

Primjena novih tehnologija za ekstrakciju polifenola iz komine borovnice

Jelinić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:486015>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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**

Josip Jelinić

**PRIMJENA NOVIH TEHNOLOGIJA ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLA IZ
KOMINE BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2020. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju ugljikohidrata
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Prehrambeno inženjerstvo**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 16. srpnja 2019.**Mentor:** doc. dr. sc. *Antun Jozinović***Komentor:** doc. dr. sc. *Ante Lončarić***Primjena novih tehnologija za ekstrakciju polifenola iz komine borovnice***Josip Jelinić, 0113133555*

Sažetak: Cilj rada bio je na osnovi dostupnih literaturnih izvora prikazati dosadašnje spoznaje o inovativnim tehnikama za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala. Nadalje, eksperimentalno provesti istraživanje o učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja, pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka ovisno o otapalu na bazi metanola odnosno etanola. Na temelju provedenog istraživanja najboljom metodom pokazala se ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja gdje je najviše ukupnih polifenola ekstrahirano pri uvjetima: jakost polja 20 kV/cm u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi etanola, a najveću antioksidativnu aktivnost imao je ekstrakt dobiven pri uvjetima: jakost polja od 20 kV/cm u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi etanola. Najbolja metoda za ekstrakciju antocijana i flavonola pokazala se ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem pri uvjetima: jakost polja od 20 kV/cm, brojem impulsa 100 i uz upotrebu otapala na bazi metanola, dok je najbolja metoda za ekstrakciju fenolnih kiselina također ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem uz iste prethodne uvjete, ali uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Ključne riječi: borovnica, polifenoli, visokonaponsko električno pražnjenje, pulsirajuće električno polje, ultrazvuk, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 55 stranica
20 slika
14 tablica
78 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i> | član-komentor |
| 4. prof. doc. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 29. lipnja 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip JurajStrossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Carbohydrates Technology
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Food engineering

Thesis subject was approved by the Faculty of Food TechnologyOsijek Councilat its session no. X. held on July 16, 2019

Mentor: *Antun Jozinović*, PhD, assistant prof.

Co-mentor: *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof.

The Application of Novel Technologies for the Extraction of Polyphenols from Blueberry Pomace

Josip Jelinić, 0113133555

Summary: The aim of this research was to present the current knowledge on innovative techniques for the extraction of polyphenolic compounds from plant materials on the basis of available literature sources. Furthermore, experimentally conduct research on the efficiency of extraction of polyphenolic compounds from blueberry pomace using high-voltage electric discharge, pulsed electric field and ultrasound depending on the solvent based on methanol and ethanol. Based on the conducted research, the best method was extraction using a pulsed electric field where most of the total polyphenols were extracted under conditions: field strength 20 kV/cm for a period of 15 min using ethanol-based solvents, and the extract obtained under the conditions had the highest antioxidant activity: field strength of 20 kV/cm for a period of 15 min using ethanol-based solvents. The best method for the extraction of anthocyanins and flavonols proved to be extraction aided by a pulsed electric field under conditions: field strength of 20 kV/cm, number of pulses 100 and using methanol-based solvents, while the best method for extraction of phenolic acids is also pulsed electric field-assisted extraction under the same previous conditions, but using ethanol-based solvents.

Key words: blueberry, polyphenols, high voltage electric discharge, pulsed electric field, ultrasound, antioxidant activity

Thesis contains: 55 pages
20 figures
14 tables
78 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|---------------------|
| 1. <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, assistant prof. | member-cosupervisor |
| 4. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: June 29, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Antunu Jozinoviću i komentoru doc. dr. sc. Anti Lončariću na strpljivosti, profesionalnosti, ljubaznosti i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Od srca se zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene kao podrška onda i kada stvari nisu išle po planu, te što su ove godine studiranja učinili nezaboravnim iskustvom punim sreće i smijeha.

Posebnu zahvalnost dugujem nogometnoj ekipi Prehrambeno-tehnološkog fakulteta koja mi je uz svu podršku i lijepe trenutke usadila ljudske i moralne vrijednosti, te zbog kojih sam još jednom dobio potvrdu da su svi ljudi različiti, ali jednako zaslužuju i vrijede. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jurislavu Babiću koji nam je uvijek bio podrška kako u sportskom tako i u stručnom smislu, te osobno na prenesom znanju i motivaciji tokom studiranja.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji koja je na ovom životnom putu sve proživjela sa mnom. Vi ste bili moja motivacija koja mi je u svim teškim trenutcima savjetima, prisutnošću i pomoći pokazivala svijetlo na kraju tunela i davala hrabrost za ići dalje. Hvala na ljubavi i podršci roditeljima, braći i baki, kojima posvećujem ovaj diplomski rad.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Borovnica	4
2.1.1. Kemijski sastav ploda borovnice	4
2.1.2. Prerada borovnice	5
2.2. Polifenoli	6
2.3. Ekstrakcija	8
2.3.1. Ekstrakcija organskim otapalima	8
2.4. Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED)	9
2.5. Pulsirajuće električno polje (PEP)	12
2.6. Ultrazvuk (UZ)	15
3. EKPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK	20
3.2. MATERIJALI I METODE	20
3.2.1. Materijali	20
3.2.2. Kemikalije i uređaji	20
3.2.3. Metode	21
3.3. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem (HVED)	21
3.4. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (PEP)	22
3.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UZ)	24
3.6. Određivanje ukupnih fenola	24
3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	25
3.8. Određivanje polifenolnog profila tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	25
3.9. Identifikacija polifenola tekućinskom kromatografijom s masenim detektorom	26
4. REZULTATI	27
4.1. Utjecaj HVED-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost	28
4.2. Utjecaj PEP-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost	32
4.3. Utjecaj UZ-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost	37
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČCI	46
7. LITERATURA	49

Popis oznaka, kratica i simbola

HVED	eng. High voltage electrical discharge, visokonaponsko električno pražnjenje
PEP	eng. Pulsed electric fields, pulsirajuće električno polje
HIPEF	eng. High-intensity pulsed electric fields, pulsirajuće električno polje visokog intenziteta
UZ	eng. Ultrasound, ultrazvuk
Na ₂ CO ₃	eng. Sodium carbonat, natrijev karbonat
F.C.	eng. Folin–Ciocalteu reagent, Folin-Ciocalteuov reagens
DPPH	eng. 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-difenil-1-piklorhidrazil
HPLC	eng. High performance liquid chromatography, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
LC-MS/MS	eng. Liquid chromatography–mass spectrometry, tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom

1. UVOD

Borovnica je kao prehrambena namirnica imala važnu ulogu u kulturi prehrane američkih domorodaca (Mateljan, 2009). Upravo u SAD-u započinje značajniji uzgoj borovnice 1893. godine, a nešto kasnije počeo je uzgoj i u Europi (Miljković, 1991).

Borovnice su među voćem i povrćem rangirane kao jedne od najzdravijih namirnica zbog udjela antioksidanasa te blagotvornog djelovanja koje imaju na ljudski organizam. Bogate su mnogim hranjivim tvarima, među kojim treba istaknuti vitamin C i polifenole, a prije svega antocijane koje im pružaju karakterističnu plavu boju. Borovnice imaju razna blagotvorna djelovanja na ljudski organizam, pa tako pružaju snažnu antioksidativnu zaštitu, poboljšavaju zdravlje mozga, podržavaju optimalno zdravlje, potiču zdravu eliminaciju kao vrlo dobar izvor prehrambenih vlakana te s obzirom da su niskokalorične idealne su namirnice za zdravo mršavljenje (Mateljan, 2009). Tijekom prerade voća dolazi do nastajanja velikih količina nusproizvoda koji mogu imati i veće udjele polifenolnih spojeva od samog proizvoda. Primjenom raznih metoda ti polifenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz nusproizvoda, što je slučaj i kod komine borovnice, te se kasnije koristiti kao sastojak različitih proizvoda u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osim antocijana, borovnica također sadrži i flavonole i fenolne kiseline (Jamison, 2003; Brenneisen i Steingger, 1981).

Na polifenolne spojeve, pa i na vitamine i minerale veliki utjecaj imaju različiti postupci obrade namirnica. Povećana trajnost proizvoda odnosno konzerviranje se između ostalog može postići povišenim temperaturama, koje nazivamo tradicionalnim načinom obrade namirnica. Uz pozitivne utjecaje kod ovog načina obrade namirnica u isto vrijeme dolazi i do negativnih utjecaja na boju, okus, vitamine i brojne druge tvari prirodno prisutne u hrani (Oms-Oliu i sur., 2010). Kako bi se osigurali proizvodi koji su vrlo slični svježim namirnicama te spriječili navedeni gubitci, razvijeni su netermički postupci obrade hrane koji podrazumijevaju tretiranje nižim temperaturama te kraćim vremenom tretiranja namirnica. Namirnice na taj način zadržavaju svoja organoleptička i nutritivna svojstva te su sigurne za konzumaciju (Cullen i sur., 2012). Osim za tretiranje namirnica neke nove metode poput visokonaponskog električnog pražnjenja, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja mogu se koristiti i za ekstrakciju bioaktivnih tvari iz otpada nastalog obradom voća.

Cilj ovog rada bio je eksperimentalno provesti istraživanje o učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom pulsirajućeg električnog polja, visokonaponskim električnim pražnjenjem i ultrazvukom ovisno o otapalu na bazi metanola odnosno etanola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Borovnica

Borovnica (**Slika 1**) pripada porodici *Ericaceae*, rod *Vaccinium*, latinskog imena *Vaccinium myrtillus* (Bačić i Sabo, 2006). Borovnica je malo, okruglo ili ovalno voće s plavom, glatkom kožicom, slatkog okusa. Bogate su antioksidansima i vitaminom C, te mogu pomoći kod upala urinarnog trakta i kod poboljšanja vida (web 1). Borovnica je drvenast, višegodišnji, nisko razgranati grm, visine do 50 cm. Stabla su uspravna, gola, razgranata i zelene boje. Korijen ima moć stvaranja izdanaka, dok je lišće sitno, izduženo jajastog oblika. Cvjetovi su pojedinačni te se javljaju uz lišće (web 2). Borovnice su koristili američki domorodci u prehrani, no prvi doseljenici ih nisu previše cijenili, zbog kiselog okusa divljeg bobičastog voća. Razvojem slatkih, mesnatih i sočnih borovnica raste i njihova popularnost. Značajniji uzgoj borovnice je počeo u SAD-u 1893. godine, gdje se i danas mogu pronaći velike površine nasada borovnice. Nešto kasnije nego u SAD-u, počeo je uzgoj i u Europi (Miljković, 1991).



Slika 1 Borovnica (web 3)

2.1.1. Kemijski sastav ploda borovnice

Kemijski sastav borovnice prikazan je u **Tablici 1**. Plod borovnice sadrži najviše vode, a od ostalih tvari sadrži: šećer, tanine, vitamine B i C. Plod sadrži i karotin, mirtilin (mirtilin klorid) od kojeg potječe boja ploda, te albuminoid, pektin, mineralne soli, masna ulja i proteine. Plod borovnice također sadrži organske kiseline kao što su: limunska, jabučna, benzojeva i oksalna kiselina (web 4).

Tablica 1 Kemijski sastav borovnice na 100 g jestivog dijela (Kaić-Rak i Antonić, 1990)

JESTIVI DIO (g)	VODA (g)	ENERGIJA		BJELANČEVINE (g)	MASTI (g)	UGLJIKOHIDRATI (g)	ALKOHOL (g)
		kJ	kcal				
98	85	234	56	0,6	0,6	14,3	0
MINERALI							
Na (mg)	K (mg)	Ca (mg)	Mg (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	
1	65	10	2	9	0,7	0,10	
VITAMINI							
R.E. (µg)	RETINOL (µg)	KAROTINI (µg)	B1 (mg)	B2 (mg)	NIACIN (mg)	B6 (mg)	
22	0	130	0,02	0,02	0,4	0,06	

R.E. – retinol ekvivalent, odnosno ukupna aktivnost vitamina A iz sadržaja retinola i karotina

2.1.2. Prerada borovnice

Bobice borovnice su sastavni dio zdrave prehrane zbog njihovih bioktivnih komponenti, prvenstveno polifenola (**Tablica 2**). Preradom bobica dobije se 70 – 80 % soka i 20 – 30 % nusproizvoda koji sadrži uglavnom sjemenke i kožicu. Prerada borovnica u sok podrazumijeva prethodnu termičku obradu i obradu enzimima, najčešće, pektinazama. Ostatak koji nastaje proizvodnjom soka je komina bobica koja sadrži veliki udio bioaktivnih komponenti. Komina bobica najčešće se upotrebljava kao stočna hrana, sirovina za proizvodnju bioplina ili se odbacuje kao otpad. U najvećoj mjeri kominu čine kožica i sjemenke bobica koje sadrže puno polifenolnih spojeva i predstavljaju dobar izvor antioksidansa i prirodnih bojila. Za karakterističnu boju bobica, različitog bobičastog voća su odgovorni antocijani. Upravo borovnice imaju najviše antocijana u kožici u usporedbi s drugim sličnim voćem (Du i sur., 2004; Wang i sur., 1997). Osim antocijana, borovnica također sadrži i flavonole i fenolne kiseline (Jamison, 2003; Brenneisen i Steingger, 1981).

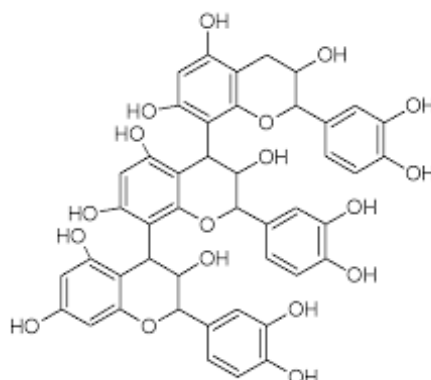
Tablica 2 Polifenolni spojevi ploda borovnice (Nile i Park, 2014)

POLIFENOLNI SPOJEVI (mg/g)	
Kampferol	0,6
Kvercetin	10,5 - 16,0
Miricetin	0,9 - 6,9
p-Kumarinska kiselina	0,7
Kava kiselina	8,3 - 42,2
Ferulična kiselina	0,2 - 0,8
Ukupni fenoli	261-585
Ukupni flavonoidi	50
Ukupni antocijani	25-495

2.2. Polifenoli

Polifenoli su tvari koje čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva. Zajedničko obilježje polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (**Slika 2**). Polifenoli su sekundarni metaboliti biljnog metabolizma, a mogu se pronaći u raznim količinama u voću i voćnim sokovima, povrću, kavi, čaju i vinu (Bravo, 1998; Rastija i Medić-Šarić, 2009). Neki polifenoli kao npr. jednostavni fenoli, kumarini, kromoni, naftokinoni, benzokinoni, ksantoni, fenolne kiseline (hidroksicimetne, hidroksibenzojeve), stilbeni ili flavonoidi su jednostavne molekule, ali u polifenole ubrajamo i molekule s velikom molekularnom masom, koje su puno kompleksnije, poput tanina (Robards i Antolovich, 1997; Robards i sur., 1999; Wollgast i Anklam, 2000). Najveća i najvažnija skupina polifenola su flavonoidi (Kähkönen i sur. 1999, Mattila i sur., 2006). Flavonoidi se mogu pronaći u svi dijelovima biljaka, te su po količini u biljnim organima različito raspoređeni. Na tu raznovrsnost utječu čimbenici poput stadija zrelosti biljke, klime i način uzgoja, ali glavnu kontrolu imaju geni biljke (Robards i Antolovich, 1997). Neki od glavnih nutritivnih izvora flavonoida su crveni luk, jabuke, čaj i crno vino (Manach i sur., 2004; Erlund, 2004). U biljkama možemo pronaći i tri dominantne podskupine flavonoida, a to su flavonoli, antocijani i flavan-3-oli (flavanoli) (Robards i Antolovich, 1997). Već spomenute fenolne kiseline su u biti derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida koji nemaju vezane molekule šećera čine strukturu C₆-C₃-C₆, odnosno sadrže petnaest ugljikovih atoma. Pri tome su atomi ugljika raspoređeni tako da su propanskim lancem povezane dvije strukture benzena koji može, ali i ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli kojima funkcionalnu skupinu čini 1,2- difeniletan, te oni ne sadrže osnovnu strukturu flavonoida. Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina u nastanku prirodnih aromatskih spojeva je ključna. U biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama je univerzalni prekursor, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998). U prirodi se polifenoli uglavnom javljaju u konjugiranom obliku kojemu su jedna ili više šećernih jedinica vezane na hidroksilne skupine, iako se mogu pronaći i oblici u kojemu su šećerne jedinice vezane direktno na aromatski ugljikov prsten. Najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza, ali se mogu pronaći i drugi oblici vezanih šećera: monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi. Polifenoli se mogu

konjugirati i s drugim tvarima poput amina, lipida, različite karboksilne i organske kiseline, ali su isto tako česte konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).



Slika 2 Polifenolna struktura (web 5)

Polifenoli su glavni antioksidansi u našoj prehrani. Oni su česti sastojci hrane biljnog podrijetla. Dnevno se prehranom unese sto puta veća količina od prosječnog unosa vitamina E i karotenoida, te deset puta veća količina od prosječnog unosa vitamina C. U prehrani voće i pića dobivena od biljaka, kao što su voćni sokovi, čaj, kava i crno vino su glavni izvori polifenola. Neke vrste voća sadrže oko 200 – 300 mg polifenola na 100 g svježeg voća, dok čaša crnog vina ili šalice kave sadrže oko 100 mg polifenola (Scalbert i sur., 2005; Pandey i Rizvi, 2009). Jagodasto, koštuničavo i bobičasto voće su vrlo ukusne, niskoenergetske namirnice bogate polifenolnim spojevima. *Ericaceae* (borovnice), *Rosaceae* (višnja, kupina, jagoda, malina) i *Saxifragaceae* (ribiz) sadrži veće količine polifenolnih spojeva od povrća, žitarica i nekih drugih vrsta voća. Ovo voće pokazuje i jaku antioksidacijsku aktivnost i to zbog velike količine polifenola (BHalvorsen i sur., 2002; Pellegrini i sur., 2003). Namirnice sadrže kompleksnu smjesu polifenola, te je stoga točan sastav polifenola većinom nepoznat. Na sastav polifenola u voću utječu različiti čimbenici, prije svega okolišni čimbenici. Mogu biti agronomski (ukupni urod po jednoj biljci, uzgoj u stakleniku ili na otvorenom i dr.) i pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina). Nadalje, kada govorimo o obradi namirnica, termička obrada namirnica ili guljenje voća ili povrća rezultira većim gubitkom polifenola (Manach i sur., 2004).

Polifenoli imaju brojna pozitivna djelovanja među kojima su najvažnija: antioksidativno, analgetsko, antialergijsko, antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, antimalarično te

brojna druga (Petrik, 2008). Kardiovaskularne bolesti, rak te osteoporoza su neke od bolesti na koje polifenoli djeluju preventivno. Primjer pozitivnog djelovanja polifenola je „francuski paradoks“ koji navodi da razlog iznimno niskoj pojavi kardiovaskularnih bolesti u Francuskoj je upravo konzumacija crnog vina bogatog polifenolnim spojevima, unatoč velikoj konzumaciji masne hrane (Castañer i sur., 2011; Scalbert i sur., 2005). Polifenoli također potiču aktivnost velikog broja enzima (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004). Treba spomenuti i da polifenoli imaju različito biološko djelovanje jer se sastoje od različitih spojeva što znači da učinak jednog polifenolnog spoja ne prikazuje učinak ostalih. Također bioraspoloživost pojedinih polifenolnih spojeva itekako varira (Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Razlikujemo dva načina ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje dviju faza: čvrsto-tekuće i tekuće-tekuće. Ekstrakcija se temelji na izjednačavanju koncentracije otopljenih tvari koji u sustavu dođu u međusobni dodir, odnosno molekulskoj difuziji. Taj princip ekstrakcije je opisan prvim zakonom A. Ficka, **formula (1)**:

$$N = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

gdje N (kg/s ili kmol/s) označava količinu i brzinu prijelaza mase, D (m²/s) koeficijent difuzije ili difuzivnost, c (kg/m³ ili kmol/m³) masenu ili molnu koncentraciju, a x (m) udaljenost. Proces ekstrakcije se može provoditi kontinuirano ili diskontinuirano (šaržno) te polukontinuirano, a danas se najčešće koristi kontinuirani tip procesa koji je najzastupljeniji u industrijama poizvodnje ulja i šećera (Lovrić, 2003).

2.3.1. Ekstrakcija organskim otapalima

Jedna od najraširenijih tehnika pripreme uzoraka je upravo ovaj tip ekstrakcije koji podrazumijeva otapanje cijelog ili dijela uzorka odgovarajućim otapalom. Tim postupkom dolazi do odjeljivanja smjese tvari na osnovu različite topljivosti u otapalima koja se koriste u samom procesu ekstrakcije (Raynie, 2000).

Faze procesa ekstrakcije organskim otapalom:

- namakanje biljnog materijala u otapalu što dovodi do otapanja ekstraktibilnih tvari s površine razorenih stanica,
- otapanje tvari i prodiranje otapala u nerazorene stanice istovremeno,
- difuzija ekstraktibilnih tvari iz unutarnjeg dijela stanica na površinu i zatim sa površine čestica biljnog materijala u otapalo.

Nakon procesa ekstrakcije provodi se odvajanje faza, u kojem odvajamo otapalo sa ciljanom komponentom od matice tj. uzorka najčešće procesima filtracije, centrifugiranja, taloženja ili dekantiranja. Uklanjanje otapala je posljednji korak u procesu koji se provodi postupcima destilacije, kristalizacije ili uparavanja (Wiley, 2003).

Ciljana komponenta koja se otapa mora imati veći afinitet prema otapalu nego prema matici iz koje se ekstrahira, što znači da je pravilan izbor otapala vrlo važan za ovaj proces i ovisi najviše o karakteristikama komponente koja se nalazi u procesu ekstrakcije (Raynie, 2000).

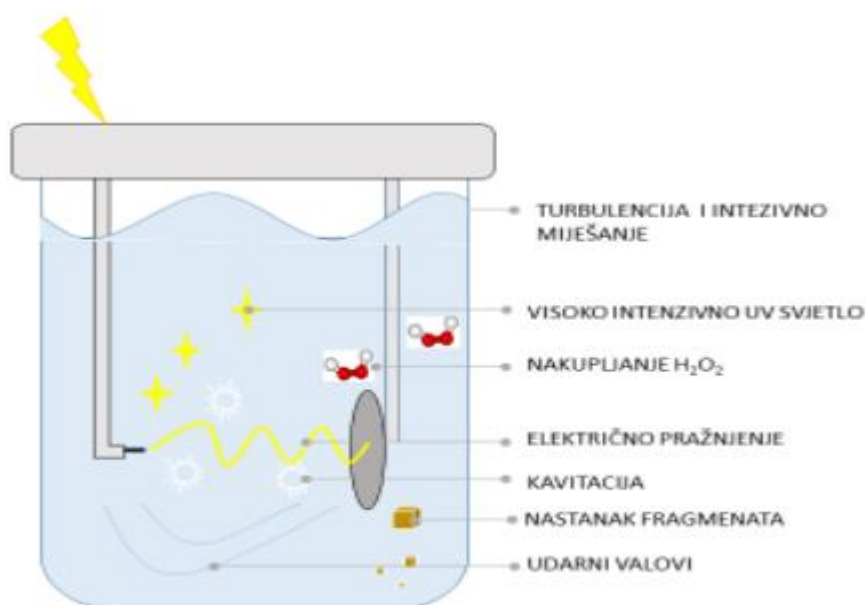
Uvjeti pri izboru otapala:

- selektivnost,
- stabilnost otapala, ne bi trebalo reagirati sa materijalom iz kojega se određene komponente ekstrahiraju,
- polarnost otapala,
- vrelište otapala bi trebalo biti što niže,
- mala viskoznost,
- cijena,
- nezapaljivost,
- netoksičnost
- mogućnost ponovne uporabe.

2.4. Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED)

Visokonaponsko električno pražnjenje (**Slika 3**) netermička je metoda ekstrakcije koja nalazi sve veću primjenu u prehrambenoj industriji, a koja se temelji na fenomenu električnog izboja u otopini. Taj fenomen električnog izboja izaziva u vodi oštećenje strukture stanica, ali isto tako i fragmentaciju čestica čime je omogućena brža i bolja ekstrakcija komponenata unutar stanica (Rajha i sur., 2015). Upravo zbog toga se za ekstrakciju bioaktivnih komponenti koristi visokonaponsko električno pražnjenje (engl. *High voltage electrical discharge* – HVED). Pojava

električnog izboja dovodi do intenzivnog miješanja i tekućinske turbulencije, stvaranja vodikovog peroksida (H_2O_2), pojave emisije UV svjetla visokog intenziteta, proizvodnju kavitacijskih mjehurića i udarnih valova (Boussetta i sur., 2014). Navedene pojave se nazivaju sekundarni fenomeni. Sekundarni fenomeni omogućuju lakšu ekstrakciju biljnog materijala, a javljaju se tijekom tretmana biljnog materijala u određenom otapalu visokonaponskim električnim pražnjenjem. Sustav za šaržno provođenje ekstrakcije sastoji se od reaktora/komore u kojemu se nalaze dvije elektrode na određenoj udaljenosti koje su različite konfiguracije. Jedna elektroda je u obliku igle i ona je spojena na vanjski izvor napona te je pozitivno nabijena, a druga je u obliku diska/ploče.



Slika 3 Visokonaponsko električno pražnjenje između dvije elektrode u otopini
(Rajha i sur., 2015)

Prilikom visokonaponskog električnog pražnjenja u ionskim otopinama između dvije elektrode dolazi do električnog pražnjenja, a posljedica toga je stvaranje plazme. Dovođenjem električne energije učestalost sudara čestica u otopini se povećava, koje se ionako u otopini neprestano kreću i sudaraju. Zbog razlike potencijala usmjerenim gibanjem nosioca električnog polja nastaje električna struja. U plinovima i elektrolitima pozitivni i negativni ioni te elektroni su nosioci naboja (Komen, 2018). Tijekom neelastičnih sudara neutralnih molekula i elektrona u otopini dolazi do prijenosa energije s elektrona na neutralnu molekulu, te nastaju pobuđene i ionizirane molekule. Proporcionalnim povećanjem energije sudara povećava se i vjerojatnost

pobude u veće energetske stanje atoma ili molekula, njihova disocijacija ili ionizacija atoma (Milošević, 2008).

Tijekom električnog pražnjenja dolazi do niza fizikalnih i kemijskih promjena u otopini.

Fizikalne promjene su:

- UV radijacija,
- snažno električno polje,
- stvaranje udarnih valova.

Zbog odvijanja kemijskih reakcija u kojima nastaju reaktivne tvari, dolazi i do kemijskih promjena u otopini. U vodenim otopinama ekscitacijom i ionizacijom nastaje vodikov peroksid, ozon te hidroksilni vodikovi i kisikovi radikali. Nastale čestice su dugo 'živeće', odnosno ioni i neutralne molekule s visokim oksidacijskim potencijalom ili kratko 'živeće' poput radikala (Kirkpatrick i Locke, 2005; Joshi i sur., 1995).

Disocijacijom i ionizacijom molekula vode započinju reakcije inicijacije u vodi, zbog neelastičnih sudara s visokoenergetskim elektronima (Kozakova, 2011):



Nastali radikali mogu reagirati s drugim molekulama vode u otopini ili mogu međusobno reagirati uz nastanak stabilnih molekula poput H_2 , H_2O_2 i H_2O :



Nastajanje glavnih produkata hidroksilnog i vodikovog radikala, vodikovog peroksida i vodika prikazuju se dvjema sumarnim reakcijama koje se odvijaju istodobno:

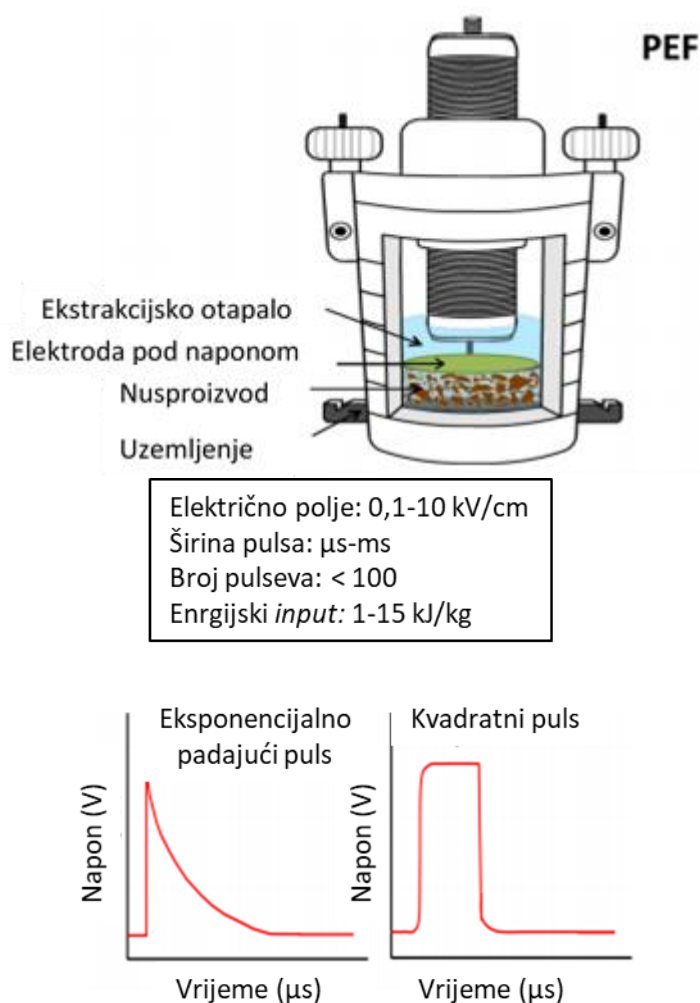


2.5. Pulsirajuće električno polje (PEP)

Pulsirajuće električno polje (PEP), ili pulsirajuće električno polje visokog intenziteta (engl. *High-intensity pulsed electric fields* - HIPEF) danas nalazi sve veću primjenu u prehrambenoj industriji. Pulsirajuće električno polje je postupak u kojem se proizvod tretira određenim brojem kratkotrajnih električnih pulseva. Pulsevi su površinski valovi, koji su snažniji od sinusoidnih valova. PEP se dosada koristilo za sigurnost i poboljšanje kakvoće hrane preko inaktivacije velikog broja enzima i mikroorganizama koji imaju utjecaj na moguće promjene sigurnosti i kakvoće hrane. Tijekom obrade hrane PEP-om postižu se maksimalne temperature 46 – 69 °C tj. temperature niže od temperatura termičke pasterizacije čime se minimalizira gubitak termolabilnih tvari poput, specifičnih tvari arome. Stoga se ova tehnologija može uključiti i kao korak u procesima poput ekstrakcije, sušenja zrakom, dehidracije osmozom i dr. Pasterizacija mlijeka istosmjernom strujom 1900. godine je prva zabilježena upotreba ove tehnologije. Prethodno tretiranje prehrambenog matriksa ovom metodom, prije klasične ekstrakcije, poboljšava iskorištenje vrijednih spojeva koji se nalaze unutar stanica. Pri tome ne dolazi do oštećenja matriksa namirnice te dolazi do laganog porasta temperature (Vorobiev i Lebovka, 2011a). Ovi postupci se sastoje od tretiranja uzorka kratkotrajnim (od nekoliko mikrosekundi do nekoliko milisekundi) i povremenim pulsevima (<300 Hz) visokog napona (0,1 – 20 kV/cm) (Puértolas i sur., 2012). Pulsevi visokog napona imaju mogućnost destabilizacije lipidno-proteinskog sloja stanične stjenke, tj. elektroporacije (Teissie i sur., 2005). Elektroporacija može biti reverzibilna ili ireverzibilna, ovisno o intenzitetu napona pulseva (Puértolas i sur., 2012). Upravo ireverzibilna elektroporacija poboljšava proces ekstrakcije. Elektroporacija PEP-om ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima tretiranog matriksa (npr. vodljivosti), te o svojstvima stanica i tkiva koje čine matriks (npr. veličina, oblik, vrsta membrane) (Puértolas i sur., 2012; Vorobiev i Lebovka, 2008, 2011b). U mekim biljnim tkivima

ili materijalima, poput mezokarpa ili perikarpa većine plodova, upotreba električnog polja jačine između 0,1 i 10 kV/cm dovodi do postizanja dobrih rezultata ekstrakcije, dok u tvrdim tkivima, u kojima može doći do lignifikacije ta električna polja nemaju učinka. U svrhu poboljšanja ekstrakcije takvog tvrdog materijala, predložena je upotreba električnog polja jakosti do 20 kV/cm (Boussetta i sur., 2012a, 2013, 2014; Sarkis i sur., 2015a, 2015b).

Uređaj za tretiranje hrane PEP-om se temelji na punjenju kondenzatora izvorom istosmjerne struje koji se nakon toga prazne u obliku pulseva (napona <50 kV i struje <1 kA), te komore za obradu gdje se pulsevi ispuštaju. Komora za tretiranje mora imati jednu elektrodu spoenu na visoki napon a drugu na uzemljenje. Proizvod se nalazi između elektroda gdje uslijed razlike potencijala nastaje električno polje (**Slika 4**). Električno polje ovisi o karakteristikama električnog pulsa, morfologiji i rasporedu elektroda te o vodljivosti samog proizvoda (Heinz i sur., 2001). Razlikujemo dvije skupine komora šaržnu ili statičku i kontinuiranu ili dinamičku kod kojih protok omogućuje kontinuirani tretman materijala, te je tako dizajniran da udovolji zahtjevima industrijske proizvodnje (Dunn, 2001). Glavni nedostatak je to što raspodjela električnog polja u području obrade nije jednolika (Meneses i sur., 2011). Preporučeni materijali za izradu elektroda su nehrđajući čelik, grafit ili titanij (Pizzichemi, 2009).



Slika 4 Primjer komora za obradu, glavni parametri obrade i oblici pulseva koji se koriste za tretiranje hrane PEP-om (Roselló-Soto i sur. (2015a) i Puértolas i sur. (2016))

Uz spomenuto električno polje, trajanje pulsa i frekvenciju ostali važni parametri koji definiraju PEP su:

- primijenjeno vrijeme tretiranja (broj primijenjenih pulsa pomnoženo sa njegovom širinom odnosno trajanjem),
- oblik pulsa (kvadratni ili eksponencijalni raspad, unipolarni ili bipolarni),
- specifični unos energije tretmanom (kJ/kg) (**Slika 4**) (Puértolas i sur., 2012).

Ukupna specifična energija koja se koristi u procesu poboljšanja ekstrakcije PEP-om u mekim tkivima, kao npr. voćna kaša kreće se između 1 i 15 kJ/kg (Puértolas i sur., 2012). To je znatno manje u odnosu na standardne metode poput mehaničke, enzimske i toplinske obrade gdje je potrebno od 20 – 100 kJ/kg ukupne specifične energije za tu vrstu tkiva (Toepfl, 2006; Vorobiev

i Lebovka, 2011a). U tvrdim tkivima, poput sjemenki, ukupna specifična energija je u rasponu od 50 do 400 kJ/kg, negdje čak naraste i do 800 kJ/kg (Boussetta i Vorobiev, 2014; Boussetta i sur., 2014). Jačina električnog polja ispod 1 kV/cm smatra se umjerenim električnim poljem, dok se električna polja jačine iznad 1 kV/cm označavaju kao električna polja visokog intenziteta (Asavasanti i sur., 2010). Primijenjeno električno polje uravnoteženo je sa širinom impulsa, što znači da često umjerena električna polja imaju dugo trajanje (reda milisekundi), dok električna polja visokog intenziteta su kraća (reda mikrosekundi) (Weaver i sur., 2012).

Prednosti metode:

- Uništavanje vegetativnih bakterija, plijesni i kvasaca,
- Kratko vrijeme obrade (< 1 s),
- Očuvanje organoleptičkih svojstva i nutrijenata,
- Dobra energetska učinkovitost – PEP tehnologiju karakterizira mala potrošnja i dobra iskoristivost energije.

Nedostaci metode:

- Slabo djelovanje na enzime i spore m.o.,
- Utjecaj produkata elektrolize na kvalitetu namirnice,
- Mogu se obrađivati samo tekuće i polutekuće namirnice,
- Manji učinak djelovanja na materijale sa većom električnom vodljivošću,

2.6. Ultrazvuk (UZ)

Ljudsko uho ne može čuti ultrazvučne valove, iako su slični zvučnim valovima, ali imaju frekvencije više od 16 kHz. U prehrambenoj industriji upotrebljavaju se UZ valovi niskog intenziteta (manje od 1 W/cm²) frekvencije 5 do 10 MHz i UZ valovi visokog intenziteta (10 do 1000 W/cm²) frekvencija viših od 2,5 MHz. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta dovode do fizičkog oštećenja tkiva zbog velike snage kojom djeluju na uzorak. To su i osnove ove tehnike u različitim procesima prerade i konzerviranja hrane. Za razliku od njih ultrazvučni valovi niskog intenziteta koriste se za analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane, jer ne dovode do fizičkog oštećenja uzorka (Lelas, 2006).

Zvučni valovi se mogu podijeliti s obzirom na frekvenciju u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu (**Slika 5**).

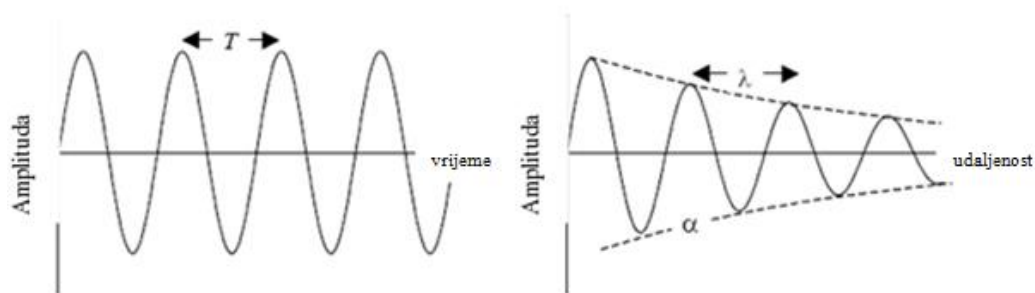


Slika 5 Područje podjele zvuka prema frekvencijama (web 6)

U prehrambenoj industriji najvažnije frekvencije ultrazvuka su više od 20 kHz. Zvučni val određen je svojom amplitudom $[A]$, frekvencijom $[f]$, te valnom duljinom $[l]$ i koeficijentom prigušenja $[\alpha]$. Promjene amplitude ultrazvučnog vala u određenom položaju u materijalu, i vremenu prikazane su na **Slici 5**. Udaljenost između susjednih maksimuma vala mijenja se sinusoidno s vremenom, kod fiksnih položaja u materijalu. Amplituda $[A]$ se smanjuje s porastom udaljenosti zbog prigušenja, dok je koeficijent prigušenja $[\alpha]$ mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon njegova prolaska kroz materijal. Koeficijent prigušenja $[\alpha]$ materijala definira se prema **formuli (10)**:

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (10)$$

gdje je, A_0 početna amplituda zvučnog vala, a x je prijeđena udaljenost. Adsorpcija i raspršivanje su glavni uzroci prigušenja. Raspršivanje se javlja u heterogenim materijalima, kao što su emulzije, pjene i suspenzije, dok je uzrok adsorpcije fizikalni mehanizam koji pretvara električnu energiju u toplinu. Energija uslijed raspršivanja još uvijek je spremljena u obliku ultrazvučne energije, za razliku od adsorpcije, ali su njezin smjer i faza prenošenja promijenjeni, pa se ne registrira.



Slika 6 Promjene amplitude ultrazvuka u određenim položajima u materijalu (lijevo), te u određenom vremenu (desno), gdje je T udaljenost između susjednih maksimuma vala, λ je valna duljina i α je koeficijent atenuacije (Režek Jambrek, 2008 i web 7).

Kod većine materijala ultrazvučna brzina vala je nelinearna funkcija temperature. Brzina vala kod vode koji je glavni sastojak hrane mijenja se za otprilike 3 m/s po stupnju Celzijusa na sobnoj temperaturi. Upotrebom preciznijih uređaja može se preciznije odrediti brzina vala.

Izvor ultrazvuka su ultrazvučni generatori u kojima se električna energija pretvara u ultrazvučnu. UZ generatori mogu imati destruktivno djelovanje, te stoga moraju generirati samo UZ dozvoljenih frekvencija. U prehrambenoj industriji, ultrazvučna kavitacija se može koristiti samo za tekuće namirnice, radilo se o homogenim tekućinama, homogenim sustavima čvrsto-tekućo ili o sustavima tekuće-tekuće. Kombinacija UZ s drugim metodama konzerviranja daje još bolji učinak. Letalni učinak na mikroorganizme je 6 do 30 puta veći kod kombinacije zagrijavanja, UZ i visokog tlaka nego kod toplinskog tretmana pri istoj temperaturi. Samo upotreba UZ se koristi za uništavanje vegetativnih stanica, dok je termosonikacija kombinacija UZ sa zagrijavanjem i uništava vegetativne stanice i spore. Manosonikacija je kombinacija UZ s tlakom. Kombinacija sva tri učinka naziva se manotermosonikacija i uništava vegetativne stanice, spore, ali i enzime.

UZ se više koristi za usitnjavanje, emulgiranje, homogenizaciju, bistrenje i sterilizaciju opreme, međutim pronašao je primjenu i u ekstrakciji bioaktivnih tvari, ubrzavanju procesa zamrzavanja i kristalizaciji u proizvodnji masti i šećera. Koristi se u preradi i sterilizaciji voćnih sokova, mlijeka, marmelada, jaja i čokolade, a sve više i u većim komadima i u čvrstim namirnicama. Oštećenjem stanične stijenke ultrazvukom uslijed nastalih kavitacija omogućuje ulazak otapala u stanice što se pokazalo da značajno pospješuje proces ekstrakcije. Primjenom ultrazvuka kod emulgiranja dovodi do toga da je stabilnost emulzije bolja u odnosu na

standardne metode, jer je vrijeme tretiranja kraće, a kod sušenja se koristi za skraćivanje vremena potrebnog za sušenje mnogih prehrambenih proizvoda.

Osnovne prednosti primjene ultrazvuka u prehrambenoj industriji su:

- Djeluje u potpuno optički neprozirnim sustavima,
- Inaktivira enzime,
- Uništava vegetativne oblike mikroorganizama,
- Manotermosonikacijom uništava i spore,
- Skraćuje vrijeme potrebno za homogenizaciju, ekstrakciju, filtraciju, sušenje, zamrzavanje i emulgiranje,
- Može se upotrebljavati za intenzifikaciju i/ili poboljšavanje i drugih specifičnih operacija kao što su pakiranje, rezanje, pročišćavanje otpadnih voda, te grijanje i čišćenje (i sterilizaciju) procesnih površina,
- Pospješuje prijenos topline, pa se koristi u procesima pasterizacije i sterilizacije,
- Koristi se i kao analitička metoda u dobivanju podataka o fizikalno-kemijskim svojstvima namirnice,
- Primjena u ekstrakciji različitih spojeva u hrani i u reaktorskom inženjerstvu za ubrzavanje kemijskih reakcija i modifikaciju enzimske aktivnosti.

Nedostaci su:

- Mogući nastanak slobodnih radikala, koji su štetni za ljude,
- Neželjene promjene u strukturi i teksturi namirnice,
- Potpuni učinak se postiže tek uz primjenu i drugih metoda, kao što su visoki tlak i grijanje,
- Ultrasonična obrada hrane još uvijek je nedovoljno istražena, posebice u Hrvatskoj, i zahtjeva opsežna buduća istraživanja kako bi se razvila tehnologija u industrijskom mjerilu te da bi se razjasnio utjecaj ultrazvuka na svojstva hrane.

3. EKPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je prikazati dosadašnje spoznaje o inovativnim tehnikama za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala na osnovi dostupne literature. Nadalje, eksperimentalno provesti istraživanje o učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom pulsirajućeg električnog polja, visokonaponskim električnim pražnjenjem i ultrazvuka ovisno o otapalu na bazi metanola odnosno etanola.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

U ovom istraživanju korištena je komina borovnice dobivena nakon proizvodnje soka postupkom hladnog prešanja. Borovnice su dobivene na poklon s plantaže u Miklešu (Bogadi d.o.o., Hrvatska). Komina je prije ekstrakcija osušena postupkom liofilizacija (Alpha LSCplus, Christ, Njemačka) do udjela suhe tvari od 98 %. Sušenje je provedeno u temperaturnom rasponu od -80 °C do 25 °C i tlakom do 0,180 mbar. Temperatura izotermalne desorpcije bila je 25 °C, a tlak 0,060 mbar. Nakon sušenja, komina je usitnjena i skladištena u zatamnjanim bocama pri sobnoj temperaturi.

3.2.2. Kemikalije i uređaji

Kemikalije

- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD),
- 20 %-tna otopina Na_2CO_3 (J.T.Baker, SAD),
- Metanol (Chemie S.A., Barcelona, Španjolska),
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska),
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, SAD),
- Standardi polifenola (minimalne čistoće 96,63 %) – Sigma-Aldrich (Chemie GmbH Steinheim, Njemačka),
- Mravlja kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka).

Uređaji

- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),

- Magnetska miješalica (Unistirer 7 LLG Labware, Njemačka),
- Centrifuga Heareus Multifuge 3 L-R Centrifuge (Hanau, Njemačka),
- Spektrofotometar (Jenway 6300, Bibby Scientific, UK),
- Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje (Osijek, Hrvatska),
- Uređaj za tretiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (Osijek, Hrvatska),
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex Super RK 100 H, Bandelin (Berlin, Njemačka)
- HPLC (JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan),
- LC-MS/MS Thermo Scientific system (San Jose, CA, SAD).

3.2.3. Metode

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj novih tehnologija poput visokonaponskog pražnjenja, pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka na ekstrakciju polifenola iz komine borovnice. Za ekstrakciju su korištene dvije vrste otapala, na bazi etanola (50 % etanol i 1 % klorovodične kiseline) odnosno metanola (50 % metanol i 1 % klorovodične kiseline).

3.3. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem (HVED)

Pripremljene su suspenzije komine borovnice u omjeru tekuće-kruto (50:1). Suspenzije su homogenizirane na magnetskoj miješalici, a potom tretirane visokonaponskim električnim pražnjenjem pri 20, 50, 100 Hz u trajanju od 5, 10 i 15 min. Tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem odnosno postupak ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem proveden je uz pomoć uređaja za visokonaponsko električno pražnjenje (**Slika 7**) koji je, u suradnji s firmom Inganiare CPTS1, konstruiran na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

Uređaj za HVED sastoji se od:

- Visokonaponskog generatora koji je izvor visokog istosmjernog napona od 30 kV te maksimalne snage od 120 W i maksimalnog iznosa struje od 10 mA,
- Spremnika energije/kondenzatora u kojem se energija skladišti, a potom prazni u obliku izboja unutar komore,
- Visokonaponske sklopke koja osigurava pražnjenje spremnika u određenom intervalu čija frekvencija može iznositi od 10 – 100 Hz,

- Komore za „pin-to-plate“ tretiranje uzorka, unutar koje se nalazi magnetska miješalica na koju se stavlja staklena posuda s uzorkom i u koju su uronjene elektrode na konstantom razmaku od 1 cm, upravljačkog sklopa za automatsko upravljanje te upravljača pomoću kojega možemo upravljati uređajem sa sigurne udaljenosti, a sastoji se od tipki za pokretanje i zaustavljanje te tipki za podešavanje frekvencije i vremena trajanja tretmana (ekstrakcije).



Slika 7 Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje

3.4. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (PEP)

Pripremljene su suspenzije komine borovnice u omjeru tekuće-kruće (50:1). Suspenzije su homogenizirane na magnetskoj miješalici, a potom tretirane pulsirajućim električnim poljem pri jakosti polja od 10, 15 i 20 kV/cm, broja impulsa 10, 50 i 100 te vremena trajanja impulsa od 2 μ s. Tretman pulsirajućim električnim poljem odnosno postupak ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem proveden je uz pomoć uređaja za tretiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (GROM) (**Slika 8**) koji je, u suradnji s Fakultetom elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek, konstruiran na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

Uređaj za PEP sastoji se od:

- Visokonaponskog generatora koji je izvor visokog istosmjernog napona od 30 kV te maksimalne snage od 120 W i maksimalnog iznosa struje od 10 mA,
- Spremnika energije/kondenzatora u kojem se energija skladišti, a potom prazni u obliku pulsa unutar komore,

- Visokonaponske sklopke koja osigurava pražnjenje spremnika u određenom intervalu,
- Komore za tretiranje s paralelnim pločama od nehrđajućeg čelika s razmakom od 1 cm, upravljačkog sklopa za automatsko upravljanje te upravljača pomoću kojega možemo upravljati uređajem sa sigurne udaljenosti, a sastoji se od tipki za pokretanje i zaustavljanje te tipki za podešavanje jakosti, trajanja i broja pulseva.



Slika 8 Uređaj za tretiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (GROM)

Specifični *input* energije za HVED i PEP je računat prema slijedećoj **formuli (11)**:

$$W = \frac{E_p \times n}{m} \quad (11)$$

Gdje je W *input* energije (kJ/kg), E_p energija jednog pulsa (kJ), m masa suspenzije (kg). Energija jednog pulsa je dobivena iz **formule (12)**:

$$E_p = \int_0^t U \times I \times dt \quad (12)$$

Gdje je U napon (V) i I jakost električne struje (A).

Intenzitet električnog polja (E_{HVED} i E_{PEF}) je dobiven iz **formule (13)**:

$$E = \frac{V}{d} \quad (13)$$

Gdje je E intenzitet električnog polja (kV/cm); V napon (kV); d udaljenost između elektroda (cm).

3.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UZ)

Pripremljene su suspenzije komine borovnice u omjeru tekuće-kruto (50:1). Suspenzije su homogenizirane na magnetskoj miješalici, a potom tretirane ultrazvukom pri 35 kHz u trajanju od 5, 10 i 15 min i pri različitim temperaturama 20, 40 i 80 °C. Postupak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom proveden je uz pomoć ultrazvučne kupelji Sonorex Super RK 100 H, Bandelin (Berlin, Njemačka).

3.6. Određivanje ukupnih fenola

Princip metode: Određivanje ukupnih fenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u potpoglavljima (3.3. – 3.5.) Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti ekstrakcijskim otapalom, 50 % etanol i 1 % klorovodične kiseline odnosno 50 % metanol i 1 % klorovodične kiseline u omjeru 1:5.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu odpipetira se redom 500 µL ekstrakta (koji je prethodno razrijeđen 5x), 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (koji je prethodno 10x razrijeđen) te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (50 % etanol i 1 % klorovodične kiseline) odnosno 50 % metanol i 1 % klorovodične kiseline). Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama (1 – 20 mg/mL, $R^2=0,9929$) masenog udjela galne kiseline i ukupnih fenola, te izraženi kao mg

ekvivalenata galne kiseline (GAE) po mililitru ekstrakta. Mjerenja su u svakom uzorku izvršena tri puta.

3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Princip metode: Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je DPPH metoda koja se temelji na određivanju reducirajuće sposobnosti antioksidanasa (polifenola) prema DPPH radikalu. DPPH testom, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 515 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima (Brand-Williams i sur., 1995).

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u potpoglavljima (3.3. – 3.5.) Za potrebe određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta je potrebno prethodno razrijediti ekstrakcijskim otapalom, 50 % etanol i 1 % klorovodične kiseline odnosno 50 % metanol i 1 % klorovodične kiseline u omjeru 1:5.

Postupak: odpipetira se 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje Trolox® (0,1 – 1,5 mmol TE/g, $R^2=0,9937$). Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja i rezultati su izraženi u ekvivalentima Trolox® po gramu osušene komine borovnice (mmol TE/g s.tv.).

3.8. Određivanje polifenolnog profila tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Pojedinačni polifenoli: katehin, procijanidin B1 i B2, kava kiselina klorogenska kiselina, epikatehin, 4-hidroksicimetna kiselina, mirecetin, kvercetin, kampferol, delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3-arabinozid, petunidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, peonidin-3-glukozid, peoidin-3-arabinozid, malvidin-3-glukozid određeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti izvedena je s uređajem Jasco LC Net II opremljenim *autosamplerom* AS4150, pumpom PU 4180 i PDA detektorom MD-4010. Sustav je upravljan s programom JASCO ChromNAV verzije 2.01.00 (JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan). Eksperimenti su izvedeni na koloni C18 Kinetex (150 × 4,5 mm, 2,6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Mobilna faza se sastoji od A (voda koja sadrži 1 % mravlje kiseline) i B (metanol koji sadrži 1 % mravlje kiseline). Gradijentski program bio je od 95 % A do 80 % u 10 min, od 80 do 70 % u 5 min, od 70 do 50 % u 5 min, od 50 do 0 % u 5 min, a zatim izokratski 10 minuta pri protoku od 1 mL/min. 5 μL uzorka ubrizgano je u duplikatima na kolonu koja je temperirana na 50 °C.

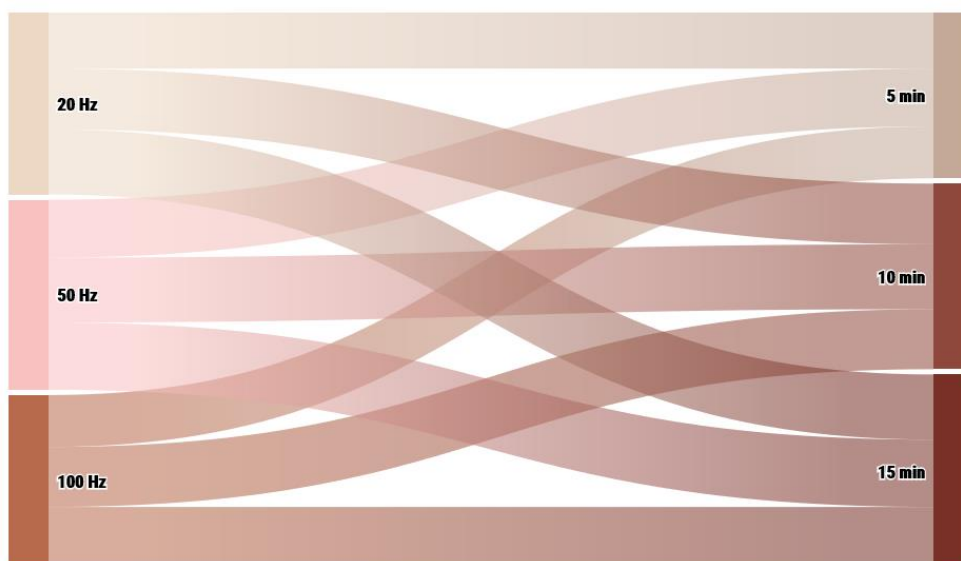
UV-Vis spektri zabilježeni su u rasponu od 190 do 600 nm. Polifenoli su detektirani pri 280, 320, 360 i 520 nm i identificirani su usporedbom njihovih retencijskih vremena i UV-Vis spektrom standarda. Kvantifikacija je provedena vanjskom standardnom kalibracijom. Količina polifenola izražena je u mg/100 g s.tv. Neki su pikovi identificirani pomoću podataka iz literature (Bamba i sur., 2018; You i sur., 2011; Barnes i sur., 2009).

3.9. Identifikacija polifenola tekućinskom kromatografijom s masenim detektorom (LC–MS/MS)

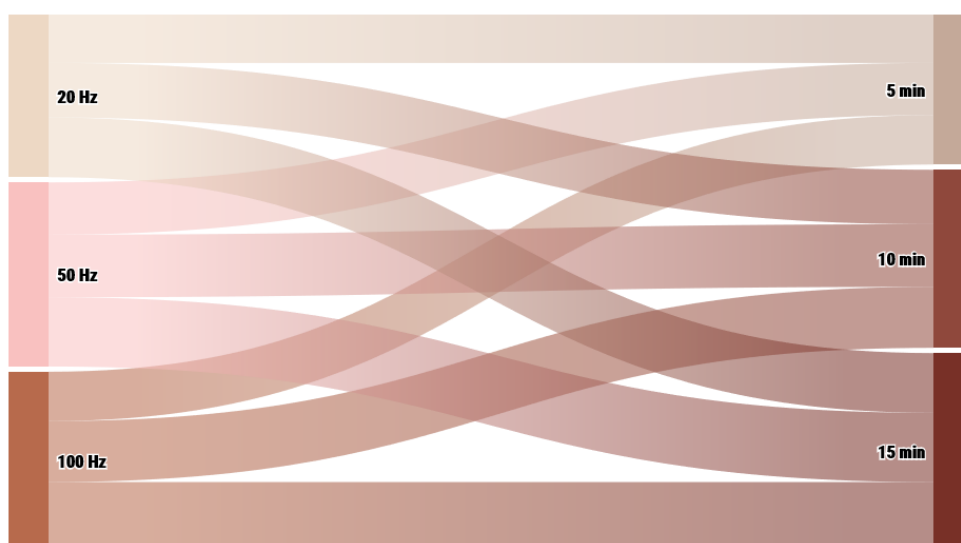
Identifikacija glavnih polifenola provedena je na LC–MS/MS, u Thermo Scientific sustavu (San Jose, CA, USA). Sustav se sastojao od Finnigan Surveyor™ HPLC Thermo Fisher Scientific (Madrid, Španjolska) i TSQ Quantum Discovery, trostrukim kvadropolom Thermo Fisher Scientific (Madrid, Španjolska) opremljen grijanim ionizacijskim izvorom (HESI) i Thermo Scientific Hypersil Gold aQ (1,9 μm, 100 × 2,1 mm) kolonom. Mobilna faza se sastojala od (A) 0,1 % mravlje kiseline/vode i (B) 0,1 % mravlje kiseline/metanola, čiji je gradijentni program bio 0 – 20 min 5 % B do 20 % B i 20 – 25 min 100 % B s brzinom protoka od 1,0 mL/min i temperaturom kolone 50 °C. Elucija u koloni je praćena odabranim reakcijama praćenja (SRM). Otkriveni su polifenoli u negativnom modu (ESI-NI), stvarajući uglavnom [M-H]⁻-pseudomolekularne ione.

4. REZULTATI

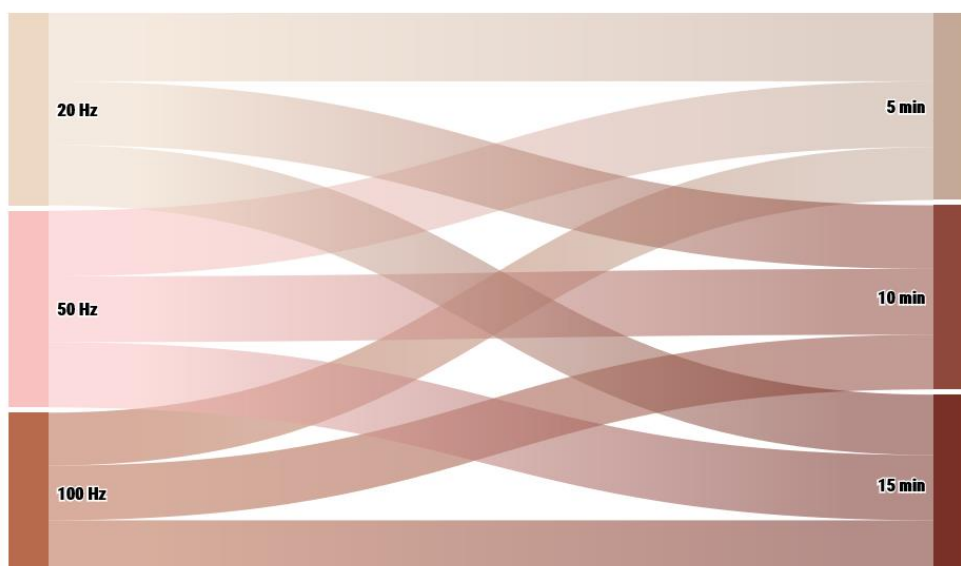
4.1. Utjecaj HVED-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost



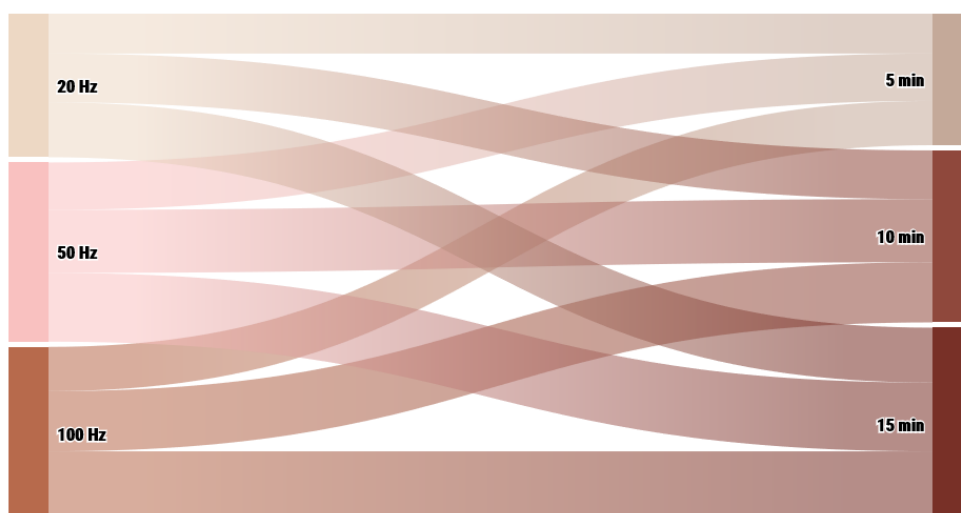
Slika 9 Utjecaj HVED-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri 20, 50 i 100 Hz na ekstrakciju polifenola komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 10 Utjecaj HVED-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri 20, 50 i 100 Hz na ekstrakciju polifenola komine borovnice uz upotrebu otapala etanola



Slika 11 Utjecaj HVED-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri 20, 50 i 100 Hz na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 12 Utjecaj HVED-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri 20, 50 i 100 Hz na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala etanola

Tablica 3 Udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene HVED-a

Metanol		Antocijani							
HVED (Hz)	Vrijeme (min)	Delfinidin-3-pirinozid	Delfinidin-3-arabinozid	Petunidin-3-pirinozid	Cijanidin-3-arabinozid	Peonidin-3-pirinozid	Peonidin-3-arabinozid	Malvidin-3-pirinozid	UKUPNO
20	5	183,81 ± 4,19	128,97 ± 3,40	228,02 ± 6,46	46,92 ± 1,45	265,21 ± 7,32	10,79 ± 0,17	114,86 ± 2,85	978,58
20	10	205,46 ± 10,31	144,44 ± 7,08	254,27 ± 13,45	53,32 ± 2,80	299,05 ± 15,64	10,54 ± 0,53	131,10 ± 7,07	1098,18
20	15	222,23 ± 6,57	155,98 ± 4,94	275,22 ± 7,94	56,88 ± 2,42	325,47 ± 9,84	10,30 ± 0,61	143,05 ± 4,92	1189,13
50	5	187,32 ± 2,61	130,42 ± 2,15	231,34 ± 3,76	47,70 ± 0,90	271,26 ± 3,86	11,38 ± 0,79	116,95 ± 1,18	996,37
50	10	217,38 ± 14,17	152,38 ± 10,08	268,88 ± 18,97	55,38 ± 4,23	319,06 ± 21,7	11,43 ± 0,36	139,19 ± 9,52	1163,70
50	15	228,11 ± 5,61	158,83 ± 3,48	283,99 ± 6,87	58,86 ± 1,62	334,39 ± 8,52	11,31 ± 0,25	145,79 ± 3,91	1221,28
100	5	167,92 ± 3,18	117,15 ± 1,96	205,56 ± 3,39	40,96 ± 1,22	241,71 ± 4,65	8,86 ± 0,35	105,92 ± 2,10	888,08
100	10	201,16 ± 7,87	139,64 ± 5,13	247,67 ± 9,74	52,06 ± 1,80	291,32 ± 10,85	9,87 ± 0,52	127,33 ± 4,68	1069,05
100	15	204,98 ± 5,70	142,35 ± 4,02	253,36 ± 6,90	52,96 ± 1,90	298,10 ± 9,05	9,83 ± 0,22	130,07 ± 3,38	1091,65
Etanol									
20	5	122,23 ± 3,08	87,77 ± 2,33	171,12 ± 4,91	44,73 ± 1,71	192,38 ± 5,3	7,14 ± 0,28	78,11 ± 2,69	703,48
20	10	157,04 ± 2,05	110,96 ± 1,34	188,35 ± 3,54	39,05 ± 1,14	228,56 ± 2,92	8,42 ± 0,16	100,74 ± 1,33	833,12
20	15	174,12 ± 4,22	124,02 ± 3,16	212,94 ± 4,97	44,99 ± 1,19	255,62 ± 5,96	9,36 ± 0,29	112,22 ± 2,84	933,27
50	5	146,66 ± 3,36	105,27 ± 2,44	178,60 ± 4,81	35,80± 0,89	213,30 ± 5,89	7,96 ± 0,3	93,88 ± 3,51	781,47
50	10	185,50 ± 2,90	133,14 ± 2,46	226,25 ± 4,94	43,09 ± 1,13	269,41 ± 3,89	10,49 ± 0,29	120,33 ± 2,3	988,21
50	15	102,24 ± 2,32	74,03 ± 1,81	128,17 ± 3,22	26,16 ± 0,81	152,06 ± 4,06	1,00 ± 0,02	67,03 ± 1,34	550,69
100	5	133,76 ± 3,86	95,75 ± 2,55	171,07 ± 11,34	37,44 ± 7,16	196,93 ± 10,19	7,65 ± 0,26	83,75 ± 2,54	726,35
100	10	178,95 ± 5,66	126,32 ± 3,61	222,76 ± 5,90	46,02 ± 1,57	259,50 ± 8,23	10,35 ± 0,26	113,66 ± 3,67	957,56
100	15	203,96 ± 5,67	144,19 ± 3,30	253,84 ± 5,37	52,92 ± 1,94	299,82 ± 8,56	11,93 ± 0,43	130,52 ± 3,93	1097,18

Tablica 4 Udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene HVED-a

Metanol		Fenolne kiseline			UKUPNO
HVED (Hz)	Vrijeme (min)	Klorogenska kiselina	Kava kiselina	4-hidroksi cinematna kiselina	
20	5,00	168,27 ± 5,04	2,81 ± 0,06	23,79 ± 0,59	194,87
20	10,00	190,52 ± 11,7	2,68 ± 0,14	23,91 ± 0,23	217,11
20	15,00	210,23 ± 9,57	2,63 ± 0,16	26,02 ± 0,97	238,88
50	5,00	166,81 ± 2,19	2,68 ± 0,10	26,93 ± 1,70	196,42
50	10,00	197,98 ± 14,93	2,67 ± 0,16	27,74 ± 0,92	228,39
50	15,00	209,00 ± 7,29	2,67 ± 0,17	27,89 ± 0,61	239,56
100	5,00	142,83 ± 2,73	2,46 ± 0,09	21,62 ± 0,32	166,91
100	10,00	173,46 ± 8,48	2,37 ± 0,14	25,11 ± 0,80	200,94
100	15,00	179,62 ± 6,80	2,27 ± 0,17	25,59 ± 0,64	207,48
Etanol					
20	5,00	224,30 ± 7,73	2,52 ± 0,06	16,82 ± 0,76	243,64
20	10,00	282,73 ± 5,57	2,91 ± 0,11	21,20 ± 0,21	306,84
20	15,00	322,65 ± 7,94	3,18 ± 0,12	23,29 ± 0,69	349,12
50	5,00	302,03 ± 5,67	2,98 ± 0,08	20,27 ± 0,37	325,28
50	10,00	373,83 ± 7,18	3,57 ± 0,10	24,59 ± 0,42	401,99
50	15,00	425,42 ± 14,87	1,63 ± 0,05	15,85 ± 0,31	442,90
100	5,00	256,38 ± 8,84	2,78 ± 0,07	18,53 ± 0,57	277,69
100	10,00	334,03 ± 11,74	3,32 ± 0,11	23,93 ± 0,48	361,28
100	15,00	378,60 ± 12,13	3,63 ± 0,10	26,67 ± 0,90	408,90

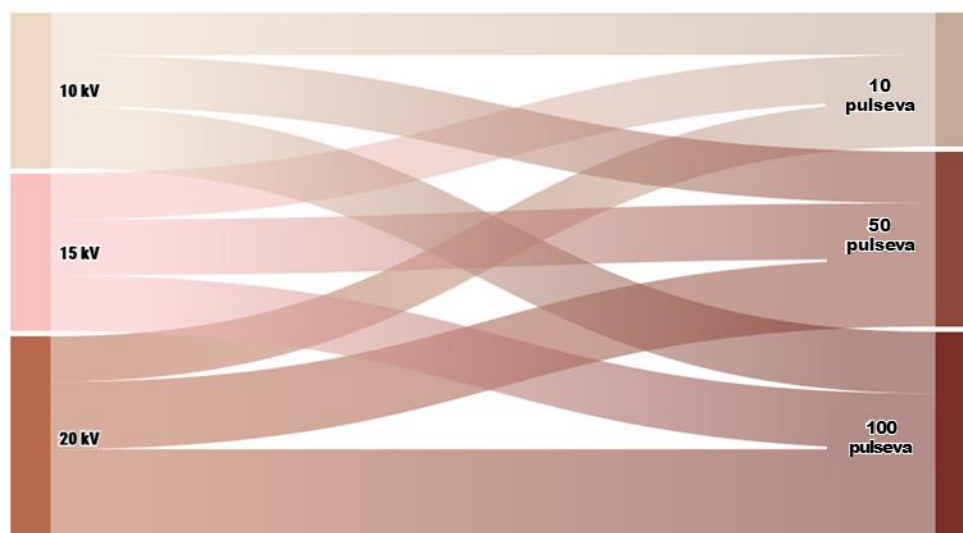
Tablica 5 Polifenolni prikaz flavanola nakon primjene HVED-a

Metanol		Flavanoli				UKUPNO
HVED (Hz)	Vrijeme (min)	Katehin	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Epikatehin	
20	5	26,31 ± 0,25	8,45 ± 0,19	64,38 ± 1,86	53,91 ± 0,83	153,05
20	10	28,43 ± 0,43	7,12 ± 0,65	62,25 ± 1,47	55,09 ± 0,70	152,89
20	15	30,96 ± 1,28	6,13 ± 0,55	68,87 ± 4,43	59,55 ± 2,82	165,51
50	5	32,48 ± 1,91	6,29 ± 0,46	73,07 ± 4,55	64,02 ± 3,79	175,86
50	10	33,12 ± 0,94	6,24 ± 0,40	76,06 ± 2,75	64,94 ± 1,45	180,36
50	15	34,02 ± 0,97	6,23 ± 0,56	76,34 ± 2,31	65,88 ± 1,58	182,47
100	5	25,48 ± 0,19	6,42 ± 0,38	53,89 ± 1,08	49,55 ± 1,22	135,34
100	10	29,62 ± 1,10	5,49 ± 0,31	64,01 ± 3,05	58,00 ± 2,02	157,12
100	15	30,57 ± 0,83	5,53 ± 0,35	66,73 ± 2,08	59,11 ± 1,59	161,94
Etanol						
20	5	18,77 ± 1,09	5,21 ± 0,16	44,13 ± 0,67	31,13 ± 0,70	99,24
20	10	21,63 ± 0,90	5,40 ± 0,26	54,50 ± 0,75	35,22 ± 2,10	116,75
20	15	26,19 ± 0,85	5,56 ± 0,20	61,00 ± 2,03	42,37 ± 1,64	135,12
50	5	23,38 ± 0,76	5,37 ± 0,07	56,75 ± 0,77	35,61 ± 1,33	121,11
50	10	27,38 ± 0,51	5,69 ± 0,15	68,75 ± 1,30	44,52 ± 0,87	146,34
50	15	20,00 ± 0,70	7,20 ± 0,18	37,71 ± 1,08	30,91 ± 0,77	95,82
100	5	21,70 ± 0,42	5,27 ± 0,05	49,59 ± 1,97	35,65 ± 0,91	112,21
100	10	28,16 ± 0,24	5,67 ± 0,10	64,23 ± 2,17	48,65 ± 0,79	146,71
100	15	30,39 ± 0,74	5,91 ± 0,13	72,98 ± 2,49	53,95 ± 1,18	163,23

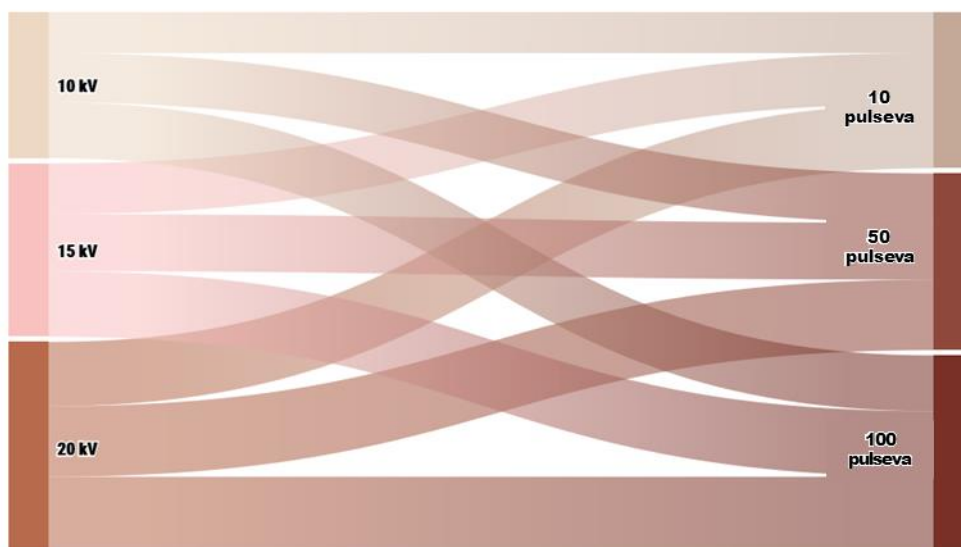
Tablica 6 Udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene HVED-a

Metanol		Flavonoli				
HVED (Hz)	Vrijeme (min)	Mirecetin	Kvercetin derivati	Kvercetin	Kampferol	UKUPNO
20	5	38,36 ± 1,12	11,63 ± 0,17	8,71 ± 0,13	16,17 ± 0,35	74,87
20	10	38,24 ± 0,31	11,28 ± 0,43	8,82 ± 0,06	16,10 ± 0,33	74,44
20	15	42,76 ± 2,67	9,90 ± 0,46	8,68 ± 0,29	16,52 ± 0,79	77,86
50	5	45,80 ± 3,40	10,80 ± 0,57	9,18 ± 0,43	17,51 ± 1,08	83,29
50	10	47,69 ± 2,46	11,31 ± 0,42	9,44 ± 0,23	18,21 ± 0,65	86,65
50	15	48,53 ± 1,85	11,07 ± 0,35	9,47 ± 0,29	18,56 ± 0,61	87,63
100	5	34,71 ± 0,61	9,86 ± 0,30	8,34 ± 0,12	14,46 ± 0,24	67,37
100	10	40,67 ± 1,52	9,09 ± 0,52	8,32 ± 0,30	15,53 ± 0,67	73,61
100	15	43,01 ± 1,59	9,39 ± 0,51	8,47 ± 0,28	16,23 ± 0,48	77,10
Etanol						
20	5	39,08 ± 0,88	9,66 ± 0,20	8,57 ± 0,14	13,30 ± 0,33	70,61
20	10	49,10 ± 0,61	10,54 ± 0,40	9,54 ± 0,24	15,95 ± 0,20	85,13
20	15	55,08 ± 1,52	10,78 ± 0,27	9,75 ± 0,26	17,12 ± 0,38	92,73
50	5	48,18 ± 1,16	10,66 ± 0,26	9,50 ± 0,20	15,44 ± 0,27	83,78
50	10	59,87 ± 1,34	12,31 ± 0,23	10,72 ± 0,17	17,88 ± 0,30	100,78
50	15	26,89 ± 0,77	9,22 ± 0,16	9,41 ± 0,17	12,38 ± 0,28	57,90
100	5	42,90 ± 1,30	10,29 ± 0,20	9,05 ± 0,15	14,18 ± 0,27	76,42
100	10	56,06 ± 1,96	12,10 ± 0,27	10,39 ± 0,24	17,30 ± 0,51	95,85
100	15	63,97 ± 2,25	13,05 ± 0,28	11,18 ± 0,23	19,15 ± 0,50	107,35

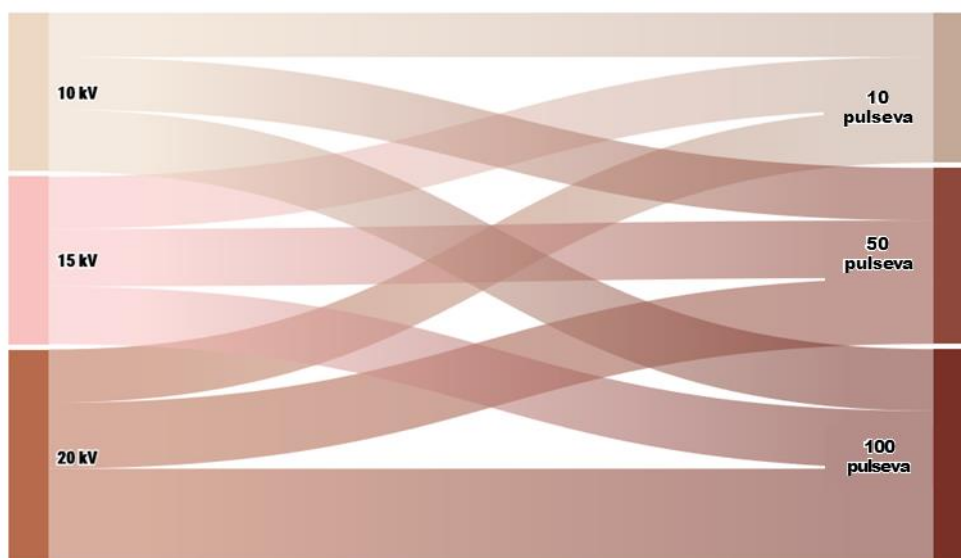
4.2. Utjecaj PEP-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost



Slika 13 Utjecaj PEP-a (broj impulsa 10, 50 i 100) pri 10, 15 i 20 Kv na polifenole komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 14 Utjecaj PEP-a (broj impulsa 10, 50 i 100) pri 10, 15 i 20 Kv na polifenole komine borovnice uz upotrebu otapala etanola



Slika 15 Utjecaj PEP-a (broj impulsa 10, 50 i 100) pri 10, 15 i 20 Kv na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 16 Utjecaj PEP-a (broj impulsa 10, 50 i 100) pri 10, 15 i 20 Kv na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala etanola

Tablica 7 Udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene PEP-a

Metanol		Antocijani							
PEP (kV/cm)	Br. Pulseva	Delfinidin-3- pirinozid	Delfinidin-3- arabinozid	Petunidin-3- pirinozid	Cijanidin-3- arabinozid	Peonidin-3- pirinozid	Peonidin-3- arabinozid	Malvidin-3- pirinozid	UKUPNO
10	10	177,70 ± 10,78	125,50 ± 5,33	222,39 ± 12,60	48,79 ± 3,37	270,18 ± 14,44	1,41 ± 0,20	116,78 ± 8,72	962,75
10	50	202,38 ± 10,85	143,46 ± 11,05	255,74 ± 20,02	52,43 ± 4,92	320,43 ± 23,07	1,50 ± 0,17	136,94 ± 11,36	1112,88
10	100	206,96 ± 3,71	146,98 ± 1,52	263,92 ± 12,29	58,49 ± 3,05	341,00 ± 10,18	1,73 ± 0,19	148,07 ± 3,24	1167,15
15	10	210,21 ± 11,62	149,62 ± 9,02	265,86 ± 13,47	59,77 ± 3,31	332,22 ± 16,36	1,56 ± 0,39	141,98 ± 6,19	1161,22
15	50	239,46 ± 6,99	174,41 ± 8,29	295,52 ± 20,43	62,89 ± 5,79	347,15 ± 24,64	1,83 ± 0,19	155,87 ± 11,05	1277,13
15	100	248,33 ± 12,46	178,99 ± 10,51	326,64 ± 17,45	68,57 ± 4,26	419,18 ± 27,02	1,83 ± 0,18	180,08 ± 9,31	1423,62
20	10	228,41 ± 7,58	161,90 ± 7,95	294,41 ± 11,87	60,80 ± 2,34	367,03 ± 13,34	1,72 ± 0,06	156,65 ± 6,17	1270,92
20	50	263,36 ± 5,38	183,62 ± 3,98	343,53 ± 2,73	77,21 ± 7,35	472,62 ± 40,17	2,01 ± 0,18	189,68 ± 10,29	1532,03
20	100	325,13 ± 10,14	230,93 ± 7,35	408,30 ± 12,17	87,65 ± 2,80	485,47 ± 18,70	2,63 ± 0,09	217,21 ± 6,38	1757,32
Etanol									
10	10	185,94 ± 13,92	132,99 ± 3,71	225 ± 8,04	48,20 ± 1,14	298,26 ± 10,54	5,47 ± 0,07	127,01 ± 4,18	1022,87
10	50	187,96 ± 5,08	135,52 ± 3,1	241,02 ± 4,53	50,98 ± 2,60	316,21 ± 7,63	5,23 ± 0,14	131,25 ± 3,72	1068,17
10	100	190,89 ± 5,23	143,61 ± 3,97	256,63 ± 5,52	55,03 ± 2,34	348,97 ± 7,09	6,70 ± 0,24	147,45 ± 3,67	1149,28
15	10	175,75 ± 8,54	127,31 ± 6,84	217,25 ± 8,19	47,09 ± 1,66	279,67 ± 11,45	4,95 ± 0,23	117,26 ± 7,54	969,28
15	50	169,08 ± 2,75	126,12 ± 1,82	222,3 ± 4,18	47,60 ± 1,00	293,73 ± 4,69	4,69 ± 0,24	126,44 ± 2,05	989,96
15	100	193,49 ± 9,05	153,4 ± 9,19	289,65 ± 14,8	60,66 ± 2,96	400,71 ± 17,97	7,07 ± 0,29	169,94 ± 7,39	1274,92
20	10	209,32 ± 8,70	152,16 ± 6,09	262,42 ± 8,91	55,95 ± 2,77	340,43 ± 13,96	5,92 ± 0,27	145,56 ± 6,77	1171,76
20	50	220,56 ± 7,80	162,98 ± 4,34	301,2 ± 23,05	67,17 ± 15,76	386,54 ± 19,83	7,36 ± 0,16	162,10 ± 5,93	1307,91
20	100	279,39 ± 10,73	205,24 ± 7,90	370,58 ± 14,00	79,13 ± 2,9	477,61 ± 17,45	11,33 ± 0,51	201,26 ± 8,81	1624,54

Tablica 8 Udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene PEP-a

Metanol		Fenolne kiseline			
PEP (kV/cm)	Br. Pulseva	Klorogenska kiselina	Kava kiselina	4-hidroksicinematna kiselina	UKUPNO
10	10	130,87 ± 6,51	2,78 ± 0,20	26,88 ± 0,57	160,53
10	50	116,84 ± 10,36	3,37 ± 0,21	29,47 ± 2,23	149,68
10	100	85,53 ± 2,56	2,90 ± 0,11	30,78 ± 1,05	119,21
15	10	97,50 ± 4,74	3,55 ± 0,29	28,42 ± 1,44	129,47
15	50	126,95 ± 3,15	3,51 ± 0,24	32,55 ± 2,12	163,01
15	100	133,41 ± 5,44	3,95 ± 0,27	36,27 ± 2,71	173,63
20	10	97,88 ± 6,61	4,06 ± 0,14	32,43 ± 1,43	134,37
20	50	157,15 ± 14,03	4,30 ± 0,42	40,30 ± 2,97	201,75
20	100	551,29 ± 5,08	4,93 ± 0,21	44,57 ± 1,43	600,79
Etanol					
10	10	297,91 ± 10,07	3,39 ± 0,08	30,43 ± 1,23	331,73
10	50	216,55 ± 5,45	3,70 ± 0,14	32,55 ± 1,06	252,80
10	100	279,64 ± 8,22	3,47 ± 0,12	33,43 ± 1,37	316,54
15	10	197,80 ± 10,44	3,46 ± 0,16	28,74 ± 0,81	230,00
15	50	188,52 ± 4,82	3,66 ± 0,11	29,89 ± 0,67	222,07
15	100	253,91 ± 11,81	4,99 ± 0,17	35,49 ± 1,73	294,39
20	10	270,83 ± 3,46	3,80 ± 0,24	33,90 ± 1,13	308,53
20	50	372,75 ± 15,78	4,36 ± 0,11	37,52 ± 1,29	414,63
20	100	568,86 ± 4,83	6,86 ± 0,19	49,75 ± 1,51	625,47

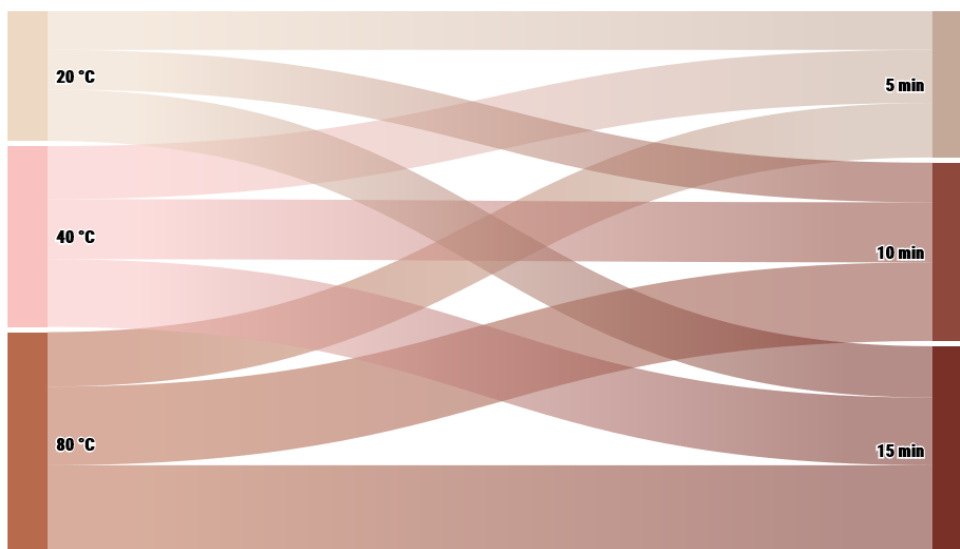
Tablica 9 Udio pojedinačnih flavanola u ekstraktu nakon primjene PEP-a

Metanol		Flavanoli				
PEP (kV/cm)	Br. Pulseva	Katehin	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Epikatehin	UKUPNO
10	10	33,63 ± 1,64	7,68 ± 0,36	68,18 ± 3,76	56,48 ± 3,01	165,97
10	50	44,86 ± 2,38	8,74 ± 0,67	86,01 ± 5,61	60,54 ± 4,57	200,15
10	100	45,21 ± 0,34	8,04 ± 0,32	89,39 ± 2,71	63,01 ± 1,46	205,65
15	10	44,53 ± 1,98	8,63 ± 0,84	86,5 ± 3,69	65,15 ± 2,35	204,81
15	50	50,42 ± 2,96	9,47 ± 0,64	94,44 ± 6,92	70,83 ± 5,47	225,16
15	100	57,35 ± 2,54	10,00 ± 0,26	110,84 ± 7,62	75,88 ± 5,03	254,07
20	10	49,49 ± 2,08	8,52 ± 0,33	92,4 ± 5,37	70,75 ± 5,65	221,16
20	50	60,57 ± 3,81	10,74 ± 0,09	119,25 ± 8,51	85,50 ± 7,39	276,06
20	100	59,27 ± 1,40	12,11 ± 0,44	130,3 ± 4,81	96,18 ± 3,39	297,86
Etanol						
10	10	39,56 ± 0,81	5,98 ± 0,11	80,32 ± 3,30	54,43 ± 12,67	180,29
10	50	46,09 ± 0,38	5,83 ± 0,21	85,74 ± 1,13	45,54 ± 1,62	183,20
10	100	46,02 ± 0,88	5,99 ± 0,32	90,81 ± 3,21	50,74 ± 2,92	193,56
15	10	37,74 ± 0,90	5,69 ± 0,27	72,01 ± 3,69	44,35 ± 0,88	159,79
15	50	43,14 ± 1,86	5,90 ± 0,08	80,86 ± 3,37	40,47 ± 4,31	170,37
15	100	57,46 ± 1,76	6,28 ± 0,13	111,91 ± 5,26	47,91 ± 1,99	223,56
20	10	45,03 ± 1,86	6,14 ± 0,19	86,20 ± 3,91	47,86 ± 0,43	185,23
20	50	49,84 ± 1,45	6,43 ± 0,15	94,64 ± 2,93	51,20 ± 1,55	202,11
20	100	59,34 ± 2,54	7,65 ± 0,17	123,16 ± 4,58	74,72 ± 1,55	264,87

Tablica 10 Udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene PEP-a

Metanol		Flavonoli				
PEP (kV/cm)	Br. Pulseva	Mirecetin	Kvercetin derivati	Kvercetin	Kampferol	UKUPNO
10	10	43,27 ± 2,33	11,72 ± 0,42	12,33 ± 0,42	20,74 ± 1,08	88,06
10	50	52,92 ± 4,42	13,45 ± 0,67	13,48 ± 1,05	25,11 ± 1,67	104,96
10	100	54,94 ± 1,32	14,12 ± 0,42	13,23 ± 0,22	25,93 ± 0,61	108,22
15	10	52,30 ± 2,56	13,13 ± 0,34	14,15 ± 0,27	24,54 ± 1,35	104,12
15	50	61,18 ± 4,42	14,73 ± 0,83	14,93 ± 0,61	27,93 ± 1,21	118,77
15	100	66,01 ± 3,94	14,55 ± 0,79	15,13 ± 0,99	29,05 ± 1,81	124,74
20	10	57,90 ± 3,30	12,64 ± 0,50	15,01 ± 0,87	25,09 ± 1,19	110,64
20	50	72,78 ± 6,29	15,83 ± 1,09	16,29 ± 0,75	32,13 ± 2,45	137,03
20	100	83,21 ± 3,17	15,48 ± 0,65	18,45 ± 0,58	33,26 ± 1,23	150,40
Etanol						
10	10	54,30 ± 1,89	14,00 ± 0,26	14,75 ± 0,36	25,61 ± 0,70	108,66
10	50	59,51 ± 1,86	13,87 ± 0,54	14,93 ± 0,33	26,18 ± 1,02	114,49
10	100	62,48 ± 2,06	15,14 ± 0,41	15,59 ± 0,40	28,37 ± 0,95	121,58
15	10	51,94 ± 3,06	12,46 ± 0,47	14,24 ± 0,63	22,64 ± 1,20	101,28
15	50	58,82 ± 1,76	13,52 ± 0,56	14,76 ± 0,50	25,50 ± 0,76	112,60
15	100	72,40 ± 3,52	16,47 ± 0,52	16,95 ± 0,57	32,21 ± 1,55	138,03
20	10	61,91 ± 3,42	13,91 ± 0,37	15,96 ± 0,58	26,32 ± 1,18	118,10
20	50	67,86 ± 2,32	15,25 ± 0,30	16,91 ± 0,39	30,32 ± 0,85	130,34
20	100	84,90 ± 3,56	17,39 ± 0,55	20,17 ± 0,70	35,08 ± 1,24	157,54

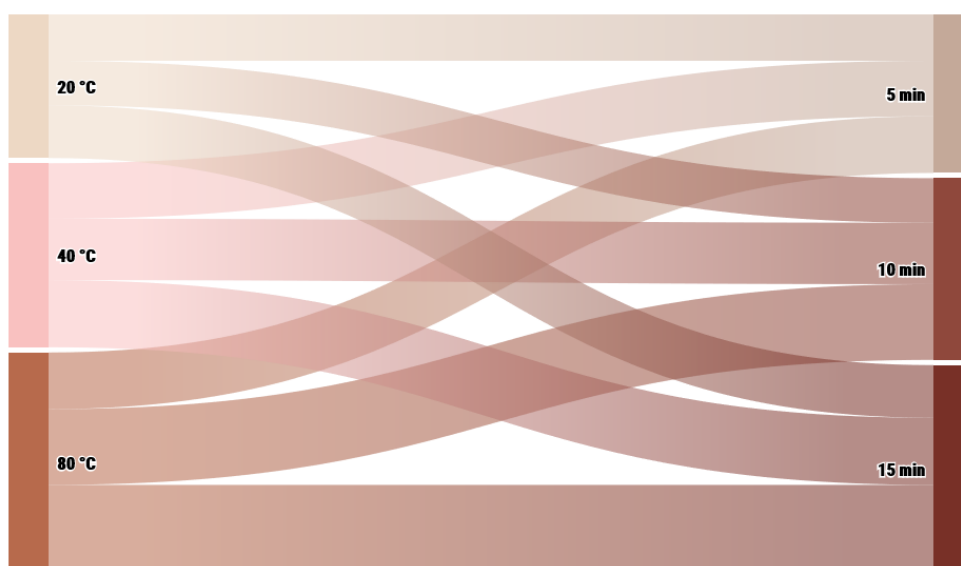
4.3. Utjecaj UZ-a na polifenole i antioksidacijsku aktivnost



Slika 17 Utjecaj UZ-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri temperaturama od 20, 40 i 80 °C na ekstrakciju polifenola komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 18 Utjecaj UZ-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri temperaturama od 20, 40 i 80 °C na ekstrakciju polifenola komine borovnice uz upotrebu otapala etanola



Slika 19 Utjecaj UZ-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri temperaturama od 20, 40 i 80 °C na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala metanola



Slika 20 Utjecaj UZ-a (u trajanju od 5, 10 i 15 min) pri temperaturama od 20, 40 i 80 °C na antioksidacijsku aktivnost komine borovnice uz upotrebu otapala etanola

Tablica 11 Udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene UZ-a

Metanol		Antocijani							
UZ (T °C)	Vrijeme (min)	Delfinidin-3- pirinozid	Delfinidin-3- arabinozid	Petunidin-3- pirinozid	Cijanidin-3- arabinozid	Peonidin-3- pirinozid	Peonidin-3- arabinozid	Malvidin-3- pirinozid	UKUPNO
20	5	73,60 ± 3,27	53,96 ± 2,26	90,33 ± 4,12	18,59 ± 0,86	114,96 ± 5,35	0,66 ± 0,04	49,84 ± 2,37	401,94
20	10	76,36 ± 2,23	56,41 ± 1,76	94,01 ± 3,01	18,59 ± 0,61	114,16 ± 3,89	2,28 ± 0,06	49,33 ± 2,05	411,14
20	15	100,01 ± 5,53	72,44 ± 3,93	122,48 ± 6,23	23,44 ± 0,85	146,78 ± 7,75	4,12 ± 0,28	63,90 ± 3,98	533,17
40	5	102,24 ± 2,32	74,03 ± 1,81	128,17 ± 3,22	26,16 ± 0,81	152,06 ± 4,06	1,00 ± 0,02	67,03 ± 1,34	550,69
40	10	116,83 ± 5,12	84,49 ± 3,55	145,41 ± 6,57	29,93 ± 1,29	169,60 ± 7,37	1,12 ± 0,06	75,61 ± 3,64	622,99
40	15	132,09 ± 8,63	94,68 ± 6,02	164,35 ± 11,45	33,62 ± 1,85	191,19 ± 12,97	1,28 ± 0,12	85,19 ± 5,80	702,40
80	5	108,87 ± 4,58	79,96 ± 3,46	132,15 ± 6,63	28,00 ± 2,11	148,29 ± 8,72	0,89 ± 0,09	67,40 ± 3,76	565,56
80	10	156,31 ± 8,85	114,30 ± 6,40	190,59 ± 10,71	41,67 ± 2,64	214,49 ± 13,5	1,40 ± 0,12	97,52 ± 5,94	816,28
80	15	175,59 ± 7,32	128,90 ± 5,07	216,13 ± 7,99	45,28 ± 1,44	252,73 ± 10,43	2,16 ± 0,07	113,12 ± 4,67	933,91
Etanol									
20	5	52,95 ± 0,87	40,80 ± 1,05	64,36 ± 1,22	12,40 ± 0,26	80,07 ± 2,45	1,40 ± 0,02	33,75 ± 0,95	285,73
20	10	76,36 ± 2,23	56,41 ± 1,76	94,01 ± 3,01	18,59 ± 0,61	114,16 ± 3,89	2,28 ± 0,06	49,33 ± 2,05	411,14
20	15	100,01 ± 5,53	72,44 ± 3,93	122,48 ± 6,23	23,44 ± 0,85	146,78 ± 7,75	4,12 ± 0,28	63,90 ± 3,98	533,17
40	5	62,29 ± 2,27	46,44 ± 1,87	73,13 ± 3,27	13,45 ± 0,36	82,88 ± 4,75	1,41 ± 0,04	37,10 ± 2,45	316,70
40	10	79,30 ± 3,16	58,12 ± 2,57	93,87 ± 4,98	17,38 ± 0,58	105,80 ± 5,8	1,90 ± 0,06	47,52 ± 2,61	403,89
40	15	120,50 ± 2,84	88,06 ± 2,19	153,57 ± 12,24	32,90 ± 8,39	181,80 ± 10,59	5,08 ± 0,13	77,01 ± 2,09	658,92
80	5	124,94 ± 2,59	92,61 ± 2,16	155,35 ± 3,96	29,97 ± 0,88	201,58 ± 4,94	4,13 ± 0,11	86,36 ± 1,95	694,94
80	10	146,36 ± 3,28	107,94 ± 2,15	183,81 ± 4,09	36,57 ± 0,65	226,42 ± 4,54	4,80 ± 0,10	98,60 ± 2,56	804,50
80	15	182,33 ± 6,15	131,75 ± 4,68	224,11 ± 7,91	43,37 ± 1,36	264,54 ± 9,86	6,29 ± 0,31	116,89 ± 4,68	969,28

Tablica 12 Udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene UZ-a

Metanol		Fenolne kiseline			
UZ (T °C)	Vrijeme (min)	Klorogenska kiselina	Kava kiselina	4-hidroksicinematna kiselina	UKUPNO
20	5	220,06 ± 15,75	1,31 ± 0,11	12,10 ± 0,42	233,47
20	10	342,73 ± 6,23	1,61 ± 0,05	13,22 ± 0,29	357,56
20	15	439,57 ± 29,82	1,77 ± 0,15	16,69 ± 0,21	458,03
40	5	425,42 ± 14,87	1,63 ± 0,05	15,85 ± 0,31	442,90
40	10	461,50 ± 14,64	1,77 ± 0,07	17,76 ± 0,74	481,03
40	15	539,92 ± 20,67	1,93 ± 0,08	19,41 ± 1,10	561,26
80	5	227,08 ± 11,94	1,79 ± 0,06	16,86 ± 0,69	245,73
80	10	332,86 ± 20,71	2,19 ± 0,10	22,58 ± 1,35	357,63
80	15	372,99 ± 14,32	2,32 ± 0,07	26,24 ± 0,86	401,55
Etanol					
20	5	170,20 ± 5,84	1,37 ± 0,04	10,13 ± 0,10	181,70
20	10	197,97 ± 21,29	1,61 ± 0,05	13,22 ± 0,29	212,80
20	15	250,41 ± 4,87	1,77 ± 0,15	16,69 ± 0,21	268,87
40	5	143,46 ± 2,92	1,44 ± 0,05	10,66 ± 0,54	155,56
40	10	184,11 ± 9,56	1,66 ± 0,06	12,61 ± 0,29	198,38
40	15	442,98 ± 13,05	2,13 ± 0,06	18,40 ± 0,47	463,51
80	5	350,38 ± 33,72	2,25 ± 0,04	18,85 ± 0,38	371,48
80	10	451,21 ± 11,93	2,57 ± 0,34	19,35 ± 0,28	473,13
80	15	471,95 ± 2,17	2,69 ± 0,1	20,24 ± 0,85	494,88

Tablica 13 Udio pojedinačnih flavanola u ekstraktu nakon primjene UZ-a

Metanol		Flavanoli				
UZ (T °C)	Vrijeme (min)	Katehin	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Epikatehin	UKUPNO
20	5	18,11 ± 0,89	6,11 ± 0,71	32,79 ± 2,84	22,46 ± 1,42	79,47
20	10	15,98 ± 0,38	5,21 ± 0,10	30,32 ± 1,07	18,87 ± 0,39	70,38
20	15	18,19 ± 1,84	5,36 ± 0,39	36,73 ± 2,99	23,48 ± 1,25	83,76
40	5	20,00 ± 0,70	7,20 ± 0,18	37,71 ± 1,08	30,91 ± 0,77	95,82
40	10	21,77 ± 0,84	7,94 ± 0,23	41,79 ± 1,83	35,62 ± 1,44	107,12
40	15	23,30 ± 1,30	8,42 ± 0,29	45,58 ± 2,83	39,64 ± 2,51	116,94
80	5	19,58 ± 0,82	7,62 ± 0,11	37,86 ± 1,93	33,08 ± 1,36	98,14
80	10	25,65 ± 1,30	9,13 ± 0,33	52,00 ± 2,74	46,51 ± 3,05	133,29
80	15	30,98 ± 1,06	9,66 ± 0,31	63,05 ± 2,38	52,35 ± 2,08	156,04
Etanol						
20	5	14,30 ± 0,30	4,75 ± 0,16	26,02 ± 1,60	14,08 ± 0,42	59,15
20	10	15,98 ± 0,38	5,21 ± 0,10	30,32 ± 1,07	18,87 ± 0,39	70,38
20	15	18,19 ± 1,84	5,36 ± 0,39	36,73 ± 2,99	23,48 ± 1,25	83,76
40	5	12,41 ± 0,32	4,97 ± 0,13	22,21 ± 0,83	13,75 ± 1,02	53,34
40	10	15,09 ± 0,35	5,26 ± 0,11	26,99 ± 0,83	17,99 ± 0,88	65,33
40	15	22,79 ± 0,73	5,90 ± 0,14	45,30 ± 1,50	26,55 ± 1,57	100,54
80	5	25,67 ± 0,87	6,08 ± 0,13	54,39 ± 1,10	26,30 ± 1,66	112,44
80	10	28,04 ± 1,70	5,79 ± 0,10	57,73 ± 2,48	29,48 ± 2,53	121,04
80	15	30,34 ± 1,66	5,70 ± 0,25	63,08 ± 1,68	34,84 ± 2,37	133,96

Tablica 14 Udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene UZ-a

Metanol		Flavonoli				
UZ (T °C)	Vrijeme (min)	Mirecetin	Kvercetin derivati	Kvercetin	Kampferol	UKUPNO
20	5	21,42 ± 1,00	8,20 ± 0,19	8,35 ± 0,22	10,89 ± 0,33	48,86
20	10	24,31 ± 0,89	8,50 ± 0,16	8,84 ± 0,17	11,39 ± 0,32	53,04
20	15	29,22 ± 1,74	9,52 ± 0,31	10,09 ± 0,39	13,23 ± 0,60	62,06
40	5	26,89 ± 0,77	9,22 ± 0,16	9,41 ± 0,17	12,38 ± 0,28	57,90
40	10	29,81 ± 1,44	9,73 ± 0,28	10,05 ± 0,27	13,29 ± 0,48	62,88
40	15	33,20 ± 2,15	10,42 ± 0,39	10,75 ± 0,44	14,53 ± 0,70	68,90
80	5	27,98 ± 1,38	9,15 ± 0,26	9,53 ± 0,30	12,11 ± 0,45	58,77
80	10	38,78 ± 2,40	10,89 ± 0,38	11,76 ± 0,50	15,04 ± 0,73	76,47
80	15	46,11 ± 1,82	12,11 ± 0,29	13,18 ± 0,39	17,23 ± 0,51	88,63
Etanol						
20	5	20,00 ± 0,84	7,74 ± 0,16	7,98 ± 0,14	10,08 ± 0,28	45,80
20	10	24,31 ± 0,89	8,50 ± 0,16	8,84 ± 0,17	11,39 ± 0,32	53,04
20	15	29,22 ± 1,74	9,52 ± 0,31	10,09 ± 0,39	13,23 ± 0,60	62,06
40	5	19,38 ± 1,00	7,54 ± 0,24	8,04 ± 0,25	9,57 ± 0,31	44,53
40	10	22,76 ± 1,09	8,14 ± 0,22	8,72 ± 0,19	10,67 ± 0,40	50,29
40	15	34,76 ± 0,98	10,34 ± 0,17	11,19 ± 0,22	14,74 ± 0,31	71,03
80	5	40,36 ± 0,90	11,15 ± 0,15	11,87 ± 0,18	16,11 ± 0,28	79,49
80	10	43,50 ± 1,07	11,16 ± 0,19	12,59 ± 0,24	16,74 ± 0,37	83,99
80	15	49,87 ± 1,94	11,38 ± 0,39	13,94 ± 0,45	18,11 ± 0,60	93,30

5. RASPRAVA

U ovom radu provedeno je istraživanje o učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja, pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka uz upotrebu otapala na bazi metanola odnosno etanola.

Na **Slikama 9 i 10** je prikazan utjecaj HVED-a na ekstrakciju ukupnih polifenola iz komine borovnice. Na slikama se može vidjeti da je najveći udio polifenola ekstrahiran pri uvjetima za ekstrakciju: frekvencija od 50 Hz u vremenskom trajanju od 15 min, uz upotrebu otapala na bazi metanola. Najmanji udio ukupnih polifenolnih spojeva postignut je ekstrakcijom pri frekvenciji od 20 Hz, vremenskom trajanju od 5 min, uz upotrebu otapala etanola, dok se na **Slikama 11 i 12** može se vidjeti da je utjecajem HVED-a najveća antioksidacijska aktivnost ekstrakta postignuta pri uvjetima za ekstrakciju: frekvenciji od 100 Hz u vremenskom trajanju od 15 min, uz upotrebu otapala na bazi etanola, dok je ekstrakt dobiven pri uvjetima: frekvencija od 20 Hz u vremenskom trajanju od 5 min, također uz upotrebu otapala na bazi etanola imao najmanju antioksidacijsku aktivnost. Ovi rezultati su samo nešto veći uspoređujući ostale uvjete ekstrakcije, što znači da povećanjem frekvencije te vremenskog trajanja tretmana nije dovelo do znatno boljih rezultata. U istraživanjima upotreba HVED-a pokazala se zadovoljavajućom metodom za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa (Bousseta i sur. 2009; Bousseta i sur. 2011) te iz sjemenki grožđa (Liu i sur., 2011). Također, u drugim istraživanjima pokazalo se da je upotreba HVED-a bila učinkovitija metoda od upotrebe PEP-a za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa (Bousseta i sur., 2009), komine grožđa (Barba i sur., 2015) te kore manga (Parniakov i sur., 2016). U ovom istraživanju nije zabilježen takav slučaj te se upotreba PEP-a pokazala kao najbolja metoda za ekstrakciju polifenola iz komine borovnice.

Na **Slikama 13 i 14** je prikazan utjecaj PEP-a na ekstrakciju ukupnih polifenola iz komine borovnice. Na slikama se može vidjeti da je najveći udio polifenola ekstrahiran pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola. Najmanji udio ukupnih polifenolnih spojeva postignut je ekstrakcijom pri jakosti polja od 10 kV/cm, s brojem impulsa 10 uz upotrebu otapala na bazi metanola, što je također najviše i u odnosu na druge provedene metode (HVED i UZ). Na **Slikama 15 i 16** može se vidjeti da je utjecajem PEP-a najveća antioksidacijska aktivnost ekstrakta postignuta pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola, dok je ekstrakt dobiven pri uvjetima: jakost polja od 5 kV/cm, s brojem impulsa 20

također uz upotrebu otapala na bazi etanola imao najmanju antioksidacijsku aktivnost. Ovi rezultati su se dosta razlikovali ako se usporede uvjeti ekstrakcije, što znači da povećanjem jačine pulsa te povećanje vremenskog trajanja tretmana je dovelo do znatno boljih rezultata. U istraživanjima upotreba PEP-a kao i u ovom radu pokazala se dobrom metodom za ekstrakciju polifenola iz kore naranče (Luengo i sur., 2013), antocijana iz komine borovnice (Zhou i sur., 2015) te polifenola, odnosno antocijana iz komine kupine (Lamanauskas i sur., 2016). U drugom istraživanju upotreba PEP-a pokazala se dobrom metodom za ekstrakciju antocijana iz kože grožđa, ali se nije pokazala baš učinkovitom kod ekstrakcije antocijana iz kože šljive (Medina-Meza i Brabarosa-Canovas, 2015).

Na **Slikama 17 i 18** je prikazan utjecaj UZ-a na ekstrakciju ukupnih polifenola iz komine borovnice. Na slikama se može vidjeti da je najveći udio polifenola ekstrahiran pri uvjetima za ekstrakciju: temperatura od 80 °C u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi etanola. Najmanji udio ukupnih polifenolnih spojeva postignut je ekstrakcijom pri temperaturi od 20 °C u vremenskom trajanju od 5 min također uz upotrebu otapala na bazi etanola. Na **Slikama 19 i 20** može se vidjeti da je utjecajem UZ-a najveća antioksidacijska aktivnost ekstrakta postignuta pri uvjetima za ekstrakciju: temperatura od 80 °C u vremenskom trajanju od 15 min, uz upotrebu otapala na bazi metanola, dok je ekstrakt dobiven pri temperaturi od 40 °C u vremenskom trajanju od 5 min, uz upotrebu otapala na bazi etanola imao najmanju antioksidacijsku aktivnost. Ovi rezultati su se također dosta razlikovali ako se usporede uvjeti ekstrakcije, što znači da povećanjem temperature te povećanjem vremenskog trajanja tretmana je dovelo do znatno boljih rezultata.

Na **Slikama 15 i 16** može se vidjeti da su najveću antioksidativnu aktivnost imali ekstrakti dobiveni upotrebom PEP-a, u odnosu na ekstrakte dobivene upotrebom HVED-a prikazane na **Slikama 11 i 12** i ekstrakte dobivene primjenom UZ-a prikazane na **Slikama 19 i 20**. Na **Slici 16** može se vidjeti da je najveća antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivena uz pomoć PEP-a pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola. U vezi s tim, neka istraživanja koja su procijenjivala potencijal primjene PEP-a i HVED-a za ekstrakciju vrijednih bioaktivnih spojeva iz otpada nastalog preradom voća, kao na primjer iz kore i sjemenki papaje i manga, su pokazala obećavajuće rezultate (Parniakov i sur., 2014a, 2015a, 2015b). Autori su procjenjivali učinak PEP-a u kombinaciji s konvencionalnom vodenom ekstrakcijom na 50 °C. Otkrili su da je ova dvostupanjska ekstrakcija

značajno povećala iskorištenje antioksidativnih spojeva u vodenom mediju, čak i pri neutralnom pH, izbjegavajući na taj način upotrebu toksičnih otapala, smanjujući vrijeme ekstrakcije, temperaturu i upotrebu kiseline u usporedbi s uobičajenim tretmanima. Iako se ne radi o istom promatranom uzorku, može se povući paralela o učinkovitosti PEP-a na antioksidacijsku aktivnost u odnosu na HVED i UZ.

Tablica 3 prikazuje udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene HVED-a. Najzastupljeniji polifenoli iz skupine antocijana, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom HVED-om, su peonidin-3-pirinozid i petunidin-3-pirinozid, a najviše antocijana ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: frekvencija od 50 Hz u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 4 prikazuje udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene HVED-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine fenolnih kiselina, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom HVED-om, je klorogena kiselina, a najviše fenolnih kiselina ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: frekvencija od 50 Hz u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Tablica 5 prikazuje polifenolni prikaz flavanola nakon primjene HVED-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavanola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom HVED-om, je procijanidin B2, a najviše flavanola ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: frekvencija od 50 Hz u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 6 prikazuje udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene HVED-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavonola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom HVED-om, je mirecetin, a najviše flavonola ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: frekvencija od 100 Hz u vremenskom trajanju od 15 min uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Tablica 7 prikazuje udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene PEP-a. Najzastupljeniji polifenoli iz skupine antocijana, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom PEP-om, su peonidin-3-pirinozid i petunidin-3-pirinozid, a najviše antocijana ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 8 prikazuje udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene PEP-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine fenolnih kiselina, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom

potpomugnotom PEP-om, je klorogenska kiselina, a najviše fenolnih kiselina ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Tablica 9 prikazuje udio pojedinačnih flavanola u ekstraktu nakon primjene PEP-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavanola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom PEP-om, je procijanidin B2, a najviše flavanola ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 10 prikazuje udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene PEP-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavonola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom PEP-om, je mirecetin, a najviše flavonola ekstrahirano je pri uvjetima za ekstrakciju od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Tablica 11 prikazuje udio pojedinačnih antocijana u ekstraktu nakon primjene UZ-a. Najzastupljeniji polifenoli iz skupine antocijana, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom UZ-om, su peonidin-3-pirinozid i petunidin-3-pirinozid, a najviše antocijana je ekstrahirano pri temperaturi od 80 °C u vremenskom trajanju od 15 minuta uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Tablica 12 prikazuje udio pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktu nakon primjene UZ-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine fenolnih kiselina, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom UZ-om, je klorogena kiselina, a najviše fenolnih kiselina ekstrahirano je pri temperaturi od 40 °C u vremenskom trajanju od 15 minuta uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 13 prikazuje udio pojedinačnih flavanola u ekstraktu nakon primjene UZ-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavanola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomugnotom UZ-om, je procijanidin B2, a najviše flavanola ekstrahirano je pri temperaturi od 80 °C u vremenskom trajanju od 15 minuta uz upotrebu otapala na bazi metanola.

Tablica 14 prikazuje udio pojedinačnih flavonola u ekstraktu nakon primjene UZ-a. Najzastupljeniji polifenol iz skupine flavonola, u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomognutom UZ-om, je mirecetin, a najviše flavonola ekstrahirano je pri temperaturi od 80 °C u vremenskom trajanju od 15 minuta uz upotrebu otapala na bazi etanola.

Iz **Tablica 3-11** može se vidjeti da najveći udio ekstrahiranih komponenti ukupnih polifenola otpada na antocijane. **Tablica 3** pokazuje da je najviše antocijana ekstrahirano metodom

potpomognutom PEP-om pri uvjetima za ekstrakciju: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100, te nešto malo više uz upotrebu otapala metanola u odnosu na etanol. Slično su potvrdili i znanstvenici u istraživanju u kojem je procijenjen učinak PEP-a i ultrazvuka na ekstrakciju antocijana iz nusproizvoda prerade borovnice (Zhou i sur., 2015). U istraživanju je ustanovljeno da su najbolji uvjeti koji omogućavaju optimalnu ekstrakciju antocijanina upotrebom PEP-a sljedeći: jakost polja od 20 kV/cm korištenjem otapala na bazi etanola (60 %, zakiseljenog klorovodičnom kiselinom pri 0,1 % v/v) i omjer tekuće:tekuće (1:6 (mL/mL)). Pod tim uvjetima, iskorištenje antocijanina bilo je 223,13 mg/L. Također je uočeno da se primjenom PEP-a smanjuje temperatura i vrijeme ekstrakcije u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom UZ-om.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog eksperimentalnog istraživanja o učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja, pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka uz upotrebu otapala na bazi metanola odnosno etanola izvedeni su sljedeći zaključci:

- Najviše ukupnih polifenola dobilo se ekstrakcijom potpomognutom pulsirajućim električnim poljem, pri sljedećim uvjetima: jakost polja 20 kV/cm s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola, dok je najmanje ukupnih polifenola dobiveno ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri temperaturi od 20 °C , u vremenskom trajanju od 5 min uz upotrebu otapala na bazi etanola.
- Najveću antioksidativnu aktivnost imao je ekstrakt dobiven ekstrakcijom potpomognutom pulsirajućim električnim poljem, pri sljedećim uvjetima: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 uz upotrebu otapala na bazi etanola, dok je najmanju antioksidativnu aktivnost imao ekstrakt dobiven ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri temperaturi od 40 °C u vremenskom trajanju od 5 min i uz upotrebu otapala na bazi etanola.
- Najbolja metoda za ekstrakciju antocijana pokazala se ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem pri sljedećim uvjetima: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 i uz upotrebu otapala na bazi metanola.
- Najbolja metoda za ekstrakciju fenolnih kiselina pokazala se ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem pri sljedećim uvjetima: jakost polja 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 i uz upotrebu otapala na bazi etanola.
- Najbolja metoda za ekstrakciju flavonola pokazala se ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem pri sljedećim uvjetima: jakost polja od 20 kV/cm, s brojem impulsa 100 i uz upotrebu otapala na bazi metanola.

7. LITERATURA

- Asavasanti S, Ersus S, Ristenpart W, Stroeve P, Barrett DM: Critical electric field strengths of onion tissues treated by pulsed electric fields. *J. Food Sci.* 75, E433–E443, 2010.
- Bačić T, Sabo M: Filogenetska sistematika stablašica (Embriophyta-Cormophyta), Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2006.
- Barba FJ, Brianceau S, Turk M, Boussetta N, Vorobiev E: Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 1139-1148. doi:10.1007/s11947-015-1482-3, 2015.
- Boussetta N, Lebovka N, Vorobiev E, Adenier H, Bedel-Cloutour C, Lanoisellé JL: Electrically assisted extraction of soluble matter from chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1491–1497, 2009.
- Boussetta N, Soichi E, Lanoiselle JL, Vorobiev E: Valorization of oilseed residues: extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Ind. Crops Prod.* 52, 347–353, 2014.
- Boussetta N, Turk M, De Taeye C, Larondelle Y, Lanoiselle JL, Vorobiev E: Effect of high voltage electrical discharges, heating and Etanol concentration on the extraction of polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Ind. Crops Prod.* 49, 690–696, 2013.
- Boussetta N, Vorobiev E, Deloison V, Pochez F, Falcimaigne-Cordin A, Lanoisellé JL: Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128(2), 364-370.
- Boussetta N, Vorobiev E, Le LH, Cordin-Falcimaigne A, Lanoisellé JL: Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT – Food Sci. Technol.* 46, 127–134, 2012a.
- Boussetta N, Vorobiev E: Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: a review. *Comptes Rendus Chim.* 17, 197–203, 2014.
- Bravo L: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56, 317-333., 1998.

- Brenneisen VR, Steingger: Analysis of polyphenols from *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae) fruit. *Pharma. Acta Helvetiae*. 56, 180–185, 1981.
- Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI: The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 30 (4): str. 490-493, 2011.
- Cullen PJ, Tiwari BK, Valdramidis VP: *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*, 2012.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4): str. 348-361, 2007. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.035, 2011.
- Du Q, Jerz G, Winterhalter: Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatography. A*. 1045:59–63, 2004.
- Dunn J, Barbosa-Canovas G, Zhang QH (Eds.): *Pulsed Electric Fields in Food Processing, Fundamental Aspects and Applications*. Technomic Press, Lancaster, PA, pp. 1–30, 2011.
- Erlund I: Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24:851-874, 2004.
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold A, Haffner K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug JØ, Jacobs D.R, Blomhoff R: A systematic screening of antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition* 132, 461-471, 2002.
- Heinz V, Álvarez I, Angersbach A, Knorr D: Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 103–111, 2001.
- Jamison JR: Bilberry fruit (*Vaccinium myrtillus*). In Jamison JR (Ed.). *Clinical guide to nutrition and dietary supplements in disease management*. (p. 449–451) London, UK: Churchill Livingstone, 2003.

- Joshi AA, Locke BR, Arce P, Finney WC: Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 41:3 – 30, 1995.
- Kähkönen P, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M: Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1403-1411, 2003.
- Kaić-Rak A, AntoniĆ K: Tablice o sastavu namirnica i pića, Zavod za zaštitu zdravlja Sr Hrvatske, 1990.
- Kirkpatrick MJ, Locke BR: Hydrogen, Oxygen and Hydrogen Peroxide Formation in Aqueous Phase Pulsed Corona Electrical Discharge. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44: 4243-4248, 2005.
- Komen V: Elektrotehnika, interni materijal, Veleučilište u Rijeci, 2018.
- Kozakova Z: Electric Discharges in Water Solutions. Habilitation thesis, Brno University of Technology, Brno, 2011.
- Lelas V: Nove tehnike procesiranja hrane, *Mljekarstvo* 56 (4) 311-330, 2006.
- Liu D, Vorobiev E, Savoie R, Lanoisellé JL: Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 81(2), 134-140. doi:10.1016/j.seppur.2011.07.012, 2011.
- Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb. str 299., 2003.
- Luengo E, Álvarez I, Raso J: Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 17, 79–84, 2013.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.
- Mateljan G: Najzdravije namirnice svijeta, Profil international, Zagreb, 2009.
- Mattila P, Hellström J, Törrönen R: Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7193-7199, 2006.

- Meneses N, Jaeger H, Knorr D: Minimization of thermal impact by application of electrode cooling in a co-linear PEF treatment chamber. *J. Food Sci.* 76, E536–E543, 2011.
- Milošević S: Plazma, svjetlost i spektroskopija, Institut za fiziku, Zagreb, 2008.
- Miljković I: Suvremeno voćarstvo, Znanje, Zagreb, 1991.
- Nile SH, Park SW: Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144, 2014.
- Oms-Oliu G, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R: Pulsed Light Treatments for Food Preservation. A Review, *Food and Bioprocess Technology*, 2010.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2: str. 270-278, 2009.
- Parniakov O, Barba FJ, Grimi N i sur: Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chem* 192:842-848, 2016.
- Parniakov O, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Vorobiev E: Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Res. Int.* 65, 337–343, 2014a.
- Parniakov O, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Vorobiev E: Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chem.* 196, 842–848, 2015a.
- Parniakov O, Roselló-Soto E, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Vorobiev E: New approaches for the effective valorization of papaya seeds: extraction of proteins, phenolic compounds, carbohydrates, and isothiocyanates assisted by pulsed electric energy. *Food Res. Int.* 77 (Part 4), 711–717, 2015b.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F: UKUPNO antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133, 2812-2819, 2003.
- Petrik J: Polifenoli – antioksidansi, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 1-8., 2008.

- Pizzichemi M: Pulsed electric field inactivation of microbial cells: the use of ceramic layers to increase the efficiency of treatment. *Nucl. Phys. B: Proc. Suppl.* 197, 374–377, 2009.
- Puértolas E, Koubaa M, Barba FJ.: An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: energy and economic cost implications. *Food Res Int.* 80, 19–26, 2016.
- Puértolas E, Luengo E, Álvarez I, Raso J: Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 263–282, 2012.
- Rajha HN, Boussetta N, Louka N, Maroun RG, Vorobiev E: Mechanical and non-mechanical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. In: *The Electroporation-based Technologies for Biorefinery Workshop*, Compiègne, France, 2015.
- Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 58, 121-128., 2009.
- Raynie DE: *Extraction*, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press, str. 118, 2000.
- Režek Jambrek A: Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke, disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2008.
- Robards K, Antolovich M: Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst* 122:11R34R, 1997.
- Robards K, Prenzel PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66:401-436, 1999.
- Roselló-Soto E, Koubaa M, Moubarik A, Lopes RP, Saraiva JA, Boussetta N, Grimi N, Barba FJ: Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 45 (2), 296–310, 2015a.

- Sarkis JR, Boussetta N, Blouet C, Tessaro IC, Marczak LDF, Vorobiev E: Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 29, 170–177, 2015a.
- Sarkis JR, Boussetta N, Tessaro IC, Marczak LDF, Vorobiev E: Application of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges for oil extraction from sesame seeds. *J. Food Eng.* 153, 20–27, 2015b.
- Scalbert A Johnson IT, Saltmarsh M: Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 81 (1): str. 2155-2175, 2005.
- Sun AY, Simonyi A, Sun GY: The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 32 (4): str. 314- 318, 2002.
- Teissie J, Golzio M, Rols MP: Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 270–280, 2005.
- Toepfl S, (PhD thesis): Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food- and Bioprocessing. Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis. Technological University of Berlin, 2006.
- Vladimir-Knežević S: Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutskobiokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 9-14, 2008.
- Vorobiev E, Lebovka N: Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials. Springer, pp. 39–81, 2008.
- Vorobiev EI, Lebovka NI: Enhancing extraction processes in the food industry series: contemporary food engineering. In: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (Eds.): Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, Contemporary Food Engineering. CRC Press, Taylor & Francis LLC, pp. 25–83, 2011a.
- Vorobiev EI, Lebovka NI: Pulse electric field-assisted extraction. In: Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. (Eds.), Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, Contemporary Food Engineering. CRC Press, Taylor & Francis LLC, pp. 25–83, 2011b.
- Wang H, Cao G, Prior RL: Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agri. Food Chem.* 45, 304–309, 1997.

- Weaver JC, Smith KC, Esser AT, Son RS, Gowrishankar R: A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: a region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry* 87, 236–243, 2012.
- Wiley John: Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry. published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 75-79, 2003.
- Wollgast J, Anklam E: Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33:423-447, 2000.
- Zhou Y, Zhao X, Huang H: Effects of pulsed electric fields on anthocyanin extraction yield of blueberry processing by-products. *J. Food Process. Preserv.* 39 (6), 1898–1904, 2015.
- Web 1: www.thefruitbook.com/fruits/index.html [4.5.2020.]
- Web 2: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/proizvodnja-bistrog-koncentrata-vocnog-soka-borovnice> [4.5.2020.]
- Web 3: <https://www.rasadnik-milic.hr/wp-content/uploads/2019/08/top-hat-borovnica-40-kn-2.png> [7.5.2020.]
- Web 4: *Pomologia Croatica* Vol. 13-2007. br. 4., Dubravka Dujmović Purgar, Zoran Šindrak, Darko Mihelj, Sandra Voća, Boris Duralija: *Rasprostranjenost roda Vaccinium u Hrvatskoj* [14.5.2020.]
- Web 5: https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcS3Fo_BMiw418Z_8KTUPIXGn73S5KfMgobWx_KcHijidn_2idf&usqp=CAU [10.5.2020.]
- Web 6: <https://lh3.googleusercontent.com/proxy/aLOTaSa5pUreeqOcU8fLX2GktcQGJV3kMO3BRAFrVK77LHAPQDpFbG3m3bMEQawJ1oiJPwHCgLWQbx8X4xspfRAEJduZoM70xVZkTDV> [11.5.2020.]
- Web 7: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:457/preview> [7.5.2020.]