

# Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz pšenice metodom odzivnih površina

---

Karakaš, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

*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:109:603668>

*Rights / Prava:* [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-19**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Martina Karakaš**

**OPTIMIRANJE PROCESA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE FENOLNIH  
TVARI IZ PŠENICE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološke operacije  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Jedinične operacije u procesnom inženjerstvu**Tema rada** je prihvaćena na V. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2012./2013. održanoj 27. veljače 2013.**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ana Bucic-Kojić**Pomoć pri izradi:** Nikolina Pavić, mag. ing.**Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz pšenice metodom odzivnih površina***Martina Karakaš, 138/DI*

**Sažetak:** U radu je ispitivan utjecaj temperature ekstrakcije (30, 60 i 90 °C), sastava otapala (30, 60 i 90% etanol, v/v) i vremena ekstrakcije (10, 40 i 70 min.) te njihova interakcija na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i flavonoida iz brašna cjelovitog zrna pšenice. Istraživanja su provedena na slijedećim uzorcima pšenice: Kutjevo d.d.(PK), Čakovečki mlinovi (PČM) i Belje (PB). Metodom odzivnih površina određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije u vodenoj kupelji za fenolne tvari: otapalo 58%-tni etanol, temperatura 83 °C i vrijeme 70 minuta. Pri navedenim optimalnim uvjetima modelom predviđen maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari iznosio je: za PK 3,7 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub>, za PČM 3,26 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub> te za PB 3,35 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub>. Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije za flavonoide su: otapalo 90%-tni etanol; temperatura 44 °C i vrijeme 70 minuta, pri kojima je modelom predviđen maksimalni prinos ukupnih flavonoida iznosio: za PK 2,42 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>, PČM 2,2 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub> te PB 2,63 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>. Ekstrakcijom fenolnih spojeva u vodenoj kupelji (pri optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti optimiranja) dobiveni su maseni udjeli ukupnih fenolnih tvari: PK 3,67 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub>, PČM 3,33 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub> i PB 3,33 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub> a udio flavonoida je iznosio: PK 2,36 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>, 2,55 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>, PČM i 2,65 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub> PB. Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju (Büchi-LSV) je provedena standardnom Soxhlet metodom (s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo) pri čemu je udio ukupnih fenola bio: PK 2,42 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub>, PČM 2,24 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub> i PB 2,32 mg<sub>GAE/g<sub>s.t.</sub></sub>, a udio flavonoida: PK 2,82 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>, 2,54 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub>, PČM i 2,53 mg<sub>CE/g<sub>s.t.</sub></sub> za PB. Eksperimentalni rezultati dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima ekstrakcije pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim kvadratnim modelom.

**Ključne riječi:** pšenica, kruto-tekuća ekstrakcija, fenolne tvari, flavonoidi, metoda odzivnih površina

**Rad sadrži:** 60 stranica  
24 slika  
19 tablica  
35 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |                                                 |               |
|-------------------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić           | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić           | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. Srećko Tomas                   | član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. Daliborka Koceva-Komlenić | zamjena člana |

**Datum obrane:** 11. travnja 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process Engineering  
Sub department of Unit operations  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program of Process engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Unit operations in process engineering

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. V. held on February 27, 2013.

**Mentor:** Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof.

**Technical assistance:** Nikolina Pavić, mag. ing.

### Optimization of solid-liquid extraction process of the phenolic compounds from wheat using response surface methodology

Martina Karakaš, 138/DI

**Summary:** The effects of extraction temperature (30, 60 i 90°C), ethanol/water solution (30, 60 i 90%, v/v) and the duration of the extraction (10, 40 i 70 min) as well as their interaction on total phenolic and flavonoid compounds extractability from wholegrain wheat flour were studied. Studied samples were collected from different locations in Croatia (Kutjevo (PK), Čakovečki mlinovi (PČM) and Belje, Beli Manastir (PB)).

The optimal conditions for extraction of the total phenolic compounds were determined by response surface methodology based on Box-Bhenken experimental design as follows: solvent 58% v/v ethanol/water, temperature 83 °C and time 70 min. The maximum yield of total phenolic compounds predicted by the quadratic model was for PK 3.7 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub>, PČM 3.26 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub> and PB 3.35 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub>. Determined optimal conditions for extraction of the flavonoids compounds were: solvent 90% v/v ethanol/water; temperature 44 °C and time 70 minutes and the model predicted maximum yield of total flavonoid compounds were: PK 2.42 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub>, PČM 2.2 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub> and PB 2.63 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub>. Optimization efficiency of the extraction process is estimated by implementation of extraction in certain optimal conditions in a water bath and on the universal extraction system Büchi-LSV with an aim to convert extraction in a bigger scale. Results obtained in a water bath for total phenolic compounds were: PK 3.67 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub>, PČM 3.33 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub> and PB 3.33 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub> and for flavonoid compounds were: PK 2.36 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub>, 2.55 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub>, PČM i 2.65 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub> PB. Extraction at the universal extraction system (Büchi-LSV) is carried out by standard Soxhlet methodology and content of total phenolic compounds were: PK 2.42 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub>, PČM 2.24 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub>, PB 2.32 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>db</sub> and for flavonoids: 2.82 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub> PK, 2.54 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub> PČM, 2.53 mg<sub>CE</sub>/g<sub>db</sub> PB. Results indicate that experimental results obtained under the above optimum extraction conditions showed good agreement with the data provided by quadratic model.

**Key words:** wheat, solid-liquid extraction, phenolic compounds, flavonoids, response surface methodology

**Thesis contains:** 60 pages  
24 figures  
19 tables  
35 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |                                                    |              |
|----------------------------------------------------|--------------|
| 1. Mirela Planinić, PhD, associate prof.           | chair person |
| 2. Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof.           | supervisor   |
| 3. Srećko Tomas, PhD, full prof.                   | member       |
| 4. Daliborka Koceva-Komlenić, PhD, associate prof. | stand-in     |

**Defense date:** 11<sup>th</sup> April 2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology  
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Zahvaljujem se profesorici Ani Bucić-Kojić na strpljenju i stručnoj pomoći prilikom izrade ovoga rada. Također se zahvaljujem i asistentici Nikolini Pavić na tehničkoj pomoći prilikom izrade rada.*

*Zahvaljujem se majci, bratu i dečku što su uvijek bili tu za mene te mi pružili podršku, razumjevanje i poticaj za završetak ovoga rada.*

*Zahvaljujem se i svima drugima koji su mi na bilo koji način sudjelovali ili pomogli u realizaciji rada.*

## Sadržaj

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>                                                              | <b>1</b>  |
| <b>2.1. ŽITARICE.....</b>                                                                  | <b>2</b>  |
| 2.1.1. Pšenica .....                                                                       | 2         |
| 2.1.2. Morfološka svojstva pšenice.....                                                    | 2         |
| 2.1.3. Klasifikacija pšenice .....                                                         | 3         |
| <b>2.2. FENOLNE TVARI .....</b>                                                            | <b>4</b>  |
| 2.2.1. Flavonoidi .....                                                                    | 5         |
| 2.2.2. Fenolne tvari u namirnicama i njihovi pozitivni učinci na zdravlje ljudi .....      | 6         |
| <b>2.3. EKSTRAKCIJA.....</b>                                                               | <b>7</b>  |
| 2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće .....                                                      | 7         |
| 2.3.2. Prijenos mase u operaciji kruto-tekuća ekstrakcija .....                            | 8         |
| <b>2.4. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI .....</b>                                        | <b>9</b>  |
| 2.4.1. Određivanje fenolnih tvari primjenom spektrofotometrijske metode .....              | 9         |
| <b>2.5. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA .....</b>                   | <b>10</b> |
| 2.5.1. Metoda odzivnih površina .....                                                      | 10        |
| 2.5.2. Box-Behnken dizajn .....                                                            | 11        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                                                        | <b>13</b> |
| <b>3.1. ZADATAK.....</b>                                                                   | <b>14</b> |
| <b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>                                                       | <b>14</b> |
| 3.2.1. Materijali .....                                                                    | 14        |
| 3.2.2. Granulometrijska analiza .....                                                      | 15        |
| 3.2.3. Određivanje suhe tvari .....                                                        | 16        |
| <b>3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA PŠENICE .....</b>                             | <b>17</b> |
| 3.3.1. Provedba ekstrakcije .....                                                          | 17        |
| 3.3.2. Priprema ekstrakata za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida..... | 19        |
| 3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari.....                                             | 19        |
| 3.3.4. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari .....  | 19        |
| 3.3.5. Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari .....                                | 20        |
| 3.3.6. Određivanje ukupnih flavonoida .....                                                | 21        |
| 3.3.7. Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju ukupnih flavonoida.....        | 21        |
| 3.3.8. Postupak za određivanje ukupnih flavonoida.....                                     | 21        |
| 3.3.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina .....                       | 22        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                                   | <b>25</b> |
| <b>4.1. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA.....</b>                                     | <b>26</b> |
| <b>4.2. ODREĐIVANJE SUHE TVARI .....</b>                                                   | <b>26</b> |
| <b>4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI .....</b>             | <b>27</b> |
| <b>4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA .....</b>                 | <b>28</b> |

|        |                                                                                                                                                                                        |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5.   | IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLA .....                                                                                                                                              | 29 |
| 4.6.   | UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI I FLAVONOIDA IZ BRAŠNA PŠENICE TE<br>ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA ..... | 30 |
| 4.7.   | MODELIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI .....                                                                                                                                   | 31 |
| 4.8.   | OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLA I FLAVONOIDA.....                                                                                                                               | 42 |
| 4.9.   | EKSTRAKCIJA PRI OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJE ODREĐENIH RSM- OM .....                                                                                                                | 42 |
| 4.9.1. | Ekstrakcija u vodenoj kupelji .....                                                                                                                                                    | 43 |
| 4.9.2. | Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju .....                                                                                                                               | 43 |
| 5.     | RASPRAVA.....                                                                                                                                                                          | 45 |
| 6.     | ZAKLJUČCI .....                                                                                                                                                                        | 51 |
| 7.     | LITERATURA .....                                                                                                                                                                       | 55 |

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

|               |                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| $A$           | apsorbancija                                                                                 |
| $A$           | međufazna kruto-tekuće površina [m <sup>2</sup> ]                                            |
| $\beta_0$     | konstanta jednadžbe odzivnog polinoma                                                        |
| $\beta_i$     | koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma                                      |
| $\beta_{ii}$  | koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma                                     |
| $\beta_{ij}$  | koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma                                    |
| $c$           | masena koncentracija fenolnih tvari [mg <sub>GAE(CE)</sub> /mL]                              |
| $c'$          | masena koncentracija otopine (u glavnoj masi otopine) [kg/m <sup>3</sup> ]                   |
| $c_{CE}$      | masena koncentracija otopine (+) – katehina [mg/mL]                                          |
| $c_{GAE}$     | masena koncentracija otopine galne kiseline [mg/mL]                                          |
| $C_{UFT}$     | maseni udio ukupnih fenolnih tvari [mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ]                   |
| $C_{UFL}$     | maseni udio ukupnih flavonoida [mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ]                        |
| $f_r$         | faktor razređenja ekstrakta za potrebe određivanja fenolnih tvari                            |
| $m$           | masa [g]                                                                                     |
| $p$           | razina signifinkantnosti                                                                     |
| $R$           | indeks korelacije                                                                            |
| $t$           | vrijeme ekstrakcije [min]                                                                    |
| $T$           | temperatura ekstrakcije [°C]                                                                 |
| $V$           | volumen ukupno dobivenog ekstrakta [mL]                                                      |
| $w_{s.t.}$    | udio suhe tvari [%]                                                                          |
| $x_{i,j}$     | ispitivane nezavisne varijable u procesu ekstrakcije (procesni uvijeti)                      |
| $Y(Y')_{UFT}$ | modelom predviđen maseni udio ukupnih fenolnih tvari [mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |



$Y(Y')_{UFL}$  modelom predviđen maseni udio ukupnih flavonoida [ $\text{mg}_{CE}/\text{g}_{s.t.}$ ]

KRATICE:

$GAE$  ekvivalenti galne kiseline

$CE$  ekvivalenti (+)-katehina

$EtOH$  etanol

$df$  stupnjevi slobode

$F$  vrijednost faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge

$MS$  varijanca prosječno odstupanje varijanata od prosječne vrijednosti uzorka

$s.t.$  suha tvar

$SS$  suma kvadrata odstupanja svih varijanata od prosječne vrijednosti

$UFT$  ukupne fenolne tvari

$UFL$  ukupni flavonoidi

SIMBOLI:

$\varepsilon$  koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [ $\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$ ]

$\phi_{EtOH}$  volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [% v/v]

## **1. UVOD**

Žitarice su jednogodišnje biljke, a među najznačajnijima za ljudsku prehranu je pšenica. Pšenica se sije na 220 milijuna ha godišnje i najviše prinose daje u područjima umjerene klime sa 500-700 mm oborina s povoljnim rasporedom tijekom vegetacije. Ozime i fakultativne žitarice se siju uglavnom za proizvodnju zrna. Zrno se prerađeno ili dorađeno troši za prehranu ljudi, industrijsku preradu, kao koncentrat za hranidbu stoke i kao voluminozno krmivo (Štafa i Stjepanović, 2015).

Fenolni spojevi se sintetiziraju u biljkama tijekom njihovog normalnog razvoja ili kao odgovor na stres (infekcije, oštećenja). Polifenoli predstavljaju glavni izvor antioksidanasa u prehrani. (Perez-Jimenez i sur., 2008). U posljednje vrijeme flavonoidi su dosta istraživani kao potencijalni markeri za identifikaciju različitih prehrambenih proizvoda, a također su pogodni i za taksonomsku klasifikaciju biljaka (Čačić-Kenjerić, 2016).

Ekstrakcija i izluživanje su metode izolacije spojeva iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala (Jerković i Radonić, 2009). Ekstrakcija kruto-tekuće je najčešće korištena operacija za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Naczki i Shahidi, 2006).

Cilj ovoga rada je bio istražiti utjecaj različitih procesnih uvjeta (temperatura, vrijeme i otapalo) i načina kruto-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom i ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju) na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna cjelovitog zrna pšenice i odrediti optimalne uvjete ekstrakcije za navedene spojeve metodom odzivnih površina.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ŽITARICE

Ozime i fakultativne žitarice se siju uglavnom za proizvodnju zrna. Zrno se prerađeno ili dorađeno troši za prehranu ljudi, industrijsku preradu, kao koncentrat za hranidbu stoke i kao voluminozno krmivo.

Životni ciklus biljke žitarice započinje klijanjem sjemena, a završava punom zrelošću. Tijekom tog životnog ciklusa žitarice prolaze kroz sljedeće stadije rasta i razvoja: klijanje, nicanje, busanje, klasanje odnosno metličanje, cvatnju i oplodnju, nalijevanje zrna te mliječnu, voštanu i punu zrelost. Svaki od navedenih stadija može trajati od nekoliko dana do nekoliko tjedana. Pod rastom žitarica podrazumijeva se povećanje mase i volumena biljke, a razvoj kvalitativnih promjena u biljci se odvija od nicanja pa do sazrijevanja sjemena (Štafa i Stjepanović, 2015).

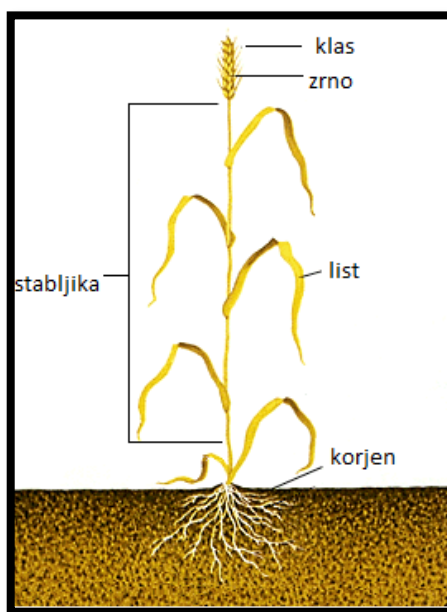
### 2.1.1. Pšenica

Žitarice su jednogodišnje biljke, a među najznačajnijima za ljudsku prehranu je pšenica. Ona u sebi sadrži esencijalne aminokiseline, vitamine, minerale, fitokemikalije i vlakna (Arendt i Zannini, 2013). Sije se na 220 milijuna ha godišnje i najviše prinose daje u područjima umjerene klime sa 500-700 mm oborina s povoljnim rasporedom tijekom vegetacije. Pšenica je iz roda *Triticum*, iz porodice trava (*Poaceae*, *Gramineae*) i ubraja se među najzastupljenije porodice u biljnom svijetu po broju vrsta, a po važnosti je najznačajnija porodica za proizvodnju hrane za ljude i stoku (Štafa i Stjepanović, 2015).

### 2.1.2. Morfološka svojstva pšenice

Sastavni dijelovi pšenice su korijen, stabljika, klas i list što se vidi na **Slici 1**. Korijen pšenice je žiličast. U povoljnim uvjetima pojedine žile mogu prodrijeti u tlo i do 1,5 (2 m). Klijanjem iz sjemena se pojave primarne žile (3-5) koje imaju funkciju u prvim tjednima rasta. Stalno sekundarno korijenje izbija iz najnižeg dijela stabljike u tlu pa sve do čvora busanja. Svaki izdanak iz busa tjera svoje korijenje. Stabljika pšenice je podijeljena na koljenca i međukoljenca. Što su donja međukoljenca kraća stabljika je čvršća. Stabljika pšenice je obično 60-120 m ovisno o sorti, uvjetima uzgoja i klimi. Cvat pšenice je klas s osjem ili bez osja. Sastoji se od klasnog vretena i klasića (Štafa i Stjepanović, 2015). Klasići su u cik-cak

formaciji i na jednom klasiću može biti maksimalno 5 zrna. Važno svojstvo za prinos pšenice jest da klas može imati 4-10 redova sa 2-10, a ponekad i više zrna u svakom redu.



**Slika 1** Sastavni dijelovi pšenice

Cijelovito zrno pšenice je bogat izvor bioaktivnih fitokemikalija kao što su: fenolne kiseline, karotenoidi, tokoferoli, alkilrezocinoli, fitosteroli, lignani i dr. (Luthria i sur., 2015). Fenolnih spojeva ima više ako je cijelo zrno s omotačem upotrebljeno u proizvodnji te je i veća antioksidativna aktivnost spojeva u takvom zrnu (Hung i sur., 2009). Zrno pšenice se sastoji od omotača, klice i endosperma. Endosperm je ekonomski najznačajniji dio zrna. Sastoji se od aleuronskog sloja bogatog bjelančevinama i unutrašnjosti zrna bogate škrobom. Zrno može biti brašnasto i staklasto (koje je kvalitetnije) (Štafa i Stjepanović, 2015).

### 2.1.3. Klasifikacija pšenice

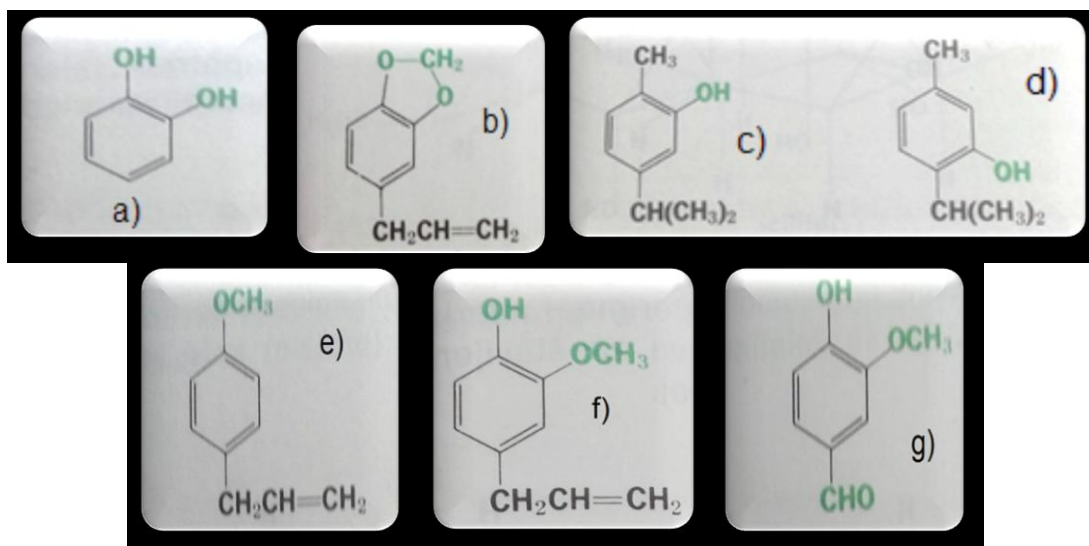
Klasifikacija žitarica vrši se s obzirom na razlike u botaničkim i morfološkim osobinama i uvjetima uzgoja. Pšenica se klasifikacija kao žitarica prve klase. Svojstva ovih žitarica su: klijanje s većim brojem korjenčića (pšenica s 3), zrno ima izraženu brazdicu s trbušne strane, cvat je klas ili metlica te postoje jare i ozime vrste (Komljenović i Todorović, 2009).

Klasifikacija pšenice se vrši prema: broju kromosoma, postotku izbrašnjavanja, dobi sjetve, boji i tvrdoći zrna, količini proteina i sedimentacijskoj vrijednosti.

Boja zrna pšenice ovisi o sorti, klimatskim uvjetima i uvjetima uzgoja te varira od bijele do crvenosmeđe. Prema broju kromosoma se razlikuju sljedeće tri vrste pšenice: *Triticum aestivum* (21 par kromosoma), *Triticum compactum* (21 par kromosoma) i *Triticum durum* (14 pari kromosoma) (Ugarčić-Hardi, 2010). Najvažnija i najraširenija je pšenica *Triticum aestivum*, koja se naziva obična ili meka pšenica. Od ove pšenice se dobiva brašno za kruh i pekarske proizvode. Tvrdna pšenica *T. durum* se upotrebljava za proizvodnju tjestenine. *Triticum compactum* je patuljasta pšenica. Brašno ove pšenice se upotrebljava za proizvodnju keksa, kolača i pita. U svijetu se još uzgajaju *Triticum monococcum* (jednozrnac), *Triticum dicoccum* (dvoznac) i *Triticum spelta* (pir, krupnik) (Hrvatska enciklopedija, 2016).

## 2.2. FENOLNE TVARI

Fenolni spojevi su bioaktivne komponente biljnih produkata i kao takvi se nalaze u obliku estera ili glikozida (Klepacka i sur., 2011). U ovu skupinu spojeva ubrajaju se i neke prirodne aminokiseline, sredstva za štavljenje, sastavni dijelovi drveta (lignin) i velika grupa cvjetnih pigmenata (Cram i Hammond, 1973). Prema kemijskoj strukturi fenolne tvari dijele se na fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide (Balasundram i sur., 2006). Osnovno obilježje fenolnih spojeva je prisutnost jednog ili više hidroksilnih benzenskih prstena, a većina fenolnih prirodnih spojeva su prisutni u obliku konjugata s mono- ili posaharidima, vezani za jednu ili više fenolnih skupina (**Slika 2**) (Herrero i sur., 2012; Balasundram i sur., 2006). Naudio fenolnih tvari u biljnom materijalu i njihov sastav utječu: svjetlost, temperatura, uvjeti skladištenja i obrade (Zobel, 1997).



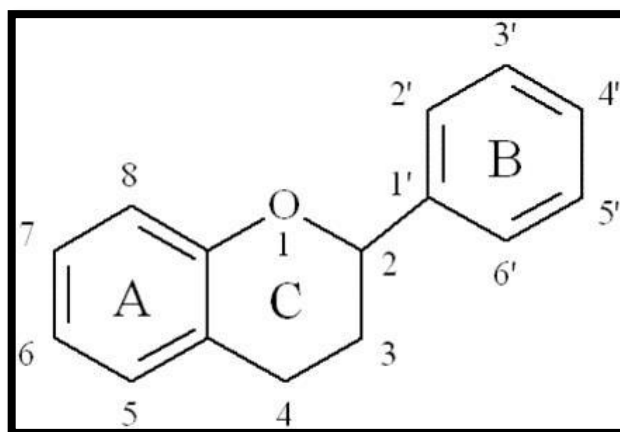
**Slika 2** Jednostavni prirodni fenoli: (a) katehol, (b) safrol, (c) karvakrol, (d) timol, (e) anetol, (f) eugenol i (g) vanilin (Cram i Hammond, 1973).

### 2.2.1. Flavonoidi

Danas je identificirano više od 4000 flavonoida. Flavonoidi se nalaze u korjenu, lišću, sjemenkama, koži voća i cvijetu viših biljaka. U većini slučajeva vrše funkciju pigmenta na biljkama dajući njihovim cvjetovima široku paletu boja. Ovi spojevi ne mogu se pronaći u namirnicama životinjskog podrijetla i ljudski organizam ih ne može sintetizirati. Međutim, otkriveno je da sposobnost sinteze flavonoida imaju morski koralj *Echinophora lamellosa* i gljive *Aspergillus candidus* i *Phallus impudicus*. Također su pronađeni na krilima plavog leptira *Polymmatius icarus* no on ih ne sintetizira. U posljednje vrijeme flavonoidi su dosta istraživani kao potencijalni markeri za identifikaciju različitih prehrambenih proizvoda, a također su pogodni i za taksonomsku klasifikaciju biljaka (Čačić-Kenjerić, 2016).

Osnovna kemijska struktura flavonoida je difenolpropanski kostur (C6-C3-C6) (Balasundram i sur., 2006). Sastoje se od dva fenilna prstena (A i B) povezana sa mostom od tri ugljikova atoma (C) (**Slika 3**) (Čačić-Kenjerić, 2016). Najveće i najviše istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini), proantocijanidini i antocijanidini (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Strukturne razlike između ovih skupina su utemeljene na stupnju hidroksilacije i prisutnosti C2-C3 dvostruke veze (Čačić-Kenjerić, 2016).





**Slika 3** Osnovna struktura flavonoida

### 2.2.2. Fenolne tvari u namirnicama i njihovi pozitivni učinci na zdravlje ljudi

Fenolni spojevi se sintetiziraju u biljkama tijekom njihova normalnog razvoja ili kao odgovora na stres (infekcije, oštećenja). Sadržaj ovih spojeva u biljnom materijalu ovisi o vrsti i sorti, procesu dozrijevanja te o uvjetima uzgoja i skladištenja (Naczki i Shahidi, 2006). Polifenoli predstavljaju glavni izvor antioksidanasa u prehrani. Kumulativno i sinergističko djelovanje velikog broja antioksidanasa doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti hrane biljnog podrijetla (Perez-Jimenez i sur., 2008).

Bioflavonoidi (vitamin P) daju žutu i narandžastu boju agrumima. Bioflavonoidi su antioksidansi i mogu pomoći u sprječavanju razvoja određenih vrsta raka. Specifični bioflavonoidi obavljaju različite funkcije kao npr. rutin koji je koristan u liječenju krhkosti kapilara lakših nagnječenja kod pacijenata s visokim krvnim tlakom (Mindell, 1998). Fenolni spoj punikalagin se nalazi u naru, a ima antibakterijsko, antifungalno i antioksidacijsko djelovanje (Ismail i sur., 2012). Izoflavoni se nalaze u mahunarkama kao što su soja, šareni grah, grašak, leća i kikiriki. Ovi spojevi sprječavaju rast stanica tumora kod raka dojke. Flavonoidi kvercetin, hesperidin i katehin su pokazali antivirusno djelovanje protiv herpes virusa. Katehini se nalaze u zelenom čaju i bobicama i smatra se da mogu smanjiti rizik od raka probavnog sustava (Mindell, 1998). Kvercetin se nalazi u normalnim i ukrasnim rajčicama, a u brokuli, rajčici, crvenom luku i zelenoj salati se nalaze flavonoli koji su i najraširenija skupina u prirodi. Antocijani se nalaze u bobičastom voću kao što su višnje, šljive ili u radiču i kupusu. Flavanoni su najčešće nosioci gorkog okusa, a nalaze se u voću ili

sokovima citrusa. Flavani se nalaze u breskvama, jagodama, crnom ribizu, u grožđu i jabukama, a flavoni u sjemenkama žitarica i začinskom bilju kao što je peršin, timijan i ružmarin (Čačić-Kenjerić, 2016).

## 2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija i izluživanje su metode izolacije spojeva iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Određuje ih prijenos otopljene tvari iz krute smjese, otopine ili suspenzije u otapalo (Jerković i Radonić, 2009). Izluživanje se koristi kada se radi s anorganskim tvarima, a ekstrakcija s organskim tvarima (Tomas i sur., 2013). Proces ekstrakcije se općenito djeli na:

- ekstrakciju kruto-tekuće (izluživanje) – topljiva tvar je u krutom stanju, a otapalo u tekućem stanju;
- ekstrakciju tekuće-tekuće – u tekućem stanju su i topljiva tvar i otapalo (Jerković i Radonić, 2009).

### 2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Operacija prijenosa mase, kojom se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog otapala, naziva se ekstrakcija kruto-tekuće. Kao otapalo se koristi voda, organska otapala, otopine baza, kiselina ili soli, a kao čvrsti materijal se upotrebljava mineralna ili biljna sirovina. Dobivena otopina u ekstrakciji se naziva ekstrakt, a ekstraktivne supstance su dio čvrstog materijala koji se otapa (Veljković i Milenković, 2002).

Proces ekstrakcije se odvija miješanjem krute tvari i otapala, zatim važno je vrijeme kontakta otapala i krute tvari te separacija (taloženje, dekantiranje, filtracija, centrifugiranje).

Utjecaj na ekstrakciju kruto-tekuće imaju:

- topljivost krute tvari;
- temperatura ekstrakcije – u većini slučajeva veća temperatura ubrzava proces ekstrakcije jer povećava brzinu otapanja krute tvari i brzinu difuzije u volumen otapala, ali u nekim slučajevima se aktivne komponente degradiraju porastom temperature (Jokić, 2015);
- veličina čestica – manje čestice imaju veću ukupnu površinu pa je brži prijenos mase i kraći put koji otopljena tvar prijeđe izlazeći iz krutine pa je poželjno da je kruta tvar usitnjena (Mujić, 2006);

- otapalo – u početku je otapalo relativno čisto, ali kako ekstrakcija napreduje, koncentracija otopljene tvari je sve veća i brzina ekstrakcije se smanjuje. Do smanjenja brzine dolazi zbog povećanja koncentracije otopljene tvari te zbog povećanja viskoziteta otopine;
- miješanje – povećava se prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja oko čestice u glavnu masu zbog turbulencija te se povećava brzina difuzije otopljene tvari kroz pore krute tvari na površini čestica (Mujić, 2006; Jokić, 2015).

Ekstrakcija kruto-tekuće se najčešće izvodi kao perkolacija ili maceracija. Perkolacija se provodi tako što kroz nepokretan sloj čvrstog materijala kontinuirano prolazi otapalo, a kada se kruti materijal potapa u otapalo provodi se maceracija (Veljković i Milenković, 2002).

### 2.3.2. Prijenos mase u operaciji kruto-tekuća ekstrakcija

Zbog razlike koncentracije između dvije faze koje su u kontaktu nastaje prijenos mase i odvija se u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Granični sloj (sloj zasićene otopine na površini krute tvari) nastaje kada krutu tvar dovedemo u kontakt s nekim otapalom. Koncentracija otopine u tom sloju ima ravnotežnu vrijednost  $c_s$ . Otapanje tvari bi prestalo ako otopljena tvar ne bi difundirala iz graničnog sloja. Radi razlike koncentracije između graničnog sloja i ostatka otapala postoji koncentracijski gradijent zbog kojeg topiva tvar stalno prelazi u ostatak otapala. Ovaj mehanizam se odvija difuzijom i konvekcijom. Difuzija je vrlo spor proces jer je prijenos mase u molekularnom razmjeru. Konvekcija se odvija u molarnom razmjeru gdje se skupine molekula gibaju s mjesta više na mjesto niže koncentracije.

Brzina prijenosa mase iz krute tvari u otapalo izražava se formulom **(1)**:

$$\frac{dw}{dt} = K \cdot \bar{A} \cdot (c_s - c) \quad (1)$$

gdje je:

- $w/t$  - brzina prijenosa mase u otapalo [kg/s],
- $\bar{A}$  – dodirna površina (međufaza) između tekućine i krute čestice [ $m^2$ ],
- $c_s$  – masena koncentracija zasićene otopine (u graničnom sloju) [ $kg/m^3$ ],
- $c$  - masena koncentracija otopine (u glavnoj masi otopine) [ $kg/m^3$ ],
- $K$  - koeficijent prijenosa mase [m/s] (Tomas i sur., 2013).

## 2.4. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI

Fenolni spojevi se mogu kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih tehnika kao što su:

- UV/VIS spektrofotometrija,
- HPLC (visoko djelotvorna tekućinska kromatografija),
- TLC (tankoslojna kromatografija),
- kapilarno-zonska elektroforeza (Dragović-Uzelac i sur., 2009).

### 2.4.1. Određivanje fenolnih tvari primjenom spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je način određivanja koncentracije u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao (Ilustrirani hrvatsko-engleski kemijski riječnik & glosar, 2015). Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta smanjuje intenzitet frekvencije elektromagnetskog zračenja. Apsorpcijske značajke te kemijske vrste se opisuju apsorpcijskim spektrom. Apsorpcijski spektar je krivulja koja nastaje mjerenjem apsorbancije pri različitim valnim duljinama. Najbolje je odabrati valnu duljinu koja daje najstrmiju baždarnu krivulju pri kojoj će mjerenja biti najosjetljivija. Na odabranoj valnoj duljini se mjeri nekoliko različitih koncentracija tvari. Koncentracija se prikaže u ovisnosti o apsorbanciji. Mjerenje uzorka na odabranoj valnoj duljini, računanje koncentracije u uzorku, vrši se pomoću kalibracijske krivulje (Jakobek, 2013).

Za spektrofotometriju je važan Lambert – Beerov zakon **(2)**.

$$\log\left(\frac{I_0}{I_p}\right) = A = \varepsilon \cdot s \cdot c_a \quad (2)$$

gdje je:

- $I_0$  - intezitet ulazne svjetlosti,
- $I_p$  – intezitet propuštene svjetlosti,
- $A$  – apsorbancija,
- $\varepsilon$  - koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije) [ $\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$ ],
- $s$  – dužina optičkog puta [m],
- $c_a$  – množinska koncentracija tvari [ $\text{mol}/\text{m}^3$ ].

Lambert-Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije obojenih otopina (na osnovu mjerenja apsorpcije) ili one kod kojih u tijeku reakcije nastaje obojenje. Apsorpcija svjetlosnog zračenja ovisi o prirodi supstance koja apsorbira svjetlost, debljini sloja supstance, valnoj dužini upadne svjetlosti, temperaturi, a kod otopina o koncentraciji supstance u otopini (Šeruga, 1988).

## **2.5. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

Optimizacija podrazumjeva poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa, a uz što manje troškove. Može se provesti empirijskim ili statističkim metodama. S obzirom na to da svaki tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra, uz ostale konstantne, neće dati stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces.

U novije vrijeme se u optimizaciji procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a jedna od njih je i metoda odzivnih površina, eng. Response surface methodology, RSM (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

### **2.5.1. Metoda odzivnih površina**

Metoda odzivnih površina je skup matematičkih i statističkih metoda koje se temelje na aproksimaciji eksperimentalnih podataka empirijskim modelom. Primjena ove metode je u slučajevima gdje više varijabli utječe na proces. Prije primjene metode je potrebno izabrati odgovarajući dizajn eksperimenta (iz ispitivanog eksperimentalnog područja) kojim će se definirati eksperimenti. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta se dobiva odzivna ploha. Odzivna ploha je kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti. Funkcija koja opisuje odzivnu plohu je odzivna funkcija. Ona prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Odabir dizajna eksperimenta ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što je:

trofaktorijalni pokus na tri razine ili Box-Behnken dizajn. Ovakvi modeli daju informacije o minimumu ili maksimumu funkcije te funkcionalnu ovisnost zavisnih varijabli o ispitivanim varijablama te njihovoj interakciji. Navedeni planovi pokusa se razlikuju s obzirom na broj pokusa koji su potrebni, razinu ispitivanih varijabli i prema odabiru eksperimentalnih točaka (Bezerra i sur., 2008).

### **Definicije termina u metodi odzivnih površina**

Eksperimentalna domena – predstavlja područje ispitivanja odnosno raspon minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (uvjeta, parametara).

Dizajn eksperimenta (plan pokusa) – predstavlja set eksperimenata određenih matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli.

Faktori ili nezavisne varijable – varijable koje se mogu mjenjati nezavisno jedne od drugih i koje se kontroliraju tijekom procesa (npr. temperatura, vrijeme, protok).

Razina varijabli – različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperiment provesti (npr. varijabla temperature na tri razine 30-60-90 °C) da bi se optimizirao neki proces.

Odziv ili zavisne varijable – predstavljaju izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija).

Ostatak (eng. Residual) – predstavlja razliku između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka odnosno onaj dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom. Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom predstavljena je niskim vrijednostima ostataka (Bezerra i sur., 2008).

#### **2.5.2. Box-Behnken dizajn**

Box-Behnken dizajn (**Slika 4**) prikazuje kako odabrati točke eksperimenata kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn je učinkovitiji od trofaktorijalnog

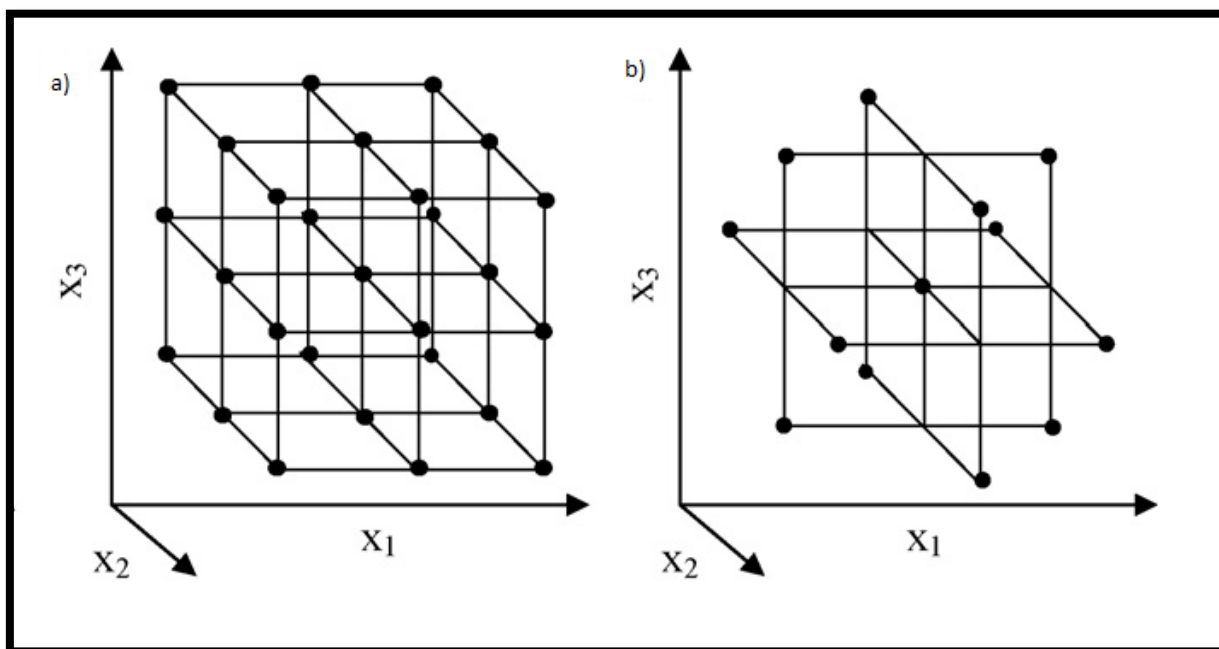
dizajna ( $3k$ ) zbog mogućnosti ispitivanja više varijabli (3-10) te manjeg broja potrebnih pokusa. Osnovne karakteristike ovog dizajna su:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu:

$$N = 2k(k-1) + c_p \quad (3)$$

gdje je:  $k$  broj faktora, a  $c_p$  je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- sve razine faktora se moraju svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina (Bezerra i sur., 2008)



**Slika 4** Trofaktorijski dizajn za optimizaciju (a) tri varijable i (b) Box-Behnken dizajn za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka (Bezerra i sur., 2008)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje utjecaja procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz ekstrakta brašna cjelovitog zrna pšenice te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije.

Provedeno je ispitivanje utjecaja otapala (volumni udio 96 %-tnog etanola u vodenoj otopini: 30, 60 i 90%, v/v), temperature (30, 60 i 90 °C) i vremena ekstrakcije (10, 40 i 70 minuta) te njihove interakcije tijekom ekstrakcije u vodenoj kupelji s tresilicom.

Procjena utjecaja ispitivanih uvjeta na promatrane procese i njihovo optimiranje je provedeno primjenom programa Design Expert 7.1.6., metodom odzivnih površina (eng. Response surface methodology) na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

Zatim, radi provjere uspješnosti optimiranja, ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji (pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije) i na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi-LSV s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Materijali

Za istraživanja su korištena tri uzorka pšenice: Pšenica Belje (PB), Pšenica Kutjevo (PK) i Pšenica Čakovečki mlinovi (PČM) (**Slika 5**).



**Slika 5** Korišteni uzorci za analizu

### 3.2.2. Granulometrijska analiza

Uzorci pšenice su, prije granulometrijske analize, očišćeni od primjesa detaljnim probiranjem i nakon toga su samljeveni na laboratorijskom mlinu. Granulometrijska analiza uzoraka je provedena na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200) i određena je prosječna veličina čestica. Na seriju standardnih sita, prethodno izvaganih zajedno s kuglicama (koje olakšavaju odjeljivanje čestica), je preneseno 100 grama uzorka. Sita su posložena tako da gornje sito ima najveće otvore, a zadnje sito je tzv. "slijepo sito" (**Tablica 1**). Prosijavanje je provedeno tijekom 5 minuta te je ponovno vagano svako pojedino sito s uzorkom i na temelju toga je izračunat srednji promjer veličine čestica ( $\bar{d}_c$ ), broj čestica po gramu uzorka ( $n'_c$ ) i specifična površina čestica ( $A'_c$ ) (**Tablica 3**) prema Backeru i Herrmanu (2002.).

**Tablica 1** Oznaka i veličina otvora sita

| BROJ SITA | VELIČINA SITA<br>(mm) |
|-----------|-----------------------|
| 8         | 0,71                  |
| 7         | 0,56                  |
| 6         | 0,4                   |
| 5         | 0,28                  |
| 4         | 0,15                  |
| 3         | 0,125                 |
| 2         | 0,1                   |
| 1         | 0,05                  |
| 0         | "slijepo sito"        |

Prosječna veličina čestica je izračunata prema jednadžbi:

$$\bar{d}_c = \log^{-1} \left[ \frac{\sum W_i (W_i \cdot \log d_i)}{\sum W_i} \right] \quad (4)$$

Standardna devijacija:

$$SD = \log^{-1} \left[ \frac{\sum W_i (\log d_i - \log \bar{d}_\epsilon)^2}{\sum W_i} \right]^{0,5} \quad (5)$$

Broj čestica po gramu uzorka:

$$n'_\epsilon = \frac{1}{\rho \beta_v} \exp(4,5 \ln^2 SD - 3 \ln \bar{d}_\epsilon) \quad (6)$$

Specifična površina čestica (ukupna površina čestica u gramu uzorka):

$$A'_\epsilon = \frac{\beta_s}{\rho \beta_v} \exp(0,5 \ln^2 SD - \ln \bar{d}_\epsilon) \quad (7)$$

gdje je:

- $\bar{d}_\epsilon$  - prosječna veličina čestica [cm],
- $W_i$  - masa čestica na  $i$ -tom situ [g],
- $d_i$  - promjer otvora  $i$ -tog sita [g],
- $SD$  - standardna devijacija,
- $n'_\epsilon$  - broj čestica po gramu uzorka,
- $A'_\epsilon$  - specifična površina čestica [cm<sup>2</sup>/g],
- $\beta_v$  - faktor oblika za izračun volumena čestica,
- $\beta_s$  - faktor oblika za izračun područja čestica,
- $\rho$  - specifična masa materijala [g/cm<sup>3</sup>].

### 3.2.3. Određivanje suhe tvari

Određivanje udjela suhe tvari provedeno je termogravimetrijskom metodom pomoću tzv. brzog analizatora vlage na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (**Slika 6**). Ispitivani uzorak je stavljen na aluminijsku pliticu (oko 3 g) koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje gdje se sušenje provodi do konstantne mase. Prema preporukama proizvođača uređaja su odabrani uvjeti sušenja za

pšenično brašno: brza metoda (eng. rapid), temperatura sušenja 180 °C i kriterij završetka procesa (eng. switch-off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur., 2003). Sušenje ispitivanih uzoraka brašna se provodilo u dva ponavljanja.



**Slika 6** Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

### **3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA PŠENICE**

#### **3.3.1. Provedba ekstrakcije**

U prvom dijelu eksperimentalnog rada su provedena preliminarne istraživanja kruto-tekuće ekstrakcije vodenom kupelji s tresilicom pri 200 rpm (Julabo SW-23, Njemačka) s ciljem određivanja intervala ispitivanih procesnih uvjeta. Pri odabiru mase uzorka je provedena po jedna ekstrakcija s različitim masama uzoraka (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 i 5 g). Masa uzorka koja je pokazala najbolje rezultate je 1,5 g. Pri odabiru vremena trajanja ekstrakcije provedene su tijekom 20, 40, 60 i 90 min izabrane su varijable 10, 40 i 70 min. Pri izboru pogodnog otapala za ekstrakciju korištene su različite koncentracije etanola: 10, 30, 50, 70, 90 i 96 % a za potrebe određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije odabrane su koncentracije su 30, 60 i 90 %.

U tikvice je odvagano 1,5 g uzorka brašna i dodano je 20 mL ekstrakcijskog otapala. Tikvice su začepljene i stavljene u vodenu kupelj s tresilicom (Julabo SW-23) te je provedena ekstrakcija uz rotaciju od 200 rpm te podešenu odgovarajuću temperaturu i vrijeme.

Provedeno je ispitivanje utjecaja otapala, temperature i vremena ekstrakcije. Eksperimenti su provedeni pri različitim kombinacijama ispitivanih uvjeta određenim prema Box-Behnkenovom dizajnu (ukupno 15 pokusa) na osnovi čega su, nakon određivanja prinosa fenolnih tvari u ekstraktima, određeni optimalni uvjeti ekstrakcije.

Pri tim istim uvjetima je također provedena i ekstrakcija u univerzalnom aparatu za ekstrakciju Büchi (B-811 LSV) koji je potpuno automatiziran ekstrakcijski sustav (**Slika 7**). Ovaj sustav uključuje četiri ekstrakcijske jedinice s posudama za otapalo volumena 230 mL i ekstrakcijskim čahurama te modul za uvođenje inertnog plina. Sustav može primijeniti četiri različite metode ekstrakcije: Standardni Soxhlet, toplu, vruću i kontinuiranu ekstrakciju (Babić i sur., 2015). Najčešće korištena u laboratorijskim istraživanjima je Standard Soxhlet metoda (Bucić-Kojić, 2008).



**Slika 7** Univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi, B-811 LSV)

### Princip

*Soxhlet standard* - otapalo isparava iz posude pri čemu se pare dižu do hladila i kondenziraju. Otapalo se prelijeva preko kondenzacijske cijevi u uzorak koji je u ekstrakcijskoj čahuri. Stakleni ventil je zatvoren. Ekstrahiraju se tvari topljive u otapalu i ono se zadržava u kontaktu s uzorkom sve dok nivo otapala ne dosegne visinu na kojoj je optički senzor. Kada nivo otapala dosegne tu visinu otvara se stakleni ventil i otapalo se s ekstrahiranom tvari

ispušta nazad u posudu s otapalom. Ciklus se ponavlja dok ne istekne vrijeme ekstrakcije koje je postavljeno (Bucić-Kojić, 2008).

## **Postupak**

Odvagano je 7,5 g brašna pšenice veličine 0,016 - 0,017 cm u staklene frite i one su pričvršćene u ekstrakcijsku komoru. Ekstrakcija je rađena pri određenim optimalnim uvjetima za ukupne fenolne tvari (otapalo 58 % etanol i vrijeme 70 min) i flavonoide (otapalo 90 % etanol i vrijeme 70 min) te su izračunati njihovi maseni udjeli.

### **3.3.2. Priprema ekstrakata za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida**

Suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana (Sigma 2-16) pri 15000g tijekom pet minuta. Supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem i nadopunjen je ekstrakcijskim otapalom do poznatog volumena. Odgovarajuće razrjeđenje ekstrakta je pripremljeno nakon centrifugiranja suspenzije i dekantiranja supernatanta. Određivanje fenolnih tvari provedeno je isti dan kada i ekstrakcija.

### **3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari**

U ekstraktima brašna pšenice su određene ukupne fenolne tvari, spektrofotometrijski, mikro Folin-Ciocalteuovom metodom. Folin-Ciocalteuova metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. U alkalnom mediju, u prisustvu Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline), fenolni spojevi se oksidiraju, a navedene kiseline reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Pavel i sur., 2006).

### **3.3.4. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari**

Galna kiselina poznate koncentracije je korištena kao standard i na osnovu nje je izrađena baždarna krivulja. Otopina galne kiseline je pripremljena otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96 %-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do

oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Nakon toga su pripremljena različita razrjeđenja na način da je u odmjerene tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari (poglavlje 3.3.5), određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline, a iz dobivenih rezultata je izrađena krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline (kalibracijska krivulja).

### 3.3.5. Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

U epruvetu je otpipetirano 40  $\mu$ L pripremljenog ekstrakta brašna, 3160  $\mu$ L destilirane vode i 200  $\mu$ L Folin - Ciocalteu-ovog reagensa. Nakon stajanja između 30 s i 8 min je dodano 600  $\mu$ L 20 %-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavalo 40  $\mu$ L destilirane vode. Uzorci su protreseni na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) (**Slika 8**) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 min na 40 °C da se razvije boja. Apsorbancija je mjerena na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 765 nm.

Iz dobivenih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje, su izračunate koncentracije ukupnih fenolnih tvari. Koncentracije su izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard u  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$  ekstrakta. Konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih tvari preračunate su na suhu tvar uzorka  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ . Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u tri ponavljanja.



**Slika 8** Vibromix 10, Tehnica

### 3.3.6. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi su određivani spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida pri čemu je nastajao žućkasto obojeni kompleks.

### 3.3.7. Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju ukupnih flavonoida

Prije određivanja koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice, napravljena je baždarna krivulja (+)-katehina koja je korištena kao standard. Otopina (+)-katehina pripremljena je otapanjem 0,2 g (+)-katehina u krutom stanju s 10 mL 95 %-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Pripremljena su različita razrjeđenja tako da je u odmjerene tikvice od 50 ml otpipetirano po 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2 mL; 2,5 ml; 5,0 ml pripremljene otopine (+)-katehina te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine (+)-katehina. Iz dobivenih rezultata je izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji (+)-katehina.

### 3.3.8. Postupak za određivanje ukupnih flavonoida

U 4 mL destilirane vode dodano je 1 mL ekstrakta brašna cjelovitog zrna pšenice, a zatim 0,3 mL 5 % natrijevog nitrita te je nakon pet minuta dodano 0,3 mL 10 %-tne vodene otopine aluminij(III)-klorida-heksahidrata. Nakon 5-8 minuta je dodano 2 mL 1 M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 10 mL. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (1 mL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) te je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

Koncentracija flavonoida u ekstraktima brašna pšenice je određena u odnosu na standardnu krivulju (+)-katehina (CE) i preračunata je na suhu tvar pšenice ( $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.



### 3.3.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

Osnovni koraci u primjeni metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta su:

- ❖ odabir nezavisnih varijabli (parametara, faktora) koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara (odabiru se prema cilju ispitivanja ili na temelju iskustva istraživača);
- ❖ izbor dizajna eksperimenta i provođenje eksperimenata prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara (ovisna o primjenjenom dizajnu);
- ❖ aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom) primjenom matematičko-statističkih metoda;
- ❖ evaluacija prikladnosti modela
- ❖ određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih modela

Za procjenu glavnih procesnih parametara ekstrakcije (temperature, vrijeme i otapala) i njihove interakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz ekstrakta brašna pšenice (**Tablica 2**) je korišten Box-Behnkenov plan pokusa.

**Tablica 2** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za ekstrakciju fenolnih i flavonoidnih tvari iz ekstrakata brašna pšenice

| FAKTOR                           | DONJA<br>RAZINA | CENTRALNA<br>RAZINA | GORNJA<br>RAZINA |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| Kodirane varijable               | -1              | 0                   | 1                |
| Temperatura ( $X_1$ , °C)        | 30              | 60                  | 90               |
| Sastav otapala ( $X_2$ , %, v/v) | 30              | 60                  | 90               |
| Vrijeme ( $X_3$ , min)           | 10              | 40                  | 70               |

Ispitivane varijable prevedene su u kodirane prema izrazu:

$$X = \frac{X - \frac{X_{\max} + X_{\min}}{2}}{\frac{X_{\max} - X_{\min}}{2}} \quad (8)$$

Provedeno je petnaest eksperimenata ekstrakcije s tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja. Eksperimenti su provedeni prema Box-Benkhenovu planu pokusa.

Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (9)$$

gdje je:

- $Y$  - modelom predviđena odzivna funkcija,
- $\beta_0$  - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,
- $\beta_i$  - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- $\beta_{ii}$  - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- $\beta_{ij}$  - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,
- $x_{i,j}$  – ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti).

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

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara i statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 7.1.6. (DOE). Ovaj program može raditi s kodiranim i s nekodiranim varijablama.

## **4. REZULTATI**

Eksperimentalno dobiveni podaci kao i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima. Pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6. provedeni su dizajn eksperimenta i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima, a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

#### 4.1. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA

**Tablica 3** Prosječna veličina čestica, standardna devijacija, površina čestica, broj čestica po gramu

| UZORAK | Prosječna veličina čestica (cm) | Standardna devijacija, <i>SD</i> | Površina čestica (cm <sup>2</sup> /g) | Broj čestica po gramu |
|--------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| PK     | 0,016                           | 2,05                             | 375,9                                 | 2002321               |
| PČM    | 0,017                           | 2,09                             | 343,4                                 | 1681069               |
| PB     | 0,016                           | 2,06                             | 361,5                                 | 1823598               |

#### 4.2. ODREĐIVANJE SUHE TVARI

Nakon provedenog sušenja uzoraka brašna pšenice na uređaju za određivanje vlage Mettler Toledo brzom metodom na 180 °C, izračunata je suha tvar svih uzoraka te je izražena kao srednja vrijednost dva određivanja koja je iznosila za: pšenicu Belje (PB): 89,53 %, pšenicu Čakovečki mlinovi (PČM): 88,38 % i pšenicu Kutjevo d.d. (PK): 87,955 %.

### 4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI

**Tablica 4** Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini  $\lambda = 765$  nm za pripadajuće koncentracije otopine galne kiseline

| $c$ [mg <sub>GAE</sub> /mL] | $A_{sr}$ |
|-----------------------------|----------|
| 0                           | 0,000    |
| 0,05                        | 0,038    |
| 0,1                         | 0,082    |
| 0,15                        | 0,134    |
| 0,25                        | 0,232    |
| 0,5                         | 0,508    |
| 0,75                        | 0,772    |
| 1                           | 1,002    |

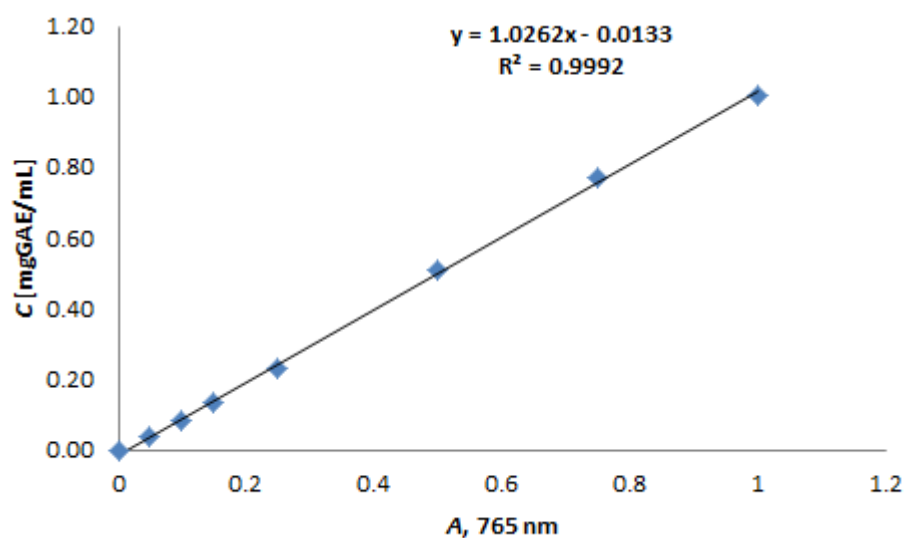
Metodom linearne regresije je dobivena jednadžba:

$$y = 1,0262x - 0,0133 \quad (10)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = 1,0262 \cdot A - 0,0133 \text{ [mg}_{GAE}\text{/mL]} \quad (11)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



**Slika 9** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari

#### 4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

**Tablica 5** Vrijednosti apsorancija na valnoj duljini  $\lambda = 510$  nm za pripadajuće koncentracije (+) – katehina

| $c$ [mg <sub>CE</sub> /mL] | $A_{sr}$ |
|----------------------------|----------|
| 0                          | 0,000    |
| 0,02                       | 0,066    |
| 0,04                       | 0,122    |
| 0,06                       | 0,201    |
| 0,08                       | 0,254    |
| 0,1                        | 0,318    |
| 0,2                        | 0,589    |

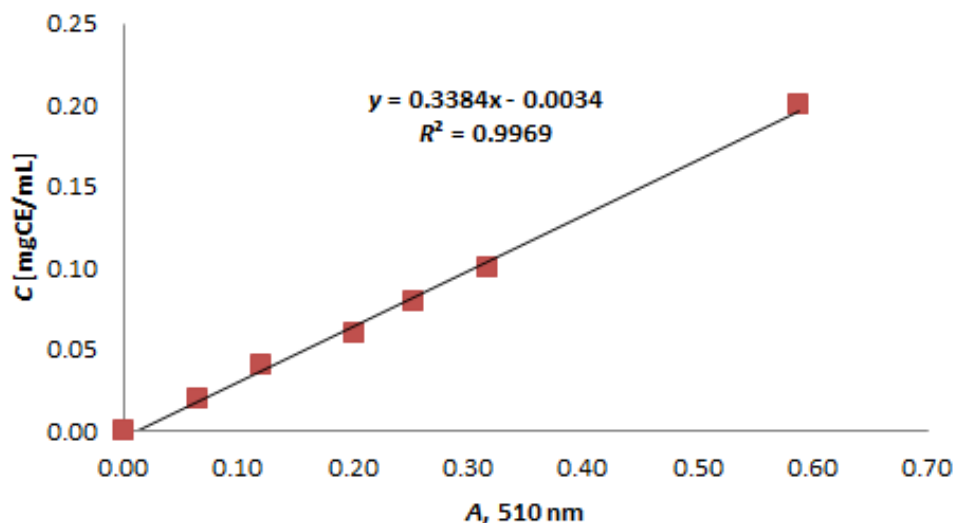
Metodom linearne regresije je dobivena jednadžba:

$$y = 0,3384x - 0,0034 \quad (12)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih flavonoida)} = 0,3384 \cdot A - 0,0034 \text{ [mg}_{CE}\text{/mL]} \quad (13)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



**Slika 10** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih flavonoida

#### 4.5. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLA

Prema jednadžbama (11 i 13) izračunate su koncentracije ukupnih fenola [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ] odnosno ukupnih flavonoida [ $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$ ] koje su preračunate na suhu tvar uzorka prema jednadžbi 14.

$$C = \frac{c \cdot V}{m_{\text{uz}} \cdot w_{\text{s.t.}}} \cdot 100 [\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{g}_{\text{s.t.}}] \quad (14)$$

gdje je:

- $C$  - maseni udio fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ],
- $c$  - masena koncentracija fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{mL}$ ],
- $V$  – volumen otapala [mL],
- $m_{\text{uz}}$  - masa uzorka iz koje su se ekstrahirali fenoli [g],
- $w_{\text{s.t.}}$  – udio suhe tvari [%].

#### 4.6. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI I FLAVONOIDA IZ BRAŠNA PŠENICE TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Eksperimentalno je ispitan utjecaj tri procesna uvjeta ekstrakcije u tri razine (sastav otapala tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola 30-60-90%, v/v, temperatura 30-60-90 °C i vrijeme 10-40-70 minuta) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz brašna cjelovitog zrna pšenice. Dizajn eksperimenta i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6., a korištena je metoda odzivnih površina.

**Tablica 6** Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih tvari ( $C_{UFT}$ ) u ekstraktima brašna pšenice dobivene pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta (temperatura  $T$ , otapalo  $\phi$  i vrijeme  $t$ ) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica).

| BROJ<br>EKSPERIMENTATA | Faktor $X_1$ ,<br>$T$ [°C] | Faktor<br>$X_2$ , $\phi$ [%] | Faktor $X_3$ ,<br>$t$ [min] | $C_{UFTPK}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $C_{UFTPČM}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $C_{UFTPB}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |
|------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1                      | 90                         | 60                           | 10                          | 3,45                                                   | 2,65                                                    | 2,65                                                   |
| 2                      | 60                         | 60                           | 40                          | 3,32                                                   | 2,53                                                    | 2,72                                                   |
| 3                      | 90                         | 30                           | 40                          | 1,36                                                   | 1,28                                                    | 1,10                                                   |
| 4                      | 60                         | 60                           | 40                          | 3,25                                                   | 2,58                                                    | 2,75                                                   |
| 5                      | 60                         | 30                           | 70                          | 2,36                                                   | 2,09                                                    | 2,25                                                   |
| 6                      | 30                         | 30                           | 40                          | 1,63                                                   | 1,41                                                    | 1,76                                                   |
| 7                      | 60                         | 60                           | 40                          | 3,19                                                   | 2,61                                                    | 2,79                                                   |
| 8                      | 30                         | 60                           | 10                          | 2,29                                                   | 2,01                                                    | 2,19                                                   |
| 9                      | 90                         | 60                           | 70                          | 3,87                                                   | 3,51                                                    | 3,65                                                   |
| 10                     | 60                         | 30                           | 10                          | 1,72                                                   | 1,87                                                    | 2,15                                                   |
| 11                     | 90                         | 90                           | 40                          | 1,18                                                   | 1,07                                                    | 1,09                                                   |
| 12                     | 60                         | 90                           | 70                          | 1,21                                                   | 1,53                                                    | 1,11                                                   |
| 13                     | 30                         | 60                           | 70                          | 2,57                                                   | 2,27                                                    | 2,36                                                   |
| 14                     | 60                         | 90                           | 10                          | 0,85                                                   | 1,15                                                    | 0,80                                                   |
| 15                     | 30                         | 90                           | 40                          | 0,45                                                   | 0,62                                                    | 0,48                                                   |



**Tablica 7** Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih flavonoida ( $C_{UFL}$ ) u ekstraktima brašna pšenice dobivene pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta (temperatura  $T$ , otapalo  $\phi$  i vrijeme  $t$ ) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica).

| BROJ<br>EKSPERIMENTATA | Faktor $X_1$ ,<br>$T$ [°C] | Faktor<br>$X_2$ , $\phi$ [%] | Faktor $X_3$ ,<br>$t$ [min] | $C_{UFLPK}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $C_{UFLPČM}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $C_{UFLPB}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |
|------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1                      | 90                         | 60                           | 10                          | 0,20                                                  | 0,15                                                   | 0,17                                                  |
| 2                      | 60                         | 60                           | 40                          | 0,19                                                  | 0,19                                                   | 0,21                                                  |
| 3                      | 90                         | 30                           | 40                          | 0,06                                                  | 0,09                                                   | 0,06                                                  |
| 4                      | 60                         | 60                           | 40                          | 0,18                                                  | 0,19                                                   | 0,20                                                  |
| 5                      | 60                         | 30                           | 70                          | 0,07                                                  | 0,08                                                   | 0,08                                                  |
| 6                      | 30                         | 30                           | 40                          | 0,07                                                  | 0,06                                                   | 0,06                                                  |
| 7                      | 60                         | 60                           | 40                          | 0,17                                                  | 0,17                                                   | 0,19                                                  |
| 8                      | 30                         | 60                           | 10                          | 0,22                                                  | 0,18                                                   | 0,20                                                  |
| 9                      | 90                         | 60                           | 70                          | 0,20                                                  | 0,26                                                   | 0,25                                                  |
| 10                     | 60                         | 30                           | 10                          | 0,05                                                  | 0,11                                                   | 0,11                                                  |
| 11                     | 90                         | 90                           | 40                          | 1,61                                                  | 1,64                                                   | 1,83                                                  |
| 12                     | 60                         | 90                           | 70                          | 2,46                                                  | 2,19                                                   | 2,84                                                  |
| 13                     | 30                         | 60                           | 70                          | 0,25                                                  | 0,22                                                   | 0,27                                                  |
| 14                     | 60                         | 90                           | 10                          | 2,42                                                  | 1,70                                                   | 2,62                                                  |
| 15                     | 30                         | 90                           | 40                          | 2,22                                                  | 2,05                                                   | 2,03                                                  |

#### 4.7. MODELIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (kvadratnim polinomom prema jednadžbi (9)) dobivena je odzivna funkcija odnosno funkcionalna ovisnost sadržaja ukupnih fenolnih tvari ( $Y_{UFT}$ ) i ukupnih flavonoida ( $Y_{UFL}$ ) o ispitivanim procesnim uvjetima i o njihovoj interakciji kako slijedi:

PK:

$$Y_{UFT} = 3,25 + 0,37 \cdot X_1 - 0,42 \cdot X_2 + 0,21 \cdot X_3 + 0,25 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,036 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,07 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,29 \cdot X_1^2 - 1,8 \cdot X_2^2 + 0,009 \cdot X_3^2 \quad (15)$$

$$Y_{UFL} = 0,18 - 0,085 \cdot X_1 + 1,06 \cdot X_2 + 0,012 \cdot X_3 - 0,15 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,009187 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,004927 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,11 \cdot X_1^2 + 0,92 \cdot X_2^2 + 0,15 \cdot X_3^2 \quad (16)$$

PČM:

$$Y_{\text{UFT}} = 2,58 - 0,27 \cdot X_1 - 0,29 \cdot X_2 + 0,21 \cdot X_3 + 0,14 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,15 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,04 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,27 \cdot X_1^2 - 1,21 \cdot X_2^2 + 0,3 \cdot X_3^2 \quad (17)$$

$$Y_{\text{UFL}} = 0,19 - 0,046 \cdot X_1 + 0,9 \cdot X_2 + 0,077 \cdot X_3 - 0,11 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,019 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,13 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,021 \cdot X_1^2 + 0,8 \cdot X_2^2 + 0,039 \cdot X_3^2 \quad (18)$$

PB:

$$Y_{\text{UFT}} = 2,76 + 0,21 \cdot X_1 - 0,47 \cdot X_2 + 0,2 \cdot X_3 + 0,32 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,21 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,054 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,26 \cdot X_1^2 - 1,39 \cdot X_2^2 + 0,21 \cdot X_3^2 \quad (19)$$

$$Y_{\text{UFL}} = 0,2 - 0,031 \cdot X_1 + 1,13 \cdot X_2 + 0,041 \cdot X_3 - 0,05 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,001225 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,064 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,2 \cdot X_1^2 + 0,99 \cdot X_2^2 + 0,22 \cdot X_3^2 \quad (20)$$

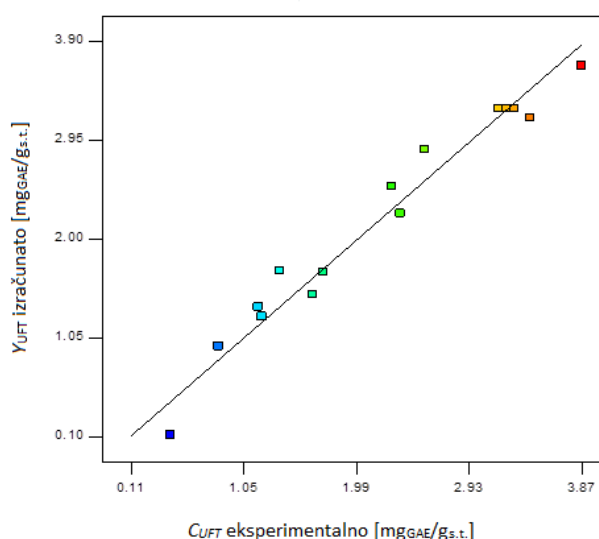
gdje je:  $Y$  - modelom predviđen maseni udio fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ],  
 $X_1$  – ispitivane temperature ekstrakcije [ $^{\circ}\text{C}$ ],  
 $X_2$  – ispitivani volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [% v/v],  
 $X_3$  – ispitivano vrijeme ekstrakcije [min].

**Tablica 8** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna pšenice Kutjevo d.d. (PK) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

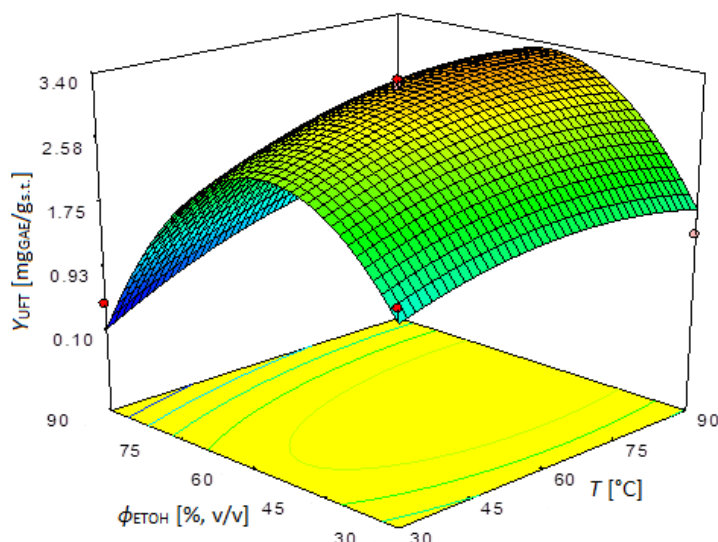
| IZVOR<br>VARIJABILNOSTI | SS       | df | MS       | F vrijednost        | Prob>F,<br>( $p < 0,05$ ) |
|-------------------------|----------|----|----------|---------------------|---------------------------|
| Model                   | 15,47    | 9  | 1,72     | 14,99 *             | 0,0041                    |
| $X_1$ -temperatura      | 1,07     | 1  | 1,07     | 9,32 *              | 0,0283                    |
| $X_2$ -otapalo          | 1,44     | 1  | 1,44     | 12,59 *             | 0,0164                    |
| $X_3$ -vrijeme          | 0,36     | 1  | 0,36     | 3,18 <sup>ns</sup>  | 0,1346                    |
| $X_1X_2$                | 0,25     | 1  | 0,25     | 2,18 <sup>ns</sup>  | 0,1999                    |
| $X_1X_3$                | 0,005292 | 1  | 0,005292 | 0,046 <sup>ns</sup> | 0,8384                    |
| $X_2X_3$                | 0,02     | 1  | 0,02     | 0,17 <sup>ns</sup>  | 0,6968                    |
| $X_1^2$                 | 0,32     | 1  | 0,32     | 2,75 <sup>ns</sup>  | 0,1582                    |
| $X_2^2$                 | 12,02    | 1  | 12,02    | 104,77 *            | 0,0002                    |
| $X_3^2$                 | 0,03     | 1  | 0,03     | 0,26 <sup>ns</sup>  | 0,6332                    |
| Ostatak                 | 0,57     | 5  | 0,11     |                     |                           |
| Nedostatak modela       | 0,57     | 3  | 0,19     | 44,34 *             | 0,0221                    |
| Pogreška                | 0,008497 | 2  | 0,004249 |                     |                           |
| Ukupno                  | 16,05    | 14 |          |                     |                           |
| $R^2$                   | 0,9643   |    |          |                     |                           |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 11** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari ( $C_{UFT}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFT}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Kutjevo d.d. (PK).



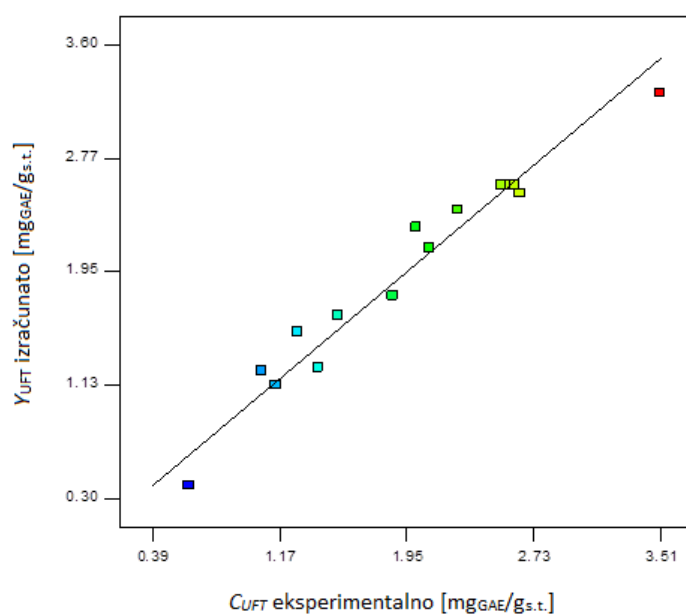
**Slika 12** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari ( $Y_{UFT}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Kutjevo d.d. (PK) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

**Tablica 9** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

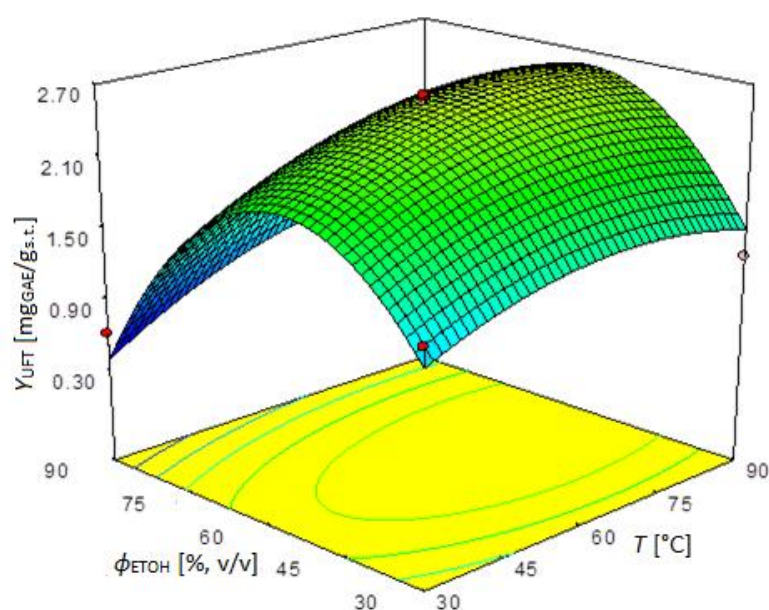
| IZVOR<br>VARIJABILNOSTI | SS       | df | MS       | F vrijednost        | Prob>F,<br>( $p < 0,05$ ) |
|-------------------------|----------|----|----------|---------------------|---------------------------|
| Model                   | 7,96     | 9  | 0,88     | 12,73 *             | 0,006                     |
| $X_1$ -temperatura      | 0,60     | 1  | 0,6      | 8,64 *              | 0,0323                    |
| $X_2$ -otapalo          | 0,65     | 1  | 0,65     | 9,36 *              | 0,0281                    |
| $X_3$ -vrijeme          | 0,37     | 1  | 0,37     | 5,30 <sup>ns</sup>  | 0,0697                    |
| $X_1X_2$                | 0,082    | 1  | 0,082    | 1,18 <sup>ns</sup>  | 0,3277                    |
| $X_1X_3$                | 0,092    | 1  | 0,092    | 1,32 <sup>ns</sup>  | 0,3024                    |
| $X_2X_3$                | 0,00656  | 1  | 0,00656  | 0,094 <sup>ns</sup> | 0,771                     |
| $X_1^2$                 | 0,26     | 1  | 0,26     | 3,79 <sup>ns</sup>  | 0,1092                    |
| $X_2^2$                 | 5,44     | 1  | 5,44     | 78,28 *             | 0,0003                    |
| $X_3^2$                 | 0,33     | 1  | 0,33     | 4,73 <sup>ns</sup>  | 0,0815                    |
| Ostatak                 | 0,35     | 5  | 0,069    |                     |                           |
| Nedostatak modela       | 0,34     | 3  | 0,11     | 60,8 *              | 0,0162                    |
| Pogreška                | 0,003767 | 2  | 0,001883 |                     |                           |
| Ukupno                  | 8,3      | 14 |          |                     |                           |
| $R^2$                   | 0,9582   |    |          |                     |                           |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 13** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari ( $C_{UFT}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFT}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM).



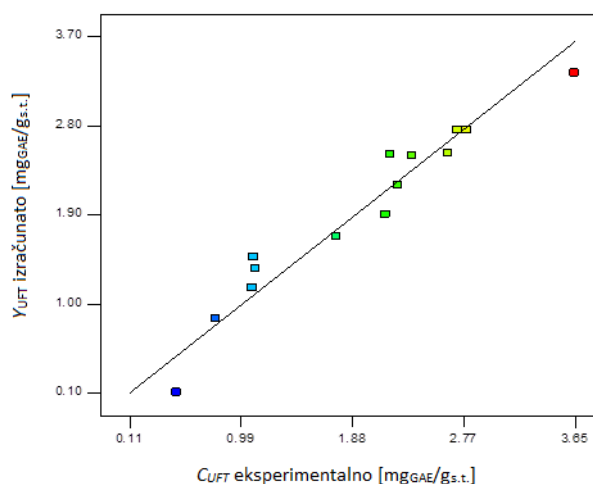
**Slika 14** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari ( $Y_{UFT}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

**Tablica 10** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna pšenice Belje (PB) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

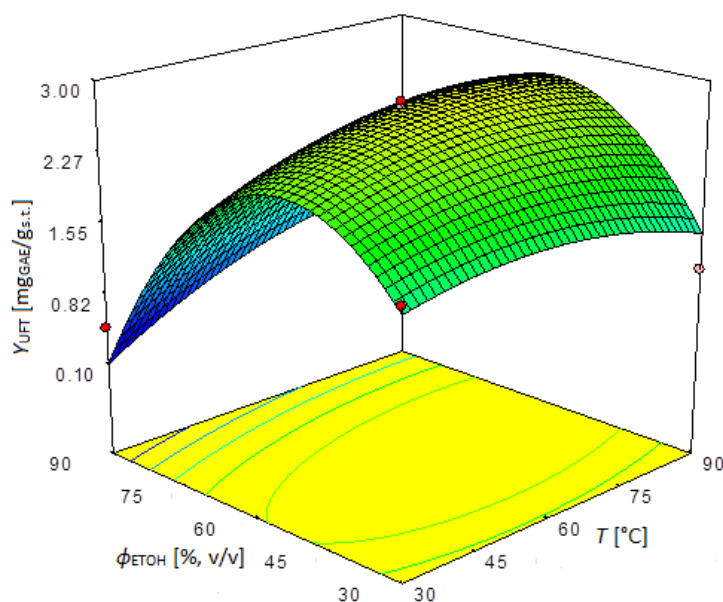
| IZVOR<br>VARIJABILNOSTI | SS       | df | MS       | F vrijednost        | Prob>F,<br>( $p < 0,05$ ) |
|-------------------------|----------|----|----------|---------------------|---------------------------|
| Model                   | 10,69    | 9  | 1,19     | 8,39 *              | 0,0133                    |
| $X_1$ -temperatura      | 0,36     | 1  | 0,36     | 2,71 <sup>ns</sup>  | 0,1606                    |
| $X_2$ -otapalo          | 1,77     | 1  | 1,77     | 13,35 *             | 0,0147                    |
| $X_3$ -vrijeme          | 0,32     | 1  | 0,32     | 2,39 <sup>ns</sup>  | 0,1825                    |
| $X_1X_2$                | 0,4      | 1  | 0,4      | 3,01 <sup>ns</sup>  | 0,1433                    |
| $X_1X_3$                | 0,17     | 1  | 0,17     | 1,30 <sup>ns</sup>  | 0,3063                    |
| $X_2X_3$                | 0,012    | 1  | 0,012    | 0,089 <sup>ns</sup> | 0,7772                    |
| $X_1^2$                 | 0,24     | 1  | 0,24     | 1,83 <sup>ns</sup>  | 0,234                     |
| $X_2^2$                 | 7,16     | 1  | 7,16     | 53,82 *             | 0,0007                    |
| $X_3^2$                 | 0,17     | 1  | 0,17     | 1,28 <sup>ns</sup>  | 0,31                      |
| Ostatak                 | 0,66     | 5  | 0,13     |                     |                           |
| Nedostatak modela       | 0,66     | 3  | 0,22     | 169,89 *            | 0,0059                    |
| Pogreška                | 0,002598 | 2  | 0,001299 |                     |                           |
| Ukupno                  | 11,35    | 14 |          |                     |                           |
| $R^2$                   | 0,9414   |    |          |                     |                           |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 15** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari ( $C_{UFT}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFT}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Belje (PB).



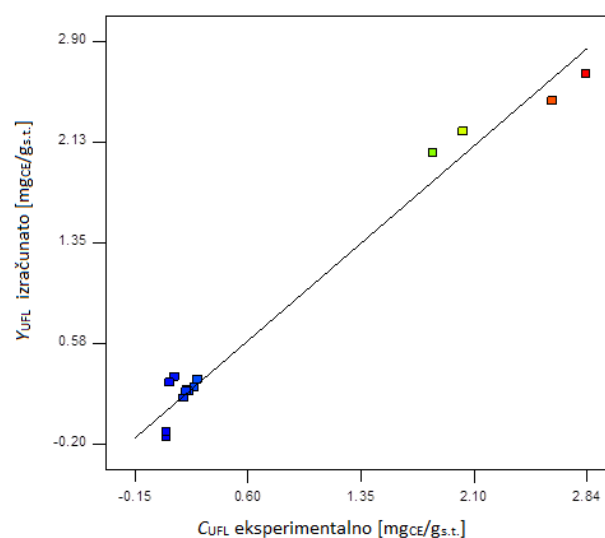
**Slika 16** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari ( $Y_{UFT}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Belje (PB) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

**Tablica 11** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice Kutjevo d.d (PK) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

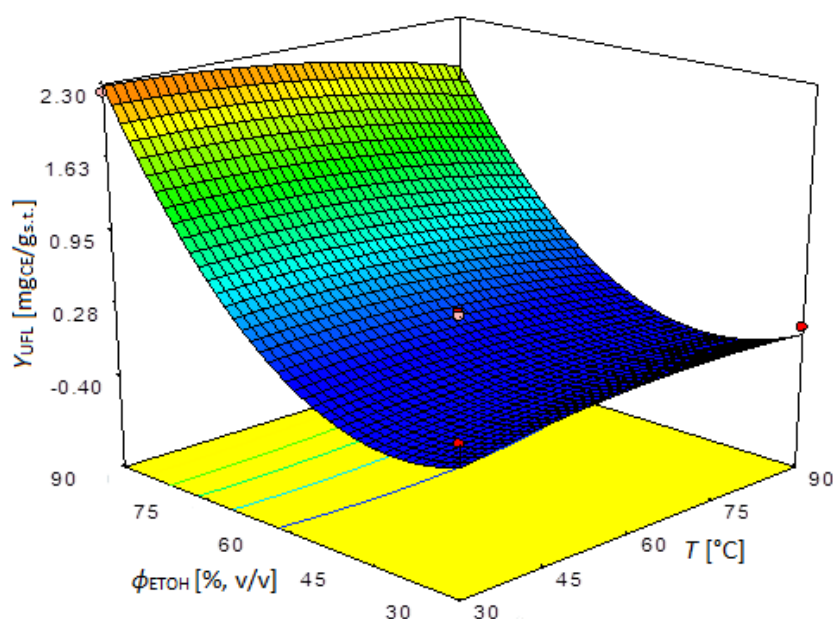
| IZVOR VARIJABILNOSTI | SS         | df | MS         | F vrijednost           | Prob>F, ( $p<0,05$ ) |
|----------------------|------------|----|------------|------------------------|----------------------|
| Model                | 12,36      | 9  | 1,37       | 38,14 *                | 0,0004               |
| $X_1$ -temperatura   | 0,058      | 1  | 0,058      | 1,62 <sup>ns</sup>     | 0,2589               |
| $X_2$ -otapalo       | 8,93       | 1  | 8,93       | 247,95 *               | <0,0001              |
| $X_3$ -vrijeme       | 0,001097   | 1  | 0,001097   | 0,03 <sup>ns</sup>     | 0,8683               |
| $X_1X_2$             | 0,089      | 1  | 0,089      | 2,48 <sup>ns</sup>     | 0,1759               |
| $X_1X_3$             | 0,0003376  | 1  | 0,0003376  | 0,009373 <sup>ns</sup> | 0,9266               |
| $X_2X_3$             | 0,00009709 | 1  | 0,00009709 | 0,002696 <sup>ns</sup> | 0,9606               |
| $X_1^2$              | 0,045      | 1  | 0,045      | 1,25 <sup>ns</sup>     | 0,3145               |
| $X_2^2$              | 3,13       | 1  | 3,13       | 86,94 *                | 0,0002               |
| $X_3^2$              | 0,081      | 1  | 0,081      | 2,25 <sup>ns</sup>     | 0,194                |
| Ostatak              | 0,18       | 5  | 0,036      |                        |                      |
| Nedostatak modela    | 0,18       | 3  | 0,06       | 288,17 *               | 0,0035               |
| Pogreška             | 0,0004157  | 2  | 0,0002078  |                        |                      |
| Ukupno               | 12,54      | 14 |            |                        |                      |
| $R^2$                | 0,985614   |    |            |                        |                      |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 17** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida ( $C_{UFL}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFL}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Kutjevo d.d. (PK).



**Slika 18** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida ( $Y_{UFL}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Kutjevo (PK) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

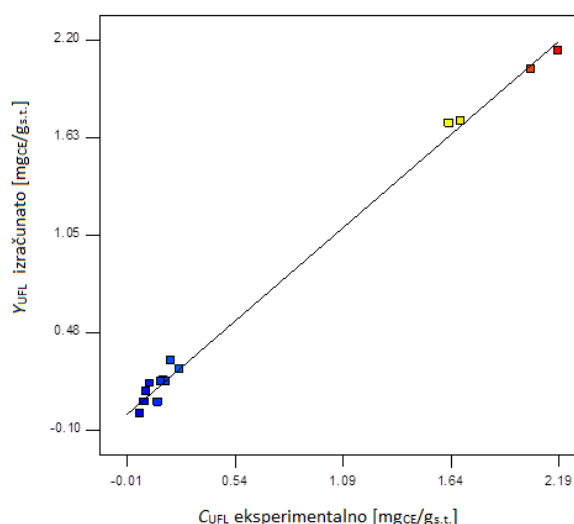


**Tablica 12** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

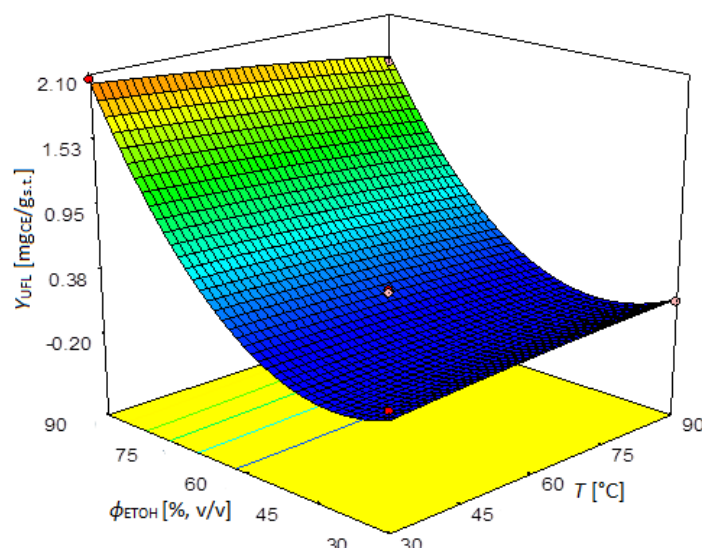
| IZVOR<br>VARIJABILNOSTI | SS       | df | MS        | F vrijednost       | Prob>F,<br>( $p < 0,05$ ) |
|-------------------------|----------|----|-----------|--------------------|---------------------------|
| Model                   | 9,09     | 9  | 1,01      | 137,62 *           | <0,0001                   |
| $X_1$ -temperatura      | 0,017    | 1  | 0,017     | 2,34 <sup>ns</sup> | 0,1864                    |
| $X_2$ -otapalo          | 6,53     | 1  | 6,53      | 890,49 *           | <0,0001                   |
| $X_3$ -vrijeme          | 0,047    | 1  | 0,047     | 6,42 <sup>ns</sup> | 0,0523                    |
| $X_1X_2$                | 0,05     | 1  | 0,05      | 6,77 *             | 0,0481                    |
| $X_1X_3$                | 0,001398 | 1  | 0,001398  | 0,19 <sup>ns</sup> | 0,6806                    |
| $X_2X_3$                | 0,069    | 1  | 0,069     | 9,36 *             | 0,0281                    |
| $X_1^2$                 | 0,001602 | 1  | 0,001602  | 0,22 <sup>ns</sup> | 0,6599                    |
| $X_2^2$                 | 2,34     | 1  | 2,34      | 319,44 *           | <0,0001                   |
| $X_3^2$                 | 0,005613 | 1  | 0,005613  | 0,77 <sup>ns</sup> | 0,4217                    |
| Ostatak                 | 0,037    | 5  | 0,007335  |                    |                           |
| Nedostatak modela       | 0,036    | 3  | 0,012     | 50,38 *            | 0,0195                    |
| Pogreška                | 0,000479 | 2  | 0,0002395 |                    |                           |
| Ukupno                  | 9,12     | 14 |           |                    |                           |
| $R^2$                   | 0,9960   |    |           |                    |                           |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 19** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida ( $C_{UFL}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFL}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM).



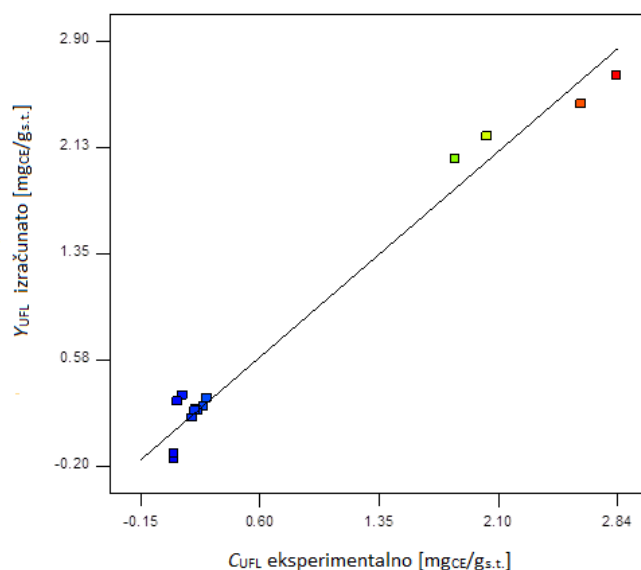
**Slika 20** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida ( $Y_{UFL}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Čakovečki mlinovi (PČM) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

**Tablica 13** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice Belje (PB) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

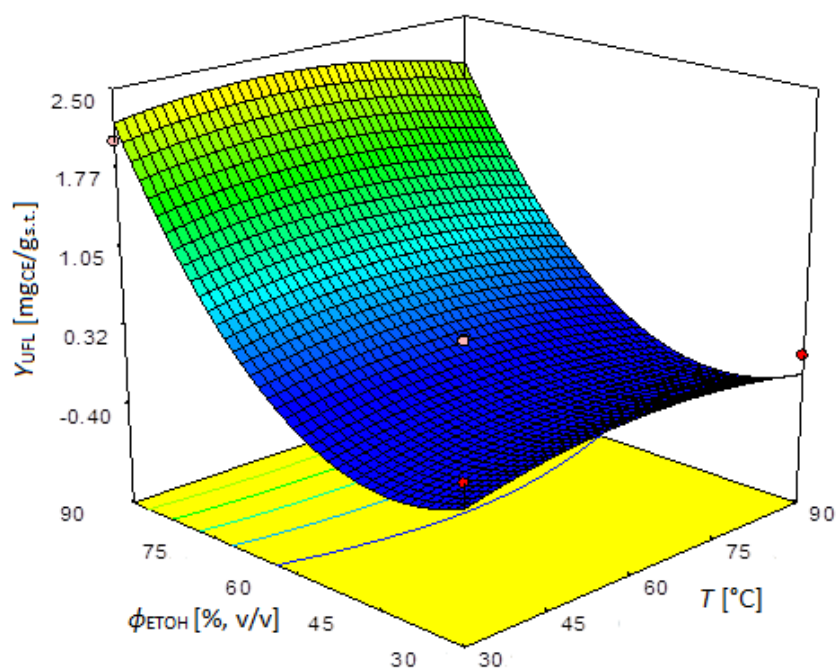
| IZVOR<br>VARIJABILNOSTI | <i>SS</i>   | <i>df</i> | <i>MS</i>   | <i>F</i> vrijednost       | Prob> <i>F</i> ,<br>( <i>p</i> <0,05) |
|-------------------------|-------------|-----------|-------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Model                   | 14,23       | 9         | 1,58        | 26,74 *                   | 0,001                                 |
| $X_1$ -temperatura      | 0,007563    | 1         | 0,007563    | 0,13 <sup>ns</sup>        | 0,7352                                |
| $X_2$ -otapalo          | 10,14       | 1         | 10,14       | 171,56 *                  | <0,0001                               |
| $X_3$ -vrijeme          | 0,014       | 1         | 0,014       | 0,23 <sup>ns</sup>        | 0,6511                                |
| $X_1X_2$                | 0,01        | 1         | 0,01        | 0,17 <sup>ns</sup>        | 0,6957                                |
| $X_1X_3$                | 0,000005998 | 1         | 0,000005998 | 0,000101519 <sup>ns</sup> | 0,9924                                |
| $X_2X_3$                | 0,016       | 1         | 0,016       | 0,27                      | 0,6224                                |
| $X_1^2$                 | 0,15        | 1         | 0,15        | 2,48 <sup>ns</sup>        | 0,1763                                |
| $X_2^2$                 | 3,65        | 1         | 3,65        | 61,83 *                   | 0,0005                                |
| $X_3^2$                 | 0,18        | 1         | 0,18        | 3,09 <sup>ns</sup>        | 0,1392                                |
| Ostatak                 | 0,3         | 5         | 0,059       |                           |                                       |
| Nedostatak modela       | 0,3         | 3         | 0,098       | 1732,91 *                 | 0,0006                                |
| Pogreška                | 0,0001137   | 2         | 0,00005683  |                           |                                       |
| Ukupno                  | 14,52       | 14        |             |                           |                                       |
| $R^2$                   | 0,9797      |           |             |                           |                                       |

*SS* – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df* – stupnjevi slobode; *MS* – varijanca

\*utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p = 0,05$ ; ns – utjecaj faktora nije statistički značajan



**Slika 21** Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida ( $C_{UFL}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFL}$ ) prema aproksimacijskom modelu, tj. kvadratnom polinomu za ekstrakte brašna cjelovitog zrna pšenice Belje (PB).



**Slika 22** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida ( $Y_{UFL}$ ) ekstrakata brašna cjelovitog zrna pšenice Belje (PB) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije ( $T$ ) i koncentraciji etanola ( $\phi$ ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 40 minuta.

#### 4.8. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE FENOLA I FLAVONOIDA

Numerička optimizacija procesa je provedena (pomoću programa Design Expert 7.1.6.) da bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna za ispitivano eksperimentalno područje. Iako je dobiveno više mogućih rješenja (kombinacija ispitivanih varijabli) odabrani su procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (eng. Desirability), kao kriterij za optimalno provođenje procesa bio bliže vrijednosti 1. U **Tablici 14** prikazane su optimalne vrijednosti ekstrakcije za ukupne fenolne tvari uz poželjnost 0,96, a u **Tablici 15** ukupne flavonoide uz poželjnost 0,98.

**Tablica 14** Numerička optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari

| $T$<br>[°C] | $\phi_{\text{ETOH}}$<br>[% v/v] | $t$<br>[min] | $Y_{\text{PK}}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $Y_{\text{PČM}}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $Y_{\text{PB}}$<br>[mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | Poželjnost |
|-------------|---------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| 83          | 58                              | 70           | 3,87                                                       | 3,51                                                        | 3,65                                                       | 0,96       |

**Tablica 15** Numerička optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida

| $T$<br>[°C] | $\phi_{\text{ETOH}}$<br>[% v/v] | $t$<br>[min] | $Y_{\text{PK}}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $Y_{\text{PČM}}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | $Y_{\text{PB}}$<br>[mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] | Poželjnost |
|-------------|---------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|
| 44          | 90                              | 70           | 2,46                                                      | 2,19                                                       | 2,84                                                      | 0,98       |

#### 4.9. EKSTRAKCIJA PRI OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJE ODREĐENIH RSM-om

Ekstrakcija je provedena pomoću vodene kupelji i univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi-LSV, metodom ekstrakcije standard Soxhlet pri izračunatim optimalnim uvjetima, da bi se provjerila uspješnost optimiranja RSM-om.

#### 4.9.1. Ekstrakcija u vodenoj kupelji

Rezultati ekstrakcije (pri optimalnim uvjetima) u vodenoj kupelji su prikazani u **Tablicama 16 i 17.**

**Tablica 16** Maseni udio ukupnih fenolnih tvari (pri optimalnim uvjetima) određen ekstrakcijom u vodenoj kupelji

| UZORAK | $m_{uz}$ [g] | $T$ [°C] | $\phi_{ETOH}$ [%] | $t$ [min] | $C_{sr}$ [mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |
|--------|--------------|----------|-------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| PK     | 1,5          | 83       | 58                | 70        | 3,67                                             |
| PČM    | 1,5          | 83       | 58                | 70        | 3,33                                             |
| PB     | 1,5          | 83       | 30                | 70        | 3,41                                             |

**Tablica 17** Maseni udio ukupnih flavonoida (pri optimalnim uvjetima) određen ekstrakcijom u vodenoj kupelji

| UZORAK | $m_{uz}$ [g] | $T$ [°C] | $\phi_{ETOH}$ [%] | $t$ [min] | $C_{sr}$ [mg <sub>CE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |
|--------|--------------|----------|-------------------|-----------|-------------------------------------------------|
| PK     | 1,5          | 44       | 90                | 70        | 2,36                                            |
| PČM    | 1,5          | 44       | 90                | 70        | 2,55                                            |
| PB     | 1,5          | 44       | 90                | 70        | 2,65                                            |

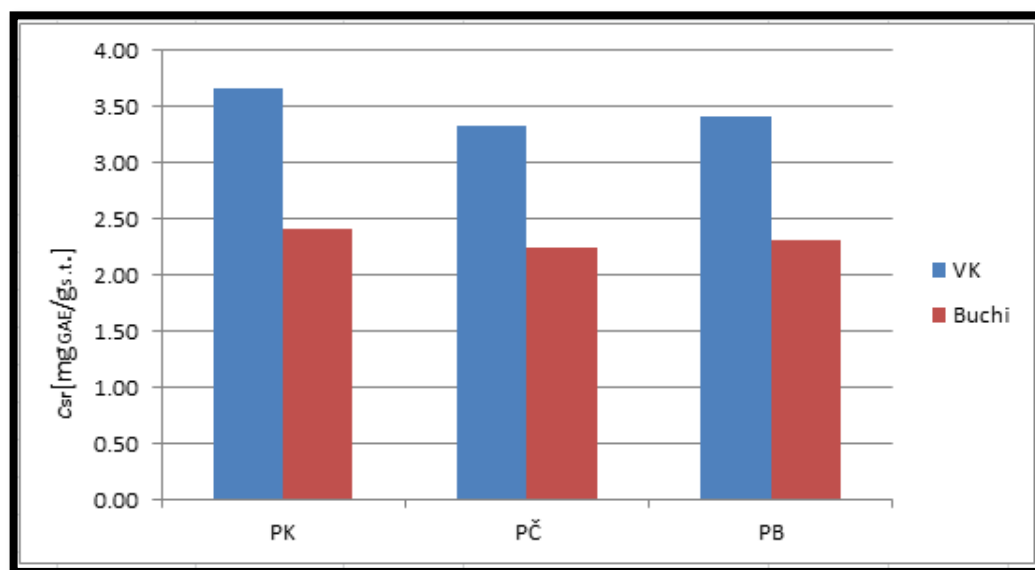
#### 4.9.2. Ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju

Rezultati ekstrakcije na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi LSV, metodom standard Soxhlet pri optimalnim uvjetima (**Tablica 18 i 19**).

**Tablica 18** Maseni udio ukupnih fenolnih tvari, određen metodom standard Soxhlet, pri optimalnim uvjetima

| UZORAK | $m_{uz}$ [g] | $\phi_{ETOH}$ [%] | $t$ [min] | $C_{sr}$ [mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.t.</sub> ] |
|--------|--------------|-------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| PK     | 7,5          | 58                | 70        | 2,42                                             |
| PČM    | 7,5          | 58                | 70        | 2,24                                             |
| PB     | 7,5          | 58                | 70        | 2,32                                             |

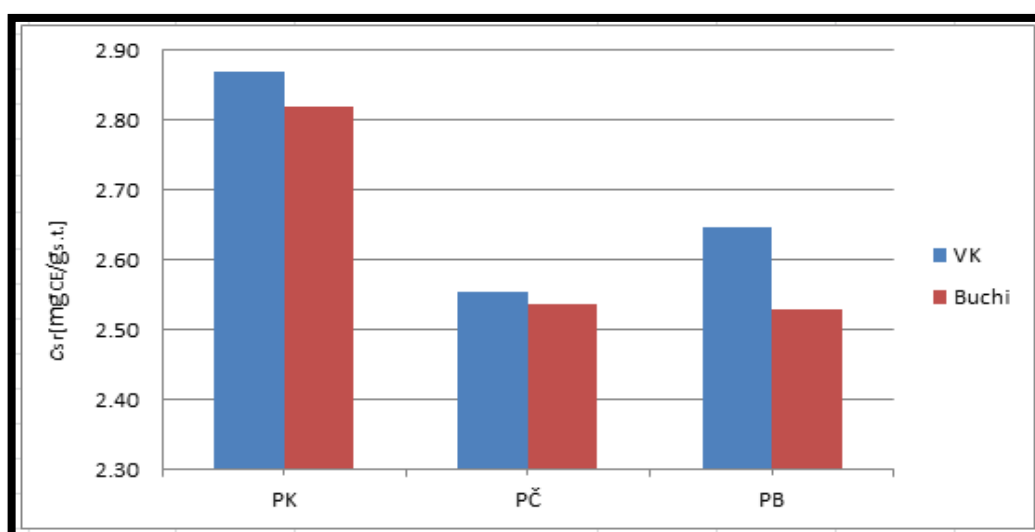
Usporedba rezultata dobivenih ekstrakcijom vodenom kupelji i standard Soxhlet metodom su prikazani na **Slici 23 i 24**.



**Slika 23** Ekstrakcija ukupnih fenolnih tvari vodenom kupelji (VK) i metodom standard Soxhlet (Buchi)

**Tablica 19** Maseni udio ukupnih flavonoida, određen metodom standard Soxhlet, pri optimalnim uvjetima

| UZORAK | $m_{uz}[g]$ | $\phi_{ETOH}[\%]$ | $t [min]$ | $C_{sr} [mg_{CE}/g_{s.t.}]$ |
|--------|-------------|-------------------|-----------|-----------------------------|
| PK     | 7,5         | 90                | 70        | 2,82                        |
| PČM    | 7,5         | 90                | 70        | 2,54                        |
| PB     | 7,5         | 90                | 70        | 2,53                        |



**Slika 24** Ekstrakcija ukupnih flavonoida vodenom kupelji (VK) i metodom standard Soxhlet (Buchi)

## **5. RASPRAVA**

Učinkovitost procesa ekstrakcije značajno ovisi o brojnim procesnim parametrima koji mogu djelovati nezavisno ili zavisno. Za određivanje optimalnih procesnih parametara nekog procesa potrebno je provoditi veliki broj eksperimenata u svim mogućim kombinacijama ispitivanih parametara. Metoda odzivnih površina (kao skup matematičkih i statističkih tehnika) se pokazala kao koristan alat u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa uz smanjen broj eksperimenata. Ovom metodom je omogućeno planiranje pokusa odnosno provedba samo nekih eksperimenata određenih kombinacija procesnih parametara na osnovu kojih je moguće odrediti optimalne parametre procesa uz ekonomsku i energetska uštedu (Carley i sur., 2004).

U ovome radu planiranje pokusa, statistička obrada dobivenih podataka i određivanje optimalnih uvjeta u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 7.1.6. Korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

U tablicama i dijagramima su prikazani (prema primjenjenom matematičkom modelu) svi eksperimentalno određeni i izračunati podaci.

Prosječna veličina čestica za uzorke PK, PČM i PB iznosila je kako slijedi: 0,016; 0,017 i 0,016 cm što je uz standardnu devijaciju, površinu čestica i broj čestica po gramu za sva tri uzorka prikazano u **Tablici 3**. Suha tvar pšeničnog brašna svih ispitivanih uzoraka je iznosila za PK 87,955 %, PČM 88,38 %, PB 89,53 % (**Tablica 7**).

Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija koje su prikazane u **Tablicama 4 i 5** dobivenih spektroskopijskim mjerenjem pomoću regresijskih jednadžbi (**10-13**) dobivenih iz kalibracijskih krivulja (**Slike 9 i 10**), izračunate su masene koncentracije fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ], a za ukupne flavonoide [ $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$ ] u ekvivalentima (+) -katehina. Konačni sadržaj fenolnih tvari je izražen kao maseni udio fenolnih tvari prema jednadžbi (**14**) odnosno u ekvivalentima galne kiseline (katehina) po masi suhe tvari uzorka.

Rasponi masenih udjela fenolnih tvari i flavonoida (dobiveni eksperimentalnim putem) su prikazani u **Tablicama 6 i 7**. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna pšenice se kretao u rasponu od 0,45 do 3,87  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PK; od 0,45 do 3,87  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PČM; od 0,62 do 3,51  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  i za uzorak PB; od 0,48 do 3,65  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ . Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice se kretao u rasponu od 0,06 do



2,84 mg<sub>CE</sub>/ g<sub>s.t.</sub>, za uzorak PK; od 0,06 do 2,46 mg<sub>CE</sub>/ g<sub>s.t.</sub>, za uzorak PČM; od 0,06 do 2,19 mg<sub>CE</sub>/ g<sub>s.t.</sub> i za uzorak PB; od 0,06 do 2,84 mg<sub>CE</sub>/ g<sub>s.t.</sub>.

Da bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli i njihove interakcije (temperature, vrijeme, otapalo) na zavisnu varijablu (prinos fenolnih tvari) te provjerila prikladnost primjenjenog Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema jednadžbi (9). Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkim modelom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka. Model daje funkcionalnu ovisnost između zavisnih i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju između ispitivanih varijabli.

Model koji je najprihvatljiviji je određen na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenata determinacije ( $R^2$ ). Ovaj koeficijent je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Za eksperimentalne uvjete ovoga rada utvrđeno je da je to kvadratni polinom prikazan jednadžbama 15-20 sa  $R^2 > 0,94$  za ukupne flavonoide i fenolne tvari. Slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka prikazuju i **Slike 11, 13, 15, 17, 19 i 21**. Često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano područje. Zbog toga je uz koeficijent korelacije provedena i detaljna statistička analiza (ANOVA) na osnovi koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su vrijednosti "Prob > F" za određene članove odzivnog polinoma je manje od 0,05 ( $p$ -vrijednost), onda su ti članovi značajni. To znači da je vjerojatnost (eng. Probability) dobivanja tako velike F vrijednosti uslijed šuma, manja od 5% (Bezerra i sur., 2008.).

Statističkom analizom (**ANOVA**) utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti masenih udjela fenolnih tvari (**Tablice 8-10**) i masenih udjela flavonoida (**Tablice 11-13**) u ekstraktima svih ispitivanih uzoraka pšenice (kvadratnim polinomom) statistički značajna. Prema tome je utvrđeno da je navedeni model prikladan za opisivanje procesa ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida u provedenim eksperimentalnim uvjetima.

Iz **Tablica 8-13** za statističku analizu (**ANOVA**) se vidi da je koncentracija otapala, kao linearni i kao kvadratni član, imala najveći utjecaj na učinkovitost ekstrakcije kod svih uzoraka ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida. Kod uzoraka PK i PČM (kod fenola) je utjecala i

temperatura kao individualan parametar, a kod uzorka PČM (kod flavonoida) je imalo utjecaja i otapalo u interakciji s temperaturom te otapalo u interakciji s vremenom.

**Slike 11-22** predstavljaju 3D dijagram odzivne površine. Odzivna površina predstavlja modelom predviđene masene udjele ukupnih fenolnih tvari (**Slike 12, 14 i 16**) za ispitivane kombinacije otapala i temperature pri konstantnom vremenu od 40 minuta ekstrakcije (vrijeme nije imalo statistički značajan utjecaja na proces ekstrakcije). Iz dijagrama je vidljivo da porastom temperature raste udio ukupnih fenolnih tvari, a porastom koncentracije otapala raste ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari do neke maksimalne vrijednosti te potom opada. Porastom koncentracije etanola i porastom temperature povećao se maseni udio flavonoida (**Slike 18, 20 i 22**).

Numeričkom optimizacijom (programom Design Expert 7.1.6.) izračunati su optimalni uvjeti ekstrakcije za ispitivano eksperimentalno područje pri kojima je moguće dobiti maksimalan prinos ukupnih fenolnih tvari. Izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz svih uzoraka brašna uz poželjnost 0,96 su: temperatura 83 °C, vrijeme 70 min i otapalo 58 % etanola pri čemu bi se ekstrahiralo 3,7 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PK; 3,26 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PČM; 3,35 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> te za uzorak PB (**Tablica 14**). Za ukupne flavonoide, izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije uz poželjnost 0,984 su: temperatura 44 °C, vrijeme 70 min i otapalo 90 % etanola pri čemu bi se ekstrahiralo 2,42 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PK; 2,2 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PČM; 2,63 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PB (**Tablica 15**).

U drugom dijelu eksperimentalnog rada, ekstrakcija je provedena pri optimalnim uvjetima zbog provjere uspješnosti optimiranja primjenjenom metodom. Nakon provedene ekstrakcije u vodenoj kupelji, pri optimalnim uvjetima, dobiveni su sljedeći prinosi ukupnih fenolnih tvari (**Tablica 16**): 3,67 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PK; 3,33 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PČM; 3,41 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PB te za flavonoide (**Tablica 17**): 2,36 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PK; 2,55 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PČM i 2,65 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PB. Rezultati pokazuju da polinom drugog reda dobro opisuje ekstrakciju fenolnih tvari i flavonoida te da je Box-Behnken dizajn (eksperimentalni plan) dobro postavljen.

Ekstrakcija je provedena i na univerzalnom sustavu na ekstrakciju (Büchi-LSV) s ciljem prevođenja ekstrakcije u veće mjerilo. Ekstrakcija je provedena standardnom Soxhlet metodom (**Tablica 18 i 19**) pri čemu je prinos ukupnih fenolnih tvari bio za uzorke: PK 2,42 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, PČM 2,24 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, PB 2,32 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, a flavonoida: za PK 2,82 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, za PČM

2,54 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> i 2,53 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PB. Usporedbom rezultata dobivenih na univerzalnom sredstvu (Büchi-LSV) i u vodenom kupelji vidljivo je da su općenito veće vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (**Slika 23**) i ukupnih flavonoida (**Slika 24**) postignute pri ekstrakciji u vodenoj kupelji. Pretpostavka je da navedene razlike postoje zbog različitosti u principu metode kruto-tekuće ekstrakcije, različitom mjerilu i automatiziranosti univerzalnog sustava za ekstrakciju.

Ipak relativno zadovoljavajuća ponovljivost rezultata i u većem mjerilu pokazuje da je optimiranje procesa ekstrakcije metodom odzivnih površina prikladno za ispitivani proces, a metoda odzivnih površina osigurava pronalažanje optimalnih uvjeta procesa uz ekonomsko-energetsku uštedu i minimalan broj eksperimenata.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima brašna pšenice pri ispitivanju ispitivanim uvjetima se kretao u rasponu od 0,45 do 3,87  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PK; od 0,45 do 3,87  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PČM; od 0,62 do 3,51  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  i za uzorak PB; od 0,48 do 3,65  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .
2. Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima brašna pšenice se kretao u rasponu od 0,06 do 2,84  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PK; od 0,06 do 2,46  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , za uzorak PČM; od 0,06 do 2,19  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  i za uzorak PB; od 0,06 do 2,84  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .
3. Rezultati ispitivanja RSM metodom pokazuju da je koncentracija otapala, kao linearni te kvadratni član, imala najveći utjecaj na učinkovitost ekstrakcije kod svih uzoraka ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida. Temperatura je imala utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola kao individualan parametar za uzorke. Kod uzoraka PK i PČM dok je u slučaju ekstrakcije flavonoida temperatura u interakciji s otapalom te otapalo u interakciji s vremenom imalo utjecaja kod uzoraka PČM.
4. Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz svih uzoraka brašna pšenice uz poželjnost 0,96 su: Temperatura 83 °C, vrijeme 70 min i otapalo 58 % etanola. Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz svih uzoraka brašna pšenice uz poželjnost 0,984 su: temperatura 44 °C, vrijeme 70 min i otapalo 90 % etanola.
5. Porastom temperature raste udio ukupnih fenolnih tvari. Porastom koncentracije otapala do neke maksimalne vrijednosti raste ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, a potom opada. Kod flavonoida je uočeno da se porastom temperature i porastom koncentracije etanola povećao maseni udio flavonoida.
6. Ekstrakcijom u vodenoj kupelji pri (optimalnim uvjetima) maseni udio fenolnih tvari iznosi 3,87  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za uzorak PK, 3,53  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za PČM, 3,65  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za PB.
7. Ekstrakcijom u vodenoj kupelji pri (optimalnim uvjetima) maseni udio flavonoida iznosi 2,46  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za uzorak PK, 2,19  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za PČM, 2,84  $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  za PB.

8. Ekstrakcijom na univerzalnom aparatu za ekstrakciju (pri optimalnim uvjetima) metodom Soxhlet standard dobiveni su sljedeći rezultati za fenolne tvari: PK 2,42 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, PČM 2,24 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, PB 2,32 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>
9. Ekstrakcijom na univerzalnom aparatu za ekstrakciju (pri optimalnim uvjetima) metodom Soxhlet standard dobiveni su sljedeći rezultati za flavonoide: za PK 2,82 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, za PČM 2,54 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> i 2,53 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub> za uzorak PB.
10. Razlike u rezultatima ekstrakcije u vodenoj kupelji i univerzalnom sustavu za ekstrakciju Buchi (B-811 LSV) posljedica su razlika u principu metode kruto-tekuće ekstrakcije, različitom mjerilu i automatiziranosti sustava za ekstrakciju.
11. Ispitivani matematički model (kvadratni polinom) je pokazao dobra slaganja eksperimentalnih vrijednosti s aproksimiranim vrijednostima masenih udjela ukupnih ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida i visok stupanj determinacije ( $R^2 > 0,94$ ). To znači da se ovaj model može primjeniti za opisivanje ekstrakcije kruto-tekuće ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz brašna.
12. Metoda odzivnih površina se pokazala kao učinkovita metoda za pronalažanje optimalnih uvjeta procesa uz minimalan broj eksperimenata.



## **7. LITERATURA**



- Arendt E K, Zannini E: Cereal Grains for the Food and Beverage Industries: Wheat and other Triticum grains. *Food science, Technology and nutrition*. 1-66, 67e, 2013.
- Babić J, Strelec I, Jozinović A: *Katalog opreme*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Baker S, Herrman T: Evaluating particle size. *Feed manufacturing*, 2051. Kansas State University, Manhattan, 2002.
- Balasundram N, Sundram K, Samman: Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity occurrence and potential uses. *Food Chemistry* 99(1): 191-203, 2006.
- Bezzera M, Santelli R, Oliveira E, Villar L, Escaleira L: Responce surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76(5): 965-977, 2008.
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
- Carley K M, Kamneva N Y, Reminga J: *Response surface methodology – CASOS Technical Report*. CMU-ISRI-04-136, 2004. <http://reports-archive.adm.cs.cmu.edu/anon/isri2004/CMU-ISRI-04-136.pdf> [15. 08. 2016.]
- Cram D J, Hammond G S: Fenolne tvari. U *Organska kemija*, str. 59-767. Školska knjiga, Zagreb, 1973.
- Čačić-Kenjerić D: *Funkcionalna hrana i dodaci u prehrani*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Radojčić Redovniković I, Lončarić S: *Biološki aktivne komponente u hrani i mehanizmi djelovanja*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2009.
- Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E: Extraction Techniques for the Determination of Phenolic compounds in Food. *Institute of Food Science Research (CIAL-CSIC)*, (4): 159-180, 2012.
- Hung P V, Maeda T, Miyatake K, Morita N: Total phenolic compound and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 42(1): 185-190, 2009.
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje: *Pšenica*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2016. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=50972> [08. 08. 2016.]
- Ilustrirani hrvatsko-englesko kemijski riječnik & glosar: *Spektrofotometrija*, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2016. <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektrofotometrija> [14. 08. 2016.]

- Ismail T, Sestili P, Akhtar S: Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal in Ethnopharmacology*, 143(2): 397-405, 2012.
- Jakobek L: *Instrumentalne metode analize*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Jerković I, Radonić A: *Praktikum iz organske kemije*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
- Jokić S: *Projektiranje uređaja u procesnoj industriji*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.  
[http://studenti.ptfos.hr/Diplomski\\_studij/Projektiranje\\_uredjaja\\_procesne\\_industrije/Ekstrakcija\\_%202016.pdf](http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Projektiranje_uredjaja_procesne_industrije/Ekstrakcija_%202016.pdf) [20. 08. 2016.]
- Komljenović I, Todorović J: *Ratarsko-povrtarski priručnik*. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2009.
- Klepacka J, Gujska E, Michalak J: Phenolic Compounds as Cultivar- and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products. *Plant food for human*, 66(1): 64-69, 2011.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*, 93(1): 47-56, 2005.
- Luthria D L, Lu Y, John K M M: Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing and functional properties. *Journal of Functional Food*, 18B: 910-925, 2015.
- Mindell E: Fenolne tvari i flavonoidi. U *Hrana kao lijek*, str. 13-17. Mozaik knjiga, Zagreb, 1998.
- Mujić I: *Ekstrakcija i ekstraktori biljnih materijala*. Biotehnički fakultet, Bihać, 2006.
- Naczk M, Shahidi F: Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 1523-1542, 2006.
- Pavel S, Klejdus B, Kuban V: Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables-Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3): 607-616, 2006.
- Perez-Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Diaz-Rubio M E, Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F: Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant: Extraction, measurement and expression of results., *Food research international*, 41(3): 274-285, 2008.
- Planinić M, Bucić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. U *Proceedings of International Congress FLOUR-BREAD '03 and 4.Croatian Congress of Cereal*. Faculty of Food Technology, Osijek, 2004.
- Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji*, 58(3): 121-128, 2009.

- Šeruga M: *Kolorimetrija*. Laboratorijske vježbe iz fizikalne kemije, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 1988.
- Štafa Z, Stjepanović M: Žitarice i pšenica. U *Ozime i fakultativne krmne kulture*, str. 63-68 i 84-88. *Hrvatska mljekarska udruga*, Zagreb, 2015.
- Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: *Jedninične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Ugarčić-Hardi Ž: *Sirovine biljnog podrijetla (žitarice)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Veljković V B, Milenković D M: Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L)-II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije. *Znanstveni rad*. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2001.
- Zobel A M: Coumarins in fruit and vegetables. In: Thomas Barberan F and Robins R: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. *Clarendon Press*, Oxford, 1997.

