Primjena ultrazvuka za ekstrakciju steviol glikozida iz lista stevije

Čirjak, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:194863

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marina Čirjak

6609/PT

PRIMJENA ULTRAZVUKA ZA EKSTRAKCIJU STEVIOL GLIKOZIDA IZ LISTA STEVIJE

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija vina
Mentor: prof. dr. sc. Mara Banović

Zagreb, 02.rujan 2015.

Zahvaljujem profesorici Mari Banović na svesrdnoj pomoći i strpljenju pri izradi završnog rad

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrembeno-tehnološki inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

PRIMJENA ULTRAZVUKA ZA EKSTRAKCIJU STEVIOL GLIKOZIDA IZ LISTA STEVIJE

Marina Čirjak 6609/PT

Sažetak: Ultrazvuk u prehrambenoj industriji ima široku primjenu, a jedan od primjera je i ekstrakcija bioaktivnih sastojaka iz biljnog materijala. U ovom radu provedena je ekstrakcija steviol glikozida iz suhog lista biljke Stevie. Za provedbu eksperimenta su primjenjene metoda ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta te metoda ekstrakcije vodom po Soxletu. Uvjeti ekstrakcije ultrazvukom (vrijeme, amplituda i temperatura) su mijenjani tijekom eksperimenta. Udio steviol glikozida određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dobiveni rezultati pokazali su da se pri svim primjenjenim uvjetima ekstrakcije ultrazvukom dobije veće iskorištenje steviol glikozida nego pri ekstrakciji u aparaturi po Soxletu.

Ključne riječi: *bioaktivni sastojci, ekstrakcija, HPLC, Stevia rebaudiana Berton , ultrazvuk*
Rad sadrži: 35 stranice, 14 slika, 6 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *prof.dr.sc. Mara Banović*
Pomoć pri izradi: *izv.prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak, mag.ing. Tomislava Vukušić*
Rad predan: 2. Rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

THE USE OF ULTRASOUND FOR THE EXTRACTION OF STEVIOL GLYCOSIDES FROM STEVIA LEAF

Marina Čirjak 6609/PT

Abstract: Ultrasound in the food industry is widely used, one example is the extraction of bioactive compounds from plant materials. This paper describes the extraction of steviol glycosides from the dried leaves of the plant Stevie. To conduct the experiment, were applied the method of extraction of high-intensity ultrasound and. Terms of ultrasonic extraction (time, amplitude and temperature) are changed during the experiment. The share of steviol glycosides was determined using high performance liquid chromatography (HPLC). The results shows that in all conditions applied ultrasonic extraction obtain higher yields steviol glycosides, but the Soxhlet extraction method.

Keywords: *bioactive compounds, extraction, HPLC, ultrasound, Stevia rebaudiana Bertoni*
Thesis contains: 35 pages,14 figures, 6 tables, 45 references, 0 supplements
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *PhD Mara Banović, full professor*
Technical support and assistance: *PhD Anet Režek Jambrak, associate professor*, *Tomislava Vukušić, mag.ing., scientific assistant*

SADRŽAJ :

---

1. **UVOD** 1

2. **TEORIJSKI DIO** 2
   2.1.Teorijski principi o ultrazvuku 2
   2.2. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji 3
   2.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponentni.....13
   2.3.1 Metode ekstrakcije bioaktivnih komponenti.....14
   2.4. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) 18
   2.4.1. Sastav lista stevije 19

3. **EKSPERIMENTALNI DIO** 23
   3.1. Materijali 23
   3.2. Metode ekstrakcije 23
   3.3. Metode analize 25

4. **REZULTATI I RASPRAVA** 28

5. **ZAKLJUČAK** 31

6. **POPIS LITERATURE** 32

1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina znanstvena istraživanja su sve više usmjerena na razvoj novih tehnika procesiranja hrane kojima je moguće dobiti proizvode visoke kvalitete. Jedna od tih tehnika je i ultrazvuk visokog intenziteta čijom primjenom dolazi do fizičkih promjena na biološkom materijalu te do ubrzanja pojedinih kemijskih reakcija. Ultrazvuk visokog intenziteta je tehnika kojom se postiže minimalno procesiranje hrane, očuvanje namirnice te smanjenje degradacije biološki aktivnih spojeva te stoga ima široku primjenu u prehrambenoj i prerađivačkoj industriji. U ovom radu primjenjen je u svrhu ekstrakcije steviol glikozida (steviozida i rebaudiozida) iz lišća stevije.

Stevija i njeni diterpenski glikozidi koriste se kao prirodni zaslađivači te se primjenjuju u pripremi brojnih proizvoda u prehrambenoj industriji. Prah dobiven ekstrakcijom iz listova stevije je 200 do 300 puta slađi od konzumnog šećera, nema energetsku vrijednost te ne izaziva inzulinski odgovor. Također toksikološke analize su pokazale da steviozidi nisu mutageni i kancerogeni te da ne pokazuju alergijske reakcije kada se koriste kao zaslađivači.

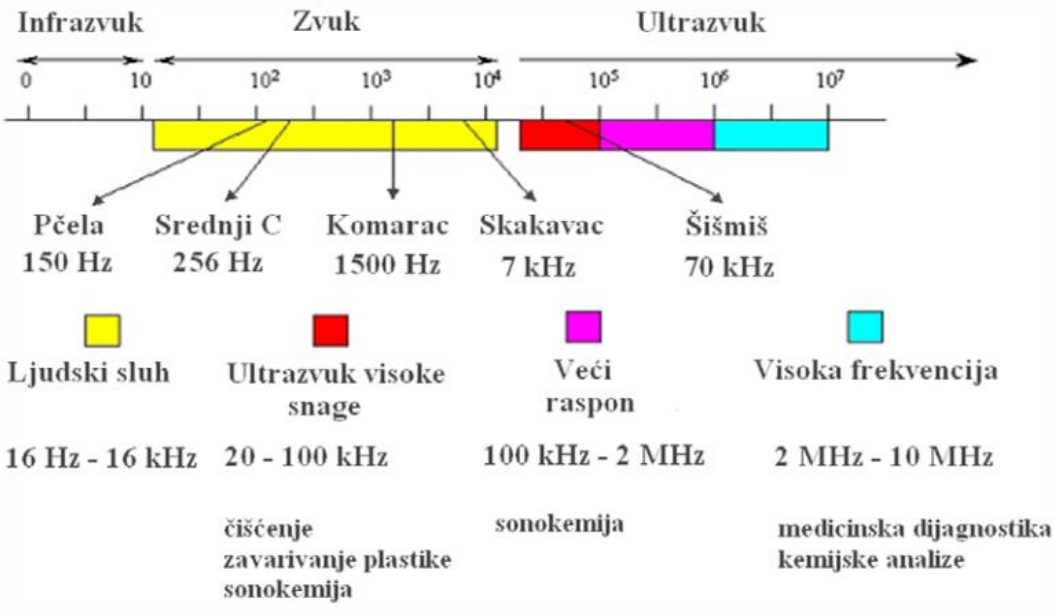
Kako bi se dobio prah steviol glikozida trenutno se u prehrambenoj industiji koriste klasične metode ekstrakcije, koje pokazuju brojne nedostatke kao što su dug period ekstrakcije, relativno mala iskorištenja, korištenje velike količine energije, povećano korištenje otapala te puno oslobođene energije.

U ovom radu steviozidi i rebaudiozidi ekstrahirani su pomoću dvije metode: ekstrakcija vodom u aparaturi po Soxhletu te ekstrakcija ultrazvkom visokog intenziteta, kako bi se odredilo da li ultrazvuk visokog intenziteta može poslužiti kao zamjena klasičnim metodama ekstrakcije te se tako otklonili gore spomenuti nedostatci. Udio steviol glikozida (steviozida i rebaudiozida A) određivan je tehnikom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC). Dobiveni rezultati su uspoređeni te je zaključeno da je udio steviozida i rebaudiozida iz lišća stevije ekstrakcijom pomoću ultrazvuka visokog intenziteta bio veći nego primjenom ekstrakcije u aparaturi po Soxhletu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEORIJSKI PRINCIPI ULTRAZVUKA

Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji predmet je istraživanja i razvoja nekoliko desetaka godina. Pod ultrazvukom podrazumijevamo zvučni val s frekvencijama višima od praga osjetljivosti ljudskog sluha (16-18 kHz) (*slika 1*).



Slika 1. *Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998.)*

Rasponi zvuka pri ultrazvuku mogu se općenito podjeliti na:

- **dijagnostički ultrazvuk** (raspon u MHz), ultrazvučni valovi niskog intenziteta – visoke frekvenije i niske energije

- **ultrazvuk visoke energije** (raspon u kHz), ultrazvučni valovi visokog intenziteta – niske frekvencije i visoke energije

Ultrazvučni valovi niskog intenziteta – frekvencije 1 do 10 MHz te vrlo male razine snage (manje od 1 W/cm^2) ne dovode do fizikalnih i kemijskih oštećenja materijala kroz koji prolaze, a mogu se koristiti u analitičke svrhe za određivanje sastava,strukture ili viskoznosti hrane. Također se može koristiti za stimulaciju asistiranu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, procese sušenja i zamrzavanja, kao i za omekšivanje mesa.

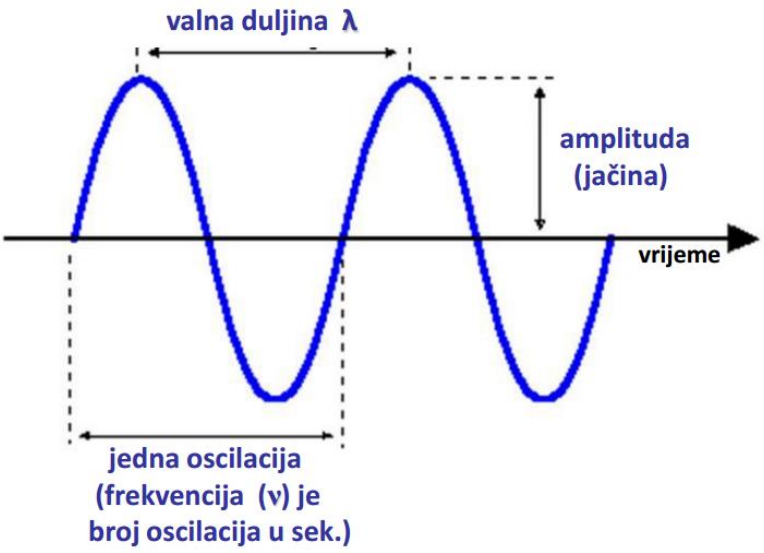
Ultrazvučni valovi visokog intenziteta – frekvencije 20 do 100 kHz te visoke razine snage (u rasponu od 10 do 1000 W/cm^2), zbog velike snage kojom djeluju na materijal,uzrokuju fizička oštećenja tkiva kao i određene kemijske reakcije. Ultrazvuk visokog intenziteta tijekom prolaska kroz materijal uzrokuje ubrzavanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009).

2.1.1. Amplituda, frekvencija, valna duljina i koeficijent atenuacije zvučnog vala

Zvučni val karakterizira amplituda [A] i frekvencija [f] te valna duljina i koeficijent atenuacije [α] koji ovisi o karakteristikama materijala kroz koji ultrazvuk prolazi. Premještanje ultrazvučnog vala kroz materijal varira sinusoidno s vremenom, a amplituda se smanjuje s porastom udaljenosti od izvora ultrazvuka zbog atenuacije. Koeficijent atenuacije koji predstavlja smanjenje amplitude ultrazvučnog vala tijekom njegovog prolaza kroz materijal može se definirati izrazom:

$$A = A_0 \times e^{-\alpha x}$$

gdje je A_0 inicijalna amplituda zvučnog vala, a x je prijeđena udaljenost. Glavni uzroci prigušenja su adsorpcija i raspršivanje. Adsorpcija je uzrokovana fizikalnim mehanizmom koji pretvara ultrazvučnu energiju u toplinu. Raspršivanje pojavljuje u heterogenim materijalima kao što su emulzije, suspenzije i pjene. Za razliku od adsorpcije, energija ultrazvuka zbog raspršivanja još je uvijek prisutna kao ultrazvučna energija, ali se ne detektira jer su njezin smjer i faza prenošenja promijenjeni (Herceg i sur., 2009).



***Slika 2**. Izgled i karakteristike sinusnog vala (Kovač, 2015)*

2.1.2. Kavitacija

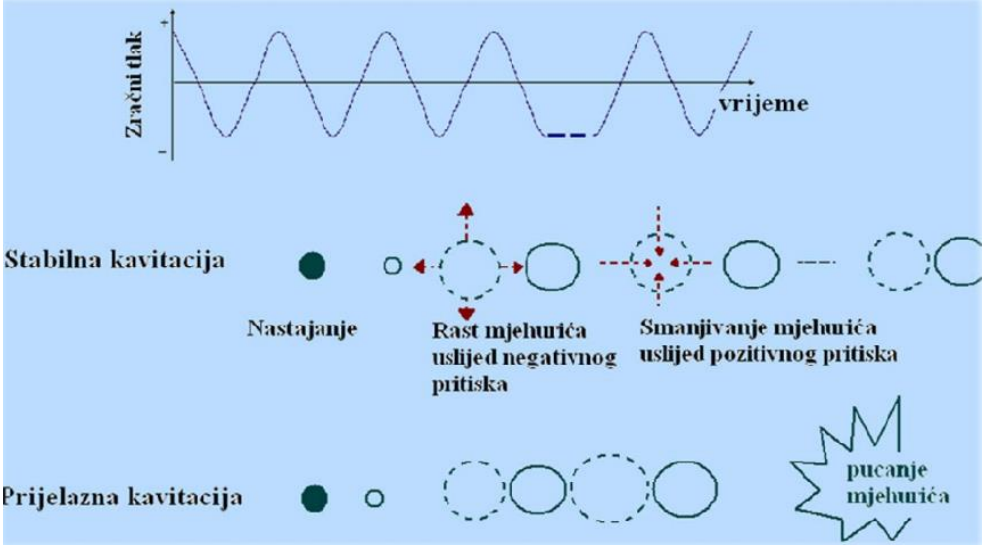
Prolaskom zvučnog vala tekućim medijem, kao longitudinalnog vala, stvaraju se izmjenični pritisak i ekspanzijski vrtlozi. Djelovanjem ekspanzijskih vrtloga u tekućini se stvara negativan tlak. Kad je taj tlak dovoljno nizak da svlada intramolekularne sile, formiraju se mali mjehurići. Tijekom slijedeće ekspanzije/kompresije vrtloga mjehurići pare se šire i skupljaju. Formiranje i nastanak mjehurića poznat je kao kavitacija.

Kavitacija koja nastaje djelovanjem ultrazvuka niskog intenziteta (frekvencije 1 do 10 MHz) te vrlo male razine snage, koja uzrokuje nastajanje mjehurića čija veličina neznatno oscilira tijekom nastajanja tisuća vrtloga (minimalno se mijenja promjer mjehurića), poznata je kao „stabilna kavitacija“.

Ultrazvuk djeluje tako da mjehurići vibriraju unutar stabilne kavitacije, uzrokujući jaka mikrostrujanja u tekućem mediju. Pri frekvenciji od oko 1 MHz, kavitacija je manje moguća, a na frekvencijama višim od 2,5 MHz neće doći do kavitacije.

Zbog prolaska ultrazvuka visokog intenziteta (frekvencije 20 – 100 kHz) te visoke razine snage kroz tekući medij, veličina mjehurića snažno oscilira. Dodirna površina mjehurića sve je veća tijekom uzastopnih ekspanzija i kompresija, što poboljšava

difuziju plina. Rezultat toga je da se veličina mjehurića povećava tijekom svakog ciklusa. Nakon brojnih ciklusa kompresije i ekspanzije, mjehurići dostižu kritičnu veličinu te u sljedećem ciklusu kompresije para iznenada kondenzira, a mjehurići implodiraju. Molekule oko mjehurića snažno se sudaraju jedna s drugom, stvarajući mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom (5500 °C) i visokim tlakom (104 – 105 kPa). Taj je fenomen poznat kao „kratkotrajna ili prijelazna kavitacija".



Slika 3*.Stabilna i prijelazna kavitacija (Kujipers i sur., 2002)*

Prag kavitacije ovisi o frekvenciji ultrazvučnih valova, amplitudi nastalog tlaka te o početnomu polumjeru mjehurića. Promjene tlaka (potrebne da dođe do kavitacije) unutar medija tijekom tretiranja ultrazvukom ovise o fizikalnim karakteristikama tekućeg medija kao i o udjelu otopljenog plina. Važni faktori su također hidrostatski tlak i temperatura. Vrlo visoki hidrostatski tlak može prouzročiti difuziju plina iz mjehurića te tako smanjiti kavitaciju. Prag kavitacije također se smanjuje s porastom temperature te dostiže nulu pri temperaturi vrenja.

Učinak ultrazvuka pri procesiranju hrane ovisi o broju mjehurića koji podliježu kavitaciji te o jačini njihove implozije.

Broj mjehurića – povećava se povećanjem amplitude ultrazvučnih valova, budući da pri višim amplitudama veći dio volumena tekućeg medija podliježe kavitaciji.

Intenzitet implozije mjehurića ovisi o omjeru maksimalne i početne veličine mjehurića, a taj je omjer u uskoj vezi sa snagom ultrazvuka (Herceg i sur., 2009).

2.1.3. Učinci ultrazvuka tijekom prolaska kroz medij

Širenje akustičnog vala kroz medij uzrokuje različite promjene. Najznačajniji učinci ultrazvuka su: kavitacija, zagrijavanje, strukturni učinci, kompresija i širenje, turbulencija i ostalo (Režek Jambrak, 2008).

Za primjenu u prehrambenoj tehologiji osobito su važni procesi koji se zasnivaju na pojavi kavitacije te se stoga primjena ultrazvuka u procesiranju hrane može podijeliti u dvije osnovne kategorije:

- primjena ultrazvuka ispod praga kavitacije
- primjena ultrazvuka iznad praga kavitacije

Podvrgne li se neka tekućina zvučnim ili ultrazvučnim vibracijama, nastaju sitni mjehurići. Prolazak energije zvuka kroz medij rezultira kontinuiranim gibanjem nalik valu, te će nastati longitudinalni valovi pri čemu se stvara alternativna kompresija i razrjeđenje dijelova medija. Kad je amplituda nastalog tlaka (uslijed kompresije) veća od hidrostatskog tlaka, tada u tekućini tijekom negativne faze dolazi do kavitacije, odnosno do stvaranja iznimno malih mjehurića. Rad proizveden kavitacijom je posljedica „šoka" valova do kojeg dolazi pri pucanju mjehurića. Intenzitet tog „šoka" valova ovisi o značajkama tekućine, početnom polumjeru mjehurića i primjenjenoj frekvenciji (Herceg i sur., 2009).

2.1.5. Vrste ultrazvučnih reaktora

Više je stotina tipova ultrazvučnih sustava koji se trenutno upotrijebljavaju,a razlikuju se prema dizajnu pretvarača, tipovima pretvarača te načinom na koji se ultrazvuk predaje procesu. Za procesno-prehrambenu industriju od posebnog su značenja ultrazvučna kupelj i sustav ultrazvučne sonde (Herceg i sur.,2009).

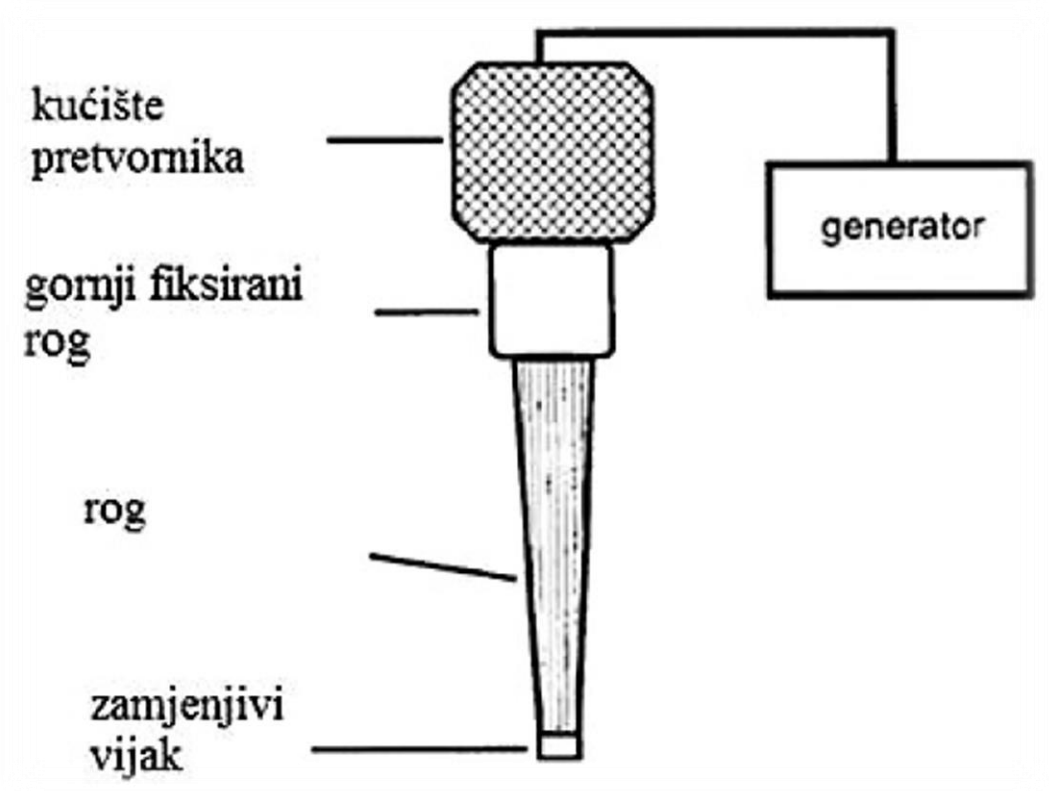
- **Sustav sa direktno uronjenom sondom**

  Većina uređaja za dobivanje ultrazvuka visokog intenziteta temelje se na elektroakustičnim sustavima, tj. piezoelektričnom ili manje uobičajenom magnetostriktivnom pretvorniku. Koji god se od ova dva pretvornika koristi, najvažnije je da se energija utrazvuka dostavlja tekućem sustavu koji se tretira (Barbosa-Canovas i sur.,2005). Uobičajeni ultrazvučni postav prikazan je na *slici 4*, i sadrži slijedeće osnovne dijelove:

- *generator* koji pretvara električnu energiju u zahtjevanu visoku frekvenciju izmjenične struje

- *pretvornik* pretvara visoku frekvenciju izmjenične struje u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitacije.

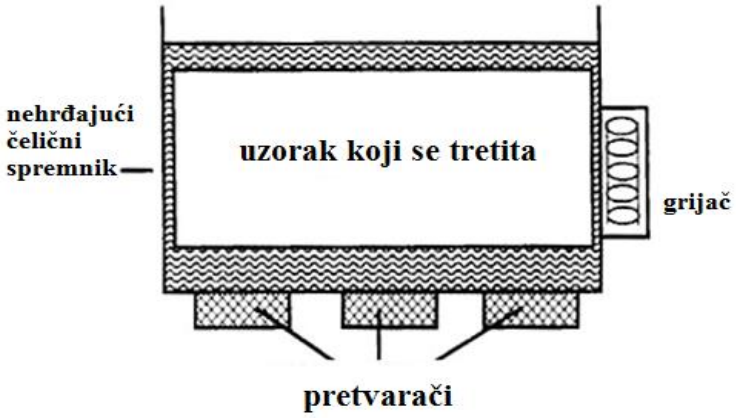
U slučaju ultrazvučne kupelji pretvornik je spojen na dno spremnika i dostavlja vibracije direktno tekućini koja je u spremniku (Brnčić i sur).



Slika 4*. Sustav sa direktno uronjenom sondom (De Castro i Capote, 2007)*

- **Ultrazvučne kupelji**

Ultrazvučna kupelj (*slika 5*) je spremnik koji sadrži procesni medij sa pretvaračem ili više njih vezanim na dno tj. bazu (Režek Jambrak, 2008).
Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno su jeftine (Fernandes i Rodrigues, 2007). Glavnina ultrazvučnih kupelji radi na frekvencijama od 20.40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur., 2009).



Slika 5*. Ultrazvučna kupelj (Gogate i sur., 2006)*

Postoje različite izvedbe ultrazvučnih kupelji te to omogućava velik broj parametara koji se mogu proučavati, a uključuju:

- Termostatski kontrolirano grijanje i promjenjiva snaga.

- Frekvencijsko prostiranje: dobiva se ujednačenije polje kavitacije pri čemu se izbjegavaju stojni valovi koji bi inače ograničili kavitaciju.

- Pokretna sila koja nastaje uključivanjem ili isključivanjem omogućava kratak signal isprekidane snage ili njezino pulsiranje. Ovo je obično korisno pri otplinjavanju, je ako se na neko vrijeme zaustavi signal svi otplinjeni mjehurići izbijaju na površinu. U protivnom mjehurići ostaju zarobljeni u stojnim valovim i odgovorni su za adsorpciju energije ultrazvuka.

- Električni mjerači vremena koji omogućuju različito trajanje tretmana i perioda kad je isključen.

Standardne ultrazvučne kupelji rade pri nižem intenzitetuu da bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika uzrokovano kavitacijom, a i manjim akustičnim snagama jer su volumeni tretirane tekućine u spremniku najčešće veliki (Brnčić i sur., 2009).

2.2. PRIMJENA ULTRAZVUKA U PREHRAMBENOJ TEHNOLOGIJI

U svrhu odgovarajuće primjena ultrazvuka u pojedinim područjima kako prehrambene tehnologije tako i u drugima, važno je poznavati njegovu energiju koja je određena snagom zvuka (W), intenziteta (W/m^2) i gustoćom ($W\ s/m^3$). Uobičajena je podjela na ultrazvuk niske i visoke snage ili sinonime niske frekvencije niske amplitude, visoke frekvencije niske amplitude ili niske frekvencije visoke amplitude (Režek Jambrak, 2008).

Ultrazvuk niske amplitude i visoke frekvencije može se primjeniti u industrijskim uvjetima za praćenje procesiranja hrane. Navedena industrijska primjena uključuje određivanje teksture, viskoznosti i koncentracije tvari u jajima, mesu, voću i povrću, mliječnim i drugim proizvodima, za mjerenje gustoće te za praćenje i kontrolu različitih procesa (Herceg i sur., 2009).

Osim za praćenje procesiranja hrane, ultrazvuk se u prehrambenoj industriji može primjeniti i u ovim procesima:

- **Inaktivacija mikroorganizama i enzima**

  Letalan je učinak ultrazvuka niskog intenziteta malen te se mnogi autori slažu da je za letalne učinke odgovorna kavitacija nastala djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta. U trenutku implodiranja mjehurića zraka pod djelovanjem ultrazvuka, ostvaruju se visoke temperature i tlakovi, tzv. šok valovi topline ili tlaka, za koje se smatra da su odgovorni za letalan učinak ultrazvuka. S druge strane, ekstremno visoka temperatura i tlak nastali kolapskom mjehurića mogu voditi do disocijacije vodene pare u OH- radikale i H+ ione. Ti vrlo reaktivni radikali smatraju se odgovornima za inaktivaciju bakterijskih stanica oksidacijom. Procesi oksidacije uzrokuju oštećenja nekih mikrobioloških struktura prije nego što počne sama inaktivacija. Međutim, ta se oštećenja mogu popraviti nakon završenog tretiranja pa se nastoji stvoriti nepovoljne uvjete za rast i razvoj prethodno oštećenih mikroorganizama. Kada mjehurić implodira, u tekućini izloženoj djelovanju ultrazvuka dolazi do oslobađanja topline. Volumen zagrijane tekućine vrlo je malen te toplina brzo nestaje, iako je temperatura tog mikropodručja u nekoliko milisekundi vrlo visoka (oko 5000 °C).

  Novija istraživanja pokazuju da toplina ne sudjeluje u letalnom učinku ultrazvuka. Naime, postoji čitav niz faktora koju upućuju na različite mehanizme inaktivacije toplinskih tretiranja i ultrazvučnog procesa. Nadalje, otpornost bakterija

na toplinu jako varira, dok je otpornost na tretiranje ultrazvukom slična u svih vegetativnih stanica. Također, na vrijeme decimalne redukcije pri obradi toplinom (Dt) znatno utječu faktori okoline, dok pri tretiranju ultrazvukom vrijeme decimalne redukcije (Dms) uglavnom nije ovisno o utjecaju okoline.

Šok valovi tlaka, nastali implozijom mjehurića koji podliježu kavitaciji, najvjerojatnije su posljednji i najvažniji razlog inaktivirajućeg učinka ultrazvuka na mikroorganizme. Mnogi istraživači se slažu da valovi tlaka koji prolaze kroz tekući medij kao posljedica kavitacije, uzrokuju mehaničko uništenje stanične membrane, a time i uništenje mikroorganizama (Herceg i sur., 2009).

- **Ubrzavanje reakcija**

  Ultrazvuk niskog intenziteta a visoke frekvencije omogućuje ubrzavanje reakcija dekompozicije, degradacije polimera i reakcija polimerizacije.

- **Čišćenje i odzračivanje tekućina**

  Mehanički i fizikalni učinci ultrazvuka često se rabe pri čišćenju površina (Herceg, 2009). Čišćenje ultrazvukom se pokazalo posebno korisno u sprezi sa kemijskom obradom a nudi prednosti kao što su: smanjena kemijska potrošnja, smanjen kontakt radnika sa opasnim kemikalijama, poboljšana brzina čišćenja te učinkovitost čišćenja (Mason, 2003). Dok se mehanički i fizički učinci rabe pri čišćenju površina učinci kavitacije su razlog vrlo uspješne upotrebe ultrazvuka u odzračivanju tekućina. Prisutnost otopljenog plina ili mjehurića plina u mediju djeluje kao nukleus za stvaranje kavitacijskih mjehurića. Takvi mjehurići se u kompresijskom stupnju vala ne raspadaju zbog toga što sadrže plin. U sljedećim stupnjevima širenja oni će puniti sve više plinom i tako nastaviti rasti i eventualno plutati prema površini. Pošto se širenje mjehurića događa vrlo brzo (u kupeljima i do 40 000 puta u sekundi) do odzračivanja dolazi gotovo trenutno (Režek Jambrak, 2008).

- **Kristalizacija i zamrzavanje**

  Za ultrazvuk visokog intenziteta dokazana je velika učinkovitost u procesima kristalizacije šećera pri čemu ultrazvuk pospješuje stvaranje centara kristalizacije i rast kristala.

  Ultrazvuk se također može rabiti u kontroli stvaranja kristala leda tijekom zamrzavanja namirnice što je jedan od važnijih faktora u procesiranju hrane zamrzavanjem u prehrambenoj industriji. Poznato je da kvaliteta smrznute hrane ovisi o veličinni kristala leda. Prisutnost velikih kristala leda unutar tkiva smrznute

namirnice uzrokuje mehanička oštećenja, gubitak tekućine te na taj način smanjuje kvalitetu proizvoda. Brzim zamrzavanjem nastaju mali intracelularn kristali leda, dok sporim zamrzavanjem nastaju veliki kristali leda. Da bismo dobili kvalitetan proizvod, potrebno je brzo zamrznuti, a ultrazvuk visoke snage (frekvencije od 20 do 100 kHz) pokazao se učinkovitim tijekom zamrzavanja prehrambenih proizvoda budući da je uočeno kako se djelovanjem ultrazvuka brže i jednoličnije stvaraju centri kristalizacije te da time nastaju manja oštećenja stanica. Osim toga, neke su studije pokazale da ultrazvuk visoke snage potiče prijenos topline te na taj način povećava brzinu zamrzavanja (Herceg i sur., 2009).

- **Sušenje**

  Ultrazvuk se uspješno može primjeniti za sušenje mnogih prehrambenih proizvoda, pri čemu se u znatnoj mjeri skraćuje vrijeme sušenja. Sušenje ultrazvukom odvija se pri puno nižim temperaturama nego li konvencijalne metode sušenja što smanjuje vjerojatnost oksidacije i degradacije materijala (Ensminger, 1988). Najčešće se primjenjuje za predtretiranje sirovine, a u novije doba provode se ispitivanja istodobnog ultrazvučnog tretiranja i izdvajanja vode iz namirnice vakuumiranjem.

- **Filtracija**

  Ultrazvučnom filtracijom povećava se stupanj protoka kroz filtar. Dva su sprecifična načina djelovanja ultrazvuka tijekom procesa filtracije:
  1. sonifikacija koja uzrokuje razbijanje aglomerata te tvorbu sitnijih čestica i time dovodi do brze filtracija, i
  2. sonifikacija koja osigurava dovoljno vibracijske energije sustavu za održavanje djelomično suspendiranih čestica u suspenziji, osiguravajući na taj način više slobodnih "kanala" za izlazak tekućine, odnosno sprječavajući tvorbu filtarskog kolača.

  Kombinirani utjecaj tih učinaka uspješno se primjenjuje u poboljšavanju vakuumske filtracije industrijskih mješavina kao što su otpadne vode (Kyllönen i sur., 2006) te u proizvodnji voćnih ekstrakata i pića (Mason i sur., 1996).

- **Homogenizacija**

  Provedena ispitivanja pokazala su da se tretiranje ultrazvukom uspješno može primjeniti u mljekarskoj industriji u procesu homogenizacije mlijeka u kojoj kontunuirani ultrazvučni homogenizatori pokazuju visoku učinkovitost te znatno

niže troškove zbog manje potrošnje energije u usporedbi s klasičnim homogenizatorima.

Bosiljkov (2011) je ultrazvukom tretirao mlijeko (sojino, kravlje, ovčje i kozje mlijeko) te su kombinacijom različitih parametara (amplituda, vrijeme i promjer sonde) dobivene vrlo stabilne emulzije. Utvrđeno je da nakon uspješne homogenizacije primjenom ultrazvuka mlijeko ostaje u svom izvornom obliku, nepromjenjenog kemijskog sastava (Bosiljkov i sur., 2013)

- **Ubrzavanje procesa ekstrakcije**

  Ekstrakcija organskih tvari, koje sadržavaju dijelovi biljaka i zrna, otapalom znatno je poboljšana upotrebom ultrazvuka visoke snage. Mehanički učinci ultrazvuka osiguravaju vee prodiranje otapala u stanične materijale te poboljšavaju transfer mase. Dodatna korist upotrebe ultrazvuka visoke snage u procesima ekstrakcije ogleda se u oštećenju bioloških staničnih stijenki i time poboljšanju otpuštanja sadržaja.

  Ultrazvuk može poboljšati postojeće mehanizme ekstrakcije te omogućiti nove mogućnosti komercijalne ekstrakcije (Drmić i Jambrak, 2010).

  Albu i sur. (2004) su proveli ekstrakciju karozinske kiseline iz biljke ružmarina *(Rosmarinus officinalis)* koristeći razna otapala. Ekstrahirani su i suhi i svježi listovi biljke pri istoj temperaturi. Rezultati su pokazali da su se primjenom ultrazvuka prinosi povećali te da je smanjeno vrijeme ekstrakcije.

- **Emulgiranje**

  Jedna od prvotnih upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji bila je vezana za proces emulgiranja. Stabilne emulzije dobivene ultrazvukom koriste se u brojnim granama industrije kao što su: tekstilna, farmaceutska, kozmetička te prehrambena industrija. Takve su emulzije obično stabilnije od onih konvencionalno proizvedenih i obično zahtjevaju vlo malo, ili nimalno, surfaktanata (tvari koje smanjuju površinsku napetost) (Mason i sur., 1996). Dobivene emulzije imaju manju veličinu kapljica u usporedbi s emulzijama dobivenim drugim metodama (Herceg i sur., 2009). U prehrambenoj industiji emulgiranje primjenom ultrazvuka se koristi pri proizvodnji voćnih sokova, majoneze te ketchupa , pri homogenizaciji mlijeka te za inkapsulaciju arome (Cheamt i su., 2010).

2.3. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Raso i sur., 1995).

Općenito za ekstrakciju vrijedi slijedeće (Eskilsson i Bjorklund, 2000):

- Kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povečati površinu uzajamnog djelovanja među fazama (usitnjavanjem i homogenizacijom)
- Kod ekstrakcije u sredini treba povećati brzinu gibanja faza
- Prilikom povećanja količine tvari treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije

Za vrijeme mirovanje odvija se prijenos mase, tj. otopljenje tvari prelaze iz namirnice u otapalo.

Prijenos mase odvija se u 3 stupnja:

1. Željena komponenta se otapa u otapalu
2. Smjesa otopljene tvari i otapaa prelazi iz namirnice na površinu
3. Otopljena tvar se raspršuje u volumenu otapala (Raso i sur., 1995).

Osnovni faktori koji utječu na ekstrakciju su temperatura, pH vrijednost, veličina čestica i vrsta otapala (Wang i sur., 2006).

Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati prilikom izbora potrebno je uzeti u obzir (Albu i sur., 2004):

- Polarnost
- Točku ključanja – treba biti što niža, da olakša odvajanje otapala od komponente
- Reaktivnost – otapalo ne smije reagirati sa ekstraktom, niti se smije razgrađivati
- Viskozitet – otapalo mora imati nizak viskozitet
- Stabilnost otapala na toplinu, kisik i svjetlo
- Sigurnost pri upotrebu – po mogučnosti otapalo mora biti nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš
- Mora biti dostupno u dovoljnim količinama
- Cijena – mora biti jeftino
- Pogodnost za ponovnu upotrebu.

Nakon provedene ekstrakcije otapalo je potrebno ukloniti i to uz pomoć grijanja, destilacije, otparavanja ili neke druge prikladnije operacije.

Fenolne komponente hrane i prehrambenih proizvoda su stekle veliku popularnost otkrivanjem njihove karakteristične antioksidativne aktivnosti te potencijalno korisnih učinaka koje mogu imati na ljudsko zdravlje, od prevencije raka do prevencije kardiovaskularnih bolesti (Pearson i sur., 1999). Općenito, voće i povrće je najvažniji izvor različitih tipova korisnih fenolnih komponenti (Markowski i Plocharski, 2006).

2.3.1. METODE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI

Konvencionalne metode ekstracije su dugotrajne te zahtjevaju veću količinu otapala. U konvencionalne metode spada ekstrakcija otapalima, perkloracija, maceracija i Soxlet ekstrakcija.

Abou-Arab i sur. (2010), u som su istraživanju ispitivali učinkovitost različitih konvencionalnih metoda ekstrakcije steviol glikozida iz lišća stevije, i to korištenjem a) vode, b) metanola i c) metanola/vode (4:1), te su ustanovili da se korištenjem vode u ekstrakciji dostiže učinkovitost od 98% ekstrahiranih steviozida te se tako dobiva prirodni produkt bez korištenja kemijskog otapala.

Novi načini procesiranja hrane mogu u potpunosti zamijeniti pojedine standardne operacije, a pri tome se dobivaju proizvodi bolje kakvoće, postiže se ušteda energije i skraćuje trajanje tehnološkog procesa . Prvenstveno zbog potrebe za povećanjem produktivnosti ekstrakcijskih postupaka, koriste se nekonvencionlne ekstrakcijske metode što se pokazalo velikim napretkom u doprinosu i kvaliteti ekstrahiranih komponenti. Suvremene tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenti biljaka uključuju ekstrakciju mikrovalovma, ultrazvukom (UAE) i superkritičnom tekućom ekstrakcijom (Herceg i sur., 2009).

- METODA EKSTRAKCIJE PRIMJENOM MIKROVALOVA

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije od 2450 MHz u frekvencijskom rasponu od 1 GHz do 300 GHz (Wnag i Weller, 2006). Primjena mikrovalova u prehrambenoj industriji je široka, koriste se za pečenje, zagrijavanje, sušenje, odmrzavanje, blanširanje, dehidraciju te za pasterizaciju i sterilizaciju.

U novije vrijeme svoj razvoj je doživila i ekstrakcija primjenom mikrovalova (mikrovalna ekstrakcija). Mikrovalna ekstrakcija se primjenjuje za analizu tragova organskih spojeva u krutim uzorcima, za ekstrakciju biomolekule kao što su flavanoidi, kofein te polifenolni spojevi.

U primjeni postoje dvije vrste sustava mikrovalne ekstrakcije:

-ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te;

-ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Kaufmann i Christen, 2002).

Za provedbu mikrovalne ekstrakcije bitni faktori su izbor otapala te temperatura. Izbor otapala ovisi o topljivosti ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvu otapala da apsorbira mikrovalove (Bousbia i sur., 2009). Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom (Brachet i sur., 2002). Uz otapalo važan faktor je i temperatura. Općenito, povišenje temperature učinak ekstrakcij je bolji, no pri ekstrakcji termolabilnih spojeva povišenje temperature može dovesti do razgradnje termoosjetljivih supstanci (Font i su., 1998).

- METODA EKSTRAKCIJE PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Ultrazvuk visoke frekvencije uslijed djelovanja kavitacije na stanične stjenke materijala, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase (Vinatour, 2001). Mehaničko djelovanje ultrazvuka osigurava bolji prelazak otapala u stanicu, poboljšava prijenos mase te omogućava razbijanje stijenki stanice u biljnom materijalu čime se postiže lakše otpuštanje staničnih sastojaka (Patist i Bates, 2007). Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena efikasnost kao što je prikazano u *Tablica 1.*

Smatra se da je ultrazvučna ekstrakcija jedan od najjednostavnijih tehnika ekstrakcije jer je lako izvediva u laboratoriju (ultrazvučna kupelj). Usitnjeni uzorak se pomiješa sa pogodnim otapalom, stavlja u ultrazvučnu kupelj, gdje je unaprijed podešena temperatura i vrijeme ekstrakcije (Garcia-Salas i sur., 2010). U odnosu na običnu ekstrakciju učinak ekstrahiranja pomoću ultrazvuka je značajno veći i kraće traje. Većina se tvari ekstrahira u prvih 10 minuta prozračivanja.

Prednosti ultrazvučne ekstrakcije nas klasičnim postupcima su :

- Skraćeno vrijeme ekstrakcije
- Ekstrakcija se provodi pri nižim temperaturama i tlaku (moguća ekstrakcija termolabilnih spojeva)
- Troši se znatno manja količina otapala
- Ekološki je prihvatljivija metoda (Wang i sur., 2006)

Postizanje većeg prinosa u ultrazvučnim procesima je od glavnog interesa sa industrijskog stajališta. Upotreba ultrazvuka u ekstrakcijske svrhe iz skupih sirovina je ekonomična alternativa pred tradicionalnim procesima ekstrakcije (Garcia-Salas i sur., 2010).

Tablica 1. *Primjeri poboljšanja performansi ekstrakcije korištenjem ultrazvuka (Vilkhu i sur., 2008)*

Uzorak	Ultrazvuk	Otapalo	Performanse
Bademovo ulje	UZV kupelj, 20 kHz	Superkritični CO_2	30% povišenje prinosa ili smanjenje vremena redukcije
Biljni ekstrakti (komorač,hmelj,neven,menta)	Miješana kupelj, 20 do 2400 kHz	Voda i etanol	34% povećanje prinosa uz miješanje
Ginseng saponini	Kupelj, 38.5 kHz	Voda, metanol i n-butanol	Trostruko povećanje brzine ekstrakcije
Đumbir	Kupka, 20 kHz	Superkritični CO_2	30% povišenje prinosa ili smanjenje vremena redukcije
Sojini proteini	Kontinuirano, 20 kHz, 3 W po gramu	Voda i lužina (NaOH)	53% i 23% povećanje prinosa u odnosu na ekvivalentne UZV kupelji
Sojini izoflavoni	Kupelj, 24 kHz	Voda i otapalo	15% povećanje učinkovitosti ekstrakcije
Rutin	Kupelj, 20 kHz	Voda i mentol	20% povećanje u 30 min
Karnozinska kiselina	Kupelj, 20 kHz i 40 kHz	Butanon i etil-acetat	Redukcija u ekstrakcijskom vremenu
Polifenoli, amino k. I kafein (zeleni čaj)	Kupelj, 40 kHz	Voda	Povećan prinos pri 65°C, u usporebi sa 85°C

2.4. STEVIJA

Stevia rebaudiana (Bertoni) je jedna od 200 različitih biljna vrsta iz obitelji glavočiki (Asteraceae) (Mishra i sur., 2010). To je kratkotrajna biljka koja cvjeta od siječnja do ožujka na južnoj polutki. Pošto je *Stevia rebaudiana* neotporna na mraz u Europi se može uzgajati kao jednogodišnja biljak (Lankes i Pude, 2008). Biljka preferira mokro tlo i zahtjeva toplu sunčanu poziciju. Odgovara joj suptropska klima s temperaturnim ekstremima između 21 i 43°C te sa srednjom temperaturom 24°C. Zrela biljka dosegne 65-180 cm u visinu kada se uzgaja i raste na plodnom tlu (*Slika 9*).

Komercijalni uzgoj stevije raširen je u mnogim zemljama kao što su Paragvaj, Brazil, Koreja, Meksiko, SAD, Indonezija, Tanzanija, Kanada, Kina i Japan. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) je poznata i pod nazivima stevija, slatki list, slatka biljka Paragvaja, medeni listovi i slatka biljka (Madan i sur., 2010).



Slika 6*. Stevia rebaudiana* Bertoni *(Madan i sur.,2010)*

2.5. SASTAV LISTA STEVIJE

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) se u mnogim zemljama svijeta upotrebljava kao nekalorični zaslađivač (Cardello i sur., 1994). Prah lista stevije bez ikakve posebne prerade je iznimno siguran za upotrebu, nema kalorijsku vrijednost i 20-30 puta je slađi od šećera dobivenog od šećerne trske. Primjena stevije preporuča se u raznim područjima proizvodnje prehrambenih proizvoda, kao npr. u pekartvu, konditorskoj industriji, proizvodnji raznih pića i napitaka i slično (Madana i sur., 2010).

Lišće stevije je prirodni izvor diterpenskih glikozida: steviozida, steviolbiozida, rebaudiozida (A, B, C, D, E, F) i dulkozida A (O'Brien-Nabors, 2012). Najzastupljeniji steviol glikozid među svima je steviozid (4-20%), a slijede ga rebaudiozid A (1-3%) te ostali steviol glikozidi (Geuns, 2003).

Steviozid i rebaudiozid A su glavne slatke komponente od interesa proizvođača. Omjer steviozida i rebaudiozida A utječe na kvalitetu biljne biomase. Ako je u lišću prisutna jednaka količina steviozida i rebaudiozida A okus gorčine će biti uvelike smanjen (Mitchell, 2006).

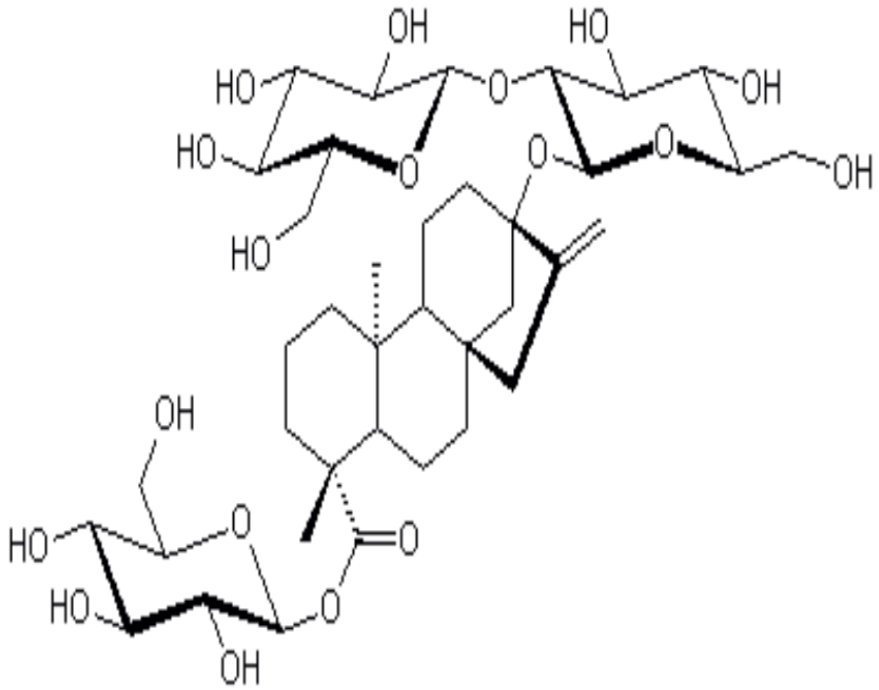
Osim što posjeduju svojstvo slatkoće steviol glikozidi su termostabilni spojevi čak i na temperaturi od 200°C, što ih čini pogodnim za kuhanje hrane (Lemus-Mondaca i sur., 2012) a zbog svoje kemijske građe pokazuju izvrsnu topljivost u vodi (O'Brien-Nabors, 2012).

Nadalje, lišće stevije sadrži i visoku koncentraciju fenolnih spojeva koji doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (Barba i sur., 2014; Shukla i sur., 2012), i ostalim pozitivnim učincima fenolnih spojeva na zdravlje konzumenata (Madana i sur., 2010).

2.5.1. STEVIOZID

Steviozid je prirodni zaslađivač ekstrahiran iz listova stevije. To je diterpen glikozid ($C_{38}H_{60}O_{18}$) (*Slika 8*). Poznat je po svojoj slatkoći, on je 250-300 puta slađi od saharoze (Kim i sur., 2010). Steviozid je najprisutniji steviol-glikozid u steviji. Molekula steviozida je vrlo stabilna u vodenim otopinama pri velikom rasponu pH i temperature (Virendra i Kalpagam, 2008). Istraživanje Buckenhuskersa i Omrana (1997) su pokazala da steviozid posjeduje izvrsnu stabilnost 100°C/1h pri pH vrijednosti 3-9,a li pri pH većem od 9 dolazi do brze razgradnje steviozida.

Prednosti korištenja steviozida u prehrani su mnogobrojne: stabilan je, nekaloričan, osigurava dentalno zdravlje reduciranjem unosa šećera, povoljan je za dijabetičare, pretile osobe i osobe sa fenilketonurijom (Geuns, 2003).

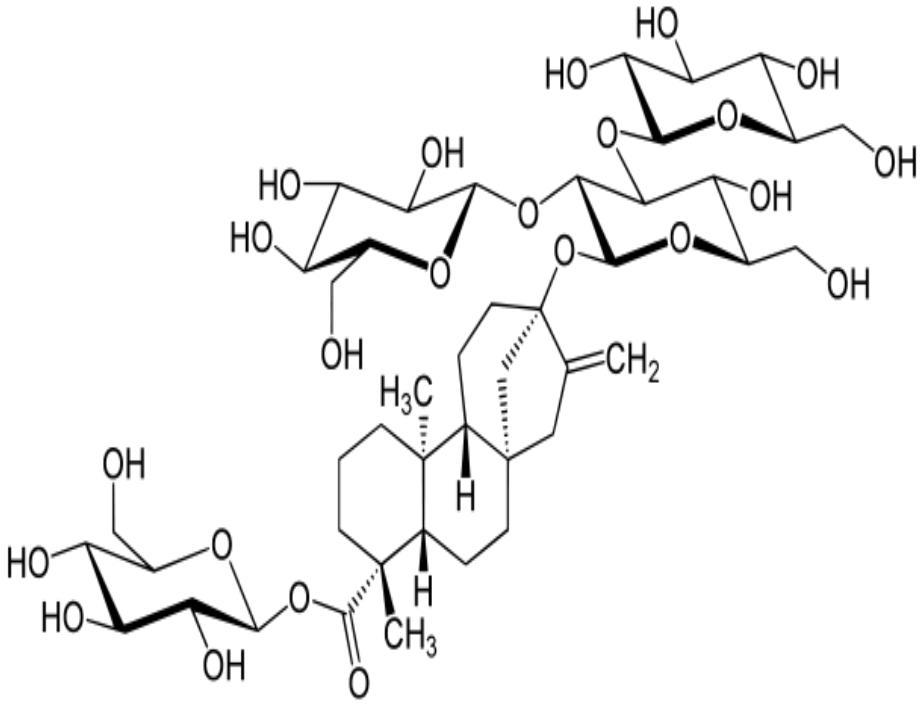


Slika 7*. Molekula steviozida (De Muylder i sur., 1998)*

2.5.2. REBAUDIOZID A

Rebaudiozid A je poznat još i kao Rebiana ($C_{44}H_{70}O_{23}$). Razlikuje između rebaudiozida A i steviozida po tome što on ima jednu molekulu glukoze više. Bez obzira što je u lišću stevije prisutan u manjoj koncentraciji, rebaudiozi A značajnije pridonosi ugodnom slatkastom okusu od steviozida koji daje gorkast, opor okus (Mitchelle, 2006). Termodinamička ravnoteža rebaudiozida A u vodi pri 25°C iznosi 0,8%, a topljivost u etanolu iznosi 1,69% (Prakash, 2008).

U Tablici 1. prikazana je relativna slatkoća diterpenskih glikozida iz lista stevije u odnosu na standard slatkoće saharoze (Puri i sur., 2011).



***Slika 8**. Moleukla rebaudiozida A (Anonymous 1)*

***Tablica 2**. Biološka aktivnost komponenata stevije (Ahmed i sur., 2011)*

Komponenta	Testirana aktivnost	Model testa	Doza	Rezultat	Testirani organ i napomene
Steviozid, Rebaudiozid A-C, Steviolbiozid, Dulkozid A	Toksični efekti	Oralno, Miševi	2 g/kg 2 g/kg 2 g/kg 2 g/kg	Inaktivan	/
Steviol	Genotoksični efekt	Oralno, Miševi	250 mg/kg 500 mg/kg 1000 mg/kg 2000 mg/kg	Inaktivan	DNA želuca, jetre, bubrega i testisa neoštećen
Steviozid	Mutagena aktivnost	Kultura stanica	50 mg	Inaktivan	Salmonella typhmurium TA98 & TA100, in vitro, Ames test
Steviol	Mutagena aktivnost	Kultura stanica	2 mg	Inaktivan	Salmonella typhmurium TA98 & TA100, in vitro, Ames test
Steviozid	Anti-reproduktivna aktivnost	Oralno, Ženke hrčka	0.5 g/kg 1 g/kg 2.5 g/kg	Inaktivan	Bez abnormalnosti u rastu i fertilnosti, nema efekta na trudnoću niti fetalnih abnormalnost
Steviozid	Anti-hiperglikemijska aktivnost	IV štakori	0.2 g/kg	Aktivan	Steviozid sa glukozom potiskuje odgovor na glukozu, povećan inzulinski odgovor i potisnut nivo glukagona kod dijabetesa tipa II
Steviozid	Anti-hiperglikemijska aktivnost	Oralno, Štakori	0.025 g/kg	Aktivan	Kod štakora sa dijabetesom tip II, steviozidi imaju anti-hiperglikemijski efekt, poboljšavajući prvu fazu inzulinskog odgovora i potiskivanjem razine glukagona

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

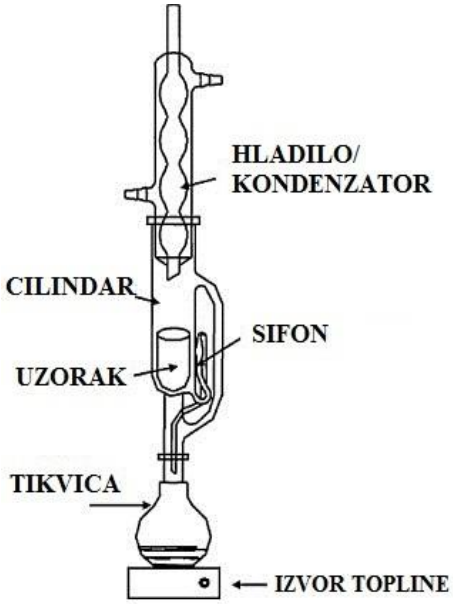
Za ekstrakciju steviol glikozida korišteno je lišće biljke *Stevia rebaudiana Bertoni,* prethodno osušeno u sušnici na cca 90% suhe tvari. Suho lišće je pakirano u dobro zatvorene plastične vrećice i do provedbe pokusa čuvano u tamnom prostoru pri sobnoj temperaturi. Za provođenje ekstrakcija odvagano je oko 5 ± 0,0001g djelomično usitnjenog suhog lišća.

3.2. Metode ekstrakcije

3.2.1. Ekstrakcija vodom u aparaturi po Soxhletu

Aparatura po Soxhletu sastoji se od tri glavna dijela: perkloratora (grijač za vodu i refluks) u kojem cirkulira otopina, cilindra i mehanizma sifona koji periodično prazni cilindar. Uzorak koji sadrži komponentu za ekstrakciju se stavi u papirnatu čahuru i potom u cilindar, a otapalo u tikvicu koja se nalazi iznad izvora topline. Soxhlet ekstraktor se nalazi iznad tikvice, a na vrhu ekstraktora se nalazi vodeno hladilo za refluks (James, 1995).

Odvagani uzorak (5 ± 0,0001g) prenese se u kartonsku čahuru aparata po Soxhletu (*Slika 13.)* i zaštiti slojem čiste vate. U okruglu tikvicu ulije se 100mL destilirane vode i vrši ekstrakcija u trajanju od 3 sata. Po završetku ekstrakcije uzorak se prelije u tikvicu i kao takav je spreman za analizu.



Slika 9*. Aparatura po Soxhletu (Anonymous 2,2013)*

3.2.2. Ekstrakcija primjenom ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvučni procesor korišten je u ovom istraživanju je model S-4000, proizvođač Misonix Sonicators, Newtown, USA. Značajke procesora su: 600 W maksimalne izlazne snage, 100-240 V strujnog napona, 50-60 Hz, frekvencija ultrazvuka od 20 kHz. Uzorci su tretirani ultrazvučnom sondom promjera 12,7 mm, a izlazna snaga kontrolirana je amplitudom.

Uzorak se odvagne (5 ± 0,0001g) i prenese u čašu od 250 mL u kojoj se nalazi 100 mL destilirane vode prethodno zagrijane na temperaturu pri kojoj će se provoditi ekstrakcija. U pokusima je mijenjano vrijeme tretiranja ultrazvukom, amplituda i temperatura otapala (destilirane vode). Korekcija temperature provedena je na način da se čaša sa uzorkom lista setvije nalazila u vodenoj kupelji u koju se dodavao led kako temperatura ne bi porasla iznad zadane temperature ekstrakcije pod utjecajem ultrazvuka. Nakon tretmana uzorak se hladi na sobnu temperaturu i profiltrira preko filter papira.

Uvjeti ekstrakcije rebaudiozida i steviozida pomoću ultrazvuka visokog intenziteta prikazani su u *Tablici 3.*

***Tablica 3**. Uvjeti ekstrakcije pomoću ultrazvuka*

Uzorak	Vrijeme(min)	Amplituda(μm)	Temperatura(°C)
1	10	120	35
2	20	90	55
3	30	120	55
4	10	60	55
5	20	120	45
6	20	90	45
7	10	90	45
8	20	90	45

3.3. Metoda analize

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je jedan od najčešćih metoda za identifikaciju, kvantifikaciju i pročišćavanje smjese spojeva. Bazira se raspodijeli komponenata smjese između adsorbensa (stacionarna faza) i otapala (pokretna faza). HPLC se upotrebljava kod različith područja istraživanja kao što su analiza složenih smjesa, čišćenje kemijskih spojeva, razvoj procesa za sintezu kemijski spojevi, izoliranje prirodnih spojeva (Đaković, 2015).



Slika 10. Uređaj za HPLC analizu, 1100 Seria (Anonymous 3)

Provođenje analize

Uzorci su, nakon tretiranja ultrazvukom, analizirani pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography - HPLC). Kromatografski uvjeti koji su korišteni za određivanje steviozida i rebaudiozida A u ekstraktu stevije su:

- Instrument: HPLC, 1100 Seria, HP (Agilent)
- Kolona: SUPELCOSIL LC-18-RP 25cm x 4,6mm, 5µm
- Detektor: DAD
- Mobilna faza: a) voda, b) acetonitril
- Eluiranje: gradijentno (Tablica 5.)
- Protok: 0,750ml/min
- Temperatura kolone: 40°C
- Volumen injektiranja: 20µl
- Standardi: rebaudizid A Sigma, Steviozid Chromadex

***Tablica 4**. Brzina eluiranja mobilne faze B*

Vrijeme(min)	Mobilna faza B (ml)
0:00	0,0
10:00	28,00
25:00	28,00
35:00	72,00
50:00	72,00
52:00	0,00

4. REZULTATI I RASPRAVA

U radu su primjenjene dvije tehnike ekstrakcije steviol glikozida: ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke frekvencije. Prikazani rezultati, dobiveni analizom ekstrakata uz primjenu HPLC tehnike, predstavljaju ukupnu količinu steviol glikozida (steviozida i rebaudiozida) kod oba načina ekstrakcije.

Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu trajala je 3 sata. Odvagana masa suhih djelomično usitnjenih listova stevije (5±0,0001g) ekstrahirana je destiliranom vodom (100 mL). U ovom ekstraktu zabilježena vrijednost steviol glikozida iznosila je 69940 mg/kg suhog lista stevije (oko 7%) (Tablica 5). Dobivena vrijednost za udio steviol glikozida je neznatno niža u odnosu na podatke koje navode drugi autori, koji iznose 7,6%, odnosno 12,9 % (Gardana i sur, 2010; Goyal i sur., 2010). U ovim istraživanjima pokazalo se da je prisutan veći udio steviozida (5,8 i 9,1%) nego rebaudiozida A (1.8 i 3,8%). Geuns (2003) u svom radu navodi da je steviozid prisutan u količini 4-20%, a rebaudiozid A 1-3%. Navedene razlike mogu se pripisati prvenstveno tehnici ekstrakcije i kvantifikacije ali i kvaliteti i stupnju suhoće lista stevije.

Tablica 5. *Rezultati ekstrakcije vodom u aparaturi po Soxhletu*

Uzorak	**odvaga/g**	**V/mL**	**S+R mg/mL**	**mg/kg**
B	5,0043	100	3,5	69940

Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visoke frekvencije mijenjani su uvjeti pod kojima se ona odvijala. Parametri koji su se mijenjali su: vrijeme tretiranja, amplituda i temperatura ekstrakcije (Tablica 3), dok je za sve ekstrakcije primjenjena ista količina uzorka (5±0,0001g) i otapala (100 ml destilirane vode).

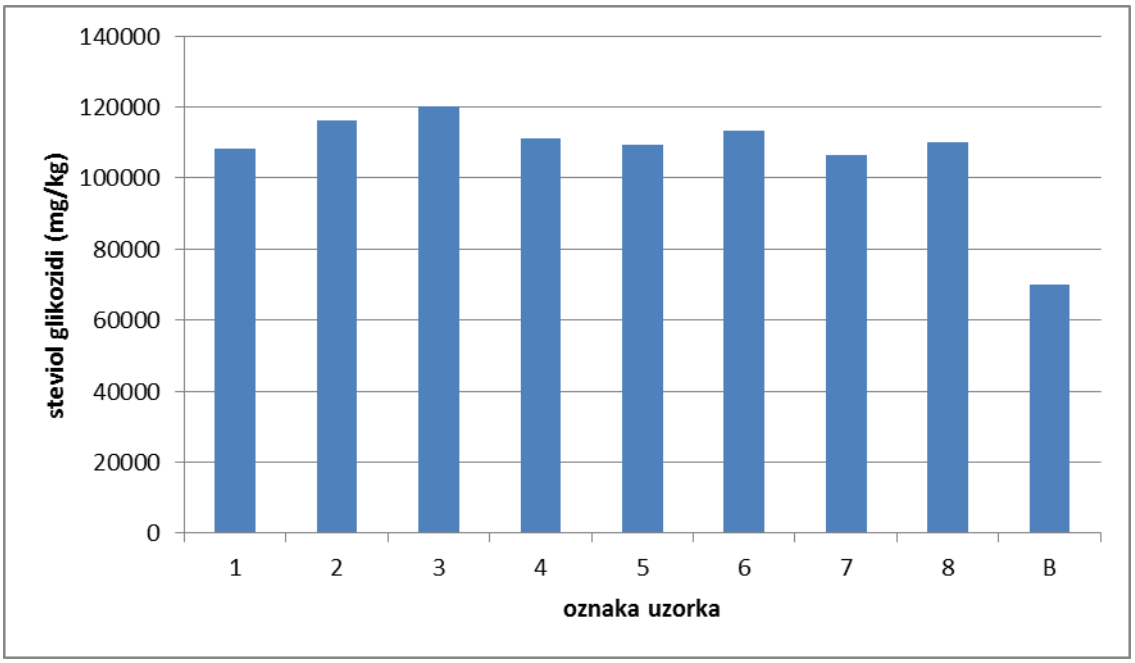
U *Tablici 6.* prikazane su odvagane mase suhog lista stevije, volumen otapala te udio steviol glikozida (izraženi u mg/ml ekstrakta i u mg/kg suhog lišća stevije) ekstrahiranih primjenom ultrazvuka visokog intenziteta. Vrijednosti u ekstraktima kretale su se u rasponu od 106557 do 120308 mg/kg suhog lista stevije, dok je srednja vrijednost iznosila 111978 mg/ kg ovisno o uvjetima ekstrakcije.

Najveći udio steviol glikozida (120,308 g/kg) među uzorcima tretiranim ultrazvukom zabilježen je u uzorku kod kojeg je ekstrakcija provedena u trajanju od 30 minuta, pri amplitudi 120 μm i temperaturi 55ºC, dok je najmanji udio steviol glikozida (106,557 g/kg) zabilježen u uzorku kod kojeg je ektrakcija provedena u trajanju od 10 minuta, pri amplitudi 90 μm i temperaturi 45 ºC. Usporedbom uvjeta ekstrakcije (*Tablica 3*) i dobivenih rezultata (*Tablica 6*) može se zaključiti da povećanjem pojedinih parametara ekstrakcije dolazi do povećanja udjela steviol glikozida, što je vidlivo posebice kod uzorka 3 kod kojeg su vrijednosti navedenih parametara najveće te u skladu s time je zabilježeno najviše steviol glikozida (120,3g/kg). Ipak se može zamjetiti da su prema ovim rezultatima, veći utjecaj imali povećanje vremena i temperature ekstrakcije nego što je bio utjecaj povećanja amplitude.

Tablica 6. *Odvagane količine uzoraka, volumen otapala i udio steviozida i rebaudiozida (S+R) ekstraktima dobivenim primjenom ultrazvuka*

Uzorak	Odvaga/g	V/mL	S+R (mg/mL)	S+R (mg/kg)
1	4,9881	100	5,4	108258
2	4,9846	100	5,8	116358
3	4,9872	100	6,0	120308
4	4,9422	100	5,5	111286
5	5,0224	100	5,5	109509
6	5,0225	100	5,7	113489
7	5,0677	100	5,4	106557
8	5,0879	100	5,6	110065

Povećanje udjela steviol glikozida produženjem vremena ekstrakcije ultrazvukom navode u svom radu i Šic Žlabur i sur. (2015). Utjecaj temperature i vremena na udio ekstrahiranog rebaudiozida ispitivali su Afandi i sur. (2013). Oni su kao otapala koristili različite udjele organskih otapala (kao npr. etanol, metanol, aceton ...) i zaključili da se udio ekstrahiranog rebaudiozida A povećava s vremenom trajanja ekstrakcije (do 2 sata) nakon čega se ne mijenja. Porastom temperature do 50^{O}C raste i udio rebaudiozida A, a pri višim temperaturama dolazi do njegovog smanjenja.



*B – uzorak ekstrahiran vodom u aparaturi po Soxletu

Slika 11. *Grafički prikaz udjela steviozida i rebaudiozida u dobivenim ekstraktima stevije*

Da bi se istaknuo utjecaj načina ekstrakcije, prikazani su rezultati određivanja udjela steviol glikozida dobivenih klasičnim (Soxhlet) i suvremenim (ultrazvuk) postupkom ekstrakcije (*Slika 11*). Prosječna vrijednost udjela steviol glikozida u uzorcima dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom bila znatno veće (oko 60 %) od onoga u ekstraktu dobivenom u aparaturi po Soxhletu. Šic Žlabur i sur. (2015) također su zabilježili bolju ekstrakciju steviol glikozida primjenom ultrazvuka u odnosu na ekstrakciju toplom vodom (do 24%).

Razlika u udjelu steviol glikozida među uzorcima ekstrahiranim ultrazvukom visokog intenziteta (*Tablica 6. i Slika 11.)* iznosila je oko 10%, ovisno o uvjetima ekstrakcije. Veći rezultati zabilježeni su kod uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom pri 55ºC.

Dobiveni rezultati su pokazali da se suvremenim postupkom ekstrakcije postižu znatno bolji rezultati u odnosu na klasični postupak (Šic Žlabur i sur., 2015). Također su i u skladu s rezultatima koje su objavili Chandrapala i sur. (2012) koji navode da su parametri koji značajno utječu na ekstrakciju ultrazvukom vrijeme, amplituda i temperatura ekstrakcije.

5. ZAKLJUČAK

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:

- Sadržaj steviol glikozida u suhom lišću stevije kretao se od 7 do 12 % ovisno o postupku i uvjetima ekstrakcije.

- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke frekvencije pokazala se uspješnijom u odnosu na ekstrakciju u aparaturi po Soxhletu.

- Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pokazalo se da vrijeme, amplituda i temperatura značajno utječu na udio ekstrahiranih komponenti. Prema ovim rezultatima najznačajniji je utjecaj temperature, zatim vremena te amplitude.

- Najbolji rezultat (120 g/kg suhog lista stevije) dobiven je primjenom slijedećih parametara: vrijeme – 30 min, amplituda- 120μm, temperatura- 55°C. To su ujedno i najveće vrijednosti parametara primjenjenih u ovom eksperimentu.

- Odabrana metoda ekstrakcije (Soxhlet/ ultrazvuk visoke frekvencije) imala je veći utjecaj na udio ekstrahiranih steviol glikozida nego promjena uvjeta kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

- Potrebno je provesti daljnja istraživanja da bi se sa sigurnošću mogli utvrditi optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visoke frekvencije.

7. POPIS LITERATURE

Afabdi, A., Sarijan, S.,Shaha, R. K., (2013) Optimization od rebaudioside A extraction from *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *J. Trop. Resour. Sustain. Sci.* **1**, 62-70.

Ahmed, B., Hossain, M., Islam, R., Kumar, Saha A., Mandal, A. (2011) A review on natural sweetener plant- Stevia having medicinal and commercial importance. *Agron. Glas.* **1-2**, 75-92.

Albu S., Joyce E., Paniw.J. (2004): Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem.* **11**, 261-265.

Anonymous 1. Rebaudiozid A, molekulska struktura https://en.wikipedia.org/wiki/Rebaudioside_A#/media/File:Rebaudioside_A.svg. Pristupljeno 1. rujan 2015

Anoymous 2 (2013) Soxhlet extractor, <http://mkshelford.blogspot.com/2013/03/soxhlet-extraction-introduction.html>. Pristupljeno 29. kolovoz 2105.

Anonymous 3 (2015) Uređaj za HPLC analizu,< http://www.gmi-inc.com/hp-agilent-1100-hplc.html>. Pristupljeni 29. kolovoz 2015.

Barba F.J, Grimi N., Negm M., and Frigola A., (2014) Bioactive components from leaf vegetable products. Stud. Nat, Prod. Chem., 41, 321-346.

Barbosa, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (2005) Novel Food Processing Technologies, CRC Press, Boca Raton.

Bausbia, N., Vian, A., M., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodestillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chem.* **114**, 355-362.

Bosiljkov, T., (2011) "Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stupanj homogenizacije i fizička svojstva sojinog, kravljeg, ovčjeg o kozjeg mlijeka" Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Zagreb.

Bosiljkov, T., Brnčić, M., Karlović, S., Tripalo, B., Ježek, D., Dujmić, F., Vadlja, D. (2013) Primjena ultrazvuka i visokih hidrostatskih tlakova na promjenu raspodjele veličine masnih globula i kemijski sastav kravljeg mlijeka. *Croat. J. Food Technol. Biotech. Nutr*. **8**, 82-89.

Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J. L. (2002) Focused microwave- assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Phytochem. Anal.* **13**, 162-169.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Croat. J. Food Technol. Biotech. Nutr.* **4,** 32-37.

Cardello, H. M., Da Silva, M.A. i Damasio, M. H. (1994) Measurment od the relative sweetness od stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations, *Plant. Food Hum. Natur.* **54,** 119-130.

Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish. S., Ashokkumar, M. (2012) Ultrasonic in food processing. *Ultrason. Sonochem*, **19**. 975-983.

Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2011) Applicatons of ultrasound in food tachnology: Processing, preservation and extraction, *Ultrason. Sonochem.* **18,** 813-835.

De Castro L.M.D., Capote P.F. (2007) Applications of ultrasound. Elsevier Science, Langford

De Muylder, E., Naudts, P., Geuns, J., Simoens, S., Vanhoudt, L. (1998) Utilization of stevioside, a new natural, non-caloric feed sweetener, in feeds for dogs. <http://www.lni.unipi.it/stevia/stevia/stepadog.htm> Pristupljeno 20. lipanj 2015.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2012) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol*. **2**, 22-23

Đaković, S. (2015) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), interna skripta, PBF, Zagreb.

Ensminger D., (1988) Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying. Draying Techn. **6, 3,** 473-499.

Eskilsson, S., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chrom. A.* **902**, 227-250.

Feng, S., Luo, Z., Tao, B., Chen, C. (2015) Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (Saccharum officinarum L.) rinds. *LWT- Food Sci. Technol.* **60**, 970-976.

Font, N., Hernandez,F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R.A., & van Zoonen, P. (1998) Micowave- asissted solvent extraction and reversed- phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides, *J. Chrom. A.* **798**, 179-186.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Sefura-Carretero, A. & Fernadez-Gutierrez, A. (2010) Phenolic- Compoun- Extraction ystem for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules,* **15,** 8813-8826.

Gardana, C., Scaglianti, M., & Simonetti, P. (2010) Evaluation of steviol and its glycosides in Stevia rebaudiana leave and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography- mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* , **1217,** 1463-1470.

Geuns, J.M.C., 2003. Stevioside. Phytochem,. **64**, 913-921.

Goyal, S., Samsher & Goyal, R. (2010) Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *Int. J. Food. Sci. Nutr.,* **61**, 1-10.

Gogate P.R., Tayal K.R., Pandit A.B. (2006) Cavitation; A technology on the horizont. Cur.Sci., **91**, 5-16

Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G.(2009) Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.

James, C. S. (1995) Analytical Chemisty of Foods, Blackie Academic & Professional, Glasgow, NZ str. 91-92.

Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microvawe-assisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anala.* **13**, 105-113.

Kovač, V. (2015) Elektromagnetsko zračenje- IR spektroskopija, interna skripta, PBF, Zagreb.

Kuijpers ,M.W., van Eck, D., Kemmere, M.F., Keurentjes, J.T. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide. *Science,* **6**,1969-71.

Kyllönen, H., Pirkonen, P., Nyström, M., Nourtila-Jokinen, J., Grönroos, A. (2006) experimental aspects of ultrasonically enhanced cross-flow membrane filtration of industrial wastewater. *Ultrason. Sonochem.* **13**, 642-646.

Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., Garg, M. (2010) Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni – A Review. Indian J. Nat. Prod. Resour. **1**, 267-286.

Mason T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., (1996) The usea of ultrasound in food technology . *Ultrason. Sonochem.* **3**, 253-260.

Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., & Prakash, V. (2010). Stevia rebaudiana- A magical sweetener. Global Biotechnol. & Biochem., **5**, 62-74

Mitchell, H.L. (2006) Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 341-347.

O'Brien-Nabors, L. (ured.), (2012) Alternative Sweeteners. CRC Press Taylor and Francis Group, New York, USA.

Puri M., Sharma D., and Tiwari A.K., (2011) Downstream processing of stevioside and its potential applications. Biotech. Adv. **29**, 781-791.

Režek Jambrak., A. (2008) "Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke" Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu,, Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Zagreb.

Shukla S., Mehta A., Mehta P., i Bajpai V.K., (2012) Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bertoni. *Toxicol. Pathol*., **64**, 807-811.

Vilkhu L., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review, *Innovat, Food. Sci. Emerg. Tech.* 9, 161-169.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, Ultrason. Sonochem. **8**, 303-313.

Virendra, V., i Kaplagam, P. (2008) Assessment of Stevia (Stevia rebaudiana) natural sweetener: A reviw. *J. Food Sci. Tech*. **45**, 467-473.