X_4 – Jakost polja	3,306E-003	1	3,306E-003	5,052E-003	0,9443
X_1X_2	3,301E-003	1	3,301E-003	5,045E-003	0,9444
X_1X_3	0,10	1	0,10	0,16	0,6964
X_1X_4	7,33	1	7,33	11,21	0,0048
X_2X_3	0,037	1	0,037	0,057	0,8145
X_2X_4	0,16	1	0,16	0,24	0,6326
X_3X_4	0,051	1	0,051	0,078	0,7835
X_1^2	1,78	1	1,78	2,73	0,1210
X_2^2	2,68	1	2,68	4,10	0,0624
X_3^2	4,37	1	4,37	6,69	0,0216
X_4^2	1,08	1	1,08	1,65	0,2201
OSTATAK	9,16	14	0,65		
NEDOSTATAK MODELA	8,64	10	0,86	6,60	0,0419
POGREŠKA	0,52	4	0,13		
UKUPNO	47,39	28			
R^2	0,8067				

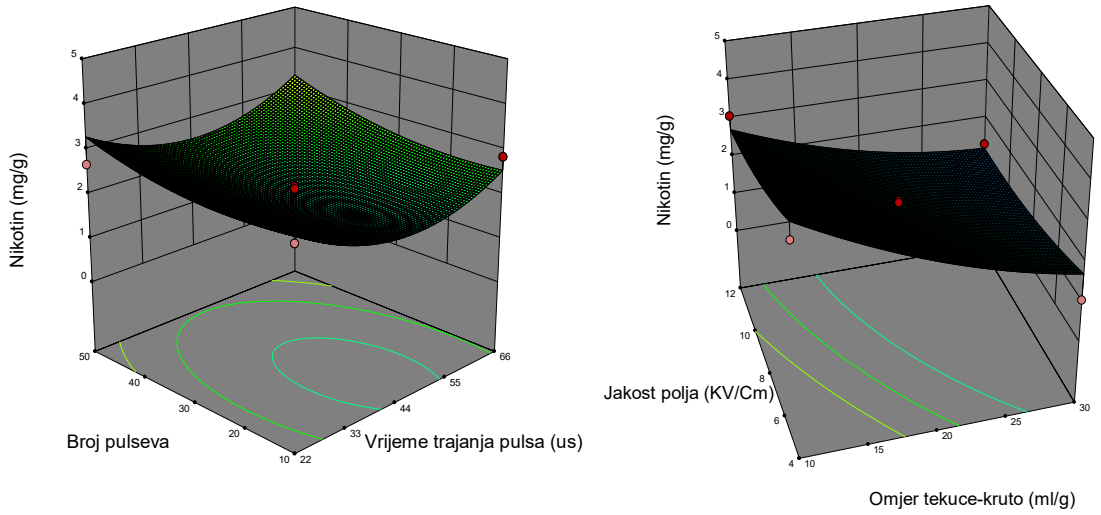
Analizom promatranih odziva za nikotin, možemo primijetiti da Omjer tekuće/kruto ima visoki statistički značaj (p<0,0001), dok kombinacija parametara X_1X_4 (p-vrijednost = 0,0048) i

kvadratna vrijednost X_3^2 (p-vrijednost= 0,0216) su statistički značajni (p<0,05). Ostali parametri i njihove kombinacije nemaju statistički značaj na udio nikotina. R^2 vrijednost govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi 0,8067.

Model u kodiranim vrijednostima, za nikotin:

Udio nikotina= $1{,}76-0{,}059X_1-0{,}42X_2-1{,}34X_3-0{,}017X_4+0{,}029X_1X_2-0{,}16X_1X_3-1{,}35X_1X_4$

$+0{,}097X_2X_3-0{,}20X_2X_4-0{,}11X_3X_4+0{,}52X_1^2+0{,}64X_2^2+0{,}82X_3^2+0{,}41X_4^2$ (11)



Slika 25: 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na nikotin (Izvor: Autor)

Slika 25 prikazuje kako Omjer tekuće/kruto ima značajan utjecaj na porast udjela nikotina, dok jakost polja, vrijeme trajanja pulsa i broj pulseva nemaju značajan utjecaj na porast udjela nikotina.

Metodom odzivnih površina konačan cilj je optimizacija procesa. Tako razvijeni modeli mogu se koristiti za optimizaciju i simulaciju. U prehrambenom inženjerstvu kao osnovni alat za unaprjeđenje različitih procesa radi dobivanja kvalitetnijeg proizvoda koristi se optimizacija. Za optimiranje procesa najčešće se primjenjuje metoda temeljena na konceptu željene funkcije. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija. Optimiranje se provodi tako da se promatrani odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 1

predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv, dok 0 predstavlja najlošiju. Cilj ovog istraživanja bio je pronaći optimalne parametre ekstrakcije za vrijednost udjela fenola, udjela flavonoida, antioksidacijski aktivnost i udjela nikotina. Za izračun su predloženi sljedeći uvjeti optimizacije:

- Maksimalna antioksidacijska aktivnost
- Maksimalni udio fenola i flavonoida
- Minimalan udio nikotina

Tablica 12: Optimalni uvjeti PLE ekstrakcije za duhanski otpad i list

		Refabrikat	**List**
Optimalni uvjeti ekstrakcije	Vrijeme	59,88 s	46,45 s
	Broj pulseva	49,91	29,76
	Omjer tekuće/kruto	28,44 mL/g	26,19 mL/g
	Jakost polja	4,01 kV/cm	7,1 kV/cm
Predviđene vrijednosti	DPPH	64,45 %	96,39 %
	Ukupni Fenoli	42,26 mg/g	61,0 mg/g
	Ukupni Flavonoidi	7,53 mg/g	0,06 mg/g
	Nikotin	2,1 mg/g	1,31 mg/g
Ukupna željena funkcija(desirability)		0,84	0,77

Primjenom funkcionalne metode (engl. *desirability function method*) (Cojoracu i sur.,2009), optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je dobivena najveća vrijednost željenih parametara prikazana je u **tablici 12** . Ukupna željena funkcija, u **tablici 12**, u vrijednosti 0,84 za refabrikat nam govori da dobivene vrijednosti parametara (vrijeme pulsa, broj pulseva, Omjer tekuće/kruto, jakost polja) predstavljaju dobro rješenje željene funkcije pojedinih praćenih odziva (maksimalna antioksidacijska aktivnost, maksimalni udio fenola i flavonoida i minimalan udio nikotina). Kod duhanskog otpada pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (vrijeme 59,88 s, broj pulseva 49,91, Omjer tekuće/kruto 28,44 mL/g i jakost polja 4,01 kV/cm) predviđene vrijednosti su za DPPH: 64,45%, ukupni fenoli: 42,26 mg/g, ukupni flavonoidi: 7,53 mg/g i nikotin 2,1 mg/g. Ukupna željena funkcija, u **tablici 12**, u vrijednosti 0,77 za list duhana nam govori da dobivene vrijednosti parametara(vrijeme pulsa, broj pulseva, Omjer tekuće/kruto, jakost polja) predstavljaju i dalje dobro rješenje željene funkcije pojedinih

praćenih odziva (maksimalna antioksidacijska aktivnost, maksimalni udio fenola i flavonoida i minimalni udio nikotina). Kod lista duhana pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (vrijeme 46,45 s, broj pulseva 29,76, Omjer tekuće/kruto 26,19 mL/g i jakost polja 7,1 kV/cm) predviđene vrijednosti su za DPPH: 96,39%, ukupni fenoli: 61,0 mg/g, ukupni flavonoidi: 0,06 mg/g i nikotin 1,31 mg/g.

5. Zaključak

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

- Variranjem procesnih parametara: vrijeme trajanja pulsa (22 s, 44 s, 66 s), broj pulseva (10, 30, 50), Omjer tekuće/kruto (10, 20, 30 mL/g) i jakost polja (4, 8, 12 kV/cm) na ispitivane odzive (antioksidacijska aktivnost, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, klorogenska kiselina, rutin i nikotin), vrijednosti ispitivanih veličina u velikoj mjeri su ovisile o uvjetima ekstrakcije te su bile u sljedećim rasponima: LIST – ukupni fenoli 14,06-74,83 mg/g, antioksidacijska aktivnost 60,99 - 97,72 %, ukupni flavonoidi 2,06-7,36 mg/g, nikotin 0,67-4,29 mg/g, klorogenska kiselina 1,07-3,24 mg/g i rutin 0,19-0,84 mg/g; REFABRIKAT- ukupni fenoli 8,83-46,03 mg/g, antioksidacijska aktivnost 40,95-65,16 %, ukupni flavonoidi 0,02-0,06 mg/g, nikotin 0,63-5,12 mg/g, klorogenska kiselina 0,19-0,40 mg/g, dok rutina nije pronađeno u refabrikatu.
- Neovisno o broju pulseva, vremenu pulseva i jakosti polja, pri omjeru tekuće-kruto 30 mL/g najveća je vrijednost sadržaja ukupnih fenola kod refabrikata i ona iznosi 0,06 mg/g.
- Dulje vrijeme izlaganja uzorka duhanskog otpada pulsirajućim električnim poljem i veći broj pulseva rezultira intenzivnim pucanjem staničnih stjenki biljnog materijala i oslobađanjem ekstraktivnih komponenti.
- Svi predloženi modeli za duhanski otpad tj. refabrikat i list duhana su statički značajni, sa značajnim vrijednostima statičkih parametara (R^2, *f*- i *p*-vrijednost) što ukazuje na primjenjivost predloženih modela.
- Klorogenska kiselina, polifenoli i rutin su visokovrijedne komponente duhanskog otpada koje se mogu koristiti u daljnjim postupcima prerade ili izolirati kao individualne komponente.
- Optimalni uvjeti ekstrakcije, pri kojima bi se dobio maksimalni udio fenola i flavonoida, maksimalna antioksidacijska aktivnosti i minimalan udio nikotina u ekstraktu refabrikata su: vrijeme pulsa 59,88 s, broj pulseva 49,91, Omjer tekuće/kruto 28,44 mL/g, te jakost polja 4,01 kV/cm.
- Optimalni uvjeti ekstrakcije, pri kojima bi se dobio maksimalni udio fenola i flavonoida, maksimalna antioksidacijska aktivnost i minimalan udio nikotina u ekstraktu lista

duhana su: vrijeme trajanja pulsa 46,45 s, broj pulseva 29,76, omjer tekuće- kruto 26,19 mL/g, te jakost polja 7,1 kV/cm.

- Inovativna tehnika ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem pokazala se pogodnom za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada.
- Primjena duhanskog otpada ima višestruke pozitivne utjecaje, kako na okoliš tako i na ukupnu cijenu proizvodnje duhana i smanjenje količine duhanskog otpada.

6.LITERATURA

Banga JR i Seider WD: Global optimization of chemical processes using stochastic algorithms U *State of the Art in Global Optimization* (563-583), Springer-Verlag New York Inc.,New York, 1996.

Banožić M, Banjari I, Jakovljević M, Šubarić D, Tomas S, Babić J, Jokić S: Optimization of Ulstrasound-Assisted Extraction of Some Bioactive Compounds form Tobacco Waste. *Molecules*, 24(8):1611, 2018.

Banožić M, Šubarić D, Jokić S: Tobbaco waste in Bosnia and Herzegovina-problem or high-value material? *Glasnik zaštite bilja*, 4:24-33,2018

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977, 2008.

Carley KM, Kamneva NY, Reminga J: Response surface methodology. *U CASOS Technical Report*, Carnegie Mellon University, 2004.

Chen J, Liu J, Lee FSC, Wang X: Simultaneous determination of non- volatile, semi- volatile, and volatile organic acids in tobacco by SIM-Scan mode GC-MS *Journal of Separation Science*., 31,137,2008

Chen Y, Yu QY, Li Y, Luo Y, Liu H: Extraction and HPLC Characterization of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals. *Separation Science and Technology*, 42: 3481- 3492, 2007

Clemens KJ, Caillé S, Stinus L, Cador M: The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacol* 12: 1355–66, 2009.

Czitrom V: One factor at a time versus designed experiments, *The American Statistician* 53: 126-131, 1999.

Cox DR, Reid N: The theory of the design of experiments. Boca Raton, FL: *Champman & Hall/CRC*,2000.

Dai Y, Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoortel R, Choil YH: Natural Deep eutectic Solvents as a ne: ,Pages w potential media for green technology, *Analytica Chimica* Acta 766:61-68,2013.

Devgun M, Nanda A, Ansaru SH: Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of hearthwood of *Pterocarpus Marsupium Roxb. Drug Resarch* 69(3): 475-485,2012.

Duan S, Du Y, Hou X, Yan N, Dong W, Mao X, Zhang Z: Chemical Basis of the Fungicidal Activity of Tobacco Extracts against Valsa mali. *Molecules* 21:3481-3492,2016

Edwards IM, Jutan A: Optimization and control using response surface methods. *Computers and Chemical Engineering*, 21:441-453, 1997.

Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin PR: Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1505-1513, 2005.

Fathiazad F, Delazar A, Amiria R, Sarkerb SD: Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3:222-227, 2006.

Gadžo D, Đikić M, Miljić A: Ostale biljke za industrijsku preradu- DUHAN. U *Industrijsko bilje* (183-207), Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 2011.

Gao T, Ci Y, Jian H, An C: FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy,* 24:225-23, 2000.

Gobbo- Neto L, Lopes NP: Online idetification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoid sin the Brazilian Arnica Lychnophora ericoides Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry 56* (4):1193-1204,2008

Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, Burke V, Croft KD: Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition, 56*: 1137-1142, 2002.

Hu RS, Wang J, Li H, Ni H, Chen YF, Zhang YW, Xiang SP, Li HH: Simultaneous extraction of nicotine and solanesol from waste tobacco materials by the column chromatographic extraction method and their separation and purification. *Separation and Purification Technology*, *146:* 1–7, 2015.

Jaiswal R, Matei MF, Golon A: Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. *Food Functional,* 3: 976–984, 2012.

Joglekar AM, May AT: Product excellence through design of experiments*. Cereal Foods World*, 32:857-868, 1987.

Karačonji BI: Facts about nicotine toxicity. *Institute for Medical Research and Occupational Health, 56*: 363-371, 2005.

Keča M, Gross S, Malnar I, Kalođera Z, Malojčić R: Izolacija solanesola iz duhana (Nicotiana tabacum L.) klasičnom ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom. *Farmaceutski glasnik, 53:* 173-182, 1997.

Kopčić N: Studij procesa aerobnog kompostiranja čvrstog otpada. Doktorski rad: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.

Levin ED, Wilson W, Rose J, McEvoy J: Nicotine-haloperidol interactions and cognitive performance in schizophrenics. *Neuropsychopharmacology, 15:* 429-436. (1996)

Lipshutz BH, Lower A, Berl V, Schein K, Wetterich F: An improved synthesis of the ‘‘miracle nutrient’’ coenzyme Q10. *Organic Letters*, 7: 4095–4097, 2005.

Liu Y, Dong J, Liu G, Yang H, Liu W, Wang L, Kong C, Zheng D, Yang J, Deng L, Wang S: Co-digestion of tobacco waste with different agricultural biomass feedstocks and the inhibition of tobacco viruses by anaerobic digestion. *Bioresource Technology 189,* 210–216. 2015.

Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, Racagni G, Corsini GU: Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *Journal Neurochem, 71*: 2439–2446, 1998.

Matthews R, Yang L, Browne S, Baik MH, Beal B: Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95:* 8892-8897, 1998.

Myers RH, Montgomery DC: Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. *John Wiley & Sons,* New York, NY, 1995.

Newhouse P, Kellar K, Aisen P, White H, Wesnes K, Coderre E, Pfaff A, Wilkins H, Howard D, Levin ED: Nicotine treatment of mild cognitive impairment: a 6-month double-blind pilot clinical trial. *Neurology*, 78: 91–101, 2012.

Novotny T, Bialous S, Burt L, Curti, C, da Costa V, Iqtida, S, Liu Y, Pujari S, d'Espaignet E: The environmental and health impacts of tobacco agriculture, cigarette manufacture and consumption. *Environmental Science & Technology* 26: 25-27, 2015.

Qi BC, Aldrich C: Biosorption of heavy metals from aqueous solutions with tobacco dust, *Bioresource Technology* 99: 5595.5601,2008.

Sándor PS, Di Clemente L, Coppola G, Saenger U, Fumal A, Magis D, Seidel L, Agosti RM, Schoenen J: Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*, 64, 713-715, 2005.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molho E, Harrison M, Lew M: Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Archives of neurology, 59:* 1541-1550, 2002.

Stepić H, Budimir A, Zdeličan J, Pleša Z, Kozumplik V: Proizvodnja i skladištenje sjemena duhana, Hrvatski duhani d.d., *Agronomski glasnik : Glasilo Hrvatskog agronomskog društva, Vol. 77 No. 4-6, 2015.* Virovitica, 2015.

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 449, 261-267, 2002.

Vuković M, Ćosić I, Kolačko K, Briški F: Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada. *Kemija u industriji*. 61, 417–425, 2012.

Wang J, Lu D, Zhao H, Ling X, Jiang B, Ouyang P: Application of response surface methodology optimization for the production of caffeic acid from tobacco waste. *African Journal of Biotechnology, 8*: 1416–1424, 2009.

Wang J, Lu D, Zhao H, Jiang B, Wang J, Ling X, Chai H, Ouyang P: Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC–MS/MS. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 875–891, 2010.

Wang, W, Xu P, Tang H: Sustainable production of valuable compound 3-succinoyl-pyridine by genetically engineering Pseudomonas putida using the tobacco waste. *Scientific Reports 5*: 16411, 2015.

White HK, Levin ED: Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*, 143, 158–165, 1999.

Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Pokomeda K: Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology* 160 : 150-60, 2014.

Xu C, Yang C, Mao D: Fraction and chemical analysis of antioxidant active polysaccharide isolated from flue-cured tobacco leaves, *Pharmacognosy Magazine 10:* 66-69, 2014.

Xue M, Shi H, Zhang J :Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Molecules* 21:948–961, 2016.

Yan N, Liu Y, Gong D, Du Y, Zhang H, Zhang Z: Solanesol: a review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*.,14, 403–417, 2015.

Zhang XZ, Gao HJ, Zhang LF, Liu DH, Ye XQ: Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 39:162-169, 2012.

Zhang K, Yu BT, Chang J, Wu GY, Wang TD, Wen DS: Hydrodynamics of a fluidized bed co-combustor for tobacco waste and coal. *Bioresource Technology 119*: 339–348, 2012.

Zielke D, Liebe R: The Removal of Stems from Cut Tobacco, *The Journal of BTFI GmbH 17:* 49-55, 1997.

Web izvori: https://hr.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Nicotiana_tabacum_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-098.jpg, slika 1, pristupano 12. travnja 2020.