

# Poboľšana ekstrakcija fenolnih spojeva iz kore mandarine primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja: Utjecaj procesnih parametara i optimizacija

M. Banožić,<sup>a,b\*</sup> S. Šafranko,<sup>a</sup> D. Bogadi,<sup>a</sup> K. Aladić<sup>a</sup> i S. Jokić<sup>a</sup>

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



<sup>a</sup>Sveučilište Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet,  
Ul. Franje Kuhaća 18, 31 000 Osijek, Hrvatska

<sup>b</sup>Sveučilište u Mostaru, Agronomski i Prehrambeno-tehnološki fakultet,  
88 000 Mostar, Bosna i Hercegovina

## Sažetak

Konsumacija svježih citrusa, ali i njihova prerada generiraju nusproizvode, kao što su kora, sjemenke, pulpa, kao i otpadne vode. Cilj ovog istraživanja je valorizacija agroindustrijskih nusproizvoda (kore citrusa) kao vrijedne sirovine za ekstrakciju polifenola primjenom inovativne netermalne metode ekstrakcije sa zelenim otapalom (voda). U ekstraktima je kvantificirano i identificirano ukupno šest fenolnih spojeva. Pri tome je promatran utjecaj vremena (od 5 do 15 min), frekvencije (od 40 do 100 Hz) i omjera kapljevitost/kruto (od 200 do 400 ml g<sup>-1</sup>) na efikasnost procesa ekstrakcije (iskorištenje) i udio dominantnih fenolnih spojeva (hesperidina i narirutina). Uz pomoć metode odzivnih površina definirani su optimalni parametri promatranog procesa ekstrakcije za svaki od istraživanih odziva, i to za iskorištenje (285,93 ml g<sup>-1</sup>, 73,38 Hz i 14,84 min), za hesperidin (366,19 ml g<sup>-1</sup>, 97,56 Hz i 5,1 min) te za narirutin (200 ml g<sup>-1</sup>, 70 Hz i 15 min). Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED ekstrakcija) pokazala se pogodnom za ekstrakciju fenolnih spojeva, pri čemu je izbjegnuta uporaba organskih otapala.

## Ključne riječi

Kore citrusa, fenolni spojevi, visokonaponsko električno pražnjenje, optimizacija

## 1. Uvod

Uzgoj mandarina važna je poljoprivredna djelatnost u Hrvatskoj, a osobito u području doline Neretve. Povećan uzgoj citrusa u Republici Hrvatskoj započinje prije 40-ak godina uvođenjem sorte skupine mandarina *Citrus unshiu* Marc., koje se odlikuju većom otpornošću na niske temperature.<sup>1</sup> Prema podacima Europske unije, u Hrvatskoj je u rekordnoj sezoni 2014./2015. proizvedeno 64,700 t citrusnog voća, od čega su 64,400 t činile mandarine i manje citrusno voće (klementina).<sup>2</sup> Od ostalih sortnih skupina, sorte skupine *Citrus Unshiu* Marc razlikuju se i po znatno većem udjelu vode<sup>2,3</sup> te čine većinu uzgajanih mandarina u Republici Hrvatskoj. Ipak, uzgoj mandarina bilježi pad na području Hrvatske i to od 14 % od 2010. do 2019. godine.<sup>2</sup> Unatoč padu u proizvodnji, uzgoj citrusa nezamjenjivo je važan segment hrvatskog gospodarstva.

Najveći dio citrusnog voća konzumira se svjež, a manji dio prerađen u sokovima, pekmezima i drugim konditorskim proizvodima. Prema *Panwaru i sur.*<sup>4</sup> oko 75 % mandarina i naranči se konzumira svježe, dok se otprilike 25 % citrusa prerađuje u prehrambenoj ili drugim industrijama. Konzumacijom svježeg ploda nastaje kora kao nusproizvod, dok preradom citrusa, osim kore, nastaju pulpa, sjemenke i vlakna.<sup>5,6</sup> Također, citrusi spadaju u sezonsko voće što istodobno označava veliku količinu nastalih nusproizvoda u kratkom vremenskom roku.<sup>7,8</sup> Koru citrusa karakterizira niska pH-vrijednosti i visoke koncentracije organskih

spojeva, poput eteričnih ulja (gdje je D-limonen primarni sastojak) i fenolnih spojeva, koji često iskazuju snažno antimikrobno djelovanje što onemogućava biološku obradu takvih nusproizvoda.<sup>5,7,9</sup> Kora se sastoji od dva dijela – albeda i flaveda. Albedo sadrži pretežno vodu (70 – 80 %) i spojeve kao što su celuloza, škrob, pektin, jednostavni šećeri, kiseline i flavonoidi, dok je flavedo bogat eteričnim uljima i pigmentima.<sup>8,10,11</sup> Fenolni spojevi unutar kore nastaju kao sekundarni metaboliti, koji štite unutarne tkivo ploda citrusa od infekcija uzrokovanih mikroorganizmima te utjecaja UV i IR zračenja.<sup>12</sup>

Dva su literaturno predložena načina obrade kore citrusa, proizvodnja biogoriva ili dobivanje visokovrijednih spojeva. Procesi ekstrakcije provode se uglavnom radi dobivanja pektina i eteričnih ulja (limonen), koji se nakon toga upotrebljavaju kao prehrambeni aditivi i/ili kozmetički sastojci.<sup>4,8,9</sup> Međutim, kora citrusa sadrži i druge spojeve poput bioflavonoida i fenolnih kiselina, čijom bi se ekstrakcijom povećavala mogućnost iskorištenja te vrste nusproizvoda.

Ekstrakcija HVED je netermička tehnika ekstrakcije koja se oslanja na elektrohidrauličko pražnjenje odnosno na stvaranje električnih pražnjenja izravno u vodi. Zbog visokog napona između dviju elektroda stvara se plazma koja pokreće niz različitih kemijskih i fizikalnih reakcija u dvije faze. U prvoj “pre-breakdown phase” dolazi do stvaranja elektrovodljivog kanala ioniziranog plina i nastanka slabih udarnih valova te stvaranja manjeg broja mjehurića u vodi. U drugoj “breakdown” fazi dolazi do naglog porasta jačine struje te zatim pražnjenja uz oslobađanje energije. U drugoj fazi javljaju se fizikalne promjene u obliku jakih udarnih valova, velikog broja mjehurića, jakih turbulencija te

\* Autor za dopisivanje: dr. sc. Marija Banožić  
e-pošta: [mbanozic@ptfos.hr](mailto:mbanozic@ptfos.hr)

Rad je prezentiran na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera 2022.

UV zračenja. Također može doći i do nastanka slobodnih radikala. Te promjene uzrokuju fragmentaciju tretiranog biljnog tkiva, njegovu mehaničku destrukciju te oštećenje stanica oksidacijom uzrokovanom radikalima, što u sinergiji omogućuje prijelaz unutarstaničnog materijala u otapalo.<sup>13,14</sup> HVED je dosad pokazao svoju učinkovitost za ekstrakciju polifenola, lignina, proteina, flavonoida i šećera itd. iz različitih nusproizvoda prehrambene industrije.<sup>15–18</sup> Zbog primjene vrlo niskih temperatura i smanjene uporabe organskih otapala, ekstrakcija HVED spada u zelene tehnike ekstrakcije, poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrakcije sa superkritičnim i subkritičnim fluidima te ekstrakcije s eutektičkim otapalima.<sup>19,20</sup>

Stoga je cilj ovog istraživanja provesti ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore citrusa-mandarine potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED), prema Box-Behnkenovom planu pokusa (BBD), pri tome mijenjajući omjer kapljevitost/kruto (200, 300, 400 ml g<sup>-1</sup>), frekvenciju (40, 70, 100 Hz) i vrijeme trajanja ekstrakcije (5, 10, 15 min). U dobivenim ekstraktima odredit će se udio ukupnih polifenola i antiradikalna aktivnost te identificirati i kvantificirati polifenolni spojevi uz pomoć tekućinske kromatografije. Kao konačni cilj, utvrdit će se utjecaj nezavisnih varijabli (omjera kapljevitost/kruto, frekvencije i vremena trajanja ekstrakcije) na zavisne varijable (iskorištenje i udio najzastupljenijih spojeva) te provesti numerička optimizacija procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina.

## 2. Eksperimentalni dio

### 2.1. Materijali i kemikalije

U radu je upotrijebljen agroindustrijski otpad – kore mandarine sorte *Okitsu*. Mandarine su proizvedene na obiteljskoj farmi Dalibor Ujević (Opuzen, Hrvatska). Od kemikalija upotrijebljene su: Milli-Q voda (vodljivosti  $\leq 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Njemačka), Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (TCl, Japan) i metanol (J. T. Baker, Poljska).

### 2.2. Priprema uzoraka za ekstrakciju

Uzorci (cjeloviti plodovi mandarina) su prikupljeni u listopadu 2020. godine. Nakon odvajanja od ploda, kore su oprane u vodovodnoj, zatim isprane u destiliranoj vodi te zamrznute na  $-80^\circ\text{C}$  kroz 24 h. Uzorci su zatim osušeni, procesom liofilizacije na uređaju (Christ, Alpha LSCplus) kroz 36 h, pri čemu je maksimalna temperatura desorpcije bila  $30^\circ\text{C}$ . Nakon sušenja, kore citrusa samljevene su u mlinu (IKA M 20) te prosijane na konačnu veličinu čestica manju od 2 mm.

### 2.2. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (ekstrakcija HVED)

Ekstrakcija fenolnih spojeva HVED iz kore mandarine sorte *Okitsu* provedena je upotrebom uređaja HVED

(SFE Systems Ltd., Osijek, Hrvatska). Uređaj sadrži: visokonaponski generator (30 kV), spremnik energije/kondenzator, visokonaponsku sklopku, komoru s magnetnom miješalicom u kojoj se uzorak tretira s elektrodama na razmaku od 1 cm i upravljačkog sklopa, automatike i upravljača.

Tijekom procesa ekstrakcije ispitivan je utjecaj triju faktora i to omjera kapljevitost/kruto, frekvencije i vremena ekstrakcije. Po završetku procesa ekstrakcije, dobiveni ekstrakti profilirani su i skladišteni na temperaturi od  $4^\circ\text{C}$  do daljnjih analiza.

### 2.4. Spektrofotometrijske analize

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski primjenjujući metodu po Folin-Ciocalteu pri 765 nm, dok je antiradikalna aktivnost određena prema DPPH metodi pri 517 nm, primjenjujući metode detaljnije objašnjene u drugom radu<sup>21</sup>. Rezultati za ukupne fenole izraženi su kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po g liofiliziranog biljnog materijala, dok su za antiradikalnu aktivnost izraženi kao postotci (%) inhibicije slobodnih radikala. Sva spektrofotometrijska mjerenja provedena su u tri paralele.

### 2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Sadržaj polifenola određen je uz pomoć HPLC uređaja za semipreparativnu kromatografiju (Agilent technology 1260 Infinity II), pri čemu je primijenjena metoda detaljno opisane u radu od Šafranko i sur.<sup>22</sup> Rezultati su izraženi kao mg g<sup>-1</sup> liofiliziranog biljnog materijala.

### 2.7. Optimiranje procesa ekstrakcije HVED primjenom metode odzivnih površina

Za procjenu utjecaja procesnih parametara (omjer kapljevitost/kruto, frekvencija i vrijeme) na udio dominantnih fenolnih spojeva u ekstraktima kore mandarina primijenjen je BBD te je ispitan utjecaj triju faktora (omjer kapljevitost/kruto ( $X_1$ ), frekvencija ( $X_2$ ), vrijeme ( $X_3$ )) (tablica 1).

Tablica 1 – Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli (omjer kapljevitost/kruto, frekvencija i vrijeme korištenih u RSM dizajnu)

Table 1 – Coded and uncoded levels of independent variables (liquid/solid ratio, frequency, time) used in RSM design

Nezavisne varijable		Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
omjer kapljevitost/kruto/ml g <sup>-1</sup>	$X_1$	200	300	400
frekvencija/Hz	$X_2$	40	70	100
vrijeme/min	$X_3$	5	10	15

Provedeno je 17 eksperimenata prema BBD-u te su dobiveni rezultati eksperimenata aproksimirani polinomima drugog reda. Na temelju dobivenog polinoma kreirane su odzivne površine koje vizualiziraju utjecaj ispitivanih parametara na promatrani proces ekstrakcije HVED. Primjenom komercijalnog softverskog paketa Design-Expert®, v.7 (Stat-Ease, Minneapolis, SAD) provedena je procjena koeficijena modela, statistička analiza (ANOVA) te optimizacija ispitivanih nezavisnih varijabli. Proračuni su rađeni s intervalom pouzdanosti od 95 %, pri čemu je utjecaj faktora statistički značajan uz  $p < 0.05$

### 3. Rezultati i rasprava

Ekstrakcija HVED smatra se "zelenom" metodom za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Pokazalo se da je primjenom te tehnike moguće poboljšati iskorištenje ekstrakcije uz niži utrošak energije. Osim toga, ta tehnika odlikuje se znatno kraćim vremenom tretiranja kao i minimalnim povećanjem temperature tijekom procesa.<sup>23,24</sup> Parametri koji utječu tijekom ekstrakcije HVED su: udaljenost između elektroda, omjer uzorka i otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije i odabir otapala.<sup>13</sup> S ciljem poboljšanja ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kore mandarine sorte *Okitsu* provedena je HVED ekstrakcija tijekom koje se ispitivao utjecaj promjene parametara, i to omjera kapljevitosti/kruto (od 200 do 400 ml g<sup>-1</sup>), frekvencije (od 40 do 100 Hz) i vremena ekstrakcije (od 5 do 15 min), na iskorištenje procesa ekstrakcije HVED i na sadržaj polifenolnih spojeva, dok su

ostali parametri (otapalo, udaljenost između elektroda) bili konstantni. Eksperimentalni raspon ispitivanih parametara za frekvenciju i vrijeme odabran je pomoću literaturno dostupnih podataka,<sup>25–29</sup> dok je omjer kapljevitosti/kruto odabran na temelju preliminarnih istraživanja. Naime, omjer kapljevitosti/kruto od 200 ml g<sup>-1</sup> bila najveća koncentracija pri kojoj je još uvijek dolazilo do stvaranja izboja. Malo je literaturno dostupnih podataka za HVED tretmane na korama citrusa. *Buniowska i sur.*<sup>29</sup> tretirali su kore naranče (*Navel Navelate*) da bi dobili ekstrakte bogate karotenoidima. Ipak, i u karotenoidima-bogatim ekstraktima uočene su visoke koncentracije fenolnih spojeva i to do 40,7 %.

S druge strane, *El Kantar i sur.*<sup>18</sup> primijenili su HVED kao predtretman ekstrakciji fenola grejpa te pokazali da osim vode i glicerol može služiti kao izvrsno otapalo za tu vrstu ekstrakcije. U oba slučaja kratko vrijeme ekstrakcije i smanjena ili potpuno izbjegnuta potreba za otapalima pokazali su se kao glavne prednosti HVED-a.

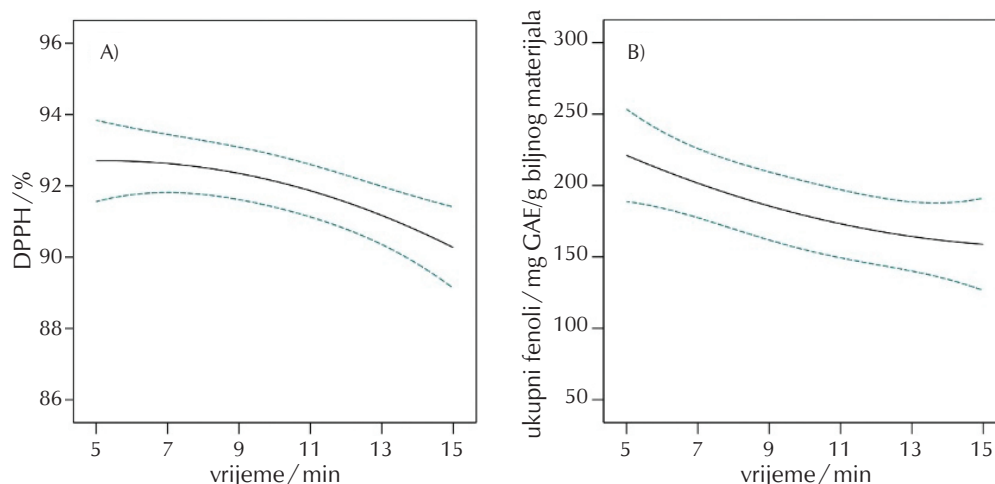
Prema rezultatima (tablica 2), iskorištenje ekstrakcije kretalo se od 359,50 do 463,20 mg g<sup>-1</sup> biljnog materijala. Najveće iskorištenje dobiveno je pri sljedećim uvjetima: omjer kapljevitosti/kruto od 300 ml g<sup>-1</sup>, frekvencija 100 Hz i trajanje ekstrakcije od 15 min. Te vrijednosti su granične u primijenjenom eksperimentu, odnosno radi se o najmanjem omjeru kapljevitosti/kruto, najvećoj primijenjenoj frekvenciji i najduljem vremenu tretiranja.

S druge strane, najmanje iskorištenje zabilježeno je kad je primijenjen omjer kapljevitosti/kruto od 400 ml g<sup>-1</sup>, fre-

Tablica 2 – Eksperimentalna matrica pokusa i dobiveni rezultati za iskorištenje ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola i antiradikalnu aktivnost

Table 2 – Experimental design used in RSM and results for extraction yield, total phenol content, and antiradical activity

Broj eksperimenata	Omjer kapljevitosti/kruto/ml g <sup>-1</sup>	Frekvencija/Hz	Vrijeme/min	Iskorištenje ekstrakcije/mg g <sup>-1</sup>	Ukupni fenoli/mg GAE g <sup>-1</sup>	DPPH/%
1.	200	40	10	416,80	134,44	92,22
2.	200	70	5	430,00	166,23	91,97
3.	400	40	10	389,00	176,49	94,93
4.	300	70	10	453,00	173,15	92,68
5.	300	70	10	432,00	179,31	92,30
6.	300	100	5	427,20	170,59	92,09
7.	400	70	5	391,50	275,46	92,85
8.	300	40	5	426,10	274,18	91,80
9.	300	70	10	432,31	176,23	92,50
10.	300	70	10	424,80	161,36	90,99
11.	200	70	15	441,20	96,23	93,91
12.	400	100	10	359,50	270,85	91,75
13.	200	100	10	418,40	138,28	92,30
14.	300	40	15	456,00	115,21	87,06
15.	300	100	15	463,20	193,92	91,97
16.	300	70	10	422,40	204,95	92,18
17.	400	70	15	424,01	232,13	92,90



Slika 1 – Utjecaj vremena na: antiradikalnu aktivnost (A) i ukupne fenole (B)

Fig. 1 – Influence of extraction time on antiradical activity (A), and total phenol content (B)

kvencija od 100 Hz i trajanje ekstrakcije od 10 min. U usporedbi s literaturno dostupnim podacima za iskorištenja dobivena s konvencionalnim<sup>30–32</sup> tehnikama ekstrakcije koja su se kretala do maksimalno 18 % vidljivo je da je ekstrakcija HVED daje veće iskorištenje u odnosu na ekstrakciju s etil-acetatom, acetonom, etanolom, petroleterom i vodom. Dobiveni rezultati nešto su sličniji onim (330 – 540 mg g<sup>-1</sup>) dobivenim u istraživanju *Liew i sur.*,<sup>33</sup> gdje se kao tehnika ekstrakcije primijenila maceracija s otapalima kao što su metanol/voda, etanol/voda i aceton/voda kroz 72 h.

Topljivost fenolnih spojeva u pojedinom otapalu ovisi ponajviše o njihovoj kemijskoj strukturi, uključujući prisutnost i položaj hidroksilne skupine, koja imaju izravan utjecaj na polarnost fenolnog spoja. Zbog toga se pojedini fenolni spojevi ekstrahiraju u višim udjelima kad se kao otapalo upotrebljavaju manje polarna otapala, a drugi kad se upotrebljavaju vodene otopine etanola ili voda.<sup>34</sup> U tablici 2 prikazani su i rezultati za antiradikalnu aktivnost te za ukupne fenole. Uočeno je da se antiradikalna aktivnost kretala od 87,08 do 94,93 % u dobivenim ekstraktima HVED. Sadržaj ukupnih fenola je u dobivenim ekstraktima bio u rasponu od 96,23 mg GAE g<sup>-1</sup> do 275 mg GAE g<sup>-1</sup>. U istraživanju *El Kantar i sur.*<sup>18</sup> ekstrakti kore grejpa tretirani HVED-om imali su od 13,3 do 18,8 mg g<sup>-1</sup> ukupnih fenola kad je ekstrakcija provedena u vodi, dok je s glicerolom sadržaj ukupnih fenola bio od 17,70 do 19,3 mg g<sup>-1</sup>. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju sličniji su onima dobivenim u istraživanju *Buniowska i sur.*,<sup>29</sup> gdje su HVED-om tretirane kore naranče, a sadržaj je ukupnih fenola bio oko 184 mg g<sup>-1</sup> pri nižem unosu energije (55 kJ). U usporedbi s drugim istraživanjima gdje su primijenjene konvencionalne tehnike ekstrakcije, poput onog od *Liew i sur.*,<sup>33</sup> ekstrakcijom HVED bilo je moguće dobiti znatno veći sadržaj ukupnih fenola.

Produljeno vrijeme tretiranja HVED-om pokazalo se negativnim, kako za antiradikalnu aktivnost tako i na sadržaj ukupnih fenola (slika 1). Iako se tretiranje HVED-om primjenjuje radi pozitivnih učinaka na procese ekstrakcije (razaranje staničnih stijenki), s druge strane, ono omogućava stvaranje hidroksilnih radikala koji nastaju fotodisocijacijom vode koja je u ovom slučaju otapalo. Osim toga, zbog pojave oksidativnih kemijskih reakcija može doći i do smanjenja udjela polifenola u ekstraktu.<sup>34</sup> Naime, pod utjecajem UV-zračenja koje nastaje zbog električnog pražnjenja može doći do reakcije između hidroksilnih radikala i fenola te nastanka fenoksilnog radikala.<sup>35</sup>

### 3.1. Sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima kore citrusa dobivenih ekstrakcijom HVED

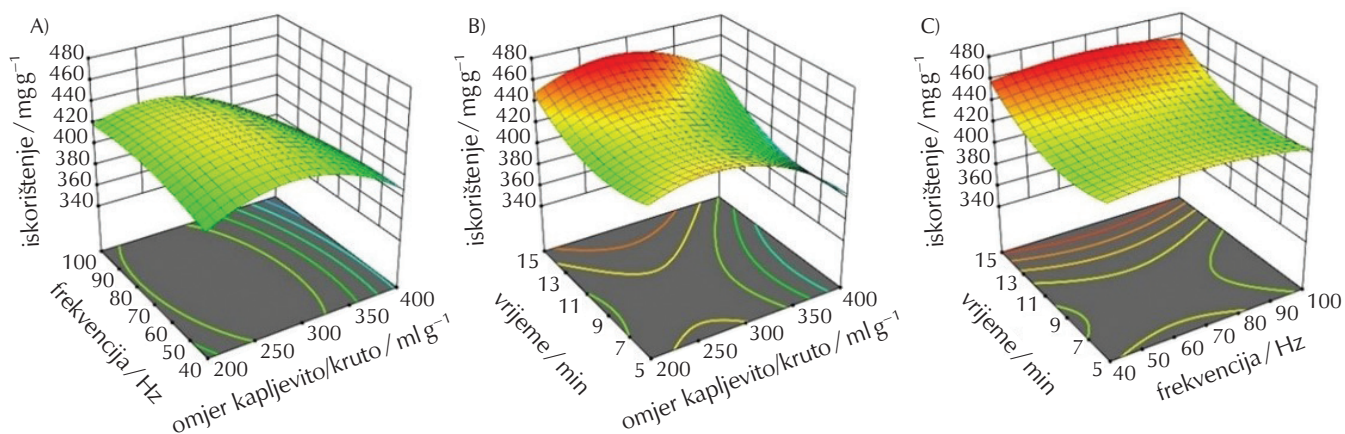
Uz pomoć HPLC-a detektirani su pojedinačni fenolni spojevi u dobivenim ekstraktima, te je tako utvrđena prisutnost šest spojeva, a to su: hesperidin i narirutin kao dominantni spojevi i kriptoklorogenska kiselina, kemferol-3-rutinozid i neoklorogenska kiselina i rutin, čije su koncentracije izražene kao mg g<sup>-1</sup> i prikazane u tablici 3.

Hesperidin kao dominantni spoj u svim ekstraktima bio je prisutan u koncentracijama od 50,52 do 72,91 mg g<sup>-1</sup>, dok je drugi spoj po zastupljenosti bio narirutin u koncentracijama od 7,47 do 17,39 mg g<sup>-1</sup>. U usporedbi s rezultatima dobivenim u našem prethodnom radu,<sup>37</sup> gdje je provedena ekstrakcija s eutekticima, dobiveni rezultati slični su onima dobivenim s otapalima kolin klorid/butan-1,4-diol i kolin klorid/*N*-metil urea, kao i onima dobivenim ekstrakcijom subkritičnom vodom (71,9 %) autora *Cheigh i sur.*<sup>38</sup> Također, u istom istraživanju provedene su i konvencionalne ekstrakcije s metanolom, etanolom i vodom te je u dobivenim ekstraktima zabilježen znatno manji sadržaj hesperidina.

Tablica 3 – Sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima kore citrusa, dobivenih HVED ekstrakcijom prema Box-Behnken dizajnu

Table 3 – Phenolic compounds in citrus peel extracts obtained using HVED extraction according to Box-Behnken design

Broj eksperimenta	Hesperidin/ $\text{mg g}^{-1}$	Narirutin/ $\text{mg g}^{-1}$	Kriptoklorogenska kiselina/ $\text{mg g}^{-1}$	Neoklorogenska kiselina/ $\text{mg g}^{-1}$	Rutin/ $\text{mg g}^{-1}$	Kemferol-3-O-rutinozid/ $\text{mg g}^{-1}$
1.	58,51	12,77	1,05	0,68	2,49	0,59
2.	59,96	13,55	0,98	0,68	2,25	0,59
3.	64,74	13,72	0,75	0,53	4,35	0,56
4.	59,46	13,95	0,93	0,72	4,33	0,66
5.	67,07	14,20	0,79	0,64	4,62	0,61
6.	70,62	14,53	0,81	0,64	2,55	0,57
7.	69,76	14,74	0,84	0,60	2,66	0,36
8.	55,88	7,47	0,43	0,33	1,37	0,23
9.	59,16	12,87	0,39	0,54	4,19	0,60
10.	67,08	14,67	0,85	0,68	4,78	0,63
11.	59,22	17,39	1,10	1,10	5,10	0,90
12.	72,91	12,19	0,86	0,66	5,25	0,44
13.	50,52	13,51	0,85	0,62	4,00	0,72
14.	62,90	14,40	0,76	0,72	5,05	0,51
15.	58,71	13,76	0,69	0,71	4,56	0,49
16.	64,50	14,54	0,65	0,68	4,92	0,89
17.	68,32	14,58	0,67	0,61	5,13	0,61



Slika 2 – 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na iskorištenje ekstrakcije (A: utjecaj frekvencije i omjera kapljevito/kruto, B: utjecaj vremena i omjera kapljevito/kruto i C: utjecaj vremena i frekvencije)

Fig. 2 – Three-dimensional response surface plots for extraction yield as a function of independent variables (A: influence of frequency and liquid/solid ratio, B: influence of time and liquid/solid ratio, and C: influence of time and frequency)

### 3.2. Utjecaj procesnih parametara ekstrakcije HVED na iskorištenje ekstrakcije, sadržaj hesperidina i narirutina

Na iskorištenje ekstrakcije statistički su najviše utjecali omjer kapljevito/kruto ( $X_1$ ) s ( $p = 0,003$ ) te vrijeme ( $X_2$ ) ( $p = 0,012$ ). Također su i kvadratne vrijednosti omjera kapljevito/kruto statistički znatno utjecale na iskorištenje (tablica 4).

Na slici 2 vidljivo je da se s porastom omjera kapljevito/kruto smanjivalo iskorištenje ekstrakcije, dok je s produlje-

nim trajanjem tretiranja iskorištenje raslo. Povećanjem trajanja tretiranja uzorka HVED-om ( $X_2$ ) omogućeno je bolje razaranje staničnih stijenki biljnog materijala, što istodobno znači i povećano iskorištenje.

*Wiboonsirikul i Adachi*<sup>39</sup> navode da se s većom dostupnošću otapala (pri većem omjeru kapljevito/kruto) poboljšava i kontakt i prodiranje otapala u biljni materijal, povećavajući učinkovitost ekstrakcije. Međutim, u ovom istraživanju iskorištenje se nije povećavalo s omjerom kapljevito/kruto, što sugerira da na povećano iskorištenje ekstrakcije tijekom tretmana HVED veći utjecaj imaju drugi fenomeni uključujući

jući promjenu svojstava otapala s promjenom koncentracije i vrijeme ekstrakcije.

Produljeno vrijeme ekstrakcije imalo je pozitivan utjecaj na iskorištenje ekstrakcije. Trajanje tretmana HVED-om temelji se na broju pražnjenja pri naponu od 30 kV. Povećanje broja pražnjenja ubrzava ekstrakciju i time povećava iskorištenje ekstrakcije. Ipak, iskorištenje se povećava s povećanjem broja izboja dok ne dosegne optimalnu točku (najveće iskorištenje) i nakon toga opada.<sup>40,41</sup> To se također može objasniti Fickovim drugim zakonom difuzije, koji predviđa konačnu ravnotežu koncentracije otopljenog tvari između matrice uzorka i otapala za ekstrakciju nakon određenog razdoblja.

Na sadržaj hesperidina pri procesu ekstrakcije HVED statistički je najveći utjecaj ( $p = 0,002$ ) imao omjer kapljevitost/kruto ( $X_1$ ). Također, pokazalo se da vrijeme i frekvencija na sadržaj hesperidina djeluju sinergistički, zbog njihove statistički značajne ( $p = 0,032$ ) interakcije ( $X_2X_3$ ) (tablica 4). Sličan utjecaj procesnih parametara vremena i omjera kapljevitost/kruto na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kora mandarina zabilježen je i u drugom istraživanju Zhou i sur.,<sup>42</sup> gdje je kao tehnika ekstrakcije primijenjeno pulsirajuće električno polje (PEF).

U navedenom istraživanju eksperimenti su provedeni u trajanju od 1 do 5 min te se iskorištenje flavonoida postupno smanjivalo od četvrte minute. Kao mogući razlog

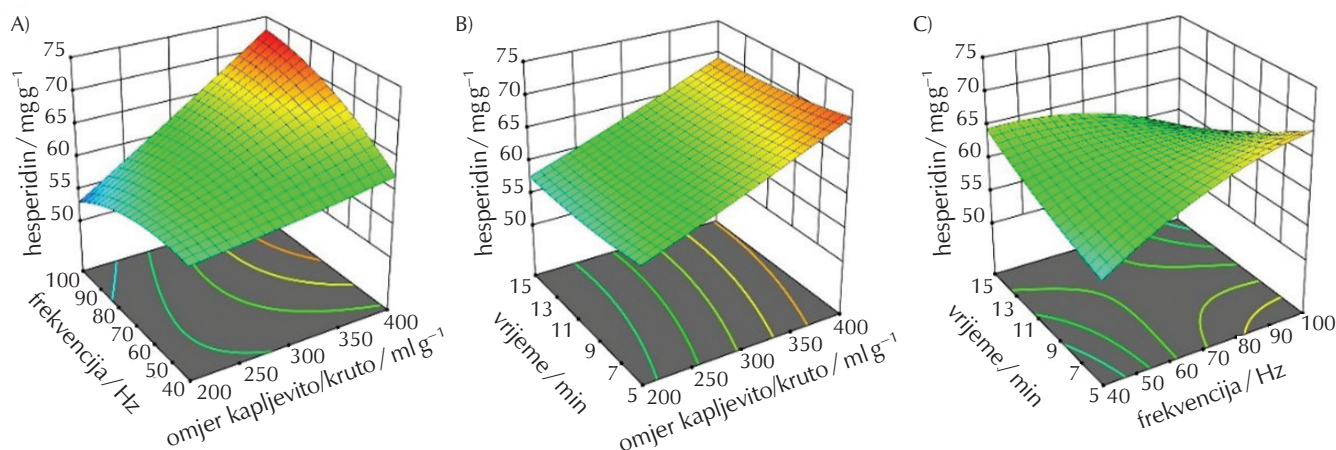
Tablica 4 – Analiza varijance (ANOVA) za iskorištenje ekstrakcije, sadržaj hesperidina i narirutina dobivenih ekstrakcijom HVED  
Table 4 – Analysis of variance (ANOVA) for extraction yield, hesperidin content, and narirutin content obtained using HVED extraction

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode / df	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
<i>Iskorištenje ekstrakcije</i>					
model	9482,48	9	1053,61	7,96	0,006
$X_1$ – omjer kapljevitost/kruto	2534,36	1	2534,36	19,15	0,003
$X_2$ – frekvencija	48,02	1	48,02	0,36	0,570
$X_3$ – vrijeme	1501,79	1	1501,79	11,35	0,012
$X_1X_2$	241,80	1	241,80	1,83	0,220
$X_1X_3$	113,53	1	113,53	0,86	0,390
$X_2X_3$	9,30	1	9,30	0,07	0,790
$X_1^2$	3593,08	1	3593,08	27,14	0,001
$X_2^2$	253,86	1	253,86	1,92	0,210
$X_3^2$	1362,35	1	1362,35	10,29	0,015
ostatak	926,59	7	132,37		
nedostatak modela	345,56	3	115,19	0,79	0,560
pogreška	581,03	4	145,26		
ukupno	10409,07	16			
<b><math>R^2</math></b>	<b>0,911</b>				
<i>Sadržaj hesperidina</i>					
model	476,55	9	52,95	4,22	0,036
$X_1$ – omjer kapljevitost/kruto	282,33	1	282,33	22,48	0,002
$X_2$ – frekvencija	14,37	1	14,37	1,14	0,320
$X_3$ – vrijeme	6,26	1	6,26	0,50	0,500
$X_1X_2$	65,18	1	65,18	5,19	0,057
$X_1X_3$	0,12	1	0,12	0,01	0,920
$X_2X_3$	89,63	1	89,63	7,14	0,032
$X_1^2$	0,27	1	0,27	0,02	0,890
$X_2^2$	17,46	1	17,46	1,39	0,280
$X_3^2$	1,56	1	1,56	0,12	0,730
ostatak	87,92	7	12,56		
nedostatak modela	26,16	3	8,72	0,56	0,670
pogreška	61,76	4	15,44		
ukupno	564,46	16			
<b><math>R^2</math></b>	<b>0,844</b>				

Tablica 4 – (nastavak)

Table 4 – (continued)

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode / <i>df</i>	Varijanca <i>MS</i>	<i>f</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
<i>Sadržaj narirutina</i>					
model	51,8	9	5,76	4,24	0,035
$X_1$ – omjer kapljevito/kruto	0,50	1	0,50	0,37	0,565
$X_2$ – frekvencija	3,96	1	3,96	2,91	0,132
$X_3$ – vrijeme	12,07	1	12,07	8,89	0,021
$X_1X_2$	1,29	1	1,29	0,95	0,363
$X_1X_3$	4,00	1	4,00	2,95	0,130
$X_2X_3$	14,81	1	14,81	10,90	0,013
$X_1^2$	2,47	1	2,47	1,82	0,220
$X_2^2$	13,08	1	13,08	9,63	0,017
$X_3^2$	0,28	1	0,28	0,21	0,660
ostatak	9,51	7	1,36		
nedostatak modela	7,45	3	2,48	4,83	0,081
pogreška	2,06	4	0,51		
ukupno	61,31	16			
<b><math>R^2</math></b>	<b>0,845</b>				

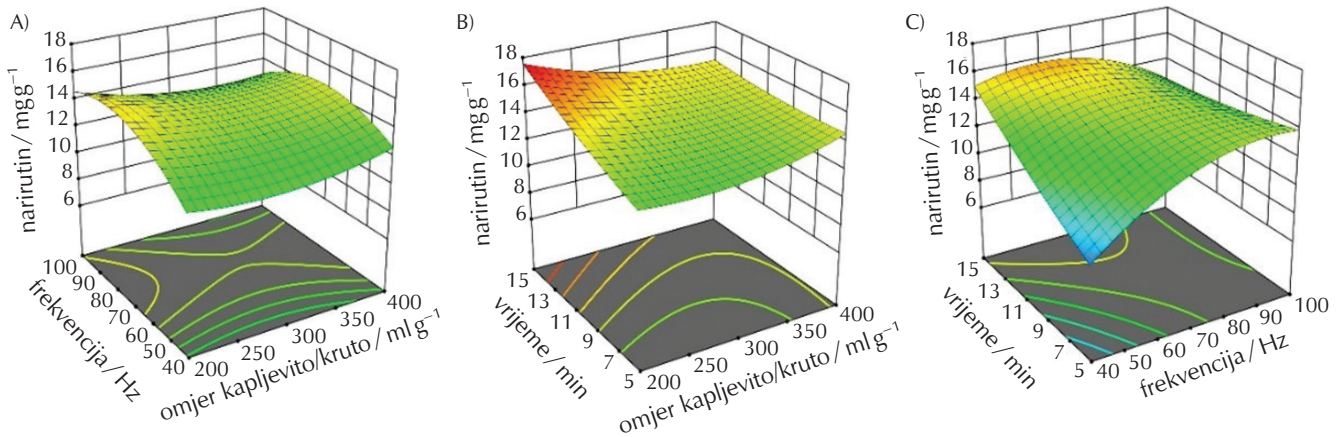


Slika 3 – 3D-dijagram utjecaja ispitivanih varijabli na sadržaj hesperidina (A: utjecaj frekvencije i omjera kapljevito/kruto, B: utjecaj vremena i omjera kapljevito/kruto i C: utjecaj vremena i frekvencije)

Fig. 3 – Three-dimensional response surface plot for hesperidin content as a function of independent variables (A: influence of frequency and liquid/solid ratio, B: influence of time and liquid/solid ratio, and C: influence of time and frequency)

autori su naveli i kontinuirano otapanje pektina i proteina iz perikarpa mandarine tijekom procesa ekstrakcije što postupno mijenja svojstva otapala. Iako se kinetika prijenosa mase kod obje tehnike (HVED i PEF) temelji na djelovanju električnog naboja tijekom ekstrakcije, ipak se one zasnivaju na različitim mehanizmima koji zahtijevaju različite vrste elektroda i primijenjeni napon. Naime, kod HVED-a se radi o visokonaponskom generatoru i igličastoj elektrodi za pražnjenje u obliku luka, dok PEF zahtijeva dvije usporedne pločaste elektrode gdje uslijed razlike potencijala nastaje električno polje.<sup>43</sup>

Na slici 3 prikazan je utjecaj nezavisnih varijabli na sadržaj hesperidina, gdje je vidljivo da s porastom omjera kapljevito/kruto raste i koncentracija hesperidina u cjelokupnom promatranom eksperimentalnom rangu. Udio otapala (vode) jedan je od najvažnijih procesnih parametara koji utječu na prijenos mase tijekom ekstrakcije.<sup>44</sup> Također, veći omjer kapljevito/kruto uzrokuje nižu električnu provodljivost početne suspenzije. Naime, električna pražnjenja odvijaju se pri vrlo niskoj vodljivosti medija, što bi značilo da je pri višim omjerima kapljevito/kruto, odnosno nižim koncentracijama suspenzije bilo više pražnjenja.<sup>27</sup> S pove-



Slika 4 – 3D-dijagram utjecaja ispitivanih varijabli na sadržaj narirutina (A: utjecaj frekvencije i omjera kapljevitost/krućina, B: utjecaj vremena i omjera kapljevitost/krućina i C: utjecaj vremena i frekvencije)

Fig. 4 – Three-dimensional response surface plot for naringin content as a function of independent variables (A: influence of frequency and liquid/solid ratio, B: influence of time and liquid/solid ratio, and C: influence of time and frequency)

čanom električnim pražnjenjem u mediju došlo je do većeg narušavanja staničnih stijenci biljnih stanica i efikasnijeg procesa ekstrakcije hesperidina. Ipak, taj procesni parametar je potrebno optimizirati jer njegovo povećanje dovodi do prevelike uporabe otapala (vode), što nije poželjno, kako s energetske tako i s ekološke strane.<sup>45</sup>

Na sadržaj narirutina dobivenog ekstrakcijom HVED statistički najveći utjecaj je imalo vrijeme tretiranja ( $p = 0,021$ ). Također, vrijeme i frekvencija imali su sinergistički pozitivan utjecaj na sadržaj narirutina s  $p$  vrijednošću od 0,013. Osim navedenih, statistički značajan utjecaj ( $p = 0,017$ ) imala je i kvadratna vrijednost frekvencije ( $X_2^2$ ) (tablica 4).

Na slici 4 prikazani su 3D-dijagrami utjecaja nezavisnih varijabli na sadržaj narirutina, gdje je vidljiv pozitivan učinak vremena. Odnosno, uslijed duljeg izlaganja biljnog materijala HVED-u došlo je i do povećanja koncentracije narirutina u ekstraktima.

Za ispitivanje utjecaja procesnih parametara ekstrakcije HVED, koji predstavljaju nezavisne varijable, na zavisne varijable (iskorištenje, sadržaj hesperidina i narirutina) te provjeru prikladnosti primijenjenog BBD-a u modeliranju i optimizaciji kreirani su modeli, odnosno polinomi drugog reda. Modeli su dobiveni aproksimacijom eksperimentalno dobivenih podataka, dok su njihovi koeficijenti dobiveni nelinearnom regresijom a daju funkcionalnu ovisnost između zavisnih (odziva) i nezavisnih (promatranih procesnih parametara) varijabli.

$$\begin{aligned} \text{Iskorištenje ekstrakcije} = \\ = 432,90 - 17,80X_1 - 2,45X_2 + 13,70X_3 - 7,78X_1X_2 + \\ + 5,33X_1X_3 + 1,53X_2X_3 - 29,21X_1^2 - 7,76X_2^2 + \\ + 17,99X_3^2 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Sadržaj hesperidina} = \\ = 63,45 + 5,94X_1 + 1,34X_2 - 0,88X_3 + 4,04X_1X_2 - \\ - 0,18X_1X_3 - 4,73X_2X_3 + 0,25X_1^2 - 2,04X_2^2 + 6,36X_3^2 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Sadržaj narirutina} = \\ = 14,04 - 0,25X_1 + 0,70X_2 + 1,23X_3 - 0,57X_1X_2 - \\ - 1,00X_1X_3 - 1,92X_2X_3 + 0,77X_1^2 - 1,76X_2^2 - 0,26X_3^2 \end{aligned} \quad (3)$$

Pogodnost modela tumači se uz pomoć koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), koji predstavlja mjeru odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobivenih rezultata. Visoke vrijednosti za  $R^2$  (0,911; 0,844 i 0,845) ukazuju na adekvatnost primijenjenih modela. Osim toga,  $p$ -vrijednost tih regresijskih modela bila je ispod 0,05.

U konačnici, primjenom funkcije poželjnosti (engl. *desirability function method*), na temelju dobivenih podataka, provedena je optimizacija procesa da bi se dobilo maksimalno iskorištenje ekstrakcije, maksimalan sadržaj hesperidina i maksimalan sadržaj narirutina. Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno potvrđene vrijednosti prikazane su u tablici 5.

Tablica 5 – Optimalni uvjeti HVED ekstrakcije za koru citrusa dobiveni pomoću metode odzivnih površina

Table 5 – Optimal HVED extraction conditions for citrus peel obtained by response surface methodology

		Iskorištenje/ mg g <sup>-1</sup>	Sadržaj hesperidina/ mg g <sup>-1</sup>	Sadržaj narirutina/ mg g <sup>-1</sup>
OPTIMALNI UVJETI	Omjer kapljevitost/krućina/ml g <sup>-1</sup>	285,93	366,19	200,00
	Frekvencija/Hz	73,38	97,56	70,00
	Vrijeme ekstrakcije/min	14,84	5,10	15,00
	Predviđene vrijednosti	463,13	75,30	17,55
	Funkcija poželjnosti (D)	1,00	1,00	1,00
	Vrijednosti dobivene eksperimentom	451,01 ± 24,03	73,16 ± 4,73	15,15 ± 1,53



Predviđene optimalne vrijednosti potvrđene su eksperimentalno, čime je dokazana prikladnost modela za optimizaciju procesa ekstrakcije HVED s rasponom pogreške od  $\pm 10\%$ .

## 4. Zaključak

Ekstrakcija HVED pokazala se vrlo učinkovitom u ekstrakciji fenolnih spojeva kore mandarine (*Citrus unshiu* Marc.) sorte *Okitsu*. Također se pokazalo da promjena procesnih parametara ekstrakcije HVED (omjer kapljevitosti/krutosti, frekvencija i vrijeme) značajno utječu, kako na iskorištenje ekstrakcije tako i na sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva, ponajviše zbog povećanja broja pražnjenja koje ubrzava ekstrakciju ciljanih fenolnih spojeva, poglavito hesperidina. Primjenom metode odzivnih površina i optimizacije procesa ekstrakcije HVED moguće je dobiti visoke koncentracije hesperidina i narirutina. U konačnici, tom tehnikom ekstrakcije u potpunosti je izbjegnuta uporaba štetnih organskih otapala i visokih temperatura, što tehniku karakterizira kao zelenu i netermalnu tehniku ekstrakcije.

## ZAHVALA

Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom "Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla" (UIP-2017-05-9909).

## Popis kratica i simbola

### List of abbreviations and symbols

ANOVA	– analiza varijance – analysis of variance
BBD	– Box – Behnkenov plan pokusa – Box – Behnken design
<i>D</i>	– željena funkcija – desirability function
<i>df</i>	– stupnjevi slobode – degrees of freedom
DPPH	– 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GAE	– ekvivalenti galne kiseline – gallic acid equivalent
HPLC	– tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – High Performance Liquid Chromatography
HVED	– visokonaponsko električno pražnjenje – High-Voltage Electric Discharge
PEF	– pulsirajuće električno polje – Pulsed Electric Field
MS	– srednja vrijednost sume kvadrata odstupanja – mean square
UV	– ultraljubičasto – ultraviolet
IR	– infracrveno – infrared

## Literatura References

1. *D. Hartl-Musinov, J. Rošin, K. Hančević, Ž. Gatin, S. Černi, M. Krajačić, D. Škorić*, Uvođenje postupaka za zasnivanje osnovnog matičnog nasada mandarine Unshiu u Hrvatskoj, u: I. Kolar (ur.), Zbornik radova Drugog hrvatskog oplemenjivačkog i sjemenarskog kongresa, Hrvatsko agronomsko društvo, Poreč, 2006., str. 76–77.
2. European Commission, Working Group for Citrus fruit: The citrus market in the EU: production, areas and yields, WORKING DOCUMENT WG - Vol. 01, 2021, URL: [https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/citrus-production\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/citrus-production_en.pdf).
3. *D. Gluhic*, Opskrbljenost hranivima tala za uzgoj mandarina u dolini neretve, Glasnik zaštite bilja **5** (2006) 39–47.
4. *D. Panwar, A. Saini, P. S. Panesar, H. K. Chopra*, Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy, Trends Food Sci. Technol. **111** (2021) 549–562, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.018>.
5. *D. A. Zema, P. S. Calabrò, A. Folino, V. Tamburino, G. Zappia, S. M. Zimbone*, Valorisation of citrus processing waste: A review, Waste Manage. **80** (2018) 252–273, doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>.
6. *D. Mamma, P. Christakopoulos*, Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products, Waste Biomass Valor. **5** (2014) 529–549, doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9250-y>.
7. *Y. Lu, C. Zhang, P. Bucheli, D. Wei*, Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China, Plant Foods Hum. Nutr. **61** (2006) 57–65, doi: <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0014-8>.
8. *I. John, K. Muthukumar, A. Arunagiri*, A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production, Int. J. Green Energy **14** (2017) 599–612, doi: <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1307753>.
9. *B. Satari, K. Karimi*, Citrus processing wastes: environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization, Resour. Conserv. Recy. **129** (2018) 153–167, doi: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>.
10. *Z. Berk*, Citrus Fruit Processing, Vol. 9, Academic Press, Elsevier, UK, str. 9–10, 261–274, 2016., ISBN 9780128031339.
11. *N. Mahato, M. Sinha, K. Sharma, R. Koteswarara, M. Hwan*, Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes, Foods **8** (2019) 523–604, doi: <https://doi.org/10.3390/foods8110523>.
12. *I. Moulehi, S. Bourgou, I. Ourghemmi, M. Saidani Tounsi*, Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, Ind. Crops Prod. **39** (2012) 74–80, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.013>.
13. *N. Boussetta, E. Vorobiev*, Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review, Comptes. Rendus. Chimie **17** (2014) 197–203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>.
14. *Z. Li, Y. Fan, J. Xi*, Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials, Food Chem. **277** (2019) 246–260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.119>.
15. *E. Puértolas, F. J. Barba*, Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization, Food Bioprod. Process. **100** (2016) 172–184, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.001>.

- org/10.1016/j.fbp.2016.06.020.
16. M. Chadni, N. Grimi, I. Ziegler-Devin, N. Brosse, O. Bals, High voltage electric discharges treatment for high molecular weight hemicelluloses extraction from spruce, *Carbohydr. Polym.* **222** (2019) 115019, doi: <https://doi.org/10.1007/s12393-016-9154-2>.
  17. O. Parniakov, F. J. Barba, N. Grimi, N. Lebovka, E. Vorobiev, Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels, *Food Chem.* **192** (2016) 842–848, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.096>.
  18. S. El Kantar, H. N. Rajha, N. Boussetta, E. Vorobiev, R. G. Maroun, N. Louka, Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol, *Food Chem.* **295** (2019) 165–171, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.111>.
  19. A. Mitar, D. Kučić Grgić, J. Prlić Kardum, Ekstrakcija i ispitivanja stabilnosti polifenola komine masline u prirodnim eutektičkim otapalima, *Kem. Ind.* **68** (2019) 407–414, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2019.039>.
  20. M. Banožić, M. Matić, S. Šafranko, A. M. Cikoš, M. Jakovljević, M. Molnar, S. Jokić, Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada primjenom eutektičkih otapala. *Kem. Ind.* **69** (2020) P1–P10, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.010>.
  21. M. Molnar, I. Jerković, D. Suknović, B. Bilić Rajs, K. Aladić, D. Šubarić, S. Jokić, Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO<sub>2</sub> extraction targeted on coumarin content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenols content, *Molecules* **22** (2017) 348, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22030348>.
  22. S. Šafranko, I. Ćorković, I. Jerković, M. Jakovljević, K. Aladić, D. Šubarić, S. Jokić, Green extraction techniques for obtaining bioactive compounds from mandarin peel (*Citrus unshiu* var. *Kuno*): Phytochemical analysis and process optimization, *Foods* **10** (2021) 1043, doi: <https://doi.org/10.3390/foods10051043>.
  23. C. Picot-Allain, M. F. Mahomoodally, G. Ak, G. Zengin, Conventional versus green extraction techniques – A comparative perspective, *Curr. Opin. Food Sci.* **40** (2021) 144–156, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
  24. M. Anticono, J. Blesa, A. Frigola, M. J. Esteve, High biological value compounds extraction from citrus waste with non-conventional methods, *Foods* **9** (2020) 811, doi: <https://doi.org/10.3390/foods9060811>.
  25. D. Qin, B. Xiang, X. Zhou, S. Qiu, J. Xi, Microemulsion as solvent for naphthoquinones extraction from walnut (*Juglans mandshurica* Maxim) green husk using high voltage electrical discharge, *Sep. Purif. Technol.* **281** (2022) 119983, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119983>.
  26. N. Boussetta, E. Vorobiev, L. H. Le, A. Cordin-Falcimaigne, J.-L. Lanoisellé, Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds, *LWT* **46** (2012) 127–134, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.016>.
  27. M. Banožić, A. Jozinović, J. Grgić, B. Miličević, S. Jokić, High voltage electric discharge for recovery of chlorogenic acid from tobacco waste, *Sustainability* **13** (2021) 4481, doi: <https://doi.org/10.3390/su13084481>.
  28. S. Jokić, N. Pavlović, A. Jozinović, Đ. Ačkar, J. Babić, D. Šubarić, High-voltage electric discharge extraction of bioactive compounds from the cocoa bean shell, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **33** (2019) 271–280, doi: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1525>.
  29. M. Buniowska, J. Carbonell-Capella, A. Zulueta, A. Frigola, M. J. Esteve, Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant capacity from orange peel after pulsed electric fields and high voltage electrical discharges, *MOJ Food Process. Technol.* **1** (2015) 77–83, doi: <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2015.01.00017>.
  30. A. Kumar, M. Narayani, A. Subanthini, M. Jayakumar, Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels -utilization of fruit waste, *Eng. Sci. Technol. Int. J.* **3** (2011) 5414–5421, doi: <https://doi.org/10.21276/ap.2016.5.2.22>.
  31. J. E. Jeong, S. P. Shim, Y. S. Jeong, H. K. Jung, Y. C. Kim, J. H. Hong, Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Citrus unshiu* peel by response surface methodology, *Korean J. Food Preserv.* **18** (2011) 755–763, doi: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2011.18.5.755>.
  32. H. Y. Park, Y. Park, Y. Lee, S. K. Noh, E. G. Sung, I. Choi, Effect of oral administration of water-soluble extract from citrus peel (*Citrus unshiu*) on suppressing alcohol-induced fatty liver in rats, *Food Chem.* **130** (2012) 598–604, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.081>.
  33. S. S. Liew, W. Y. Ho, S. K. Yeap, S. A. B. Sharifudin, Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of *Citrus sinensis* peel extracts, *Peer J.* **6** (2018) e5331, doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.5331>.
  34. C. M. Galanakis, V. Goulas, S. Tsakona, G. A. Manganaris, V. Gekas, A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents, *Int. J. Food Prop.* **16** (2013) 382–396, doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>.
  35. A. Bogomaz, V. L. Goryachev, A. S. Remmenui, P. G. Rutberg, Efficiency of pulsed electric discharges in water disinfection, *Lett. J. Theor. Phys.* **17** (1991) 65–68.
  36. Y. S. Chen, X. S. Zhang, Y. C. Dai, W. K. Yuan, Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution, *Sep. Purif. Technol.* **34** (2004) 5–12, doi: [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(03\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(03)00169-2).
  37. S. Jokić, S. Šafranko, M. Jakovljević, A.-M. Cikoš, N. Kajić, F. Kolarević, J. Babić, M. Molnar, Sustainable green procedure for extraction of hesperidin from selected Croatian mandarin peels, *Processes* **7** (2019) 469, doi: <https://doi.org/10.3390/pr7070469>.
  38. C. I. Cheigh, E.-Y. Chung, M.-S. Chung, Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water, *J. Food Eng.* **110** (2012) 472–477, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.019>.
  39. J. Wiboonsirikul, S. Adachi, Extraction of functional substances from agricultural products of by-products by subcritical water treatment, *Food Sci. Technol. Res.* **14** (2008) 319–328, doi: <https://doi.org/10.3136/fstr.14.319>.
  40. A. Moubarik, K. El-Belghiti, E. Vorobiev, Kinetic model of solute aqueous extraction from Fennel (*Foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiations, *Food Bioprod. Process.* **89** (2011) 356–361, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.09.002>.
  41. N. Boussetta, E. Vorobiev, V. Deloison, F. Pochez, A. Falcimaigne-Cordin, J. L. Lanoisellé, Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: application of high voltage electrical discharges, *Food Chem.* **128** (2011) 364–370, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>.
  42. X. Zhou, D. Qin, B. Xiang, J. Xi, Cyclodextrin-based liquid-phase pulsed discharge extraction of flavonoids from tangerine (*Citrus reticulata*) pericarp: Optimization, antioxidant activity and storage stability, *Sep. Purif. Technol.* **278** (2022) 119603, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119603>.

43. E. Alexandre, L. M. Castro, S. A. Moreira, M. Pintado, J. A. Saraiva, Comparison of emerging technologies to extract high-added value compounds from fruit residues: Pressure- and electro-based technologies, *Food Eng. Rev.* **9** (2017) 190–212, doi: <https://doi.org/10.1007/s12393-016-9154-2>.
44. W. Bi, M. Tian, K. H. Row, Evaluation of alcohol based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology, *J. Chromatogr. A* **1285** (2013) 22–30, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>.
45. A. Sridhar, M. Ponnuchamy, P. S. Kumar, A Kapoor, D. N Vo, S. Prabhakar, Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review, *Environ. Chem. Lett.* **19** (2021) 3409–3443, doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>.

## EXTENDED SUMMARY

### Intensification of Polyphenols Extraction from Mandarin Peel by High Voltage Electric Discharge: Effect of Process Parameters and Optimisation

Marija Banožić,<sup>a,b\*</sup> Silvija Šafranko,<sup>a</sup> Dora Bogadi,<sup>a</sup> Krunoslav Aladić,<sup>a</sup> and Stela Jokić<sup>a</sup>

The peel of the *Okitsu* variety of mandarin is created as a by-product of the fruit's growth and processing. The primary goal of this research was to use a unique nonthermal extraction method (high-voltage electric discharge assisted) with green solvent (water) to valorise citrus peel as a valuable raw material. In October 2020, samples (citrus peel) were collected from the farm of Mr. Dalibor Ujević (Opuzen, Hrvatska). Samples were washed, freeze-dried, and sieved before extraction.

The effects of extraction process parameters, such as treatment duration (5–15 min), frequency (40–100 Hz), and liquid to solid ratio (200–400 ml g<sup>-1</sup>) on the extraction yield and content of hesperidin and narirutin were studied. Spectrophotometric methods were used to assess the antiradical activity and total phenolic content of the extracts. Individual phenolic components were identified and quantified using HPLC method. The extraction process parameters were optimised with a commercial softer tool (Design Expert<sup>®</sup>) using experimental data gathered using the Box-Behnken experimental design.

Experiments were conducted as shown in Tables 1 and 2. The extraction yield was ranked from 359.23 to 463.20, the total phenol values ranged from 96.23 to 275.46 mg GAE l<sup>-1</sup>, DPPH values ranged from 87.08 to 94.93 %. Total phenol content and antiradical activity decreased with increasing extraction time, as shown in Fig. 1. Six phenolic compounds were identified and quantified, predominated by hesperidin and narirutin (Table 3).

The regression models for all tested HVED extraction responses were significant (p-value under 0.05) based on the acquired data, and the quality of the models produced was evaluated based on the coefficients of determination ( $R^2$ ) and Lack of Fit value. The obtained  $R^2$  values for all models developed were 0.911; 0.844, and 0.845 with a nonsignificant lack of fit, indicating an adequate relationship between input parameters (extraction conditions) and observed variable, in this case, extraction efficiency, hesperidin and narirutin content (Table 4). The obtained data was utilised to create three-dimensional (3D) response surface graphs, as shown in Figs. 2–4. The regression models within this study were predicted by Eqs. (1)–(3). With response surface methodology (RSM), optimal parameters of HVED extraction process were defined, as follows: extraction yield (285.93 ml g<sup>-1</sup>, 73.38 Hz and 14.84 min), hesperidin content (366.19 ml g<sup>-1</sup>, 97.56 Hz, and 5.1 min), and narirutin content (200 ml g<sup>-1</sup>, 70 Hz, and 15 min), as presented in Table 5, together with predicted and experimentally verified values.

#### Keywords

*Citrus peel, phenolic compounds, high-voltage electric discharge, optimisation*

<sup>a</sup> Faculty of Food Technology Osijek,  
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek,  
Ul. Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia

<sup>b</sup> Faculty of Agriculture and Food Technology,  
University of Mostar, 88 000 Mostar, Bosnia  
and Herzegovina

Original scientific paper

Received March 31, 2022

Accepted June 27, 2022