

Potencijal ljuske lješnjaka kao bogatog izvora polifenola

Đumbir, Margareta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:204:675447>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



POTENCIJAL LJUSKE LJEŠNJAKA KAO BOGATOG IZVORA POLIFENOLA

DIPLOMSKI RAD

Margareta Đumbir

Zagreb, rujan, 2024.

Diplomski studij:

OBNOVLJIVI IZVORI ENERGIJE U POLJOPRIVREDI

POTENCIJAL LJUSKE LJEŠNJAKA KAO BOGATOG IZVORA POLIFENOLA

DIPLOMSKI RAD

Margareta Đumbir

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREB
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Margareta Đumbir**, JMBAG 0124124150, rođena 04.02.1997. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POTENCIJAL LJUSKE LJEŠNJAKA KAO BOGATOG IZVORA POLIFENOLA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Margareta Đumbir**, JMBAG 0124124150, naslova

POTENCIJAL LJUSKE LJEŠNJAKA KAO BOGATOG IZVORA POLIFENOLA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur, mentor _____
2. prof. dr. sc. Sandra Voća, član _____
3. prof. dr. sc. Martina Skendrović Babojelić, član _____

Zahvala

Od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Jani Šic Žlabur na svim sugestijama, pomoći i strpljenju tijekom rada u laboratoriju i pisanja rada. Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i pomoći tijekom diplomskog studija.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Cilj rada	2
2.	Pregled literature	3
2.1.	Morfološka i biološka svojstva lijeske	3
2.2.	Sorta lješnjaka 'Istarski'	4
2.3.	Sorta lješnjaka 'Rimski'	5
2.4.	Kemijski sastav	6
2.5.	Zakon o gospodarenju otpadom	7
2.6.	Mogućnosti ponovne uporabe ljuske lješnjaka	8
2.7.	Ultrazvučna ekstrakcija	10
3.	Materijali i metode	12
3.1.	Materijali rada	12
3.2.	Određivanje mehaničkog sastava	15
3.3.	Određivanje ukupnih fenola u jezgri i ljusci lješnjaka	16
3.4.	Određivanje flavonoida i neflavonoida u jezgri i ljusci lješnjaka	17
3.5.	Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima	18
3.6.	Određivanje ukupnih flavonoida i neflavonoida u ekstraktima	19
3.7.	Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom	19
3.8.	FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta	20
4.	Rezultati i rasprava	21
4.1.	Mehanički sastav ploda lješnjaka	21
5.	Zaključak	51
6.	Literatura	52
	Životopis	55

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Margarete Đumbir**, naslova

POTENCIJAL LJUSKE LJEŠNJAKA KAO BOGATOG IZVORA POLIFENOLA

Lješnjak je jedna od najpopularnijih vrsta jezgrastih plodova koji se mogu konzumirati kao svježi ili prerađeni, najčešće pečeni / tostirani. Osim spomenutog, popularna je proizvodnja i različitih proizvoda od lješnjaka poput slatkih namaza, ulja i brašna. Izazov prilikom proizvodnje, odnosno prerade lješnjaka predstavlja građa ploda, a s obzirom da na ljusku otpada čak 50 % ukupne mase ploda, što u konačnici može predstavljati značajan problem prilikom zbrinjavanja iste. Naime, ljuska ploda lješnjaka koja zaostaje nakon prerade je nusproizvod koji se tretira kao kategorija biootpada. Istovremeno, s obzirom na činjenicu kako je i ljuska vrlo bogata sadržajem specifičnih fitokemikalija, posebno polifenolnih spojeva, brojne su mogućnosti iskorištenja njenog punog potencijala. Stoga je i cilj ovog rada bio valorizirati nutritivni potencijal ljuske i jezgre dviju sorti lješnjaka te utvrditi mogućnosti uporabe ljuske lješnjaka ultrazvukom visokog intenziteta za izdvajanje polifenola. U istraživanju je analiziran sadržaj polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ljuske i jezgre svježih plodova lješnjaka dviju sorti, 'Rimski' i 'Istarski', a nakon čega je ljuska ploda za svaku sortu odvojena ručno i laboratorijskim mlinom usitnjena u prah koji je korišten za testiranje tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (UZV). Za potrebe ultrazvučno potpomognute ekstrakcije korišten je sustav sonde, a varirana je koncentracija otapala, etilnog alkohola 50 i 80 % (v/v), amplituda uređaja (40 i 60 %) i vrijeme tretmana (10, 15 i 25 min). Kontrolni uzorak predstavljao je klasični tretman maceracijom u trajanju od 24 sata 50 i 80 %-im etanolom. Uspoređujući rezultate ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida i antioksidacijskog kapaciteta između ljuske i jezgre obje sorte lješnjaka, najviše vrijednosti svih navedenih parametara utvrđene su za ljusku ploda. Usporedbom načina ekstrakcije, klasično i UZV potpomognuto, značajno više vrijednosti ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida zabilježene su u ekstraktima ljuske obje istraživane sorte lješnjaka tretiranim UZV u usporedbi s uzorcima tretiranim klasično. Također, sukladno visokim vrijednostima polifenolnih spojeva, značajno viši antioksidacijski kapacitet utvrđen je za ekstrakte ljuske tretirane UZV u usporedbi s klasičnim načinom ekstrakcije. Prilikom testiranja parametara ekstrakcije, svi varirani faktori utjecali su na sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Koncentracija otapala (alkohola etanola) značajno je utjecala na prinos polifenolnih spojeva, tako je koncentracija etanola od 80 % (v/v) dala veće prinose u usporedbi s 50 % etanolom. Kod ultrazvučne ekstrakcije varirane su amplituda i vrijeme tretmana, prilikom čega su duže vrijeme tretmana (25 minuta) te viša amplituda (60 %) pozitivno utjecali na ukupni sadržaj fenola, flavonoida, neflavonoida i antioksidacijskog kapaciteta. Za kraj valja istaknuti kako je ljuska obje analizirane sorte lješnjaka vrlo bogat izvor polifenolnih spojeva te se stoga može smatrati nutritivno visoko

vrijednim nusproizvodom s brojim potencijalnim funkcionalnim svojstvima i mogućnostima upotrebe u zamjenu za njezino zbrinjavanje kao biootpada. Ultrazvuk visokog intenziteta pokazao se izuzetno učinkovitim u izolaciji polifenolnih spojeva iz ljuske lješnjaka čime se ta procesna tehnologija može smatrati potencijalnom za daljnju uporabu nusproizvoda proizvodnje lješnjaka.

Ključne riječi: lješnjak, ljuska, nusproizvod, polifenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet, ultrazvuk visokog intenziteta

Summary

Of the master's thesis – student Margareta Đumbir, entitled

THE POTENTIAL OF HAZELNUT SHELLS AS A RICH SOURCE OF POLYPHENOLS

Hazelnuts are one of the most popular types of nuts, which can be eaten fresh or processed, usually baked/roasted. In addition, the production of various hazelnut products such as sweet spreads, oil and flour is also very popular. The challenge in producing and processing hazelnuts is the structure of the fruit, considering that the shell accounts for up to 50% of the total mass of the fruit, this can ultimately pose a significant problem when it comes to disposal. The shell of the hazelnut fruit that remains after processing is a by-product that is treated as bio-waste. Considering that the shell is also very rich in phytochemicals, particularly polyphenolic compounds, there are numerous opportunities to exploit its full potential. The aim of this work was therefore to evaluate the nutritional potential of the shell and kernel of two hazelnut varieties and to determine the possibilities of extracting polyphenols from the hazelnut shell using high-intensity ultrasound. As part of the study, the content of polyphenolic compounds and antioxidant capacity in the shell and kernel of fresh hazelnut fruits of two varieties, 'Rimski' and 'Istarski', was analyzed. The shell of each variety was then separated by hand and ground into a powder using a laboratory mill, which was used to test the treatment with high-intensity ultrasound (UAE). A probe system was used for the ultrasound-assisted extraction, and the concentration of the solvent, ethyl alcohol 50 and 80% (v/v), the amplitude of the device (40 and 60%) and the treatment time (10, 15 and 25 min) were varied. The control sample represented the classical maceration treatment over 24 hours with 80 and % ethanol. When comparing the results of total phenols, flavonoids, non-flavonoids and antioxidant capacity between the shell and the kernel of the two hazelnut varieties, the highest values of all mentioned parameters were obtained for the shell of the fruit. When comparing the extraction methods, conventional and UAE-assisted, significantly higher values for total phenols, flavonoids and non-flavonoids were found in the extracts of the shell of both hazelnut varieties treated with UAE compared to the classically treated samples. In agreement with the high levels of polyphenolic compounds, a significantly higher antioxidant capacity was also found for extracts of the shell treated with UAE compared to the classical extraction method. When testing the extraction parameters, all varied factors had an effect on the content of total polyphenols and the antioxidant capacity. The concentration of the solvent (ethanol-alcohol) significantly influenced the yield of polyphenolic compounds, so that an ethanol concentration of 80% (v/v) resulted in higher yields compared to 50% ethanol. In ultrasonic extraction, the amplitude and treatment time were varied, with a longer treatment time (25 min) and higher amplitude (60%) having a positive effect on the total content of phenols, flavonoids, non-flavonoids and antioxidant capacity. In conclusion, the shell of the two

hazelnut varieties studied is a very rich source of polyphenolic compounds and can therefore be considered a nutritionally valuable by-product with many potential functional properties and uses in exchange for disposal as bio-waste. High-intensity ultrasound proved to be highly effective in isolating polyphenolic compounds from the shell of hazelnuts, which means that this process technology can be considered as a potential for further utilization of the by-products of hazelnut production.

Key words: hazelnut, hazelnut shell, by-product, polyphenols, antioxidant capacity, high-intensity ultrasound

1. Uvod

Lješnjak je plod lijeske (*Corilus avellana* L.) građen od jezgre i ljuske. Potječe iz Anatolije i Grčke, a u 19. stoljeću se proizvodnja proširila po većem dijelu Europe (Cruz-Lopez i sur., 2012.). Proizvodnja ploda lješnjaka, danas je široko rasprostranjena, a prema podacima FAOSTAT-a iz 2022. godine u svijetu je proizvedeno 1195732,16 tona lješnjaka u ljusci. Najveći proizvođač je Turska sa 60 - 70 % nasada svjetske proizvodnje. Osim proizvodnje, konzumacija ove vrste jezgrastog voća iz dana u dan sve više raste, a prvenstveno zbog bogatog nutritivnog sastava ploda lijeske, posebice zbog visokog sadržaja ulja (Stévigny i sur., 2007.). Jezgra ploda sadrži i visok udio proteina, vitamina, vlakana i minerala. Važan su izvor esencijalnih elemenata te sadrže antioksidanse, a zbog čega ispoljavaju i brojne pozitivne funkcije za ljudsko zdravlje (Fuso i sur., 2021.). Prema istraživačkim studijama ljuska lješnjaka kao i list lijeske sadrže taksane koji mogu spriječiti proliferaciju stanica raka (Di Michele i sur., 2021.).

Plod lijeske široko se koristi u konditorskoj i pekarskoj industriji, a važno je napomenuti kako je lješnjak jedna od rijetkih poljoprivrednih kultura koja pokazuje visoku iskoristivost cijele biljke. Naime, drvo lijeske koristi se u drveno-prerađivačkoj industriji za proizvodnju namještaja i raznih predmeta za kućnu upotrebu te u industriji boja za proizvodnju furfurala (Di Michele i sur., 2021.). Jezgra lješnjaka se nakon odvajanja od ljuske dalje prerađuje za potrebe konditorske, farmaceutske i kemijske industrije. Zeleni lisnati pokrov i list se mogu koristiti kao organsko gnojivo, odnosno kao sirovina za proizvodnju komposta. Ljuska, s druge strane zaostaje kao nusproizvod klasificiran kao biootpad zbog čega zahtjeva adekvatno zbrinjavanje, iako predstavlja vrlo korisnu biomasu. U zadnjih nekoliko godina stavlja se naglasak na važnost i potrebu iskorištenja nusproizvoda od proizvodnje lješnjaka. Lignocelulozna biomasa je jedan od najpotencijalnijih obnovljivih izvora energije s obzirom na dostupne količine i na činjenicu da nema kompeticije za hranu. Preko 65 % celuloze i hemiceluloze, odnosno lignoceluloznih materijala može biti hidrolizirano u jednostavne šećere i zatim transformirano u biogorivo druge generacije. Od ljuske se različitim procesima prerade može dobiti vrijedna sirovina za proizvodnju goriva, kemikalija i bio materijala. Ljuska se može preraditi i u bio-ulje termokemijskim metodama poput rasplinjavanja, ukapljivanja i pirolize (Uyan i sur., 2020.).

Plod lijeske bogat je i raznim fitokemikalijama, prilikom čega se u sastavu i sadržaju izdvaja kategorija polifenolnih spojeva od posebno značajnog interesa, a zbog svoje visoke biološke aktivnosti i funkcionalnih svojstava. Fenolni spojevi su visoko zastupljeni kako u jezgri tako i u nusproizvodima prerade. Od fenolnih spojeva važno je istaknuti flavonoide, tanine i proantocijanide. Što se tiče biološke aktivnosti bitno je istaknuti antioksidacijsku aktivnost ploda lijeske zbog mnogih drugih blagodati na ljudsko zdravlje (Bottone i sur., 2019.). Fenoli su najzastupljeniji spojevi u prirodi, a pri tom su jaki antioksidansi. Previsoka razina slobodnih radikala dovodi do oštećenja stanica i tkiva što može uzrokovati razne bolesti i smetnje. Bioaktivni spojevi poput vitamina, minerala, fenolnih spojeva i ostalih su izravno povezani s

antioksidativnim djelovanjem što dovodi do zaključka da uzorci s višim sadržajem bioaktivnih spojeva bi trebali imati i veće antioksidativno djelovanje (Brnčić i Šic Žlabur, 2019.). Temeljem navedenog bogatog kemijskog sastava ne samo jezgre kao dijela ploda lijeske namijenjenog konzumaciji i ljuska ploda izdvaja se visokim nutritivnim sastavom te se kao prioritet postavlja uporaba takvog nusproizvoda nad zbrinjavanjem.

Zadnjih godina procesna tehnologija razvija postupke obrade i procesiranje koji omogućuju maksimalnu uštedu energije, pozitivno utječu na kakvoću proizvoda te općenito ostavljaju niži ekološki otisak. Jedna od takvih metoda je i ultrazvuk visokog intenziteta koju karakterizira visoka procesna učinkovitost u različitim tehnološkim procesima, tako i ekstrakciji. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pokazuje brojne prednosti, ubraja se u kategoriju neinvazivnih metoda, visoko je učinkovita u izdvajanju fitokemikalija prilikom čega se u kratkom vremenu ostvaruju visoki prinosi kemijskih spojeva, kvaliteta proizvoda maksimalno je očuvana uz značajnu uštedu energije (Herceg i sur.).

1.1. Cilj rada

Valorizirati nutritivni potencijal ljuske i jezgre dviju sorti lješnjaka. Utvrditi mogućnosti uporabe ljuske lješnjaka ultrazvukom visokog intenziteta za izdvajanje polifenola.

2. Pregled literature

2.1. Morfološka i biološka svojstva lijeske

Corylus avellana L. europska ili obična lijeska je vrlo stara voćna vrsta. Češće je grmovita, rjeđe stablašica. Ima razvijen grm koji doseže visinu od 4 do 5 metara s velikim brojem grana i grančica. Plodovi mogu biti različitog oblika, okrugli, jajoliki s ravnim ili šiljastim vrhom (Slika 1). Plod lijeske je orah i smješten je u ovoju/kupuli. Izrazito je stranooplodna biljka, jednodomna je što znači da su muški i ženski cvjetovi na istom stablu, ali prostorno odvojeni. Oprašuje se anemofilno, odnosno vjetrom. Lijeska je zanimljiva jer za razliku od drugih voćnih vrsta cvate zimi, od prosinca do ožujka. Muški cvjetovi se počinju formirati u razdoblju od srpnja do kolovoza na jednogodišnjim mladima. Mikrosporogeneza, odnosno redukcijaska dioba se počinje odvijati u rujnu. Muški cvjetovi sakupljeni su u cvatove pod nazivom rese i obično se nalaze u grupama, 2-5 resa. Potpuno se razviju u prosincu te počinju rasijavati pelud. Ženski cvjetovi su u jesen sasvim sitni, nalikuju na plosnati lisni pup. Kada je cvijet otvoren, iz njega vire dva crvena izdužena žiga. Kora je siva s bijelim i velikim mrljama, a listovi su listopadni, zaobljeni, dugi 6-12 cm s dvostruko nazubljenim rubom i dlakavi s donje strane. Listovi su raspoređeni u pravilnom i naizmjeničnom redu na mladici tako da svaki šesti list dolazi iznad prvog lista prethodne serije. Uglavnom služi za asimilaciju, disanje i transpiraciju, čemu je sama građa lista prilagođena. Randman jezgre je oko 50 %. Prosječan životni vijek lijeske je oko 80-90 godina (Miljković, 2018.).



Slika 1. Mladica lijeske s listovima i plodovima

2.2. Sorta lješnjaka 'Istarski'

Sorta lješnjaka 'Istarski' ili 'Istarski duguljasti' (Slika 2) je stara, autohtona hrvatska sorta istarskog porijekla, a najviše se uzgaja na zapadnoj obali istarskog poluotoka i oko Bjelovara u kontinentalnoj Hrvatskoj. Najraširenija je sorta lijeske u Hrvatskoj, a zastupljena je na čak 80 % svih plantaža. Razvija bujne grmove s loptastom krošnjom, dobro razgranatim skeletom i velikom obrastajućom rodnom površinom. Ova hrvatska sorta bogato i redovito rodi te daje plodove dobre kakvoće. Zbog svojih bioloških i gospodarskih svojstava, vrlo je raširena za uzgoj u Hrvatskoj. Cvate srednje rano i samooplodna je sorta. Zbog postojanja većeg broja tipova postoji mogućnost uspješne interpolinacije i međuoplodnje. List je velik, nepravilnog okruglog oblika i bez izraženog šiljka. Plod je omotan u omotač koji je dulji od ploda, nazubljenog vrha, sužen i savijen. Omotač je sastavljen od dva lista. Plod je krupan i ovalnog duguljastog oblika. U infrutescenci su najčešće 2-3 ploda, a može ih biti maksimalno 8. Masa ploda je obično oko 3,5 g, duljina 2,6 cm, a širina 2 cm. Ljuska ploda je tamno smeđa s tamnijim prugama, a vrh ploda je prekriven sivim dlačicama. Debljina ljuske je oko 1,4 mm (Miljković, 2018.)



Slika 2. Sorta lješnjaka 'Istarski'

2.3. Sorta lješnjaka 'Rimski'

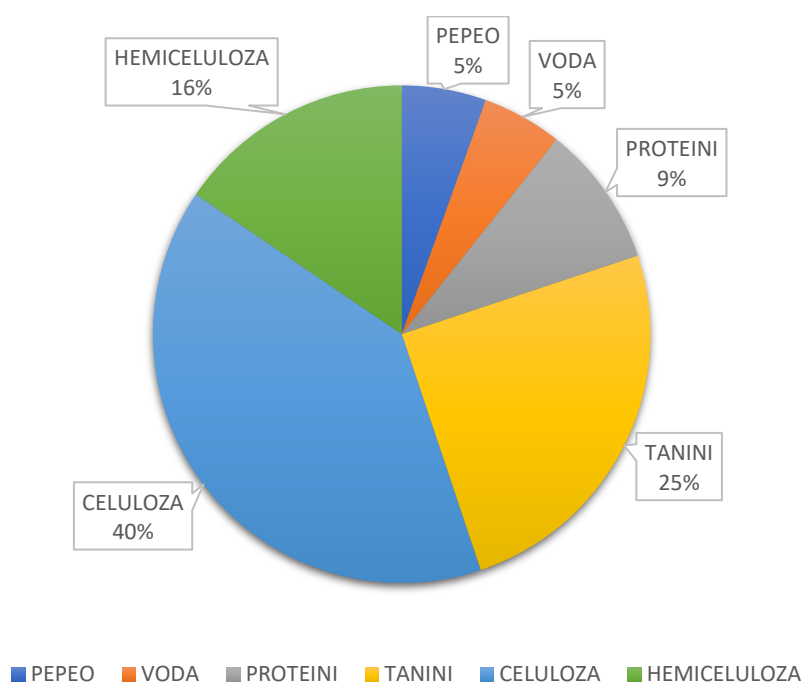
'Rimski ukusni' ili 'Tonda Gentile Romana' sorta je lijeske talijanskog porijekla. Razvija bujna stabla ili grmove koji rastu uspravno zbog čega se može uzgajati i kao stablašica na vlastitom korijenu. Formira mnogo korijenovih izdanaka, a krošnja je vrlo rodna, spljoštenog oblika. Cvate srednje rano, posebice ženski cvjetovi, još u studenom. Samosterilna je sorta, ali je dobar oprašivač za polen sorte 'Halski div'. Ova sorta je obilne rodnosti zbog čega rađa alternativno. List je velik, nepravilnog okruglog oblika i bez izraženog šiljka. Plod je srednje veličine, okruglastog oblika i svijetlosmeđe boje s istaknutim tamnim linijama (Slika 3). Infrutescence sadrže prosječno 3-4 ploda, maksimalno 8. Gornja trećina ploda je prekrivena sitnim dlačicama. Masa ploda je u prosjeku 2,8 g. Jezgra je okruglastog do spljoštenog oblika s prosječnom masom oko 1,4 g. Ljuska je tanka. Randman jezgre je oko 45%. Jezgra sadrži oko 64% masti, 17% bjelančevina i 5,7 mg% nezasićenih masnih kiselina (Miljković, 2018.).



Slika 3. Plod lijeske sorte 'Rimski'

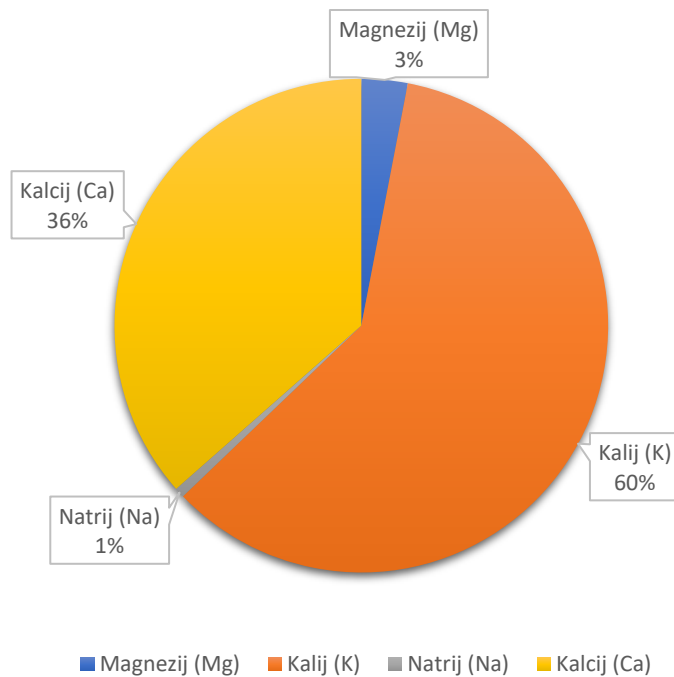
2.4. Kemijski sastav

Ljuska lješnjaka je lignocelulozni materijal u čijem sastavu dominira lignin (oko 30 %), zatim celuloza (29 %) i hemiceluloza (11 %), a važno je istaknuti i prisutnost tanina (18 %). Osim toga, ljuska lješnjaka sadrži i visok udio proteina što ju čini još poželjnijim nusproizvodom i povećava njen potencijal. U osnovnom kemijskom sastavu osim lignoceluloznih molekula, 4 % čini ukupni pepeo, voda oko 4 %, proteini u prosjeku oko 7 %, dok ostatak tanini, celuloza i hemiceluloza (Grafikon 1) (Demirbas, 2001.).



Grafikon 1. Prikaz osnovnog kemijskog sastava ljuske lješnjaka (% na suhu tvar)

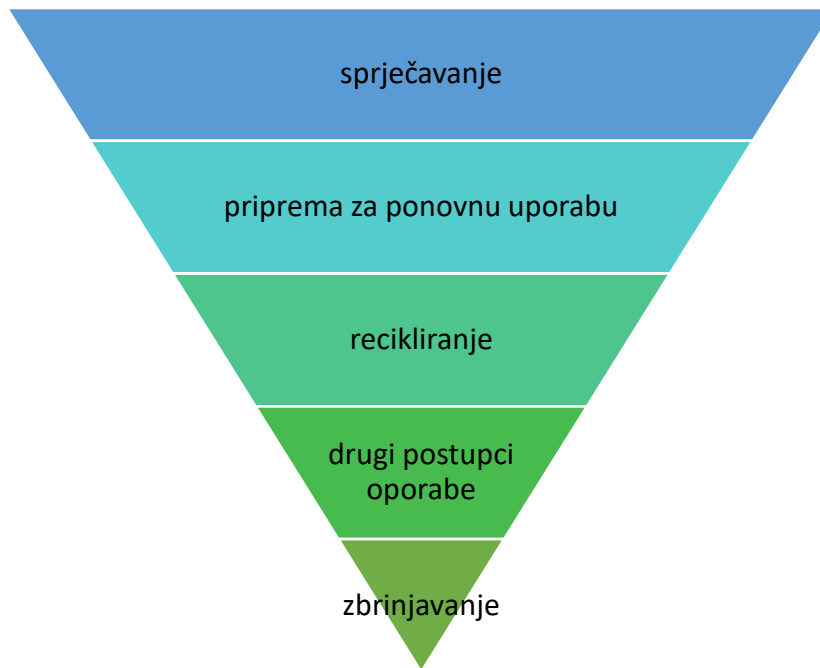
U analiziranom pepelu ljuske lješnjaka oko 5 % čine slijedeći elementi: Mg, K, Na i Ca (Grafikon 2). Temeljem analize pepela utvrđeno je kako je pepeo ljuske lješnjaka idealna zamjena za *feldšpat* ili glinenci. Glinenci su najraširenija i najvažnija skupina silikatnih minerala koji se koriste u staklarskoj i keramičkoj industriji za smanjenje temperature taljenja (Cruz-Lopes i sur., 2012.).



Grafikon 2. Prikaz mineralnog sastava pepela ljuske lješnjaka

2.5. Zakon o gospodarenju otpadom

Članak 7. stavak 1. Zakon o gospodarenju otpadom (NN, 84/21) propisuje red prvenstva gospodarenja otpadom (Slika 4.). Kao prvo i najvažnije se ističe sprječavanje nastanka otpada bilo koje vrste, zatim se naglasak stavlja na ponovnu uporabu recikliranjem ili drugim postupcima uporabe. Kao najnepoželjnije opcije se ističu zbrinjavanje ili odlaganje otpada.



Slika 4. Red prvenstva gospodarenja otpadom od najpoželjnije do najnepoželjnije opcije
(Izvor: NN 61/19)

Kada dođe do situacije da se pojedini otpad ne može reciklirati, ponovno koristiti ili podvrgnuti nekom od postupaka uporabe potrebno ga je propisno zbrinuti na odlagalištima koji su predviđeni i legalni za tu vrstu otpada. Gospodarenje otpadom je potrebno provoditi na način da se spriječi svaki mogući rizik za ljudsko zdravlje i negativan utjecaj na okoliš te bioraznost (NN, 94/13).

Zakon o održivom gospodarenju otpadom (NN 84/21) biootpad klasificira kao biološki razgradiv otpad porijeklom iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana i ugostiteljskih objekata te slični otpad iz prehrambene industrije. Prema navedenom zakonu, ljuska lješnjaka se klasificira kao biootpad.

Proizvođač biootpada dužan je predati biootpad odvojeno od drugih vrsta otpada osobi ovlaštenoj za gospodarenje otpadom ili reciklirati biootpad na mjestu nastanka. U Hrvatskoj spaljivanje otpada je strogo zabranjeno i kažnjivo.

2.6. Mogućnosti ponovne uporabe ljuske lješnjaka

Globalna energetska kriza, klimatske promjene te svijest o iscrpljivanju rezervi fosilnih goriva dovode do sve većih razmatranja i istraživanja obnovljivih izvora energije te uporabe već postojećih sirovina. Lignocelulozna biomasa je jedna od najvećih potencijalnih izvora za obnovljivu energiju. Sirovina s preko 65 % sastava celuloze i hemiceluloze može biti iskorištena

u proizvodnji biogoriva. Provedena su mnoga istraživanja o mogućnostima iskorištenja ljuske lješnjaka u svrhu proizvodnje bioetanola. Dodatno, istraživani su toplinski i kemijski predtretmani biomase ljuske lješnjaka za proizvodnju šećera koji mogu fermentirati, a koja su između ostalog dokazala da je prilikom obrade ljuske lješnjaka nužna intenzivna predobrada zbog visokog sadržaja lignina (Uyan i sur., 2020.). Jedan od optimalnih predtretmana ljuske lješnjaka u proizvodnji bioetanola je tretman vrućom vodom zbog visoke učinkovitosti degradacije lignocelulozne strukture. Predobrada vrućom vodom ne zahtijeva dodatne katalizatore ili kemikalije, a vruća voda lako i brzo prodire u biomasu čime uspješno hidrolizira celulozu te izdvaja hemicelulozu i dio lignina (Uyan i sur., 2020.).

Još jedna od mogućnosti upotrebe ljuske lješnjaka je u proizvodnji peleta. Naime, svjetska potrošnja peleta intenzivno raste, a peleti se istovremeno smatraju poželjnim izvorom energije iz obnovljivih resursa s niskom emisijom stakleničkih plinova prilikom izgaranja. Miješanjem različitih sirovina može se dobiti izuzetno kvalitetna sirovina za proizvodnju peleta, uz što se nadopunjuju pozitivne gorive karakteristike pojedine sirovine. Jedna od izrazito kvalitetnih sirovina koju je poželjno miješati s drugom sirovinom u svrhu peletiranja je upravo ljuska lješnjaka. Kroz mnoga istraživanja ljuska lješnjaka se istaknula svojim bogatim kemijskim sastavom i sastavom pepela, mikro i makro elementima te energetske vrijednosti, što dovodi do zaključka da je potrebno pronaći sirovinu koja bi u sinergiji s ljuskom lješnjaka činila idealan materijal za peletiranje (Solis i sur., 2023.).

Oporaba nusproizvoda u prehrambenoj industriji tijekom godina dobiva sve više na važnosti te se teži stvoriti nove proizvode s dodanom vrijednosti. Posljednjih nekoliko godina svijet okružuju pojmovi poput: zdrav način života, zdrava prehrana, proteini, dijetalna vlakna i bjelančevine. Upravo su dijetalna vlakna jedan od glavnih područja istraživanja budući da su znanstvena istraživanja dokazala njihove dobrobiti za ljudsko zdravlje (Fuso i sur., 2023.). Stoga je ponovna uporaba nusproizvoda voća i povrća za ekstrakciju i upotrebu njihovih vlakana u funkcionalnoj hrani obećavajući korak za okoliš, prehrambenu industriju i zdravlje potrošača. Lignocelulozni ostaci čine 90 % ukupne biljne biomase i nedvojbeno su najzanimljiviji nusproizvodi za ponovnu upotrebu vlakana. U proizvodnji lješnjaka, 50-55 % ukupne mase ploda otpada na ljusku. Provedena su različita istraživanja kojima je utvrđeno kako je iz ljuske lješnjaka moguće izdvajanje vlakana različitog sastava i to topljivih u vrijednosti od 32,7 g/kg suhe tvari i netopljivih u vrijednosti od 862,6 g/kg suhe tvari (Fuso i sur., 2023.).

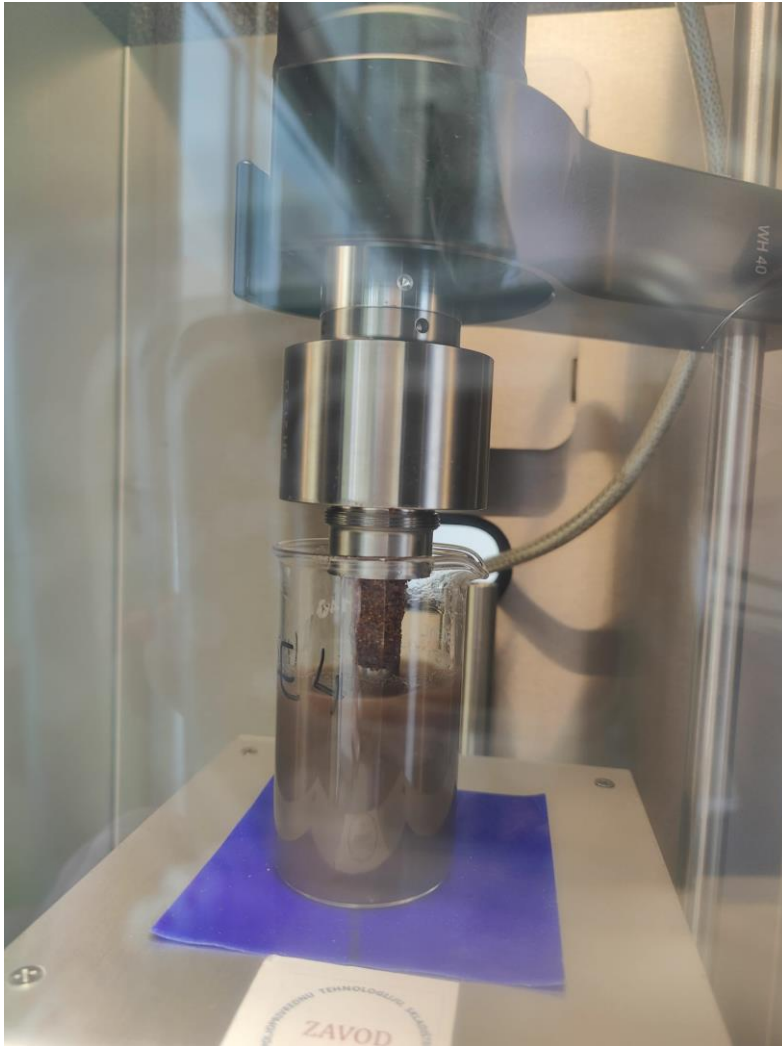
2.7. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija je procesni postupak kojim se postiže potpuno ili djelomično odvajanje i izdvajanje željene tvari iz čvrste ili tekuće smjese koristeći prikladno otapalo u kojem je ta željena tvar topljiva ili barem ima bolju topljivost od ostalih sastojaka. Razlikujemo dva tipa ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje dviju faza u nekoj smjesi: tekuće-tekuće te čvrsto-tekuće. Vrijeme koje je potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti tvari u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini koja je izložena otapalu, volumnom protoku otapala te viskoznosti otapala. Viša temperatura ubrzava proces ekstrakcije jer dolazi do povećanja brzine otapanja, no previsoke temperature mogu imati negativni utjecaj na nutritivna svojstva ili na izdvajanje nepoželjnih tvari. U ekstrakciji se kao otapala najčešće koriste voda, alkohol, biljna ulja i aceton (Drmić i Režek Jambrak, 2010.; Šic Žlabur, 2015.).

Zadnjih nekoliko godina prehrambena tehnologija teži razvoju postupaka koji omogućuju minimalno procesiranje hrane, a koji bi mogli zamijeniti konvencionalne metode. Novi načini procesiranja hrane trebali bi u potpunosti ili djelomično zamijeniti konvencionalne postupke i pri tome pozitivno utjecati na kakvoću proizvoda, uštedu energije i skraćanje vremena procesiranja. Neki od takvih novih tehnoloških postupaka u procesiranju su: visoki hidrostatički tlak, ultrazvuk, oscilirajuće magnetsko polje, elektromagnetsko zračenje i pulsirajuće električno polje. Zajednička karakteristika svih navedenih postupaka je kratko trajanje procesa (od 1 do 10 minuta), mogućnost provođenja postupka pri sobnoj temperaturi te u konačnici nizak negativan utjecaj kako na kvalitetu konačnog proizvoda okoliš općenito (Herceg i sur., 2009.). Za procesiranje hrane ultrazvukom postoji veliki interes zbog toga što je transfer energije do prehrambenog proizvoda trenutačan i širi se kroz cijeli volumen proizvoda što dovodi do smanjenja vremena procesiranja i posljedično tome manjoj potrošnji energije. Ultrazvuk se kao metoda procesiranja često koristi u laboratorijskim uvjetima, dok se u industrijskim uvjetima koristi za ubrzavanje i pospješivanje nekolicine postupaka poput: emulgiranja, homogeniziranja, kristalizacije, inaktivacije mikroorganizama i enzima, ubrzavanja reakcije te pospješivanju procesa ekstrakcije.

Ultrazvuk je zapravo zvučni val frekvencije više od praga osjetljivosti ljudskog sluha (16-18 kHz). Razlikujemo dijagnostički ultrazvuk (niskog intenziteta – visoke frekvencije i niske energije) te ultrazvuk visoke snage (visokog intenziteta – niska frekvencija i visoka energija). Ultrazvučni valovi visokog intenziteta / snage podrazumijeva frekvencije od 20-100 kHz te visoke razine snage u rasponu od 10-1000 W/cm², a koji prolaskom kroz materijal dovodi do destrukcije staničnih struktura, a što je temeljni mehanizam učinka ultrazvuka visokog intenziteta (Herceg i sur., 2009.). Prolaskom ultrazvuka visokog intenziteta, visoke razine snage kroz tekući medij, veličina mjehurića plina koji se formira u tekućini prolaskom zvučnog vala snažno oscilira. Formiranje i nastanak mjehurića plina u tekućini poznat je kao fenomen kavitacije.

Dodirna površina mjehurića je sve veća tijekom uzastopnih ekspanzija i kompresija tijekom svakog ciklusa prolaska ultrazvučnog vala visoke snage što posljedično poboljšava difuziju plina, ali istovremeno dovodi do pucanja mjehurića plina i uzrokuje prijelaznu kavitaciju, temeljni mehanizam djelovanja ultrazvuka visoke snage. Prijelazna kavitacija posljedično dovodi do pucanja stanične stijenke što pomaže oslobađanju topljivih sastojaka (tako i fitokemikalija) iz uzorka u otapalo čime se ubrzava ekstrakcija i povećava njena učinkovitost. Najčešća oprema koja se koristi za primjenu ultrazvuka je sustav ultrazvučne sonde (Slika 5) i ultrazvučna kupelj (Herceg i sur., 2009.).



Slika 5. Ultrazvučna sonda

3. Materijali i metode

3.1. Materijali rada

Za ovo istraživanje korišteni su lješnjaci uzgojeni na OPG Đumbir. Nasad je podignut 2008. godine na obiteljskom poljoprivrednom zemljištu u blizini Siska. Nasad od 560 sadnica se rasprostire na površini od 1 ha. Agrotehničke mjere koje se redovito koriste su mehaničko uništavanje korova, ručna rezidba izbojaka te održavanje uzgojnog oblika u formi stabla. U istraživanju su korištene dvije sorte: 'Istarski' i 'Rimski' lješnjak. Na spomenutom OPG-u odvojena je ljuska od jezgre ploda pomoću stroja iz kućne radinosti bez prethodne kalibracije koji se sastoji od pogonskog motora, čeličnog bubnja unutar kojeg se pomoću centrifugalne sile lješnjaci vrte te dolazi do loma ljuske. Odmah po odvajanju ljuske od jezgre, uzorci lješnjaka dopremljeni su u Laboratorij za analizu kvalitete poljoprivrednih proizvoda biljnog porijekla pri Zavodu za održive tehnologije i obnovljive izvore energije na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a prilikom čega je napravljena i kemijska analiza jezgre i ljuske za svaku sortu.

Ljuska i jezgra svake sorte zasebno su izvagane na tehničkoj vagi za potrebe određivanja mehaničkog sastava sirovine, a nakon čega je ljuska za svaku sortu zasebno usitnjena pomoću mlina i laboratorijskog homogenizatora (Slika 6), te prosijana kako bi se dobio prah što ujednačenije konzistencije.



Slika 6. Usitnjavanje ljuske lješnjaka i priprema praha

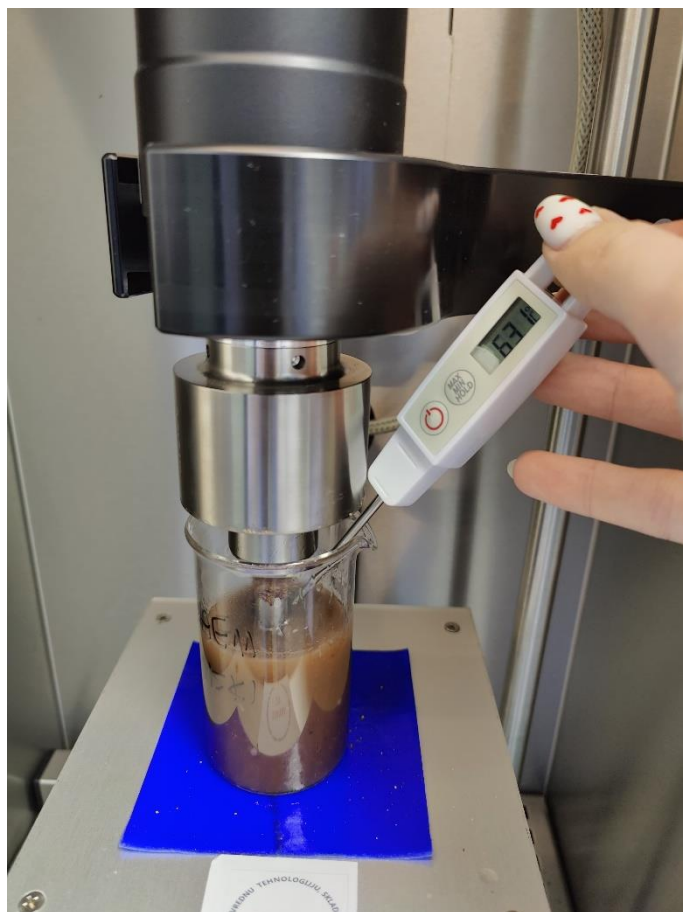
Tako usitnjena ljuska korištena je za pripremu ekstrakata, odnosno tretmana uporabe ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom i klasičnom metodom. Za oba načina ekstrakcije, u laboratorijske čaše volumena od 100 mL odvagano je $4 \text{ g} \pm 0,01$ praha ljuske te je dodan ukupni volumen od 100 mL otapala. Za potrebe pokusa korištene su dvije koncentracije alkohola etanola kao otapala: 50 i 80 % (v/v). Dio tako pripremljenih uzoraka ostavljen je na maceraciji za potrebe provođenja postupka klasične ekstrakcije, a prilikom čega su uzorci praha ljuske nakon dodavanja etanola ostavljeni stajati 24 sata uz povremeno miješanje. Za potrebe ultrazvučno potpomognute ekstrakcije korišten je sustav izravno uranjajuće sonde uređajem Bandelin HD 2000.2 (Njemačka), nominalne snage od 200 W i frekvencije od 30 kHz. Pri ultrazvučno potpomognutoj ekstrakciji varirani su slijedeći parametri: vrijeme (10, 15 i 25 min) i amplituda (40 i 60 %). Plan pokusa ekstrakcije ljuske lješnjaka klasičnom metodom i ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Plan pokusa klasične i ultrazvučno potpomognute ekstrakcije ljuske lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski'

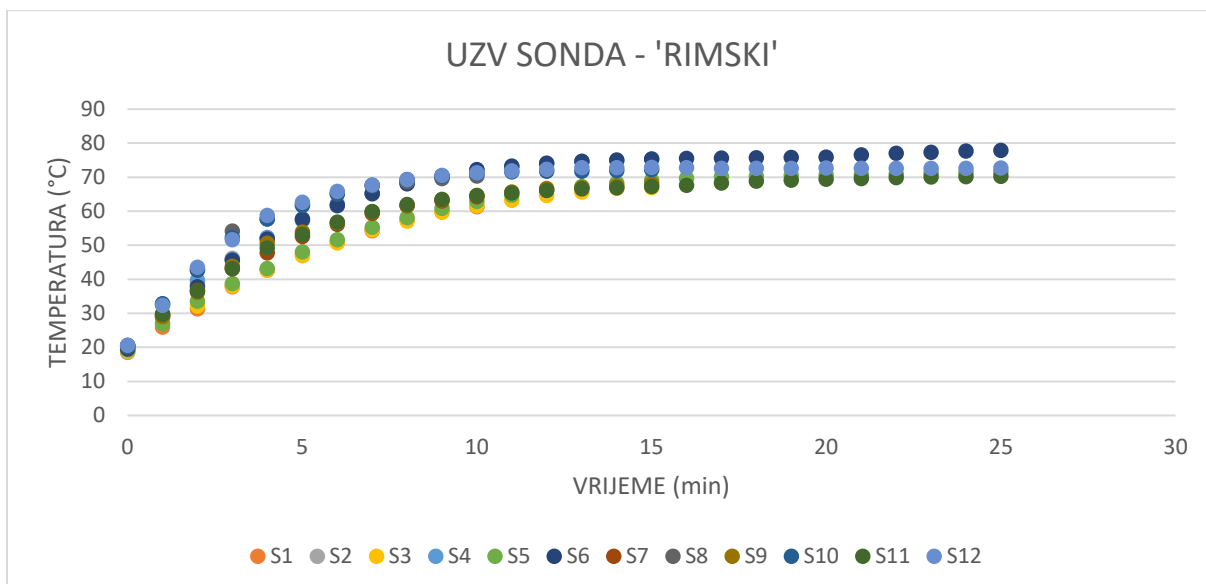
Način ekstrakcije	Otapalo EtOH (%)	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Uzorak
KLASIČNO	50	100	1440	/	KL1
KLASIČNO	80	100	1440	/	KL2
UZV SONDA	50	100	10	40	S1
UZV SONDA	50	100	10	60	S2
UZV SONDA	50	100	15	40	S3
UZV SONDA	50	100	15	60	S4
UZV SONDA	50	100	25	40	S5
UZV SONDA	50	100	25	60	S6
UZV SONDA	80	100	10	40	S7
UZV SONDA	80	100	10	60	S8
UZV SONDA	80	100	15	40	S9
UZV SONDA	80	100	15	60	S10
UZV SONDA	80	100	25	40	S11
UZV SONDA	80	100	25	60	S12

UZV SONDA – ultrazvučni tretman sondom, EtOH – etanolni alkohol

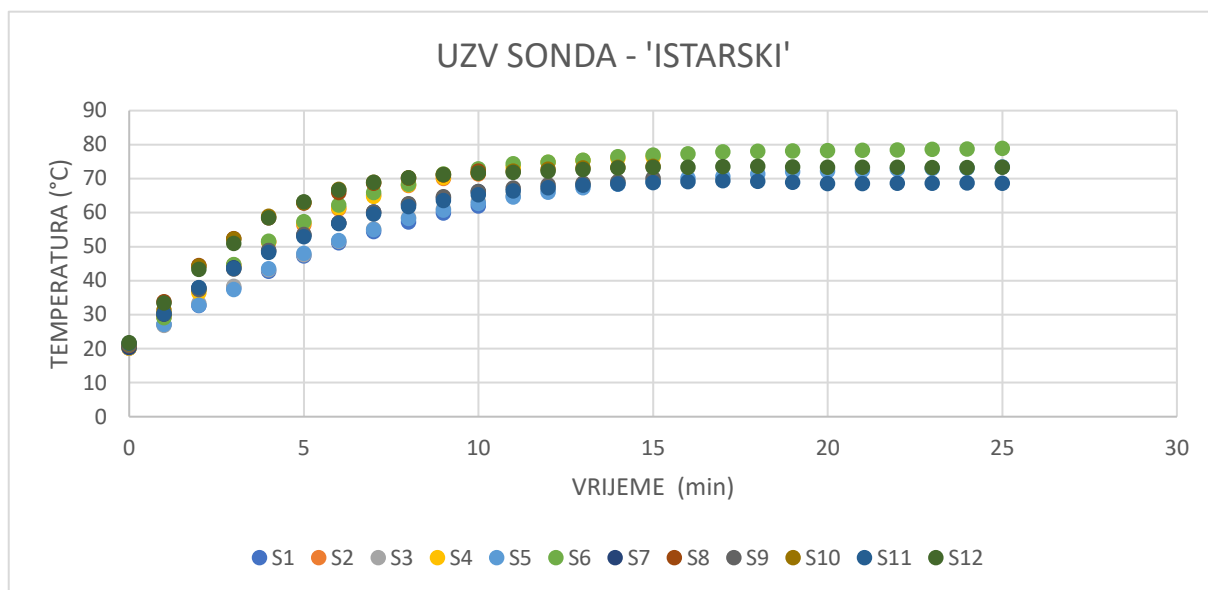
Tijekom ultrazvučnog tretmana sondom, mjerena je temperatura sustava svakih 60 sekundi termometrom (M.E.V. Feller termometar, Ujedinjeno Kraljevstvo) (Slika 7). Promjena temperature (°C) prilikom ultrazvučno potpomognute ekstrakcije alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka za obje sorte prikazana je u Grafikonima 1 i 2.



Slika 7. Mjerenje temperature ekstrakta tijekom procesa ultrazvučne sonde visokog intenziteta



Grafikon 1. Promjena temperature (°C) alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski' tijekom ultrazvučnog tretmana sondom u različitim vremenskim periodima tretiranja (10, 15 i 25 minuta)



Grafikon 2. Promjena temperature (°C) alkoholnih ekstrakata ljuske 'Istarskog' lješnjaka tijekom ultrazvučnog tretmana sondom u različitim vremenskim periodima tretiranja (10, 15 i 25 minuta)

3.2. Određivanje mehaničkog sastava

Određivanje mehaničkog sastava je osnovni uvjet kako bi se odredila ekonomska isplativost proizvodnje bez obzira na vrstu proizvoda. Mehanički sastav podrazumijeva težinski odnos pojedinih dijelova, točnije dijelova koji se prerađuju, te dijelova ploda koji nisu namijenjeni preradi već predstavljaju otpad, a što najčešće čine: kožica ili ljuska ploda, koštica i dio sjemene lože, peteljke i slično. U procesu prerade razlikuju se dva elementa kojima se definira iskoristivost sirovine, to su upotrebljivi i neupotrebljivi dio, odnosno otpad. Otpadom se smatra sve ono što se u određenom tehnološkom procesu ne koristi. Odnos upotrebljivog i neupotrebljivog dijela se izražava u postocima (%) te predstavlja randman. Kako bi ekonomska isplativost određene proizvodnje i prerade bila što veća, teži se prema što većem randmanu.

Aparatura i pribor:

- mlin
- laboratorijski homogenizator
- laboratorijska čaša
- tehnička vaga

Postupak određivanja:

Nakon odvajanja ljuske od jezgre zasebno su na tehničkoj vagi odvagani ljuska i jezgra za obje sorte lješnjaka. Iz odvaganih masa odvojenih dijelova ploda prema jednadžbama 1 i 2 izračunata je iskoristivost i udio otpada

$$\text{Iskoristivost (\%)} = \frac{m(\text{jezgra ploda})}{m(\text{cijelog ploda})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Udio otpada (\%)} = \frac{m(\text{otpada})}{m(\text{cijelog ploda})} \times 100 \quad (2)$$

3.3. Određivanje ukupnih fenola u jezgri i ljusci lješnjaka

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 750 nm. Metoda se bazira na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u wolfram-oksidi i molibden-oksidi koji su plavo obojeni (Ough i Amerine, 1988).

Aparatura i pribor:

- filter papir
- stakleni lijevci
- pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- tikvice s okruglim dnom volumena 100 mL
- odmjerne tikvice volumena 50 mL i 100 mL
- kivete
- povratno hladilo
- spektrofotometar (1900i, Shimadzu, Japan)

Kemikalije:

- 96 %-ni etanol
- 80 %-ni etanol
- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- zasićena otopina natrijeva karbonata, Na_2CO_3

Priprema uzoraka:

Izvagano je $10 \pm 0,01$ g uzorka i homogenizirano s 40 mL 80 %-og etanola. Homogena smjesa kuhana je 10 minuta uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt filtriran je u odmjernu tikvicu od 100 mL. Zaostali talog zajedno sa filter papirom prebačen je s 50 mL 80 %-og etanola u tikvicu sa šlifom i dodatno kuhan uz povratno hladilo još 10 min. Dobiveni ekstrakti spojeni su s prethodno dobivenim ekstraktom te je odmjerna tikvica nadopunjena do oznake s 80 %-im etanolom.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se redom: 0,5 mL ekstrakta, 30 mL destilirane vode, 2,5 mL F.C. reagensa i 7,5 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Sadržaj tikvice se promiješa, nadopuni destiliranom vodom do oznake te ostavi dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbanacija pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

3.4. Određivanje flavonoida i neflavonoida u jezgri i ljusci lješnjaka

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba 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 također na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor:

- Filter papir
- Stakleni lijevci
- Erlenmeyer-ova tikvira sa šlifom i čepom volumena 25 mL
- Pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Analitična vaga
- Staklene kivete
- Spektrofotometar (1900i, Shimadzu, Japan)

Kemikalije:

- Klorovodična kiselina, HCl 1:4 (koncentrirana HCl razrijedi se vodom u omjeru 1:4)
- Formaldehid (35%)
- Dušik za propuhivanje uzorka

- Zasićena otopina natrijeva karbonata
- Folin-Ciocalteu reagens
- 80 %-ni etanol

Priprema uzorka:

Ekstrakt ukupnih fenola (opisan u poglavlju 3.3.) koristi se i za određivanje flavonoida i neflavonoida.

Postupak određivanja:

Za potrebe određivanja neflavonoida otpipetira se 10 mL ekstrakta u tikvicu od 25 mL i doda 5 mL otopine HCl (1:4) te 5 mL formaldehida. Smjesa se propuše dušikom, zatvori i ostavi stajati 24 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Slijedeći dan se profiltrira preko filter papira i slijedi isti postupak kao za određivanje ukupnih fenola.

Koncentracija neflavonoida izračunava se na isti način kao i koncentracija ukupnih fenola uzimajući u obzir i dodatna razrjeđenja. Iz razlike ukupnih fenola i neflavonoida odredi se sadržaj ukupnih flavonoida.

3.5. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima

Aparatura i pribor:

- odmjerna tikvica od 50 mL
- pipete volumena 1 mL i 2 mL
- Spektrofotometar (1900i, Shimadzu, Japan)

Kemikalije:

- 1 mL Folin-Ciocalteu reagens (1:2)
- 3 mL zasićenog natrijevog karbonata, Na_2CO_3
- destilirana voda

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se redom: 1 mL ekstrakta, 1 mL Folin-Ciocalteu reagens (1:2 destilirana voda) i 3 mL zasićenog natrijevog karbonata te se tikvica napuni do oznake destiliranom vodom, ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 750 nm i destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

3.6. Određivanje ukupnih flavonoida i neflavonoida u ekstraktima

Aparatura i pribor:

- odmjerna tikvica od 25 mL
- pipete volumena 1 mL i 2 mL
- Spektrofotometar (1900i, Shimadzu, Japan)

Kemikalije:

- 2 mL 20% klorovodične kiseline, HCl
- 1 mL formaldehida
- dušik za propuhivanje uzoraka

Za potrebe određivanja flavonoida u odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 2 mL ekstrakta, 1 mL 20 %-ne klorovodične kiseline te 1 mL formaldehida. Uzorak se propuše dušikom te ostavi stajati 24 h.

Nakon taloženja, sadržaj tikvice se profiltira i slijedi ista reakcija kao za određivanje ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih neflavonoida izražava se matematički iz razlike ukupnih fenola i flavonoida.

3.7. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2 – azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+} radikal-kationa) koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS^{•+} kation se reducira u ABTS, a reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorpcije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorpcije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan

- 140 mM otopina kalijeva persulfata, K₂S₂O₈ (0,1892 g K₂S₂O₈ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL

- 7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- Stabilna ABTS otopina (88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine (140 mM) prenese 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 pri sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava.

2. dan

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-na otopina $ABTS^{\cdot+}$ (1 mL $ABTS^{\cdot+}$ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake. Nakon toga mjeri se apsorbancija 1%-tne otopine $ABTS^{\cdot+}$ pri 734 nm koja mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Ako apsorbancija otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbancija premala u tikvicu od 100 ml pripremljene 1%-tne otopine $ABTS^{\cdot+}$ treba dodati još par kapi stalne $ABTS^{\cdot+}$ otopine, a ako je apsorbancija prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu (100 mL) dodati još 96 %-og etanola.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski):

Volumen od 160 μ L uzorka (ekstrakta) pomiješa s 2 mL 1%-tne otopine $ABTS^{\cdot+}$ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol. Konačne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka izračunavaju se iz jednadžbe baždarnog pravca otopine Trolox-a izražene kao μ molTE L⁻¹. Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox (Sigma Aldrich, SAD) koji uzrokuje smanjenje boje $ABTS^{\cdot+}$ otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 μ mol/L. 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%-im etanolom nadopuni do oznake. Iz „stock“ otopine pripremaju se ostala razrjeđenja. Nakon pripreme navedenih koncentracija otpipetira se 160 μ L pojedine razrijeđene otopine Trolox-a i doda 2 mL 1 %-ne $ABTS^{\cdot+}$ otopine, te se mjeri apsorbancija pri 734 nm.

3.8. FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom vrši se mjerenje antioksidacijskog potencijala uzorka 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 (Moharram i Youssef, 2014.). 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. 40 mM HCl dobiva se tako da se otpipetira 330 μ L 37%-tna HCl u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. 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. Za pripremu acetatnog pufera 0,3 M potrebno je odvagati 3,1 g natrij-acetat trihidrata u tikvicu od 1 L. Potom se otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Nakon toga potrebno je provjeriti pH pufera koji bi trebao iznositi 3,6. Postupak pripreme FRAP reagensa: 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.

Postupak određivanja:

Prvo je potrebno napraviti slijepu probu: 240 μ L destilirane vode, 80 μ L 80%tnog EtOH, 2080 μ L FRAP reagensa te se slijepa proba termostatira u vodenoj kupelji 5 min na 37 °C.

Postupak reakcije:

U epruvetu se doda 240 μ L destilirane vode, 80 μ L uzorka, 2080 μ L 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 (mM željezo(II)-sulfat heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)) prema baždarnom pravcu potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepa probe od apsorbancije uzoraka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje prema dobivenoj jednadžbi pravca (Benzie i Strain, 1996).

4. Rezultati i rasprava

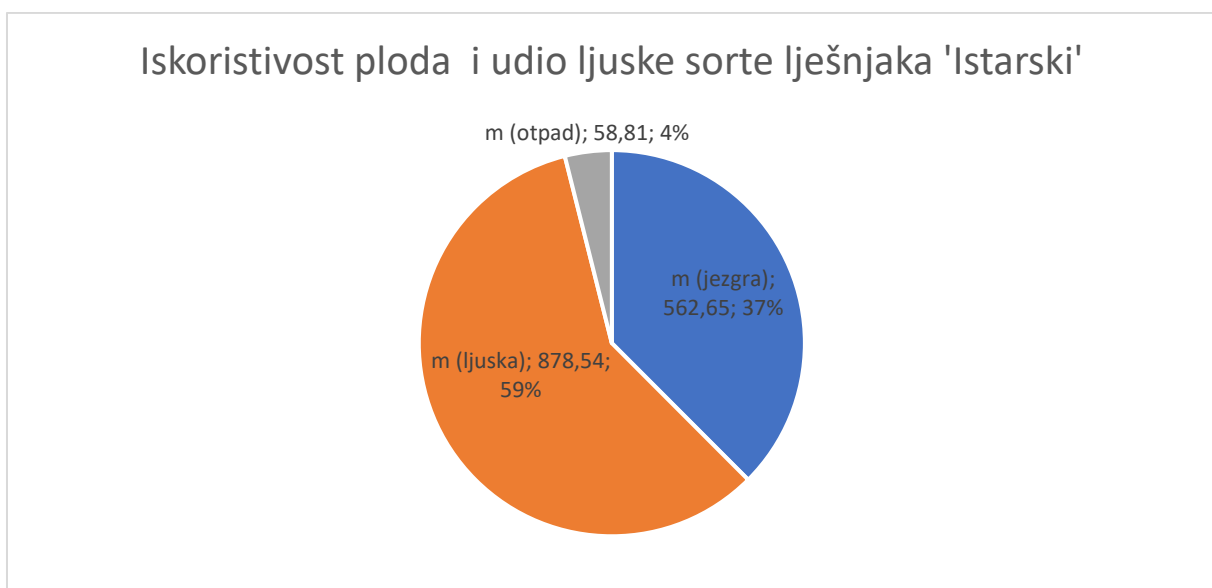
4.1. Mehanički sastav ploda lješnjaka

Rezultati iskoristivosti ploda lješnjaka i udjela otpada (ljuske) za istraživane sorte 'Istarski' i 'Rimski' prikazani su u Grafikonima 3 i 4. Kod obje sorte lješnjaka, jezgra ploda čini manje od 40 % ukupne mase ploda i to kod sorte 'Rimski' udio jezgre je svega 32,16 %, dok kod sorte 'Istarski' jezgra čini 37,51 % mase ploda. Također, udio ljuske je kod obje sorte blizak te konkretno kod sorte 'Rimski' iznosi 58,09 % ukupne mase, a kod sorte 'Istarski' iznosi 58,87 %. Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je kako preko 50 % ukupne mase ploda istraživanih sorti lješnjaka čini ljuska koja prilikom daljnje upotrebe i prerade predstavlja otpad. Dobiveni rezultati udjela ljuske u ukupnoj masi ploda lješnjaka u skladu su s istraživanjima drugih autora prilikom čega Fuso i sur. (2023.) u svojem istraživanju ističu podatke za udio ljuske u masi ploda

lješnjaka od 50-55 %. Ovakvi rezultati jasno označavaju da je potrebno veću pozornost pridati ljusci lješnjaka kao nusproizvodu punog potencijala za daljnje iskorištenje, a ne ga isključivo klasificirati otpadom.



Grafikon 3. Iskoristivost ploda i udio ljuske sorte lješnjaka 'Rimski'

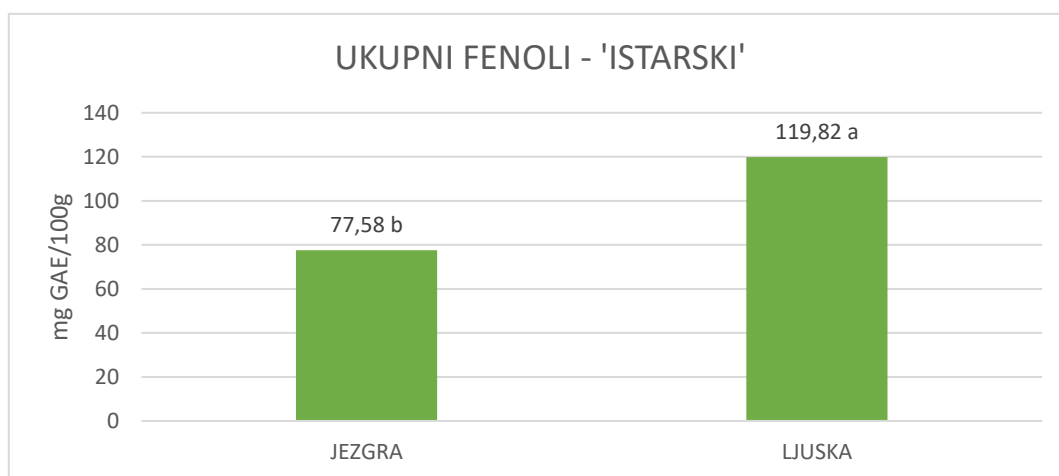


Grafikon 4. Iskoristivost ploda i udio ljuske sorte lješnjaka 'Istarski'

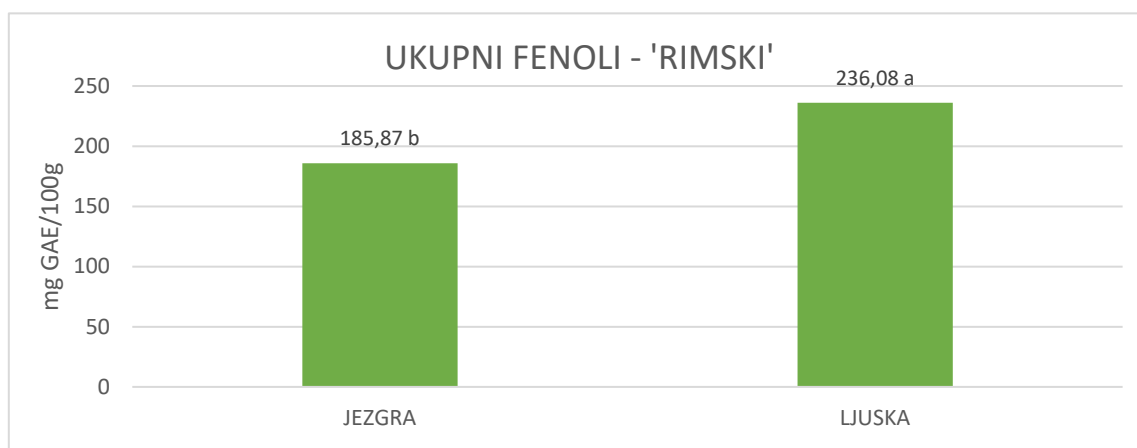
4.2. Sadržaj ukupnih polifenola (flavonoida i neflavonoida) u jezgri i ljusci lješnjaka

Rezultati sadržaja ukupnih fenola (flavonoida i neflavonoida) analiziranih u jezgri i ljusci lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski' prikazani su u Grafikonima 5 i 6. Prema provedenoj statističkoj analizi uzorci ljuske i jezgre lješnjaka kod obiju analiziranih sorti značajno se razlikuju u sadržaju

ukupnih fenola, a prilikom čega je kod sorte 'Istarski' u ljusci utvrđeno čak oko 55 % više ukupnih fenola u usporedbi s jezgrom, dok je kod sorte 'Rimski' ta razlika bila nešto manja, te je iznosila oko 27 %.

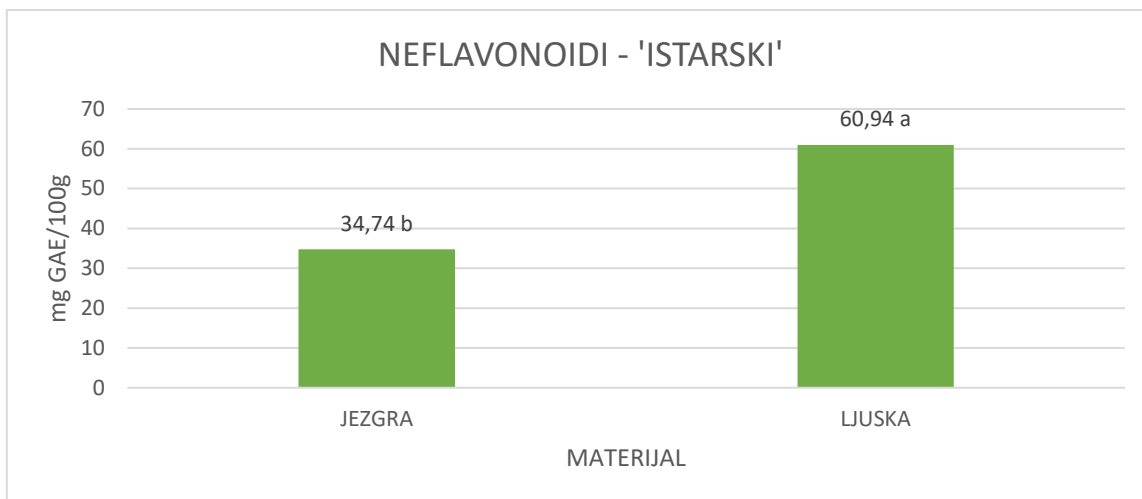


Grafikon 5. Sadržaj ukupnih fenola ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Istarski' (mg GAE/100 g)

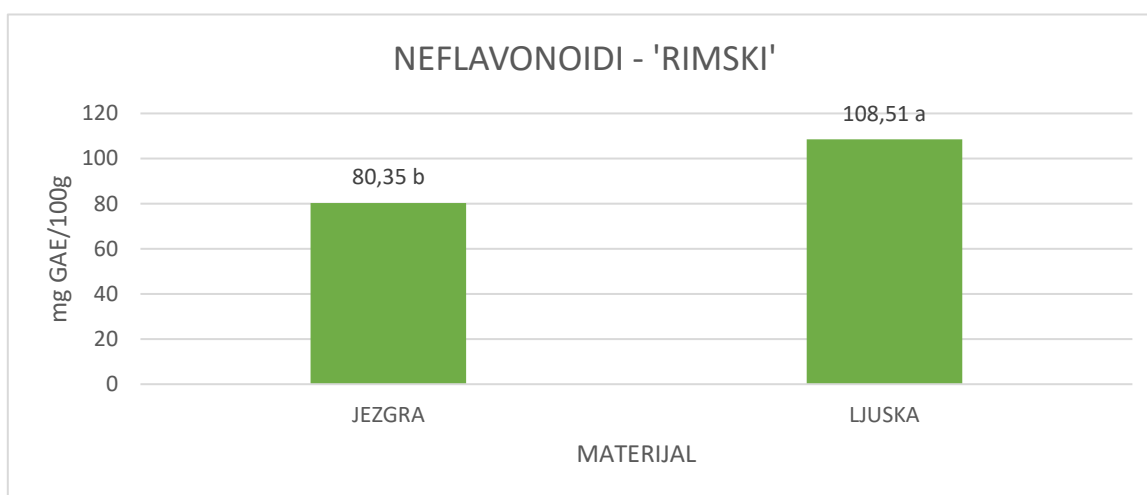


Grafikon 6. Sadržaj ukupnih fenola ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Rimski' (mg GAE/100 g)

Isti trend zabilježen je i za sadržaj ukupnih neflavonoida (Grafikon 7 i 8) i ukupnih flavonoida (Grafikon 9 i 10) analiziranih u jezgri i ljusci lješnjaka sorata 'Istarski' i 'Rimski'. Naime ponovno, kod objiju sorti statističkom analizom je utvrđeno značajno više ukupnih neflavonoida u ljusci u usporedbi s jezgrom. Kod sorte 'Istarski' 75 % više je neflavonoida u ljusci u odnosu na jezgru ploda, dok kod sorte 'Rimski' oko 35 % više neflavonoida u ljusci u odnosu na jezgru.

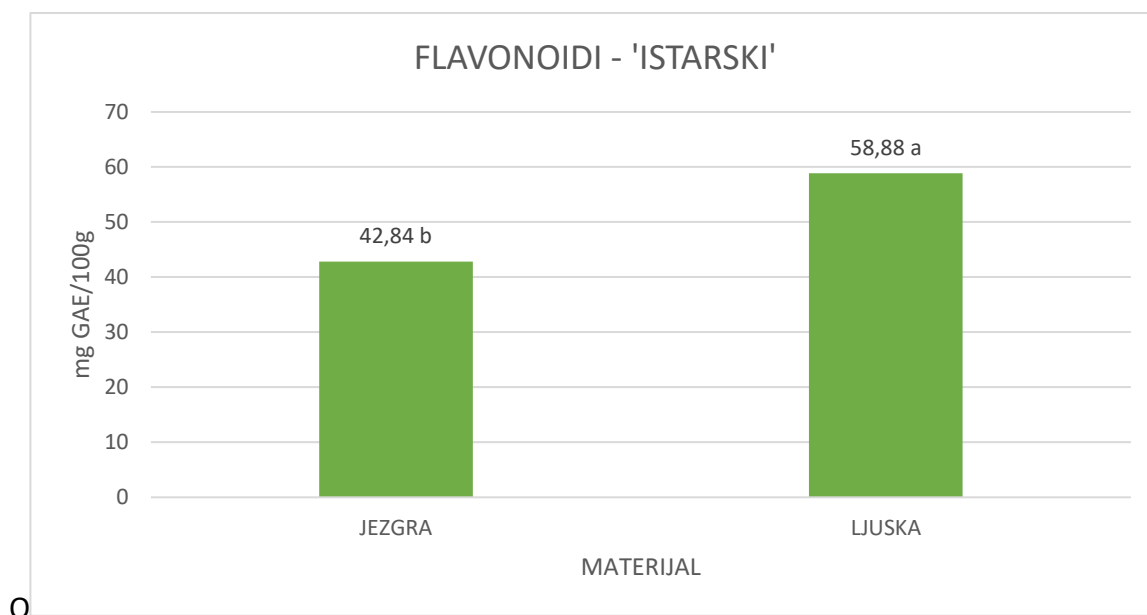


Grafikon 7. Sadržaj ukupnih neflavonoida ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Istarski' (mg GAE/100g)

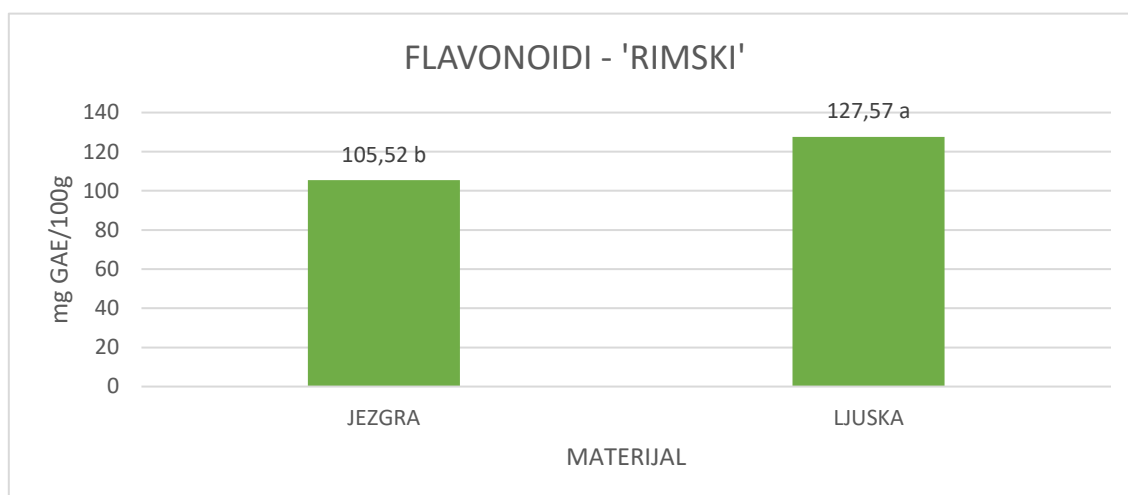


Grafikon 8. Sadržaj ukupnih neflavonoida ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Rimski' (mg GAE/100g)

Prema provedenoj statističkoj analizi može se zaključiti kako se uzorci ljuske i jezgre lješnjaka obiju sorti značajno razlikuju i u sadržaju flavonoida. Kod sorte 'Istarski' u ljusci je utvrđeno 38 % više flavonoida u usporedbi s jezgrom, dok je kod sorte 'Rimski' ta razlika nešto manja te je iznosila oko 20 %.



Grafikon 9. Sadržaj ukupnih flavonoida ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Istarski' (mg GAE/100 g)

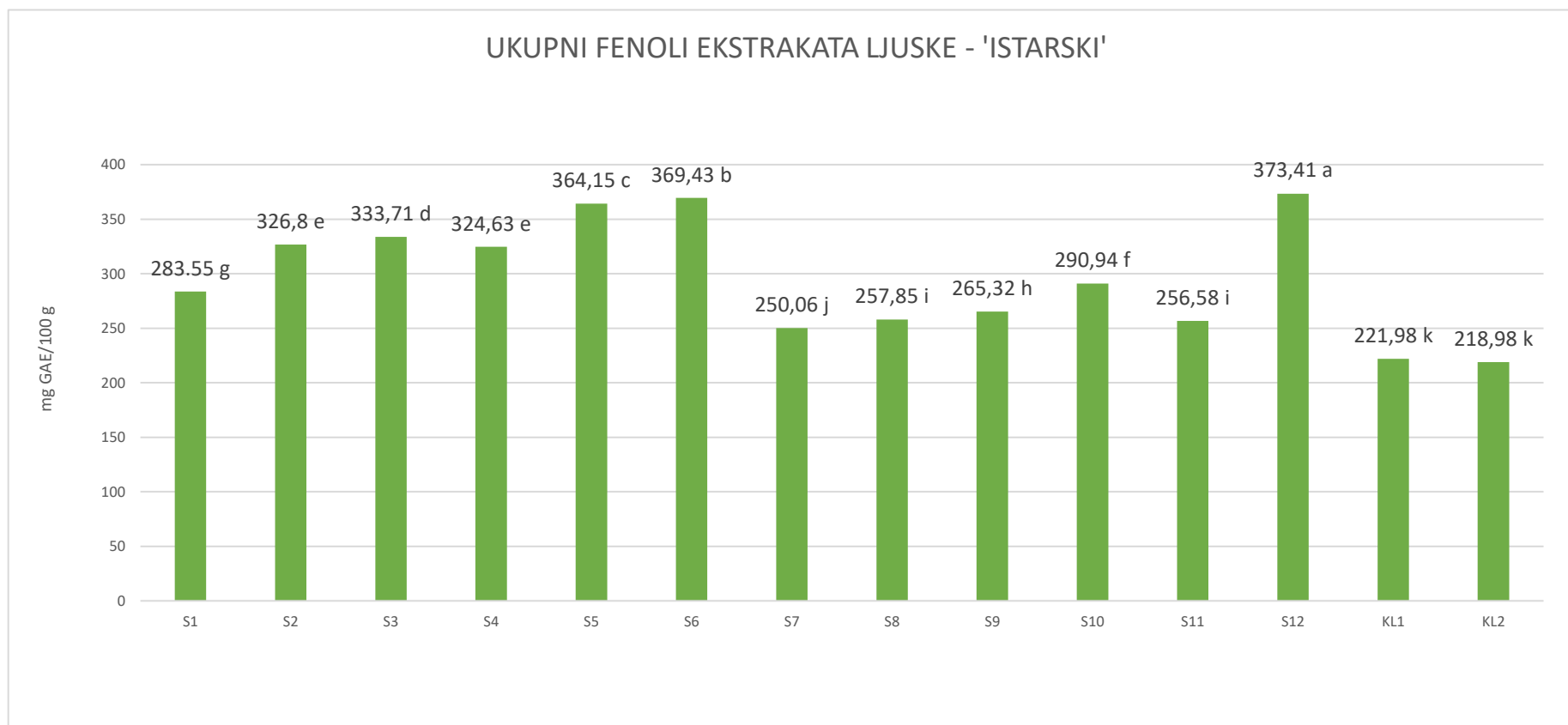


Grafikon 10. Sadržaj ukupnih flavonoida ljuske i jezgre lješnjaka sorte 'Rimski' (mg GAE/100 g)

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako je ljuska lješnjaka bogat izvor polifenolnih spojeva, što odgovara i rezultatima drugih autora (Shahidi i sur., 2007.). Shahidi i sur. (2007) su u svom istraživanju utvrdili 90 % viši sadržaj ukupnih fenola u ljusci lješnjaka u usporedbi s jezgrom ploda. Nadalje, iako u ovom istraživanju nisu statistički uspoređivane analizirane sorte lješnjaka, jasno je uočljivo kako sorta lješnjaka 'Rimski' općenito ima viši sadržaj polifenolnih spojeva neovisno o dijelu ploda (jezgra ili ljuska) što kao i kod svih drugih biljnih vrsta dokazuje genetsku varijabilnost jednako u morfološkim i kemijskim svojstvima unutar iste biljne vrste (Król i Ganter, 2020.).

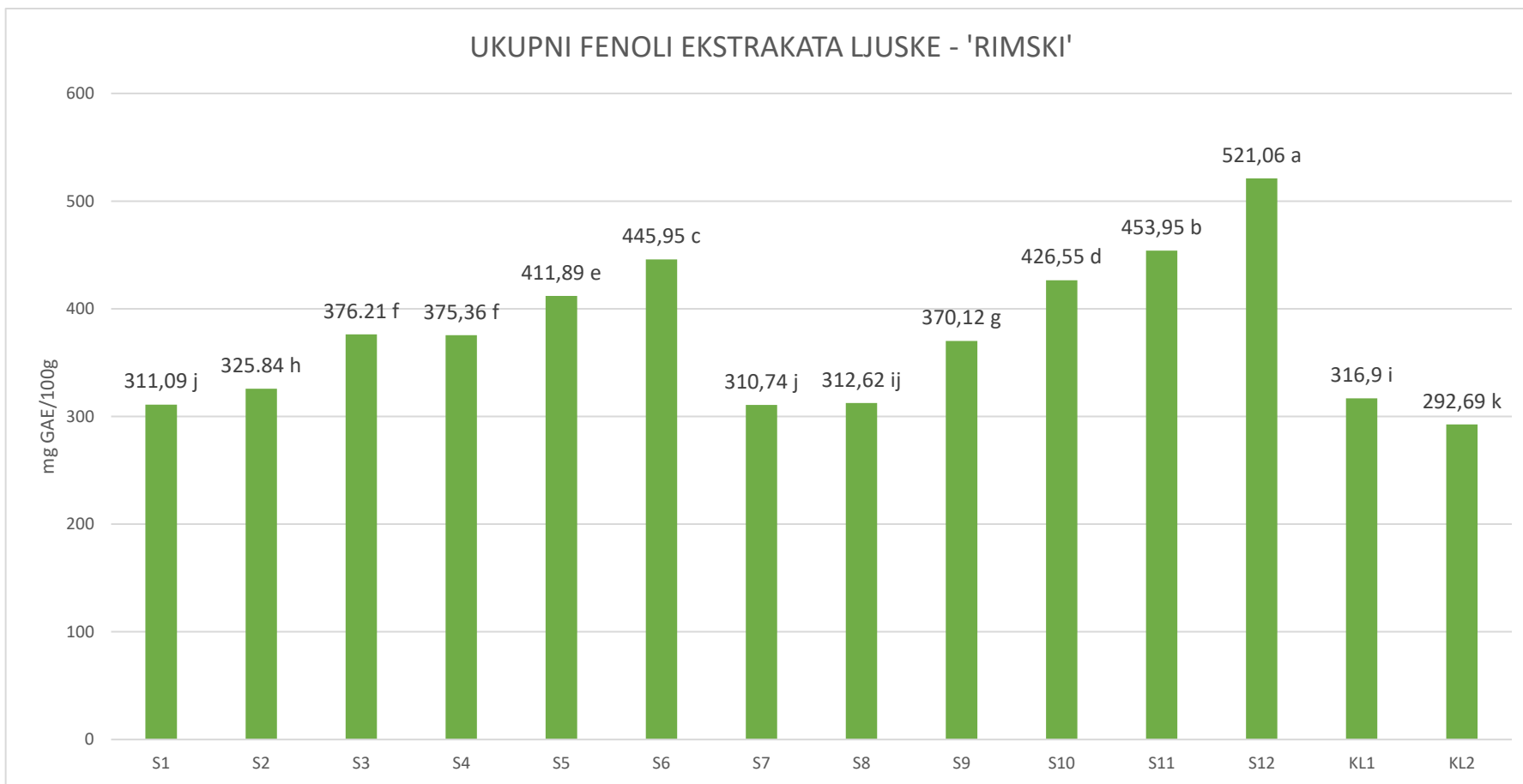
4.3. Sadržaj polifenolnih spojeva alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka

U Grafikonu 11 prikazani su rezultati sadržaja ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'. Prema provedenoj statističkoj analizi najviši sadržaj ukupnih fenola (373,41 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom uz amplitudu od 60 % primjenom 80 % etanola kao otapala u ukupnom trajanju tretmana od 25 minuta (S12). Najniži sadržaj ukupnih fenola (218,98 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku ekstrakta tretiranim klasičnom metodom ekstrakcije čvrsto-tekuće uz 80 %-ni etanol kao otapalo (KL2). Tijekom ultrazvučnog tretmana varirana je amplituda, vrijeme trajanja ekstrakcije te koncentracija otapala, a statističkom analizom utvrđeno je kako su sve tri varijable značajno utjecale na sadržaj ukupnih fenola. U uvjetima ultrazvučnog tretmana uz amplitudu od 40 % u prosjeku su dobivene niže vrijednosti ukupnih fenola u usporedbi s tretmanima u kojima je korištena amplituda od 60 % i to u prosjeku oko 12 % niže vrijednosti neovisno o korištenom otapalu i vremenu tretmana. Jednako tako uspoređujući vrijeme trajanja tretmana, više vrijednosti ukupnih fenola su dobivene prilikom UZV tretmana u trajanju od 25 minuta. U prosjeku je sadržaj ukupnih fenola tijekom 25 minuta tretmana bio viši za skoro 22 % u odnosu na vrijeme trajanja 10 minuta te oko 12 % u usporedbi s trajanjem od 15 min, dok je vrijeme tretmana od 15 minuta dovelo do skoro 9 % većeg sadržaja ukupnih fenola u odnosu na vrijeme od 10 minuta. Uspoređujući vrijednosti ukupnih fenola ovisno o korištenoj koncentraciji otapala i kod ultrazvučno potpomognute i klasične ekstrakcije utvrđeno je kako koncentracija 80 %-og etanola značajnije pogoduje ekstrakciji ukupnih fenola u odnosu na 50 %-ni etanol.



Grafikon 11. Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'

U grafikonu 12 prikazani su rezultati sadržaja ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'. Prema provedenoj statističkoj analizi najviši sadržaj ukupnih fenola (521,06 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom uz amplitudu 60 %, primjenom 80 % etanola u trajanju 25 minuta (S12), dok je najniža vrijednost ukupnih fenola (292,69 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku ekstrahiranom klasičnom metodom u 80 % otopini etanola u trajanju 24 sata (KL2). Uspoređujući dobivene vrijednosti ukupnih fenola na temelju amplitude, utvrđeno je kako su u uvjetima amplitude od 60 % dobivene više vrijednosti ukupnih fenola uspoređujući s vrijednostima ukupnih fenola pri amplitudi od 40 %, u prosjeku su vrijednosti više za skoro 8 %. Uspoređujući dobivene vrijednosti na temelju vremena trajanja ekstrakcije utvrđeno je da trajanje ekstrakcije 25 minuta najpozitivnije utječe na vrijednosti ukupnih fenola, u prosjeku su vrijednosti za 18 % veće od vrijednosti dobivenih vremenom trajanja ekstrakcije 15 minuta i 45 % veće u odnosu na vrijednosti dobivene tijekom trajanja tretmana od 10 minuta. Također, i kod ove sorte lješnjaka, viši prinosi ukupnih fenolnih spojeva ostvareni su prilikom upotrebe 80 %-og etanola u usporedbi s 50 %-im etanolom i to u prosjeku čak 33 % više vrijednosti ukupnih fenola.



Grafikon 12. Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'

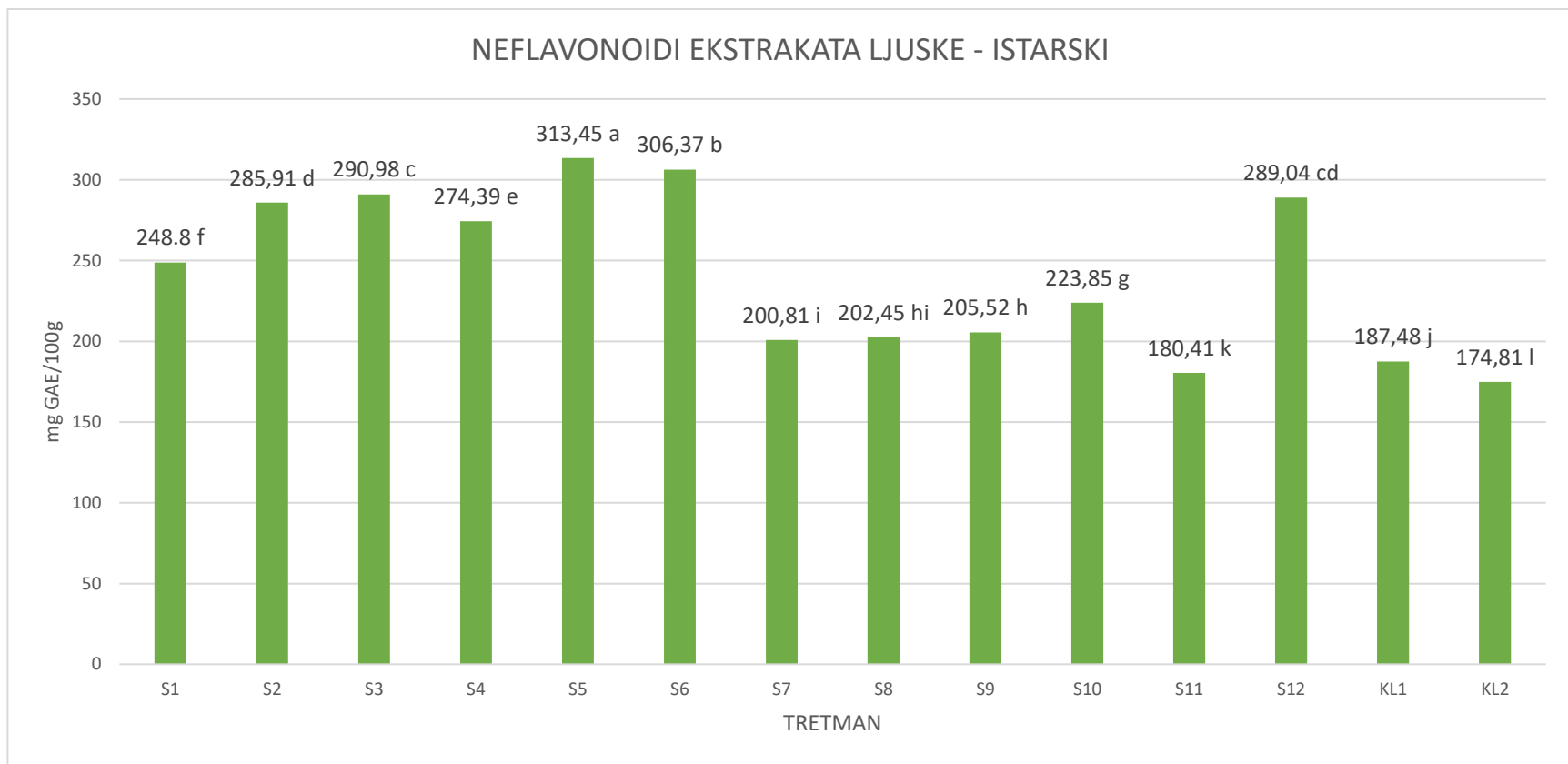
Temeljem dobivenih rezultata sadržaja ukupnih fenola u alkoholnim ekstraktima obiju analiziranih sorata lješnjaka može se zaključiti kako način ekstrakcije (klasično i ultrazvučnom sondom) ima značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola, a prilikom čega ultrazvučna ekstrakcija značajno više pozitivno utječe na prinos ukupnih fenola što se poklapa i s rezultatima istraživanja drugih autora (Dal i sur., 2020.). Kod ekstrakata ekstrahiranih ultrazvučnom sondom utvrđene su najviše vrijednosti ukupnih fenola, neovisno o koncentraciji otapala, amplitudi i vremenskom periodu u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije. Uspoređujući uzorke koji su tretirani ultrazvukom i klasično, gotovo 70 % niže vrijednosti ukupnih fenola utvrđene su u uzrocima tretiranim klasičnom metodom u usporedbi s ekstraktima ekstrahiranim ultrazvukom kod obje sorte. Autori Debiasi i sur. (2021.) su u svojem istraživanju također utvrdili kako ultrazvučna ekstrakcija povoljnije utječe na ekstrakciju bioaktivnih komponenata te da je ultrazvučna metoda bolja zbog kraćeg vremenskog trajanja, zahtjeva manju količinu otapala te uzrokuje najmanje promjene molekularnih, strukturalnih svojstva ispitivane tvari, a time i nutritivne vrijednosti.

Promatrajući dobivene rezultate ovisno o koncentraciji otapala kod tretmana ultrazvukom, uočljive su razlike. Kod sorte lješnjaka 'Istarski', viši sadržaj ukupnih fenola uzoraka ljuske utvrđena je korištenjem 50 %-og etanola u odnosu na 80 %-ni etanol, dok je kod sorte lješnjaka 'Rimski' upotrebom 80 %-og etanola ekstrahirana veća količina ukupnih fenola. Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima istraživanja drugih autora (Oroian i sur., 2020.), utvrđeno je kako viša koncentracija etanola pozitivnije utječe na ekstrakciju polifenolnih spojeva, a što se poklapa s navedenim literaturnim navodom.

U tretmanu ultrazvukom varirano je i vrijeme ekstrakcije, a uspoređujući ekstrakciju u trajanju od 10, 15 i 25 minuta može se utvrditi da je kod obje sorte veći prinos ukupnih fenola ostvaren prilikom tretmana u trajanju od 25 minuta. Naime i drugi autori navode kako prilikom ultrazvučnog tretmana, optimalno vrijeme trajanja ultrazvučnog tretmana iznosi oko 20 minuta uz napomenu kako navedeno značajno varira i ovisno o drugim procesnim uvjetima, prvenstveno korištenoj amplitudi i temperaturi sustava (Egues i sur., 2021.).

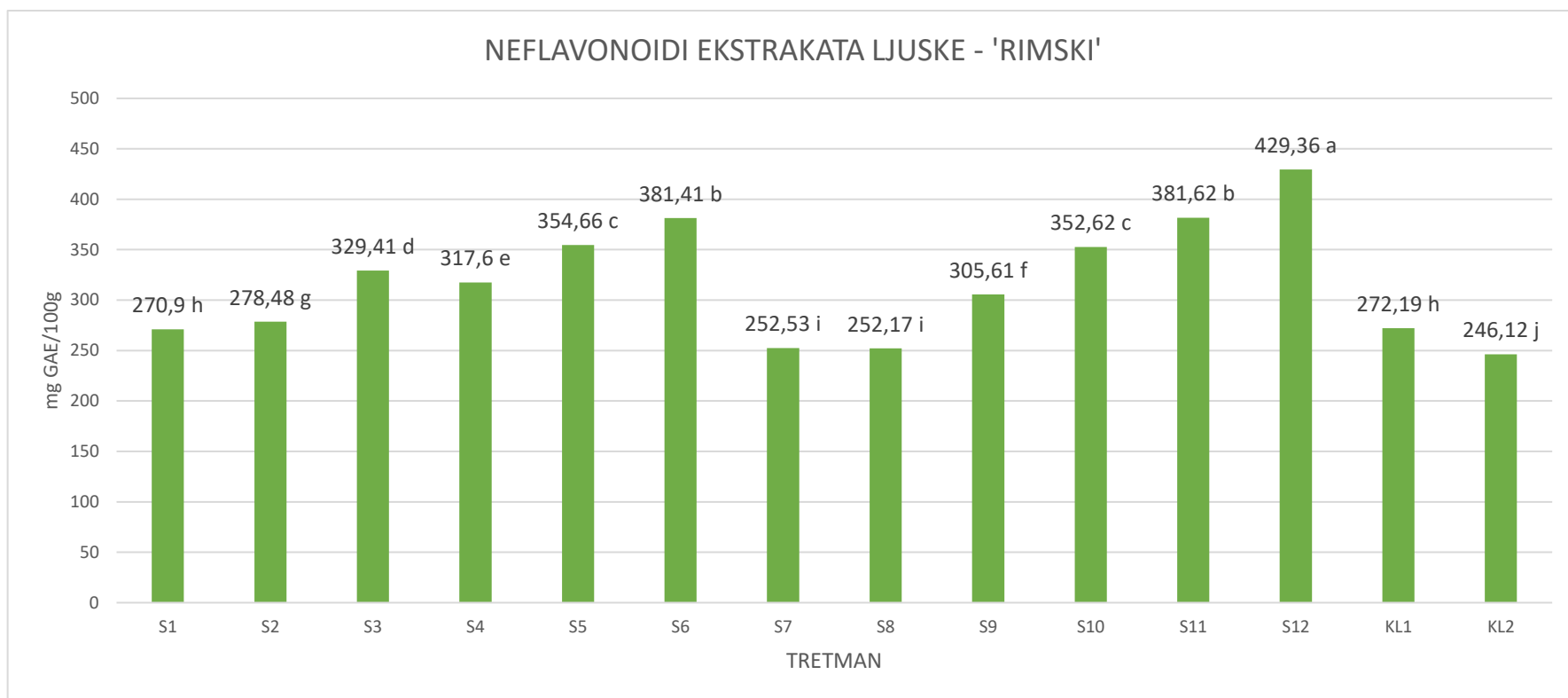
Također, prilikom ekstrakcije u sustavu ultrazvučne sonde, varirana je i amplituda (40 i 60 %), koja značajno utječe na količinu ukupnih fenola. Viša razina amplitude je bila učinkovitija za ekstrakciju ukupnih fenola za obje sorte, što odgovara rezultatima istraživanja drugih autora (Egues i sur., 2021.). Egues i sur. (2021.) u svojem su istraživanju utvrdili kako viša amplituda, u njihovom slučaju 70 % povoljnije utječe na ekstrakciju polifenolnih spojeva u odnosu na nižu amplitudu, 50 %. Ovdje valja napomenuti, kako faktor amplitude i odabir optimalne pri UZV potpomognutoj ekstrakciji značajno ovisi i o nominalnoj snazi uređaja kojim se provodi ultrazvučni tretman (Herceg i sur., 2008).

U Grafikonu 13 prikazani su rezultati sadržaja ukupnih neflavonoida ekstrahiranih klasičnom metodom i metodom ultrazvuka visokog intenziteta ljuske lješnjaka 'Istarski'. Najviši sadržaj ukupnih neflavonoida (313,45 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranom ultrazvukom uz amplitudu 40 %, primjenom 50 %-og etanola u trajanju od 25 minuta (S5), dok je najniža vrijednost (174,81 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku 80 %-ne otopine etanola klasičnom ekstrakcijom (KL2). Uspoređujući dobivene vrijednosti ukupnih neflavonoida ovisno o korištenoj amplitudi utvrđeno je kako su pri amplitudi od 60 % dobivene u prosjeku oko 9 % više vrijednosti ukupnih neflavonoida u usporedbi s amplitudom od 40 %. Također, utvrđen je i značajan utjecaj vremena ultrazvučnog tretmana na ekstrakciju neflavonoida iz ekstrakata ljuske lješnjaka 'Istarski', a prilikom čega su značajno više vrijednosti utvrđene prilikom 25 minuta u odnosu na trajanje od 15 minuta i to u prosjeku za 10 % te 16 % u odnosu na vrijeme trajanja od 10 minuta. Što se tiče koncentracije etanola, viši prinos ukupnih neflavonoida utvrđen je prilikom primjene 50 %-og etanola u usporedbi s 80 %-im etanolom (u prosjeku oko 32 % više vrijednosti).



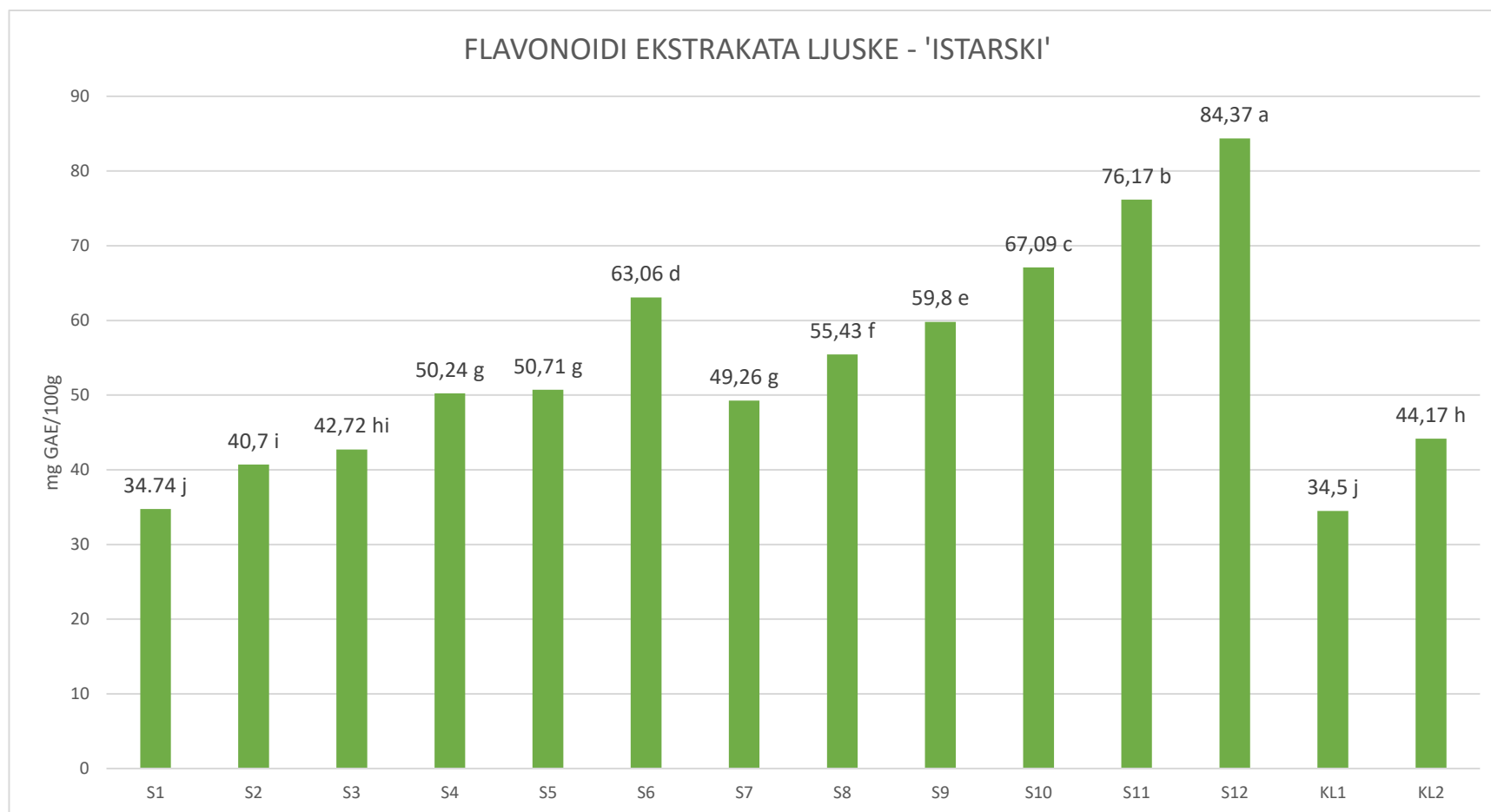
Grafikon 13. Sadržaj ukupnih neflavonoida (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'

U Grafikonu 14 prikazani su rezultati sadržaja neflavonoida ovisno o načinu ekstrakcije ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'. Najviši sadržaj ukupnih neflavonoida (429,36 mg GAE/100 g) utvrđen je u uzorku tretiranim ultrazvučnom sondom uz amplitudu 60 %, primjenom 80 %-ne otopine etanola u trajanju od 25 minuta, dok je najniža vrijednost ukupnih neflavonoida (246,12 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku 80 %-ne otopine etanola tretiranim klasičnom metodom u trajanju od 24 sata (KL2). Tijekom ultrazvučnog tretmana uz amplitudu od 40 % u prosjeku su dobivene niže vrijednosti ukupnih neflavonoida u usporedbi s tretmanima u kojima je korištena amplituda od 60 % i to u prosjeku oko 9 % niže vrijednosti neovisno o korištenom otapalu i vremenu tretmana. Jednako tako uspoređujući vrijeme trajanja tretmana, više vrijednosti ukupnih neflavonoida dobivene su duljim tretmanom, u trajanju od 25 minuta. U prosjeku je sadržaj ukupnih neflavonoida prilikom tretmana od 25 minuta viši za gotovo 18 % u odnosu na vrijeme tretmana od 15 minuta te 47 % više u usporedbi s vremenom tretmana od 10 minuta. Uspoređujući vrijednosti ukupnih neflavonoida na temelju koncentracije otapala utvrđeno je kako koncentracija 50 %-og etanola bolje pogoduje ekstrakciji ukupnih neflavonoida u odnosu na 80 %-ni etanol. U prosjeku su vrijednosti ukupnih neflavonoida 32 % više kod korištenja 50 %-og etanola u usporedbi s 80 %-im.



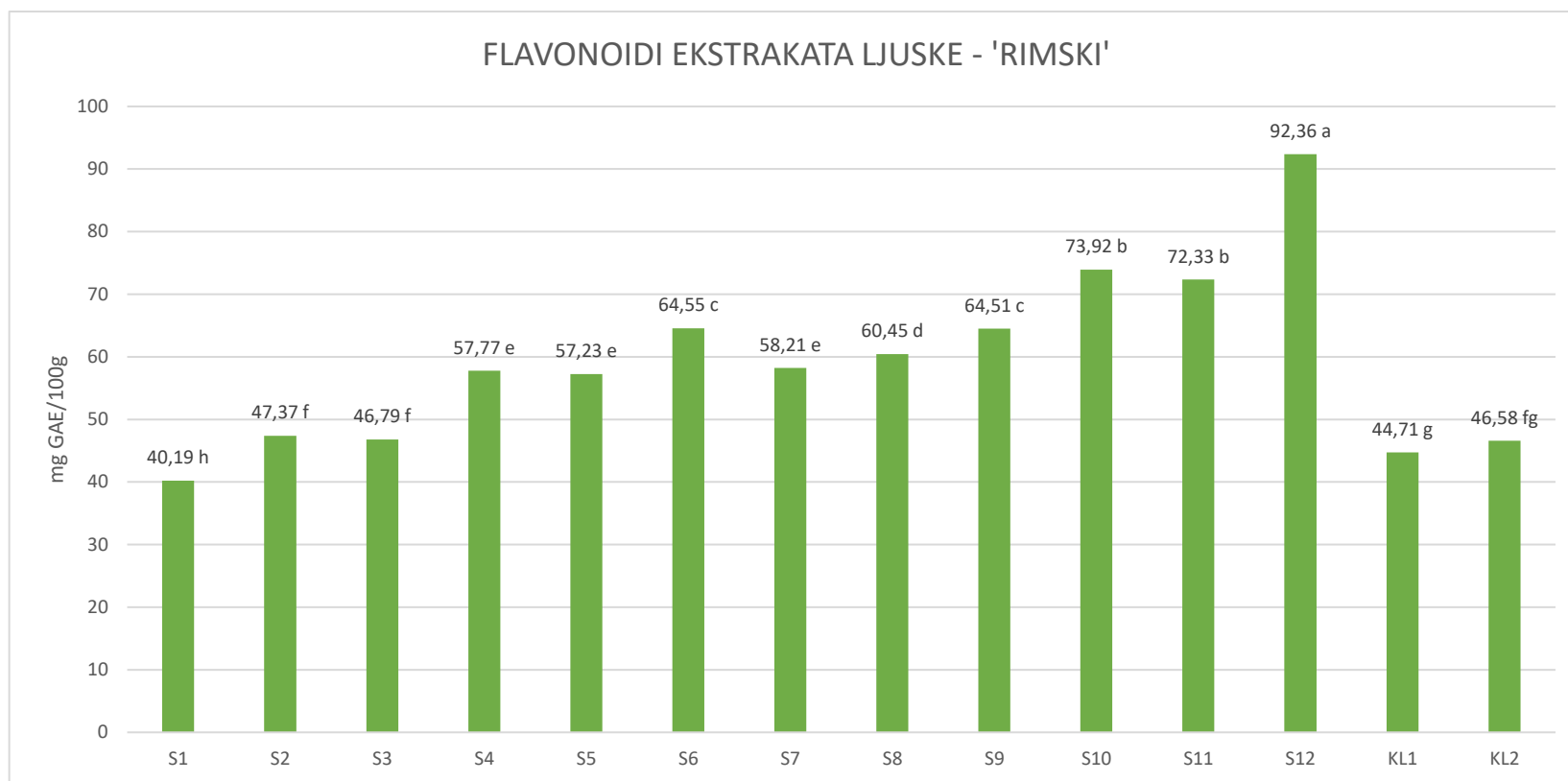
Grafikon 14. Sadržaj ukupnih neflavonoida (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'

Sadržaj ukupnih flavonoida alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski' prikazan je u Grafikonu 15. Najviši sadržaj flavonoida iznosio je 84,37 mg GAE/100 g, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvukom visokog intenziteta pri amplitudi od 60 %, vremenu tretiranja od 25 minuta uz 80 %-ni etanol (S12). Najniži sadržaj flavonoida od 34,5 mg GAE/100 g utvrđena je u uzorku tretiranom klasičnom metodom ekstrakcije uz 50 %-ni etanol kao otapalo. Tijekom ultrazvučnog tretmana u uvjetima amplitude od 60 % dobivene su više vrijednosti ukupnih flavonoida uspoređujući s vrijednostima ukupnih flavonoida u uvjetima amplitude 40 %. U prosjeku su vrijednosti više za skoro 16 %. Što se tiče vremena tretmana, prilikom ekstrakcije u trajanju od 25 minuta ostvarene su najviše vrijednosti ukupnih flavonoida, u prosjeku za 24 % više u odnosu na vrijeme tretmana od 15 minuta te 52 % više u odnosu na tretman u trajanju od 10 minuta. Nadalje, promatrajući koncentraciju korištenog etanola, više vrijednosti ukupnih flavonoida utvrđene su korištenjem 80 %-og etanola u usporedbi s 50 %-im, u prosjeku 38 % više vrijednosti.



Grafikon 15. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'

Grafikon 16 prikazuje ukupan sadržaj flavonoida ekstrahiranih iz ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'. Najviša vrijednost flavonoida (92,36 mg GAE/100 g) je utvrđena u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom uz amplitudu od 60 %, 80 %-ni etanol i vremenskom periodu od 25 minuta (S12), dok je najniža vrijednost (44,71 mg GAE/100 g) utvrđena u uzorku ekstrakta tretiranom klasičnom metodom u trajanju od 24 sata i u 50 %-ni etanol. U uvjetima ultrazvučnog tretmana uz amplitudu od 40 % u prosjeku su dobivene niže vrijednosti ukupnih flavonoida u usporedbi s tretmanima u kojima je korištena amplituda od 60 % i to u prosjeku oko 17 % niže vrijednosti neovisno o korištenom otapalu i vremenu tretmana. Jednako tako uspoređujući vrijeme trajanja tretmana, više vrijednosti ukupnih flavonoida su dobivene prilikom UZV tretmana u trajanju od 25 minuta. U prosjeku je sadržaj ukupnih flavonoida tijekom 25 minuta tretmana bio viši za gotovo 18 % u odnosu na vrijeme trajanja 15 minuta te 39 % u usporedbi s vremenom tretmana od 10 minuta. Uspoređujući vrijednosti ukupnih flavonoida ovisno o koncentraciji otapala, utvrđeno je kako koncentracija 50 %-og etanola pogoduje ekstrakciji ukupnih flavonoida u odnosu na 80 %-ni etanol. U prosjeku su vrijednosti ukupnih flavonoida 34 % više kod korištenja 50 %-og etanola u usporedbi s 80 %-im.



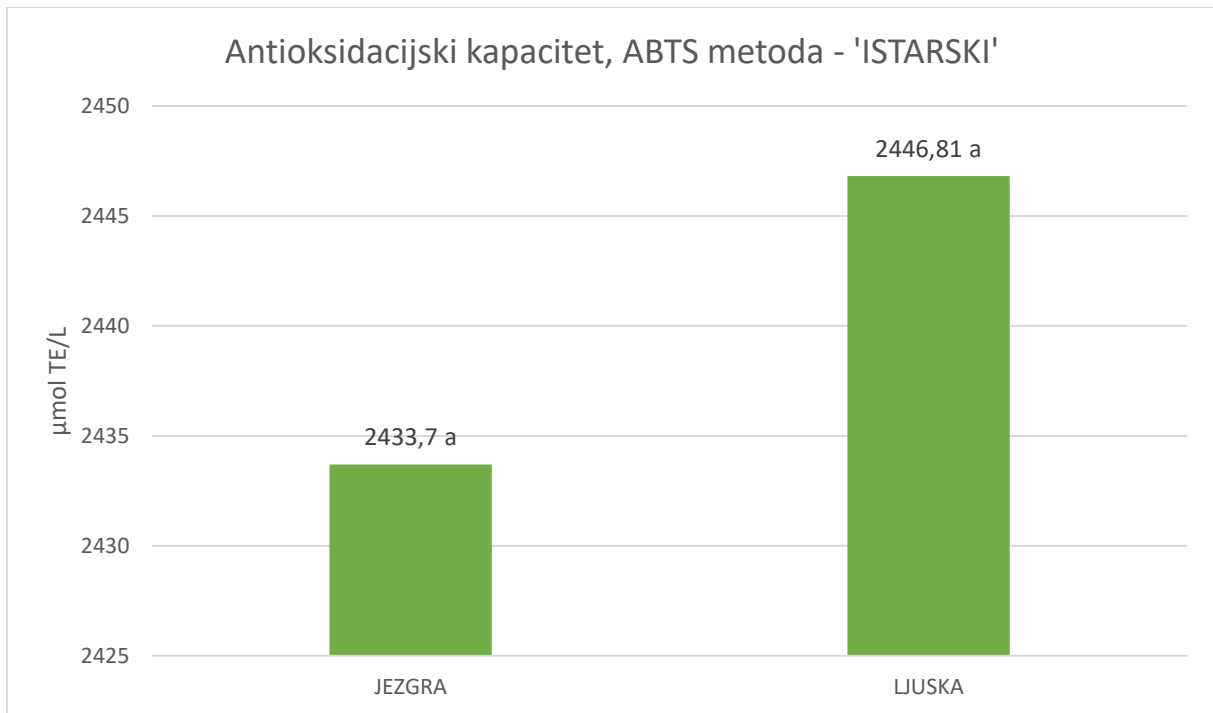
Grafikon 16. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg GAE/100 g) ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'

Temeljem svih dobivenih rezultata može se zaključiti kako ultrazvučna ekstrakcija i kod sorti lješnjaka 'Istarski' i 'Rimski' pozitivno utječe na ekstrakciju ukupnih flavonoida i neflavonoida, što odgovara i rezultatima istraživanja drugih autora (Salem i sur., 2022.). Uspoređujući uzorke koji su tretirani ultrazvučnom sondom neovisno o vremenskom periodu tretmana, amplitudi i koncentraciji etanola i uzoraka koji su tretirani klasičnom metodom može se utvrditi kako je sadržaj polifenolnih spojeva veći za do 30 % u ekstraktima koji su tretirani ultrazvučnom sondom. Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s rezultatima istraživanja drugih autora (Deng i sur., 2017.) potvrđeno je kako ultrazvučna ekstrakcija povoljnije utječe na ekstrakciju te zahtjeva kraće vrijeme, manje otapala i nižu temperaturu u odnosu na klasičnu metodu maceracije. Vrijeme trajanja tretmana ultrazvučnom sondom je značajno i pozitivno utjecalo na sadržaj polifenolnih spojeva kod obje sorte lješnjaka. Osim vremenskog perioda koje ima pozitivan utjecaj na ekstrakciju, amplituda također pozitivno utječe na ekstrakciju i količinu ekstrahiranih polifenolnih spojeva. Veća amplituda (60 %) je imala povoljniji utjecaj na ekstrakciju u usporedbi s nižom razinom amplitude (40 %). Slične rezultate dobili su i autori drugih istraživanja (Oroian i sur., 2020.). Oroian i sur. (2020.) su utvrdili da amplituda 100 % potiče 13 % veću ekstrakciju ukupnih flavonoida i neflavonoida u odnosu na amplitudu 60 % te 29 % veću ekstrakciju u odnosu na amplitudu 20 %. Veća koncentracija otopine etanola (80 % v/v) imala je pozitivniji utjecaj na ekstrakciju i količinu ekstrahiranih svih polifenolnih spojeva osim neflavonoida. Autori Oroian i sur. (2020.) su također ispitali utjecaj koncentracije otapala na ekstrakciju ukupnih flavonoida i neflavonoida te su utvrdili kako 80 %-ni etanol dovodi do 7 % više ekstrahiranih flavonoida i neflavonoida u odnosu na 60 %-ni etanol.

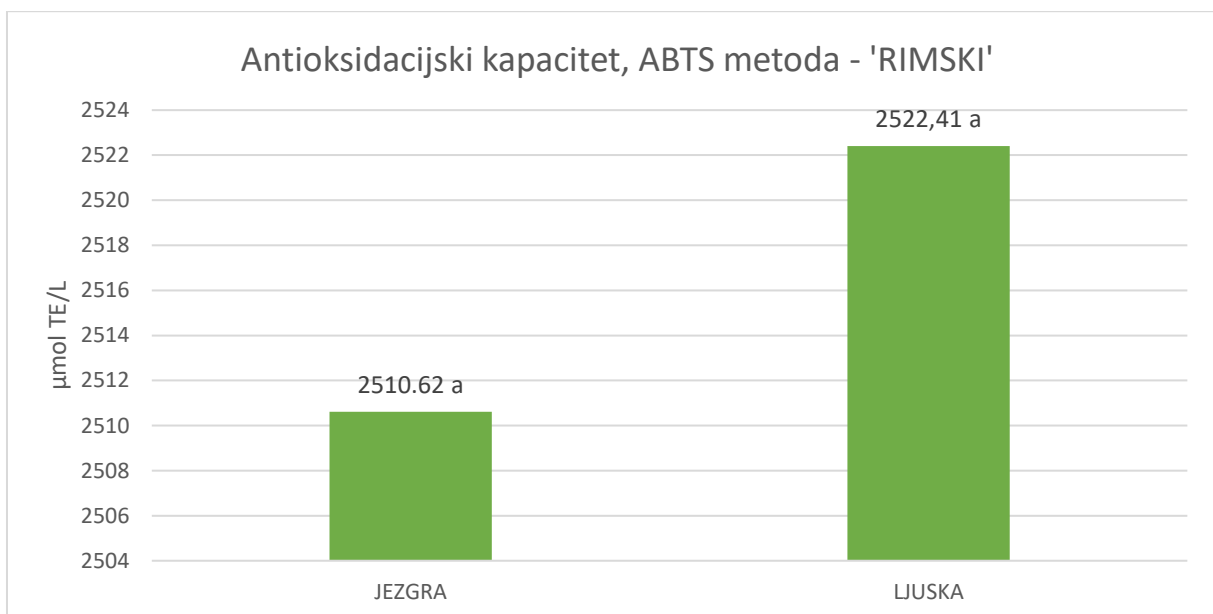
4.4. Antioksidacijski kapacitet jezgre i ljuske lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski'

U Grafikonima 17-20 prikazani su rezultati antioksidacijskog kapaciteta ljuske i jezgre lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski' analiziranih ABTS i FRAP metodom te rezultati antioksidacijskog kapaciteta alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka ovisno o načinu ekstrakcije. Analizirajući vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prema ABTS metodi za ljusku i jezgru lješnjaka obje sorte, utvrđene su općenito visoke vrijednosti što ukazuje na značajnu nutritivnu vrijednost i potencijal i ljuske i jezgre lješnjaka u funkcionalne svrhe. FRAP metodom također su utvrđene izrazito visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta što ponovno ističe nutritivni potencijal ove sirovine, no upotrebom FRAP metode ljuska obje analizirane sorte lješnjaka pokazuje značajno više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s jezgrom ploda. U slučaju lješnjaka sorte 'Istarski' ljuska ima gotovo 73 % veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s jezgrom, dok je kod sorte lješnjaka 'Rimski' ta razlika između ljuske i jezgre oko 60 %. Navedeni rezultati su bili i očekivani s obzirom na utvrđen visok sadržaj polifenolnih spojeva posebice u ljuski lješnjaka u usporedbi s jezgrom ploda.

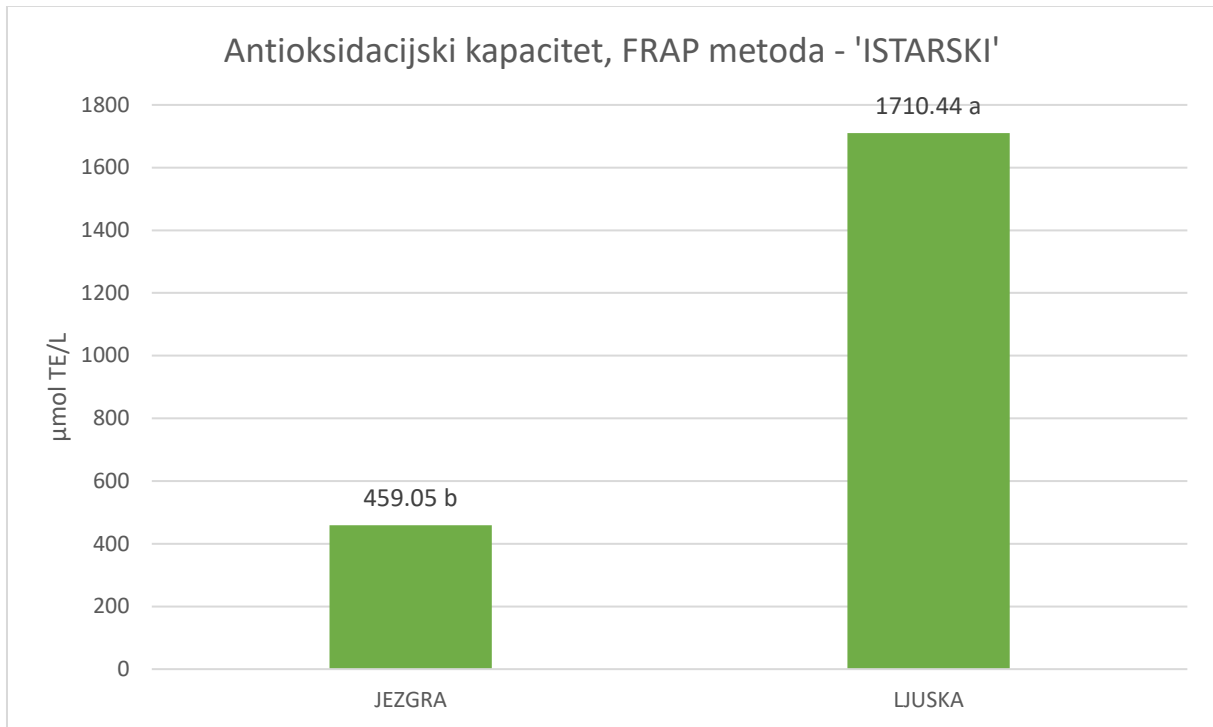
Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je da ljuska i jezgra pokazuju općenito visoki antioksidacijski kapacitet samim time i visoku koncentraciju bioaktivnih spojeva, što odgovara rezultatima istraživanja drugih autora (Gavilan-Cuicui i sur., 2024.). Autor Gavilan-Cuicui i sur. (2024.) su također utvrdili analizirajući dvije sorte lješnjaka kako ljuska lješnjaka obje sorte pokazuje veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na jezgru ploda.



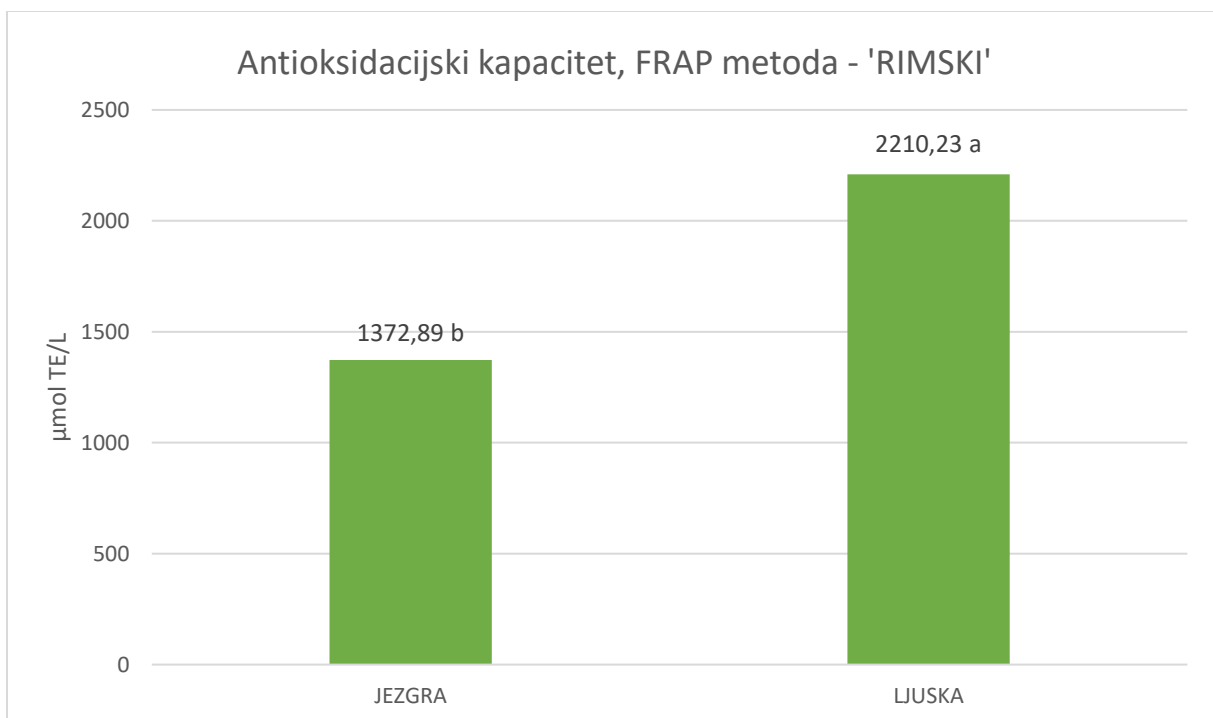
Grafikon 17. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta ljuske i jezgre lješnjaka 'Istarski' (µmol TE/L)



Grafikon 18. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljuske i jezgre lješnjaka 'Rimski' (µmol TE/L)



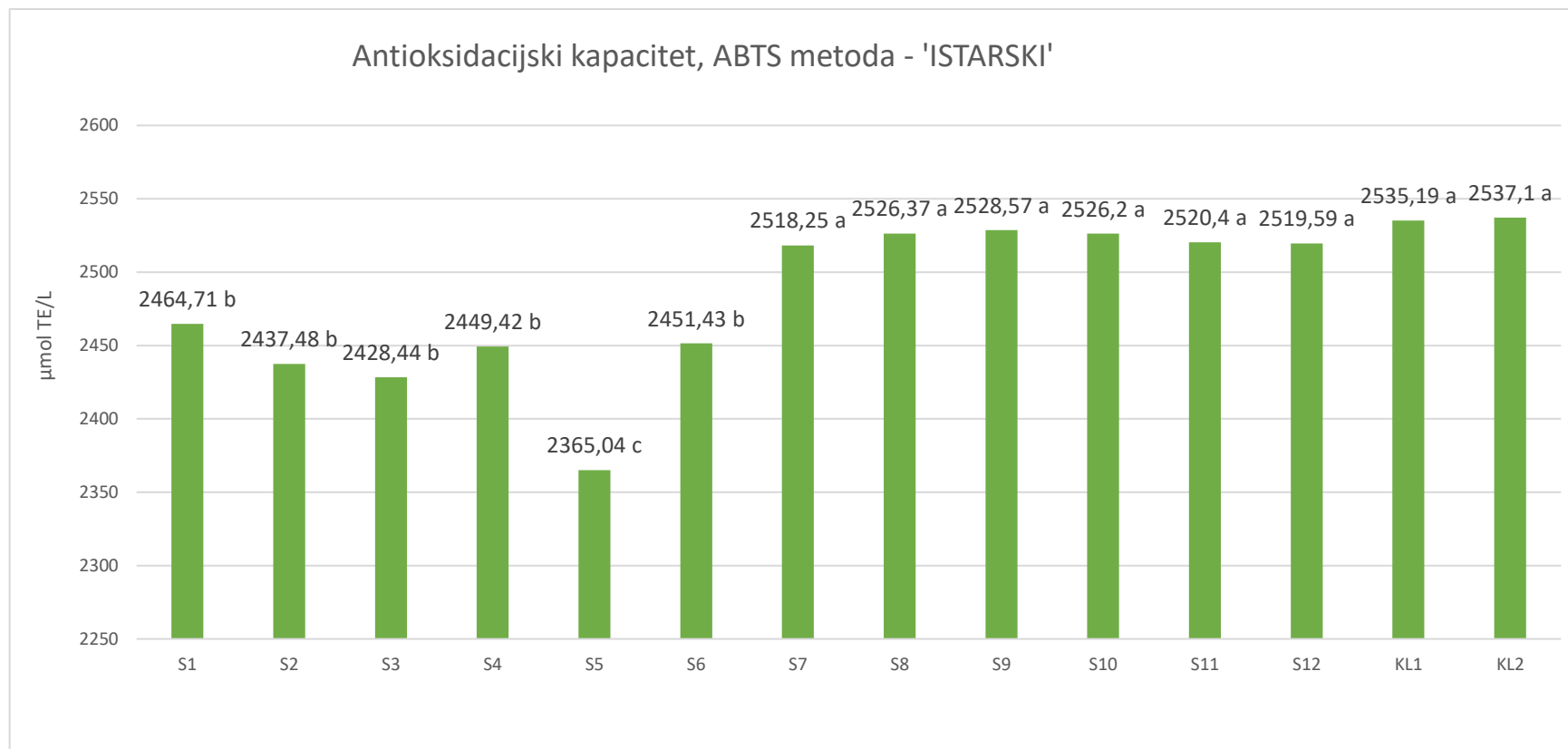
Grafikon 19. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljuske i jezgre lješnjaka 'Istarski' (µmol TE/L)



Grafikon 20. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljuske i jezgre lješnjaka 'Rimski' (µmol TE/L)

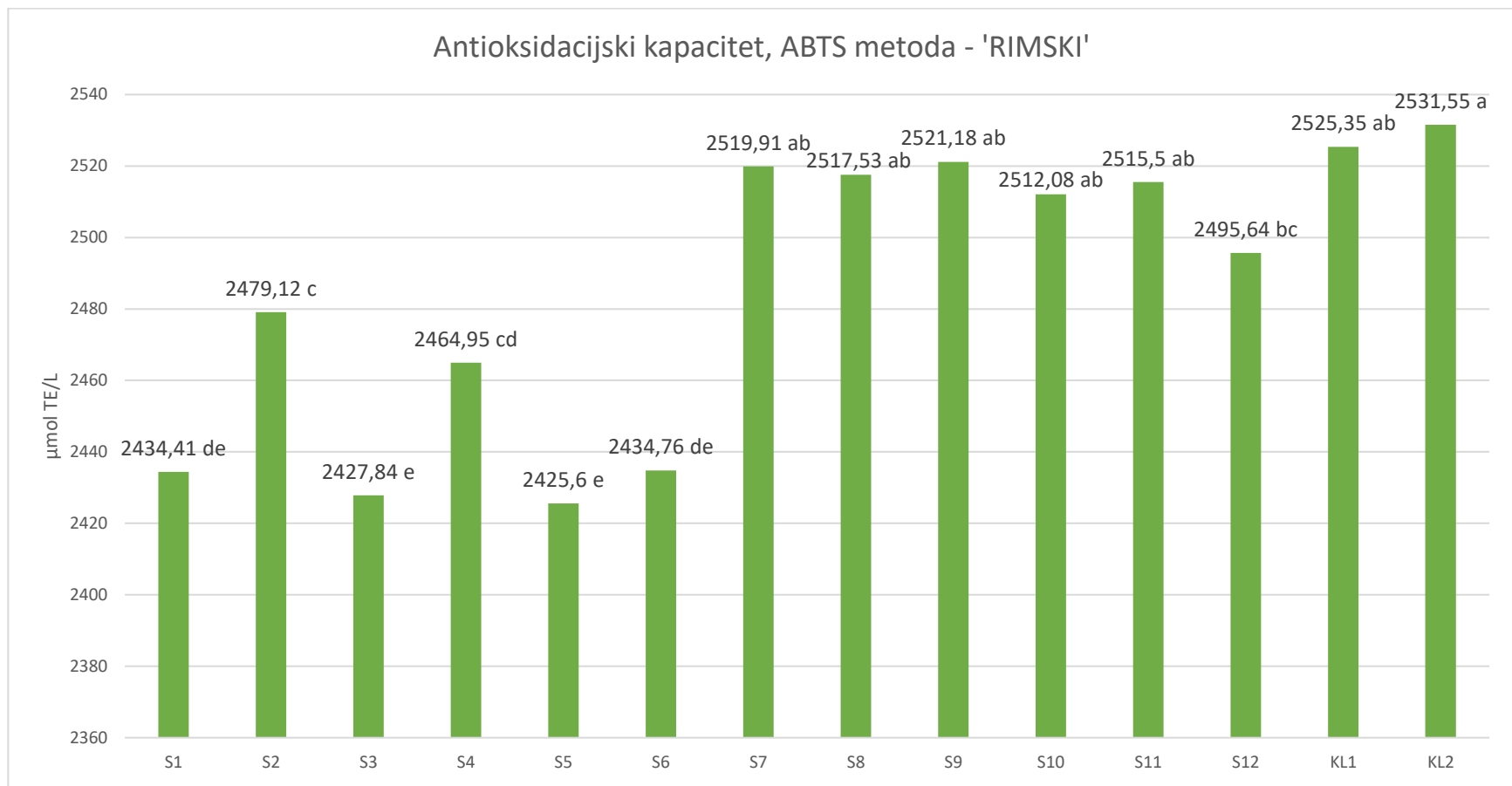
4.5. Antioksidacijski kapacitet alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski'

Grafikon 21 i 22 prikazuju vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski' analiziranih ABTS metodom. Uspoređujući utjecaj načina ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet prema ABTS metodi ne može se donijeti jasni zaključak kojim načinom ekstrakcije su ostvarene veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Naime, kod ultrazvučne ekstrakcije značajan utjecaj imaju svi varirani faktori, odnosno amplituda, vrijeme tretmana i koncentracija etanola kao otapala, a prilikom čega za razliku od ostalih analiziranih komponenata jasno je uočljiv jedino utjecaj vrste otapala. Uzorci u kojima je korišten 80 %-ni etanol imali su nešto viši antioksidacijski kapacitet u usporedbi s uzorcima u kojima je korišten 50 %-ni etanol.



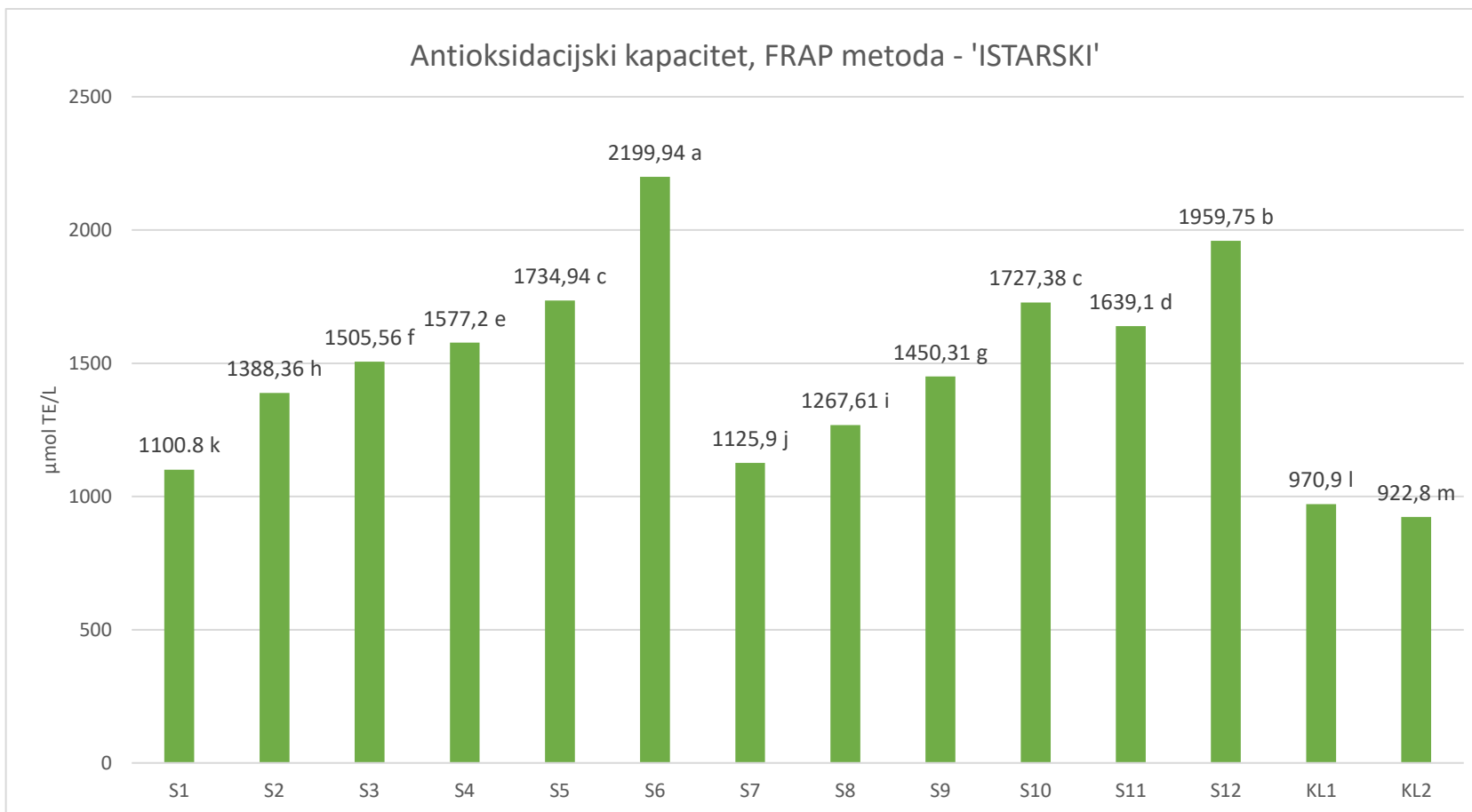
Grafikon 21. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$) analiziran ABTS metodom alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'

Najviši antioksidacijski kapacitet ekstrakata ljuske sorte 'Rimski' utvrđen je za uzorak klasično tretiran (KL2), a prilikom čega općenito se može utvrditi da su ovisno o načinu ekstrakcije veći antioksidacijski kapacitet imali uzorci tretirani klasično. Uspoređujući antioksidacijski kapacitet ekstrakata ljuske ovisno o amplitudi, značajne razlike nisu utvrđene. Uzorci koji su tretirani 80 %-im etanolom u usporedbi s uzorcima tretiranim 50 %-im etanolom pokazuju gotovo 3 % veći antioksidacijski kapacitet. Dobivene vrijednosti ovisno o vremenskom trajanju tretmana se razlikuju te pritom uzorci koji su tretirani 10 minuta pokazuju nešto veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke tretirane 25 minuta.



Grafikon 22. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$) analiziran ABTS metodom alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'

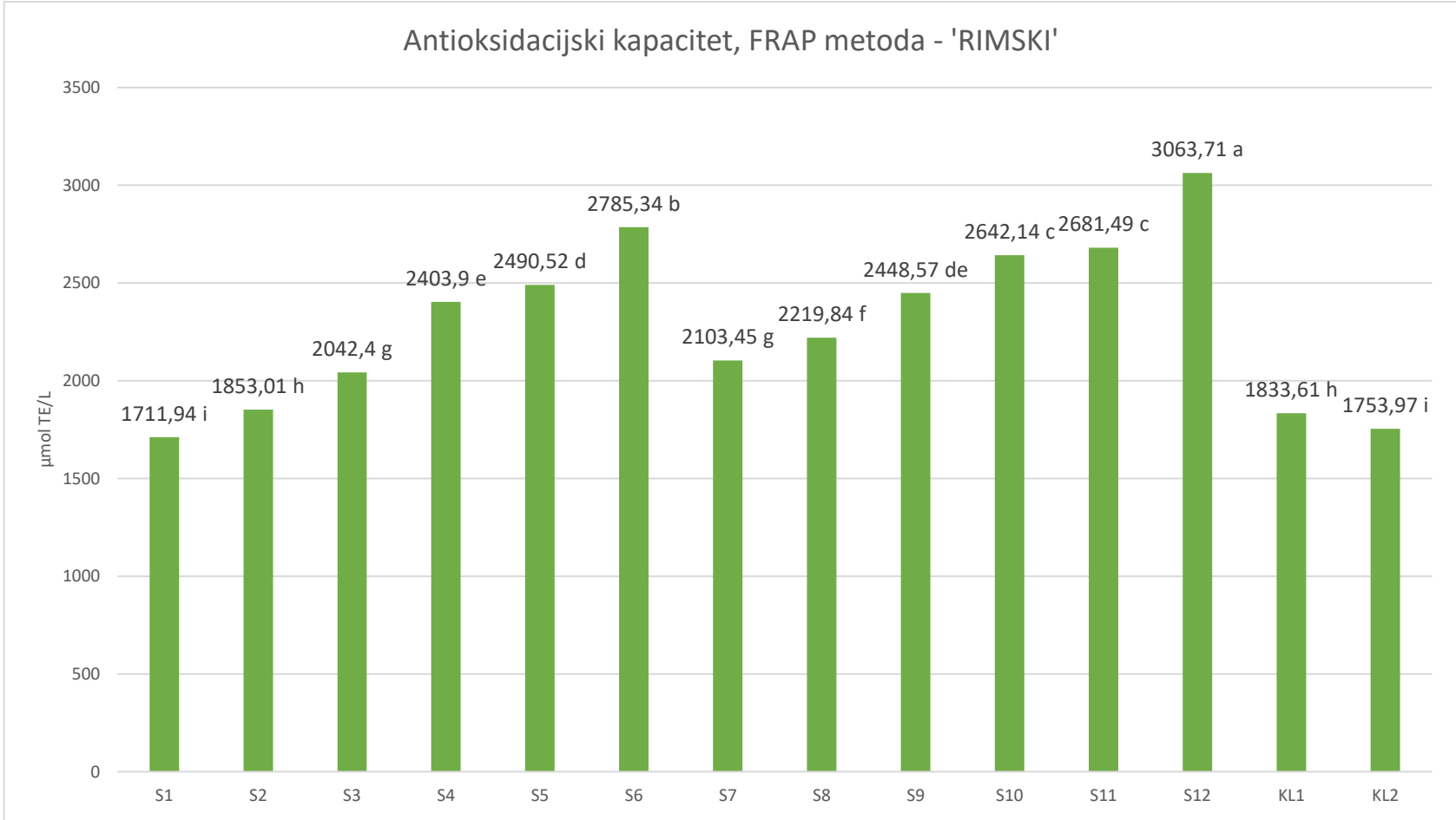
Grafikon 23 i 24 prikazuju vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljuske lješnjaka sorti 'Istarski' i 'Rimski' analiziranih FRAP metodom. Uspoređujući rezultate antioksidacijskog kapaciteta ovisno o načinu ekstrakcije (ultrazvukom i klasično) utvrđene su značajno više vrijednosti istog prilikom UZV potpomognute ekstrakcije i to za čak 26 % u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Amplituda, vrijeme tretmana kao i koncentracija etanola značajno su utjecale, a prilikom čega je utvrđen viši antioksidacijski kapacitet primjenom amplitude od 60 %, u prosjeku za 18 % u odnosu na ekstrakte tretirane 40 %-om amplitudom. Tretmanom od 25 minuta u prosjeku su ostvarene 20 % više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na vremensko trajanje od 15 minuta te 54 % više u odnosu na vremenski period tretmana od 10 minuta. Uspoređujući rezultate na temelju korištenog otapala (50 %-ni i 80 %-ni etanol), uzorci tretirani 50 %-im etanolom pokazuju gotovo 4 % veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke tretirane 80 %-im etanolom.



Grafikon 23. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$) analiziran FRAP metodom alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Istarski'

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski' prema FRAP metodi prikazani su u Grafikonu 24. Najviša vrijednost (3063,71 $\mu\text{mol TE/L}$) utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvukom uz amplitudu od 60 % tijekom 25 minuta tretmana i 80 %-ni etanol korišten kao otapalo. Općenito, uzorci tretirani ultrazvukom imali su značajno više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s onima tretiranim klasično.

Kod ultrazvučnog tretmana razina amplitude značajno je utjecala na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pripremljenih ekstrakata, a prilikom čega su oko 11 % više vrijednosti kapaciteta uzoraka utvrđene uz 60 % amplitudu u odnosu na uzorke tretirane 40 %-om amplitudom. Isto tako, više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene su korištenjem 80 %-og etanola u usporedbi s 50 %-im. Još jedan značajan čimbenik utjecaja na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta alkoholnih ekstrakata tretiranih ultrazvukom bio je i vrijeme tretmana. Uspoređujući dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta na temelju vremenskog perioda od 10, 15 i 25 minuta, uzorci koji su tretirani 25 minuta pokazuju oko 15 % veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke tretirane 15 minuta te 39 % veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke tretirane 10 minuta.



Grafikon 24. Antioksidacijski kapacitet (μmol TE/L) analiziran FRAP metodom alkoholnih ekstrakata ljuske lješnjaka sorte 'Rimski'

Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je da ljuska obje sorte pokazuje općenito visoki antioksidacijski kapacitet samim time i visoku koncentraciju bioaktivnih spojeva, što odgovara rezultatima istraživanja drugih autora (Salem i sur., 2022.), a koji su analizirajući ljusku lješnjaka utvrdili njezin visok antioksidacijski kapacitet. Rezultati ovog istraživanja pokazali su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta uzoraka tretiranih ultrazvukom u usporedbi s klasičnim tretmanom (koristeći FRAP metodu) što je također u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora (Ummat i sur., 2020.). Uspoređujući dobivene rezultate antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom na temelju različitih upotrijebljenih amplitudi utvrđeno je kako viša amplituda pozitivnije utječe na ekstrakciju bioaktivnih spojeva što je u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora (Hu i Li, 2022.). Analizirajući dobivene rezultate antioksidacijskog kapaciteta i uspoređujući ih s rezultatima istraživanja drugih autora (Falleh i sur., 2012.), utvrđeno je kako duže vrijeme trajanja ekstrakcije potiče ekstrakciju veće količine bioaktivnih spojeva, a čime se posljedično ostvaruju i više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

5. Zaključak

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti sljedeće:

- jezgra i ljuska obje sorte lješnjaka značajno su se razlikovale u sadržaju ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida kao i u antioksidacijskom kapacitetu. Značajno više vrijednosti ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta utvrđene su u ljusci obje sorte u odnosu na jezgru lješnjaka.
- ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija pozitivno utječe na prinos polifenolnih spojeva, a prilikom čega su za sve alkoholne ekstrakte ljuske obje analiziranih sorti lješnjaka utvrđene značajno veće vrijednosti navedenih istraživanih komponenti u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta u usporedbi s klasičnom metodom ekstrakcije.
- kod ultrazvučne ekstrakcije svi varirani parametri: vrijeme, amplituda i koncentracija etanola značajno su utjecali na sadržaj polifenolnih spojeva, a općenito su najviše vrijednosti istih ostvarene uz vremenskom periodu od 25 minuta, upotrebu koncentriranije etanola od 80 % te korištenjem više amplitude uređaja od 60 %. Prethodno navedenom postoji iznimka prilikom čega su u pojedinim slučajevima kraći vremenski period (10 minuta) i niža koncentracija otapala (50 %) doveli do ekstrakcije većeg sadržaja bioaktivnih spojeva što ukazuje na činjenicu da različite ispitivane tvari zahtijevaju različitu kombinaciju parametara koja će dovesti do najboljih rezultata.

Na kraju se može zaključiti kako je organski ostatak točnije nusproizvod proizvodnje lješnjaka, ljuska, izrazito nutritivno vrijedan nusproizvod, bogat različitim metabolitima čime se dokazuje njezin nutritivni potencijal, a time i brojne funkcionalne vrijednosti. S obzirom na iznesene činjenice i rezultate, utvrđeno je da ljuska lješnjaka pokazuje značajan potencijal za uporabu te bi se kao takva mogla koristiti u izradi različitih proizvoda dodane vrijednosti, a ne klasificirati kao biootpad. Uz sve, ultrazvučna metoda je iznimno neinvazivna, brza i pouzdana u usporedbi klasičnom metodom, čime se daje na važnosti daljnjeg razvijanja i korištenja ultrazvuka kao zelene procesne tehnologije uporabe ljuske lješnjaka.

6. Literatura

1. Bottone, A., Cerulli, A., D'Urso, G., Masullo, M., Montoro, P., Napolitano, A. and Piacente, S., 2019. Plant specialized metabolites in hazelnut (*Corylus avellana*) kernel and byproducts: an update on chemistry, biological activity, and analytical aspects. *Planta medica*, 85(11/12): 840-855.
2. Brnčić, M. and Šic Žlabur, J., 2019. Impact of ultrasound on food constituents. Effect of Emerging Processing Methods on the Food Quality. U knjizi: Advantages and Challenges, Roohinejad, S., Koubaa, M., Greiner, R. and Mallikarjunan, K. (ur.): 69-94.
3. Lopes, L.C., Martins, J., Esteves, B. and Lemos, L.T.D.E., 2012. New products from hazelnut shell. *Proceedings of the ECOWOOD*, 83-90.
4. Dal, O., Şengün, D. and Özşen, A.Y., 2020. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from waste hazelnut shell. *Environmental Research and Technology*, 3(3): 135-146.
5. Debiassi, B.W., Rodrigues, P.G.R.S., Torres, M.P.R., Bonacorsi, C., Andrighetti, C.R., Ribeiro, E.B. and Valladã, D.M.S., 2021. Comparison between maceration and ultrasound-assisted extraction of white bracts with flowers of *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Scientific Electronic Archives*, 14(2): 47-55.
6. Demirbaş, A., 2001. Relationships between lignin contents and heating values of biomass. *Energy conversion and management*, 42(2):183-188.
7. Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z. and Ding, C., 2017. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37:328-334.
8. Di Michele, A., Pagano, C., Allegrini, A., Blasi, F., Cossignani, L., Raimo, E.D., Faieta, M., Oliva, E., Pittia, P., Primavilla, S. and Sergi, M., 2021. Hazelnut shells as source of active ingredients: Extracts preparation and characterization. *Molecules*, 26(21):6607.
9. Drmić, H. and Režek Jambrak, A., 2010. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol*, 2(2): 22-33.
10. Egüés, I., Hernandez-Ramos, F., Rivilla, I. and Labidi, J., 2021. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from apple pomace. *Molecules*, 26(13): 3783.
11. Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C. and Magné, C., 2012. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2): 243-249.
12. Fuso, A., Risso, D., Rosso, G., Rosso, F., Manini, F., Manera, I. and Caligiani, A., 2021. Potential valorization of hazelnut shells through extraction, purification and structural characterization of prebiotic compounds: A critical review. *Foods*, 10(6): 1197.
13. Fuso, A., Viscusi, P., Righetti, L., Pedrazzani, C., Rosso, G., Manera, I., Rosso, F. and Caligiani, A., 2023. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells as a potential source of dietary

- fibre: impact of hydrothermal treatment temperature on fibre structure and degradation compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(15): 7569-7579.
14. Gavilán-CuiCui, G., Padilla-Contreras, D., Manterola-Barroso, C., Morina, F. and Meriño-Gergichevich, C., 2024. Antioxidant Performance in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cultivars Shell Is Substantially Influenced by Season and Locality. *Agronomy*, 14(7): 1412.
 15. Hu, A. and Li, L., 2022. Effects of ultrasound pretreatment on functional property, antioxidant activity, and digestibility of soy protein isolate nanofibrils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 90: 106193.
 16. Jiménez-Moreno, N., Volpe, F., Moler, J.A., Esparza, I. and Ancín-Azpilicueta, C., 2019. Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants*, 8(12): 597.
 17. Król, K. and Gantner, M., 2020. Morphological traits and chemical composition of hazelnut from different geographical origins: A review. *Agriculture*, 10(9):375.
 18. Miljković, I., 2018. Lijeska. Hrvatska voćarska zajednica, Zagreb.
 19. Oroian, M., Ursachi, F. and Dranca, F., 2020. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64: 105021.
 20. Salem, M.A., Aborehab, N.M., Al-Karmalawy, A.A., Fernie, A.R., Alseekh, S. and Ezzat, S.M., 2022. Potential valorization of edible nuts by-products: exploring the immunomodulatory and antioxidants effects of selected nut shells extracts in relation to their metabolic profiles. *Antioxidants*, 11(3): 462.
 21. Shahidi, F., Alasalvar, C. and Liyana-Pathirana, C.M., 2007. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4): 1212-1220.
 22. Solís, A., Rocha, S., König, M., Adam, R., Garcés, H.O., Candia, O., Muñoz, R. and Azócar, L., 2023. Preliminary assessment of hazelnut shell biomass as a raw material for pellet production. *Fuel*, 333: 126517.
 23. Stévigny, C., Rolle, L., Valentini, N. and Zeppa, G., 2007. Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(15): 2817-2822.
 24. Žlabur, J.Š., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F. and Brnčić, S.R., 2015. Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29(2): 231-237.
 25. Ummat, V., Tiwari, B.K., Jaiswal, A.K., Condon, K., Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J., O'Donnell, C. and Rajauria, G., 2020. Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds. *Marine drugs*, 18(5): 250.

26. Uyan, M., Alptekin, F.M., Cebi, D. and Celiktas, M.S., 2020. Bioconversion of hazelnut shell using near critical water pretreatment for second generation biofuel production. *Fuel*, 273: 117641.
27. Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S. and Krešić, G., 2009. *Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci* (1-147).
28. Zakon o gospodarenju otpadom. NN 84/2021.
https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html NN 84/21
29. Zakon o održivom gospodarenju otpadom. NN 94/13.
https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html
30. Zannou, O., Pashazadeh, H., Ibrahim, S.A., Koca, I. and Galanakis, C.M., 2022. Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5): 103752.

Web izvori:

1. FAOSTAT (2022). Crops and livestock products
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> - pristup: 20.07.2024.

Životopis

Margareta Đumbir rođena je 04.02.1997. godine u Sisku. Osnovnu školu Braća Ribar u Sisku završila je 2012. godine, a Gimnaziju u Sisku je završila 2016. godine. Potom upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu te se 2019. godine odlučuje upisati Agronomski fakultet u Zagrebu, preddiplomski studij Agroekologije. Završava preddiplomski studij obranom završnog rada u rujnu 2022. te stječe kvalifikaciju sveučilišne prvostupnice inženjerke agroekologije. Nakon toga nastavlja obrazovanje na Agronomskom fakultetu, diplomski studij Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi. Tijekom cijelog studiranja aktivno radi preko studentskog ugovora na različitim poslovima poput asistenta na DOS3 CarNET projektu pod vodstvom Algebre d.o.o., administrativni posao u kozmetičkom salonu Beauty salon Mala Kreativka te honorarno radi kao trenerica grupnih treninga u Tjelesnoj revoluciji Petrinja. Osim toga, aktivno trenira veslanje u Udruzi lađarica Sisak s kojom osvaja dugi niz godina Maratone Lađarica.