

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija polifenolnih spojeva iz taloga kave

Humski, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:185836>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija polifenolnih spojeva iz taloga kave

DIPLOMSKI RAD

Mislav Humski

Zagreb, rujan, 2023.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

OBNOVLJIVI IZVORI ENERGIJE U POLJOPRIVREDI

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija polifenolnih spojeva iz taloga kave

DIPLOMSKI RAD

Mislav Humski

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Mislav Humski**, JMBAG 000636038 , rođen 24.5.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija polifenolnih spojeva iz taloga kave

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Mislav Humski**, JMBAG 0006036038, naslova

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija polifenolnih spojeva iz taloga kave

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur

2. izv. prof. dr. sc. Marko Petek

3. prof. dr. sc. Neven Voća

Zahvala

Od srca se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Jani Šic Žlabur na pomoći, strpljenju, sugestijama te prijateljskim savjetima prilikom izrade rada. Zahvaljujem se tehničkoj suradnici Martini Krilčić, te Mii Dujmović na pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada.

Također hvala svim kolegama s fakulteta, kolegama i šefu s posla i naravno prijateljima koji su me tjerali naprijed.

Na kraju posebno veliko hvala mojoj majci, i cijeloj mojoj obitelji na strpljenju, potpori i pomoći kroz sve godine studiranja. Hvala Vam.

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Mislav Humski**, naslova

ULTRAZVUČNO POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ TALOGA KAVE

Kava se kao napitak priprema prelijevanjem vruće vode preko samljevenih, prethodno prženih sjemenki (zrna) biljke kavovac (*Coffea arabica* L.), a danas je jedan od najpopularnijih napitaka diljem svijeta. Prilikom pripreme kave zaostaje velika količina organskog ostatka, taloga kave. S obzirom kako je zrno kave općenito bogato različitim fitokemikalijama, posebice polifenolnim spojevima, ostatak koji zaostaje nakon pripreme kave, potencijalno predstavlja bogat izvor bioaktivnih spojeva značajne antioksidacijske aktivnosti. Takav organski ostatak umjesto da se zbrinjava kao biootpad pokazuje veliki potencijal uporabe. U suvremenim procesnim tehnologijama danas se sve više upotrebljavaju zelene tehnologije čiji je glavni cilj upotrebe smanjen negativni utjecaj na okoliš i zdravlje ljudi. Jedna od takvih tehnologija je i ultrazvuk visokog intenziteta, a koji pokazuje niz prednosti od kojih valja izdvojiti znatno skraćeno vrijeme izolacije spojeva te veći prinos istih. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (sustav sonde i kupelji) na sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ekstrakata od taloga kave. Uzorci za testiranje ultrazvučno potpomognute ekstrakcije pripremljeni su iz taloga kave (5 g) sakupljenog iz objekta za posluživanje hrane prilikom čega je kao otapalo varirana koncentracija etanola: 50 i 80 % (v/v). Variran je i način ekstrakcije, klasični tretman i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta. Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom variran je tip uređaja, sonda i kupelj, vrijeme tretmana (5 i 10 min) te u tretmanu sondom amplituda: 20, 40 i 60 %. Najviše vrijednosti ekstrahiranih polifenolnih spojeva utvrđene su u ekstraktima tretiranima sondom pri amplitudi od 60 % i uz upotrebu 50 %-og etanola u vremenskom trajanju od 10 minuta. Također, utvrđeno je da općenito svi uzorci ekstrakata od taloga kave imaju visok antioksidacijski kapacitet, a prilikom čega ABTS metodom utvrđen najviši kapacitet za uzorke tretirane klasično, a FRAP metodom za uzorke tretirane ultrazvučnom sondom pri amplitudi od 20 %, uz upotrebu 50 %-og etanola u vremenskom trajanju od 5 minuta. Iz navedenog može se zaključiti kako tretman ultrazvučnom sondom visokog intenziteta ima pozitivan utjecaj na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz taloga kave. Konačno, može se utvrditi da su etanolni ekstrakti od taloga kave bogat izvor specijaliziranih metabolitima prilikom čega se može zaključiti da se radi o potencijalno nutritivno vrijednom nusproizvodu za daljnju uporabu.

Ključne riječi: talog kave, ultrazvučna sonda, ultrazvučna kupelj, polifenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Summary

Of the master's thesis – student **Mislav Humski**, entitled

ULTRASONICALLY ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM COFFEE RESIDUE

The beverage coffee is prepared by pouring hot water over ground, previously roasted seeds (beans) of the coffee plant (*Coffea arabica* L.) and is one of the most popular beverages in the world today. When coffee is prepared, a significant amount of organic residue, coffee sludge, is left behind. Since coffee beans are generally rich in various phytochemicals, especially polyphenolic compounds, the residue remaining after coffee preparation may represent a rich source of bioactive compounds with significant antioxidant activity. Rather than disposing of such organic residues as biowaste, they offer great potential for reuse. Today's processing technologies are increasingly using environmentally friendly technologies that are primarily aimed at reducing negative impacts on the environment and human health. One of these technologies is high-intensity ultrasound, which offers several advantages, including significantly reduced time for compound isolation and higher yield. The objective of this study was to determine the effects of ultrasound-assisted extraction (probe and bath system) on the polyphenolic compound content and antioxidant capacity of coffee sludge extracts. Samples for ultrasound-assisted extraction testing were prepared from coffee sludge (5 g) collected from a food service establishment and spiked with different ethanol concentrations: 50 and 80% (v/v). The extraction method was also varied, with classical treatment and high-intensity ultrasound-assisted extraction. For ultrasound-assisted extraction, the type of device, probe and bath, treatment time (5 and 10 minutes), and probe treatment were varied with amplitudes of 20, 40, and 60%. The highest levels of extracted polyphenolic compounds were found in extracts treated with the probe with an amplitude of 60% and using 50% ethanol for a duration of 10 minutes. It was also found that all coffee sludge extract samples generally had high antioxidant capacity, with the highest capacity observed in samples conventionally treated with the ABTS method and in samples treated with the ultrasonic probe at an amplitude of 20% and using 50% ethanol for 5 minutes with the FRAP method. It can be concluded that treatment with a high-intensity ultrasonic probe has a positive effect on the extraction of polyphenolic compounds from coffee sludge. Finally, it can be concluded that ethanol extracts from coffee sludge are a rich source of specialized metabolites, suggesting that they are a potentially valuable nutritional by-product for further utilization.

Key words: spent coffee grounds, ultrasound probe, ultrasound bath, polyphenols, antioxidant capacity

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. Uvod | 2 |
| 1.1. Cilj rada | 3 |
| 2. Pregled literature..... | 4 |
| 2.1. Proizvodnja i potrošnja kave | 4 |
| 2.2. Kava u Hrvatskoj..... | 4 |
| 2.3. Morfološka i biološka svojstva kavovca (<i>Coffea arabica</i> L.) | 4 |
| 2.4. Uzgoj kavovca i obrada zrna kave | 6 |
| 2.5. Kemijski sastav kave | 9 |
| 2.6. Zakonski okvir gospodarenja biootpadom | 9 |
| 2.7. Mogućnosti za oporabu organskog ostatka kave | 11 |
| 2.8. Ekstrakcija | 11 |
| 3. Materijali i metode | 13 |
| 3.1. Materijali rada..... | 13 |
| 3.2. Priprema ekstrakata od taloga kave..... | 13 |
| 3.3. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara taloga kave | 16 |
| 3.3.1. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem na 105°C | 16 |
| 3.3.2. Određivanje ukupne kiselosti | 17 |
| 3.3.3. Određivanje pH vrijednosti..... | 18 |
| 3.4. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom..... | 19 |
| 3.5. Određivanje flavonoida i neflavonoida | 21 |
| 3.6. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta..... | 22 |
| 3.7. FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta..... | 23 |
| 3.8. Statistička obrada podataka | 24 |
| 4. Rezultati i rasprava | 25 |
| 4.1. Kemijsko-fizikalna svojstva, sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet organskog ostatka od kave | 25 |
| 4.2. Sadržaj ukupnih fenola | 25 |
| 4.3. Sadržaj ukupnih neflavonoida..... | 28 |
| 4.4. Ukupni sadržaj flavonoida | 30 |
| 4.5. Antioksidacijski kapacitet (ABTS metoda) | 32 |
| 4.6. Antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda) | 34 |
| 5. Zaključak..... | 36 |
| 6. Literatura | 37 |
| Životopis | 42 |

1. Uvod

Kava je napitak u kojem uživaju ljudi diljem svijeta i rijetko se koji svakodnevni ritual može usporediti s užitkom ispijanja dobro pripremljene kave, dok „odlazak na kavu“ predstavlja mehanizam socijalne interakcije (Ratković, 2021.).

Prema FAOSTAT-u 2020. godine proizvedeno je čak 10 368 369 tona zrna kave, a općenito proizvodnja kave na svjetskoj razini iz godine u godinu raste. Najveći svjetski proizvođač zrna sirove kave je Brazil s 3 700 231 tona zrna kave, a slijede ga Vijetnam i Kolumbija (FAOSTAT, 2022.). Najviše šalica napitka kave u svijetu po glavi stanovnika konzumiraju Finci, s 12 kg po osobi, ili gotovo 4 šalice kave dnevno, zatim slijede također zemlje sjevernog dijela Europe: Norveška, Island, Danska (Bernard, 2020.). FAOSTAT je napisao: „Većina proizvodnje zrna kave se odvija na južnoj polutci, dok se većina potrošnje odvija na sjevernoj polutci.“ (FAOSTAT, 2022.)

Nakon pripreme i ispijanja kave zaostaje organski ostatak, odnosno talog od kave. Prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN, 94/13) organski ostatak općenito se klasificira kao biootpad i kao takav zahtjeva postupke daljnjeg zbrinjavanja.

Proizvodnja, ali i konzumacija kave veliki je ekonomski i ekološki teret s obzirom na značajne količine taloga kave, neiskorištenog dijela zrna kave, koji zaostane nakon pripreme napitka. Međutim, ovakva vrsta otpada ima potencijal uporabe u razne proizvode visoke vrijednosti. Naime, talog kave sadrži velike količine organskih spojeva (masnih kiselina, aminokiselina, polifenola, minerala i polisaharida) kao i specifičnih spojeva poput ulja, aroma, terpena i alkohola koji opravdavaju njegovu valorizaciju i uporabu (Campos-Vega i sur., 2015.). Za sada neiskorišten talog kave ima potencijal uporabe u razne bio-proizvode visoke vrijednosti. Potencijalno bi se talog kave mogao koristiti u energetici, prehrambenoj industriji, farmaciji, kozmetičkoj industriji (McNutt i He, 2019.), ali i kao poboljšivač tla jer značajno doprinosi zadržavanju vode i nutrijenata u tlu (Kasongo i sur. 2010.).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom sve više se koristi za izolaciju kemijskih spojeva, a prije svega zbog značajnih prednosti koje pokazuje tijekom primjene, od skraćenog vremena ekstrakcije do značajno većeg prinosa spojeva (Drmić i Režek Jambrak, 2010., Dujmić, 2015.). Ultrazvučna ekstrakcija također omogućuje očuvanje bioaktivnih spojeva što doprinosi očuvanju kvalitete ekstrakta, a ponajviše nutritivno vrijednih spojeva. Nadalje, ultrazvučna tehnologija klasificira se kao „čista“, „zelena“ tehnologija zbog značajnih energetske ušteda, smanjenog korištenja otapala, a čime je značajno smanjen negativan otisak na okoliš, ali i zdravlje ljudi (Šic Žlabur i sur. 2021.).

1.1. Cilj rada

Utvrđiti utjecaj ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (sustav sonde i kupelji) na sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ekstrakata od taloga kave.

2. Pregled literature

2.1. Proizvodnja i potrošnja kave

Uz naftu, kava je sirovina kojom se najviše prometuje u svijetu, te potrošači iz cijelog svijeta svakodnevno kupuju i uživaju u kavi kao napitku (Bongase, 2017.). Zrna kave se ne koriste samo za pripremu napitka kave, već (putem dekofeinizacije) također služe za izdvajanje kofeina koji se onda koristi u proizvodnji drugih proizvoda poput pića (Coca Cola™), lijekova i kozmetike. Dvije glavne komercijalno uzgojene sorte kave su 'Arabica' (*Coffea arabica*) koja čini 70% svjetske proizvodnje kave, i 'Robusta' (*Coffea canephora*) koja je značajno jeftinija i lakša za uzgoj (Szenthe, 2020.).

Godišnja svjetska proizvodnja kave 2020. godine iznosila je 10 178 040 tona, a deset najvećih proizvođača na svijetu su: Brazil, Vijetnam, Kolumbija, Indonezija, Etiopija, Honduras, Indija, Uganda, Meksiko te Guatemala (ICO, 2021.).

Prema International Coffee Organization (ICO) 2020./2021. potrošnja kave je iznosila 10 218 000 tona, a najveći potrošači po glavi stanovnika su: Finska, Norveška, Island, Danska, Nizozemska, Švedska, Švicarska, Belgija, Luksemburg i Kanada (ICO, 2021.).

2.2. Kava u Hrvatskoj

Hrvati su po potrošnji kave na visokom 19. mjestu u svijetu s oko 5 kg po glavi stanovnika (WPR, 2022.). Glavni distributeri i prerađivači u industriji kave u Republici Hrvatskoj su: Frank d.d., Atlantic Grupa i Anamarija Company d.o.o. (Martinović, 2022.). Prema istraživanjima, kava se kao napitak u Hrvatskoj najčešće ispija u prijepodnevnim satima, a količinski se prosječno popije između jedne i dvije šalice kave na dan (Naglić i sur., 2014.).

Najviše se konzumira tzv. crna ili „turska“ kava i *espresso*. Najčešći motiv za konzumaciju kave je navika, ali i pozitivni učinci kave na probavu, opće stanje i smirenje. Također uz kavu se veže fenomen ritualizacije pića. Iz toga proizlazi da kava kao vrsta nealkoholnog pića predstavlja jedan od mehanizama koji uvjetuje socijalnu interakciju. Važnost rituala pića za društvenost i interakciju pokazuje činjenica da ljudi odlaze na kavu kako bi se družili, razgovarali ili uspostavljali poslovne dogovore (Čičak, 2021., Ratković, 2021.).

2.3. Morfološka i biološka svojstva kavovca (*Coffea arabica* L.)

Kavovci su tropske biljke koje se uglavnom koriste za pripremu poznatog napitka zvanog kava. Rod *Coffea* pripada redu Rubiales i porodici Rubiaceae - broćevi (Cronquist, 1988).

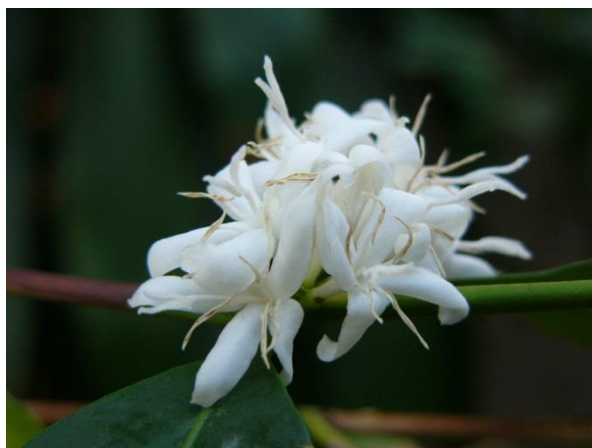
Kavovac je vazdazeleni grm ili manje stablo najčešće visoko između 2-3 metra, no može narasti i do 8 metara.

Listovi kavovca (slika 2.3.1.) su jednostavni jajoliki, kožasti, krupni (dugi do 15 cm, široki do 6 cm), vazdazeleni i s gornje strane sjajni, cjelovitog ruba te nasuprotno raspoređeni (Maleš i sur., 2018.).



Slika 2.3.1. List kavovca
(Izvor: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Kava>)

Cvjetovi (slika 2.3.2.) su bijeli, dvospolni, entomofilni, slatkasto mirisni. Sastoji se od vanjske čaške građene od predlistića, cjevaste čaške; bijelog, 1,1 cm dugog vjenčića s 5 zvjezdasto raširenih zubaca. Po 3 cvijeta zajedno nalaze se u kratkim paštucima, a više paštucica u pazušcima listova, na oko 4 mm dugačkim, debelim stapkama. Cvjetanje je od travnja do lipnja (u povoljnim uvjetima i više puta godišnje) (Maleš i sur., 2018., Vodopija 2020.).



Slika 2.3.2. Cvjetovi kavovca

(Izvor: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/coffee-arabica/>)

Plodovi (slika 2.3.3.) su tamnocrvene, sjajne, elipsoidne, mesnate, 12-18 mm dugačke, 8-15 mm široke bobičaste koštunice ili bobice. Bobice su najprije zelene, pa žute, crvene, a tamnocrveno obojenje poprimaju na kraju dozrijevanja. Plodovi sadrže dvije žućkasto bijele, 8,5-12,5 mm dugačke koštice (sirova zrna kave), koje su s jedne strane ravne i duboko uzdužno užlijebljene, a s druge strane konveksne. Biljka daje plod tek od treće godine razvoja (Maleš i sur., 2018., Vodopija 2020.).



Slika 2.3.3. Plodovi kavovca

(<https://www.tibaagan.com/coffee-arabica-rubiaceae/>)

2.4. Uzgoj kavovca i obrada zrna kave

Kavovac se razmnožava generativno (sjemenom) ili vegetativno (reznicama, cijepljenjem). Sjeme najčešće raznose ptice (Vodopija 2020.). Sjemenke ovih vrsta, koje se u svakodnevnom govoru nazivaju zrnima kave, koriste se primarno za pripremu i aromatiziranje raznih napitaka. Upravo ovaj dio biljke se gospodarski koristi, te je cilj uzgoja dobiti čim veće količine zrna što bolje kvalitete (Vodopija 2020., Visković 2023.).

U velikim proizvodnim pogonima većinom se sjemenke kave prvo siju u zaštićenim prostorima, a nakon čega se kao sadnice presađuju na otvoreno i to u vrijeme vlažne sezone. Potrebno je oko 3-4 godine da novozasađene biljke urode plodom (Winston i sur., 2005.).

Kavovac se uzgaja u vlažnim, tropskim i suptropskim područjima, uglavnom na nadmorskim visinama iznad 1000 m. Optimalna dnevna temperatura za uzgoj *C. arabica* je 20-24 °C. Na temperaturi ispod 15 °C rast biljaka je usporen. Biljke su osjetljive na mraz. Optimalna količina oborina za uzgoj je 1200 do 1500 mm godišnje, s ravnomjernim rasporedom tijekom sedam do devet mjeseci u godini. Kavovac može rasti na različitim tipovima tala, ali ona trebaju biti bogata hranjivima i dobro propusna. Najpovoljnija su blago kisela tla, s pH- vrijednosti od 5-6 (Winston i sur., 2005., Myhrvold i Coste, 2023.).

Zreli plodovi se beru ručno ili uz pomoć mehanizacije te se zatim obrađuju, najbolje isti dan. Postoje tri metode obrade plodova kavovca: suhi, mokri i hibridni (polu – mokri) postupci (Myhrvold i Coste, 2023.).

Suhi proces je najstariji i najjednostavniji proces obrade ploda kave i zahtijeva manju upotrebu mehanizacije. Nakon sortiranja i čišćenja, plodovi se ostavljaju na velikim površinama u jednom sloju da se suše na suncu prilikom čega se često okreću i prevrću kako bi se spriječilo eventualno nakupljanje vlage, a time i pojava gljivica, plijesni i drugih oboljenja. Ovisno o vremenskim uvjetima proces traje od nekoliko dana do nekoliko tjedana sve dok sadržaj vode u plodu ne padne ispod 13 %. Tek se onda iz tako osušenih plodova izdvajaju sjemenke, odnosno zrna kave. Ovakav postupak obrade kave ne zahtijeva puno ulaganja u mehanizaciju i ne troši dodatne resurse za proces sušenja, no moguć je na samo onim područjima gdje je veći dio godine bez većih oborina i uz dovoljnu količinu Sunca. (Winston i sur., 2005., Myhrvold i Coste, 2023.).

Za mokru metodu karakteristično je da se prvo sa svježih ubranih plodova mehanički u vodenoj kupelji odvoji vanjski ovoj i pulpa ploda od sjemenke. Nakon ovog postupka sjeme je još pokriveno sluzavim slojem pulpe ploda koji se odvaja procesom fermentacije. Proces fermentacije najčešće traje oko 48 sati, a nakon njega sjemenke se ponovno peru kako bi se uklonio zaostali sloj pulpe ploda. Nakon toga slijedi sušenje u prirodnim uvjetima na Sunčevom svjetlu ili u umjetnim u sušionicama do ispod 13 % sadržaja vode u sjemenkama. Postupak daje homogenije i bolje očuvane sjemenke kave s manje nedostataka, ali zahtijeva mehanizaciju i veće količine vode (Winston i sur., 2005., Myhrvold i Coste, 2023.).

Hibridni ili polu – mokri postupak je kombinacija dva prethodno navedena. U hibridnom postupku se kao i u mokrom u vodenoj kupelji mehanički odvaja plod od sjemenki, ali se umjesto fermentacije koriste mehanički postupci za eliminaciju zaostalog sluzavog sloja od pulpe ploda sa sjemenki. Neposredno nakon sjemenke se suše identično kao i nakon fermentacije u mokrom postupku. Ovaj postupak koristi manje vode od mokrog postupka, te

nema rizika od pretjerano intenzivne fermentacije, a daje ujednačeniju kvalitetu zrna kave od suhe metode (Winston i sur., 2005., Myhrvold i Coste, 2023.).

Nakon procesa obrade ploda dobiva se sirova ili zelena kava, odnosno osušene i obrađene, ali još nepržene sjemenke kave koje karakterizira žućkasto bijela i zelenkasto bijela boja. Sirova kava je proizvod koji se izvozi i s kojim se trguje na veliko. Sirova kava prerađuje se postupkom koji nazivamo prženje u aromatične, smeđe sjemenke koje kupujemo u trgovinama ili kafićima. Postupak prženja se uglavnom obavlja u zemljama uvoznicama jer svježije pržene sjemenke moraju što prije doći do potrošača (Winston i sur., 2005.).

Prženje je jedna od najbitnijih tehnoloških operacija u industriji kave. Prženje sirove kave ima svrhu formiranja arome i boje. Ovisno o namjeni kave (filter kava, „turska“ kava, espresso kava) postoje tri glavne vrste prženja, a to su: svijetlo, srednje i tamno prženje. Do danas u industriji prerade kave primjenjuju se četiri konstrukcije izvedbe pržionika: kontinuirani horizontalni rotacioni bubnjasti pržionik, šaržni vertikalni bubnjasti pržionik, šaržni zdjelasti rotacioni pržionik, šaržni horizontalni rotacioni i bubnjasti pržionik (Grabar, 2021.).

Industrijsko prženje odvija se na rotirajućim ili u nepokretnim pržionicima u vremenskom razdoblju od 15-20 minuta na temperaturi do 220 °C, no sve češće se koristi i novija metoda visoke dobiti ili „*flash*“ metoda koja podrazumijeva kratkotrajni proces prženja, od 2-5 minuta, na vrlo visokoj temperaturi od čak 800 °C (Vido 2020.).

Proces prženja dijeli se u 3 faze: 1) prva je sušenje sirovih zrna čime se uklanja višak vode; 2) druga faza je „pravo“ prženje kada se odvijaju pirolitičke reakcije te se mijenja kemijski sastav zrna, isparava voda (smanjuje se masa i povećava zapremina), celuloza djelomično pougljenjuje i šećeri karameliziraju (povećava se poroznost i količina ekstraktivnih materijala), dolazi do polimerizacije derivata furana (stvaraju se pigmenti i mijenja boja), nastaje veliki broj hlapljivih spojeva koji pridonose aromi (najvjerojatnije nastaju iz masnog ulja). Tijekom prženja purinski alkaloidi se oslobađaju iz kompleksa s klorogenskom kiselinom i trjeslovinama; 3) treća je faza naglog hlađenja kako bi se zaustavile kemijske reakcije i spriječilo pretjerano prženje zrna koje može ugroziti proizvodnu kvalitetu i narušiti specifične arome prženog zrna kave. Dugim prženjem dobiva se „ugljen od kave“ (*Carbo Coffeae tostae*) koji se može primijeniti kao zamjena za životinjski ugljen (*Carbo animalis*) (Maleš i sur., 2018., Vido 2020.).

Konačni je cilj prženja sirove kave da zrna poprimaju potrebna svojstva te da se iz njih može pripremiti kvalitetan napitak optimalne i odgovarajuće boje, okusa i arome (Vodopija 2020., Grabar, 2021.).

2.5. Kemijski sastav kave

Kemijski sastav kave može varirati ovisno o tome radi li se o različitim vrstama kave i o tome radi li se o sirovom zelenom ili prženom zrnju (Vido, 2020.).

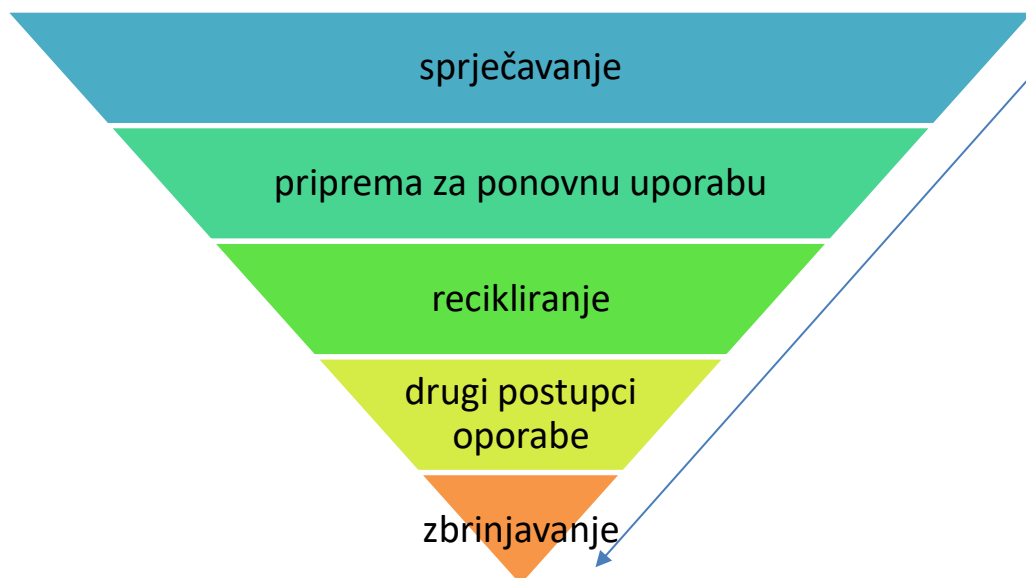
Sirovo zrno kave u svom kemijskom sastavu sadrži: vodu (6,99 %) ugljikohidrate (47,1 %), vlakna (5 %), proteine (10,95 %), lipide (6,13 %) od kojih su zastupljenije su zasićene masne kiseline, minerale (4,16 %) i to kalij, magnezij, kalcij, natrij, željezo, mangan, rubidij, cink, bakar, stroncij, krom, vanadij, barij, nikel, kobalt, olovo, molibden, titan i kadmij, organske kiseline, klorogenske kiseline, trigonelin i kofein (0,9-1,3 %) (Farah 2012.). Zrno kave sadrži i fenolne spojeve, kao što su antocijanini i lignani, te tragove teofilina i teobromina. Šećeri koji se nalaze u zrnju kave su: saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza i manozna, a aminokiseline: alanin, arginin, asparagin, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin i valin. Osim navedenih spojeva zrna kave sadrže i vitamine B kompleksa (Nogaim i sur., 2013., Brnica, 2018.).

Prženje dovodi do gubitka određenog dijela saharoze i polisaharida, smanjuje se udio klorogenskih kiselina i proteina. Sadržaj kofeina i trigonelina ostaje gotovo nepromijenjen, dok se sadržaj lipida čak i povećava. Prženje dovodi do nastanka novih melanoidnih spojeva kao posljedica Maillardove reakcije (Vido, 2020.). Udio većine bioogenih elemenata (Mg, K, Rb, Mo, Cd, Sn, V, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Sb i Ba) prženjem se povećava, dok se udio pojedinih smanjuje ili ostaje isti (Na, Al, Li, Cs, Pb, Cr i Li) (Šušić, 2020.).

Prženo zrno kave u svom sastavu ima 1,5-5 % vode, 36,2 % ugljikohidrata, 5 % vlakana, 8,75 % proteina, 17 % lipida, 4,5 % minerala, te 1,1-1,3 % kofeina uz ostale nabrojane spojeve kao i u sirovom zrnju kave (Farah 2012.).

2.6. Zakonski okvir gospodarenja biootpadom

Članak 7. stavak 1. Zakona o gospodarenju otpadom (NN, 84/21) propisuje red prvenstva gospodarenja otpadom (Slika 2.6.1.). Prvo mjesto zauzima sprječavanje nastanka otpada bilo koje vrste, zatim slijedi jedna od opcija upotrebljavanja otpada (priprema za ponovnu upotrebu, recikliranje i drugi postupci uporabe) te kao najnepoželjnija opcija je zbrinjavanje ili odlaganje otpada.



Slika 2.6.1. Red prvenstva gospodarenjem otpadom od najpoželjniji do najnepoželjnije opcije.

(Izvor: NN 61/19)

Ukoliko se pojedini otpad ne može reciklirati, ponovno iskoristiti ili podvrgnuti drugim postupcima uporabe potrebno je vršiti njegovo zbrinjavanje na odlagalištima. Gospodarenje otpadom potrebno je provoditi tako da se spriječi mogući rizik za ljudsko zdravlje i negativan utjecaj na okoliš te bioraznolikost. Prema tome se zabranjuje odlaganje otpada u okoliš kao i njegovo spaljivanje (NN, 94/13).

Prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 84/21) biootpad je biološki razgradiv otpad iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata i slični otpad iz prehrambene industrije. Dakle prema navedenom Zakonu talog nastao pripremanjem kave u ugostiteljskim objektima klasificira se kao biootpad.

Prema navedenom Zakonu proizvođač biootpada dužan je predati biootpad odvojeno od drugog otpada ovlaštenoj osobi ili reciklirati biootpad na mjestu nastanka, a Republika Hrvatska ima obvezu osigurati odvojeno sakupljanje i recikliranje papira i kartona, stakla, metala, plastike, biootpada, drva, tekstila, ambalaže, otpadne električne i elektroničke opreme, otpadnih baterija i akumulatora i glomaznog otpada.

Stopa odvojeno sakupljenog komunalnog otpada u RH (sve vrste komunalnog otpada osim miješanog komunalnog otpada) iznosila je u 2022. godini 46 % odnosno 844 387 tona. Ipak, u posljednje dvije godine je dinamika porasta stope odvojenog sakupljanja nešto sporija, kao posljedica nečistoća koje su u značajnom udjelu prisutne u odvojeno sakupljenom otpadu, posebice u biootpadu, a koji se u tom slučaju kategorizira kao miješani komunalni otpad. U 2022. godini odvojeno je sakupljeno 118 806 tona biootpada iz komunalnog otpada odnosno 24 % procijenjene ukupne količine (489 404 t). Procjenjuje se da je u 2022. godini na

odlagalištima završilo 322 744 t biootpada iz komunalnog otpada (odvojeno sakupljeni i kao sastavni dio miješanog komunalnog otpada) tj. oko 66 % nastale količine, a što je jednako udjelu iz 2021. godine. Oporabljeno je (kompostiranje, anaerobna digestija, energetska uporaba i dr.) oko 20 % nastalog biootpada (95 471 t) što je gotovo jednako kao i u 2021. godini. Preostale količine su uglavnom završile u sklopu miješanog komunalnog otpada u centrima za gospodarenje otpadom na mehaničko–biološkoj obradi te manji dio u privremenom skladištu (Puntarić i sur., 2023.).

2.7. Mogućnosti za uporabu organskog ostatka kave

Stalni rast tržišta kave posljedično uzrokuju nastanku i generiranju velikih količina otpada taloga kave (engl. *spent coffee grounds*) koji čini i do 95 % otpada nakon konzumacije napitka kave. Otpad taloga kave sadrži brojne značajne spojeve, posebice polifenolne (Boyadhizeva i sur., 2018.; Mussato i sur., 2011.; Ramón-Gonçalves i sur., 2019.; Miladi i sur., 2021.), a zbog čega takav otpad pokazuje veliki potencijal za uporabom, odnosno korištenja u nekom drugom obliku (Čemerika i sur., 2023.). Otpadnim talogom kave smatra se mljevena kava koja se dobiva kao ostatak tijekom procesa kuhanja. U većini industrija, otpad kave prikupljaju specijalizirane agencije koje ga kasnije prodaju za različite svrhe, kao npr. za kompostiranje, vrtlarstvo, proizvodnju bioenergije, uzgoj gljiva i slično (Udovčić, 2021.). Ovisno o tome gdje se želi koristiti otpadni talog kave može ga se koristiti bez obrade kao primjerice u vrtlarstvu (poboljšivač tla), no želi li se iz njega dobiti novi proizvod ili koristiti za izdvajanje nekog specifičnog spoja potrebna je njegova dodatna obrada, dorada. Neke od naprednijih tehnologija uporabe biootpada bave se proizvodnjom biodizela, biorazgradivih polimera i biokompozita te umješavanjem u različite tipove postojećih materijala (npr. keramiku, plastiku) s ciljem poboljšavanja svojstva novog proizvoda (Carek, 2020., Udovčić, 2021., Čemerika i sur., 2023.).

2.8. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odvajanja i izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih tvari u smjesi. Princip ekstrakcije temelji se na pojavi molekulske difuzije, izjednačavanju koncentracija otopljenih tvari između sustava u nekoj smjesi koje dođu u međusobni dodir. S obzirom na agregatna stanja razlikujemo ekstrakciju tekuće-tekuće i kruto-tekuće. Potrebno vrijeme i uspješnost ekstrakcije, odnosno prinos spojeva koji se ekstrahiraju ovisi o mnoštvu čimbenika od kojih su značajniji: temperatura, vrsta otapala (topljivost tvari u otapalu), površina tvari izložena otapalu (veličina čestica krute tvari koja se ekstrahira), viskoznost otapala, volumen otapala. Učinkovitost procesa ekstrakcije, ponajviše brzina, postiže se aplikacijom viših temperatura sustava, (povećava brzinu otapanja komponenti) te usitnjavanjem i homogenizacijom čvrstih tvari kako bi se povećala površina tvari izložena

otapalu. Veći volumni protok otapala smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica, te time također povećava brzinu ekstrakcije (Šic Žlabur, 2015; Drmić i Režek Jambrak, 2010.).

U procesiranju hrane, u novije doba sve se češće upotrebljavaju metode kojima je cilj što manja obrada te očuvanje bioaktivnih spojeva, odnosno nutritivnih vrijednosti hrane koji imaju brojne koristi za ljudsko zdravlje (Šic Žlabur, 2015.). Neke od tehnike ekstrakcije su: ekstrakcija otapalom, ekstrakcija čvrstom fazom, ekstrakcija tekuće – tekuće, ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima, ekstrakcija mikrovalovima, Soxhlet ekstrakcija (za eterična ulja), ubrzana ekstrakcija otapalom (ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu), mikrovalno potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta i druge (Kaselj, 2012.).

Korištenje ultrazvuka za proces ekstrakcije sve je više korištena metoda u području zelene kemije i procesiranju. Najveće prednosti korištenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta su skraćeno vrijeme tretmana, veći prinosi ekstrahiranih spojeva, jednostavno rukovanje, niže temperature sustava kao i korištenje manjih količina otapala ili potpuno izbjegavanje korištenja istih (Drmić i Režek Jambrak, 2010.).

Razlikujemo dvije vrste ultrazvuka koji primjenjuju ultrazvučne valove niskog intenziteta i ultrazvučne valove visokog intenziteta. Ultrazvučni valovi niskog intenziteta (1 do 10 MHz i snage od 1 W/cm²) neće uzrokovati fizikalne i kemijske promjene na materijalu kroz koji prolazi te se zbog toga upotrebljava za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane, za dijagnostičke svrhe ili za površinsko čišćenje hrane. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta (od 20 do 100 kHz i snage od 10 do 1000 W/cm²) će uzrokovati oštećenje tkiva na koje se primjenjuje, zbog visoke snage koja se koristi, te potencirati i neke kemijske reakcije. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta ubrzat će kemijske reakcije, brzinu difuzije, dispergiranje agregata, a neka istraživanja sugeriraju i učinkovitost ultrazvuka visokog intenziteta na stanice mikroorganizama i enzima čime pogoduju njihovu oštećenju i smanjenju brojnosti, a time djelomično osiguravaju i mikrobiološku sigurnost (Herceg i sur., 2008). Također, ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje pojavu prijelazne kavitacije koja se javlja kada dolazi do nastajanja, rasta i naglog raspadanja mjehurića u otapalu tretiranom ultrazvukom. Kavitacija, kao glavni mehanizam ultrazvuka, uzrokuje pucanje stanične stijenke biljne stanice, a što uzrokuje oslobađanje topljivih sastojaka iz uzorka (biljnog materijala) u otapalo. Stoga kavitacija ubrzava ekstrakciju i povećava učinkovitost iste (Herceg i sur., 2008; Šic Žlabur, 2015.).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali rada

Za ovo istraživanje korišten je talog kave sakupljen iz zagrebačke slastičarnice. Ukupno je prikupljeno 1322,77 g taloga kave što odgovara otprilike 100 pripremljenih napitaka kave. Napitci su pripremani na ugostiteljskom aparatu za *espresso* kavu. Nakon prikupljanja, uzorak taloga kave dopremljen je u plastičnoj vreći u laboratorij Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu gdje su provedena daljnja istraživanja. Odmah po dolasku, analizirana su fizikalno-kemijska svojstva taloga kave uključujući: sadržaj ukupne suhe tvari (%), ukupnih kiselina (%), pH- vrijednost, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida (mg GAE/100 g) te antioksidacijski kapacitet.

3.2. Priprema ekstrakata od taloga kave

Prikupljeni svježi talog od kave korišten je za pripremu alkoholnih ekstrakata od taloga kave. Ovisno o načinu ekstrakcije, u laboratorijske čaše volumena od 300 mL odvagano je $5 \pm 0,01$ praha te dodan ukupni volumen od 100 mL otapala. Za potrebe istraživanja korištene su dvije koncentracije alkohola etanola: 50 % i 80 % (v/v). Dio uzoraka odvojen je za tretman sustavom ultrazvučne sonde, dio za tretman u ultrazvučnoj kupelji, te dio za klasičnu ekstrakciju. Klasična ekstrakcija predstavljala je kontrolni uzorak (Tablica 1), a uključivala je tekuće-krutu ekstrakciju u trajanju od 24 h uz povremeno miješanje. Ultrazvučni tretman sondom proveden je sustavom izravno uranjajuće sonde uređajem Bandelin HD 2000.2 (Njemačka) nominalne maksimalne snage uređaja od 200 W i promjera sonde od 13 mm (slika 3.2.1.), a prilikom čega je varirano vrijeme tretmana: 5 i 10 min i amplituda od: 20, 40 i 60 %.. Tretman u kupelji proveden je tako da su uzorci u čašama postavljeni u ultrazvučnu kupelj frekvencije 35 kHz i nominalne maksimalne snage uređaja od 140 W (Bandelin RK 103H, Njemačka) (slika 3.2.2.), a prilikom čega je varirano vrijeme tretmana: 5 i 10 min.. Nakon svakog tretmana uzorci su profiltrirani preko Whatmanovog filter papira kako bi se odvojila kruta faza i dobio tekući ekstrakt taloga kave (slika 3.2.3.).

Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije taloga kave

| Način ekstrakcije | Amplituda | Otapalo | Volumen otapala (mL) | Vrijeme (min) | Uzorak |
|-------------------|-----------|---------|----------------------|---------------|--------|
| Klasično | - | 50 EtOH | 100 | 1440 | klas1 |
| Klasično | - | 80 EtOH | 100 | 1440 | klas2 |
| UZV kupelj | - | 50 EtOH | 100 | 5 | k1 |
| UZV kupelj | - | 80 EtOH | 100 | 5 | k2 |
| UZV kupelj | - | 50 EtOH | 100 | 10 | k3 |
| UZV kupelj | - | 80 EtOH | 100 | 10 | k4 |
| UZV sonda | 20 | 50 EtOH | 100 | 5 | s1 |
| UZV sonda | 20 | 80 EtOH | 100 | 5 | s2 |
| UZV sonda | 20 | 50 EtOH | 100 | 10 | s3 |
| UZV sonda | 20 | 80 EtOH | 100 | 10 | s4 |
| UZV sonda | 40 | 50 EtOH | 100 | 5 | s5 |
| UZV sonda | 40 | 80 EtOH | 100 | 5 | s6 |
| UZV sonda | 40 | 50 EtOH | 100 | 10 | s7 |
| UZV sonda | 40 | 80 EtOH | 100 | 10 | s8 |
| UZV sonda | 60 | 50 EtOH | 100 | 5 | s9 |
| UZV sonda | 60 | 80 EtOH | 100 | 5 | s10 |
| UZV sonda | 60 | 50 EtOH | 100 | 10 | s11 |
| UZV sonda | 60 | 80 EtOH | 100 | 10 | s12 |

UZV sonda- ultrazvučni tretman sondom; UZV kupelj- ultrazvučni tretman u kupelji;



Slika 3.2.1. Ultrazvučna sonda



Slika 3.2.2. Ultrazvučna kupelj



Slika 3.2.3. Filtriranje ekstrakata

3.3. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara taloga kave

Analizirani su sljedeći fizikalno-kemijski parametri taloga kave: sadržaj suhe tvari (%), ukupne kiseline (%) i pH-vrijednost, dok su ukupni polifenolni spojevi (flavonoidi, neflavonoidi) i antioksidacijski kapacitet analizirani i za talog kave i u pripremljenim alkoholnim ekstraktima od taloga kave.

3.3.1. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem na 105°C

Ovisno o sastavu proizvoda, za određivanje ukupne suhe tvari primjenjuju se tri postupka sušenja: sušenje na 105 °C, sušenje u vakuumu i destilacija. U ovom radu korištena je metoda sušenja pri 105 °C (AOAC, 1995.) u tri repeticije. Ovim se postupkom određuje ostatak uzorka nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase.

Aparatura i pribor:

- laboratorijski sušionik
- eksikator
- staklene posudice

- analitička vaga
- stakleni štapić odgovarajuće duljine ovisno o veličini posudice
- kvarcni pijesak

Postupak određivanja:

U čistu, osušenu i izvaganu staklenu posudicu s poklopcem stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić. Ovako pripremljeni pomoćni materijal zatim se osuši u laboratorijskom sušioniku pod određenim uvjetima sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja poklopac se stavi na posudicu, posudica se izvadi iz sušionika i ohladi u eksikatoru, a zatim se važe s točnošću 0,0002 g.

U čistu, ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 100 g pripremljenog uzorka, koji se dobro izmiješa staklenim štapićem i sve zajedno izvaže s točnošću 0,0002 g. Staklena posudica u kojoj se nalazi pijesak i ispitivana količina uzorka stavi se u laboratorijski sušionik zagrijan na $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ u kojem se zagrijava jedan sat sa skinutim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja, sušenje se nastavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Iznova se važe s točnošću $\pm 0,0002 \text{ g}$.

Formula:

$$\text{suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Gdje je:

m_0 (g) - masa posudice i pomoćnog materijala (kvarcni pijesak, stakleni štapić, poklopac),

m_1 (g) - masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja,

m_2 (g) - masa posudice nakon sušenja.

3.3.2. Određivanje ukupne kiselosti

Ova metoda je temeljena na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijevog hidroksida. Primjenjuje se za određivanje ukupne kiselosti u voću i povrću i proizvodima od voća i povrća (Voća i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

- Graduirana pipeta, volumena 25 mL i 100 mL
- Odmjerna tikvica, volumena 250 mL
- Analitička vaga (Sartorius)
- Ph-metar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Automatska bireta
- Filter papir

Reagensi:

- Natrijev hidroksid, otopina c (NaOH)=0,1 mol/L
- Puferna otopina poznate pH vrijednosti

Priprema uzoraka:

Uzorak se homogenizira i odvagane se 10 g. Uzorak se prenese u odmjernu tikvicu volumena 250 ml, tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice dobro se promućka i profiltrira. pH-metar se baždari pomoću puferne otopine. Ovisno očekivanoj kiselosti otpipetira se 20 mL uzorka i prenese u čašu s magnetom koji pospješuje miješanje. Mješalica se pusti u rad te se iz birete dodaje otopina natrijevog hidroksida dok se ne postigne pH od oko 7. Tada se dodavanje uspori do pH 8,1 ± 0,2. (Voća i sur., 2011).

Formula:

$$\text{ukupne kiseline (\%)} = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen utrošene NaOH pri titraciji

F – faktor otopine NaOH

G (g/mL) – faktor najzastupljenije kiseline u uzorku

D (g) – masa uzorka u tekućini

3.3.3. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti radi se na pH-metru uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitavanjem vrijednosti (Voća i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

- Čaša, volumena 25 mL
- Magneti za miješanje
- Magnetska miješalica (MM-510)
- pH-metar (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Analitička vaga (Sartorius)

Priprema uzoraka:

Uzorak se prvo homogenizira, zatim ga je potrebno izvagati. Potom izvagani dio uzorka valja prenijeti u odmjernu tikvicu te nadopuniti destiliranom vodom do oznake, promućkati i profiltrirati.

Postupak određivanja:

Prije mjerenja potrebno je puferском otopinom poznate pH vrijednosti baždariti uređaj pri sobnoj temperaturi. pH vrijednost određuje se uranjanjem elektrode u uzorak.

3.4. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metodi osnova je bojana reakcija fenola i Folin-Ciocalteu reagensa koji je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdene kiseline. U reakciji s fenolima ove kiseline oksidiraju fenole te se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid plave boje (Slika 3.4.1.). Ukupni fenoli spektrofotometrijski se određuju u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem intenziteta plavog obojenja pri valnoj duljini od 750 nm (Ough i Amerine, 1988.).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar
- Tehnička vaga
- Odmjerne tikvice (50 mL i 100 mL)
- Tikvica s okruglim dnom
- Pipete
- Kivete
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Povratno hladilo
-

Kemikalije:

- Etanol (80% i 50%)
- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Priprema uzoraka:

Na tehničkoj vagi odvaži se 5 g uzorka sa točnošću $\pm 0,01$ g te se homogenizira sa 100 mL 50%-tnog ili 80%-tnog etanola. Homogena smjesa kuha se 10 minuta uz povratno hladilo, a zatim se dobiveni ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Preostali talog zajedno s filter papirom ponovno se prebaci u tikvicu sa šlifom, u koju se dodaje 50 mL etanola (50 % ili 80 %) i dodatno se kuha uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakt spoji se s prvim ekstraktom i nadopuni 50%-tnim ili 80%-tnim etanolom do oznake.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL pipetom se izdvoji 0,5 mL ekstrakta te se redom dodaje: 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) i 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvice se potom dobro promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake (slika 3.2.1.). Mjerenje apsorbancije vrši

se nakon što uzorci odstoje 2 sata na sobnoj temperaturi. Apsorbancija (optička gustoća otopine) se mjeri pri valnoj duljini 750 nm, a kao slijepu probu koristimo destiliranu vodu.



Slika 3.4.1. Uzorci pripremljeni za mjerenje apsorbancije

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca treba izvagati 500 mg galne kiseline i otopiti je u 80%-tnom etanolu, zatim odmjernu tikvicu volumena 100 mL dopuniti do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline pripreme se razrijeđenja tako da se otpipetira 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda („stock“ otopina) u odmjerne tikvice volumena 100 mL, svaku tikvicu se potom nadopunjava do oznake 80%-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 150, 250 i 500 mg/L.

Zatim se u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetira 0,5 mL uzorka iz tikvica i dodaje se 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i nakon 3 minute 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvica dobro se promiješa, nadopuni do oznake. Uzorci se ostave da stoje 2 sata na sobnoj temperaturi. Na ovaj način pripremljenim i odstajalim uzorcima izmjeri se apsorbancija otopine spektrofotometrom pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac tako da na apscisi budu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbance.

3.5. Određivanje flavonoida i neflavonoida

Za sedimentaciju flavonoidnih fenolnih spojeva preporuka je korištenje formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima isto na C-6 ili C-8 poziciji. U toj reakciji nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak flavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988.). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida. Količina neflavonoida računa se kao razlika između ukupnih fenola i flavonoida.

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga
- Spektrofotometar
- Kivete
- Filter papir
- Erlenmeyer-ova tikvica sa šlifom i čepom, 25 mL
- Pipete, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Stakleni lijevci

Kemikalije:

- Klorovodična kiselina razrijeđena s vodom u omjeru 1:4
- Formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata
- Folin-Ciocalteu reagens
- 80% etanol

Priprema uzoraka:

Ekstrakt ukupnih fenola (opisan u poglavlju 3.2.1.) koristi se i za određivanje flavonoida i neflavonoida.

Postupak određivanja:

U tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka te doda 5 mL otopine HCl (1:4) i 5 mL formaldehida. Potom se smjesa propuše dušikom, zatvori i ostavi u mračnom prostoru na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata uzorak se profiltrira i potom dolazi jednak postupak kao kod određivanja ukupnih fenola.

Račun:

Koncentracija flavonoida dobiva se jednako kao i koncentracija ukupnih fenola uzimajući u obzir dodatna razrjeđenja. Količina ukupnih neflavonoida dobiva se izračunavanjem razlike količine ukupnih fenola i flavonoida.

3.6. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Metoda je bazirana na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS^{•+} radikal-kationa) oblikovanog ili kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a koja ima karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS^{•+} kation se reducira u ABTS, a reakcija se vidi jer plavo-zelena otopina postane bezbojna. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilokroman-2-karbonska kiselina) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1997., Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan:

- 140 mM otopine kalijeva persulfata, K₂S₂O₈ (0,1892 g K₂S₂O₈ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL) Formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- 7 mL ABTS otopina (Sigma Aldrich, SAD) (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- Stabilna ABTS^{•+} otopina (88 µL K₂S₂O₈ otopine (140 mM)) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati na sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava).

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tna otopina ABTS^{•+} (pipetom se prenese 1 mL ABTS^{•+} otopine u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake). Poslije te pripreme mjeri se apsorbancija 1%-tne otopine ABTS^{•+} pri 734 nm koja mora iznositi 0,70 ± 0,02. Ako apsorbancija otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ukoliko je apsorbancija premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine ABTS^{•+} treba nadodati još nekoliko kapi stabilne ABTS^{•+} otopine, a ako je apsorbancija prevelika onda treba razrijediti otopinu, odnosno u tikvicu od 100 mL dodati još 96%-tnog etanola. Na isti dan kada se pripremljena 1%-tna stabilna otopina ABTS^{•+} s podešenom apsorbancijom na 0,70 ± 0,02 valja napraviti i sve analize uzoraka (i umjerni (kalibracijski) pravac ako je to potrebno) jer je ABTS^{•+} otopina nestabilna i nepostojana već unutar 24 sata.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski) i Izrada umjernog (kalibracijskog) pravca:

160 µL uzorka (ekstrakta) pomiješa s 2 mL 1%-tne otopine ABTS^{•+} te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol.

Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox (Sigma Aldrich, SAD) koji uzrokuje smanjenje boje ABTS^{•+} otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su

sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Prvo se pripremi „stock“ otopina i to tako da se u odmjernu tikvicu od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz „stock“ otopine pripremaju se ostala razrjeđenja. Nakon pripreme navedenih koncentracija otpipetira se 160 μL pojedine razrijeđene otopine Trolox-a i doda 2 mL 1%-tne ABTS⁺ otopine, te se mjeri apsorbanca pri 734 nm.

3.7. FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodom mjeri se antioksidacijski potencijal uzorka. Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt na principu redukcije Fe^{3+} iona – TPTZ (željezo (III)-2,4,6-tripiridil-s-triazin) u Fe^{2+} - TPTZ s antioksidansom putem SET mehanizma. Rezultat reakcije je intenzivno plavo obojenje otopine s apsorbancijom na 550 nm (Soče, 2019.). FRAP je brza, jednostavna i jeftina kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje antioksidacijskog potencijala (Zrnić, 2022.).

Priprema kemikalija i reagensa za analizu:

Prije svakog dana kada se rade analize, potrebno je pripremiti svježi FRAP reagens. FRAP reagens pripremamo na sljedeći način: u tikvicu ili čašu volumena 50 mL pomiješa se u omjeri 10:1:1 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ reagensa, 2,5 mL Fe(III) -klorid heksahidrata.

Za pripremu acetatnog pufera 0,3 M potrebno je odvagati 3,1 g natrij-acetat trihidrata u tikvicu od 1 L. Potom odpipetirati 16 mL glacialne octene kiseline i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Nakon toga potrebno je provjeriti pH pufera koji bi trebao iznositi 3,6.

Za pripremu reagensa TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazin) 10 mM potrebno je odvagati 0,0312 g TPTZ-a u tikvicu od 10 mL te potom do oznake nadopuniti 40 mM klorovodičnom kiselinom.

Dok je za pripremu željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM potrebno je odvagati 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala FRAP metodom:

Prvo je potrebno napraviti slijepu probu: 240 μL destilirane vode, 80 μL 80%-tnog EtOH, 2080 μL FRAP reagensa te se slijepa proba termostatira u vodenoj kupelji 5 min na 37 °C. Nakon toga se očita apsorbanca pri valnoj duljini 593 nm. Rezultati mjerenja u konačnici su izraženi kao ekvivalent koncentracije standarda Trolox (μM).

Postupak reakcije:

U epruvetu se doda 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka, 2080 μL FRAP reagensa te se sve termostatira 5 min u vodenoj kupelji na 37 °C.

Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Za izračunavanje koncentracije (u mM željezo(II)-sulfat heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)) prema baždarnom pravcu potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepe probe od apsorbancije uzorka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Postupak izrade baždarnog pravca za FRAP metodu:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Potom se u epruvete redom pipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Reakcije se pomiješaju i temperiraju 5 minuta na 37 °C te se apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

3.8. Statistička obrada podataka

Podatci ovog istraživanja statistički su obrađeni u programskom paketu SAS, verzija 9.3 (SAS/STAT, 2010). Tretmani ekstrakcije i sve laboratorijske analize provedene su u tri ponavljanja. Dobiveni rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA), a dobivene vrijednosti uspoređene su t-testom (LSD) i gledaju se kao značajno različite pri $p \leq 0,0001$.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Kemijsko-fizikalna svojstva, sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet organskog ostatka od kave

Prema provedenim analizama kemijsko-fizikalnih svojstava organskog ostatka od kave prije pripreme ekstrakata utvrđen je ukupni sadržaj suhe tvari od 38,68 %, sadržaj ukupnih kiselina od 1,4 % i pH vrijednost od 5,73. Dobiveni rezultati poklapaju se s onima utvrđenim za pojedina kemijsko-fizikalna svojstva iz drugih istraživanja. Tako su Tun i sur. (2020.) utvrdili su sadržaj suhe tvari u organskom ostatku kave od prosječno 35 %, dok su Vakalis i sur. (2019.) zabilježili vrijednosti između 30 i 40 %. Rezultati pH vrijednosti dobiveni u istraživanju Cervera-Mata i sur (2022.) poklapaju se s rezultatima dobivenima za pH vrijednost taloga kave u ovom istraživanju, a prilikom čega su autori Cervera-Mata i sur (2022.) zabilježili pH- vrijednost organskog ostatka kave od 5,4. Prema utvrđenom sadržaju ukupnih kiselina i pH- vrijednosti može se zaključiti da je organski ostatak taloga kave slabo kiseli.

Također, ispitan je i sadržaj fenola, flavonoida i neflavonoida kao i antioksidacijski kapacitet ABTS i FRAP metodama. Ukupni sadržaj fenola u organskom ostatku od kave iznosio je 1063,98 mg GAE/100 g, ukupni sadržaj flavonoida 565,82 mg GAE/100 g, dok ukupni sadržaj neflavonoida 498,16 mg GAE/100 g. Antioksidacijski kapacitet organskog ostatka kave analiziran ABTS metodom iznosio je 2295,82 $\mu\text{mol TE/L}$, a analiziran FRAP metodom 4862 $\mu\text{mol TE/L}$. Na temelju dobivenih rezultata analiza može se tvrditi kako organski ostatak kave dobiven pripremanjem napitka kave ima vrlo visok sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet, a što se poklapa i s rezultatima istraživanja drugih autora Campos-Vega i sur., 2015.; Boyadzhieva i sur., 2018.).

4.2. Sadržaj ukupnih fenola ekstrakata od taloga kave

U Grafikonu 1. prikazani su rezultati sadržaja ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima organskog ostatka od kave. Najviši sadržaj ukupnih fenola (834,68 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom uz amplitudu od 60 %, primjenom etanola od 50 % (v/v) te u trajanju od 10 minuta (s11), dok je najniža vrijednost (227,62 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku 50 %-ne otopine etanola tretiranom ultrazvukom u kupelji 10 minuta (k3).

Temeljem dobivenih rezultata može se utvrditi kako način ekstrakcije, klasično i ultrazvukom u kupelji i sondom imaju značajan utjecaj na količinu ekstrahiranih ukupnih fenola u ekstraktima taloga od kave. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom u kupelji općenito su utvrđene najniže vrijednosti ukupnih fenola, neovisno o vrsti otapala i vremenskom periodu ekstrakcije.

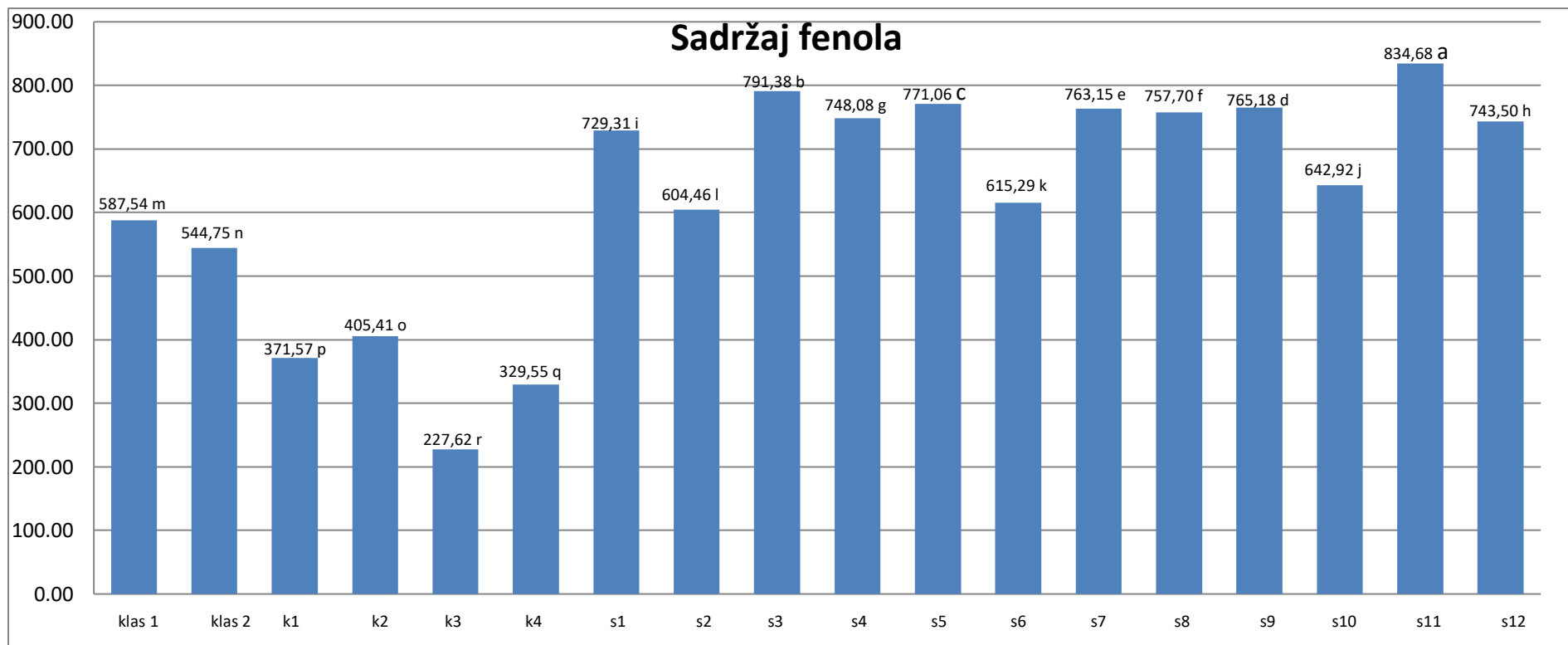
U usporedbi s uzorcima koji su bili klasično tretirani, čak 70 % niže vrijednosti utvrđene su u uzorcima tretiranim u kupelji, dok su čak 2 puta niže vrijednosti uzoraka tretiranim u kupelji utvrđene u usporedbi s onima tretiranim sustavom sonde.

Također, utvrđeno je da koncentracija etanola (50 i 80 %, v/v) ima značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola prilikom čega je u uzorcima ekstrahiranim 50 %-im etanolom utvrđen viši sadržaj ukupnih fenola nego u uzorcima tretiranim 80 %-im etanolom.

Također, prilikom ekstrakcije u sustavu ultrazvučne sonde, varirana je i amplituda (20, 40 i 60 %), a koja je također značajno utjecala na sadržaj ukupnih fenola. Više razine amplitude (40 i 60 %) bile su učinkovitije za ekstrakciju ukupnih fenola.

Varirano vrijeme tretmana kod ekstrakcije ultrazvukom (5 i 10 min) također je značajno utjecalo na prinos ukupnih fenola, a u pravilu tijekom dužeg vremena tretiranja (10 min) sadržaj ukupnih fenola bio je viši.

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da je talog kave bogat izvor ukupnih fenola, što odgovara i rezultatima drugih autora (Boyadzhieva i sur. 2018.), a da tretman ultrazvukom visokog intenziteta značajno pozitivno djeluje na ekstrakciju istih. Pozitivan utjecaj primjene ultrazvuka visokog intenziteta na sadržaj ukupnih fenola utvrdili su i drugi autori u čijim je istraživanjima zabilježen porast sadržaja ukupnih fenola u uzorcima primjenom ultrazvuka visokog intenziteta (Drmić i Režek Jambrak, 2010.; Šic Žlabur i sur., 2015., Al-Dhabi i sur., 2017.)



klas 1 - klasično, 50% EtOH, klas 2 – klasično, 80% EtOH, k1 – UZV kupelj, 50% EtOH, 5 min, k2 – UZV kupelj 80% EtOH, 5 min, k3 – UZV kupelj 50% EtOH, 10 min, k4 – UZV kupelj 80% EtOH, 10 min, s1 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 5 min, s2 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 5 min, s3 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 10 min, s4 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 10 min, s5 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 5 min, s6 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 5 min, s7 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 10 min, s8 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 10 min, s9 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 5 min, s10 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 5 min, s11 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 10 min, s12 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 10 min.

Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenola ekstrakata od taloga kave (mg GAE/100 g)

4.3. Sadržaj ukupnih neflavonoida

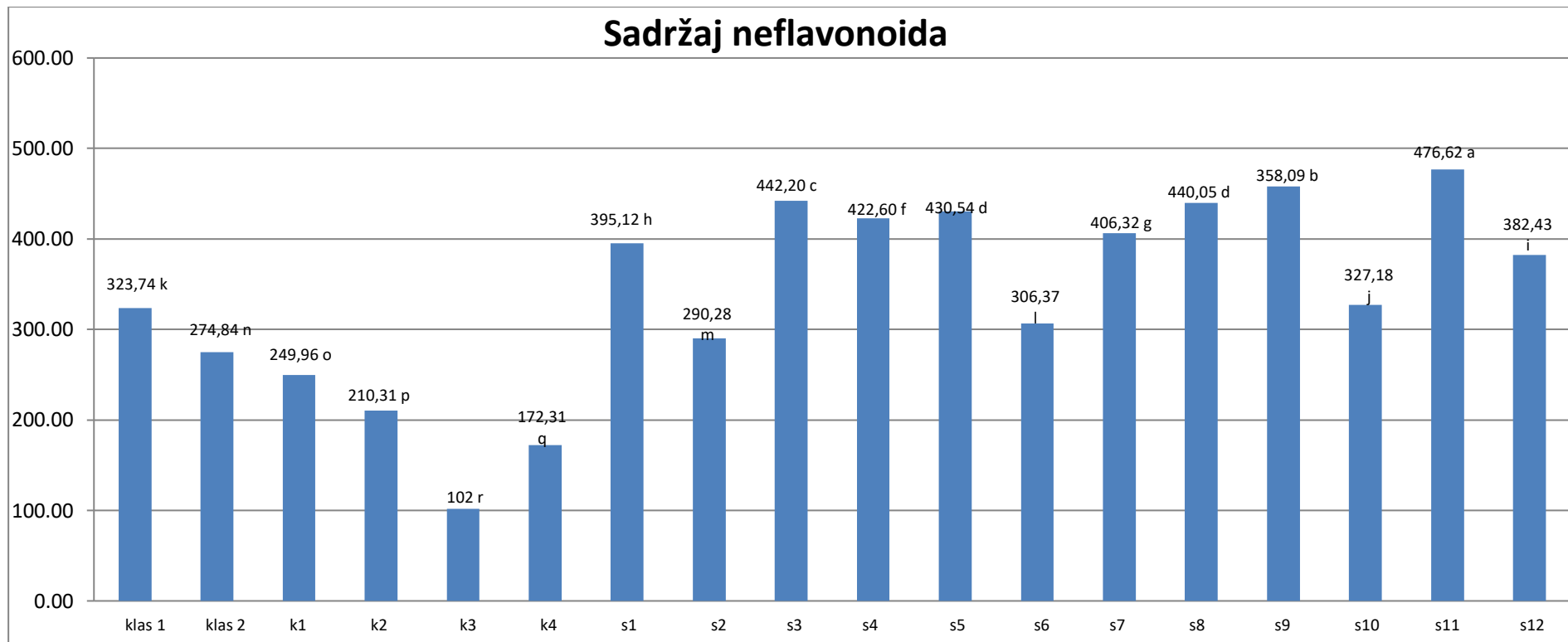
U Grafikonu 2. prikazani su rezultati sadržaja ukupnih neflavonoida u analiziranim ekstraktima organskog ostatka od kave. Najviši sadržaj ukupnih neflavonoida (476,62 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom uz amplitudu od 60 %, primjenom etanola od 50 % (v/v) te u trajanju od 10 minuta (s11), dok je najniža vrijednost (1024,0 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku 50 %-ne otopine etanola tretiranom ultrazvukom u kupelji 10 minuta (k3), što se poklapa i s rezultatima sadržaja ukupnih fenola u uzorcima.

Kao i kod ukupnog sadržaja fenola na temelju dobivenih rezultata može se utvrditi kako način ekstrakcije, klasično i ultrazvukom u kupelji i sondom imaju značajan utjecaj na količinu ekstrahiranih ukupnih neflavonoida u ekstraktima taloga od kave. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom u kupelji općenito su utvrđene najniže vrijednosti ukupnih neflavonoida, neovisno o vrsti otapala i vremenskom periodu ekstrakcije. U usporedbi s uzorcima klasično tretiranim, čak 40 % niže vrijednosti utvrđene su u uzorcima tretiranim u kupelji, dok su 2 puta niže vrijednosti utvrđene u uzorcima tretiranim u kupelji u usporedbi s onima tretiranim sustavom sonde.

Također, utvrđeno je da koncentracija etanola (50 i 80 % v/v) ima značajan utjecaj na sadržaj ukupnih neflavonoida prilikom čega je u uzorcima ekstrahiranim 50 %-im etanolom u većini slučajeva utvrđen viši sadržaj ukupnih neflavonoida nego u uzorcima tretiranim 80 %-im etanolom.

Uz to, kao i kod fenola, prilikom ekstrakcije u sustavu ultrazvučne sonde, varirana je i amplituda, a koja je također značajno utjecala na sadržaj ukupnih neflavonoida. Više razine amplitude (40 i 60 %) bile su učinkovitije za ekstrakciju ukupnih neflavonoida, te se može utvrditi da upotreba sustava ultrazvučne sonde ima pozitivan utjecaj na ekstrakciju u odnosu na ultrazvučnu kupelj, ali i klasičnu ekstrakciju. Varirano vrijeme tretmana kod ekstrakcije ultrazvukom također je značajno utjecalo na prinos sadržaja ukupnih neflavonoida, a u pravilu tijekom dužeg vremena tretiranja (10 min) sadržaj ukupnih neflavonoida bio je viši.

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da su ekstrakti kave bogat izvor ukupnih neflavonoida što potvrđuju i istraživanja drugih autora (Boyadzhieva i sur. 2018., Liczbiński i Bukowska 2021.), a da tretman ultrazvukom visokog intenziteta značajno pozitivno djeluje na ekstrakciju istih. Pozitivan utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih neflavonoida utvrdili u i drugi znanstvenici u svojim radovima (Abid i sur., 2013., Alighourchi i sur., 2013., Zou i sur., 2017., Al-Dhabi i sur., 2017.).



klas 1 - klasično, 50% EtOH, klas 2 – klasično, 80% EtOH, k1 – UZV kupelj, 50% EtOH, 5 min, k2 – UZV kupelj 80% EtOH, 5 min, k3 – UZV kupelj 50% EtOH, 10 min, k4 – UZV kupelj 80% EtOH, 10 min, s1 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 5 min, s2 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 5 min, s3 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 10 min, s4 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 10 min, s5 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 5 min, s6 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 5 min, s7 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 10 min, s8 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 10 min, s9 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 5 min, s10 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 5 min, s11 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 10 min, s12 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 10 min.

Grafikon 2. Sadržaj ukupnih neflavonoida ekstrakata od taloga kave (mg GAE/100 g)

4.4. Ukupni sadržaj flavonoida

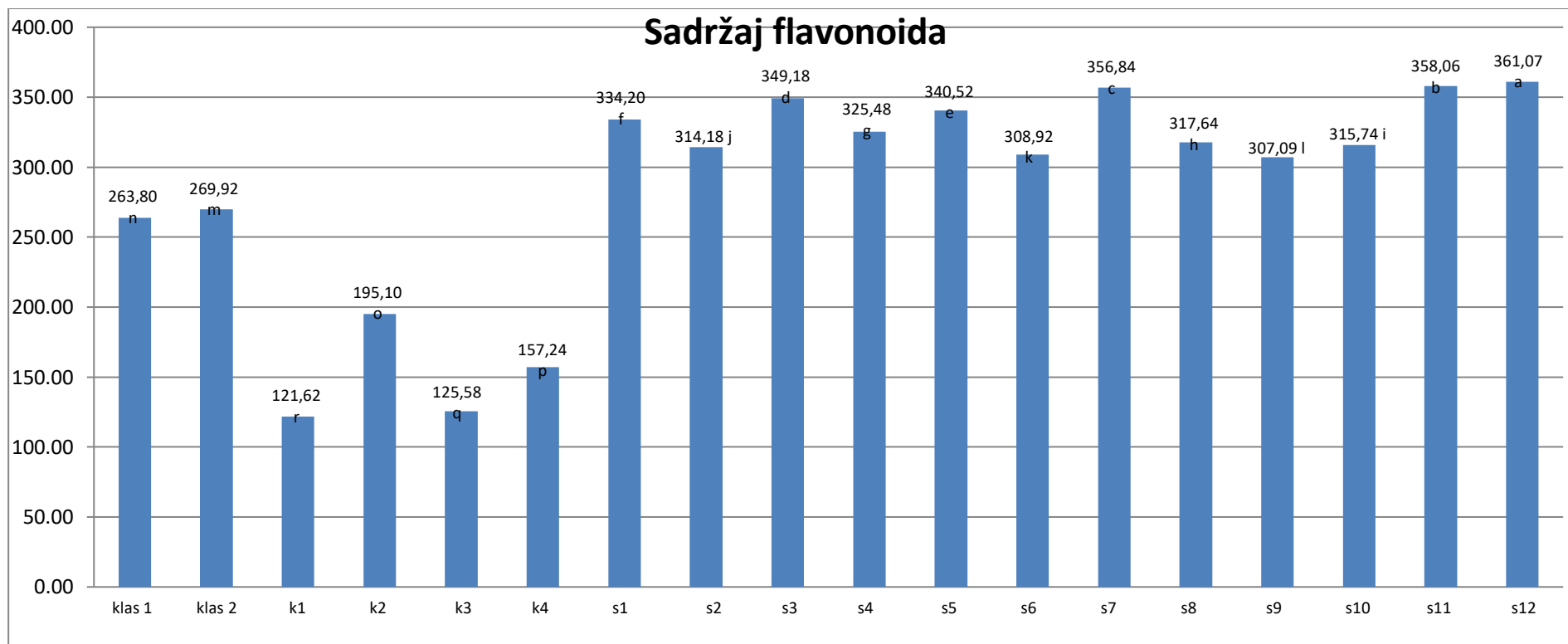
Grafikon 3. prikazuje sadržaj ukupnih flavonoida alkoholnih ekstrakata organskog ostatka od kave. Najviša zabilježena vrijednost ukupnih flavonoida iznosi 361,07 mg GAE/100 g, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom, amplitudom od 60 %, u 80 %-om etanolu u trajanju od 10 minuta (s12), dok je najniža zabilježena vrijednost 121,62 mg GAE/100 g utvrđena za uzorak tretiran 50 %-im etanolom te ultrazvučnom kupelji u trajanju od 5 minuta (k1).

Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvučnom sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, i uzorka ekstrahiranog klasično može se utvrditi kako je sadržaj ukupnih flavonoida veći u ekstraktima tretiranima sondom za 20 %.

Također, značajne razlike ukupnih flavonoida utvrđene su između uzoraka tretiranih u kupelji i uzoraka tretiranih sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, a pri čemu su više vrijednosti flavonoida utvrđene u uzorcima tretiranim ultrazvučnom sondom i to za 55 %.

Vrijeme tretmana značajno je utjecalo na sadržaj ukupnih flavonoida u tretmanu u kupelji i sondom te se može zaključiti kako je dulje vrijeme tretiranja (10 min) (uzorci k2 i k4, s3, s4, s7,s8, s11 i s12) pozitivno utjecalo na sadržaj ukupnih flavonoida. Između uzoraka tretiranih klasično i u kupelji, uočena je značajna razlika u vrijednostima ukupnih flavonoida, pri čemu su vrijednosti kod uzoraka tretiranih klasično više za čak 44 % u odnosu na uzorke tretirane u kupelji. Stoga, može se zaključiti da je uporaba sonde u kraćem vremenskom periodu djelovala iznimno učinkovito na povećanje vrijednosti ukupnih flavonoida u usporedbi s tretmanima u kupelji i klasično.

U istraživanju Badr i sur. (2022.) utvrđeno je da je talog kave izvor flavonoida, istraživanja Bhat i sur. (2011.), Abid i sur. (2013.), Sulaiman i sur. (2017.), i Zou i sur. (2017.), utvrdila su visok sadržaj ukupnih flavonoida u ultrazvučno tretiranim uzorcima što se poklapa s rezultatima ovog istraživanja.



klas 1 - klasično, 50% EtOH, klas 2 – klasično, 80% EtOH, k1 – UZV kupelj, 50% EtOH, 5 min, k2 – UZV kupelj 80% EtOH, 5 min, k3 – UZV kupelj 50% EtOH, 10 min, k4 – UZV kupelj 80% EtOH, 10 min, s1 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 5 min, s2 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 5 min, s3 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 10 min, s4 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 10 min, s5 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 5 min, s6 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 5 min, s7 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 10 min, s8 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 10 min, s9 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 5 min, s10 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 5 min, s11 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 10 min, s12 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 10 min.

Grafikon 3. Sadržaj ukupnih flavonoida ekstrakata od taloga kave (mg GAE/100 g)

4.5. Antioksidacijski kapacitet (ABTS metoda)

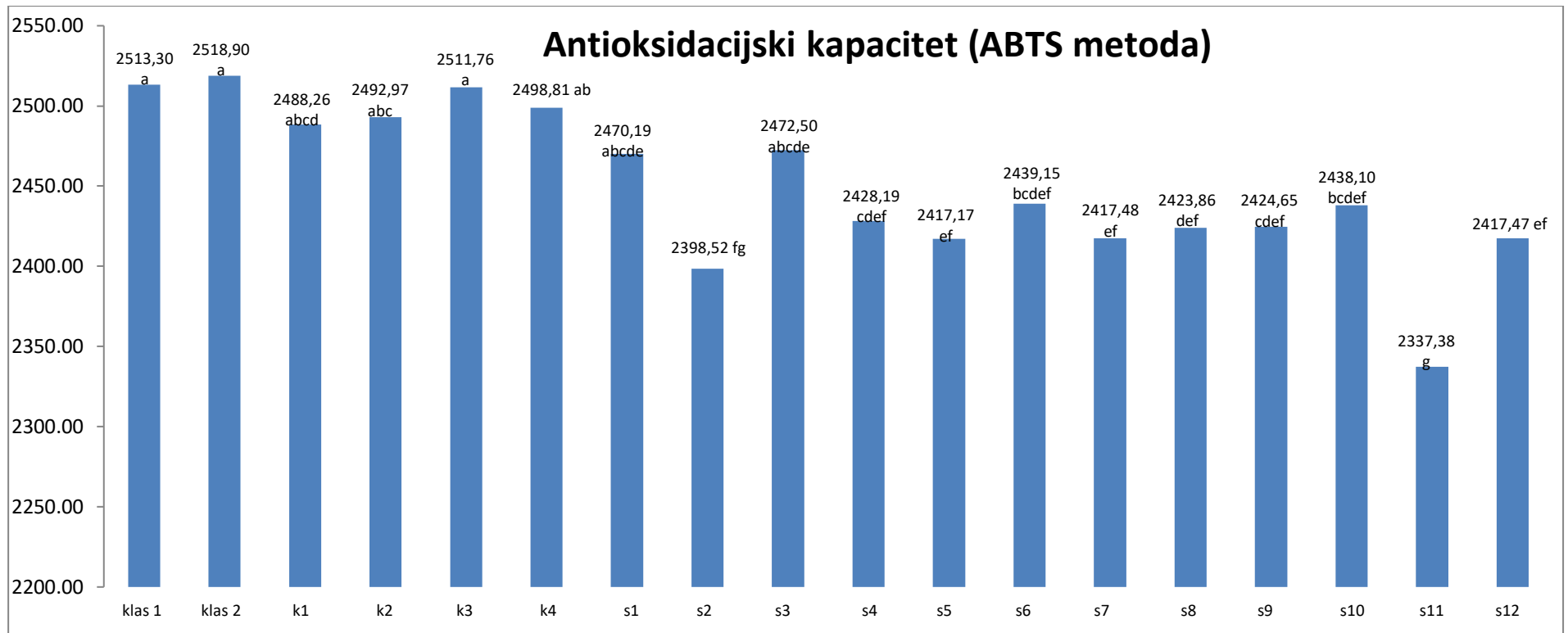
Antioksidativno djelovanje je izravno povezano sa sadržajem bioaktivnih spojeva kao što su vitamini, minerali, fenolni spojevi, pigmenti i ostali. Prema tome, uzorci s višim sadržajem bioaktivnih spojeva trebali bi imati i veće antioksidativno djelovanje (Brnčić i Šić Žlabur, 2019.). Al-Dhabi i sur. (2017.) dokazali su pozitivan utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na ekstrakciju fenolnih spojeva iz organskog ostatka kave.

Grafikon 4. prikazuje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta utvrđenih ABTS metodom alkoholnih ekstrakata organskog ostatka kave. Najviše zabilježene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta iznose 2518,90 $\mu\text{mol TE/L}$ i 2513,30 $\mu\text{mol TE/L}$, a utvrđene su za uzorke tretirane klasično 50 i 80 %-im etanolu (kl1 i kl2), dok je najniža zabilježena vrijednost (2337,38 $\mu\text{mol TE/L}$) utvrđena za uzorak tretiran 50 %-im etanolom, ultrazvučnom sondom u trajanju od 10 minuta (s11).

Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvukom, a neovisno o tipu korištenog uređaja i vremenu trajanja tretmana, s uzorcima ekstrahiranim klasično može se utvrditi kako je antioksidacijski kapacitet veći u ekstraktima tretiranim klasično za oko 3 %.

Uspoređujući uzorke s obzirom na tip uređaja (sonda i kupelj), neovisno o vremenu tretiranja, utvrđen je porast vrijednosti kod uzoraka ekstrahiranih u kupelji. Koncentracija etanola u otopini također je značajno utjecala na antioksidacijski kapacitet uzoraka tretiranih sondom, u kupelji i klasično te se općenito može utvrditi kako je viša koncentracija etanola (80 %) pozitivno utjecala na antioksidacijski kapacitet.

Rezultati ovog istraživanja poklapaju se s rezultatima drugih istraživanja (Boyadzhieva i sur. 2018., Angeloni i sur. 2021.) da u alkoholnim ekstraktima taloga kave postoje značajan antioksidacijski kapacitet. Dok za razliku od toga rezultati usporedbe klasičnih i ultrazvučnih tretmana ekstrakcij u istraživanju nisu u skladu s drugim literaturnim navodima, a koji dokazuju pozitivan utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju polifenolnih spojeva, a time i na antioksidacijski kapacitet nekog uzorka (Šić Žlabur i sur., 2015., Šić Žlabur i sur., 2017.).



klas 1 - klasično, 50% EtOH, klas 2 – klasično, 80% EtOH, k1 – UZV kupelj, 50% EtOH, 5 min, k2 – UZV kupelj 80% EtOH, 5 min, k3 – UZV kupelj 50% EtOH, 10 min, k4 – UZV kupelj 80% EtOH, 10 min, s1 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 5 min, s2 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 5 min, s3 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 10 min, s4 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 10 min, s5 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 5 min, s6 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 5 min, s7 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 10 min, s8 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 10 min, s9 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 5 min, s10 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 5 min, s11 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 10 min, s12 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 10 min

Grafikon 4. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata od taloga kave (ABTS metoda) (μmol TE/L)

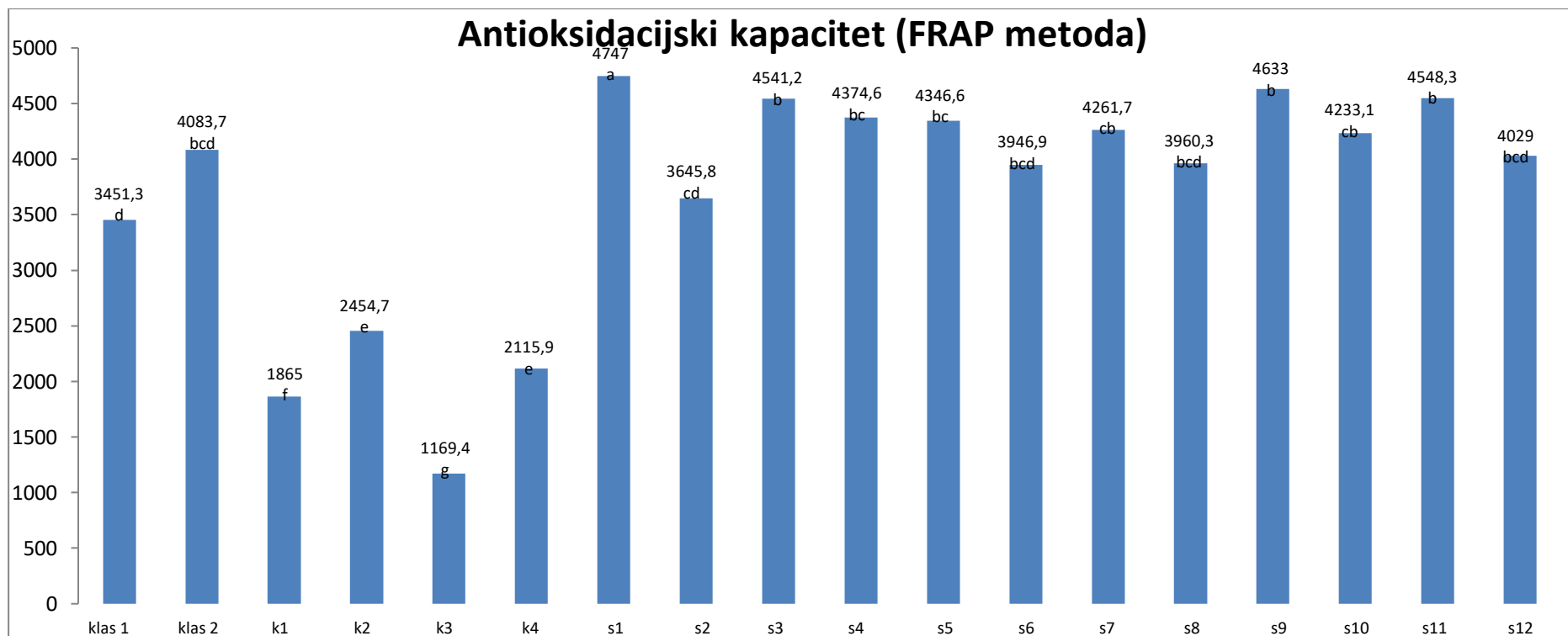
4.6. Antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda)

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta utvrđeni FRAP metodom prikazani su u Grafikonu 5. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta iznosi 4747 $\mu\text{mol TE/L}$ u uzorku tretiranim sondom uz amplitudu od 20 %, s 50 %-im etanolom (v/v) u trajanju od 5 minuta (s1), dok su najniže vrijednosti zabilježene u uzorcima tretiranim ultrazvučnom kupelji, s 80 %-im etanolom (v/v) neovisno o vremenu trajanja tretmana (k1 i k3).

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da su vrijednosti uzoraka tretiranih klasično i sondom u odnosu na uzorke tretirane u kupelji više nego dvostruko više. Najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom, općenito su utvrđene za uzorke tretirane ultrazvučnom sondom neovisno o otapalu i vremenu trajanja tretmana.

U uzorcima tretiranim sondom, više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta imali su uzorci tretirani 50 %-im etanolom neovisno o vremenu trajanja tretmana, dok se u uzorcima tretiranim klasično i kupelji pokazalo suprotno, odnosno više vrijednosti imali su uzorci tretirani 80 %-im etanolom.

Konačno, može se zaključiti kako alkoholni ekstrakti organskog ostatka kave imaju značajan antioksidacijski kapacitet (Boyadzhieva i sur. 2018., Angeloni i sur. 2021., Liczbiński i Bukowska 2021.). Uz to literatura također potvrđuje rezultate ovog istraživanja da ultrazvuk ima veći potencijal ekstrakcije pojedinih bioaktivnih spojeva, posebice polifenolnih te samim time i uzorci tretirani tako imat će veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na klasične metode ekstrakcije (Šic Žlabur i sur., 2015., Al-Dhabi i sur., 2017.).



klas 1 - klasično, 50% EtOH, klas 2 – klasično, 80% EtOH, k1 – UZV kupelj, 50% EtOH, 5 min, k2 – UZV kupelj 80% EtOH, 5 min, k3 – UZV kupelj 50% EtOH, 10 min, k4 – UZV kupelj 80% EtOH, 10 min, s1 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 5 min, s2 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 5 min, s3 – UZV sonda, amp 20%, 50% EtOH, 10 min, s4 – UZV sonda, amp 20%, 80% EtOH, 10 min, s5 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 5 min, s6 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 5 min, s7 – UZV sonda, amp 40%, 50% EtOH, 10 min, s8 – UZV sonda, amp 40%, 80% EtOH, 10 min, s9 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 5 min, s10 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 5 min, s11 – UZV sonda, amp 60%, 50% EtOH, 10 min, s12 – UZV sonda, amp 60%, 80% EtOH, 10 min

Grafikon 5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata od taloga kave (FRAP metoda) (μmol TE/L)

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da način ekstrakcije, klasično ili ultrazvukom visokog intenziteta, značajno utječe na sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ekstrakata od taloga kave. Općenito su više vrijednosti polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ostvareni ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom.

Koncentracija etanola, značajno je utjecala na prinos polifenolnih spojeva i to neovisno o načinu ekstrakcije. Naime, sadržaj ukupnih fenola i ne flavonoida bio je najviši upotrebom 50 %-og etanola, dok flavonoida primjenom 80 %-og etanola kao otapala.

Nadalje, kod ultrazvučne ekstrakcije tip uređaja, kupelj i sonda, značajno su utjecali na prinos polifenolnih spojeva, a prilikom čega je viši sadržaj polifenolnih spojeva utvrđen kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije sondom. Ovdje valja naglasiti, da je jedan od bitnih čimbenika učinkovitosti ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta vrijeme ekstrakcije i amplituda. Značajno veći prinos polifenolnih spojeva ostvaruje se primjenom viših razina amplitude i duljeg vremena tretmana no spomenute parametre važno je optimirati. Bioaktivni spojevi sklone su degradaciji prilikom procesiranja, a često zbog povišene temperature sustava, predugog vremena tretmana, utjecaju kisika i dr. Stoga predugo vrijeme tretiranja u kombinaciji s visokim razinama amplituda (energije unesene u sustav) može imati suprotan učinak i dovesti do degradacije polifenolnih spojeva. U ovom istraživanju, optimalni uvjeti vremena i amplitude pri kojima je ostvaren najviši prinos polifenolnih spojeva bili su 60 % amplituda i 10 min trajanje tretmana.

Konačno, može se zaključiti da je organski ostatak od kave, ali i pripremljeni alkoholni ekstrakti organskog ostatka od kave bogati izvor polifenolnih spojeva te imaju visok antioksidacijski kapacitet te kao takvi pokazuju značajan nutritivni potencijal. Temeljem svega, može se utvrditi da talog kave pokazuje veliki potencijal uporabe te da bi se prije zbrinjavanja kao biootpada mogao koristiti kao nusproizvod i tako ponovno koristiti za proizvodnju novih proizvoda s dodanom vrijednosti.

6. Literatura

1. Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M. M., Hu B., Lei S., Zeng X. (2013). Effect of ultrasound of different quality parameters apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182-1187.
2. Al-Dhabi N. A., Ponmurugan K., Maran Jeganathan P. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34(1), 206-213.
3. Alighourchi H. R., Barzegar M., Sahari M. A., Abbasi S. (2013). Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant capacity of pomegranate juices. *International Food Research Journal*, 20(4), 1703-1709.
4. Angeloni S., Freschi M., Marrazzo P., Hrelia S., Beghelli D., Juan-García A., Juan C., Caprioli G., Sagratini G., Angeloni C. (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Profiles of Spent Coffee Ground Extracts for the Treatment of Neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 6620913. <https://doi.org/10.1155/2021/6620913>
5. AOAC (1995). *Official methods of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of official Analytical chemists.
6. Badr, A. N., El-Attar M. M., Ali H. S., Elkhadragey M. F., Yehia H. M., Farouk A. (2022). Spent Coffee Grounds Valorization as Bioactive Phenolic Source Acquired Antifungal, Anti-Mycotoxigenic, and Anti-Cytotoxic Activities. *Toxins* 2022, 14, 109.
7. Bernard K. (2020). The Top Coffee-Consuming Countries in *Society* <https://www.worldatlas.com/articles/top-10-coffee-consuming-nations.html>
8. Bhat R., Kamaruddin N.S.B.C., Min-Tze L. & Karim A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295-1300.
9. Bongase E. D. (2017). Impacts of climate change on global coffee production industry: Review. *African Journal of Agricultural Research*, 12(19), 1607-1611.
10. Boyadzhieva S., Angelov G., Georgieva S., Yankov D. (2018). Characterization of polyphenol content and antioxidant capacity of spent coffee grounds. *Bulgarian Chemical Communications*, 50(c), 85-89.
11. Brnčić M., Šic Žlabur J. (2019). Impact of ultrasound on food constituents. Effect of Emerging Processing Methods on the Food Quality. pp 69-94.
12. Brnica B. (2018). *Kemijski sastav espresso kave Kimbo i otpada nastalog njenim konzumiranjem (Završni rad)*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:920313>
13. Campos-Vega R., Castañeda H., Oomah B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*. 1(45), Pages 24-36.
14. Carek N. (2020). *In situ transesterifikacija taloga kave (Završni rad)*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:214296>

15. Cervera-Mata A., Delgado G., Fernández-Arteaga A., Fornasier F., Mondini C. (2022). Spent coffee grounds by-products and their influence on soil C–N dynamics, *Journal of Environmental Management*, 302(b), 114075
16. Cronquist A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, New York. 555 pp.
17. Čemerika E., Milički D., Miloloža M., Kučić Grgić D., Žižek K., Ocelić Bulatović V. (2023). Zeleni biokompoziti na bazi otpada taloga kave. *Kemija u industriji*, 72 (3-4), 215-226. <https://doi.org/10.15255/KUI.2022.079>
18. Čičak S. (2021). Kava kao značajan sadržaj hrvatske gastronomske ponude (Završni rad). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:148:278749>
19. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2(2): 22-33.
20. Dujmić F. (2015). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih sastojaka iz taloga crnih vina (Disertacija). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:727833>
21. Farah A. (2012). Coffee Constituents. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 21-58.
22. Grabar K. (2021). Prijedlozi pržionika kao dio tehnološkog rješenja za prženje sirove kave (Završni rad). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:128:749529>
23. Herceg Z., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S., Krešić G. (2008). *Procesi konzerviranja hrane: novi postupci*. Zagreb: Golden marketing- Tehnička knjiga. Zagreb
24. ICO International Coffee Organization ICO Annual Review 2021/2022 Preuzeto s <https://www.ico.org/documents/cy2022-23/annual-review-2021-2022-e.pdf>
25. Kaselj I. (2012). Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom (Diplomski rad). Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preuzeto s https://bib.irb.hr/datoteka/621009.Zavrzni_rad_IK-DA-2012.pdf
26. Kasongo R. K., Verdoodt A., Kanyankagote P., Baert G., Ranst E. V. (2011), Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments. *Soil Use and Management*, 27: 94-102
27. Liczbiński P., Bukowska B. (2021). Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Ind Crops Prod.* 175, 114265
28. Maleš Ž., Ledić K., Šoić D., Skendrović D. (2018). Kriju li biljke opasnost za bjelinu zuba?. *Farmaceutski glasnik*, 74. (3), 183-261. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:130244>
29. Martinović A. (2022). Analiza razvojnih strategija poduzeća unutar industrije kave u Hrvatskoj (Završni specijalistički). Sveučilište u Zagrebu, Ekonomski fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:148:804979>
30. McNutt J., He Q. (2018). Spent coffee grounds: A review on current utilization, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 71, 78-88,
31. Miller N. J., Rice-Evans C. A. (1997). Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS Radical Cation Assay. *Free Radical Research*, 26(3): 195-199

32. Myhrvold N., Coste R. (2023.) "coffee production". Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/topic/coffee-production>. pristup: 24.8.2023.
33. Naglič T., Cerjak M., Tomić M. (2014). Utjecaj sociodemografskih obilježja potrošača na ponašanje u kupnji i konzumaciji kave. *Agroeconomia Croatica*, 4 (1), 8-15. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/125549>
34. Nogaim Q., Al-Duais M., Al-Warafi A., Al-Eriane H., Al-Sayadi M. (2013). The chemical composition of yemeni green coffee. *Journal of Food Chemistry and Nutrition*, 1(2), 42-48. Preuzeto s <https://esciencepress.net/journals/index.php/JFCN/article/view/162>
35. Ough C.S., Amerine M.A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. J. Wiley & Sons. Washington.
36. Puntarić E., Požgaj Đ., Korica Ž., Gumhalter Malić L., Kušević – Vukšić M., Bulat V., Vešligaj G., Krivanek G. Izvješće o komunalnom otpadu za 2022. Godinu https://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/inline-files/OTP_Izvje%C5%A1%C4%87e%20o%20komunalnom%20otpadu%20za%202022.%20godinu_FV.pdf pristup: 28.8.2023.
37. Ratković R. (2021). Ritualna društvena funkcija konzumacije kave u Hrvatskoj (Završni rad). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:111:515987>
38. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
39. Soče M. (2019). Antioksidacijska aktivnost divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:373356>
40. Sulaiman A., Farid M., Silva F.V., (2017). Quality stability and sensory attributes of apple juice processed by thermosonication, pulsed electric field and thermal processing. *Food Science and Technology International*, 23(3), 265-276.
41. Szenthe A. (2020). Top Coffee Producing Countries in Economics <https://www.worldatlas.com/articles/top-coffee-producing-countries.html>
42. Šic Žlabur J. (2015). Utjecaj bioaktivnih komponenata stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) na kvalitetu voćnog soka. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
43. Šic Žlabur J., Dobričević N., Pliješćić S., Galić A., Bilić D. P., Voća S. (2017). Antioxidant potential of fruit juice with added chokeberry powder (*Aronia melanocarpa*). *Molecules*, 22(12), 2158.
44. Šic Žlabur J., Brajer M., Voća S., Galić A., Radman S., Rimac-Brnčić S., Xia, Q., Zhu Z., Grimi N., Barba F. J. (2021.) Ultrasound as a Promising Tool for the Green Extraction of Specialized Metabolites from Some Culinary Spices. *Molecules*, 26, 1866.
45. Šušić I. (2020). Kemijski sastav "Karoma" kave i njenih nusproizvoda (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:676137>

46. Tun M. M., Raclavská H., Juchelková D., Růžičková J., Šafář M., Štrbová K., Gikas P. (2020). Spent coffee ground as renewable energy source: Evaluation of the drying processes. *J Environ Manage.*
47. Udovičić D. (2021). Reološka svojstva Al₂O₃ suspenzija koje sadrže biootpad (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:235:896483>
48. Vakalis S., Moustakas K., Benedetti V., Cordioli E., Patuzzi F., Loizidou M., Baratieri M. (2019). The "COFFEE BIN" concept: centralized collection and torrefaction of spent coffee grounds. *Environmental Science and Pollution Research*. 26. 10.1007/s11356-019-04919-3.
49. Vido M. (2020). Kemijski sastav i utjecaj ave na zdravlje (Završni rad). Požega: Veleučilište u Požegi. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:112:038140>
50. Visković K. (2023). Bioaktivne tvari u prirodnoj kozmetici (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Department of Chemistry).
51. Voća S., Dobričević N., Šic Žlabur J. (2011). Priručnik za vježbe iz modula Prerada voća i povrća. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet Zagreb
52. Vodopija V. (2020). egzotične drvenaste biljke: kakaovac (*Theobroma cacao* L.) i kavovac (*coffea arabica* L.) (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. Preuzeto s <https://www.bib.irb.hr/1108995>
53. Winston E., de Laak J. O., Marsh T., Lempke H., Chapman K. (2005). Arabica coffee manual for Lao-PDR. FAO Regional Office for Asia and the Pacific
54. Zakon o gospodarenju otpadom. NN 84/2021. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html NN 84/21
55. Zakon o održivom gospodarenju otpadom. NN 94/13. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html
56. Zou Y., Jiang A. (2016). Effect of ultrasound treatment on quality and microbial load of carrot juice. *Food Science and Technology*, 36(1): 111-115.
57. Zrnić, K. (2022). Praćenje kvalitete mlijeka tijekom zamrzavanja i skladištenja (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:094019>

Web izvori:

1. FAOSTAT (2022). Production quantities of green coffee. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> - pristup: 23.8.2022.
2. ICO - International Coffee Organization <https://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf> - pristup: 15.9.2022.
3. nca © National Coffee Association of U.S.A., Inc. 45 Broadway, Suite 1140, New York, NY 10006. Phone 212 766-4007 Fax 212 766-5115 <https://www.ncausa.org/about-coffee/10-steps-from-seed-to-cup> - pristup: 20.8.2023.

4. WPR - © World Population Review. Coffee Consumption by Country 2022. <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/coffee-consumption-by-country> – pristup: 15.9.2022.

Životopis

Mislav Humski rođen je 25.05.1995. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Malešnica u Zagrebu završio je 2010. godine, a Gimnaziju Lucijana Vranjanina završio je 2014. godine. Potom upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet koji brzo napušta te kreće raditi. 2015. godine upisuje preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završava preddiplomski studij obranom završnog rada u rujnu 2020. na temu „Ranjenik (*Anthyllis vulneraria* L.) u narodnoj medicini“ te stječe kvalifikaciju sveučilišnog prvostupnika inženjera biljnih znanosti. Nakon toga nastavlja obrazovanje na Agronomskom fakultetu, diplomski studij Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi. Za cijelo trajanje fakulteta aktivno radi preko studentskih ugovora, najviše kao konobar i šanker u Torterie Macaron te od 2019. kao poker dealer i 2022. kao floor u Luckia casinu u Zagrebu.