



international conference

18 RUŽIČKA DAYS

TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY

September 16–18, 2020 | Vukovar, Croatia



PROCEEDINGS

ISSN 2671-0668 (Online)

www.ruzickadays.eu

međunarodni znanstveno-stručni skup

18 RUŽIČKINI DANI

DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA

16. – 18. rujna 2020. | Vukovar, Hrvatska



ZBORNİK RADOVA

7. SUSRET MLADIH KEMIČARA

16. rujna 2020., VUKOVAR, HRVATSKA



$$Re = \frac{vdp}{\eta}$$

ZNAŠ ŠTO
BI SE DOGODILO DA
SE SILVER SURFER
I IRON MAN
UJEDINE?

ZNAM....
POSTALI BI
LEGURA!



PROCEEDINGS 	<i>18th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry”</i>
ZBORNİK RADOVA	18. Ružičkini dani “Danas znanost – sutra industrija” <i>Croatian Society of Chemical Engineers (CSCE) Faculty of Food Technology Osijek University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek</i>
Published by Izdavači	Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Editors Urednici	Ante Jukić, Vesna Ocelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić
Executive and Technical Editors Izvršne i tehničke urednice	Vesna Ocelić Bulatović Dajana Kučić Grgić
Text prepared by Tekst pripremili	AUTORI, koji su odgovorni za tekst rada i slike <i>AUTHORS, who are fully responsible for the papers and figures</i>
Cover sheet and layout design Dizajn naslovnice i prijeloma	Zdenko Blažeković
Scientific and Organizing Committee and Reviewers Znanstveno-organizacijski odbor i recenzenti	Ante Jukić (predsjednik/chairman), Jurislav Babić (dopredsjednik/vice-chairman), Vesna Ocelić Bulatović (dopredsjednica/vice- chairman), Dajana Kučić Grgić (tajnica), Ivana Lauš (tajnica), Đurđica Ačkar, Ivan Hubalek, Ljubica Glavaš-Obrovac, Ivanka Miličić, Senka Vidović (Srbija), Marjana Simonič (Slovenija), Miroslav Šlouf (Češka Republika), Zora Pilić (Bosna i Hercegovina)
Honorary Committee Počasni odbor	Damir Boras, Božo Galić, Vlado Guberac, Marin Hraste, Zvonimir Janović, Vesna Jurić Bulatović, Leo Klasinc, Filip Kljajić, Ruža Marić, Ivan Penava, Vlasta Piližota, Drago Šubarić, Vitomir Šunjić, Srećko Tomas, Nenad Trinajstić

Zagreb i Osijek, 2021.

Acknowledgement to reviewers

The Editors of the *Proceedings of the 18th Ružička days* extend their deepest gratitude to the following manuscript reviewers who maintained the professional standards of our *Proceedings of the 18th Ružička days*:

Jurislav Babić, Mara Banović, Drago Bešlo, Ivan Brnardić, Matija Cvetnić, Lara Čižmek, Matko Erceg, Maja Ergović-Ravančić, Maja Fabulić Ruszkowski, Ivana Flanjak, Ivana Grčić, Graciela Granados-Guzmán, Mirna Habuda-Stanić, Miće Jakić, Antun Jozinović, Marijana Kraljić Roković, Dajana Kučić Grgić, Nenad Kuzmanić, Sanja Lučić Blagojević, Petra Matić, Borislav Miličević, Maja Molnar, Ivan Nemet, Ivona Nuić, Vesna Ocelić Bulatović, Tomislav Penović, Zora Pilić, Ivana Plazonić, Jelena Popović-Đorđević, Ivana Radojčić Redovniković, Kristina Radošević, Tonči Rezić, Rosana Ribić, Nikola Sakač, Martina Skendrović Babojelić, Ivica Strelec, Brankica Svitlica, Anita Štrkalj, Zrinka Buhin Šturlić, Nada Vahčić, Sandra Voća, Marina Tišma, Dragan Z. Troter, Marina Zekić, Mark Žic

All pieces of information provided in this PROCEEDINGS are the sole responsibility of the authors of the manuscripts. Publishers are not responsible for any use that might be made of the data appearing in this document. Also, publishers shall not be liable for any errors, language mistakes and the like, that are found in the works of authors. The Proceedings has not been proofread by a professional proofreader.

Sadržaj radova u ovom ZBORNIKU RADOVA isključiva je odgovornost autora. Izdavač nije odgovoran za upotrebu podataka objavljenih u radovima, pogreške i sl.

Pokrovitelj	Under the Auspice of:	
Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti Razred za matematičke, fizičke i kemijske znanosti	<i>Croatian Academy of Science and Arts</i> <i>Department of Mathematical, Physical and Chemical Science</i>	
Uz potporu	Supported by:	
Ministarstvo znanosti i obrazovanja RH	<i>Ministry of Science and Education of the Republic of Croatia</i>	
Ministarstvo poljoprivrede	<i>Ministry of Agriculture</i>	
Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja	<i>Ministry of Economy and Sustainable Development</i>	
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku	<i>Josip Juraj Strossmayer University of Osijek</i>	
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu	<i>Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb</i>	
Sveučilište u Zagrebu	<i>University of Zagreb</i>	
Grad Vukovar	<i>City of Vukovar</i>	
Hrvatski dom Vukovar	<i>Public Institution in Culture Hrvatski dom Vukovar</i>	
Veleučilište Lavoslav Ružička u Vukovaru	<i>Polytechnic Lavoslav Ružička in Vukovar</i>	

Dear colleagues,



we are extremely honoured to present to You the sixth issue of proceedings of the International Scientific Conference 18th Ružička Days which was successfully held in September 2020 in Vukovar, despite the challenges posed by the ongoing pandemic. Ružička's days are held in memory of prominent scientist and first Nobel laureate from Croatia: Leopold (Lavoslav) Ružička.

From the very beginning, the main goal of the Conference was to promote excellence in scientific and professional researches with an emphasis on the latest scientific results and professional achievements. In addition, the Conference promotes cooperation between universities, institutes and the economy. With that in mind, we started to publish the Conference proceedings. This collection of papers include scientific, technological, and practical aspects related to research and development, as well as to the application of modern technological achievements in industry, emphasizing thus the recognizable slogan of the Ružička Days: "Today Science-Tomorrow Industry".

The papers in the Proceedings are divided into sections: Chemical Analysis and Synthesis (2), Chemical and Biochemical Engineering (6), Food Technology and Biotechnology (7), Medical Chemistry and Pharmacy (3), Chemistry in agriculture and Forestry (1), Environmental Protection (7), and Meeting of Young Chemists (4). Full length papers were subjected to international review procedure done by eminent experts from the corresponding fields, but were not subjected to linguistic proof reading.

The organizers of the Conference would like to thank all the authors and participants of the 18th Ružička days, especially the international organizers EuCheMS, EFFoST and EHEDG, members of the Scientific and Organizing committee, plenary and invited lecturers, reviewers, sponsors, auspices, media sponsor, and all those who in any way supported the 18th Ružička Days and contributed to the preparation of this Proceedings.

We welcome You until the next Ružička Days! Enjoy the extremely interesting scientific papers contained in these Proceedings!

We are looking forward to meeting You again in Vukovar in 2022.

Ante Jukić

Vesna Ocelić Bulatović

Dajana Kučić Grgić

Sekcija: Kemijska analiza i sinteza**Topic: Chemical analysis and synthesis****Roko Blažić, Elvira Vidović**

Sinteza 1,2,3-triazolnog derivata benzofenona klik kemijom

Synthesis of 1,2,3-triazole derivate of benzophenone by click chemistry1-10**Filipa Mrčela, Ivana Smoljko, Rolando C. S. Dias, Catarina Gomes**

Molekulski tiskani polimeri za određivanje galne kiseline

Molecularly imprinted polymers for determination of gallic acid11-18**Sekcija: Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo****Topic: Chemical and biochemical engineering****Marina Duplančić, Vanja Gilja, Ivana Elizabeta Zelić, Vesna Tomašić**Funkcionalizirani TiO₂ za fotokatalitičku razgradnju neonikotinoidnih insekticida*Functionalized TiO₂ for photocatalytic degradation of neonicotinoid insecticides*19-32**Miće Jakić, Sanja Perinović Jozić, Tina Slatina, Mihaela Storić**

Priprema i karakterizacija mješavina biorazgradljive polilaktidne kiseline s poli(etilen-oksidom)

Preparation and characterization of biodegradable polylactid acid and poly(ethylene oxide) blends33-45**Katarina Jozinović, Aleksandra Sander, Gordana Vrbanec**

Utjecaj procesnih parametara na kinetiku sušenja i morfologiju djelatne tvari

Influence of process parameters on drying kinetics and the morphology of active pharmaceutical ingredient46-59**Vanja Kosar, Ante Koštić, Marija Lukić**

Primjena IC termografije pri umreženju polimera u modelnim kalupima

Application of an IC thermography in polymer crosslinking in model moldings60-72**Marija Lukić, Domagoj Vrsaljko**

Utjecaj broja pregrada u milireaktoru na intenzifikaciju procesa

Influence of number of baffles in millireactor on process intensification73-82**Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum**

Primjena niskotemperaturnog eutektičkog otapala u pročišćavanju modelnog FCC benzina

Application of deep eutectic solvent for FCC gasoline purification83-93

Kristina Zagajski Kučan, Luka Vlašić, Marko Rogošić

Ekstrakcijsko pročišćavanje benzina primjenom niskotemperaturnih eutektičnih otapala modificiranih cinkovim kloridom

Extractive purification of gasoline using deep eutectic solvents modified with zinc chloride.....

S93-S102

Sekcija: Prehrambena tehnologija i biotehnologija

Topic: Food technology and biotechnology

Jozo Ištuk, Lidija Jakobek, Ivica Strelec

Inhibicija α -glukozidaze polifenolima prisutnim u tradicionalnim sortama jabuka

Inhibition of α -glucosidase by polyphenols present in traditional apples varieties.....

94-103

Branka Levaj, Ana Ljubas, Zrinka Čošić, Zdenka Pelaić, Filip Dujmić, Maja Repajić

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na kvalitetu i trajnost „fresh-cut“ krumpira

Effect of the high hydrostatic pressure on the quality and

shelf-life of fresh-cut potato

104-115

Valentina Obradović, Josip Mesić, Maja Ergović Ravančić, Brankica Svitlica,

Helena Marčetić, Svjetlana Škrabal

Utjecaj termina berbe i kvasaca na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva vina Graševina

Influence of harvest date and yeast strains on physical, chemical and

organoleptic properties of Graševina wine

116-124

Danijela Šeremet, Ana Mandura, Aleksandra Vojvodić Cebin, Stela Jokić,

Draženka Komes

Utjecaj konvencionalnih i inovativnih metoda ekstrakcije na bioaktivne karakteristike dobričice (*Glechoma hederacea* L.)

*Influence of conventional and innovative extraction techniques on bioactive properties of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.)*

125-131

Danijela Šeremet, Ana Mandura, Aleksandra Vojvodić Cebin, Stela Jokić,

Draženka Komes

Razvoj i karakterizacija liposoma ispunjenih dopaminom ekstrahiranim iz kore banane

Development and characterization of dopamine-loaded liposomes

extracted from banana peel

132-140

Darko Velić, Valentina Bušić, Bruno Husnjak, Natalija Velić, Daniela Amidžić Klarić,

Vlatka Petravić Tominac, Ilija Klarić

Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od kruške

Fermentation process optimisation and characterisation of pear fruit wine

141-148

Stanko Zrinščak, Valentina Obradović, Josip Mesić, Ana Mrgan
 Finalizacija vina Merlot i Cabernet Sauvignon pomoću enoloških drvenih pripravaka
Finalization wine Merlot and Cabernet Sauvignon with different enological wooden material149-156

Sekcija: Medicinska kemija i farmacija
Topic: Medical chemistry and pharmacy

Irena Landeka Jurčević, Irena Crnić, Tajana Frančić, Petar Dragičević, Verica Dragović-Uzelac, Domagoj Đikić
 Razine nastalih produkata oksidacijskih proteina kao biljeg oksidacijskog stresa kod miševa s hiperglikemijom
Advanced oxidation protein product levels as a marker of oxidative stress in mice with hyperglycemia157-166

Irena Landeka Jurčević, Valentina Vučinić, Mandica-Tamara Tolić, Petar Dragičević, Domagoj Đikić
 Hepatoprotektivni učinak *Aronia melanocarpa* u C57BL/6 miša
Hepatoprotective effect of Aronia melanocarpa in C57BL/6 mice167-177

Vesna Rastija, Domagoj Šubarić, Maja Karnaš, Vijay H. Masand
 Derivati peptida kao inhibitori SARS-CoV-2-S proteina: Studija molekularnog pristajanja
Peptide Derivatives as Inhibitors of SARS-CoV-2-S Protein: Molecular docking study.....178-185

Sekcija: Kemija u poljoprivredi i šumarstvu
Topic: Chemistry in agriculture and forestry

Vibor Roje, Darko Grba
 Ekstrakcija metala i metaloida iz uzoraka tla razrijeđenim kiselinama
Extraction of metals and metalloids from soil samples by using diluted acids186-196

Sekcija: Zaštita okoliša
Topic: Environmental protection

Dijana Grgas, Fran Andrašec, Sanja Radman, Mirna Habuda-Stanić, Tea Štefanac, Tibela Landeka Dragičević
 Učinkovitost uklanjanja P u anoksičnom uvjetu uz NO₃-N kao akceptor elektrona
P removal efficiency under anoxic condition with NO₃-N as electron acceptor197-206

Igor Jajčinović, Don Vito Lukšić, Kristina Tolić, Ivan Brnardić, Tamara Holjevac Grgurić
 Utjecaj grafen oksida na fotokatalitička svojstva titan(IV) oksida
Influence of graphene oxide on photocatalytic properties of titan(IV) oxide207-213

Dajana Kučić Grgić, Martina Miloloža, Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić, Vesna Očelić Bulatović, Kristina Bule, Marija Sigurnjak Bureš, Viktorija Prevarić, Matija Cvetnić, Šime Ukić, Marinko Markić, Tomislav Bolanča
Biorazgradnja LDPE i PS mikroplastike mješovitom bakterijskom kulturom
Bacillus sp. i *Pseudomonas alcaligenes*
Biodegradation of LDPE- and PS- microplastics by mixed bacterial culture of Bacillus sp. and Pseudomonas alcaligenes214-227

Ivan Mikac, Tea Štefanac, Dijana Grgas, Sanja Radman, Mirna Habuda-Stanić, Tibela Landeka Dragičević
Statičko/anoksična konfiguracija procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona
Static/anoxic configuration of denitrifying dephosphatation process with NO₂-N and NO₃-N as electron acceptors228-234

Vesna Očelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić, Martina Miloloža
Međupovršinski fenomen u materijalu
Interfacial phenomena in material235-247

Monika Šabić Runjavec, Sanja Ivanušić, Marin Ganjto, Marija Vuković Domanovac
Antropogeni utjecaj na dinamiku organskog opterećenja u komunalnim otpadnim vodama
Anthropogenic impact on the organic load dynamics of municipal wastewater248-256

Marin Ugrina, Teja Čeru, Ivona Nuić, Marina Trgo, Petra Prnjak, Martin Gaberšek, Miloš Miler, Mateja Gosar
Usporedno istraživanje uklanjanja žive(II) na prirodnom i željezo-modificiranom zeolitu
Comparative study of mercury(II) removal onto natural and iron-modified zeolite257-265

7. Susret mladih kemičara *7th Meeting of Young Chemists*

Andrea Bilušковиć, Đurđevka Pecikozić
Utjecaj otpadne vode na onečišćenje Dunava
The impact of wastewater on Danube pollution266-275

Nikolina Grlić, Nikolina Pravdić, Matea Jukić, Marko Tomas
Kemijska analiza tala na području općine Žepče (Bosna i Hercegovina)
Chemical analysis of soil in the municipality of Žepče (Bosnia and Herzegovina)276-287

Sandra Jozinović, Zoran Jurić, Ivona Pranjić, Slavica Jukić
Ispitivanje kvalitete paste za zube od zelene gline
Testing the quality of green clay toothpaste288-295

Kristina Nikolić, Đurđevka Pecikozić

Uzorkovanje i analiza bunarskih voda

Sampling and analysis of well waters296-303**Kazalo autora***Author index*304**Sponzori, donatori i izlagači***Sponsors, donors and exhibitors*306

1

Sekcija: KEMIJSKA ANALIZA I SINTEZA

**Topic: CHEMICAL ANALYSIS AND
SYNTHESIS**



Sinteza 1,2,3-triazolnog derivata benzofenona klik kemijom

Roko Blažić*, Elvira Vidović

*Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR – 10 000 Zagreb*

**Dopisni autor: rblazic@fkit.hr*

Sažetak

Molekulna hibridizacija pomoću poznatih farmakofora novi je pristup sintezi biološki aktivnih spojeva. Jedan od poznatih farmakofora je benzofenon. Derivati benzofenona javljaju se u prirodi i specifični su za porodicu biljaka kluzijevki (*Clusiaceae*), a pokazuju biološku aktivnost (antibakterijska svojstva, anti-HIV aktivnost, protuupalno djelovanje, inhibiciju rasta stanica karcinoma). Biološka aktivnost je utvrđena i kod sintetskih derivata benzofenona. Primjerice, ketoprofen dostupan je na tržištu kao protuupalni lijek. Također, poznati farmakofor je 1,2,3-triazolna skupina. Otporna je na metaboličku degradaciju, omogućava stvaranje vodikovih veza i poboljšava vezanje pripadajuće molekule na biološke mete. U ovom radu provedena je sinteza 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenona iz 4-azidobenzofenona i propagil alkohola uz primjenu Cu^+ ili Cu^{2+} soli kao katalizatora. Uz reakcijama uz Cu^{2+} uspješno je sintetiziran 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenon, a iskorištenje reakcije je 21-70 %.

Ključne riječi: derivati benzofenona, 1,2,3-triazol, klik kemija

Uvod

Molekulna hibridizacija strategija je razvoja novog spoja na temelju prepoznavanja farmakofornih jedinica dva ili više biološki aktivna spoja te njihovim adekvatnim spajanjem u novu molekulu pri čemu iskorištavaju funkcionalna svojstva svakog pojedinog farmakofora (Bahia i sur. 2016). Benzofenon i 1,2,3-triazol široko su istraživani farmakofori. Derivati benzofenona javljaju se u prirodi i specifični su za porodicu biljaka kluzijevki (*Clusiaceae*). Pokazuju široki spektar biološke aktivnosti od antibakterijskih svojstava, anti-HIV aktivnosti, protuupalnog djelovanja do inhibicije rasta stanica karcinoma. Biološka aktivnost također je utvrđena i kod sintetskih derivata benzofenona, a na tržištu je dostupno nekoliko lijekova čije su aktivne tvari derivati benzofenona, primjerice to su ketoprofen, tolkapon, sulisobenzon (Suran i sur. 2018). 1,2,3-Triazolna skupina važna je skupina pri razvoju učinkovitih antimikrobnih molekula. Otporna je na metaboličku degradaciju, omogućava stvaranje vodikovih veza što uz jaki dipolni moment omogućava učinkovitije vezanje molekule na ciljane biološke supstrate.

Reakcija cikloadicije azida i alkina katalizirana bakrom osnovni je primjer reakcije klik kemije u kojoj dolazi do regioselektivnog nastajanja 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola pri čemu se za sintezu kao katalizatori koriste soli Cu^+ i Cu^{2+} (Tireli M. i sur. 2017).

Kumari B. i suradnici (Kumari i sur. 2017) reakcijom cikloadicije azida i alkina sintetizirali su niz hibrida 1,2,3-triazol etodolaka. Reakciju klik kemije provodili su uz katalitički sustav $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i askorbinska kiselina.

U sustavu otapala *tert*-butanol i voda (1:1 vol. %) produkt je nastao tek u tragovima. U nastavku istraživanja ispitali su niz kootapala (dimetilsulfoksid (DMSO), dimetilformamid (DMF), tetrahidrofuran (THF), diklormetan (DCM), acetonitril) uz vodu. Najveće iskorištenje zabilježeno je u sustavu otapala DCM:voda (1:1 vol. %). Isti katalitički sustav korišten je i pri sintezi antitumorne molekule s 1,2,3-triazolnom skupinom, a reakcija je provedena u otapalu DMF:H₂O (1:1 vol. %). Antitumorne molekule s 1,2,3-triazolnom skupinom uspješno su sintetizirane ali je iskorištenje reakcije bilo 16-20 % (Gregorić i sur. 2017). Prilikom sinteze medicinski važnih 1,2,3-triazolnih derivata kinazolina kao katalizator korišten je CuSO₄·5H₂O, ali prilikom sinteze nije korišteno redukcijsko sredstvo kako bi se bakar preveo u Cu⁺ stanje već je u reakciji direktno korišten Cu²⁺. Dodatno, uz CuSO₄·5H₂O kao izvor bakra, dodana je baza trietilamin. Uz navedeni katalitički sustav 1,2,3-triazolni derivati kinazolina sintetizirani su u gotovo kvantitativnom iskorištenju dok sinteza nije bila uspješna upotrebom CuSO₄·5H₂O i askorbinske kiseline neovisno o korištenom otapalu (THF, DMF, THF/voda, acetonitril) (Vashist i sur. 2014). U sinteza derivata 1,2,3-triazol–kinolina također je korišten Cu²⁺, pri čemu je izvor bakra bio bakar (II) acetat. Reakcija je provedena u metanolu pri 60 °C, a derivati 1,2,3-triazol–kinolina sintetizirani su s iskorištenjem 21 – 89 %. Na iskorištenje znatno je utjecala vrsta korištenog fenil azida. Tako je kod *p*-supstituiranih fenil azida zabilježeno iskorištenje 76-89 %, dok je za sam fenil azid zabilježeno najniže iskorištenje (21 %) (Tireli i sur. 2017).

Osim u sintezi biološki aktivnih molekula, reakcija klik kemije koristi se i u modifikaciji polimerinih molekula. Modifikacija krajeva polistirena s 1,2,3-triazolnom skupinom provedena je u THF-u pri čemu je kao katalizator korišten bakar (I) bromid s derivatom biperidina kao ligandom koji omogućuje topljivost Cu⁺ u organskom otapalu (Lutz i sur. 2005). Iz ovog kratkog pregleda literature vidljivo je da je za uspješnost reakcije klik kemije važno pronaći odgovarajući katalitički sustav te otapala kako bi se uspješno provela reakcija i iskoristile njene prednosti. Aril azidi predstavljaju važnu grupu spojeva koja ima primjenu kao intermedijeri u organskoj sintezi izocijanata, peptida i heterocikličkih spojeva poput 1,2,3-triazola. Na reaktivnost aril azida u reakcijama klik kemije značajno utječu supstituenti. Yoshida i suradnici (Yoshida i sur. 2011) istraživali su reakcije sterički ometanih aril azida u reakciji klik kemije. Suprotno očekivanju, uočeno je da dolazi do veće reaktivnosti kod azidne skupine koja se nalazi u okruženju supstituenata koji sterički ometaju dostupnost azidne skupine za reakciju. Utvrđeno je da je veća reaktivnost posljedica utjecaja supstituenata na konjugaciju azidne skupine s aromatskim prstenom.

U ovom radu istraživana je reakcija 4-aminobenzofenona s propagil alkoholom kako bi se utvrdio najpogodniji katalitički sustav i otapalo za sintezu 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenona (1).

Materijali i metode

Materijali

U ovom radu korišteni su tetrahidrofuran (Fisher Chemical), diklormetan (Carlo Erba), etil-acetat (Kemika), bakar (II) acetat (Kemika), propagil alkohol (Acros Organic). Kemikalije su korištene bez daljnjeg pročišćavanja. Azidobenzofenon sintetiziran je prema proceduri iz literature (Han i sur. 2013).

Sinteza

Metoda 1

U otopinu propagil alkohola (1 eq) u DMF-u dodan je 4-azidobenzofenon (2,1 eq). Potom je u otopinu reaktanata dodan 1 mL otopine natrijeva askorbata (0,3 eq) i 1 mL otopine $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,03 eq). Reakcija je provedena preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa ulivena je u deioniziranu vodu pri čemu je došlo do precipitacije nastalog produkta. Ekstrakcija produkta provedena je pomoću etil-acetata.

Metoda 2

4-azidobenzofenon (1 eq) i propagil alkohol (1 eq) otopljeni su u metanolu (8 mL). U otopinu reaktanata dodana je odvagana količina $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (0,05 eq). Reakcijska smjesa je zagrijana na 60 °C te je reakcija provedena preko noći. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je ulivena u deioniziranu vodu pri čemu je došlo do precipitacije nastalog produkta. Ekstrakcija produkta provedena je pomoću etil-acetata. Pročišćavanje uzoraka provedeno je kolonskom kromatografijom s otapalom diklormetan (DCM)/etil-acetat (1:1 vol. %).

Metoda 3

U prethodno pripremljenu otopinu propagil alkohola (1 eq) u THF-u dodan je $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (15 mol. %) i trietilamin (TEA) (1,2 eq). Tako pripremljena smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi 15 min. Nakon 15 min u smjesu propagil alkohola dodana je otopina 4-azidobenzofenona (1 eq). Reakcija je provedena preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je ulivena u deioniziranu vodu pri čemu je došlo do precipitacije nastalog produkta. Ekstrakcija produkta provedena je pomoću etil-acetata. Pročišćavanje uzoraka provedeno je kolonskom kromatografijom s otapalom diklormetan (DCM)/etil-acetat (1:1 vol. %).

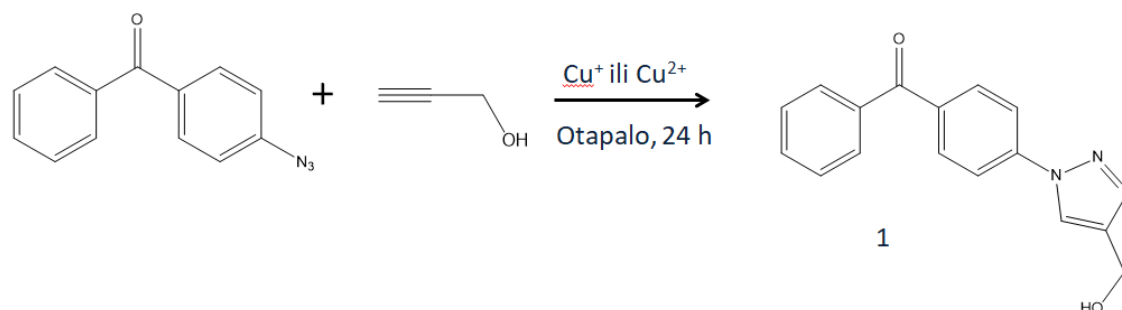
Karakterizacija produkata provedena je infracrvenom spektroskopijom (FTIR) na uređaju Perkin Elmer Spectrum One. Spektri su snimljeni u području od 4000 do 650 cm^{-1} uz rezuluciju 4 cm^{-1} .

Kako bi se odredila struktura spoja nuklearnom magnetskom rezonancom snimljeni su ^1H -NMR spektri na uređaju Bruker Avance 300 MHz. Snimanje je provedeno u diklormetanu- d_2 pri 300 MHz, a kemijski pomaci ^1H određeni su prema otapalu δ 5,32 ppm.

Rezultati i rasprava

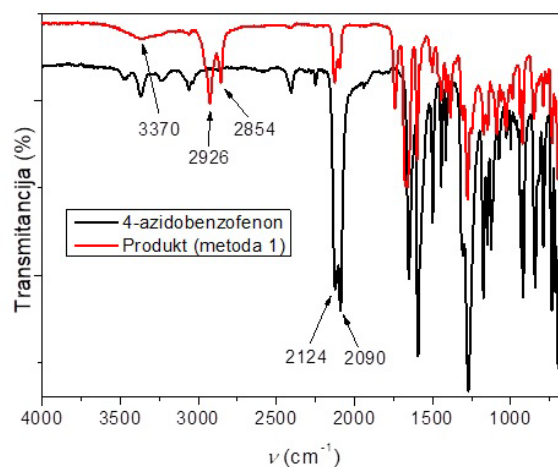
U literaturi je dostupan niz metoda sinteze 1,2,3-triazola pri čemu se kao katalizator koristi bakar (Cu , Cu^+ ili Cu^{2+}), slika 1. Izbor otapala određen je topljivosti reaktanata i katalizatora u pojedinom otapalu što onemogućava primjenu univezalnog sustava katalizator/otapalo.

U ovom radu sinteza spoja 1 provedena je na tri načina kako bi se utvrdila najpogodnija metoda za sintezu. Najprije je provedena sinteza u DMF/ H_2O s $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i askorbinskom kiselinom s obzirom na to da se navedeni sustav vrlo često koristi prilikom sinteze 1,2,3-triazola. Nadalje, ispitani su sustavi kod kojih se direktno koristi Cu^{2+} kako katalizator.

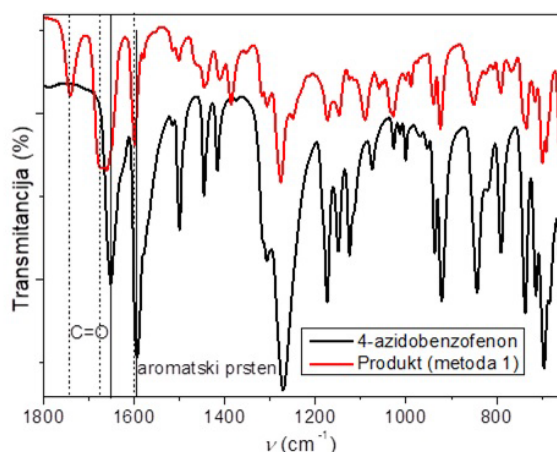


Slika 1. Shematski prikaz reakcije klik kemije 4-azidobenzofenona i propagil alkohola
Figure 1. Schematic representation of click chemistry reaction of 4-azidobenzophenone and propargyl alcohol

Nakon svake reakcije provedeno je pročišćavanje reakcijske smjese te su nastali produkti karakterizirani infracrvenom spektroskopijom i NMR-om. Iskorištenje reakcije određeno je nakon pročišćavanja reakcijske smjese. Na slikama 2 - 7 prikazani su infracrveni spektri produkata dobivenih sintezom prema metodi 1-3. Karakteristična vrpca azidne skupine 4-azidobenzofenona nalazi se pri 2124 i 2091 cm^{-1} dok se karakteristična vrpca alkina nalazi pri 2100 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{C}$) i oštra vrpca pri 3320 cm^{-1} (vibracija $\equiv\text{C-H}$). Izostanak karakterističnih vrpca za azidnu i alkinsku skupinu u infracrvenom spektru dobivenog produkta ukazuje na utrošak azida i alkina tijekom reakcije. Reakcijsku smjesu dobivenu metodom 1 nije bilo moguće pročitati kolonskom kromatografijom s obzirom na to da komponente koje se nalaze u reakcijskoj smjesi imaju bliske R_f vrijednosti. S obzirom na to karakterizacija infracrvenom spektroskopijom provedena je na nepročišćenom uzorku. Iz infracrvenog spektra produkta 1 vidljive su vrpce karakteristične za azidnu skupinu što ukazuje da se tijekom vremena trajanja nije utrošio sav aril azid. U području vibracija karbonilne skupine derivata benzofenona pojavljuju se dvije vrpce: jedna pri 1661 cm^{-1} i druga pri 1675 cm^{-1} . Dodatno se pojavljuje vrpca pri 1741 cm^{-1} koja se nalazi u području vibracija karbonilne skupine esterskih spojeva. Kod viših valnih brojeva ističu se vrpce pri 2923 i 2854 cm^{-1} koje se mogu pripisati vibracijama CH_2 skupine. Široka vrpca pri oko 3370 cm^{-1} može se pripisati vibracijama OH skupine. S obzirom da je iz infracrvenog spektra vidljivo da kod metode 1 ne dolazi do potpunog utroška azida, te su prisutne vrpce koje upućuju na prisutnost nekih novih komponenata u sustavu (vrpca pri 1741 te intenzivne vrpce pri 2923, 2854 cm^{-1}) produkt 1 nije dalje karakteriziran NMR spektroskopijom. U nastavku rada pristupilo se sintezi spoja 1 metodom 2 i 3.



Slika 2. Infracrveni spektar azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 1
Figure 2. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 1

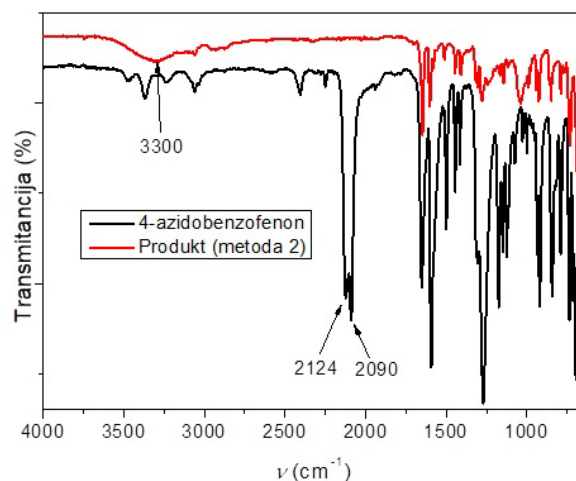


Slika 3. Infracrveni spektar azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 1 (uvećani spektar)

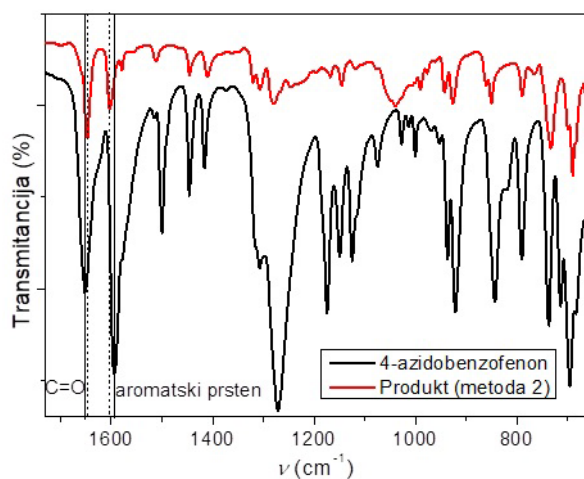
Figure 3. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 1 (magnified spectrum)

Na infracrvenom spektru produkta dobivenog metodom 2 (slika 4) nisu vidljive karakteristične vrpce koje se pripisuju azidnoj i alkinskoj skupini što ukazuje da dolazi do utroška azida i alkina prilikom reakcije. Vrpca pri 1647 cm^{-1} pripisuje se vibracijama karbonilne skupine 4-azidobenzofenona. Nakon reakcije vidljiv je pomak te vrpce na 1651 cm^{-1} kod produkta dobivenog metodom 2. Nadalje, vidljiv je pomak vrpce koje se pripisuju vibracijama benzenskog prstena, pomak vrpce s 1599 na 1603 cm^{-1} . Izostanak karakteristične vrpce za azidnu skupinu i pomak navedenih vrpce u produktu dobivenom metodom 2 u odnosu na početni 4-azidobenzofenon ukazuju da je došlo do reakcije na benzenskom prstenu 4-azidobenzofenona. Dodatno, prisutnost široke vrpce pri 3300 cm^{-1} može se pripisati vibracijama OH skupine što dodatno ukazuje da je došlo do ugradnje početnog propagil alkohola u novi produkt.

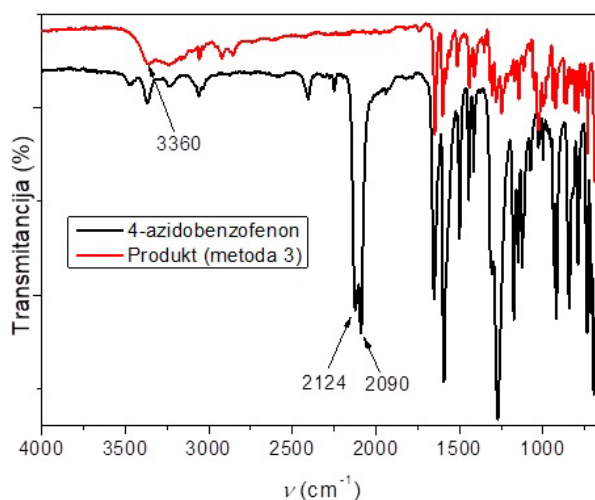
Jednako kao i kod metode 2, kod produkta dobivenog metodom 3 nisu vidljive karakteristične vrpce za azidnu i alkinsku skupinu u infracrvenom spektru (slike 7 i 8). Jednako tako vidljive su promjene na vrpcaima koje se pripisuju vibracijama C=O skupine i aromatskog prstena. Također, vidljiva je i široka vrpca pri oko 3300 cm^{-1} koja se pripisuje vibracijama OH skupine, što također ukazuje na uspješnost reakcije i nastajanja triazolnog prstena.



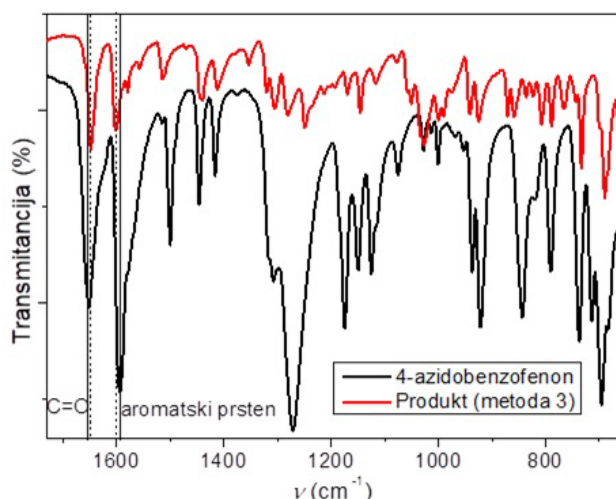
Slika 4. Infracrveni spektar azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 2
Figure 4. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 2



Slika 5. Infracrveni spektar azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 2 (uvećani spektar)
Figure 5. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 2 (magnified spectrum)



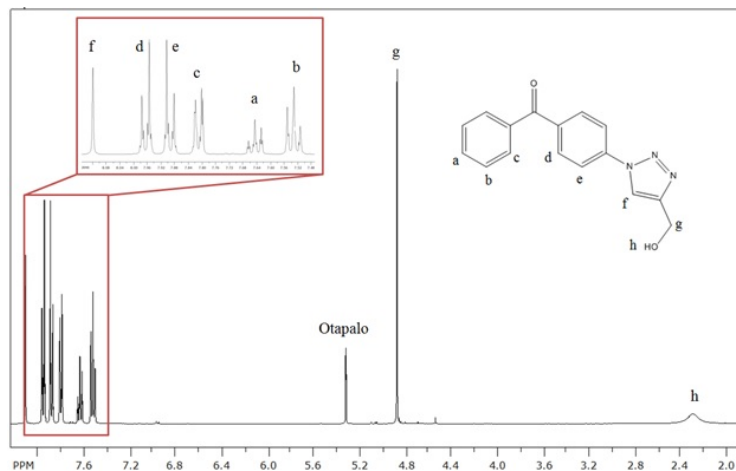
Slika 6. Infracrveni spektar azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 3
Figure 6. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 3



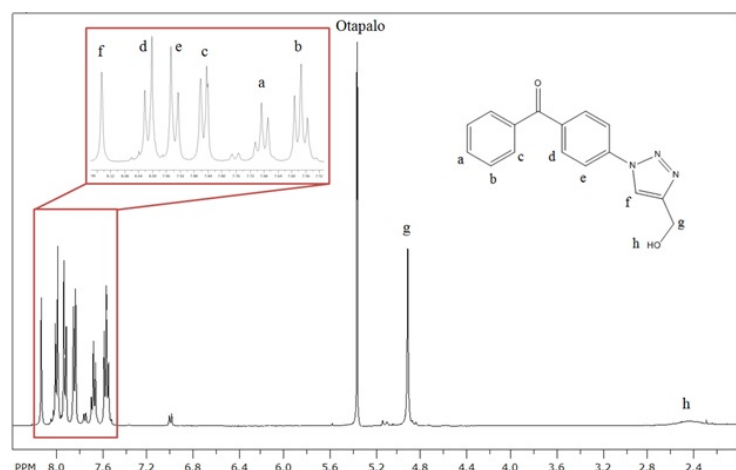
Slika 7. Infracrveni spektar 4-azidobenzofenona i produkta dobivenog metodom 3 (uvećani spektar)

Figure 7. Infrared spectrum of the 4-azidobenzofenone and the product obtained by method 3 (magnified spectrum)

Daljnja karakterizacija produkata dobivenih sintezom prema metodi 2 i 3 provedena je NMR-om. Na slikama 8 i 9 prikazani su $^1\text{H-NMR}$ spektri produkata. Asignacija signala provedena je na temelju kemijskog pomaka, intenziteta pojedinog signala (površine signala), multiplentnosti signala i H-H konstanti sprege. Iz literature je poznato da se u području kemijskih pomaka oko 7,26 nalaze signali protona derivata benzena (Pretsch i sur. 1982). Asignacijom signala utvrđeno je da su produkti koji su izolirani iz reakcijske smjese dobivene metodom 2 i metodom 3 željeni 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenon.



Slika 8. NMR spektar produkta dobivenog metodom 2
Figure 8. NMR spectra of the product obtained by method 2



Slika 9. NMR spektar produkta dobivenog metodom 3
Figure 9. NMR spectra of the product obtained by method 3

U tablici 1 prikazano je iskorištenje reakcije klik kemije ovisno o metodi sinteze. Veće iskorištenje reakcije zabilježeno je kod metode 3 u kojoj je kao katalizator korišten Cu^{2+} , a reakcija je provođena u metanolu.

Tablica 1. Iskorištenje reakcije sinteze 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenona ovisno o metodi sinteze

Table 1. Yield of the synthesis reaction of 4-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzophenone depending on the synthesis methodes

Metoda	Iskorištenje / %
2	21
3	70

Uspješnost metoda 3 te iskorištenje reakcije u skladu je s literaturom s obzirom na to da je ovom metodom uspješno provedena reakcija sinteze 1,2,3-triazol–kinolina kod koje je su korišteni aril azidi.

Zaključci

U radu su ispitane tri metode sinteze 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenona reakcijom klik kemije. Sinteza s $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ u otapalu DMF/ H_2O nije se pokazala uspješnom s obzirom na to da nije došlo do utroška azida prilikom reakcije te nije bilo moguće razdvajanje nastalih produkata. Uspješna sinteza 4-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzofenona provedena je metodama 2 i 3 kod kojih je korišten Cu^{2+} kao katalizator. Kod navedenih metoda došlo je do utroška azida prilikom reakcije. Nadalje, infracrvenom spektroskopijom utvrđeno je da je došlo do promjene položaja vrpce karbonilne skupine i vibracija benzenskog prstena, te nastali supstituent početno sadrži OH skupinu što ukazuje na nastajanje željenog 1,2,3-triazol derivata benzofenona. Struktura nastalog spoja potvrđena je NMR-om. Usporedbom konverzije metoda 2 i 3 može se zaključiti da je metoda 3 prikladnija za reakciju klik kemije 4-azidobenzofenona i propagil alkohola.

Literatura

- Bahia S. B. B.B., Reis W. J., Jardim G. A. M., Souto F. T., de Simone C. A., Gatto C. C., Menna-Barreto R. F. S., de Castro S. L., Cavalcanti B. C., Pessoa C., Araujo M. H., da Silva Júnior E. N. (2016): Molecular hybridization as a powerful tool towards multitarget quinoidal systems: synthesis, trypanocidal and antitumor activities of naphthoquinone-based 5-iodo-1,4-disubstituted-, 1,4- and 1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles, *Med. Chem. Commun.* 7, 1555-1563.
- Gregorić T., Sedić M., Grbčić P., Tomljenović Paravić A., Kraljević Pavelić S., Cetina M., Vianello R., Raić-Malić S. (2017): Novel pyrimidine-2,4-dione–1,2,3-triazole and furo[2,3-d]pyrimidine-2-one–1,2,3-triazole hybrids as potential anti-cancer agents: synthesis, computational and X-ray analysis and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 125, 1247-1267.
- Han J., Engler A., Qi J., Tung C. H. (2013): Ultra Pseudo-Stokes Shift Near Infrared Dyes Based on Energy Transfer, *Tetrahedron Lett.* 54, 502-505.
- Kummari B., Polkam N., Ramesh P., Anantaraju H., Yogeewari P., Anireddy J. S., Guggilapud S. D., Nagendra Babud B. (2017): Design and synthesis of 1,2,3-triazole–etodolac hybrids as potent anticancer molecules, *RSC Adv.* 7, 23680-23686.
- Lutz J. F., Borner H. G., Weichenhan K. (2005): Combining Atom Transfer Radical Polymerization and Click Chemistry: A Versatile Method for the Preparation of End-Functional Polymers, *Macromol. Rapid Commun.* 26, 514–518.
- Pretsch E., Seibl J., Simon W., Clerc T. (1982): Tablice za određivanje strukture organskih spojeva spektroskopskim metodama, *SKTH/Kem. ind.*, Zagreb.

- Surana K., Chaudhary B., Diwaker M., Sharma S. (2018): Benzophenone: a ubiquitous scaffold in medicinal chemistry, *Med. Chem. Commun.* 9, 1803-1817.
- Tireli M., Maračić S., Lukin S. Juribašić Kulcsár M., Žilić D., Cetina M., Halasz I., Raić-Malić S., Užarević K. (2017): Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of N-heterocyclic hybrids based on quinoline and 1,2,3-triazole, *Beilstein J. Org. Chem.* 13, 2352–2363.
- Vashist M., Kushwaha K., Kaushik R., Jain S. C. (2014): Synthesis of medicinally important quinazolines decorated with 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles using $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Et₃N catalytic system, *RSC Adv.* 4, 23679-23684.
- Yoshida, S., Shiraishi, A., Kanno, K. Matsushita T., Johmoto K., Uekusa H, Hosoya T. (2011): Enhanced clickability of doubly sterically-hindered aryl azides, *Sci. Rep.* 1, 82-86.

SYNTHESIS OF 1,2,3-TRIAZOLE DERIVATE OF BENZOPHENONE BY CLICK CHEMISTRY

Roko Blažić*, Elvira Vidović

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia
Corresponding author: rblazic@fkit.hr

Summary

Molecular hybridization using known pharmacophores is a new approach to the synthesis of biologically active compounds. One of the known pharmacophores is benzophenone. Benzophenone derivatives occur in nature. They are specific for the Clusiaceae family of plants where show biological activity (antibacterial properties, anti-HIV activity, anti-inflammatory properties, inhibition of cancer cell growth). Moreover, biological activity was determined in synthetic benzophenone derivatives. For example, ketoprofen is commercially available as an anti-inflammatory drug. The 1,2,3-triazole group is also known pharmacophore. It is resistant to metabolic degradation, enables the formation of hydrogen bonds and improves the binding of the corresponding molecule to biological targets. In this paper, the synthesis of 4-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) benzophenone (**1**) from 4-azidobenzophenone and propargyl alcohol was performed using Cu^+ or Cu^{2+} salt as a catalyst. Compound **1** was successfully synthesized in reactions with Cu^{2+} , where the yield of the reaction was 21-70 %.

Keywords: benzophenone derivatives, 1,2,3-triazole, click chemistry

Molecularly imprinted polymers for determination of gallic acid

Filipa Mrčela¹, Ivana Smoljko^{1*}, Rolando C. S. Dias², Catarina Gomes²

¹*Faculty of Chemistry and Technology, University of Split,
Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia*

²*LSRE-Instituto Politécnico de Bragança, Quinta de Santa Apolónia,
5 300 Bragança, Portugal*

**Corresponding author: ismoljko@ktf-split.hr*

Summary

Molecularly imprinted polymers (MIP) are synthetic polymers with specific recognition for targeted molecules. Herein, a facile and efficient approach is presented for the preparation of MIP capable of recognizing polyphenol, i.e. gallic acid in aqueous system. Gallic acid (3,4,5 trihydroxybenzoic acid) is a secondary metabolite present in most plants and it was selected as a template due to its range of bioactivities including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer. In this paper, MIP was prepared by electrochemical polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) monomer on graphite electrode templated with gallic acid by multiple scan cyclic voltammetry. The surface feature of the prepared MIP was characterized by cyclic voltammetry and linear sweep voltammetry. All results indicated that the prepared imprinted electrode has high affinity toward gallic acid in the solution and might offer a method for determination of gallic acid in the natural extracts.

Keywords: gallic acid, molecular imprinting, cyclic voltammetry, linear sweep voltammetry

Introduction

Molecularly imprinted polymers (MIP) are synthetic polymers with highly specific recognition for targeted molecules. A MIP is synthesized using the targeted compound as template, followed by a polymerization and subsequent removal of the template with a solvent. This process leaves specific recognition sites for the targeted compound in the MIP (BelBruno, 2019). MIP are considered a versatile and promising material able to identify both biological and chemical molecules including amino acids and proteins, nucleotide derivatives, pollutants, drugs and food (Vasapollo et al., 2011). In this study a facile and efficient approach is presented for the preparation of MIP capable of recognizing polyphenol, i.e. gallic acid in aqueous system. Gallic acid (GA, Fig. 1) is a phenolic compound. It is chemically known as 3,4,5-trihydroxybenzoic acid. The structure of gallic acid has phenolic groups that are a source of readily available hydrogen atoms so that radicals produced can be delocalized over the phenolic structure (Nikolić, 2006). GA is a secondary metabolite present in variety of fruits and number of plants and it was selected as a template due to its range of bioactivities including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer (Santos-Zea et al., 2018; Locatelli et al., 2013; Nayeem et al., 2006). A number of techniques have been developed to identify and quantify this active ingredient in most biological matrices such as spectrometry, chromatography, and capillary electrophoresis.

Among these, electrochemical methods have received much attention lately, mainly due to their sensitivity, selectivity and simplicity (Alencar Fernandes, 2015; Badea et al., 2019).

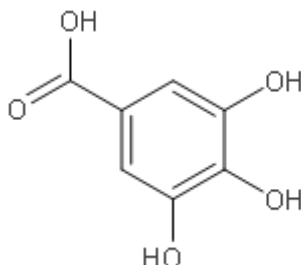


Figure 1. Molecular structure of gallic acid (GA)

In this paper, MIP was prepared by electrochemical polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) monomer on graphite electrode templated with gallic acid by multiple scan cyclic voltammetry. The surface feature of the prepared MIP was characterized by cyclic voltammetry and linear sweep voltammetry.

Materials and Methods

Reagents

Potassium chloride (KCl) was purchased from Labkem. Analytical reagent grade acetonitrile and methanol were bought from Sigma Aldrich. Gallic acid, sodium hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) and disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) were also purchased from Sigma Aldrich. 3,4-Ethylenedioxythiophene (EDOT) and lithium perchlorate (LiClO_4) were obtained from Acros Organics, USA.

Standard GA solution was prepared by dissolving 10 mg of it in 10 mL of methanol (1 mg/mL). Various concentrations (0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.75 mmol/L, 1.25 mmol/L and 1.50 mmol/L) of gallic acid solutions in stock solution, i.e. 88 % 0.1 mol/L KCl/12 % methanol were prepared from the standard solution. Also, it was prepared 10 mL of gallic acid solutions in stock solution ($c(\text{GA})=0.476$ mmol/L) of different pH values, i.e. 2.2, 3.04, 4.20, 6.9, 7.4, 8.5, 10.5, 11.5 and 11.9.

Instruments

Cyclic and linear sweep voltammetry experiments were performed utilizing a Zahner XPot potentiostat coupled with PPIInspector software. A conventional three-electrode electrochemical cell was employed, in which Ag/AgCl electrode and Pt electrode were used as the reference and counter electrode, respectively. Bare or glassy carbon electrode (GCE) was employed as working electrode.

Experimental methods

For each voltametric measurements, the GCE was freshly polished to smooth surface finish, using wet sandpaper and then it was rinsed thoroughly with double-distilled water.

After that, the clean electrode was degreased in a solution of acetone and water and then it was dried under ambient air conditions. The electrochemical behaviour of GA was investigated at a GCE as the working electrode, a Pt electrode as the counter electrode, and an Ag/AgCl electrode as the reference electrode using cyclic voltammetry technique (CV) and linear sweep voltammetry (LSV). The various parameters like the effect of scan rate, pH and concentration of GA studied.

Preparation of Molecularly imprinted and Non- imprinted polymers

MIP was prepared by electrochemical polymerization of EDOT monomer on graphite electrode templated with gallic acid by multiple scan cyclic voltammetry. Prior to the electrochemical polymerization process, the electrodes were purified in a solution of 0.1 mol/L KCl and 0.05 mol/L phosphate buffer. Purification was performed by cyclic voltammetry in the potential range from -0.6 V to 1 V at a scan rate of 100 mV/s. The imprinted electrodes were prepared in a mixture solution of 0.1077 g LiClO₄, 20 μL EDOT monomer, 0.6113 mmol/L of gallic acid and 10 mL 9:1 H₂O/Acetonitrile solution by cyclic voltammetry sweeping between -0.4 to 1.5 V at a scan rate of 100 mV/s¹ for 5 scans. Thereafter, the template was removed by incubating the electrodes in a methanol solution at room temperature for 10 min. Non-imprinted electrodes were prepared in the same manner, but in the absence of the template. The surface feature of the prepared MIP was characterized by cyclic voltammetry and linear sweep voltammetry.

Results and Discussion

Electrochemical behaviour of gallic acid on glassy carbon electrode

Fig. 2a shows cyclic voltammograms, CVs, of 0.476 mmol/L gallic acid, on GCE in 88 % 0.1 mol/L KCl/12 % methanol solution (pH = 1.7) at different scan rate in the range of 5 to 200 mV/s. Cyclic voltammograms indicated that the electrochemical oxidation of gallic acid is characterized by two irreversible anode peaks. The first oxidation peak was attributed to the formation of the semiquinone radical, followed by its oxidation to the quinone form (Fig. 3). Both processes involved one proton and one electron, with no peaks on the reverse scan, indicating an irreversible process, as demonstrated previously (Abdel-Hamid and Newair, 2011; Souza et al., 2011; Yilmaz et al., 2013). The anodic peak current varied linearly with the square root of the scan rate (Fig. 2b), thereby demonstrating that GA oxidation was controlled by diffusion to the electrode surface. From the obtained results, a scan rate of 10 mV/s was chosen for further studies. The effect of pH on the oxidation of 0.476 mmol/L gallic acid was investigated in phosphate buffer in the pH range from 2.2 to 11.9 by cyclic voltammetry at a scan rate of 10 mV/s (Fig. 4). The pH of the buffer in which GA was dissolved affects the electro-oxidation activity of GA on the surface of the GCE. Two irreversible anodic cv waves are obtained in the pH range of study, 2.2-10.5, while at pH values of >10.5 the oxidation waves are not observed.

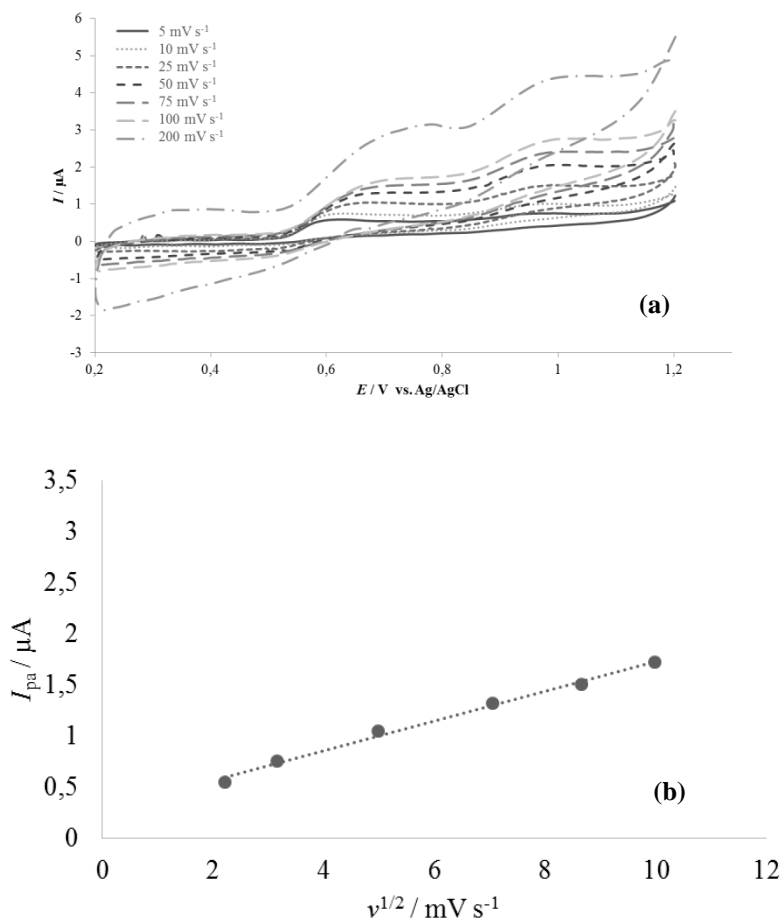


Figure 2. (a) CVs of 0.476 mmol/L GA in 88 % 0.1 mmol/L KCl/12 % methanol solution (pH = 1.7) recorded between 0.2 V and 1.2 V at different scan rate. (b) Plot of I_{pa} vs. square root of the scan rate

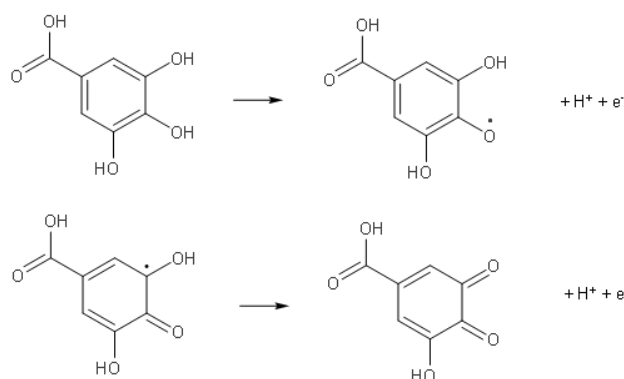


Figure 3. Two-step gallic acid oxidation (Souza et al. 2011.)

Also, the results show that on increasing pH of the solution, two peaks potentials are shifted towards less positive values.

The gradual negative shift of the peak potential as the pH increases showed a linear relationship, the linear equation is $E_{pa} = -0.0188\text{pH} + 0.7024$, $R^2=0,896$. The linear dependence for oxidation of gallic acid was observed by other authors where the shift is attributed to the participation of protons in the electrode reactions (Souza et al., 2011; Chen et al. 2019).

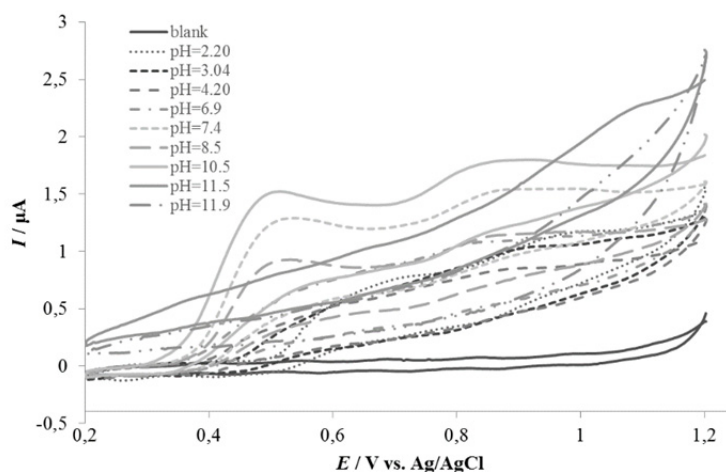
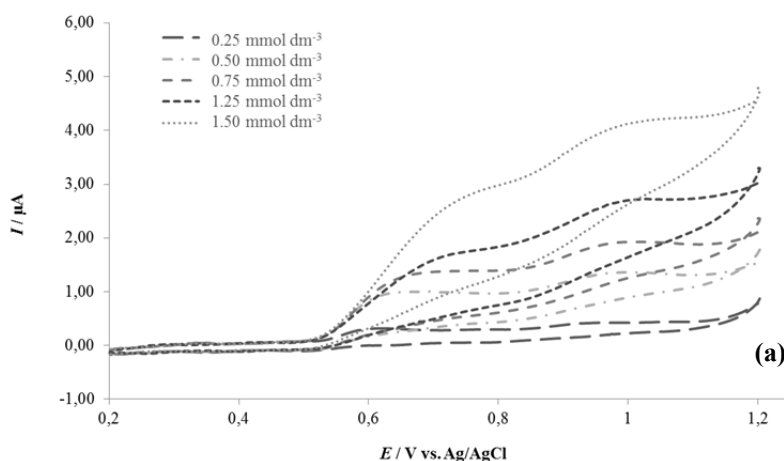


Figure 4. CVs of 0.476 mmol/L GA in 88 % 0.1 mol/L KCl/12 % methanol solution with different pH's recorded between 0.2 V and 1.2 V at a scan rate of 10 mV/s

Cyclic voltammograms of gallic acid at different concentrations (in the range from 0.25 to 1.5 mmol/L) and calibration curve obtained from the peak currents taken at the characteristic potential are shown in Fig. 5a and Fig. 5b respectively. It can be seen that current peak increase linearly with gallic acid concentration.



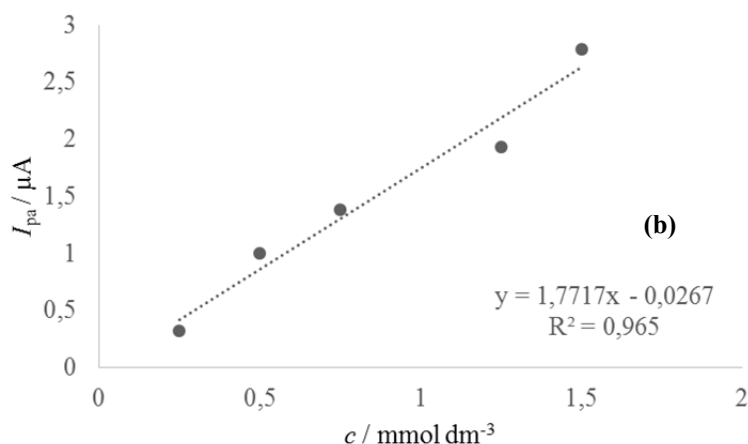


Figure 5. (a) CVs of different concentrations of GA in 88 % 0.1 mol/L KCl/12 % methanol solution (pH = 1.7) recorded between 0.2 V and 1.2 V at a scan rate of 10 mV/s.
 (b) Plot of I_{pa} vs. different GA concentrations

Electrochemical polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film was prepared on graphite electrode from LiClO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitrile}$ solution containing EDOT monomer (NIP) by multiple scan voltammetry in the range between -0.4 V and 1.5 V at a scan rate of 100 mV s^{-1} (Fig. 6). Imprinted electrodes were prepared in the same manner, but in the presence of the template, i.e. GA (Fig. 7). As shown in Fig. 6 a growth of anodic current started at +0.9 V, which corresponded to beginning of EDOT oxidation. The increase of currents with the number of successive cycles indicates the growth of PEDOT film on electrode surface. Similar voltammograms were obtained during the electropolymerization in the presence of the template (MIP) but in the presence of GA oxidation currents are much higher compared to that of the NIP. A gradually increasing current with the cycles growing from two to five is shown in Fig. 7.

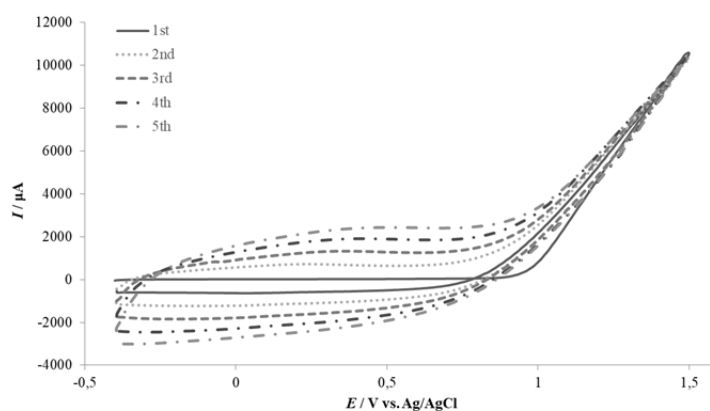


Figure 6. CVs recorded during the electropolymerization of EDOT on the graphite electrode from the solution without template (NIP), 5 scans between -0.4 V to 1.5 V at a scan rate of 100 mV/s

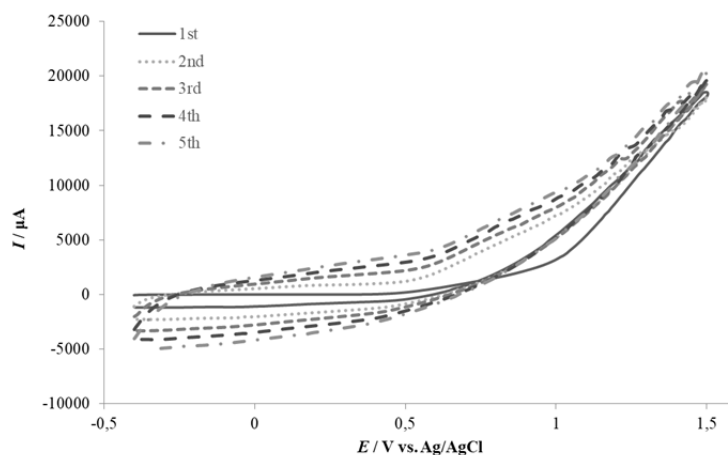


Figure 7. CVs recorded during the electropolymerization of EDOT on the graphite electrode from the solution with template (MIP), 5 scans between -0.4 V to 1.5 V at a scan rate of 100 mV/s

The electrochemical behaviour of the MIP modified electrode after electropolymerization, template removal and rebinding was monitored using linear sweep voltammetry. The template removal was performed in a methanol solution. After extracting molecules from the polymeric matrix, the imprinted cavities were created. The Fig. 8 shows the voltammograms with waves at approx. 0.5 V. The former value is associated with GA oxidation. By means of linear sweep voltammetry, it has been confirmed usefulness of prepared MIP in detection of GA in the analysed sample.

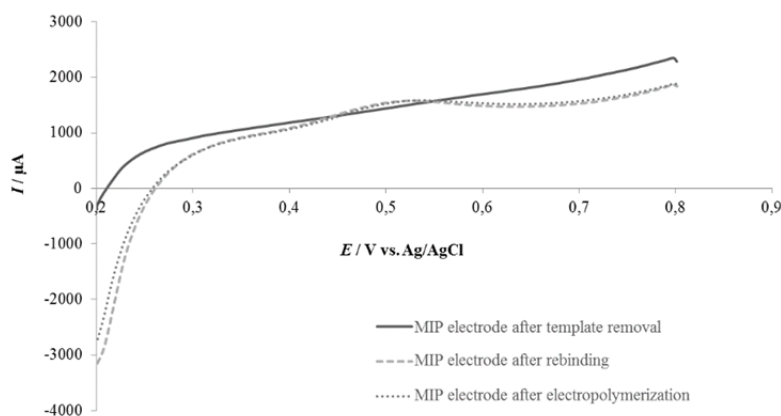


Figure 8. LSVs of 0.476 mmol/L GA in 88 % 0.1 mol/L KCl/12 % methanol solution (pH = 10.5) recorded on the MIP electrode after electropolymerization, template removal and rebinding

Conclusions

Electrochemically polymerized electrodes were used as working electrodes in the voltammetric determination of gallic acid. All results indicated that the prepared imprinted electrode has high affinity toward gallic acid in the solution and might offer a method for determination of gallic acid in the natural extracts.

References

- Abdel-Hamid, R., Newair, E. F. (2011): Electrochemical behaviour of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 657, 107-112.
- Alencar Fernandes, F. H., Nunes Salgado, H. R. (2015): Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 46(3), 257-265.
- Badea, M., di Modugno, F., Floroian, L., Tit, D. M., Restani, P., Bungau, S., Iovan, C., Badea, G.E., Aleya, L. (2019): Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses, *Sci. Total Environ.* 672, 129-140.
- BelBruno, J. J. (2019): Molecularly imprinted polymers, *Chem. Rev.* 119, 94–119.
- Chen, M., Lv, H., Li, X., Tian, Z., Ma, X. (2019): Determination of gallic acid in tea by a graphene modified glassy carbon electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 14, 4852-4860.
- Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., Centa, A., Crezinsky-Pasa, T. B. (2013): Antioxidant, Antitumoral and Anti-Inflammatory Activities of Gallic Acid. In Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications Edition: 4 th, Publisher: Nova Publishers, Michelle A. Thompson, Parker B. Collins (ed.), pp.1-23.
- Nayeem, N., Asdaq, S. M. B., Salem, H., Ahel-Alfqy, S. (2016): Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development, *J. Appl. Pharm.* 8(2) 1000213.
- Nikolić, K.M. (2006): Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals, *J. Mol. Struc- Theochem.* 774(1-3), 95-105.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J.A., Sandoval G. (2018): Cleanup Methods. In Phenolic compounds in food: characterization & analysis, Nollet, Leo M.L. (ed.), Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 80.
- Souza, L. P., Calegari, F., Zarbin, A. J. G., Marcolino-Junior, L. H., Bergamini, M. F. (2011): Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode, *J. Agric. Food Chem.* 59, 7620-7625.
- Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G. (2011): Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *Int. J. Mol. Sci.* 12(9), 5908–5945.
- Yilmaz, U. T., Kekillioglu, A., Mert, R. (2013): Determination of gallic acid by differential pulse polarography: application to fruit juices, *J. Anal. Chem.* 68, 1064-1069.

2

**Sekcija: KEMIJSKO I BIOKEMIJSKO
INŽENJERSTVO**

**Topic: CHEMICAL AND BIOCHEMICAL
ENGINEERING**



Funkcionalizirani TiO₂ za fotokatalitičku razgradnju neonikotinoidnih insekticida

Marina Duplancić, Vanja Gilja, Ivana Elizabeta Zelić, Vesna Tomašić*

*Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
 Marulićev trg 19, HR – 10 000 Zagreb*

**Dopisni autor: marina.duplancic@fkit.hr*

Sažetak

Cilj rada je izučavanje fotokatalitičke razgradnje imidakloprida u modelnoj otpadnoj vodi na imobiliziranom sloju fotokatalizatora u uvjetima simuliranog i prirodnog Sunčevog zračenja. Istraživanja su provedena u pločastom fotoreaktoru s recirkulacijom pri različitim radnim uvjetima. Da bi se aktivno radno područje komercijalno dostupnog TiO₂ katalizatora pomaknulo u vidljiv dio spektra i poboljšala ekonomska učinkovitost procesa primijenjeni su različiti postupci funkcionalizacije, uključujući predobradu praškastog fotokatalizatora uslijed izlaganja djelovanju UVC zračenja u vodenoj suspenziji (TiO₂-UVC-S), predobradu imobiliziranog sloja TiO₂ izravnim izlaganjem djelovanju UVC zračenja neposredno nakon pripreme takvoga sloja (TiO₂-UVC-D), dopiranj u TiO₂ dušikom primjenom uree (TiO₂-U) te predobradu hladnom plazmom dušika (TiO₂-PL N₂) odnosno argona (TiO₂-PL Ar). Svi postupci rezultirali su smanjenjem širine zabranjene zone, E_{bg} . Najveće smanjenje E_{bg} postignuto je za uzorak modificiran hladnom plazmom u struji dušika (TiO₂-PL N₂). Ustanovljeno je da su TiO₂-UVC-D, TiO₂-UVC-S i TiO₂-U učinkovitiji u odnosu na fotokatalizatore modificirane hladnom plazmom dušika i argona (TiO₂-PL N₂, TiO₂-PL Ar). Optimalne *pH* vrijednosti pri fotorazgradnji imidakloprida na imobiliziranoj sloju TiO₂-UVC-D nalaze se između 5 i 7. Protok recirkulacije nije značajno utjecao na učinkovitost fotorazgradnje. Najveće smanjenje koncentracije imidakloprida pri uvjetima korištenim u ovom radu postignuto je u uvjetima prirodnog Sunčevog zračenja, što je objašnjeno s izmjerenim intenzitetima zračenja.

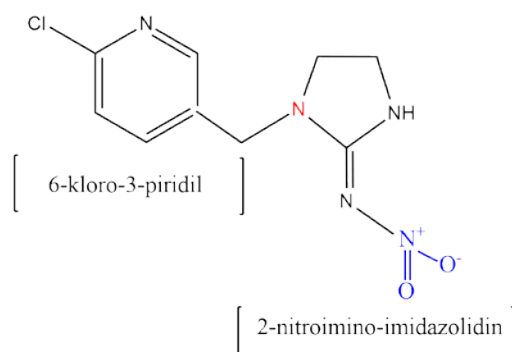
Ključne riječi: fotokatalitička razgradnja, neonikotinoidi, imidakloprid, TiO₂

Uvod

Porast broja stanovništva i sve veća potreba za hranom iziskuju prijelaz s tradicionalne na modernu i intenzivnu poljoprivrednu proizvodnju što dovodi do povećane upotrebe insekticida tijekom posljednjeg desetljeća. Insekticidi se koriste za suzbijanje štetnih nametnika u poljoprivredi i domaćinstvu čuvajući prinose poljoprivrednih kultura. Pretjerana i nepravilna uporaba insekticida štetno utječe na plodnost tla, život mikroorganizama te bioraznolikost ekosustava (Berheim i sur., 2019).

Neonikotinoidi se ubrajaju u jednu od novijih skupina insekticida, slični su nikotinu, a u poljoprivredi se intenzivno koriste za suzbijanje brojnih insekata uključujući lisne i bijele uši, resokrilce te druge nametnike na različitim kulturama kao što su: suncokret, kukuruz, pamuk, krumpir, šećerna repa, riža, soja, repica, voće i dr. (Craddock i sur., 2019).

Predstavnik prve generacije neonikotinoidnih insekticida je i imidakloprid (IMI), 1-(6-kloro-3-piridilmetil)-2-nitroiminoimidazolidin, koji djeluje na središnji živčani sustav insekata blokirajući prijenos živčanih impulsa i podražaja koji rezultiraju paralizom, a potom i smrću insekata. Jedan je od najčešće korištenih insekticida na svijetu i nalazi se na tzv. „watch“ listi Europske komisije u okviru Okvirne direktive o vodama. Kao što se može vidjeti na slici 1 struktura imidakloprida sastoji se od dva dijela: 6-kloro-3-piridilne i 2-nitroiminoimidazolidinske skupine koje su međusobno povezane metilenskom skupinom. Uvidom u literaturu ustanovljeno je da 2-nitroiminoimidazolidinska skupina ima ključnu ulogu u mehanizmu insekticidnog djelovanja (Kazuhiko i sur., 2001).



Slika 1. Strukturna formula imidakloprida
Figure 1. Structural formula of imidacloprid

Imidakloprid ima dobre fizikalno-kemijske značajke koje mu omogućavaju širok spektar primjene uključujući tretiranje sjemena, natapanje tla te nanošenje na list ili stabljiku biljke, pri čemu velik udio insekticida završava u površinskim i podzemnim vodama u kojima se bioakumulira. Zbog relativno visoke topljivosti (0,58 g/l) i velike postojanosti u vodenom mediju predstavlja veliku prijetnju okolišu (Armbrust i Peeler, 2002). Utvrđeno je da ovaj insekticid ima visoku toksičnost za korisne insekte poput medonosnih pčela, insektivornih ptica te životinja koje žive u rijekama i jezerima (Sumon i sur., 2018). Koncentracija imidakloprida u vodama uglavnom varira od ppb do ppm, dok je u jednom istraživanju koje se odnosilo na mjerenje koncentracije imidakloprida u jutarnjoj rosi i tijekom pojave gutacije utvrđena koncentracija koja je iznosila čak 300 ppm (Wong i sur., 2018). Stoga se primarni preventivni pristup s ciljem sprječavanja daljnjeg širenja i smanjenja njegovih štetnih učinaka na okoliš svodi na racionalnu upotrebu, sprječavanje nekontroliranog ispuštanja te uklanjanje imidakloprida iz površinskih voda. U novije vrijeme napredni oksidacijski procesi prepoznati su kao ekološki i ekonomski prihvatljiva tehnika koja se primjenjuje za uklanjanje imidakloprida iz okoliša. Napredni oksidacijski procesi uključuju razne tehnike, kao što su: ozoniranje (Chen i sur., 2019), fotoliza i hidroliza (Zheng i Liu, 1999), ultrazvučna obrada (Patil i sur., 2014), Fentonov i foto-Fentonov proces (Malato i sur., 2002), heterogena fotokataliza i sl. (Derbalah i sur., 2019; Yari i sur., 2019; Shorgoli i sur., 2017, Akbari i Shokri, 2017). Titanijev dioksid, TiO_2 , jedan je od najčešće korištenih poluvodičkih fotokatalizatora koji se primjenjuje u heterogenoj fotokatalizi, a odlikuje ga kemijska inertnost, netoksičnost, niska cijena te otpornost na fotokoroziju. Međutim, širina zabranjene zone (3,2 - 3,0 eV) ograničava njegovu primjenu na procese koji se uglavnom provode pod djelovanjem UV zračenja.

Također, velika mogućnost rekombinacije elektrona i šupljina često je odgovorna za malu kvantnu učinkovitost fotokatalitičkih procesa. S obzirom na činjenicu da samo 4-5 % prirodnog Sunčevog zračenja posjeduje energiju dovoljnu za aktivaciju TiO_2 fotokatalizatora, u brojnim istraživanjima provode se odgovarajuće modifikacije postojećih TiO_2 i srodnih fotokatalizatora i/ili se pripremaju novi fotokatalizatori i kompozitni materijali koje je moguće aktivirati u vidljivom dijelu spektra. Nađeno je da smanjenje širine zabranjene zone utječe na povećanje fotoaktivnosti TiO_2 katalizatora u vidljivom dijelu spektra, a za tu svrhu primjenjuju se postupci kojima nastaju strukturni defekti/nepравilnosti u osnovnoj strukturi TiO_2 . Strukturne defekte, u koje se najčešće ubrajaju upražnjena mjesta kisika i površinski Ti^{3+} defekti, moguće je izazvati dopiranjem metalima i nemetalima, termičkom obradom u struji odgovarajućeg reducensa (Ar , H_2 , H_2/Ar , N_2), djelovanjem plazme u struji plinova, postupcima aktivacije površine primjenom UVC zračenja i sl. (Pan i sur., 2013). Uklanjanjem atoma kisika s površine TiO_2 fotokatalizatora dolazi do narušavanja kristalne strukture, odnosno nastajanja tzv. upražnjenih mjesta kisika pri čemu se mijenja elektronska i geometrijska struktura katalizatora (Chen i sur., 2018). Dopiranje dušikom također može potaknuti nastajanje upražnjenih mjesta kisika u kristalnoj rešetki TiO_2 promičući njegovu fotoaktivnost u vidljivi dio spektra (Kong i sur., 2017; Simsek i Turabik, 2018). Druga vrsta defekata su površinski Ti^{3+} defekti koji nastaju redukcijom. Primjenom UV zračenja dolazi do nastajanja fotogeneriranih elektrona i šupljina, pri čemu Ti^{4+} kation prima elektrone i reducira se do Ti^{3+} , a šupljine oksidiraju O^{2-} anione do O^- (Xiong i sur., 2011). Višak oslobođenih elektrona dolazi u interakciju s atmosferskim kisikom, dok upražnjena mjesta kisika reagiraju s vodom ili dostupnim radikalima te generiraju reaktivne vrste kisika koje potom uzrokuju oksidaciju onečišćivala (Jayashree i Ashokkumar, 2018). Uvođenjem defekata u osnovnu strukturu TiO_2 fotokatalizatora povećava se apsorpcija vidljive svjetlosti, smanjuje rekombinacija elektrona i šupljina te se povećava brzina stvaranja hidroksilnih radikala što pospešuje fotokatalitičku učinkovitost katalizatora (Xu i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je primijeniti različite postupke modifikacije TiO_2 fotokatalizatora te ispitati utjecaj provedenih modifikacija na njegove fizičko-kemijske i fotokatalitičke značajke tijekom razgradnje modelnog onečišćenja (imidaklopid). Fotokatalizator s najboljom aktivnošću za razgradnju imidakloprida detaljno je ispitan pri različitim radnim uvjetima ($p\text{H}$, protok recirkulacije te vrsta i intenzitet primijenjenog izvora zračenja).

Materijali i metode

Priprema i karakterizacija fotokatalizatora

U cilju promjene fizičko-kemijskih značajki fotokatalizatora i pomicanja njegove aktivnosti u vidljivi dio spektra korišteni su različiti postupci, kao što su: a) predobrada fotokatalizatora djelovanjem UVC zračenja u vodenoj suspenziji (TiO_2 -UVC-S), b) predobrada fotokatalizatora djelovanjem UVC zračenja izravno nakon pripreme imobiliziranog sloja (TiO_2 -UVC-D), c) dopiranje TiO_2 dušikom primjenom uree (TiO_2 -U), d) predobrada hladnom plazmom dušika (TiO_2 -PL N_2) odnosno argona (TiO_2 -PL Ar).

Postupak pripreme TiO_2 -UVC-S proveden je u vodenoj suspenziji izlaganjem djelovanju UVC zračenja primjenom UVC lampe snage 8W u vremenu od 2 sata uz istovremenu recirkulaciju vodene suspenzije (200 ml/min). TiO_2 -UVC-D pripremljen je izravnim izlaganjem imobiliziranog fotokatalitičkog sloja djelovanju dviju UVC lampi snage 8W u

vremenu od 2 sata. Uzorak TiO_2 -U pripremljen je mehaničkim miješanjem uree s praškastim komercijalnim TiO_2 (Evonik, P25) u masenomjeru 4:1. Nakon mehaničkog miješanja termička obrada provedena je u uvjetima atmosferskog tlaka pri temperaturi od $400\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom jednog sata. Nakon hlađenja do sobne temperature, dobiveni produkt je usitnjen i korišten tijekom pripreme imobiliziranog sloja. Uzorci TiO_2 -PL N_2 i TiO_2 -PL Ar pripremljeni su iz vodenih suspenzija TiO_2 (5 g TiO_2 P25 i 150 mL demineralizirane vode) izloženih djelovanju hladne plazme dušika (N_2) odnosno argona (Ar). Pritom je primijenjena plazma frekvencije 120 Hz i napona 30 kV, plinovi su upuhivani pri protoku od 0,8 l/min, a vrijeme obrade iznosilo je 15 minuta. Tijekom upuhivanja plinova u suspenziju provedeno je miješanje smjese, a uslijed visokog napona dolazilo je do ionizacije plinova. Nakon izlaganja uzoraka djelovanju plazme N_2 odnosno Ar provedeno je centrifugiranje pri 5000 okr/min u trajanju od 30 minuta. Nakon toga dobiveni uzorci su sušeni pri $100\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 4 sata. Karakterizacija pripremljenih fotokatalizatora provedena je primjenom UV-Vis difuzne refleksijske spektroskopije. Karakteristični spektri u rasponu valnih duljina od 200-800 nm određeni su pri sobnoj temperaturi pomoću PerkinElmer Lambda 35 UV-Vis spektrofotometra.

Priprema imobiliziranog sloja

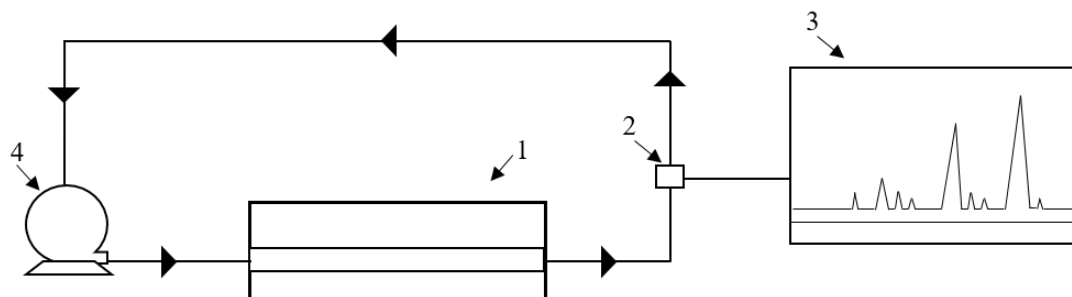
Kao nosač za pripremu imobiliziranog sloja fotokatalizatora korištena je abrazivna podloga. Za pripremu imobiliziranog sloja korištena je gusta pasta koja je sadržavala 2,5 g TiO_2 , 0,5 g komercijalnog veziva (Procol) i 5 mL destilirane vode. Nakon miješanja pasta je pomoću kista nanosena na podlogu u tankom sloju. Nakon toga slijedilo je sušenje tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi. Tako pripremljen imobilizirani sloj pomoću obostrano ljepljive trake nanosen je na metalnu pločicu da bi se omogućio njegov smještaj unutar fotoreaktora.

Opis eksperimentalnog sustava i provedba mjerenja

Fotolitička i fotokatalitička razgradnja imidaklopridana imobiliziranom sloju fotokatalizatora provedena je u pločastom fotoreaktoru karakterističnih dimenzija 25 x 10 x 2 cm, ukupnog volumena, $V= 240\text{ mL}$, pri čemu su mjerenja provedena uz recirkulaciju reakcijske smjese. Shematski prikaz eksperimentalne aparature za provedbu fotorazgradnje imidakloprida prikazan je na slici 2. Fotoreaktor je izrađen od pleksiglasa, izuzev gornje kvarcne ploče. Recirkulacija reakcijske smjese postignuta je primjenom peristaltičke pumpe (Masterflex L/S, Cole Parmer) koja je omogućavala rad u širokom rasponu protoka recirkulacije ($Q_R= 30 - 300\text{ mL/min}$). Početna koncentracija imidakloprida, $c_{0,IMI}$ iznosila je 10 mg/L. Mjerenja su provedena pri različitim pH vrijednostima reakcijske smjese ($pH= 3, 5, 7, 9$). Za podešavanje početnih pH vrijednosti korištene su 0,01 M NaOH i 0,01 M HCl. pH vrijednosti mjerene su pomoću pH metra na početku i nakon provedene reakcije (nakon 240 min). Osim pH vrijednosti, na početku i po završetku reakcije mjereno je i stupanj zasićenosti kisikom pomoću oksimetra. Za fotoinduciranu pobudu fotokatalizatora korištena su dva tipa komercijalnih lampi kojima je simulirano Sunčevo zračenje: a) *Arcadia Bird Lamp Natural Sun T5* (8 W; dimenzija 300 x 16 mm; 2, 4 % UVB i 10 % UVA zračenja) i b) *Solar GLO PT2192* lampa (125 W) koja prema podacima proizvođača sadrži optimalnu razinu UVA, UVB, vidljivog i infracrvenog zračenja, a provedeno je i mjerenje uz prirodno Sunčevo

zračenje. Prilikom mjerenja s *Arcadia Bird Lamp Natural Sun T5* korištene su dvije lampe (svaka snage 8W) koje su postavljene na udaljenosti od 3 cm od reakcijske smjese.

Intenzitet zračenja mjeren je na početku i nakon provedene fotorazgradnje uporabom UV radiometra (UVP) i odgovarajućih senzora zavisno o području valnih duljina (UVX-36, UVX-31 i UVX-25). Fotorazgradnja imidakloprida praćena je analizom uzoraka reakcijske smjese primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).



Slika 2. Shema eksperimentalne aparature za provedbu fotorazgradnje imidakloprida. 1 – fotoreaktor, 2 – mjesto za uzorkovanje, 3 – on line sustav za akviziciju podataka i obradu HPLC kromatograma, 4 – peristaltička pumpa

Figure 2. Experimental setup for photodegradation of imidacloprid. 1 - photoreactor, 2 - sampling point, 3 - on-line system for data acquisition and HPLC chromatogram processing, 4 – peristaltic pump

Rezultati i rasprava

Kao što je ranije istaknuto svrha ovog rada bila je proučavanje fotokatalitičke razgradnje neonikotinoidnog insekticida imidakloprida u uvjetima simuliranog i/ili prirodnog Sunčevog zračenja. Fotorazgradnja imidakloprida kao predstavnika neonikotinoidnih insekticida provedena je na imobiliziranom sloju fotokatalizatora u pločastom fotoreaktoru uz recirkulaciju reakcijske smjese. Da bi najpoznatiji i najčešće primjenjivani komercijalni TiO_2 P25 (*Evonik*) fotokatalizator mogao uspješno razgraditi odgovarajuću modelnu komponentu u uvjetima simuliranog i/ili Sunčevog zračenja potrebno je primijeniti odgovarajuće postupke modifikacije s ciljem smanjenja širine zabranjene zone, E_{bg} . U ovom radu za tu svrhu korišteni su različiti pristupi kao što su: predobrada fotokatalizatora koja je provedena njegovim izlaganjem djelovanjem UVC zračenja u vodenoj suspenziji (TiO_2 -UVC-S), predobrada fotokatalizatora postignuta izlaganjem imobiliziranog sloja TiO_2 fotokatalizatora djelovanju UVC zračenja izravno nakon pripreme takvoga sloja (TiO_2 -UVC-D), dopiranjem TiO_2 dušikom primjenom uree (TiO_2 -U) te predobradom TiO_2 s hladnom plazmom dušika (TiO_2 -PL N_2) odnosno argona (TiO_2 -PL Ar). U tablici 1 navedene su karakteristične vrijednosti širine zabranjene zone, E_{bg} koje su za prethodno spomenute fotokatalizatore određene UV-Vis difuznom refleksijskom spektroskopijom uz uporabu Taucova grafičkog prikaza zavisnosti $(\alpha h\nu)^{1/2}$ o $h\nu$ odnosno energiji fotona, pri čemu je α linearni apsorpcijski koeficijent, h Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js, odnosno $4,126 \cdot 10^{-15}$ eVs), avfrekvencija (Kurajica i sur., 2019).

Kao što se može vidjeti iz podataka prikazanih u tablici 1 svi postupci modifikacije polaznog TiO_2 korišteni u ovom radu doveli su do smanjenja E_{bg} , pri čemu je najveće smanjenje postignuto za uzorak TiO_2 modificiran plazmom dušika ($\text{TiO}_2\text{-PLN}_2$), a najmanje za fotokatalizatora čija je predobrada provedena njegovim izlaganjem djelovanju UVC zračenja u vodenoj suspenziji ($\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$).

Tablica 1. Vrijednosti širine zabranjene zone, E_{bg}

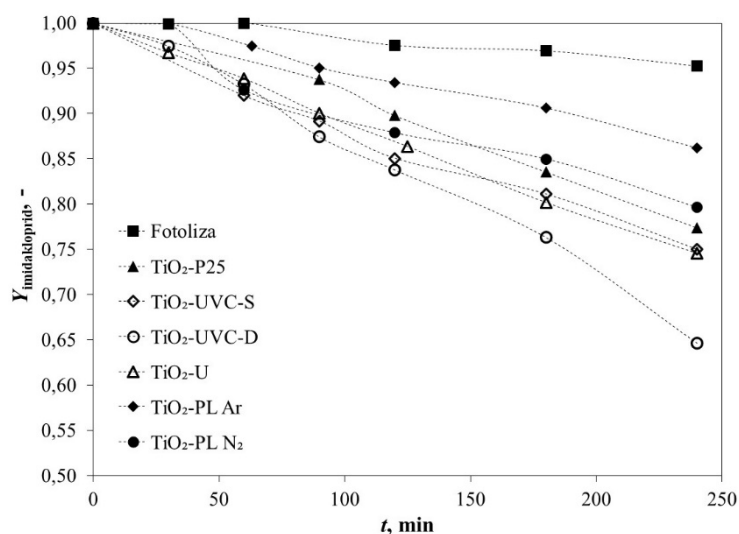
Table 1. Band gap values, E_{bg}

Uzorak	E_{bg} , eV
$\text{TiO}_2\text{-P25}^*$	3,20
$\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$	3,15
$\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$	3,10
$\text{TiO}_2\text{-U}$	3,07
$\text{TiO}_2\text{-PL N}_2$	3,05
$\text{TiO}_2\text{-PL Ar}$	3,10

*prema podacima proizvođača ($\text{TiO}_2\text{-P25}$, Evonik)

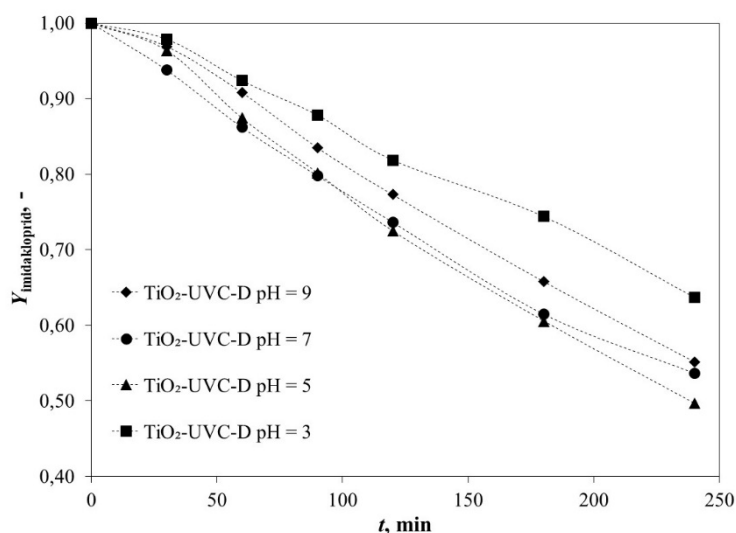
Na slici 3 prikazani su rezultati fotolitičke i fotokatalitičke razgradnje imidakloprida u uvjetima simuliranog Sunčevog zračenja (*Arcadia Sun light*, 8W). U skladu s očekivanjima fotokatalitička razgradnja dovodi do značajnijeg smanjenja koncentracije imidakloprida u odnosu na fotolitičku razgradnju. Usporedba modificiranih fotokatalizatora s komercijalnim fotokatalizatorom u izvornom obliku pokazala je da su $\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$, $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ i $\text{TiO}_2\text{-U}$ učinkovitiji fotokatalizatori za razgradnju imidakloprida, dok su fotokatalizatori modificirani djelovanjem plazme dušika i argona ($\text{TiO}_2\text{-PLN}_2$, $\text{TiO}_2\text{-PLAr}$) pokazali manju učinkovitost od izvornog TiO_2 fotokatalizatora bez obzira na manju širinu zabranjene zone, E_{bg} . Moguće objašnjenje za bolju učinkovitost $\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$, $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ i $\text{TiO}_2\text{-U}$ fotokatalizatora su strukturni defekti, koji uključuju upražnjena mjesta kisika i površinske Ti^{3+} defekte koje je moguće je izazvati na različite načine, između ostalog i dodatnom aktivacijom površine fotokatalizatora primjenom energetski najbogatijeg UVC zračenja (100-280 nm). Izostanak istog učinka kod fotokatalizatora izloženog djelovanju plazme dušika i argona može se pripisati činjenici da su uzorci vrlo kratko (15 min) izlagani djelovanju plazme (frekvencija plazme od 120 Hz i napon od 30 kV).

U brojnim fotokatalitičkim istraživanjima provedenim na sličnim modelnim komponentama nađeno je da *pH* vrijednost vodenog medija i koncentracija otopljenog kisika mogu značajno utjecati na učinkovitost fotokatalitičkog procesa. Stoga je u nastavku istraživanja ispitan utjecaj *pH* vrijednosti modelne otopine na učinkovitost razgradnje imidakloprida, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 4, dok je u tablici 2 dana usporedba *pH* vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika u vodenom mediju prije i nakon provedene razgradnje (tj. nakon 240 min) uz primjenu $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ se u prethodnim istraživanjima pokazao najboljim fotokatalizatorom.



Slika 3. Fotolitička i fotokatalitička razgradnja imidakloprida u uvjetima simuliranog Sunčevog zračenja (Arcadia Sun light, 8W). Reakcijski uvjeti: $c_{0,IMI}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min, pH = 6,5

Figure 3. Photolytic and photocatalytic degradation of imidacloprid under simulated solar radiation conditions (Arcadia Sun light, 8W). Reaction conditions: $c_{0,IMI}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min, pH = 6.5)



Slika 4. Utjecaj pH vrijednosti reakcijske smjese na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida u uvjetima simuliranog Sunčevog zračenja uz TiO₂-UVC-D fotokatalizator (Arcadia Sun light, 8W). Reakcijski uvjeti: $c_{0,IMI}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min

Figure 4. Influence of the reaction mixture pH on the photocatalytic degradation of imidacloprid under conditions of simulated solar radiation with TiO₂-UVC-D photocatalyst (Arcadia Sun light, 8W). Reaction conditions: $c_{0,IMI}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min

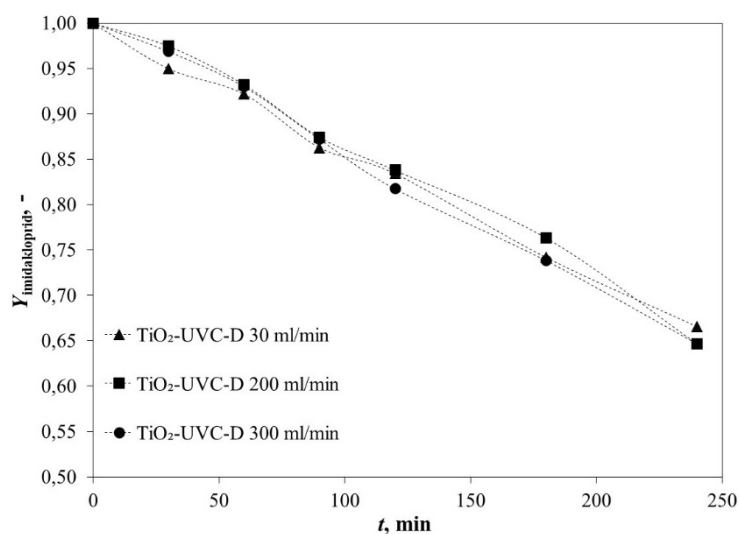
Tablica 2. Promjena pH vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika prije i nakon provedene fotokatalitičke razgradnje pri različitim početnim pH vrijednostima reakcijske smjese uz protok recirkulacije od 200 mL/min

Table 2. Change in pH and dissolved oxygen concentration before and after photocatalytic decomposition at different initial pH values of the reaction mixture with a recirculation flow of 200 mL/min

	$pH = 3$	$pH = 5$	$pH = 7$	$pH = 9$
$pH_{poč}$	3,00	5,00	7,02	9,00
pH_{kraj}	7,77	7,80	7,86	7,86
$\gamma(O_{2,poč}), \text{mg/L}$	8,1	8,6	8,4	8,4
$\gamma(O_{2,kraj}), \text{mg/L}$	7,9	7,8	7,5	7,5

Na temelju rezultata prikazanih na slici 4 vidljivo je da se najveća konverzija imidakloprida od 50,4 % postiže u kiselim uvjetima rada, tj. pri pH 5. Može se uočiti da je pri pH 7 nakon 240 min postignuta tek nešto manja konverzija od 46,4 %. U literaturi su objavljeni proturječni rezultati o utjecaju pH na razgradnju imidakloprida, primjerice Kanwal i sur. (2018) navode da je razgradnja imidakloprida uspješnija pri pH 10, dok Feng i sur. (2013) smatraju da se bolji rezultati postižu u kiselom mediju, tj. pri pH 5,8. S druge strane, neki autori navode da se maksimalna razgradnja imidakloprida postiže u jako kiselim uvjetima, tj. pri pH 3,2 (Kitsiou i sur., 2009). Takve razlike mogu se objasniti činjenicom da su navedeni autori koristili različite fotokatalizatore (tj. kompozitne fotokatalizatore $Ag-ZnO$, $H_3PW_{12}O_{40}/La-TiO_2$, TiO_2+Fe^{3+}). Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti da razgradnja imidakloprida raste s promjenom pH otopine od 3 do 9 te postiže maksimum pri pH 5, odnosno optimalni uvjeti za razgradnju imidakloprida nalaze se između pH 5 i neutralnog pH 7. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima koje su objavili Derbalah i sur. (2019) te Garg i sur. (2020). Poznato je da naboj na površini fotokatalizatora također zavisi o pH , tj. da će pri $pH < pH_{pzc}$ ($pH_{pzc} = 6,25$ za TiO_2) fotokatalizator biti u kationskom obliku (pozitivno nabijena površina), dok će pri $pH > pH_{pzc}$ biti u anionskom obliku (negativno nabijena površina). Tijekom fotokatalitičke razgradnje također mogu nastati različiti sporedni produkti koji su vjerojatno negativno nabijeni uslijed aromatskih prstenova u molekuli imidakloprida koji su bogati elektronima, pa iz toga slijedi da će se imidaklopid bolje adsorbirati i razgraditi na pozitivno nabijenoj površini fotokatalizatora (Garg i sur., 2020).

Rezultati prikazani u tablici 2 ukazuju da pH na kraju reakcije u svim slučajevima raste u odnosu na početnu pH vrijednost i poprima vrijednosti od 7,77 do 7,86. To može ukazivati na nastajanje produkata i/ ili međuprodukata razgradnje imidakloprida koji su lužnatog karaktera. Najveća promjena pH vrijednosti (početak reakcije i nakon 240 min.) uočena je uz početni pH 3. Usporedbom koncentracije kisika, O_2 na početku i kraju reakcije zabilježeno je smanjenje koncentracije O_2 pri svim pH vrijednostima, pri čemu je veće smanjenje koncentracije O_2 postignuto pri pH 7 i 9, pri kojima su opažene i relativno velike konverzije. Smanjenje koncentracije O_2 bilo je očekivano, jer fotokatalitička mineralizacija imidakloprida dovodi do nastajanja različitih reakcijskih međuprodukata čiji se ugljikovi atomi potencijalno oksidiraju do CO_2 i H_2O , dok se heteroatomi prevode u anorganske anione koji zaostaju u otopini. Utjecaj protoka recirkulacije na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida prikazan je na slici 5.



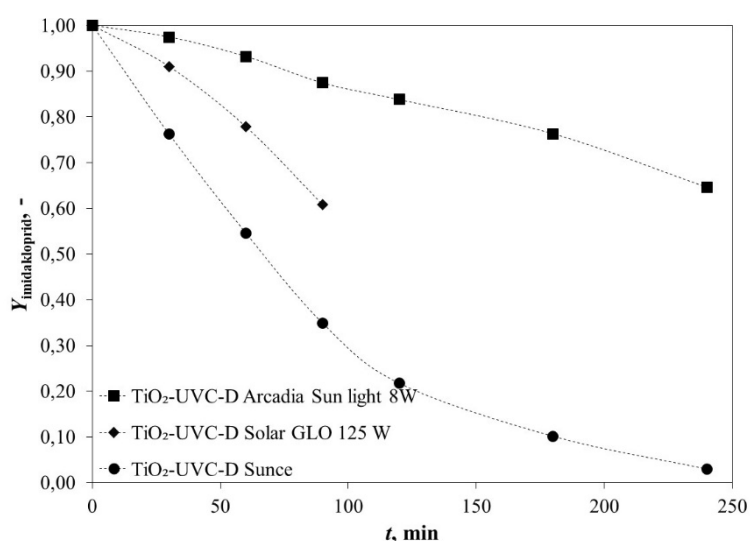
Slika 5. Utjecaj protoka recirkulacije na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida primjenom $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ fotokatalizatora. Reakcijski uvjeti: $c_{0,\text{IMI}}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 30 - 300$ mL/min, $pH=6,5$

Figure 5. Influence of recirculation flow rate on photocatalytic degradation of imidacloprid using $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ photocatalysts. Reaction conditions: $c_{0,\text{IMI}}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 30 - 300$ mL/min, $pH=6.5$

Iako se može očekivati da s porastom protoka recirkulacije reakcijske smjese dolazi da smanjenja debljine graničnog sloja između fluida i površine fotokatalizatora odnosno da smanjenja otpora prijenosu tvari međufaznom difuzijom, pri uvjetima korištenim u ovom radu to nije bio slučaj. To se može pripisati relativno uskom rasponu protoka recirkulacije reakcijske smjese korištenog u ovom istraživanju (30-300 mL/min).

U završnom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj vrste i intenziteta primijenjenih izvora zračenja na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida (slika 6), pri čemu su primijenjene dvije vrste komercijalno dostupnih lampi za simulaciju Sunčevog zračenja, a u cilju usporedbe provedeno je i mjerenje uz prirodno Sunčevo zračenje. U fotokatalitičkim istraživanjima izbor izvora zračenja kojim se izaziva fotoinducirana pobuda/aktivacija fotokatalizatora u velikoj mjeri utječe na učinkovitost izučavanog procesa, a pritom do izražaja dolaze sljedeći tehničkii ekonomski čimbenici: a) odabrani izvor zračenja mora emitirati zračenje koje apsorbira reaktant, tj. spektar emisije primijenjenog izvora zračenja mora biti podudaran sa apsorpcijskim spektrom reaktanta, b) električna ulazna snaga izvora zračenja određuje snagu zračenja unutar određenog raspona valnih duljina, pri čemu treba uzeti u obzir da se snaga zračenja značajno razlikuje od ulazne snage izvora zračenja, jer se veći dio svjetlosne energije gubi u obliku topline ili neželjenih valnih duljina i c) geometrija komercijalno dostupnih izvora zračenja ograničava izvedbu fotoreaktora, jer reaktor treba biti prilagođen geometriji primijenjenog izvora zračenja. Sunce je u ekonomskom smislu najprikladniji prirodan izvor elektromagnetskog zračenja, međutim raspodjela Sunčeva zračenja u velikoj mjeri ovisi o atmosferskim uvjetima, položaju Sunca, godišnjem dobu i sl. Na UV područje (valne duljine ispod 300 nm) odnosi se svega 4,5 % Sunčevog zračenja koje dopijeva do Zemljine površine, na vidljivi dio spektra oko 43 %, a 53 % predstavlja infracrveno zračenje (Bolton i sur., 1995). Rezultati istraživanja prikazani na slici 6 ukazuju da se najučinkovitija razgradnja

imidakloprida pri uvjetima korištenim u ovom radu postiže u uvjetima prirodnog Sunčevog zračenja, što je u uskoj vezi s izmjerenim intenzitetima zračenja (tablica 3). Komercijalna lampa Solar GLO PT2192 snage 125 W pokazala se učinkovitijim izvorom pobude fotokatalizatora u odnosu na dvije komercijalne lampe (Arcadia Sun light, 8W) što je također rezultat većeg intenziteta, međutim zbog velikog zagrijavanja nije se mogla dugotrajno koristiti i mjerenja su prekinuta nakon ca. 90 minuta od početka reakcije. Prema tome, može se zaključiti da se funkcionalizacija TiO₂ koja je rezultirala pripremom TiO₂-UVC-D fotokatalizatora pokazala uspješnom, jer je omogućila visok stupanj konverzije imidakloprida nakon ca. 250 min fotorazgradnje u uvjetima simuliranog odnosno prirodnog Sunčevog zračenja.



Slika 6. Utjecaj vrste i intenziteta zračenja na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida uz primjenu TiO₂-UVC-D fotokatalizatora. Reakcijski uvjeti: $c_{0,IMI}=10$ mg/L $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min, $pH=6,5$

Figure 6. Influence of radiation type and intensity on photocatalytic degradation of imidacloprid using TiO₂-UVC-D photocatalysts. Reaction conditions: $c_{0,IMI}=10$ mg/L, $T=25$ °C, $V=240$ mL, $Q_R = 200$ mL/min, $pH=6.5$

Tablica 3. Usporedba intenziteta zračenja
Table 3. Radiation intensity comparison

Izvor zračenja	UVA	UVA	UVB	UVB	UVC	UVC
	min.	maks.	min.	maks.	min.	maks.
Arcadia Bird Lamp	0,47	0,75	0,71	0,86	0,02	0,04
Natural Sun	2,07	2,59	1,32	1,77	0,12	0,15
T5	0,47	0,75	0,71	0,86	0,02	0,04
Solar GLO PT2192	0,30	3,58	0,20	1,76	0,04	0,41
Sunčevo zračenje	2,07	2,59	1,32	1,77	0,12	0,15

Zaključci

U radu je ispitana fotokatalitička razgradnja neonikotinoidnog insekticida imidakloprida na imobiliziranom sloju fotokatalizatora. Cilj rada bio je ispitati utjecaj različitih postupaka modifikacije komercijalno dostupnog $\text{TiO}_2(\text{P}25)$ na njegove fizičko-kemijske i fotokatalitičke značajke tijekom razgradnje imidakloprida u uvjetima simuliranog i/ili prirodnog Sunčevog zračenja. Također je ispitan utjecaj različitih radnih uvjeta kao što su pH , protok recirkulacije reakcijske smjese te vrsta i intenzitet primijenjenog izvora zračenja na učinkovitost fotorazgradnje. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da su svi postupci funkcionalizacije TiO_2 korišteni u ovom radu, koji su uključivali predobradu fotokatalizatora izazvanu izlaganjem UVC zračenju u vodenoj suspenziji ($\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$), izravno izlaganje imobiliziranog sloja TiO_2 djelovanju UVC zračenja ($\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$), dopiranje dušikom uz primjenu uree ($\text{TiO}_2\text{-U}$) te primjenu hladne plazme u struji dušika ($\text{TiO}_2\text{-PL N}_2$) odnosno argona ($\text{TiO}_2\text{-PL Ar}$), rezultirali smanjenjem širine zabranjene zone, E_{bg} . Najveće smanjenje E_{bg} postignuto je za uzorak modificiran djelovanjem hladne plazme u struji dušika ($\text{TiO}_2\text{-PL N}_2$), dok je za uzorak izložen djelovanju UVC zračenja u vodenoj suspenziji ($\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$) uočeno najmanje smanjenje E_{bg} u odnosu na polazni TiO_2 . Rezultati fotokatalitičke razgradnje imidakloprida pokazali su da $\text{TiO}_2\text{-UVC-S}$, $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ i $\text{TiO}_2\text{-U}$ pokazuju veću učinkovitost pri fotorazgradnji imidakloprida u odnosu na fotokatalizatore modificirane djelovanjem plazme dušika i argona ($\text{TiO}_2\text{-PLN}_2$, $\text{TiO}_2\text{-PLAr}$), pri čemu je utvrđeno da ne postoji izravna povezanost između smanjenja E_{bg} i učinkovitosti pri fotorazgradnji modelnog onečišćenja u uvjetima simuliranog Sunčevog zračenja. U nastavku istraživanja utvrđeno je da se optimalno područje pH vrijednosti pri fotokatalitičkoj razgradnji na imobiliziranoj sloju $\text{TiO}_2\text{-UVC-D}$ nalazi između 5 i 7. Također je ustanovljeno da porast protoka recirkulacije reakcijske smjese ne pokazuje značajan utjecaj na fotokatalitičku razgradnju imidakloprida, što je objašnjeno s relativno uskim rasponom protoka recirkulacije korištenim u ovom istraživanju (30- 300 mL/min). Istraživanje utjecaja vrste i intenziteta simuliranog i/ili Sunčevog zračenja pokazalo je da se najučinkovitija razgradnja imidakloprida pri uvjetima korištenim u ovom radu postiže u uvjetima prirodnog Sunčevog zračenja, što je u uskoj vezi s izmjerenim intenzitetima zračenja. Na temelju prethodno navedenog može se zaključiti da se primjenom jednostavnih inženjerskih rješenja odnosno postupcima modifikacije TiO_2 mogu uspješno pripremiti fotokatalizatori s potencijalnom aktivnošću u vidljivom području spektra, što je temelj za razvoj naprednih oksidacijskih procesa kao čistih, sigurnih i učinkovitih tehnologija za obradu otpadnih voda.

Zahvala

Rad je nastao u okviru projekata „Intenzifikacija fotokatalitičkih i katalitičkih procesa za obradu otpadnih voda i otpadnih plinova“, IN-PhotoCat (IP-2018-01-8669) koji financira Hrvatska zaklada za znanost.

Literatura

Akbari Shorgoli, A., Shokri, M. (2017): Photocatalytic degradation of imidacloprid pesticide in aqueous solution by TiO_2 nanoparticles immobilized on the glass plate, *Chem. Eng. Commun.* 204, 1061–1069.

- Armbrust, K. L., Peeler, H. B. (2002): Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf, *Pest Manag. Sci.* 58, 702–706.
- Berheim, E. H., Jenks, J. A., Lundgren, J. G., Michel, E. S., Grove, D., Jensen, W. F. (2019): Effects of Neonicotinoid Insecticides on Physiology and Reproductive Characteristics of Captive Female and Fawn White-tailed Deer, *Sci. Rep.* 9, 1–10.
- Bin Xiong, L., Li, J. L., Yang, B., Yu, Y. (2012): Ti^{3+} in the surface of titanium dioxide: Generation, properties and photocatalytic application, *J. Nanomater.* 2012, 1-9.
- Bolton, J. R., Safarzadeh-Amiri A., Cater, S.R. (1995): The Detoxification of Waste Water Streams Using Solar and Artificial UV Light Sources. In: Sterret, F.S. (ed.) *Alternative Fuels and the Environment*, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 187– 192.
- Chen, J., Iyemperumal, S. K., Fenton, T., Carl, A., Grimm, R., Li, G., Deskins, N. A. (2018): Synergy between Defects, Photoexcited Electrons and Supported Single Atom Catalysts for CO_2 Reduction, *ACS Catal.* 8, 10464-10478.
- Chen, S., Deng, J., Deng, Y., Gao, N. (2019): Influencing factors and kinetic studies of imidacloprid degradation by ozonation, *Environ. Technol.* 40, 2127–2134.
- Craddock, H. A., Huang, D., Turner, P. C., Quirós-Alcalá, L., Payne-Sturges, D. C. (2019): Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999-2015, *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source.* 18, 1–16.
- Derbalah, A., Sunday, M., Chidya, R., Jadoon, W., Sakugawa, H. (2019): Kinetics of photocatalytic removal of imidacloprid from water by advanced oxidation processes with respect to nanotechnology, *J. Water Health* 17, 254-265.
- Feng, C., Xu, G., Liu, X. (2013): Photocatalytic degradation of imidacloprid by composite catalysts $H_3PW_{12}O_{40}/La-TiO_2$, *J. Rare Earths.* 31, 44–48.
- Garg, R., Gupta, R., Bansal, A. (2020): Photocatalytic degradation of imidacloprid using semiconductor hybrid nano-catalyst: kinetics, surface reactions and degradation pathways, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*
- Gecgel, C., Simsek, U. B., Turabik, M. (2018): Degradation of imidacloprid in aqueous solutions by zero valent iron nanoparticles in the nitrogen medium, *Desalin. Water Treat.* 114, 341–355.
- Jayashree, S., Ashokkumar, M. (2018): Switchable intrinsic defect chemistry of titania for catalytic applications, *Catalysts.* 8, 1–25.
- Kanwal, M., Tariq, S. R., Chotana, G. A. (2018): Photocatalytic degradation of imidacloprid by Ag-ZnO composite, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 27307–27320.
- Kitsiou, V., Filippidis, N., Mantzavinos, D., Poullos, I. (2009): Heterogeneous and homogeneous photocatalytic degradation of the insecticide imidacloprid in aqueous solutions, *Appl. Catal. B Environ.* 86, 27–35.
- Kong, J. Z., Zhai, H. F., Zhang, W., Wang, S. S., Zhao, X. R., Li, M., Li, H., Li, A. D., Wu, D. (2017): Visible Light-Driven Photocatalytic Performance of N-Doped $ZnO/g-C_3N_4$ Nanocomposites, *Nanoscale Res. Lett.* 12, 526-535.
- Kurajica, S., Mandić, V., Tkalčević, M., Mužina, K., Munda, I. K. (2019): Određivanje zabranjene zone poluvodiča metodom UV-Vis difuzne refleksijske spektroskopije, *Kem. Ind.* 68, 415–426.
- Malato, S., Blanco, J., Cáceres, J., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., Rodríguez, A. (2002): Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO_2 using solar energy, *Catal. Today.* 76, 209–220.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., Sattelle, D. B. (2001):

- Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends in Pharm. Sci.* 22, 573–580.
- Pan, X., Yang, M. Q., Fu, X., Zhang, N., Xu, Y. J. (2013): Defective TiO₂ with oxygen vacancies: Synthesis, properties and photocatalytic applications, *Nanoscale*. 5, 3601–3614.
- Patil, A. L., Patil, P. N., Gogate, P. R. (2014): Degradation of imidacloprid containing wastewaters using ultrasound based treatment strategies, *Ultrason. Sonochem.* 21, 1778–1786.
- Sumon, K. A., Ritika, A. K., Peeters, E. T. H. M., Rashid, H., Bosma, R. H., Rahman, M. S., Fatema, M. K., Van den Brink, P. J. (2018): Effects of imidacloprid on the ecology of subtropical freshwater microcosms, *Environ. Pollut.* 236, 432–441.
- Wong, M. J., Liao, L. H., Berenbaum, M. R. (2018): Biphasic concentration-dependent interaction between imidacloprid and dietary phytochemicals in honey bees (*Apis mellifera*), *PLoS One*. 13, 1–15.
- Xu, Y., Wu, S., Wan, P., Sun, J., Hood, Z. D. (2017): Introducing Ti³⁺ defects based on lattice distortion for enhanced visible light photoreactivity in TiO₂ microspheres, *RSC Adv.* 7, 32461–32467.
- Yari, K., Seidmohammadi, A., Khazaei, M., Bhatnagar, A., Leili, M. (2019): A comparative study for the removal of imidacloprid insecticide from water by chemical-less UVC, UVC/TiO₂ and UVC/ZnO processes, *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 17, 337–351.
- Zheng, W., Liu, W. (1999): Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid, *Pestic. Sci.* 55, 482–485.

Functionalized TiO₂ for photocatalytic degradation of neonicotinoid insecticides

Marina Duplančić*, Vanja Gilja, Ivana Elizabeta Zelić, Vesna Tomašić

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: marina.duplancic@fkit.hr*

Summary

The aim of this paper was to study the photocatalytic degradation of imidacloprid in model wastewater on an immobilized photocatalyst layer under conditions of simulated and natural solar radiation. The studies were performed in a plate photoreactor with recirculation of reaction mixtures under different operating. In order to move the active working range of the commercially available TiO₂ catalyst to the visible part of the spectrum and to improve the economic efficiency of the process, various functionalization procedures were applied, including pretreatment of photocatalysts with UVC radiation in aqueous suspension (TiO₂-UVC-S), pretreatment of immobilized TiO₂ layer by direct UVC radiation after preparation of such a layer (TiO₂-UVC-D), doping TiO₂ with nitrogen using urea (TiO₂-U) and cold plasma pretreatment with nitrogen (TiO₂-PL N₂) or argon (TiO₂-PL Ar). All procedures resulted in a reduction of the band gap, E_{bg} . The largest reduction of E_{bg} was achieved for the sample modified with cold plasma in a stream of nitrogen (TiO₂-PL N₂). It was found that TiO₂-UVC-D, TiO₂-UVC-S and TiO₂-U show higher photocatalytic activities compared to photocatalysts modified with cold plasma of nitrogen and argon (TiO₂-PL N₂, TiO₂-PL Ar). The optimal pH range for photodegradation of imidacloprid on an immobilized TiO₂-UVC-D layer was between 5 and 7. The recirculation flow rate of the reaction mixture did not significantly affect the efficiency of photodegradation. The largest reduction in imidacloprid concentration under the conditions used in this paper was achieved under natural solar radiation, which was explained by radiation intensity.

Keywords: photocatalytic degradation, neonicotinoids, imidacloprid, TiO₂

Preparation and characterization of biodegradable poly(lactid acid) and poly(ethylene oxide) blends

Miće Jakić*, Sanja Perinović Jozić, Tina Slatina, Mihaela Storić

*Faculty of Chemistry and Technology, University of Split,
Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia
Corresponding author: mjakic@ktf-split.hr

Summary

The aim of this work was to prepare blends of biodegradable polylactid acid (PLA) with poly(ethylene oxide) (PEO) and to investigate possible interactions within prepared polymer blends. Investigated blends were prepared by hot melt extrusion (HME) process in a laboratory extruder. The thermal characteristics of neat polymers and their blends were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) in a nitrogen atmosphere. The glass transition temperature of PLA in the PLA/PEO blends could not be determined because it was overlapped with an endothermic peak of PEO melting. The change of melting temperatures at higher PLA or PEO content indicated that PLA and PEO are only partially miscible in the melt. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used to investigate possible interactions between polymers. The observed shifting of peak maxima in FT-IR spectra of blends with higher PLA or PEO content are significant enough to confirm the interactions between the investigated polymers in blends, as well as the results of DSC analysis. Thermal stability of PLA/PEO blends has been investigated by thermogravimetric analysis (TG) in non-isothermal heating regime in a nitrogen atmosphere. Neat polymers exhibit single stage degradation, while a two-stage degradation pattern is seen in the case of all PLA/PEO blends. From characteristic of TG curves, it could be concluded that the degradation of PLA/PEO blends starts at lower temperatures and occurs more slowly by addition of PEO.

Keywords: polylactid acid, poly(ethylene oxide), differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis

Introduction

Poly(lactic acid) (PLA) as an environmentally friendly biodegradable polymer, derived from renewable agricultural resources such as corn and sugar cane, is a promising alternative to petroleum-based polymers because of its renewability, biodegradability, compostability and non-toxicity. PLA is one of the most frequently used biodegradable polymers, especially in packaging and medical applications due to its high strength, high modulus, good transparency, processability and biocompatibility. However, PLA also has the drawbacks of inherent brittleness and poor toughness, which limit its large-scale commercial applications. In order to compete with the low-cost commodity polymers, many strategies such as blending PLA with other polymers, modifying PLA with plasticizers, blending with inorganic nano-fillers or copolymerization have been devised. The blending of PLA with other biocompatible polymers, i.e. poly(ethylene oxide), is considered as a practical and economical approach (Yang et al 2001; Chieng et al. 2014; Saha et al. 2018).

Poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(ethylene oxide) (PEO) are the most commercially important polyethers. PEG refers to an oligomer (molecular weight below 20,000) and PEO is polymer of ethylene oxide commercially available in the wide range of molecular weights (20,000–8,000,000). Besides the differences in molecular weight they have different end groups (PEG: –OH and PEO :–CH₃) and different physical properties. However, due to chain length effects, their chemical properties are nearly identical (Vrandečić et al. 2010). As a biodegradable plasticizer, low-molecular weight PEG, due to its miscibility, biodegradability and food contactable application, has proved to be the most suitable as an impact modifier for PLA (Mohapatra et al. 2014). Sheth et al. (1997) have investigated PLA/PEG blends and concluded that depending upon the PEG concentration miscibility varied from completely miscible to partially miscible. Recent studies on PLA plasticized with PEG in various contents have shown a limit of miscibility of polymer blends. The plasticizing efficiency increased with decreasing molecular weight of PEG. However, the same showed brittle nature at higher content because of a lack of adhesion between the separate phases. The addition of PEG also reduced the glass transition temperature and the melting temperature of the virgin polymer (Mohapatra et al. 2014). Chieng et al. (2013) employed PEG to improve the ductility of PLA. PEG acted as plasticizer and reduced glass transition temperature of PLA. Likewise, PLA/PEG blend was not stable due to phase separation at ambient temperatures leading to the formation of PLA-rich and PEG-rich phases (Hu et al. 2003b). However, papers dealing with high molecular PEO in the blend with PLA are only few (Nijenhuis et al. 1996, Oliveira et al. 2013, Saha et al. 2018). Nijenhuis et al. (1996), by using differential scanning calorimetry, concluded that blends containing up to 50 weight % PEO showed single glass transition temperatures. Likewise, the PLA and PEO melting temperatures were found to decrease on blending. Finally, later authors concluded that the PLA and PEO are miscible in the amorphous phase. On the other hand, Oliveira et al. (2013) investigated the properties of mixtures of PLA and PEO in polymer solutions (chloroform) by dilute solution viscometry and infrared spectroscopy. Their results revealed interactions, which authors attributed to dipole–dipole interactions between the ester groups of PLA and the ether groups of PEO.

In this work, an attempt was made to prepare blends of biodegradable PLA with high molecular PEO by hot-melt extrusion, technique commonly used in plastic industry. Likewise, in order to elucidate possible interaction of PLA and PEO in the melt, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis were utilized.

Materials and Methods

PEO, supplied by Sigma-Aldrich (100 000 g/mol), and PLA, supplied by NatureWorks (72 000 g/mol), were utilized. The PLA/PEO blends of different mass fraction of polymers (100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 and 0/100) were prepared by extrusion in a laboratory extruder (Dynisco, Qualitest North America) at 170 °C and screw speed 120 rpm. Fig. 1 represent the extruded samples used for further characterization. It is evident (colour) that neat polymers and their blends didn't undergo thermal degradation during preparation process.

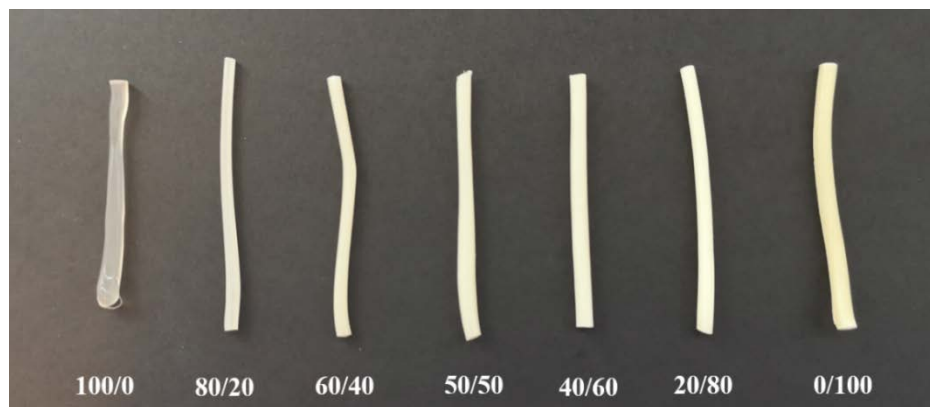


Figure 1. The extruded samples of PLA/PEO blends

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra were recorded on Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer by the Horizontal Attenuated Total Reflectance (HATR) technique. The internal reflection crystal, made of zinc selenide (ZnSe), had a 45° angle of incidence to the IR beam. Spectra were acquired in the measurement range 4000-650 1/cm at the room temperature. Signals were collected in 10 scans at a resolution of 4 1/cm and were ratiomed against a background spectrum recorded from the empty ZnSe crystal at the room temperature.

Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermal characteristics of PLA/PEO blends were investigated by the differential scanning calorimetry (Mettler Toledo DSC 823^o) in the nitrogen atmosphere (30 mL/min). The calibration was performed with indium and the samples were pressed in aluminium pans. The samples of approximately 15 mg were heated at a rate of 20 °C/min from (-90) to 210 °C, cooled at the same rate to (-90) °C and reheated to 210 °C. All thermal transition parameters of the PLA/PEO blends (glass transition, melting and crystallization) were determined according to international standards ISO 11357-2 and ISO 11357-326. More information can be found in the work of Jakić et al. (2016) and Perinović Jozić S. et al (2020).

Thermogravimetric analysis (TG)

Thermogravimetric measurements of the PLA/PEO blends were conducted by using PerkinElmer Pyris 1 TGA thermobalance at the heating rate of 10 °C/min in a temperature range 50-550 °C under a steady flow of nitrogen (20 mL/min). Samples weighing approximately 10 mg for the analysis were used. To evaluate the thermal stability of the investigated polymers different criteria were used (Jakić et al., 2013).

Results and Discussion

Fourier transform infrared spectroscopy

The FT-IR spectra of neat polymers and PLA/PEO blends are presented in Figs. 2 and 3. The spectra of neat polymers contain absorption bands that are characteristic only for PLA or PEO, respectively, and these peaks can be used as an indication of the specific interactions between polymers in the blend. Selected polymers spectrum characteristic peaks and corresponding assignments of interest are summarized in Table 1.

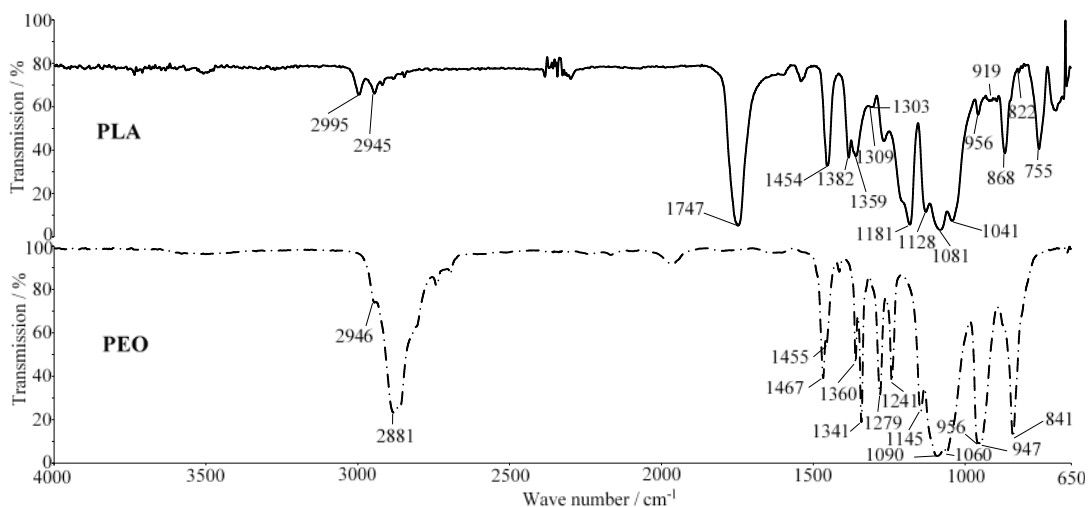


Figure 2. Comparison of the FT-IR spectra of neat PLA and neat PEO

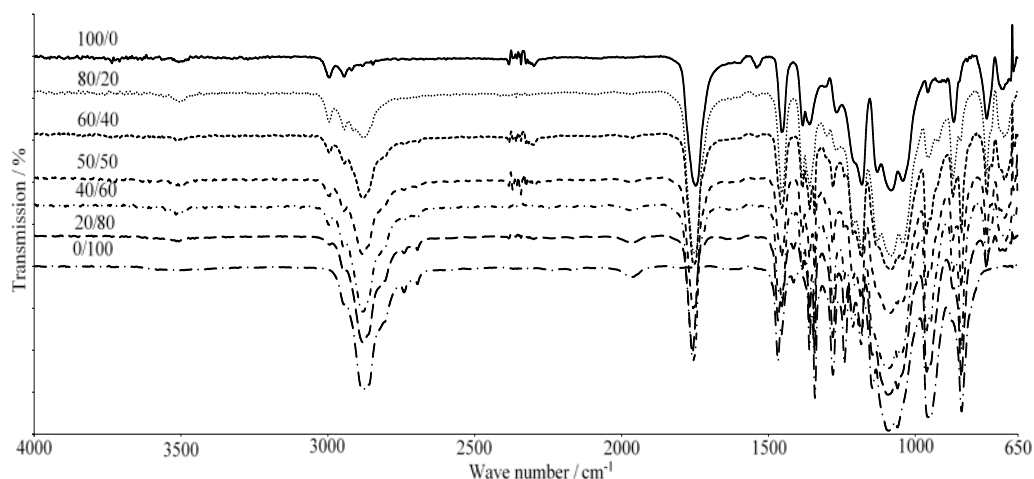


Figure 3. FT-IR spectra of PLA/PEO blends

Table 1. Selected wave numbers (cm^{-1}) and assignments of IR bands of interest, exhibited by neat polymers (Auras et al., 2010, Sim et al., 2010) in the PLA/PEO blends

PLA/PEO	100/0	80/20	60/40	50/50	40/60	20/80	0/100
C=O							
<i>asym. stretching</i>	1747	1750	1753	1756	1756	1759	-
C-O-C							
<i>stretching asym./sym.</i>	1181/ 1081	1181/ 1082	1182/ 1082	1182/ 1084	1183/ -	1183/ -	
C-O-C sym. stretching (triplet)	-/-/-	-/ -	-/ 1060	-/ 1060	-/ 1060	1144/ 1092/ 1060	1145/ 1090/ 1060
CH₂ rocking; C-O-C scissor/ deformation	-	845	842	842	842	841	841

The C=O stretching region that appeared in FT-IR spectra at 1747 cm^{-1} as a broad asymmetric band is characteristic of the ester (PLA). Upon PEO addition, the C=O band is shifted by 12 cm^{-1} (blend 20/80) to higher wave number. In the spectral range of $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, the crystalline phase of PEO is featured by the characteristic *triplet* with the sharp central peak of strong intensity (Sim et al., 2010). Changes in the intensity, shape, and position of the characteristic triplet can be associated with the interaction between PEO and PLA. The triplet maintains its shape while at the initial addition of PLA (20 %) the position of the maximum peak is shifted from 1090 cm^{-1} to 1092 and 1096 cm^{-1} , respectively. Likewise, in the same spectral range, the bands at 1181 and 1081 cm^{-1} are related to the asymmetric and symmetric C-O-C stretching of the crystalline phase of PLA (Auras et al., 2010), respectively. From Fig. 3 and Table 1 it is evident that in afore mentioned spectral range characteristic *triplet* of PEO is overlapped with C-O-C stretching of PLA or *vice versa*. On the contrary, all other characteristic peaks in the spectrum of investigated polymer blends are practically identical to neat ones which could be strong evidence of the non-existence of any interactions within the blends (Chieng et al. 2013, Saha et al. 2019). However, in our opinion the observed shifting of the broad asymmetric band (C=O) is the result of the weak interaction between the two polymers in solid state. These conclusions are partially in agreement with the work of Oliveira et al. (2013) which concluded that the nature of the interaction was most likely a result of dipole–dipole interactions between the ester groups of PLA and the ether groups of the PEO.

Differential scanning calorimetry

The results of the DSC measurements are shown as normalized DSC curves of neat polymers (Figs. 4 and 5) and PLA/PEO blends (Figs. 6 and 7). Thermal transition parameters of all investigated samples are listed in Table 2.

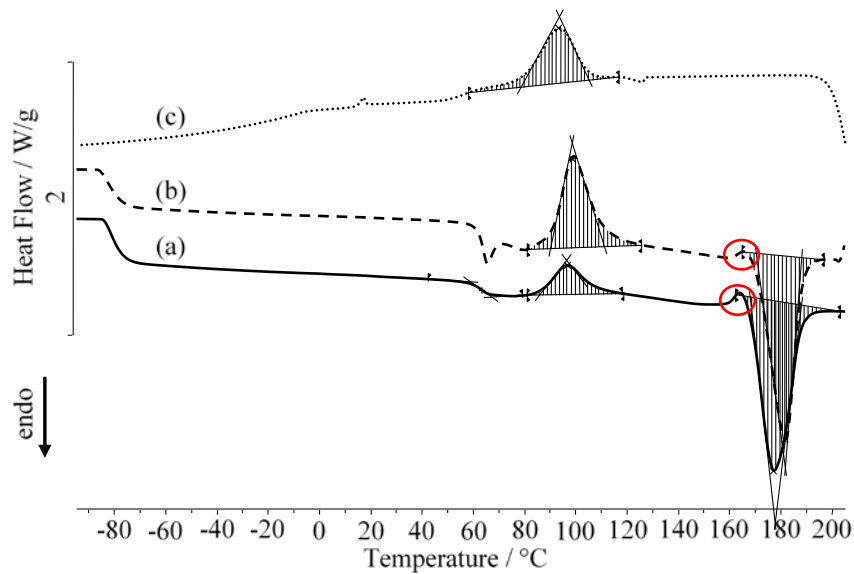


Figure 4. Normalized DSC curves of neat PLA: (a) second heating, (b) first heating and (c) cooling

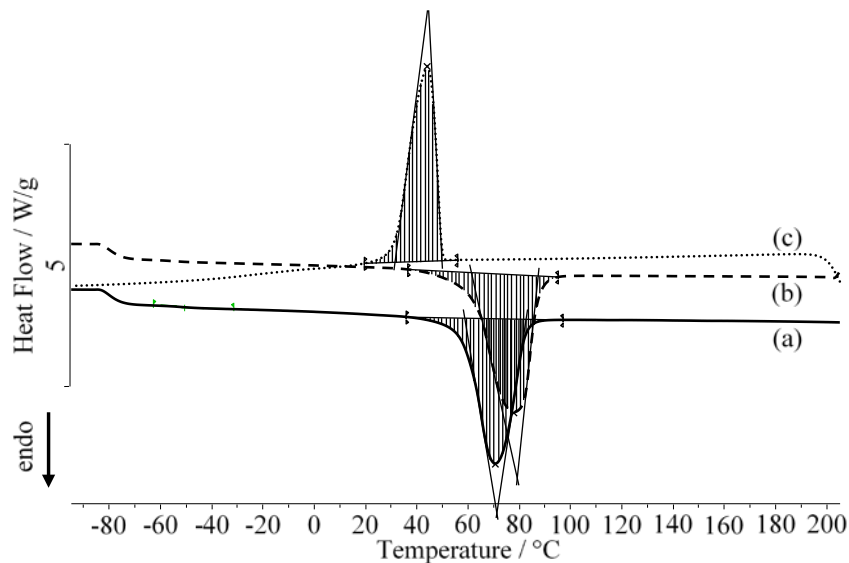


Figure 5. Normalized DSC curves of neat PEO: (a) second heating, (b) first heating and (c) cooling

The DSC heating curves of PLA/PEO blends (Fig. 6) show one glass transition temperature, which corresponds to the PEO, two endothermic peaks, which correspond to the melting of the PLA and PEO crystal phase, respectively, and one exothermic peak which corresponds to the premelting crystallization of the PLA. Likewise, the DSC cooling curves of all investigated blends (Fig. 7) show also two exothermic peaks which represents the melt crystallization of PLA and PEO, respectively.

It must be emphasized that only neat PLA has the exothermic peak of cold crystallization (Fig. 4) at temperature 86 °C (T_{eicc}), 97 °C (T_{pcc}) and 109 °C (T_{efcc}) with corresponding enthalpy of cold crystallization (ΔH_{cc}) -10.3 J/g. The cold crystallization is not visible in the other samples because PEO prevents PLA to crystallize during heating at even smallest addition of PEO (Fig.6).

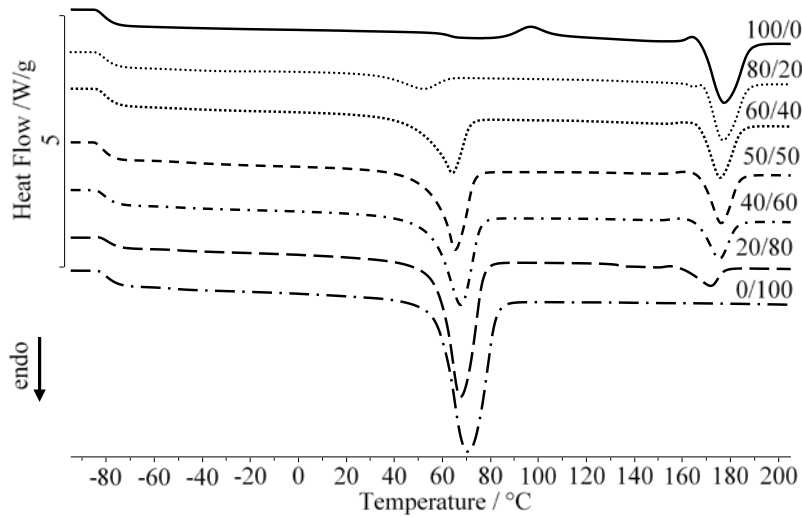


Figure 6. Normalized DSC curves of PLA/PEO blends, glass transition and melting (second heating)

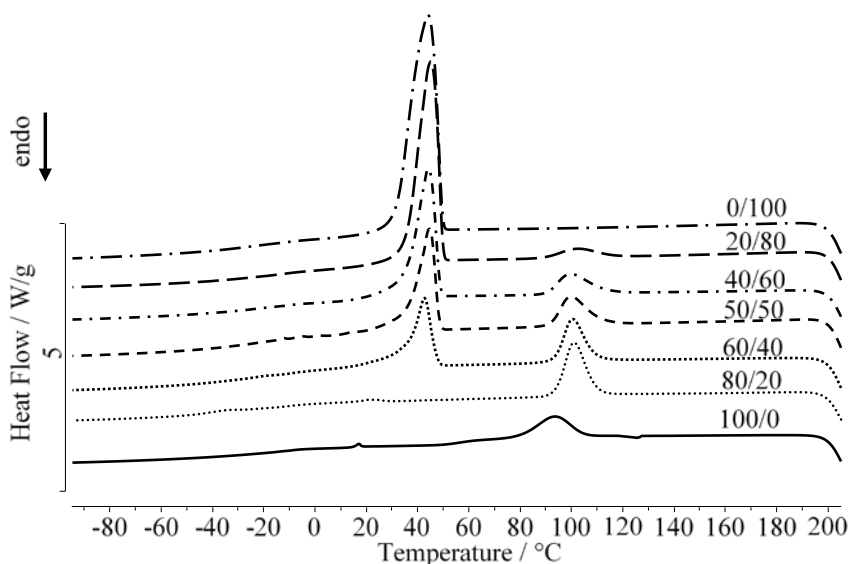


Figure 7. Normalized DSC curves of PLA/PEO blends, crystallization

The melting characteristics of the PEO in the blend 80/20 are determined but they are under the huge effect of glass transition from PLA that occurs in the same temperature region, so this melting appears at lower temperatures than melting of the PEO in other samples, while the glass transition of PLA is not visible. Because of this overlapping the melting of PEO cannot be taken as the indicator of miscibility between these two polymers. The glass transition of PLA is not visible, but it does not mean that it does not exist, so the visible glass transition of PEO cannot be considered for the miscibility too. Hence, the melting of PLA was used as the only miscibility criterion. As the PLA content increased in the investigated blends upon 50 %, the T_{mg} of PEO remains almost unchanged, while for samples with 60 % and 80 % of PLA content corresponding temperatures are increased toward T_g of PLA by 20–24 °C, as shown in Table 2. Likewise, in the case of melting temperature of the PEO, values of T_{eim} decreased from 58 °C for neat PEO to 35 °C for blend 80/20. Contrary, the melt crystallization temperatures of PEO depicted as T_{eimc} remained almost unchanged in all investigated blends. The T_{eipmc} of PLA decreases with the increase of PEO content in the blends, from 159 to 151 °C, with the exception at 80/20 blend (Table 2). On the other hand, the T_{eim} of PLA decreased upon higher PEO addition (>60 %); from 168 °C for neat PLA to 160 °C for blend 20/80. Corresponding melt crystallization temperatures (T_{eimc}) of PLA immediately increased by addition of minimum quantity of PEO from 106 °C for neat PLA to 110 °C for blend 80/20. Upon further addition of PEO, the change of values of T_{eimc} of PLA are more pronounced (117 °C for blend 20/80). This result also confirms the influence of PEO on the crystallization process of PLA that was noticed with the cold crystallization, but here it results with the earlier crystallization compared to the neat PLA. Upon PLA (PEO) addition values of corresponding enthalpies of melting (ΔH_m) and melt crystallization (ΔH_{mc}) of the PEO (PLA) in the blends are decreased (Table 2), as can be seen from the area of endothermic and exothermic peak, respectively (Figs. 6 and 7). The values of the corresponding enthalpy of premelting crystallization (ΔH_{pmc}) changes irregularly upon PEO addition, but they are all smaller in the blends than in the neat PLA (Table 2) pointing on the same conclusion according to PLA crystallization in the presence of PEO. The values of specific heat capacity (Δc_p) of the PEO are not affected by PLA addition. These results agree with FT-IR results and confirm the existence of possible interaction within PLA/PEO system. Finally, it can be concluded that the PLA and PEO are partially miscible at higher PLA or PEO content (80 %) in the melt. This is in accordance with the work of Seth et al. (1997), Zoppi et al. (2001) and Hu et al. (2003a,b).

Table 2. Thermal transition parameters of the PLA/PEO blends for DSC measurements

Parameter	PLA/PEO							
	100/0	80/20	60/40	50/50	40/60	20/80	0/100	
T_g (°C)	T_{eig}	58	-/-52	-/-55	-/-54	-/-56	-/-55	-56
	T_{mg}	63	-/-30	-/-26	-/-46	-/-50	-/-49	-50
	T_{efg}	67	-/-37	-/-35	-/-37	-/-46	-/-44	-47
Δc_p (J/g °C)	0.35	-/0.10	-/0.14	-/0.15	-/0.12	-/0.01	0.12	
T_{pmc} (°C)	T_{eipmc}	159	164/-	155/-	154/-	152/-	151/-	-
	T_{ppmc}	163	167/-	160/-	160/-	158/-	154/-	-
	T_{efpmc}	166	168/-	165/-	165/-	163/-	157/-	-
ΔH_{pmc} (J/g)	1.2	0.2/-	0.6/-	0.8/-	0.7/-	0.2/-	-	
T_m (°C)	T_{eim}	168	169/35	167/52	167/56	166/55	160/58	58
	T_{pm}	176	176/51	174/63	175/65	174/66	171/66	69
	T_{efm}	188	186/62	184/71	184/73	182/75	177/77	82
ΔH_m (J/g)	44.6	34.3/13.0	32.4/47.0	28.1/61.8	22.4/73.9	10.7/109.2	147.1	
T_{mc} (°C)	T_{eimc}	106	110/-	110/48	112/49	114/49	117/50	50
	T_{pmc}	94	102/-	101/43	100/45	100/45	103/47	46
	T_{efmc}	79	94/-	94/34	92/36	91/35	90/36	31
ΔH_{mc} (J/g)	21.7	29.8/-	23.3/39.4	20.5/52.0	16.3/69.2	7.8/103.6	143.2	

Thermogravimetric analysis

The dynamic thermogravimetric curves (mass versus degradation temperature), and corresponding derivative thermogravimetric (DTG) curves (mass loss rate versus temperature) of neat PLA and PEO are presented in Fig. 8. A one-stage degradation pattern is seen in the case of PLA. Thermal degradation of PLA begins at 335 °C (T_{onset}) with a peak temperature at 365 °C (T_{max}) and proceeds almost totally without residue which is supported by the fact that total weight loss through single degradation stage is 99.1 %.

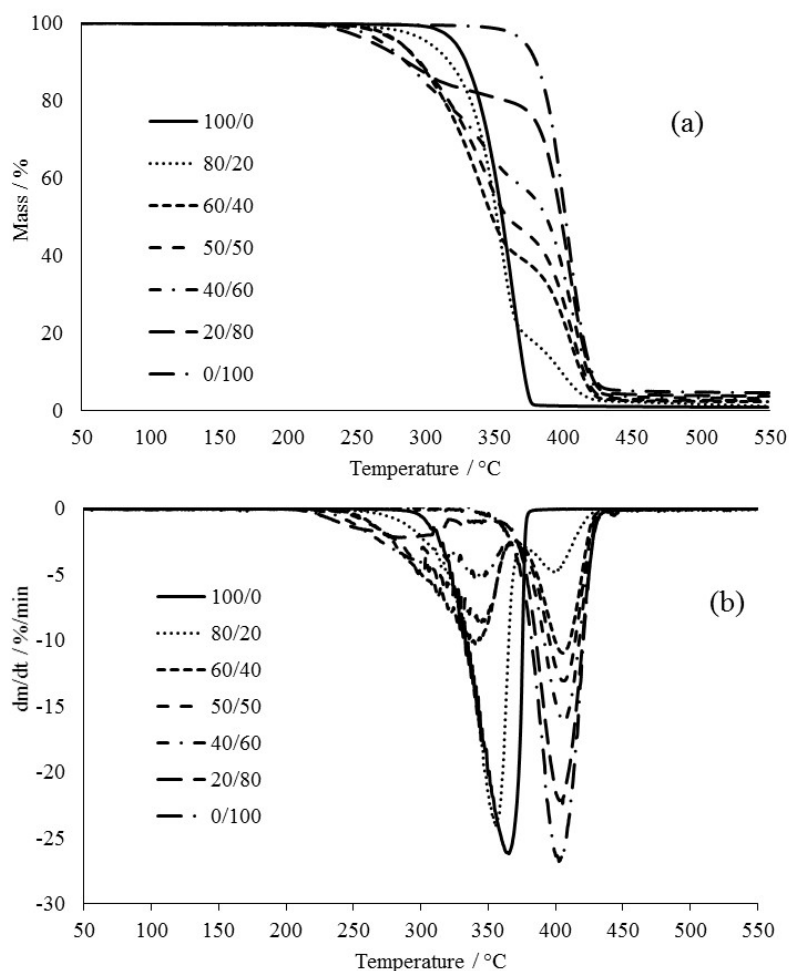


Figure 8. TG (a) and DTG (b) curves of the thermal degradation of the PLA/PEO blends

Likewise, thermal degradation of the neat PEO is also characterized by only a single degradation stage that begins at 382 °C (T_{onset}) with a peak temperature at 403 °C (T_{max}) confirming its superior thermal stability to PLA. The total weight loss is found to be 95.3 %. *Vice versa*, a two-stage degradation pattern is seen in the case of the PLA/PEO blends. Evidently, the first degradation stage corresponds to thermal degradation of PLA, while the second one corresponds to thermal degradation of PEO (Fig. 8). The dependence of the characteristics of TG and DTG curves on the blend composition is presented in Table 3. From these data it could be concluded that the degradation of PLA/PEO blends starts at even lower temperatures than neat PLA and occurs more slowly by addition of PEO (PLA). In the first degradation stage, a total increase of T_{onset} by 95 °C is observed as the PEO content is increased. Similarly, the temperature at 5 % mass loss and peak temperature also show the same change pattern. The sample with 80 % of PEO content showed the lowest values of all investigated blends, indicating its apparent destabilizing effect on PLA. Similar conclusions were reached by Chieng et al. (2013) and Bijarimi et al. (2016). Chieng et al. (2013) explained the decrease of the PLA thermal stability by the presence of PEG (PEO) as plasticizer.

PEG promotes a decrease in thermal stability by its action to intersperse itself around polymers and by breaking polymer-polymer interactions, which are predicted in the lubricity theory and gel theory of plasticization. Additionally, Hassouna et al. (2011) investigated new approach on the development of plasticized PLA with PEG via reactive extrusion. Latter authors pointed out that the products of PEG degradation (generated above 280 °C) could promote PLA degradation. The reaction between hydroxyl terminated groups of PEG and PLA ester functions, acidity, catalysts or some impurities could be the sources of such degradation. Finally, authors concluded that the addition of PEG makes certainly PLA more sensitive to thermal stability at higher temperatures (> 300 °C). However, in the second degradation stage, changes of T_{onset} and T_{max} value are minor and practically negligible. The mass loss in the first degradation stage decreased linearly as the PEO content increased in the blend, while mass loss in the second degradation stage increased. The final mass losses in the first and second stage increased linearly as the PEO content increased, that could be an additional indicator of PEO destabilising effect on PLA.

Table 3. The characteristics of thermal degradation curves of the PLA/PEO blends

PLA/PEO	$T_{5\%}$ (°C)	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	R_{max} (% 1/min)	m_f (%)	Δm (%)
<i>First degradation stage</i>						
100/0	321	335	365	26.3	0,9	99,1
80/20	301	329	355	24.1	18.4	81.6
60/40	281	296	341	10.2	39.3	60.7
50/50	279	293	344	8.6	47.0	53.0
40/60	268	275	340	5.3	58.7	41.3
20/80	261	240	284	2.2	80.7	19.3
0/100	371	382	403	26.8	4.7	95.3
<i>Second degradation stage</i>						
100/0	-	-	-	-	-	-
80/20	-	389	400	4.8	1.1	17.2
60/40	-	390	405	11.0	2.4	37.0
50/50	-	389	406	13.1	2.6	44.4
40/60	-	389	407	16.2	3.1	55.5
20/80	-	385	403	22.2	3.9	76.9
0/100	-	-	-	-	-	-

Conclusions

In this work, blends of biodegradable PLA with high molecular PEO were prepared by hot-melt extrusion, technique commonly used in plastic industry. The extruded samples, used for further characterization, didn't undergo thermal degradation during preparation process. The observed shifting of the broad asymmetric band (C=O) is the result of the weak interaction between the two polymers in solid state, which can be attributed to the dipole–dipole interactions between the ester groups of PLA and the ether groups of the PEO.

As the PLA content increased in the investigated blends upon 60 % and 80 %, the T_{mg} of PEO are increased toward T_{mg} of PLA by 20–24 °C. Likewise, the similar pattern could be seen in the case of melting temperature of PLA and PEO in the blends. DSC results are in agreement with FT-IR results and confirm that the PLA and PEO are partially miscible at higher PLA or PEO content (80 %) in the melt. Thermal degradation of neat PLA and neat PEO proceeds almost totally without residue by only a single degradation stage confirming PEO's superior thermal stability to PLA. A two-stage degradation pattern is seen in the case of the PLA/PEO blends where the first degradation stage corresponds to thermal degradation of PLA and the second one to thermal degradation of PEO. From TG data it could be concluded that the degradation of PLA/PEO blends starts at even lower temperatures than neat PLA and occurs more slowly by addition of PEO (PLA). Moreover, the sample with 80 % of PEO content showed the lowest values of all investigated blends, indicating its apparent destabilizing effect on PLA.

References

- Auras, R., Lim, L., Selke, S., Tsuji, H. (2010): Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- Bijarimi, M., Ahmad, S., Rasid, R., Khushairi, M. A., Zakir, M. (2016): Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) blends: Mechanical, thermal and morphological Properties, AIP Conference Proceedings 1727, 020002 (2016); doi: 10.1063/1.4945957.
- Chiang, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., Hussein, M. Z. (2013): Plasticized Poly(lactic acid) with Low Molecular Weight Poly(ethylene glycol): Mechanical, Thermal, and Morphology Properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 130, 4576–4580.
- Chiang, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., Hussein, M. Z. (2014): Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets, *Polymers* 6, 93–104.
- Hassouna, F., Raquez, J-M., Addiego, F., Dubois, P., Toniazzo, V., Ruch, D. (2011): New approach on the development of plasticized polylactide (PLA): Grafting of poly(ethylene glycol) (PEG) via reactive extrusion, *Eur. Polym. J.* 47, 2134–2144.
- Hu, Y., Topolkaev, V., Hiltner, A., Baer, E. (2003a): Crystallization and phase separation in blends of high stereoregular poly(lactide) with poly(ethylene glycol), *Polym.* 44, 5681–5689.
- Hu, Y., Topolkaev, V., Hiltner, A., Baer, E. (2003b): Aging of poly(lactide)/poly(ethylene glycol) blends. Part 2. Poly(lactide) with high stereoregularity, *Polymer.* 44, 5711–5720.
- ISO 11357-2: 2009 Plastics-Differential scanning calorimetry (DSC)-Part 2: Determination of glass transition temperature.
- ISO 11357-3: 2009 Plastics - Differential scanning calorimetry (DSC) - Part 3: Determination of temperature and enthalpy of melting and crystallization.
- Jakić, M., Stipanelov Vrandečić, N., Klarić, I. (2013): Thermal degradation of poly(vinyl chloride)/poly(ethylene oxide) blends: Thermogravimetric analysis, *Polym. Degrad. Stab.* 98, 1738–1743.
- Jakić, M., Stipanelov Vrandečić, N., Ocelić Bulatović, V., Govorčin Bajsić, E. (2016): Miscibility of Poly(Vinyl Chloride) with Poly(Ethylene Oxide) of Different Molecular Weights, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 30 (1) 61–71.
- Mohapatra, A. K., Mohanty, S., Nayak, S. K. (2014): Effect of PEG on PLA/PEG Blend and Its Nanocomposites: A Study of Thermo-Mechanical and Morphological Characterization, *Polym. Compos.* 35, 283–293.

- Nijenhuis, A. J., Colstee, E., Grijpma, D. W., Pennings, A. J. (1996): High molecular weight poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide) blends: thermal characterization and physical properties, *Polymer*. 37, 5849-5857.
- Oliveira, J. E., Moraes, E. A., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H. C., Glenn, G. M., Medeiros, E. S. (2013): Properties of Poly(lactic acid) and Poly(ethylene oxide) Solvent Polymer Mixtures and Nanofibers Made by Solution Blow Spinning, *J. Appl. Polym. Sci.* 129, 3672-3681.
- Perinović Jozić, S., Jozić, D., Jakić, J., Andričić, B. (2020): Preparation and characterization of PLA composites with modified magnesium hydroxide obtained from seawater, *J. Therm. Anal. Calorim.* 142, 1877-1889.
- Saha, D., Samal, S., Biswal, M., Mohanty, S., Nayak, S. (2018): Preparation and characterization of poly(lactic acid)/poly(ethylene oxide) blend film: effects of poly(ethylene oxide) and poly(ethylene glycol) on the properties, *Polym. Int.* 68, 164-172.
- Sheth, M., Kumar, R., Dave, V., Gross, R., Mccarthy, S. (1997): Biodegradable polymer blends of poly(lactic acid) and poly(ethylene glycol), *J. Appl. Polym. Sci.* 66, 1495-1505.
- Nijenhuis, A., Colstee, E., Grijpma, D., Pennings, A. (1996): High molecular weight poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide) blends: thermal characterization and physical properties, *Polym.* 37, 5849-5857.
- Sim, L., Gan, S. N., Chan, C. H., Yahya, R. (2010): ATR-FTIR studies on ion interaction of lithium perchlorate in polyacrylate/poly(ethylene oxide) blends. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 76, 287-292.
- Zoppi, R., Duek, E. A., Coraça, D., Barros, P. (2001): Preparation and Characterization of Poly (L-Lactic Acid) and Poly (Ethylene Oxide) Blends, *Materials Resh.* 4, 117-125.
- Yang, X., Kang, S., Shaw Ling Hsu, S. L., Stidham, H. D., Smith, P. B., Leugers, A. (2001): A Spectroscopic Analysis of Chain Flexibility of Poly(lactic acid). *Macromolecules.* 34, 5037-5041.

Utjecaj procesnih parametara na kinetiku sušenja i morfologiju djelatne tvari

Katarina Jozinović¹, Aleksandra Sander^{1*}, Gordana Vrbanc²

¹Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR – 10 000 Zagreb

²PLIVA HRVATSKA d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, HR - 10 000 Zagreb

*Dopisni autor: asander@fkit.hr

Sažetak

U ovom radu istražena je kinetika sušenja natrijeve soli cirkonija u različitim laboratorijskim sušionicima. Odabrana su dva vakuum sušionika, jedan s pliticama i jedan rotacijski te sušionik s fluidiziranim slojem. Osim vrste sušionika, istražen je i utjecaj početnog sadržaja vlage materijala kao i temperature na kinetiku sušenja i morfološka svojstva osušenih kristala. Kinetika sušenja praćena je gravimetrijski u vakuum sušionicima te psihometrijski u sušioniku s fluidiziranim slojem. U sušioniku s fluidiziranim slojem također je istraženo može li se bliskom infracrvenom spektroskopijom (NIR, engl. *Near InfraRed*) pratiti kinetika sušenja.

Rezultati su pokazali da vrsta sušionika i temperatura utječu na kinetiku sušenja i morfologiju kristala. Veće brzine sušenja ostvarene su pri višim temperaturama. Pri nižim temperaturama sušenje je brže u sušioniku s fluidiziranim slojem, a pri višim temperaturama u vakuum sušionicima. Mjerni podaci aproksimirani su Lewisovim i Pageovim matematičkim modelom. Pageov model uspješno opisuje kinetiku sušenja natrijeve soli cirkonija u svim istraživanim sušionicima. Vrijednost parametra k raste s porastom temperature i početnog sadržaja vlage materijala. Na parametar n utječe početni sadržaj vlage i metoda sušenja.

U rotacijskom vakuum sušioniku i u sušioniku s fluidiziranim slojem dolazi do loma kristala što rezultira većom širinom raspodjele veličina kristala. Bliska infracrvena spektroskopija pokazala se kao dobra metoda praćenja kinetike sušenja u fluidiziranom sloju.

Ključne riječi: kinetika sušenja, matematički modeli, sušenje u fluidiziranom sloju, vakuum sušenje

Uvod

Sušenje je toplinski separacijski proces uklanjanja vlage iz materijala posredstvom topline, koji je u velikoj mjeri zastupljen u farmaceutskoj industriji. Uobičajeno se proizvodnja lijeka, koji će biti distribuiran u čvrstoj formi, odvija u dva slijedna stupnja: primarni i sekundarni. Primarni stupanj, odnosno proizvodnja djelatne tvari, uključuje kemijsku sintezu i fizikalnu modifikaciju kako bi se dobila željena veličina čestica i odgovarajuća fizikalna svojstva djelatne tvari. U sekundarnom stupnju djelatna se tvar miješa s pomoćnim tvarima kako bi se dobio željeni dozirni oblik (Kemp, 2017). Nakon svakog od tih stupnjeva proizvod se suši, a odabir odgovarajućeg sušionika ovisi o svojstvima materijala kao što su njegova forma, toplinska osjetljivost i kinetika sušenja. Kako je većina djelatnih tvari kristalinična, neophodno je osigurati da se tijekom sušenja ne naruši struktura kristala te da se izbjegne

kontaminacija (Burgbacher i Wiss, 2008). Kvaliteta produkta se tijekom sušenja također može mijenjati kao posljedica predugog vremena izloženosti povišenoj temperaturi ili zbog nastajanja neželjenih produkata razgradnje. Sušenje je često dugotrajan proces koji troši velike količine energije i sušnog medija. Prilikom odabira metode sušenja važno je da se kvaliteta konačnog produkta ne mijenja. Da bi se osigurala ujednačena kvaliteta konačnog proizvoda, neophodno je utvrditi odgovarajuće ponovljive uvjete sušenja (Guerrero et al., 2003). Obzirom da su farmaceutski proizvodi visokovrijedni, ušteda energije vrlo često nije od najvećeg značaja pri odabiru metode sušenja.

Odabir vrste sušionika temelji se na vrsti materijala i svojstvima konačnog produkta. Međutim, industrijska postrojenja često se koriste za proizvodnju različitih produkata i uglavnom su ograničena na mali broj sušionika definirane veličine. Sušenje čvrstih formi provodi se u konvekcijskim ili kontaktnim sušionicima, sušenje pasti u sušionicima s pliticama ili pokretnim trakama, a sušenje suspenzija u sušionicima s raspršivanjem ili sušionicima s fluidiziranim slojem. Za potrebe uklanjanja malih količina vlage iz toplinski osjetljivog proizvoda sušenje se provodi liofilizacijom (Pakowski i Mujumdar, 1987). Sušionici koji se koriste u farmaceutskoj industriji često su sofisticiraniji od sušionika korištenih u drugim industrijama zbog potrebe za postizanjem visoke kvalitete proizvoda.

Sušionici s fluidiziranim slojem koriste se u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Sušenje se može provoditi pri relativno niskim temperaturama i velikim brzinama sušenja, što ovu vrstu sušionika čini pogodnim za sušenje toplinski osjetljivih materijala (Chen et al., 2017). U farmaceutskoj se industriji često koriste relativno mali šaržni sušionici s fluidiziranim slojem. Osim za sušenje mogu se koristiti i za hlađenje i granuliranje, a uz određene modifikacije i za sušenje polidisperznih i relativno ljepljivih materijala. Za sušenje materijala osjetljivih na povišenu temperaturu ili materijala koji je sklon oksidaciji u vlažnom stanju, sušenje se može provesti u vakuum sušionicima. Različite izvedbe vakuum sušionika također nalaze svoju primjenu u farmaceutskoj industriji (Agrawal et al., 2015).

Tijekom sušenja, osim prijenosa topline i tvari može doći do fizikalnih ili kemijskih promjena materijala koji se suši što može utjecati na strukturu materijala. Promjena strukture materijala u velikoj mjeri otežava matematičko modeliranje procesa sušenja (Marinos-Kouris i Maroulis, 1987). Poznavanje kinetike sušenja neophodno je za dizajn i odabir odgovarajućeg sušionika. Za opis kinetike sušenja najčešće se koriste empirijski i poluempirijski modeli tankog sloja (Sander, 2007). Najčešće korišteni matematički modeli su Lewisov (1921) i Pageov (1949) model. Lewisov se model zasniva na Newtonovom zakonu hlađenja. Prema tom modelu, brzina sušenja tijekom perioda padajuće brzine proporcionalna je razlici trenutnog i ravnotežnog sadržaja vlage materijala, a konstanta proporcionalnosti K , predstavlja konstantu sušenja, jed. 1:

$$\frac{X-X_{eq}}{X_0-X_{eq}} = e^{-K \cdot t} \quad (1)$$

Page uvodi eksponent na vrijeme, čime je osiguran opis kinetike sušenja uz visok stupanj korelacije, jed. 2:

$$\frac{X-X_{eq}}{X_0-X_{eq}} = e^{-k \cdot t^n} \quad (2)$$

Pageov se model pokazao uspješnim za opis kinetike sušenja različitih vrsta materijala neovisno o primijenjenoj metodi sušenja.

Indeks korelacije, ρ , izračunat je korištenjem izraza, jed. 3:

$$\rho = \sqrt{1 - \frac{\sum_i (X_{rač} - X_{eks})^2}{\sum_i (\bar{X} - X_{eks})^2}} \quad (3)$$

Provođenje eksperimenata u različitim uvjetima sušenja omogućava procjenu utjecaja procesnih parametara na parametre odabranog matematičkog modela. Poznavanjem navedenih ovisnosti moguće je procijeniti vrijeme trajanja procesa pri drugačijim uvjetima sušenja bez potrebe za provođenjem velikog broja eksperimenata.

Kvaliteta osušenog proizvoda ovisi i o konačnom sadržaju vlage. Metode određivanja završetka sušenja često zahtijevaju prekidanje procesa sušenja kako bi se uzeo uzorak i analizirao. Konvencionalne metode određivanja zaostalog sadržaja vlage materijala su gravimetrijska metoda, Karl Fischerova titracijska metoda te plinska kromatografija. *Online* praćenje procesa sušenja spektrometrijski omogućava bolju kontrolu procesa i u konačnici kraće vrijeme sušenja. Također je smanjena mogućnost presušivanja, degradacije i promjene kristalne strukture materijala zbog predugog vremena izloženosti povišenoj temperaturi te promjenljivim uvjetima u sušioniku. Bliskom infracrvenom spektroskopijom može se pratiti udio vlage u mediju za sušenje ili u materijalu koji se suši. Mjerenje količine vlage u mediju za sušenje provodi se ukoliko je sušenjem potrebno ukloniti svu nevezanu vlagu te ukoliko vlaga nije ugrađena u kristalnu rešetku. U svim ostalim slučajevima, poželjno je mjeriti udio vlage u praškastom materijalu (Burgbacher i Wiss, 2008).

U ovom radu istražen je utjecaj vrste sušionika i temperature na kinetiku sušenja praškastog materijala, tj. djelatne tvari (API, engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*). Također je istražena mogućnost korištenja bliske infracrvene spektroskopije za praćenje promjene sadržaja vlage tijekom sušenja u fluidiziranom sloju te je ispitan utjecaj metode sušenja na granulometrijska svojstva kristala.

Materijal i metode

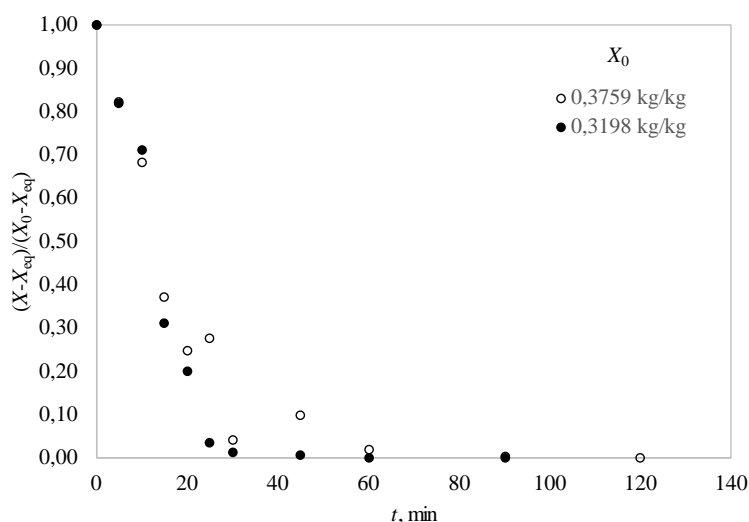
Natrijeva sol cirkonija suspendirana je u vodi te je postupno dodavana 0,15 M otopina HCl kako bi se podesila vrijednost optimalnog pH otopine (6,0 - 6,5). Kristali su izdvojeni vakuum filtracijom. Početni sadržaj vlage tako pripremljenih kristala određen je termogravimetrijskom metodom koristeći halogeni vlagomjer, *Mettler Toledo HX204 Moisture analyzer*. Sušenje je provedeno u vakuum sušioniku s pliticama ($p = 100$ mbar; $T = 60$ °C), rotacijskom vakuum sušioniku ($p = 45$ mbar; $n = 100$ o/min; $T = 30$ i 60 °C) i u sušioniku s fluidiziranim slojem (u struji dušika; $T = 30$ i 60 °C). Kinetika sušenja u vakuum sušionicima određena je gravimetrijskom, a u sušioniku s fluidiziranim slojem psihrometrijskom metodom. Kristalima je snimljen je spektar bliskog infracrvenog zračenja na spektrometru proizvođača *Bruker* u integracijskoj sferi u području od 12000 do 4000 cm^{-1} , rezolucijom od 4 cm^{-1} . Također su određena i granulometrijska svojstva kristala. Raspodjela veličina kristala određena je metodom laserske difrakcije na uređaju *Mastersizer 2000, Malvern Instruments*. Morfologija kristala određena je na temelju fotografija snimljenih pretražnim elektronskim mikroskopom, *Jeol JSM – 5800*.

Rezultati i rasprava

U ovom radu istražen je utjecaj vrste sušionika, temperature i početnog sadržaja vlage materijala na brzinu sušenja natrijeve soli cirkonija. Sušenje je provedeno u vakuum sušionicima (s pliticama i rotacijski) i sušioniku s fluidiziranim slojem. Tijekom sušenja praćena je kinetika procesa, a mjerni su podaci aproksimirani odabranim matematičkim modelima.

Utjecaj uvjeta provedbe procesa na kinetiku sušenja

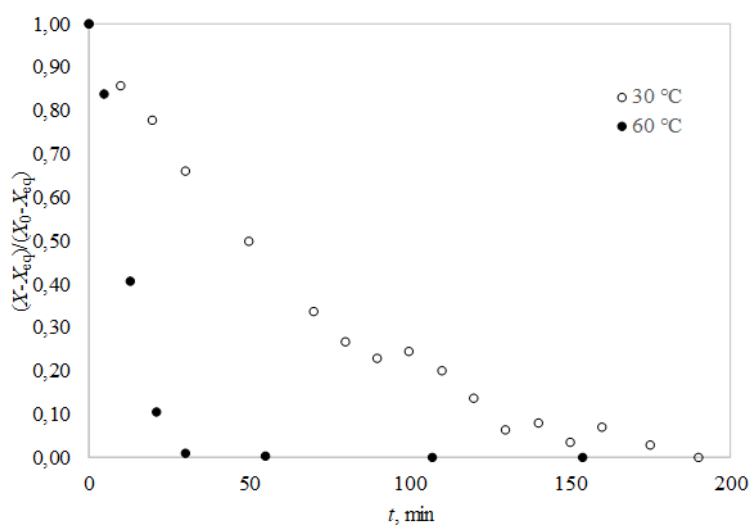
S obzirom na način pripreme uzoraka nije bilo moguće osigurati isti početni sadržaj vlage materijala za sve eksperimente pa je u vakuum sušioniku s pliticama, VSP, istražen utjecaj početnog sadržaja vlage na kinetiku sušenja. Krivulje sušenja prikazane su u normiranom obliku kao ovisnost neostvarene promjene sadržaja vlage materijala o vremenu, slika 1. Vrijeme sušenja uzorka nešto većeg početnog sadržaja vlage je dulje jer se tijekom sušenja uklanja veća količina vlage iz materijala. Kod uzorka s većim početnim sadržajem vlage može se uočiti i veće odstupanje eksperimentalnih podataka od uobičajenog trenda. To je posljedica nedovoljno precizne metode uzorkovanja. U definiranim vremenskim intervalima uziman je dio uzorka te mu se određivao sadržaj vlage. Istovremeno je cijeli uzorak vađen iz sušionika i vagan. Na taj način došlo je do promjene stanja u sušioniku kao i do promjene mase suhog materijala.



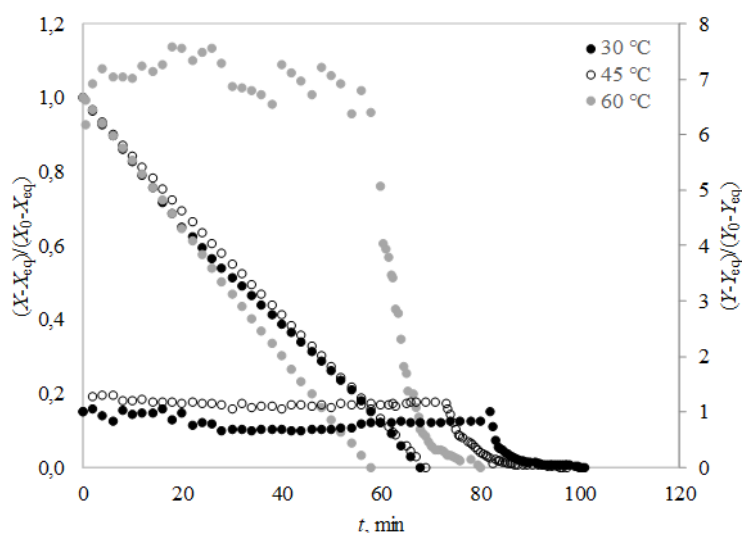
Slika 1. Utjecaj početnog sadržaja vlage kristala na kinetiku sušenja u vakuum sušioniku s pliticama pri $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $p = 100\text{ mbar}$

Figure 1. Influence of the initial moisture content of crystals on the drying kinetics in a tray vacuum dryer at $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $p = 100\text{ mbar}$

Utjecaj temperature istražen je u rotacijskom vakuum sušioniku, RVS, i u sušioniku s fluidiziranim slojem, SFS; a dobiveni su podaci prikazani na slici 2. Temperatura pri kojoj se provodi sušenje u velikoj mjeri utječe na kinetiku sušenja.



a)



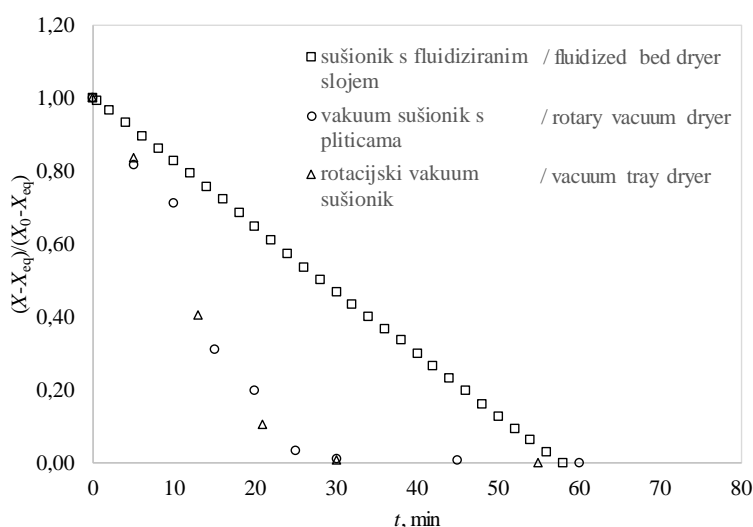
b)

Slika 2. Utjecaj temperature na kinetiku sušenja kristala: a) rotirajući vakuum sušionik pri $n = 100$ o/min i $p = 45$ mbar; b) sušionik s fluidiziranim slojem

Figure 2. Influence of temperature on crystal drying kinetics: a) rotary vacuum dryer at $n = 100$ rpm and $p = 45$ mbar; b) fluidized bed dryer

Pri višoj temperaturi pokretačke sile procesa prijenosa topline i tvari su veće što rezultira većom brzinom sušenja i kraćim vremenom trajanja procesa. Usporede li se krivulje sušenja u rotacijskom vakuum sušioniku pri 30 i 60 °C može se uočiti da vrijeme trajanja perioda konstantne i padajuće brzine sušenja opada s porastom temperature, slika 2a). Kritični sadržaj vlage iznosio je 0,1063 kg/kg i 0,0678 kg/kg pri 30 °C, odnosno 60 °C, što se može objasniti manjim brzinama sušenja, odnosno nižom vrijednosti difuzijskog koeficijenta pri nižoj temperaturi. Kako su pri višoj temperaturi brzine prijenosa tvari kroz sloj čestica i sa površine materijala veće, period padajuće brzine sušenja započet će pri nižem kritičnom sadržaju vlage.

Međutim i tijekom ovih mjerenja sušenje je prekidano kako bi se uzimali uzorci za određivanje sadržaja vlage materijala tako da se ni ovom metodom sušenja nisu uspjeli prikupiti adekvatni mjerni podaci. Kinetika sušenja u fluidiziranom sloju praćena je psihometrijskom metodom čime je izbjegnuta pogreška vezana za uzorkovanje i prekid rada sušionika. Uspoređujući krivulje bezdimenzijske apsolutne vlažnosti i bezdimenzijskog sadržaja vlage materijala može se uočiti kako je sušenje materijala trajalo znatno kraće. Krivulje bezdimenzijskog sadržaja vlage materijala pri različitim temperaturama dijelom se preklapaju, a najveća razlika se uočava pri 60 °C. Razlog tome je neujednačen sastav i početni sadržaj vlage dušika koji se koristio za sušenje. Naime, dušik nije bio u potpunosti suh i sadržavao je različita ostatna otapala. Nakon što je materijal postigao ravnotežni sadržaj vlage, dušik se nastavljao sušiti, odnosno iz dušika se nastavila uklanjati vlaga do postizanja ravnoteže u danim uvjetima sušenja. Kako je apsolutna vlažnost dušika na izlazu stalna tijekom perioda konstantne brzine sušenja, može se zaključiti da je kinetika sušenja uglavnom kontrolirana vanjskim uvjetima. Vrijeme trajanja perioda konstantne brzine sušenja skraćuje se s porastom temperature. Postojanje samo perioda konstantne brzine sušenja može se objasniti time da se u fluidiziranom sloju čestice pojedinačno suše. Uzorak je kristaliničan i neporozan te je vlaga prisutna samo na površini kristala. Na slici 3 prikazana je usporedba krivulja sušenja u sva tri sušionika pri 60 °C.

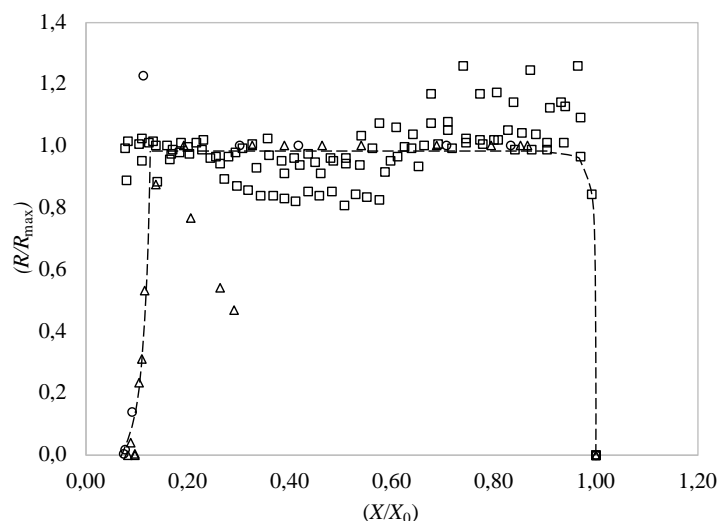


Slika 3. Usporedba kinetike sušenja u svim primijenjenim sušionicima pri 60 °C
Figure 3. Comparison of drying kinetics in all applied dryers at 60 °C

Oblik krivulja sušenja provedenih u vakuum sušionicima upućuje na postojanje perioda konstantne i perioda padajuće brzine sušenja, a većina vlage prisutne u materijalu ukloni se nakon samo 30 minuta (ukloni se 90 % vlage). U vakuum sušionicima kristali tvore više slojeva čime se dobiva porozna sredina i uvjeti potrebni za postojanje perioda padajuće brzine sušenja. Tlak u oba vakuum sušionika niži je od atmosferskog, pa tako voda pri tlaku od 45 mbar vrije na 30,9 °C, a pri 100 mbar vrije na 45,6 °C. U oba je sušionika temperatura pri kojoj se provodi sušenje veća od vrelišta pa se može pretpostaviti da do isparavanja dolazi unutar porozne strukture, ne samo na površini, što rezultira dvofaznim tokom (para i kapljevina) kroz porozni sloj kristala što rezultira većom brzinom prijenosa tvari.

S druge strane u sušioniku s fluidiziranim slojem voda hlapi jer se sušenje odvija pri temperaturi nižoj od vrelišta vode. Osim toga u sušioniku s fluidiziranim slojem bila je znatno veća masa vlažnog materijala nego u dva vakuum sušionika. Što je veća masa vlažnog materijala, uz približno jednak početni sadržaj vlage materijala, sušni medij mora na sebe primiti veću količinu vode. Time se sušni medij zasićuje vlagom i smanjuje se pokretačka sila za proces prijenosa tvari. Istovremeno zbog isparavanja dolazi do hlađenja medija čime se direktno utječe i na pokretačku silu procesa prijenosa topline.

Karakteristična krivulja sušenja za dani materijal prikazana je na slici 4. Naime, ukoliko se mjerni podaci prikažu kao ovisnost bezdimenzijske brzine (R/R_{max}) o bezdimenzijskom sadržaju vlage materijala, neovisno o metodi sušenja svi bi se podaci morali nalaziti na jednoj krivulji. Rasipanje podataka posljedica je već spomenute neadekvatne metode prikupljanja podataka u vakuum sušionicima te neujednačenog sastava dušika (sušnog medija) u sušioniku s fluidiziranim slojem.



Slika 4. Karakteristična krivulja sušenja: ○ – vakuum sušionik s pliticama; △ – rotacijski vakuum sušionik; □ – sušionik s fluidiziranim slojem

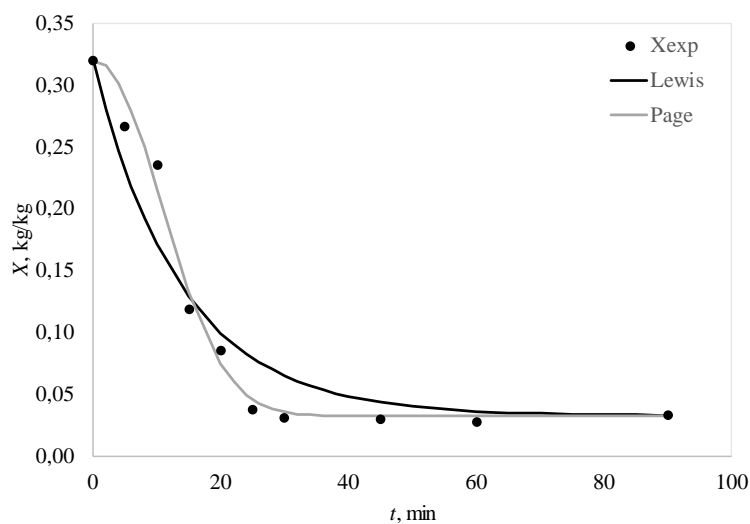
Figure 4. Characteristic drying curve: ○ - vacuum dryer with trays; △ - rotary vacuum dryer; □ - fluidized bed dryer

Aproksimacija kinetike sušenja odabranim matematičkim modelima

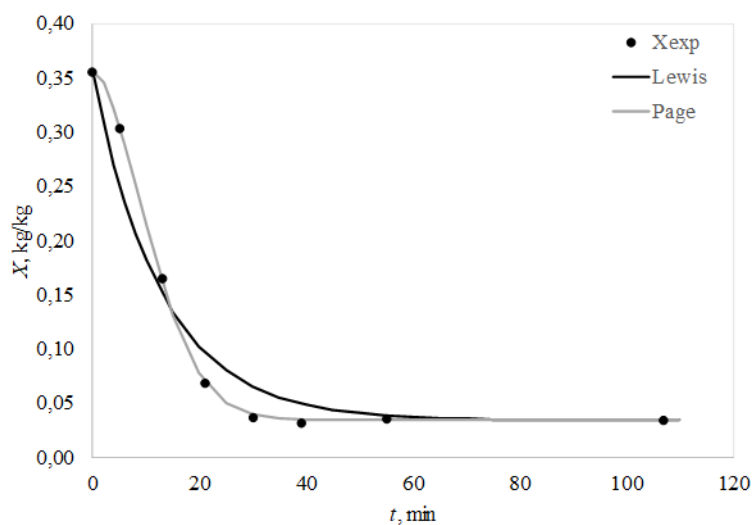
Eksperimentalni podaci promjene sadržaja vlage s vremenom aproksimirani su Lewisovim i Pageovim matematičkim modelima. U tablici 1. i na slici 5. prikazani su dobiveni rezultati iz kojih se može zaključiti da Pageov model bolje opisuje mjerne podatke. Zbog neujednačenih uvjeta sušenja u vakuum sušioniku s pliticama nije moguće izvesti zaključke vezane za utjecaj početnog sadržaja vlage materijala na parametre Lewisovog i Pageovog modela. Pri višoj temperaturi veće su vrijednosti konstante sušenja, K i parametra Pageovog modela, k , što je bilo i očekivano. Parametar n inače nije pod utjecajem temperature, tako da se različite vrijednosti mogu objasniti neujednačenim uvjetima sušenja kao posljedice neadekvatne metode prikupljanja mjernih podataka. Međutim, izvedba oba vakuum sušionika je takva da nije moguće bez prekida rada uzimanje uzoraka kojima se određuje sadržaj vlage.

Tablica 1. Procijenjene vrijednosti parametara Lewisovog i Pageovog modela
Table 1. Estimated values of the Lewis and Page models parameters

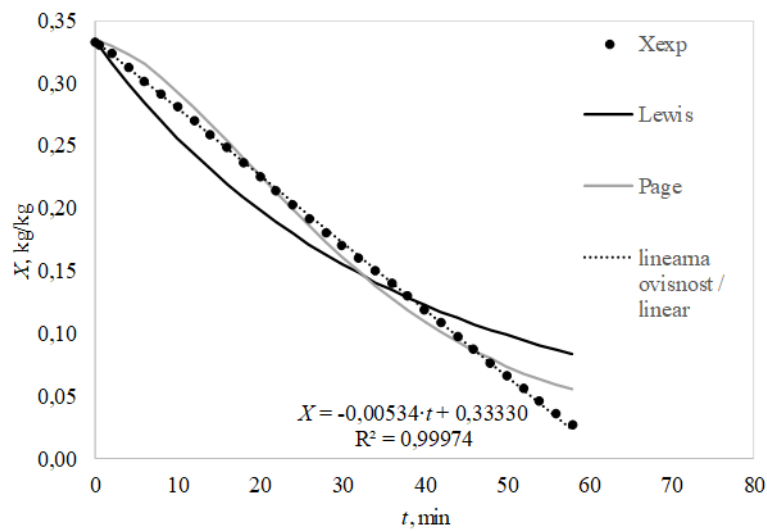
Sušionik	Dryer	T, °C	X ₀ , kg/kg	Lewisov model		Pageov model		
				K	R ²	k	n	R ²
Vakuum sušionik s pliticama	Vacuum tray dryer	60	0,3198	0,0727	0,9239	0,0035	2,109	0,9878
			0,3759	0,0587	0,9630	0,0173	1,431	0,9774
Rotacijski vakuum sušionik	Rotary vacuum dryer	30	0,3252	0,0159	0,9872	0,0074	1,175	0,9933
		60	0,3550	0,0778	0,9635	0,0093	1,793	0,9997
Sušionik s fluidiziranim slojem	Fluidized bed dryer	30	0,3396	0,0257	0,9474	0,0027	1,606	0,9747
		45	0,3383	0,0250	0,9265	0,0031	1,564	0,9825
		60	0,3333	0,0289	0,9296	0,0035	1,609	0,9872



a)



b)



c)

Slika 5. Aproximacija eksperimentalnih podataka Lewisovim i Pageovim modelom ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$): a) VSP; b) RVS; c) SFS

Figure 5. Approximation of experimental data by Lewis and Page model ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$): a) vacuum tray dryer; b) rotary vacuum dryer; c) fluidized bed dryer

Postojanje samo perioda konstantne brzine sušenja za uzorke osušene u sušioniku s fluidiziranim slojem razlog je većeg odstupanja eksperimentalnih i računskih podataka. Kinetika sušenja u sušioniku s fluidiziranim slojem najbolje se opisuje jednačom pravca u kojoj odsječak odgovara početnom sadržaju vlage materijala. Vrijednosti nagiba pravca uglavnom rastu s porastom temperature. Najnižu vrijednost poprima za sušenje pri $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,00453\text{ kg/kg s}$), a najvišu za sušenje pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,00534\text{ kg/kg s}$). Pri najnižoj temperaturi vrijednost nagiba pravca je $0,00471\text{ kg/kg s}$. Odstupanje od očekivanog trenda posljedica je već spomenutog neujednačenog sastava dušika koji se koristio za sušenje kao i mogućnosti postojanja perioda padajuće brzine sušenja kada se sušenje provodilo pri najnižoj temperaturi.

Granulometrijska svojstva kristala

Procesni uvjeti sušenja imaju veliki utjecaj na granulometrijska i morfološka svojstva te strukturu produkta, a samim time utječu i na primjenska svojstva proizvoda. Morfologija čvrstih čestica praćena je elektronskim mikroskopom, a raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije. Širina raspodjele veličine kristala izračunata je korištenjem sljedećeg izraza, jed. 4:

$$S = \frac{x_{90}}{x_{10}} \quad (4)$$

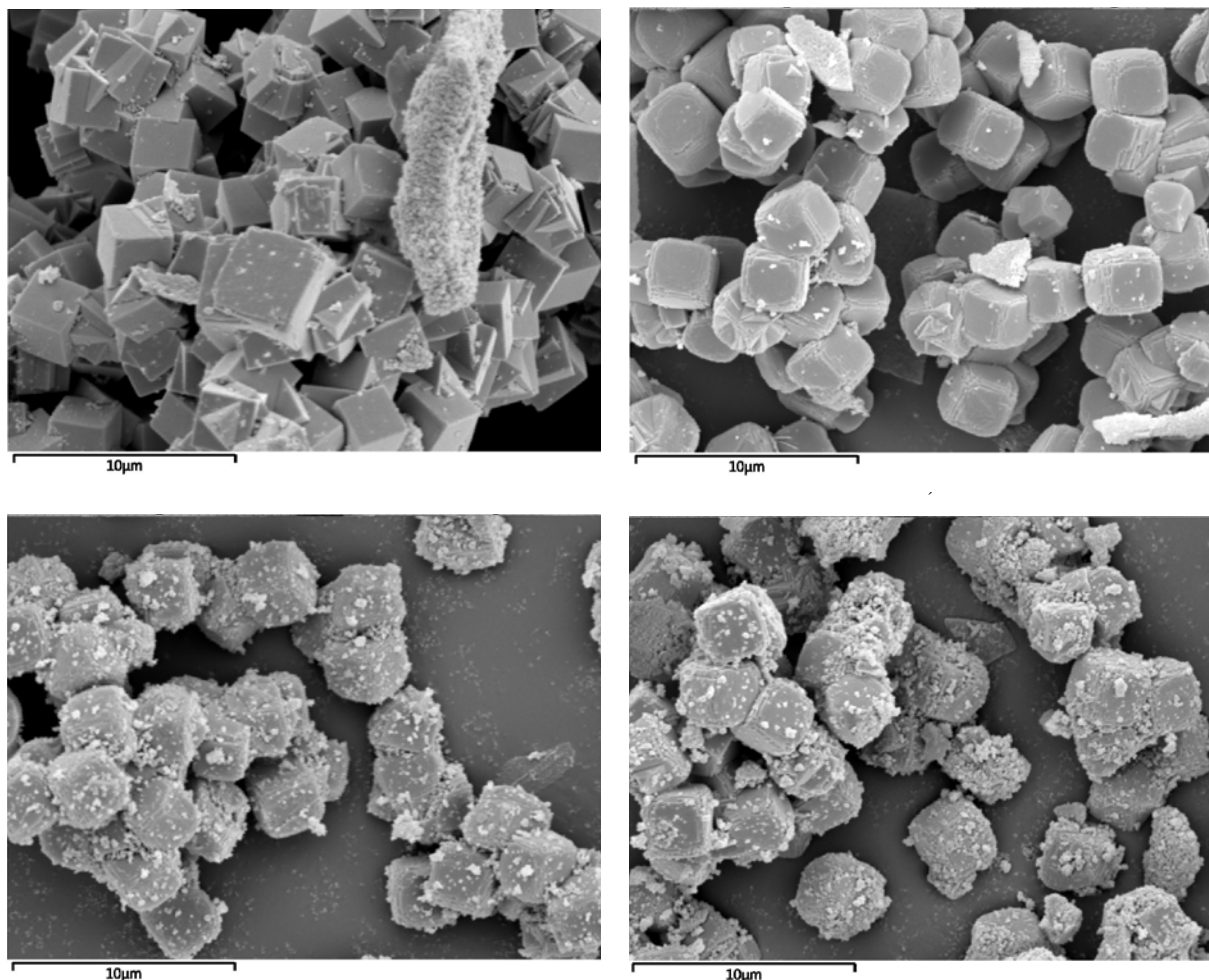
U tablici 2. prikazan je utjecaj metode sušenja na karakteristične veličine kristala i širinu raspodjele veličina čestica.

Tablica 2. Utjecaj metode sušenja na karakteristične veličine kristala i širinu raspodjele
Table 2. Influence of drying method on characteristic crystal sizes and distribution width

Uzorak	Veličina čestica, μm			Širina raspodjele	
	x_{10}	x_{50}	x_{90}		
Prije sušenja	8,0	21,0	48,0	6,0	
Nakon sušenja	Vakuum sušionik s pliticama	6,4	19,0	57,0	8,9
	Rotacijski vakuum sušionik	5,6	17,0	56,0	10,0
	Sušionik s fluidiziranim slojem	5,0	15,0	84,0	16,8

Može se zaključiti da metoda sušenja u maloj mjeri utječe na raspodjelu veličina kristala. Pomak veličina x_{10} i x_{50} prema finijim frakcijama ukazuje na usitnjavanje kristala, što je jasno za sušionike s miješanjem. Do loma kristala osušenih u vakuum sušioniku s pliticama vjerojatno je došlo tijekom prebacivanja kristala na plitice. S druge strane pomak veličine x_{90} prema grubljim frakcijama ukazuje na okrupnjavanje kristala, odnosno aglomeraciju. U vakuum sušioniku s pliticama u kojem su kristali u mirujućem sloju moguće je da je tijekom sušenja došlo do formiranja veze između kristala koji su bili u direktnom kontaktu. U rotacijskom vakuum sušioniku kristali se zbog rotacije miješaju, no uvijek postoji kontakt između susjednih kristala. U središnjoj masi kristala moguće je da je također došlo do formiranja veze između postojećih aglomerata. Najveći porast veličine x_{90} uočen je kod kristala osušenih u sušioniku s fluidiziranim slojem. Naime, tijekom sušenja dok je sadržaj vlage kristala velik, oni se nalaze u mirujućem sloju. Do fluidizacije sitnih čestica dolazi tek nakon nekih pola sata, tako da su kristali dovoljno vremena u kontaktu da se stvori veza što onda rezultira pomakom raspodjele veličina prema grubljim frakcijama. Širina raspodjele veličina kristala povećava se u sljedećem nizu: polazni uzorak < vakuum sušionik s pliticama < rotacijski vakuum sušionik < sušionik s fluidiziranim slojem.

Na slici 6. prikazane su SEM mikrofografije polaznih kristala te kristala nakon sušenja u odabranim sušionicima. Može se uočiti da natrijeva sol cirkonija kristalizira u kubičnoj strukturi te da je sklona stvaranju aglomerata. Polazni kristali su oštih bridova, a nakupine kristala sastoje se velikog broja pojedinačnih kristalića veličine oko 2,5 do 3,0 μm . Sušenjem mirujućeg sloja kristala u vakuum sušioniku s pliticama ne dolazi do značajne promjene morfologije kristala. Međutim u rotacijskom vakuum sušioniku i sušioniku s fluidiziranim slojem dolazi do loma kristala zbog miješanja (rotacijom ili u struji dušika). Osim toga kristali više nisu oštih bridova već su zaobljeni. Niti u jednom sušioniku s miješanjem nije došlo do značajnijeg razbijanja aglomerata iako se na mikrofografijama mogu uočiti i pojedinačni kristali.

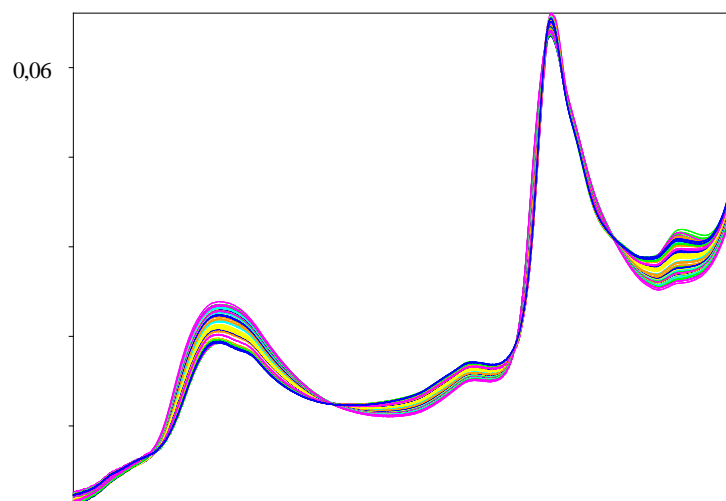


Slika 6. SEM mikrografije kristala prije i nakon sušenja uvećane 5000 puta: a) polazni; b) vakuum sušionik s pliticama; c) rotacijski vakuum sušionik; d) sušionik s fluidiziranim slojem
Figure 6. SEM micrographs of crystals before and after drying magnified 5000 times: a) initial; b) vacuum tray dryer; c) rotary vacuum dryer; d) fluidized bed dryer

Spektri bliskog infracrvenog zračenja

Praškastim uzorcima su snimljeni spektri bliskog infracrvenog zračenja u integracijskoj sferi u području $12000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, rezolucijom od 4 cm^{-1} . Svaki uzorak snimljen je 64 puta te je rezultirajući spektar uprosječen. Kako bi se eliminirala nehomogenost uzorka, snimanje uzoraka ponovljeno je tri puta uz protresanje uzorka između snimanja. Referentna vlaga uzorka je određena termogravimetrijskom metodom.

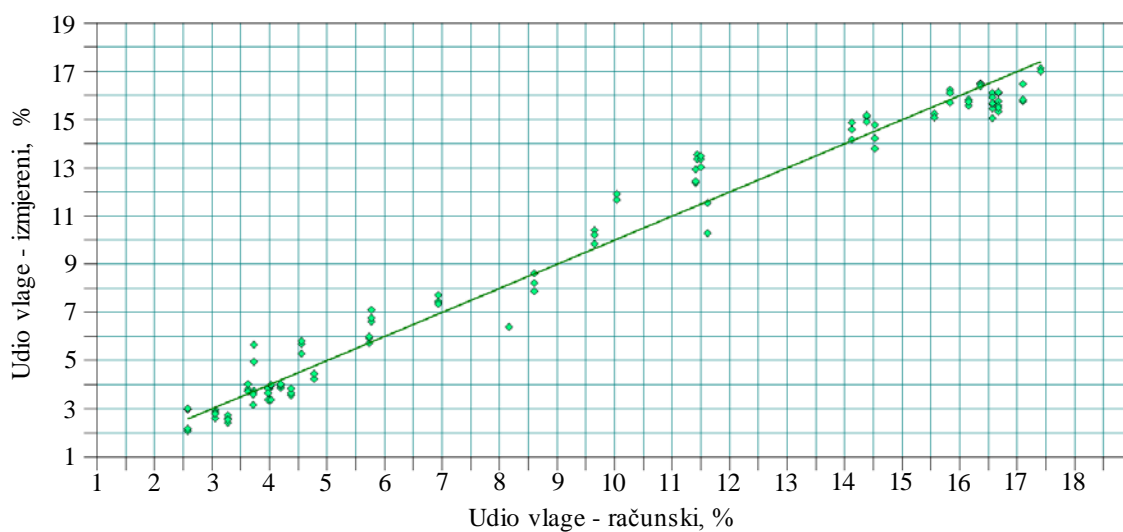
Spektri su klasificirani analizom glavne komponente te je izrađen model validiran unakrsnom validacijom po 2 segmenta. Kao primarna metoda korištena je termogravimetrija u području od $20 - 130 \text{ }^\circ\text{C}$. Možemo zaključiti da je model prihvatljiv za istraživačke svrhe, obzirom da je područje niske vlage uzorka vrlo dobro opisano. Model najviše odstupa u području vlažnosti od $5 - 10 \%$ što se može pripisati nehomogenosti uzorka u tom području vlažnosti, a kako je vidljivo i iz krivulje sušenja, to područje doživljava brze vremenske promjene.



Slika 7. Spektri blisko infracrvene spektroskopije nakon korekcije standardnim vektorom i bazne linije u području $7695 - 4198 \text{ cm}^{-1}$

Figure 7. Near-infrared spectra after standard vector and baseline correction in the range $7695 - 4198 \text{ cm}^{-1}$

Spektri su klasificirani analizom glavne komponente te je izrađen model validiran unakrsnom validacijom po 2 segmenta. Kao primarna metoda korištena je termogravimetrija u području od $20 - 130 \text{ }^\circ\text{C}$. Možemo zaključiti da je model prihvatljiv za istraživačke svrhe, obzirom da je područje niske vlage uzorka vrlo dobro opisano. Model najviše odstupa u području vlažnosti od $5 - 10 \%$ što se može pripisati nehomogenosti uzorka u tom području vlažnosti, a kako je vidljivo i iz krivulje sušenja, to područje doživljava brze vremenske promjene.



Slika 8. Odstupanje eksperimentalno dobivenih vrijednosti od vrijednosti predviđenih modelom

Figure 8. Deviation of experimentally obtained values from the values predicted by the model

Zaključci

Istražen je utjecaj početnog sadržaja vlage materijala, temperature i vrste sušionika na kinetiku sušenja i granulometrijska svojstva natrijeve soli cirkonija. Sušenje je provedeno u dva vakuum sušionika, vakuum sušionik s pliticama i rotirajući vakuum sušionik te u sušioniku s fluidiziranim slojem. Pri višim temperaturama i nižem početnom sadržaju vlage materijala brzina sušenja je veća a vrijeme trajanja procesa kraće. Sušenje u sušioniku s fluidiziranim slojem pod kontrolom je vanjskih uvjeta tijekom cijelog procesa, na što ukazuje postojanje samo perioda konstantne brzine sušenja. S obzirom da su u vakuum sušionicima kristali u više slojeva (mirujući ili u gibanju), na krivuljama sušenja može se uočiti i period padajuće brzine sušenja tijekom kojeg je proces pod kontrolom unutrašnjih uvjeta, odnosno svojstava poroznog sloja. Pageov model uz visok stupanj korelacije opisuje kinetiku sušenja u svim istraživanim sušionicima. Dugačak period konstantne brzine sušenja razlog je nižeg stupnja korelacije mjernih podataka Lewisovim modelom. Metoda sušenja u maloj mjeri utječe na raspodjelu veličina kristala. Širina raspodjele veličina kristala veća je nakon sušenja kao posljedica usitnjavanja zbog loma izazvanog miješanjem i aglomeracije. Natrijeva sol cirkonija kristalizira u kubičnoj strukturi, a sušenjem u istraživanim sušionicima ne dolazi do značajne promjene morfologije. Bliska infracrvena spektroskopija pokazala se kao uspješna metoda za praćenje kinetike sušenja u fluidiziranom sloju. Izvedeni kemometrijski model uspješno procjenjuje udio vlage u materijalu.

Literatura

- Agrawal, M., Biswas, S., Van Vliet, K. (2015): Application of Vacuum Drying in the Drug Processing and Drug Delivery Systems, *Vacuum Technology & Coating*. 1-7.
- Burgbacher, J., Wiss, J. (2008): Industrial applications of online monitoring of drying processes of drug substances using NIR. *Org. Process Res. Dev.* 12 (2), 235-242.
- Chen, H., Liu, X., Bishop, C., Glasser, B. J. (2017): Fluidized bed drying of a pharmaceutical powder: A parametric investigation of drying of dibasic calcium phosphate, *Dry. Technol.* 35 (13), 1602-1618.
- Guerrero, M., Albet, C., Palomer, A., & Guglietta, A. (2003): Drying in Pharmaceutical and biotechnological Industries, *Food Sci. Technol. Int.* 9 (3), 237-243.
- Kemp, I. C. (2017): Drying of pharmaceuticals in theory and practice, *Dry. Technol.* 35 (8), 918-924.
- Lewis, W. K. (1921): The rate of drying of solid materials, *J. Ind. Eng.* 13(5), 427-432.
- Marinos-Kouris, D., Maroulis, Z. B. (1987): Transport Properties in Drying of Solids. In: Handbook of industrial drying, Mujumdar, A. S. (ed), New York, USA: Dekker, pp. 113-159.
- Page, G. E. (1949). Factors Influencing the Maximum Rates of Air Drying Shelled Corn in Thin layers. M. S. Thesis, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
- Pakowski, Z., Mujumdar, A. S. (1987): Drying of Pharmaceutical Products. In: Handbook of industrial drying, Mujumdar, A. S. (ed), New York, USA: Dekker, pp. 743-774.
- Sander, A. (2007): Thin-layer drying of porous materials: Selection of the appropriate mathematical model and relationships between thin-layer models parameters, *Chem. Eng. Process.* 46 (12), 1324-1331.

Influence of process parameters on drying kinetics and the morphology of active pharmaceutical ingredient

Katarina Jozinović¹, Aleksandra Sander^{1*}, Gordana Vrbanc²

¹*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*PLIVA HRVATSKA d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: asander@fkit.hr*

Summary

In this paper, the drying kinetics of the zirconium sodium salt in different laboratory dryers have been investigated. Two vacuum dryers, one with trays and one rotary, and a fluidized bed dryer were selected. In addition to the type of dryer, the influence of the initial moisture content of the material as well as temperature on the drying kinetics and granulometric properties of dried crystals was investigated. Drying data was collected gravimetrically in vacuum dryers and psychrometrically in a fluidized bed dryer. In a fluidized bed dryer, it was also investigated whether the kinetics of drying could be monitored by near-infrared spectroscopy.

The results showed that the type of dryer and temperature affect the drying kinetics and crystal morphology. Higher drying rates were achieved at higher temperatures. At lower temperatures, drying is faster in a fluidized bed dryer, and at higher temperatures in vacuum dryers. Experimentally obtained data were approximated by Lewis and Page mathematical models. Page model successfully describes the drying kinetics of zirconium sodium salt in all investigated dryers. The value of the parameter k increases with increasing temperature and initial moisture content of the material. The parameter n is affected by the initial moisture content and the drying method

Crystal fracture occurs in a rotary vacuum dryer and in a fluidized bed dryer, resulting in a wider crystal size distribution. Near infrared spectroscopy has proven to be a good method for monitoring fluidized bed drying kinetics.

Keywords: drying kinetic, mathematical models, fluidized bed drying, vacuum drying

Primjena IC termografije pri umreženju polimera u modelnim kalupima

Vanja Kosar*, Ante Koštić, Marija Lukić

*Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Savska cesta 16, HR – 10 000 Zagreb
Dopisni autor: vkosar@fkit.hr

Sažetak

U ovom radu proučavana je reakcija očvršćivanja nezasićenih poliestera u valjkastim kalupima zagrijavanim u uljnoj i zračnoj kupelji. Glavni problem prilikom egzotermne reakcije očvršćivanja čini generacija topline te značajno povećanje temperature unutar kalupa. Predložen je matematički model u svrhu simuliranja reakcije očvršćivanja. Validacija modela izvršena je usporedbom sa eksperimentalno izmjerenim temperaturama u središtu kalupa. Provedeno je termografsko ispitivanje reakcije očvršćivanja u modelnim kalupima. Svrha provedbe samog snimanja jest određivanje temperaturnih profila, budući da se unutar samog kalupa za vrijeme reakcije javlja temperaturni gradijent koji se proteže od središta do stijenke kalupa što može dovesti do formiranja termosetnog proizvoda nejednolikih svojstava. Izazov samoj metodi predstavljaju male dimenzije kalupa kao i činjenica da su kalupi napravljeni od materijala niske emisivnosti (polirani bakar).

Ključne riječi: očvršćivanje, poliesterska smola, kalup, matematički model, IC termografija

Uvod

Duromeri su poliplasti s prostorno gusto umreženim makromolekulama. Dobivanje se uobičajeno provodi u dva stupnja, pri čemu u prvom stupnju nastaju niskomolekularne viskozne smole koje se zatim reakcijom očvršćivanja na povišenim temperaturama prevode u čvrstu trodimenzionalnu mrežnu strukturu. Duromere uslijed gusto umrežene strukture karakterizira visoka čvrstoća, tvrdoća, krtoš te kemijska otpornost (Janović, 1997). Zagrijavanjem na visokim temperaturama duromeri se ne tale već dolazi do degradacije pucanjem primarnih kemijskih veza. Podešavanjem gustoće mreže moguće je dobiti širok raspon primjenskih svojstava što predstavlja glavnu prednost u odnosu nad plastomere pri čemu epoksidi i nezasićeni poliesteri spadaju u jedne od najvažnijih termosetnih smola. Nezasićene poliesterske smole kao jedan od najčešćih duromernih materijala definirane su kao kondenzacijski produkti organskih dikiselina i glikola. U prisustvu peroksidnog inicijatora te reaktivnog otapala (stiren) dolazi do reakcija očvršćivanja na mjestima nezasićenih dvostrukih veza pri čemu nastaje netopljiva, netaljiva i umrežena struktura. Prednosti im se vide u dobrim mehaničkim svojstvima, niskoj cijeni, maloj masi te dobroj korozivnoj otpornosti a primjenu često pronalaze kao konstrukcijski materijali u građevinarstvu, nautici te autoindustriji. Za vrijeme reakcije očvršćivanja nezasićenih poliesterskih smola u kalupima, uslijed egzotermnosti reakcije i slabe toplinske vodljivosti polimera dolazi do akumulacije topline i porasta temperature, što može dovesti do degradacije te negativnog utjecaja na primjenska svojstva duromernog proizvoda (Paluvali i sur., 2014).

Odabirom prikladnog matematičkog modela moguće je simulirati proces očvršćivanja u svrhu procjene utjecaja brzine reakcije i prijenosa topline na akumulaciju topline u središtu kalupa te u konačnici sprečavanja nepoželjnih utjecaja na gotovi proizvod (Kosar i sur., 2012). Infracrvena termografija omogućuje čovjeku da promatra inače nevidljivo infracrveno (toplinsko) zračenje putem termokamere koja stvara zapis u obliku termograma. Temelji se na mjerenju intenziteta infracrvenog zračenja sa površine promatranog objekta. Ključna veličina koju treba definirati jest emisivnost koja opisuje sposobnost tijela da emitira toplinsko zračenje a ovisi o temperaturi, valnoj duljini i stanju površine promatranog tijela (Lahiri i sur., 2012).

Materijali i metode

Eksperimenti su provedeni s dvije različite smole: Chromoplast I-170 i Chromoplast A-120 koje su proizvedene u tvornici Scott Bader, Zagreb. Chromoplast I-170 je nezasićena poliesterska smola koja se bazira na izoftalnoj kiselini. Spada u srednje reaktivne smole te je kemijski vrlo otporna, a najviše se koristi za izradu plovila. Chromoplast A-120 je također nezasićena poliesterska smola koja se bazira na ortohtalnoj kiselini. Spada u srednje reaktivne smole te ostvaruje odličnu adheziju sa staklenim vlaknima. Upotrebljava se u ručnim i sprej procesima laminiranja a naročito je pogodna za izradu brodica. U smolama se nalazi i stiren koji služi kao monomer za umrežavanje. Prije provođenja eksperimenta u smolu je dodan inicijator. Za obje smole inicijator je 50 %-tna otopina *metil-etil-keton peroksida* (MEKP) u dimetil ftalatu, a dodan je u masenom udjelu od 1 %. U pojedinim eksperimentima korišteno je inertno punilo Marmormehl na bazi kalcij-karbonata u udjelu od 20 % u kompozitnoj smjesi, proizvedenog u Helopal, Njemačka. Prilikom provođenja reakcije očvršćivanja nezasićene poliesterske smole, termoparom se mjeri temperatura u središtu kalupa u kojem se odvija reakcija. Kalupi su cilindričnog oblika duljine 10 cm te promjera 1, 1.5 i 2 cm a izrađeni su od bakra. Baze kalupa su izolirane pa se promatra vođenje topline samo u radijalnom smjeru. Bakar je kao jedan od najboljih vodiča topline pogodan za izradu kalupa a uz to mu je koeficijent vodljivosti oko 10^3 puta veći od vodljivosti smole, te se može pretpostaviti da stjenka kalupa trenutno poprima vrijednost temperature zagrijanog medija (ulje, zrak). Termografska ispitivanja provedena su pomoću termokamere FLIR T-360 (slika 1) čije se osnovne tehničke specifikacije nalaze u tablici 1.



Slika 1. Eksperimentalna termokamera FLIR T-360
Figure 1. Experimental thermal camera FLIR T-360

Za vrijeme reakcije očvršćivanja poliesterskih smola u kalupu dolazi do pojave temperaturnih gradijenata te je potrebno snimiti temperaturne profile po presjeku kalupa. Kalupi sa uzorcima poliesterskih smola zagrijavaju se u uljnoj i zračnoj kupelji, pri čemu se kalup vadi nakon što krene reakcija umrežavanja a nakon njegovog fiksiranja kreće snimanje termokamerom u odabranom fokusu i jednakim vremenskim intervalima. Prvobitno se snimanjem dobiju neobrađeni termogrami koje je potrebno obraditi pomoću računalnog programa da bi se dobile stvarne temperature.

Tablica 1. Tehničke specifikacije termokamere

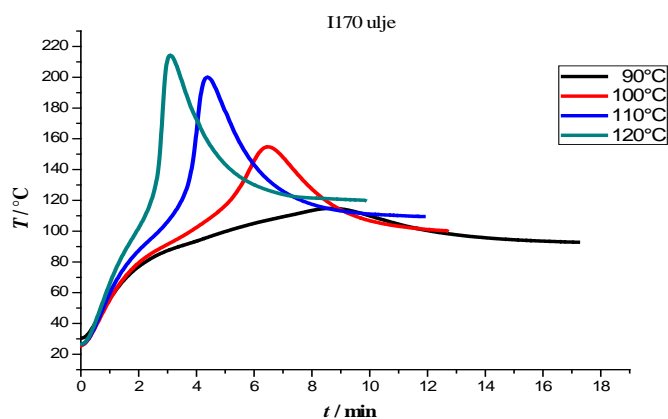
Table 1. Thermal camera specifications

Vidno polje/ Min. fokus	25 x 19/0.4m
Temperaturna osjetljivost	0.06 °C pri 30 °C
IR rezolucija	320x240
Mjerljivo temperaturno područje	-20 °C-120 °C 0 °C-350 °C opcija do 1200 °C
Radno temperaturno područje	-15 °C-50 °C
Tip detektora	nehlađeni mikrobolometar
Masa	0.88 kg
Računalni program	QuickReport

Rezultati i rasprava

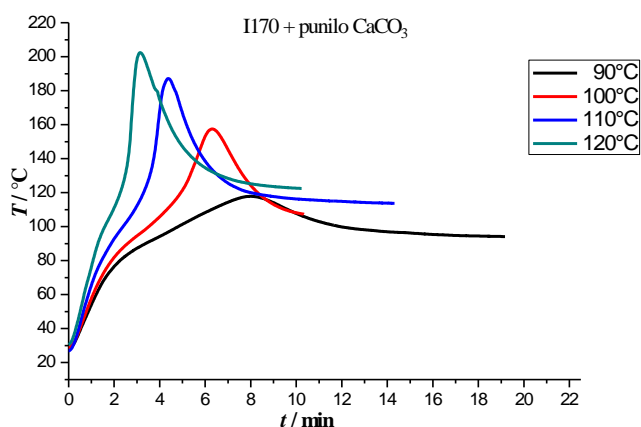
Eksperimenti su provedeni u uljnoj i zračnoj kupelji pri različitim temperaturama za obje korištene smole. Dobivena je ovisnost temperature u središtu kalupa o vremenu reakcije, a rezultati su prikazani u nastavku. Na početku mjerenja temperatura smole jednaka je sobnoj temperaturi. Kad se kalup stavi u zagrijanu kupelj dolazi do prijenosa topline s kupelji na kalup i povećanja temperature (period zagrijavanja). Nakon što se kalup zagrije na temperaturu kupelji, inicijator se raspada i započinje umrežavanje smole pri čemu se oslobađa toplina i raste temperatura u kalupu (period reakcije umrežavanja). Nakon što je reakcija završila kalup predaje toplinu kupelji i hladi se do njene temperature (period hlađenja). Na slici 2 vidljivo je da je najveći temperaturni maksimum postignut pri temperaturi uljne kupelji od 120 °C uz najkraći period zagrijavanja kao i ukupno trajanje reakcije očvršćivanja. Što je veća temperatura na koju se kalup zagrijava to je brža reakcija i veća akumulacija topline u kalupu koja rezultira višom maksimalnom postignutom temperaturom. Vođenje topline kroz uzorak predstavlja ograničavajući čimbenik bržeg prijenosa topline do stijenske kalupa, odnosno brzina nastajanja reakcijske topline veća je od brzine odvođenja topline u kupelj. Navedena činjenica bitna je za praktičnu primjenu budući da visoke temperature koje prelaze 200 °C mogu dovesti do degradacije polimera.

Kalcij-karbonatno punilo uobičajeno se dodaje u reakcijsku smjesu poradi smanjenja egzoternosti reakcije te poboljšanja odvođenja topline iz središta kalupa.



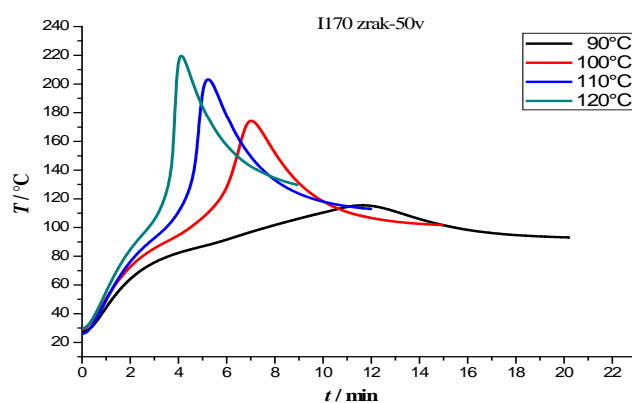
Slika 2. Usporedba eksperimenata u ulju pri različitim temperaturama u kalupu ($d=1\text{cm}$)
Figure 2. Comparison of experiments in oil at different temperatures in the mold ($d=1\text{cm}$)

Na slici 3 vidljivo je da se dodatkom karbonatnog punila postižu niži temperaturni maksimumi, odnosno manja akumulacija topline, uslijed manjeg udjela reaktivne komponente u smjesi tj. nezasićenih dvostrukih veza. U usporedbi sa eksperimentima bez punila primjećuje se i da je oblik eksperimentalne krivulje ostao isti iz čega se može zaključiti da punilo značajnije ne utječe na vođenje topline i samu brzinu reakcije. CaCO_3 u eksperimentalnom temperaturnom području ne mijenja bitno svoju strukturu te time ne pridonosi toplinskim efektima uslijed reakcije očvršćivanja.



Slika 3. Usporedba eksperimenata u ulju pri različitim temperaturama u kalupu ($d=1\text{cm}$) uz dodatak punila
Figure 3. Comparison of experiments in oil at different temperatures in the mold ($d=1\text{cm}$) with the addition of filler

Zrak za razliku od ulja ima puno niži specifični toplinski kapacitet i gustoću uslijed čega je sporiji period zagrijavanja u odnosu na eksperiment u ulju pri istoj temperaturi što je i vidljivo na slici 4. Također se vidi da je najveća temperatura u kalupu postignuta pri najvećoj temperaturi zračne kupelji. Što je veća temperatura na koju se kalup zagrijava to je brži raspad inicijatora i brža reakcija umrežavanja. Pri tome se akumulira veća količina topline u kalupu pa je viša maksimalna izmjerena temperatura.

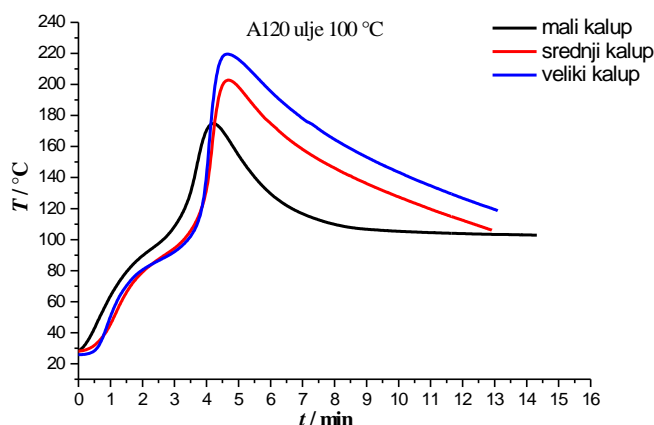


Slika 4. Usporedba eksperimenata u zraku pri različitim temperaturama te istom protoku u kalupu ($d=1\text{cm}$)

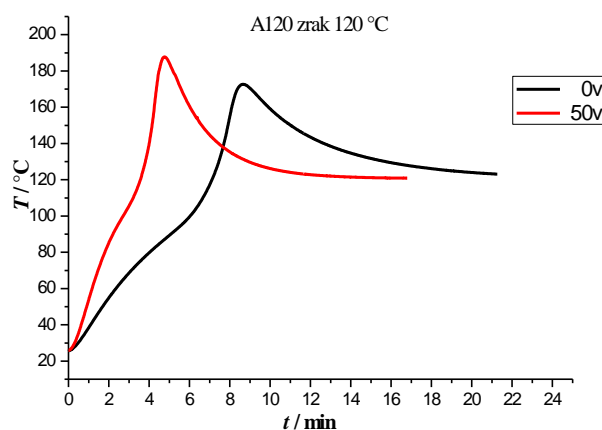
Figure 4. Comparison of experiments in air at different temperatures and the same flow in the mold ($d=1\text{cm}$)

Slični eksperimenti provedeni su i sa smolom Chromoplast A-120 gdje opet do izražaja dolazi utjecaj temperature uljne i zračne kupelji te veličine kalupa na reakciju očvršćivanja. Povišenjem temperature kupelji postižu se veći temperaturni maksimumi u središtu kalupa zbog povećanja brzine autokatalitičke reakcije, a time ujedno i reakcijske entalpije. Niska toplinska vodljivost smole predstavlja limitirajući faktor bržeg prijenosa topline od središta do stijenke kalupa pa je brzina nastajanja reakcijske topline veća od brzine odvođenja topline u kupelj. Dakle, uslijed akumulacije topline u središtu kalupa dolazi do značajnog povećanja temperature što može dovesti do degradacije polimera te negativnog odraza na primjenska svojstva gotovog proizvoda. Kalupi većih dimenzija sadrže veću količinu nezasićene poliesterske smole pa se uslijed većeg udjela reaktivnih komponenata u središtu kalupa oslobađa veća količina reakcijske topline, odnosno postiže viši temperaturni maksimum (slika 5). Na slici 6 vidljiva je usporedba dvaju eksperimenata reakcija očvršćivanja u zračnoj kupelji gdje je ispitivan utjecaj brzine strujanja zraka oko kalupa. Brzina strujanja zraka kroz cijev u kojoj je smješten kalup utječe na promjenu hidrodinamičkih uvjeta a time i na promjenu koeficijenta prijenosa topline (h). Povećanjem protoka zraka dolazi do smanjenja graničnog sloja zraka oko kalupa posljedica čega je povećanje brzine zagrijavanja i ukupne reakcije kao i posljedično postizanje većeg temperaturnog maksimuma u središtu kalupa. Prilikom provođenja eksperimenta bez strujanja zraka pri istoj temperaturi potrebno je otprilike duplo duže vrijeme zagrijavanja.

Razlika u odnosu na eksperiment bez strujanja zraka jest značajna no ipak treba imati na umu da daljnje povećanje protoka zraka ne bi dovelo do većeg povećanja brzine zagrijavanja te temperaturnih maksimuma budući da temeljni otpor prijenosu topline ipak leži u vođenju topline kondukcijom kroz smolu.



Slika 5. Usporedba eksperimenata u ulju pri istoj temperaturi te različitim dimenzijama valjkastog kalupa
Figure 5. Comparison of experiments in oil at the same temperature and different dimensions of the cylindrical mold



Slika 6. Usporedba eksperimenata u zraku sa i bez protoka zraka pri istoj temperaturi
Figure 6. Comparison of experiments in air with and without air flow at the same temperature

Nakon provedenih eksperimenata u kalupu, pri čemu se mjerila temperatura u središtu kalupa u ovisnosti o vremenu, testiran je matematički model reakcije umrežavanja.

Reakcijska entalpija, Arrheniusova konstanta i energija aktivacije predstavljaju upravo one veličine koje se procjenjuju pomoću matematičkog modela pri čemu se procjena vrši metodom ID algoritma. U toj metodi se procjenjuju parametri metodom *Nelder – Mead* koja je zasnovana na metodi simpleksa parametara a unutar tog postupka istovremeno se rješava sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi numeričkom metodom linija. Na osnovu modela moguće je izračunati temperature i konverzije tijekom očvršćivanja za različite točke po presjeku kalupa (od stijenke do središta).

Prilikom izvođenja matematičkog modela potrebno je uzeti u obzir slijedeće pretpostavke (Kosar i sur, 2012):

- kalup ima valjkasti oblik
- zanemaruje se promjena temperature u uzorku za vrijeme punjenja kalupa
- vođenje topline kroz uzorak je samo u radijalnom smjeru što je postignuto toplinskom izolacijom baza kalupa
- početna homogenost te dobra izmiješanost smjese
- tijekom reakcije ne dolazi do miješanja
- različit mehanizam prijenosa topline na stijenku kalupa ovisno o vrsti kupelji (ulje, zrak)
- gustoća, toplinski kapacitet te toplinska vodljivost stalne su veličine u ispitivanom temperaturnom intervalu

Matematički model u osnovi čine odgovarajuće bilance tvari i topline koje su povezane sa predloženim kinetičkim modelom (1). Budući da ne postoji miješanje smole za vrijeme reakcije, brzina odnosno sastav reakcijske smjese u pojedinoj točki kalupa funkcionalno su ovisni samo o vremenu te je sustav moguće opisati bilancom tvari za kotlasti reaktor. Uvrštenjem kinetičkog modela u bilancu tvari za kotlasti reaktor dolazi se do izraza (Kamal i sur. 1974), jed. 1:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = A_r e^{\frac{-E_a}{RT}} P^n (1 - P)^m \quad (1)$$

Zagrijavanjem kalupa toplina se unosi radijalno prijenosom kroz stijenku kalupa sa strane kupelji te također nastaje egzotermnom reakcijom na određenoj temperaturi. S obzirom na navedeno te uzevši u obzir činjenicu da nema miješanja tijekom reakcije, nije moguće primijeniti jednostavnu bilancu topline za kotlasti reaktor.

Opća bilanca topline za reakciju očvršćivanja unutar kalupa valjkastog oblika dana je izrazom, jed. 2:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \left[\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} \right] + r_A \rho \Delta H_r \quad (2)$$

Iz izraza je vidljivo da je akumulacija topline unutar uzorka jednaka zbroju topline koja se provodi kroz smolu unutar kalupa u radijalnom smjeru i topline koja nastaje egzotermnom reakcijom. Za procjenu parametara u modelima primjenjuje se izmijenjena diferencijalna metoda (ID algoritam) uz upotrebu *Nelder-Mead* numeričke metode pri čemu je potrebno zadati početne vrijednosti parametara koji se procjenjuju (E_a , A_r , ΔH_r). Sustav dviju parcijalnih jednadžbi kojima su opisane bilance tvari i topline istodobno se rješava metodom linija pri čemu je potrebno zadati početne i rubne uvjete koji su dani u tablici. Početni uvjeti jednaki su za eksperimente u uljnoj i zračnoj kupelji.

Na početku reakcije uzorak se nalazi na početnoj temperaturi T_0 koja je približna vrijednosti sobne temperature dok je stupanj umreženja P jednak nuli budući da reakcija počinje tek na višim temperaturama. Rubni uvjeti definirani su na prostornim granicama sustava, odnosno stijenci te osi simetrije kalupa. Vidljivo je da su gradijenti umreženja i temperature jednaki nuli u centru kalupa u kojemu se očekuje najviša postignuta temperatura te stupanj umreženja. Rubni uvjeti definirani na stijenci kalupa razlikuju se ovisno o tome da li se kalup grije u zračnoj ili uljnoj kupelji. U uljnoj kupelji stijenka trenutačno poprima temperaturu kupelji zbog visoke toplinske vodljivosti bakra. U zračnoj kupelji prijenos topline sa zraka na stijenku kalupa odvija se konvekcijskim mehanizmom te je stoga potreban određeni vremenski period da se stijenka kalupa zagrije. Rubni uvjet na stijenci kalupa izveden je iz činjenice da je količina konvekcijski prenesene topline sa zraka na kalup jednaka količini topline koja se vođenjem provede kroz stijenku kalupa na smolu unutar kalupa (Yousefi i sur., 1997). Procjena parametara provodi se dok nije zadovoljen kriterij slaganja, odnosno korijen minimalnog srednjeg odstupanja između mjerenih i izračunatih temperatura, jed. 3:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (\bar{Y}_{i\text{exp}} - \bar{Y}_{i\text{mod}})^2} \quad (3)$$

U tablicama se nalaze procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za sve provedene eksperimente: reakcijska entalpija (ΔH_r), Arrheniusova konstanta (A_r) i energija aktivacije (E_a). Predloženim modelom može se vrlo dobro simulirati proces očvršćivanja u valjkastim kalupima te procijeniti utjecaj prijenosa topline i brzine reakcije na temperaturne maksimume unutar kalupa.

Tablica 2. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za smolu I-170

Table 2. Estimated values of kinetic parameters for the I-170 resin

I-170				
ULJE				
Eksperiment	ΔH_r / J/g	A_r / 1/s	E_a / J/mol	<i>RMSD</i>
90 °C	175512	5108	41152	$9,25 \times 10^{-2}$
100 °C	216930	3020	39574	$9,81 \times 10^{-2}$
110 °C	224733	3711	39552	0,12
120 °C	229731	2687	38272	0,31
ZRAK				
Eksperiment	ΔH_r / J/g	A_r / 1/s	E_a / J/mol	<i>RMSD</i>
90 °C	176790	7549	43328	$9,46 \times 10^{-2}$
100 °C	204428	6759	42217	0,11
110 °C	206988	5328	41017	0,14
120 °C	210548	5022	40813	0,32

Tablica 3. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za smolu A-120
Table 3. Estimated values of kinetic parameters for the A-120 resin

A-120				
ULJE				
Eksperiment	$\Delta H_r / \text{J/g}$	$A_r / 1/\text{s}$	$E_a / \text{J/mol}$	RMSD
90 °C	218122	3157	38632	0,15
100 °C	224750	3932	39192	0,16
110 °C	225279	4274	39263	0,29
120 °C	193955	3960	37891	0,26
ZRAK				
Eksperiment	$\Delta H_r / \text{J/g}$	$A_r / 1/\text{s}$	$E_a / \text{J/mol}$	RMSD
90 °C	136352	6946	43103	$7,92 \times 10^{-2}$
100 °C	165177	5057	42158	0,11
110 °C	173896	4276	40954	$7,16 \times 10^{-2}$
120 °C	182232	5340	41685	0,16

Tablica 4. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za smolu I-170 uz dodatak punila
Table 4. Estimated values of kinetic parameters for the I-170 resin with addition of filler

I-170 + CaCO₃				
ULJE				
Eksperiment	$\Delta H_r / \text{J/g}$	$A_r / 1/\text{s}$	$E_a / \text{J/mol}$	RMSD
90 °C	173965	5150	41275	$6,47 \times 10^{-2}$
100 °C	222786	5035	41910	$8,65 \times 10^{-2}$
110 °C	230527	3521	39756	0,18
120 °C	197402	2668	37914	0,26

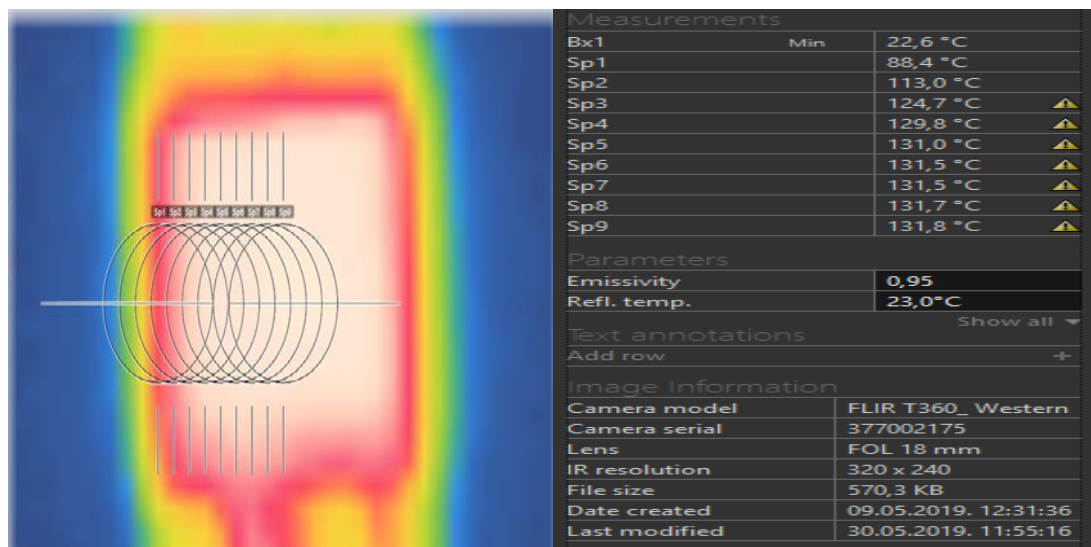
Provedeno je termografsko ispitivanje reakcija očvršćivanja uzorka poliesterske smole u valjkastom kalupu pri čemu se kalup zagrijavao uz pomoć zračne i uljne kupelji. Svrha provedbe samog snimanja jest određivanje temperaturnih profila, budući da se unutar samog kalupa za vrijeme reakcije postiže temperaturni gradijent koji se proteže od središta do stijenke kalupa. Izazov ovoj metodi predstavljaju kalupi malih dimenzija koji su napravljeni od poliranog bakra koji ima nisku emisivnost što sve skupa može utjecati na kvalitetu termografskih snimaka (Alexa i sur., 2017). Obrada eksperimentalnih termograma izvršena je u računalnom programu Flir Tools u kojem je moguće odrediti temperaturu u bilo kojoj točki ili mijenjati emisivnost u svrhu korekcije temperature. Na slici 7 vidljiv je termografski snimak očvršćivanja smole Chromoplast I-170 u zračnoj kupelji pri 100 °C. Samo snimanje je obavljeno na način da je kalup sa smolom ($d=1,5$ cm) izvađen iz zračne kupelji nakon što je krenula reakcija očvršćivanja te fiksiran uz pomoć kleme. Primjetan je gradijent temperatura od najniže temperature (plava boja) do najviše temperature (bijela boja) te je moguće uočiti bijelu površinu unutar koje se nalazi uzorak smole gdje je postignuta formalno najviša temperatura.



Slika 7. Termografski snimak reakcije očvršćivanja pri maksimalnoj temperaturi u središtu kalupa

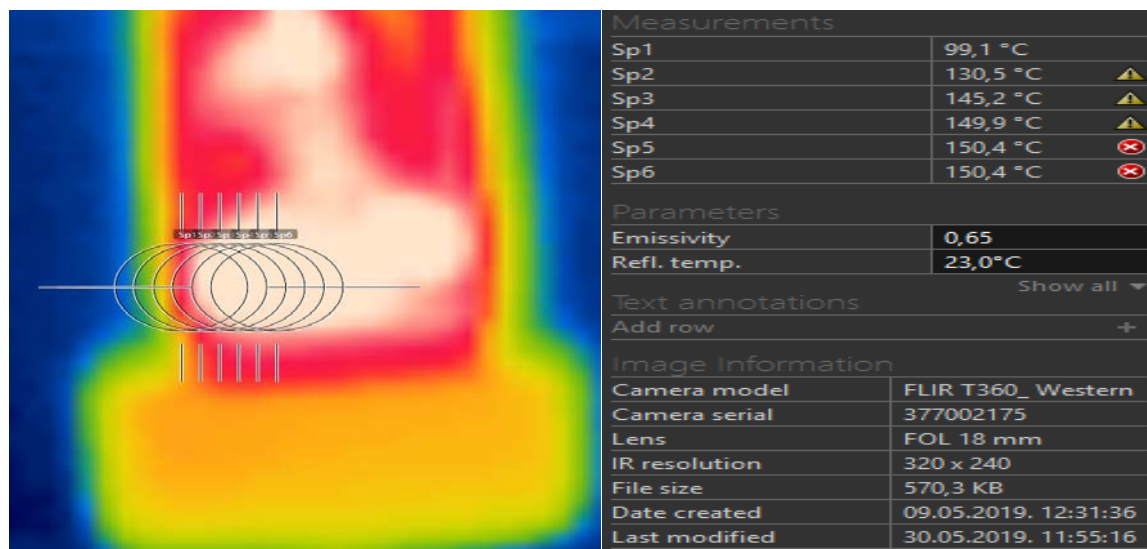
Figure 7. Thermographic image of the curing reaction at the maximum temperature in the center of the mold

Termogrami sadrže podatke o temperaturi u fokusu snimanja (gornji lijevi kut) te podatke o gradijentu svih mogućih temperatura na termogramu u obliku različitih boja (desna strana), počevši od bijele za najvišu te tamnoplave za najnižu temperaturu. Na termosnimkama su uhvaćeni periodi zagrijavanja te hlađenja uzoraka poliesterskih smola u kalupu u različitim vremenima. Eksperimenti su provedeni upotrebom referentne točke tj. crne izolir trake poznate emisivnosti ($\varepsilon = 0,95$) koja predstavlja približno idealno crno tijelo koje najbolje emitira toplinsko zračenja sa svoje površine. Jedna od uloga crne trake jest osigurati i homogenost površine kalupa na mjestu fokusa termokamere budući da je sama površina nehomogena, odnosno prepuna različitih oštećenja, nečistoća te komadića smole zaostale iz prethodnih eksperimenata. Treba uzeti u obzir i smetnje okolnih predmeta koji uslijed refleksije mogu narušavati termografsko snimanje (Nunak i sur. 2013). Temperature na eksperimentalnim termosnimkama su u principu niže od stvarnih temperatura pa ih je potrebno obraditi u računalnom programu. Na slici 8 vidljiv je prikaz termograma prethodno opisanog eksperimenta obrađenog u računalnom programu Flir Tools. Unutar samog programa moguće je odrediti temperaturu pojedine točke te podešavati emisivnost promatranog objekta u svrhu dobivanja što točnije temperature. Označeno je nekoliko točaka u području kalupa kojeg prekriva traka. U prvoj točki neposredno uz stijenku kalupa (crvena boja) dobivena je temperatura od 88,4 °C od koje slijedi temperaturni gradijent prema središtu kalupa uz povećanje temperature. Vidljivo da je u točki u središtu kalupa (bijela boja) dobivena najveća vrijednost temperature (131,8 °C) što je za očekivati prema teoretskim predviđanjima. Dakle za zaključiti je da je na ovom termogramu dobiven priželjkivani gradijent temperatura unutar kalupa, iako se radi o temperaturama izmjerenim na površini izolir trake, koje su zapravo niže od stvarnih temperatura.



Slika 8. Obrada termografske snimke u računalnom programu Flir Tools ($\varepsilon = 0,95$)
Figure 8. Thermographic image processing in a software Flir Tools ($\varepsilon = 0,95$)

U svrhu dobivanja preciznijih vrijednosti temperatura provedeno je mjerenje sa same površine kalupe, bez upotrebe referentne izolir trake a izazov samom mjerenju predstavljaju nehomogenost površine te činjenica da je kalup napravljen od materijala niske emisivnosti (poliranog bakra). Budući da je površina kalupa uslijed starosti oksidirana te nehomogena, unutar računalnog programa unesena je emisivnost koja se veže za oksidirani bakar ($\varepsilon = 0,65$) što je vidljivo na slici 9. Time je opet snimljen priželjkivani temperaturni gradijent uz još veću temperaturu u samom središtu kalupa (150,4 °C) što ipak odgovara realnijem temperaturnom maksimumu postignutom za vrijeme reakcije očvršćivanja.



Slika 9. Obrada termografske snimke u računalnom programu Flir Tools ($\varepsilon = 0,65$)
Figure 9. Thermographic image processing in a software Flir Tools ($\varepsilon = 0,65$)

Zaključci

Povišenjem temperature kupelji postižu se više maksimalne temperature u centru kalupa zbog povećanja brzine autokatalitičke reakcije, a time i reakcijske entalpije. Akumulacija topline u središtu kalupa nastaje jer je brzina nastanka topline uslijed reakcije veća od brzine odvođenja topline u kupelj, prvenstveno zbog niske toplinske vodljivosti smole. U zračnoj kupelji prijenos topline na stijenu kalupa sporiji je u odnosu na uljnu kupelj uslijed konvekcijskog mehanizma prijenosa topline. Veća brzina strujanja zraka u zračnoj kupelji vodi do povećanja koeficijenta prijenosa topline, budući da se smanjuje debljina graničnog sloja. Odabrani matematički model na zadovoljavajući način simulira proces očvršćivanja u kalupima valjkastog oblika te se njime može predvidjeti ponašanje sustava i u uvjetima izvan područja istraživanja. Infracrvenom kamerom moguće je uspješno snimiti temperaturne profile po presjeku kalupa za vrijeme reakcije očvršćivanja poliesterskih smola. Kvaliteta dobivenih termograma ovisi o materijalu i dimenzijama kalupa, stanju njegove površine te rezoluciji infracrvene kamere. Računalnom obradom termograma moguće je prilagoditi emisivnost stanju površine materijala kalupa pri čemu se u samom središtu dobivaju veće (realnije) temperature u odnosu na eksperiment sa referentnom izolir trakom. Kod kalupa izrađenih od materijala niske emisivnosti poput poliranog bakra potrebno je u svrhu snimanja temperaturnog gradijenta upotrebljavati isključivo nove kalupe, čija površina ne sadrži nečistoće i oštećenja te slojeve oksida. Upotrebom kalupa većih dimenzija moguće je postići bolju razlučivost temperaturnih gradijenata po presjeku kalupa.

Literatura

- Alexa, P., Solár, J., Čmiel, F., Valicek, P., Kadulová, M. (2017): Infrared thermographic measurement of the surface temperature and emissivity of glossy materials, *J. Build. Phys.*, 41(6), 533-546.
- Janović, Z.(1997): Polimerizacije i polimeri, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb.
- Lahiri, B. B., Bagavathiappan, S., Jayakumar, T., Philip, J. (2012): Medical applications of infrared thermography: A review, *Infrared Phys. Technol.* 55(4), 221-235.
- Kamal, M. R.(1974): Thermoset characterization for moldability analysis. *Polym. Eng. Sci.*, 14(3), 231-239.
- Kosar, V., Šercer, H., Tomašić, V. (2012): Cure modelling of polyester thermosets in a glass mould, *Chem. Eng. Res. Des.*, 90(4), 534-540.
- Nunak, N., Roonprasang, K., Suesut, T., Nunak, T.(2013): Emissivity estimation using thermographic camera, *Adv. Mat. Res.* 811, 380-387.
- Paluvai, N., Mohanty, S., Nayak, S.(2014): Synthesis and Modifications of Epoxy Resins and Their Composites: A Review, *Polym-Plast. Tech. Eng.* 53(16), 1723-1758.
- Yousefi, A., Lafleur, P. G., Gauvin, R.(1997): Kinetic studies of thermoset cure reactions: A review, *Polym. Compos.* 18(2), 157-168.

Application of an IC thermography in polymer crosslinking in model moldings

Vanja Kosar*, Ante Koštić, Marija Lukić

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Savska cesta 16, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: vkosar@fkit.hr*

Summary

In this work, the hardening reaction of unsaturated polyesters in roller molds heated in an oil and air bath was studied. The main problem with the exothermic curing reaction is heat generation and a significant increase in temperature inside the mold. A mathematical model for the purpose of simulating the hardening reaction is proposed. Model validation was performed by comparison with experimentally measured temperatures in the mold center. Thermographic testing of the hardening reaction in model molds was performed. The purpose of the recording is to determine the temperature profiles, since inside the mold during the reaction there is a temperature gradient that extends from the center to the wall of the mold, which can lead to the formation of a thermosetting product of uneven properties. The challenge of the method itself is the small dimensions of the mold as well as the fact that the molds are made of low emissivity material (polished copper).

Keywords: curing, polyester resin, mold, mathematical model, IR thermography

Utjecaj broja pregrada u milireктору na intenzifikaciju procesa

Marija Lukić*, Domagoj Vrsaljko

*Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
 Marulićev trg 19, HR - 10 000 Zagreb*

**Dopisni autor: mlukic@fkit.hr*

Sažetak

Malo povećanje veličine mikroreaktora prema milimetarskim dimenzijama povećava brzinu protoka reaktanata i na taj način prevladava mali protok kao osnovni nedostatak klasičnih mikroreaktora. Povećanjem dimenzija kanala mijenja se profil strujanja i miješanje u reaktoru. Primjenom aditivne proizvodnje (engl. *Additive Manufacturing*, AM) moguće je konstruirati reaktorske sustave koji osiguravaju intenzifikaciju miješanja što posljedično dovodi do bržeg odvijanja kemijskih procesa. Za modelnu reakciju odabrana je transesterifikacija suncokretova ulja u metilne estere masnih kiselina. Konverzija, a time i uspješnost prijenosa tvari i energije praćena je infracrvenom spektroskopijom (FTIR). Ovim istraživanjem razrađen je novi pristup izrade cijevnih polimernih milireaktora ($\varphi=2,5$ mm) s različitim brojem pregrada (1, 3, 5 i 7) i dimenzija ($\varphi=1,2$ mm x 2 mm duljine) pomoću tehnologije proizvodnje rastaljenim filamentom (engl. *Fused Filament Fabrication*, FFF) u svrhu istraživanja intenzifikacije procesa. Dobiveni rezultati pokazuju da porastom broja pregrada dolazi do poboljšanja radijalnog miješanja fluida kroz cijev milireaktora pri čemu se stvara veća dodirna površina između reaktanata za provođenje kemijske reakcije što dovodi do povećanja konverzija u kraćem vremenu zadržavanja, τ .

Ključne riječi: proizvodnja rastaljenim filamentom, milireaktor s pregradama, intenzifikacija procesa, kontinuirana proizvodnja FAME

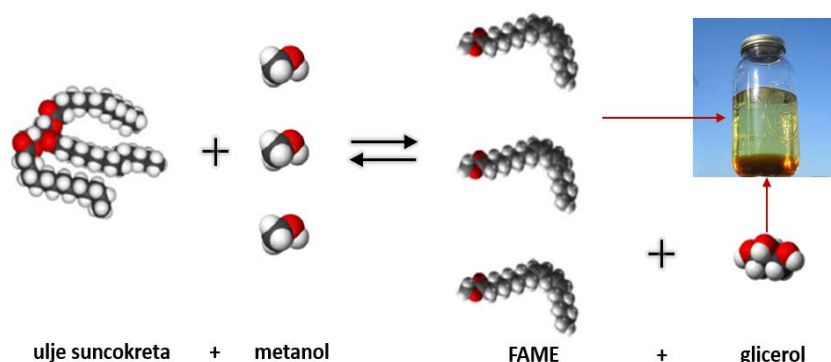
Uvod

Znanstvena zajednica i kemijski inženjeri rade na intenzifikaciji procesa (Wiles i Watts 2011.) čija je funkcija smanjenje vremena proizvodnje i utrošenih sirovina te unaprjeđenje vođenja samog procesa. Jedan od načina intenzifikacije proizvodnje je prelazak s tradicionalno šaržnih procesa na kontinuirane (Diab i Gerogiorgis 2017). Kontinuirani procesi su dobro razvijeni i uspostavljeni ako su u pitanju velike proizvodne količine određenog produkta ili proizvoda, no sve se više termin upotrebljava u novije vrijeme za primjenu na laboratorijskoj skali u kojoj se često koriste mikroreaktori. Grana kemije koja se bavi navedenim područjem je protočna kemija (engl. *Flow Chemistry* (Movsisyan i sur. 2016)), a odnosi se na kemijske reakcije koje se provode u protočnim sustavima, najčešće u mikroreaktorima (Némethné-Sóvágó i Bene 2014). S gledišta kemijskoga reakcijskoga inženjerstva radi se o cijevnim reaktorima malih promjera. Reakcije koje se provode u industrijskim sektorima poput farmaceutske i biokemijske industrije su često kinetički spore. Stoga bi kontinuirani reaktori trebali biti velikih duljina kako bi se osigurala odgovarajuća konverzija zbog režima strujanja koji bi osiguravao zadovoljavajući prijenos tvari i topline uz usku raspodjelu vremena zadržavanja, τ .

U posljednjih nekoliko godina poboljšanje mikrofluidnih platformi u laboratorijskim uvjetima dovelo je do pomaka ka boljoj regulaciji protoka i do jednostavnijeg načina primjene. U posljednjem desetljeću primjene mikroreaktorskih uređaja brzo su se proširile, ali njihova šira primjena industrijska primjena i dalje je ograničena malim količinama proizvoda i još uvijek relativno složenim metodama proizvodnje. Značajno istraživačko polje je optimiranje i usvajanje poznatih reakcija i reakcijskih dijelova (sekvenci). Navedeni razvoj u reaktorima s mili i mikro protokom pokrenuo je promjene koje otvaraju put za tehnološki napredak u kemijskoj sintezi. Prednosti mikroreaktora u odnosu na konvencionalne reaktore uključuju ogromna poboljšanja u energetske učinkovitosti, brzini reakcije i prinosu, sigurnosti, pouzdanosti te proizvodnji na licu mjesta (Ehrfeld i sur. 2005). Kao glavni nedostatak mikroreaktora identificirana je činjenica da još uvijek ne mogu zamijeniti sve postojeće sustave, a mali promjer mikrokanala može dovesti do začepjenja u radu s viskoznim tvarima i krutinama. Također, staklo kao najčešći materijal za izradu mikroreaktora je vrlo lomljiv, pa je sama niska cijena izrade mikroreaktora upitna, uzevši u obzir kratki vijek trajanja (Hajdari Gretić i sur. 2017). Osnovna razlika između mili i mikroreaktora je u njihovim dimenzijama pri čemu je bitno napomenuti da se postupci vođenja procesa između mili i mikroreaktora ne razlikuju te se karakteristike i jednih i drugih mogu zajedno proučiti i objasniti. Mikroreaktori su zbog malih volumena ograničenog proizvodnog kapaciteta i zbog tog razloga su često primjereni za optimiranje protočnih procesa na laboratorijskoj skali. Za razliku od njih, milireaktori zbog širih kanala, reda veličine i do nekoliko milimetara, imaju veću propusnost što uzrokuje manji pad tlaka te su pogodniji za korištenje na industrijskoj razini (Rossi 2012). Reaktori milimetarskih veličina mogu biti potencijalni izbor između konvencionalnih mikroreaktora u vidu poboljšanja kapaciteta, efikasnosti i robusnosti prilikom rukovanja (Sattari i sur. 2020). Nedostatak milireaktora se očituje u slabijem prijenosu tvari i topline. Uslijed povećanja dimenzija, smanjuje se i efikasnost miješanja, ali se može poboljšati elementima koji pospješuju miješanje poput statičkih miješala (Rossi 2012). Poznato je da je u mikrofluidnim sustavima prisutno laminarno strujanje. Miješanje reaktanata na tako maloj skali oslanja se na intermolekularnoj difuziji koja je ograničena na dimenzije od nekoliko desetaka do nekoliko stotina mikrometara. Bitno je napomenuti da je volumen mikroreaktora i dalje prevelik da bi imao značajnijeg utjecaja na ponašanje procesa na molekularnoj razini, no utjecaj mikrokanala na prijenos tvari i topline je neupitan (Šalić i sur. 2010). Vođeni navedenim premisama cilj ovog rada je bilo provjeriti utječe li broj pregrada na intenzifikaciju procesa proizvodnje biodizela u reaktorima s različitim brojem pregrada, odnosno, statičkih miješala. Milireaktori s pregradama izrađeni su proizvodnjom rastaljenim filamentom (engl. *Fused Filament Fabrication, FFF*), vrstom aditivne proizvodnje pri kojoj se rastaljeni materijal po izlasku iz mlaznice kontinuirano taloži stvarajući slojeve koji oblikuju trodimenzionalne objekte. U osnovi, FFF uređaj koristi proces ekstruzije (Kutz 2011) i sastoji se od grijane komore s mlaznicom i radne podloge po kojoj se materijal istiskuje. Princip FFF je da se filament polimernog materijala gura u vruću mlaznicu iz koje izlazi tanka nit polimerne taljevine. Tvorevina se izrađuje tako da se mlaznica pomiče u x - y ravnini stvarajući jedan sloj te se po završetku sloja mlaznica ili diže ili se podloga spušta te se izrađuje sljedeći sloj. Nakon polaganja sloja, on se hladi i skrućuje, a proces se ponavlja do vrha izrađenog predmeta (Gebhardt 2011). Esteri masnih kiselina (biodizel) dobivaju se reakcijom transesterifikacije (slika 1) koja uključuje reakciju triglicerida, glavnog sastojka biljnog ulja ili životinjske masti, i nižih alkohola (metanol) uz prisutnost katalizatora. Kao produkt nastaje odgovarajući ester masne kiseline, odnosno FAME (engl.

Fatty Acid Methyl Ester). Jedna molekula triglicerida reagira s tri molekule alkohola te nastaju tri molekule monoalkiliranog estera (FAME) te jedna molekula glicerola (slika 1).

Reakcija se odvija postupno u tri stupnja koji rezultiraju digliceridom i monogliceridom kao međuproduktima. Lužnato katalizirana reakcija bazirana na metanolu standardno se provodi pri temperaturi $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i molarnom omjeru metanol:ulje 6:1 za transesterifikaciju (Knothe i Gerpen 2005.). Najjednostavniji način proizvodnje FAME je u kotlastom reaktoru s miješanjem, a nemješljivost ulja i alkohola ograničava brzinu reakcije te reakcija uglavnom traje nekoliko sati (Yeh i sur. 2016).



Slika 1. Schema sinteze biodizela
Figure 1. Scheme of biodiesel synthesis reaction

Materijali i metode

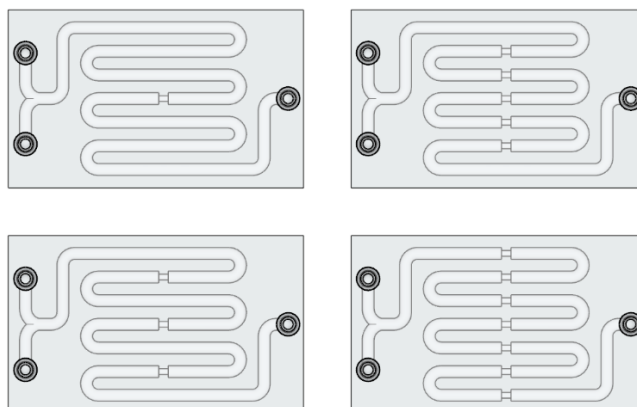
Proizvodnjom rastaljenim filamentom izrađeni su setovi od jednostavnih cijevnih polimernih milireaktora ($\varphi = 2,5\text{ mm}$) s različitim brojem pregrada (1, 3, 5 i 7) i dimenzija ($\varphi = 1,2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ duljine) od akrilonitril/butadien/stirena (ABS) i poli(etilen-tereftalata) obogaćenog glikolom (PETG).

Trodimenzionalni model milireaktora s pregradama izrađen je SketchUp programu, spremljen u STL datoteku (slika 2) te se učitava se u računalni program koji rastavlja model u slojeve i na taj način ga priprema za proizvodnju na 3D-pisaču.

Iz slicera se dobiva datoteka koja daje uputu pisaču u kojem smjeru pomicati mlaznicu pri proizvodnji svakog pojedinog sloja (slika 3) i na taj se način zadaje debljina sloja, brzina proizvodnje, temperature mlaznice i podloge te ostali parametri.

Za izradu milireaktora upotrijebljeni su sljedeći polimerni materijali za proizvodnju rastaljenim filamentom:

- ABS Extrafill, EU ($2,85\text{mm} \pm 0,05\text{ mm}$), prozirni, na osnovi ABS-a; temperatura ispisa od $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $240\text{ }^{\circ}\text{C}$
- PETG Yellow Transparent, EU ($2,85\text{mm} \pm 0,05\text{ mm}$), prozirni, na osnovi PETG-a; temperatura ispisa od $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 2. Trodimenzionalni model izrađen u SketchUpu s različitim brojem pregrada (1, 3, 5 i 7) dimenzija ($\varphi = 1,2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ duljine)
Figure 2. Three-dimensional model made in SketchUp with different number of baffles (1, 3, 5 and 7) dimensions ($\varphi = 1.2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ length)



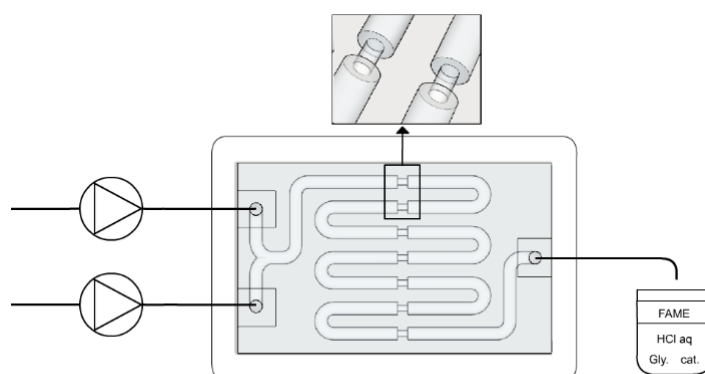
Slika 3. Fotografija milireaktora sa sedam pregrada tijekom izrade FFF-om
Figure 3. Photography of a millireactor with seven baffles during FFF fabrication

Za sintezu biodizela u milireaktoru upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- suncokretovo jestivo ulje, proizvedeno u EU-u
- metanol (MeOH) 99,9 % p.a., Carlo Erba reagents, Francuska
- klorovodična kiselina (HCl) 36,5 %, Kemika, Hrvatska
- kalijev hidroksid (KOH) p.a., T.T.T. d.o.o., Hrvatska

Reakcija transesterifikacije triglicerida u smjesu estera viših masnih kiselina (FAME, odnosno biodizel) i glicerol odvijala se pri temperaturama od 50 °C i 60 °C; vremenima zadržavanja 5 min, 7,5 min, 10 min, 12,5 min i 15 min; molarnom omjeru suncokretovo ulje:metanol 1:6 i masene koncentracije katalizatora KOH u MeOH od 1 % prema masi ulja.

Pomoću klipnih pumpi u reaktor su dodavani reaktanti metanol (s otopljenim kalijevim hidroksidom) i suncokretovo ulje (slika 4). Na samom izlazu iz milikanala spojena je silikonska cjevčica koja produkt dovodi izravno do vijale u koju je prethodno dodana vodena otopina klorovodične kiseline $c(\text{HCl})=0,5 \text{ mol l}^{-1}$ što zaustavlja reakciju.



Slika 4. Shematski prikaz reakcijskog sustava sinteze FAME u milireaktoru s pregradama; sastoji se od klipnih pumpi, milireaktora u uljnoj kupelji te skupljanja produkta u vijalu
Figure 4. Schematic presentation of the reaction system of FAME synthesis in the millireactor with baffles; consists of piston pumps, millireactor in oil bath, and collection of the product in the vial

Mjerenja konverzije reakcije provedena su na infracrvenom spektrofotometru s Fourierovom transformacijom signala Perkin-Elmer Spectrum One opremljenim s ATR dodatkom. Uzorci su snimani u području od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1} , rezolucijom od 4 cm^{-1} , a mjerenje je provedeno tako da je kap uzorka prenesena staklenim štapićem na ATR kristal. Kako bi se povećao odnos signala prema šumu svaki uzorak je snimljen četiri puta, a u grafovima je prikazana njihova srednja vrijednost. Za određivanje konverzije FTIR-om odnosno mjerenja udjela FAME u uzorcima, pripremljene su baždarne otopine različitih koncentracija suncokretova ulja i iz njega dobivenog FAME. Snimljeni su infracrveni spektri uzoraka te su iz dobivenih spektrograma određena područja gdje dolazi do odstupanja u spektrima, tj. visini signala ovisno o koncentraciji FAME i ulja. Nekoliko je karakterističnih vrpca s vrhovima na 1436 cm^{-1} , 1196 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} po kojima se razlikuju suncokretovo ulje i iz njega dobiven FAME. Za praćenje konverzije odabrana je vrijednost transmisije na 1099 cm^{-1} jer vrh pokazuje najveću promjenu vrijednosti transmisije o koncentraciji sa $R^2 = 0,9998$. Iako FTIR nije najpogodnija metoda za kvantitativna mjerenja, razvijen je brz i jednostavan način određivanja konverzije FAME u kojem ne dolazi do odstupanja u rezultatima u usporedbi s GC i $^1\text{H-NMR}$ metodom (Lukić i Vrsaljko 2020).

Rezultati i rasprava

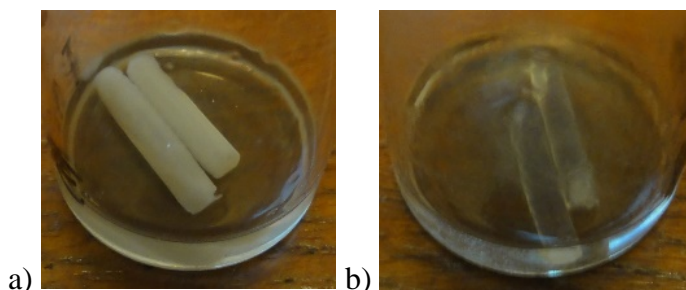
Milireaktori s pregradama trebaju biti izrađeni od materijala kompatibilnog sa zadanim reakcijskim uvjetima sinteze biodizela kako ne bi prilikom provođenja reakcije došlo do otapanja, bubrenja, kemijske reakcije, ili gubitka transparentnosti. Budući da je došlo do promjene u reaktorima prilikom provođenja sinteze, ispitana je kompatibilnost prema reakcijskim uvjetima komercijalno dostupnih transparentnih materijala: ABS transparent i PETG Yellow transparent od kojih su milireaktori izrađeni. Rezultati su prikazani u tablici 1. Filament polimernog materijala ABS Extrafill značajno bubri u biodizelu, masa mu poraste za 31,1 %, a u metanolu s otopljenim kalijevim hidroksidom za 3,3 % nakon 6 sati izloženosti (tablica 1).

Tablica 1. Rezultati kompatibilnosti polimernog materijala na reakcijske uvjete sinteze biodizela

Table 1. Results of compatibility of polymeric material to reaction conditions of biodiesel synthesis

Polimerni materijal	Medij	Porast mase nakon 3 h (%)	Porast mase nakon 6 h (%)
ABS Extrafill	biodizel	25,9	31,1
	sun. ulje	1,0	1,7
	MeOH+KOH	3,0	3,3
PETG Yellow	biodizel	1,9	2,8
	sun. ulje	1,1	2,2
Transparent	MeOH+KOH	otopljen	otopljen

Također, filamentu su se promijenila optička svojstva, dolazi do gubitka transparentnosti pri čemu postaje mutno bijeli nakon izloženosti biodizelu (slika 5 a). Polimerni materijal na osnovi PETG-a, ne zadovoljava uvjete sinteze biodizela, jer dolazi do otapanja u zaluženom metanolu u manje od 3 h izloženosti. Navedeno se najbolje vidi na slici 5 gdje je jasno uočljivo otapanje reaktora na mjestu ulaza MeOH+KOH, kao i erodiranje s nastankom nusprodukta duž cijele duljine kanala. Produkt skupljen u vijalu je istražen FTIR analizom, vidljiva je žuta otopina koja u sebi sadrži 40 % FAME, pri $\tau = 12,5$ min i 60 °C i međuprodukte reakcije, no milireaktori s pregradama izrađeni od PETG-a nisu dalje istraživani zbog loše kemijske otpornosti.



Slika 5. Promjena polimernog materijala na osnovi ABS-a: a) u FAME, b) u ulju suncokreta

Figure 5. Change of polymer material based on ABS: a) FAME, b) sunflower oil

U tablici 2 sumirani su rezultati sinteze FAME u reaktorima s pregradama. Sinteze su provedene u milireaktorima izrađenim od polimernog materijala na bazi ABS-a koji pokazuje lošu kemijsku otpornost prema biodizelu što dovodi do bubrenja unutar kanala milireaktora. Na slici 7 uočava se promjena početne dimenzije cijevi reaktora koja je iznosila u svim reaktorima $\varphi=2,5$ mm kao i promjena boje unutra kanala. Uočljivo je da se povećanjem broja pregrada u milireaktoru intenzificira proces sinteze biodizela pri čemu je nastajanje FAME kvalitativno vidljivo u nabubrenim kanalima bijele boje.



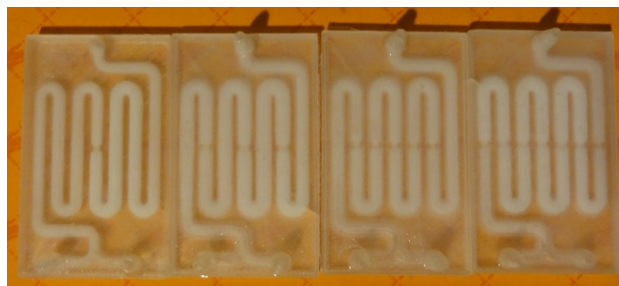
Slika 6. Milireaktor izrađen od PETG-a nakon provedene sinteze i skupljeni produkt u vijali
Figure 6. Millireactor made of PETG after synthesis and product collected in a vial

Tablica 2. Konverzija FAME određena FTIR metodom za sinteze u reaktorima s pregradama na 50 °C i 60 °C

Table 2. FAME conversion determined by FTIR method for syntheses in reactors with baffles at 50 °C and 60 °C

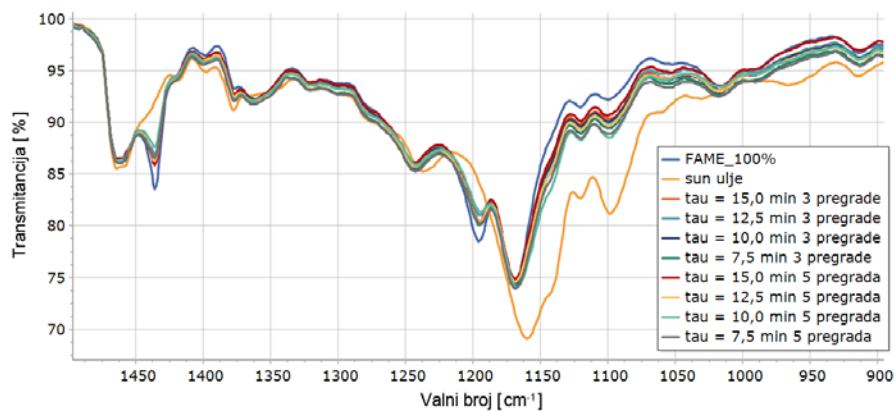
τ , min	Konverzija FAME / %							
	1 pregrada		3 pregrade		5 pregrada		7 pregrada	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
15,0	62	66	69	74	67	86	67	70
12,5	28	64	74	79	59	88	61	73
10,0	57	55	61	72	38	73	65	51
7,5	44	44	46	68	24	70	38	49
5,0	41	32	47	63	9	35	29	48

Iako se vidi trend povećanja konverzije FAME povećanjem broja pregrada on ne iznosi više od 88 % pri $\tau = 12,5$ min u milireaktoru s pet pregrada. Daljnji logični porast konverzije FAME koji se očekivao u reaktoru sa sedam pregrada nije ostvaren, bar ne kvantitativno jer je teško objasniti pad konverzije ako se uzme u obzir značajno bubrenje milireakotra u biodizelu, a skupljanje produkta se odvijalo pri stacionarnom stanju nakon četiri vremena zadržavanja, τ . Pošto su reaktanti nemješljive kapljevine, duž cijevi milireaktora pojavilo se naizmjenično segmentirano strujanje metanola s katalizatorom i ulja suncokreta koje je postepeno tijekom odvijanja reakcije u milireaktoru zamijenjen produktima, FAME i glicerolom. Pošto je konverzija FAME lošija na 50 °C, ali unutar 10 % vrijednosti s obzirom na rezultate sinteze na 60 °C, postignuta je intenzifikacija procesa. Sinteza na 60 °C ne polučuje značajniji napredak u rezultatima što se osim nekompatibilnosti polimernog materijala za sintezu biodizela može pripisati i stvaranju mjehurića metanola uslijed isparavanja na 60 °C. Navedeno dovodi do nekontrolirane reakcije, jer molarni omjer više nije 6:1. Također, nije prisutno jasno dvofazno segmentirano strujanje nego su vidljive tri faze, plinska metanola, te kapljevita ulja suncokreta i neisparenog metanola s katalizatorom. Za daljnja istraživanja potrebno je odabrati odgovarajući polimerni materijal za FFF i sintezu provoditi na temperaturama između 50 °C i 60 °C.



Slika 7. Fotografija milireaktora sa pregradama nakon provedene sinteze
Figure 7. Photography of millireactor with baffles after synthesis

Na slici 8 prikazani su FTIR spektri sinteza provedenih na 60 °C i pri vremenima zadržavanja u rasponu od 7,5 min do 15 min u milireaktorima s tri i pet pregrada. Postignuta je intenzifikacija procesa te je konverzija za sva navedena τ iznosila oko 70 %, dok je najveća intenzifikacija postignuta kod milireaktora s pet pregarada pri τ 12,5 min 88 % i 15 min 86 %. Usporedbom s rezultatima postignutim pri istim reakcijskim uvjetima u milireaktoru bez pregrada izrađenih stereolitografijom dimenzija kanala $\varphi = 2,5$ mm (Lukić i Vrsaljko, 2020) konverzija je iznosila 79 % pri $\tau = 12,5$ min i 69 % pri $\tau = 12,5$ min što jasno pokazuje poboljšanje procesa sinteze bez obzira na nekomatibilnost polimernog materijala na osnovi ABS-a.



Slika 8. Dio FTIR spektra sun. ulja i FAME dobivenih reakcijom u milireaktorima s tri i pet pregrada pri različitim vremenima zadržavanja, τ
Figure 8. Part of the FTIR spectrum of sun. oil and FAME obtained by reaction in millireactors with three and five baffles at different retention times, τ

Zaključci

Porastom broja pregrada dolazi do poboljšanja radijalnog miješanja fluida kroz cijev milireaktora pri čemu se stvara veća dodirna površina između reaktanata za provođenje kemijske reakcije što u pravilu dovodi do povećanja konverzija u manjem vremenu zadržavanja, τ . Najvjerojatniji razlog odstupanja rezultata u milireaktorima s 1 i 7 pregrada leži u odabiru materijala za FFF jer PETG ima lošu kemijsku otpornost na metanol s katalizatorom i biodizel pa dolazi do nagrizanja i bubrenja reaktora.

Zbog činjenice da dio metanola i KOH reagira s milireaktorom, manje reaktanta i katalizatora ostaje za proces transesterifikacije ulja suncokreta u FAME, ali i bubrenje kanala milireaktora u biodizelu dovodi do smanjene i nekonzistentne konverzije. Postignuta je intenzifikacija procesa povećanjem broja pregrada s obzirom na rezultate dobivene u prethodnim istraživanjima u milireaktoru bez pregrada ($\varphi = 2,5$ mm). Rezultati daju obećavajuću primjenu milireaktora s pregradama u kojima se postižu visoke konverzije (~85 %) pri kratkom vremenu zadržavanja (12,5 min) te upotrebom drugog, otpornog polimernog materijala za FFF mogu se proizvesti milireaktori za intenzificiranu, kontinuiranu proizvodnju biodizela.

Literatura

- Amirmohammad, S., Pedram H., Mina H. (2020.): Multiphase flow in microfluidics: From droplets and bubbles to the encapsulated structures, *Adv. Colloid Interface Sci.* 282 102208
- Diab, S., Gerogiorgis, D. I. (2017): Process modelling, simulation and techno-economic evaluation of separation solvents for the continuous pharmaceutical manufacturing (CPM) of diphenhydramine, *Org. Process Res. Dev.* 21, 924-946.
- Ehrfeld, W., Hessel, V., Löve H. (2005): *Microreactors: New Technology for Modern Chemistry*, Germany: Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1-69.
- Gebhardt, *Understanding Additive Manufacturing*, Munich: Hanser Publishers, 2011.
- Hajdari Gretić Z., Rahelić, T., Vrsaljko, D. (2017): Materijali za izradu mikroreaktora, *Kem. Ind.* 66, 633–640.
- Knothe, G., Gerpen, J. V. (2005): *The Biodiesel Handbook*, USA: AOCS Publishings, New York pp. 1-328.
- Kutz, M. (2011): *Applied plastics engineering handbook*, USA: William Andrew, Elsevier, pp. 227-247.
- Lukić, M., Rahelić, T, Vrsaljko, D. (2018): Cijevni milireaktori izrađeni aditivnom proizvodnjom, *Kem. Ind.* 67, 95–106.
- Lukić, M., Vrsaljko, D. (2020.): Effect of channel dimension on biodiesel yield in millireactors produced by stereolithography, *Int. J. Green Energy*, In press DOI: 10.1080/15435075.2020.1831513
- Movsisyan, M., Delbeke, E., Berton, J., Battilocchio, C., Ley, S. V., Stevens, C. V. (2016): Taming hazardous chemistry by continuous flow technology, *Chem. Soc. Rev.* 45, 4892-4928.
- Némethné-Sóvágó, J., Bene M. (2014): Microreactor: A new concept for chemical synthesis and technological feasibility (Review), *Mater. Sci. Eng.* 39, 89-101.
- Rossi, E. (2012): *Micro/Meso-Structured Reactors for Chemical Synthesis: Applications in Materials Science and Medicinal Chemistry*, Doktorska disertacija, University of Padova, pp. 11-62.
- Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B. (2010): Mikroreaktori, *Kem. Ind.* 59, 227-248.
- Yeh, S. I., Huang, Y. C., Cheng, C. H., Cheng, C. M., Yang, J. T. (2016): Development of a millimetrically scaled biodiesel transesterification device that relies on droplet-based co-axial fluidics, *Scient. Report.* 6, 1-7.
- Wiles, C., Watts, P. (2011): Recent advances in micro reaction technology, *Chem. Commun.* 47, 6512-6535.

Influence of number of baffles in millireactor on process intensification

Marija Lukić*, Domagoj Vrsaljko

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: mlukic@fkit.hr*

Summary

A small increase in the size of the microreactor to millimetre dimensions increases the flow rate of the reactants and thus prevails low volume of flow as the main disadvantage of the classical microreactors. Increasing the dimensions of the channel changes the flow profile and mixing in the reactor. By applying additive manufacturing (AM), it is possible to construct reactor systems that ensure the intensification of mixing, which consequently leads to faster chemical processes. Transesterification of sunflower oil into fatty acid methyl esters was chosen for the model reaction. Conversion, and thus the success of mass and energy transfer, was monitored by infrared spectroscopy (FTIR).

This research developed a new approach to the production of simple polymer millireactors ($\varphi = 2.5$ mm) with different numbers of baffles (1, 3, 5 and 7) and dimensions ($\varphi = 1.2$ mm x 2 mm in length) using fused filament fabrication (FFF) for the purpose of research of the process intensification. The obtained results show that as the number of baffles increases, the radial mixing of the fluid through the millireactor channel increases, creating a larger contact surface between the reactants for conducting the chemical reaction, which leads to an increase in conversions in shorter retention time, τ .

Keywords: fused filament fabrication, millireactor with baffles, process intensification, continuous FAME production

Primjena niskotemperaturnog eutektičkog otapala u pročišćavanju modelnog FCC benzina

Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR - 10 000 Zagreb

*Dopisni autor: jprlic@fkit.hr

Sažetak

Obradom sirove nafte moguće je dobiti različite proizvode visoke vrijednosti. Jedan od takvih proizvoda je motorni benzin dobiven miješanjem više frakcija, s najvećim udjelom FCC benzina. Budući da je FCC benzin frakcija u kojoj su prisutne znatne količine sumpornih i dušičnih spojeva te aromata, izgaranjem goriva, nastaju ispušni plinovi bogati štetnim SO_x i NO_x spojevima, ugljikovim monoksidom te krutim česticama. Da bi se spriječila emisija štetnih tvari, potrebno je provesti procese desulfurizacije, denitrifikacije te dearomatizacije.

Kako su se niskotemperaturna eutektička otapala pokazala kao dobra zamjena štetnih organskih otapala, u radu je ispitana mogućnost pročišćavanja modelnog FCC benzina primjenom niskotemperaturnog eutektičkog otapala pripremljenog iz tetra-*n*-butilamonij-bromida i mravlje kiseline u postupku šaržne ekstrakcije. Proces ekstrakcije je optimiran kako bi se količine štetnih tvari, tiofena, piridina i toluena svele na minimum. Definirano je optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije, maseni odnos pojne smjese i otapala, broj okretaja miješala te je provedena višestupnjevita ekstrakcija. Također, ispitana je djelotvornost ekstrakcije ključnih komponenti primjenom regeneriranog otapala, Tbab-Mk.

Rezultati su pokazali kako je optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije 20 min, pogodan maseni odnos pojne smjese i otapala 1,0, dok promjena broja okretaja miješala nije značajno utjecala na djelotvornost ekstrakcije. Zadovoljavajuća djelotvornost ekstrakcije ostvarena je primjenom regeneriranog otapala pa se optimalni rezultati mogu očekivati u višestupnjevitoj ekstrakciji s regeneriranim otapalom.

Ključne riječi: denitrifikacija, desulfurizacija, FCC benzin, kapljevinska ekstrakcija, niskotemperaturno eutektičko otapalo

Uvod

Fosilna goriva su još uvijek osnovni izvor energije na Zemlji, a nastaju od prirodnih resursa anaerobnim raspadanjem mrtvih organizama. U fosilna goriva spadaju nafta, prirodni plin i ugljen i predstavljaju jedan od primarnih oblika energije. Iako sastav nafte većinom čine ugljikovodici, prilikom njezine obrade potrebno je uzeti u obzir i ostale komponente koje sadrži, sumpor, kisik i dušik. Sumporov dioksid (SO₂), štetni plin koji nastaje izgaranjem fosilnih goriva, predstavlja prijetnju ljudskom zdravlju te samom ekosustavu (Katsouyanni i sur., 1997; Fabulic Ruszkowski i sur., 2003; Venners i sur., 2003; Chen i sur., 2007; Hime i sur., 2018). Naime, prevelika izloženost plinu SO₂ može dovesti do određenih respiratornih bolesti (npr. astma, kronični bronhitis), može uzrokovati i neurološke poremećaje (Meng, 2003; Sang i sur., 2010; Han i sur., 2018) te iritaciju kože i sluznice očiju.

Osim toga, SO_2 reagira s vlagom što rezultira nastankom kiselih kiša i magle s niskim pH vrijednostima. Kisele kiše uzrokuju eroziju građevina, dovode do promjene pH tla i vode. Iz svega navedenog, proizlazi važnost pročišćavanja goriva. Najveći dio sumpora u benzinu dolazi iz procesa katalitičkog krekiranja u fluidiziranom sloju (*engl. Fluidized Catalytic Cracking, FCC*) čije smanjivanje je moguće ostvariti obradom produkata FCC procesa, predobradom ili izborom sirovine, te modificiranom frakcionacijom (Fabulic Ruszkowski i sur., 2005; Valla i sur., 2007). Hidrodesulfurizacija (*engl. hydrodesulfurization, HDS*) je proces blagoga hidrokrekiranja koji se koristi u rafinerijama za prevođenje sumporovih, dušikovih i kisikovih spojeva u sumporovodik, amonijak, vodu i odgovarajuće ugljikovodike. *HDS* postupkom mogu se lako ukloniti visoko reaktivni spojevi merkaptani, sulfidi i disulfidi, dok je aromatične sumporove spojeve poput tiofena, benzotiofena, dibenzotiofenai njihovih alkilnih derivata, zbog njihove iznimne stabilnosti, teško ukloniti hidrodesulfurizacijom (Babich i sur., 2003; Wang i sur., 2018). Stoga se javila potreba za primjenom nekonvencionalnih metoda pročišćavanja goriva kao što su ekstrakcijska desulfurizacija i denitrifikacija. Ekstrakcijska desulfurizacija i denitrifikacija provode se selektivnim otapalima koji imaju mogućnost otapanja neželjenih, ključnih komponenti što omogućuje njihovo uklanjanje iz goriva. Godinama se kao selektivna otapala koriste konvencionalna organska otapala, ali se zbog njihove toksičnosti, zapaljivosti, hlapivosti i nemogućnosti biorazgradnje teže pronaći zamjenska i ekološki prihvatljivija "zelena" otapala poput niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Najveća prednost ekstrakcijske desulfurizacije je provedba procesa pri niskim temperaturama i tlaku bez utjecaja na druge spojeve prisutne u gorivu, a industrijska oprema potrebna za ovaj proces je konvencionalna i može se jednostavno, bez posebnih uvjeta, ugraditi u rafinerije (Rodríguez-Cabo i sur., 2014).

U ovom radu ispitana je djelotvornost ekstrakcije tiofena, piridina i toluena primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala (*engl. Deep Eutectic Solvent, DES*) u pročišćavanju modelnog *FCC* benzina uz različite masene odnose pojne smjese i otapala, broj okretaja miješala i vremena trajanja ekstrakcije. Također, ispitana je i djelotvornost ekstrakcije sa regeneriranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom te je provedena višestupnjevita ekstrakcija.

Materijali i metode

Priprema otapala

U ovom radu pripravljeno je niskotemperaturno eutektičko otapalo tetra-*n*-butilamonijev bromid s mravljom kiselinom (*Tbab-Mk*) te modelna otopina *FCC* benzina. Korištene kemikalije prikazane su u Tablici 1. Za pripremu niskotemperaturnog eutektičkog otapala *Tbab-Mk* najprije se komponenta *Tbab* sušila u vakuum sušioniku osam sati pri temperaturi od 60 °C. Nakon sušenja, komponente *Tbab* i *Mk* dodane su u tikvicu s okruglim dnom, gdje su se pomoću rotacijskog vakuum isparivača *IKA RV 10 basic* miješale dva sata pod vakuumom pri temperaturi od 60 °C, odnosno do dobivanja transparentne kapljevine. Modelno gorivo, sastava prikazanog u Tablici 2, pripravljeno je gravimetrijskom metodom, pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi.

Tablica 1. Kemikalije korištene za pripremu otapala
Table 1. Chemicals used for solvents preparation

Komponenta	Čistoća	Proizvođač
Tetra- <i>n</i> -butilamonij bromid	≥99,0	<i>Acros Organics</i>
Mravlja kiselina	98,0	<i>Lach-Ner</i>
<i>n</i> -Heksan	≥95,0	<i>Carlo Erba</i>
<i>n</i> -Heptan	99,0	<i>Carlo Erba</i>
Isooktan	100,0	<i>BDH Prolabo</i>
Piridin	99,0	<i>Acros Organics</i>
Tiofen	99,0	<i>Acros Organics</i>
Toluen	99,0	<i>Lachner</i>

Tablica 2. Sastav *FCC* modelnog goriva
Table 2. *FCC* model fuel composition

Komponenta	w, %
<i>n</i> -Heksan	26
<i>n</i> -Heptan	26
Isooktan	26
Piridin	6
Tiofen	6
Toluen	10

Šaržna kapljevinska ekstrakcija

Šaržna kapljevinska ekstrakcija pojne smjese modelnog *FCC* benzina sa sekundarnim otapalom *Tbab-Mk* provedena je u reaktoru s dvostrukom stijekom sa 4 razbijala i turbinskim miješalom s nagnutim lopaticama od 45°, pri temperaturi od 25 °C. Temperatura u reaktoru je regulirana pomoću termostata *Julabo cF41*. Ispitano je optimalno vrijeme ekstrakcije (3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 minuta), utjecaj promjene masenog odnosa pojne smjese i otapala na djelotvornost ekstrakcije ($S=0,5$, $S=1,0$ i $S=2,0$) te utjecaj broja okretaja miješala ($n=350$ o/min, $n=500$ o/min i $n=650$ o/min). Osim toga, provedena je ekstrakcija s regeneriranim *DES*-om te višestupnjevita ekstrakcija. Vrijeme separacije prije uzimanja uzoraka za analizu iznosilo je 10 minuta. Regeneracija otapala provedena je isparavanjem u vakuum isparivaču *Laborota 4000 Heidolph* pri temperaturi od 60 °C u trajanju od dva i pol sata, odnosno dok sve neželjene komponente (tiofen, piridin i toluen) nisu uklonjene. Da bi se utvrdila učinkovitost regeneracije, napravljena je analiza uzorka regeneriranog otapala i čistog sekundarnog otapala Fourier-transformiranom infracrvenom spektroskopijom na uređaju *FTIR spektrofotometar Vertex 70* s platinastim detektorom.

Kromatografska analiza uzoraka

Uzorak modelnog goriva prije ekstrakcije i uzorci rafinatne faze analizirani su metodom plinske kromatografije na plinskom kromatografu *Shimadzu GC-FID 2014*. Korišteni uređaj opremljen je plameno-ionizacijskim detektorom, kapilarnom kolonom *Zebron Phase ZB-1* te software-om *GCsolution (Shimadzu)*, potrebnim za prilagodbu programskih parametara i analizu uzoraka. Programski parametri podešeni za analizu modelnog goriva prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Programski parametri plinskog kromatografa
Table 3. Gas chromatography program parameters

Parametri	
Inertni plin	N ₂ /zrak/H ₂
Protok u kapilari	2,5 mL/min
Temperatura detektora	250 °C
Temperatura injektora	100 °C
Režim zagrijavanja	40 → 70 °C (3 °C/min) 70 → 120 °C (30 °C/min)
Vrijeme trajanja analize	16 min

Iz prikupljenih rezultata analize uzorka modelnog goriva prije ekstrakcije i uzoraka rafinatne faze, nakon ekstrakcije, izračunala se djelotvornost ekstrakcije ključnih komponenti prema jed. 1,

$$\varepsilon = \frac{(w_{(\text{modelno gorivo})} - w_{(\text{rafinatna faza})})}{w_{(\text{modelno gorivo})}} * 100, \% \quad (1)$$

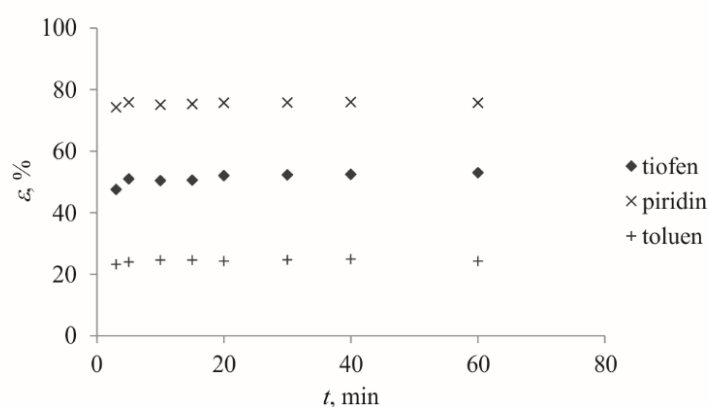
gdje su $w_{(\text{modelno gorivo})}$ i $w_{(\text{rafinatna faza})}$ maseni udjeli ključnih komponenti: tiofena, piridina ili toluena u modelnom gorivu te rafinatnoj fazi.

Rezultati i rasprava

DES se u posljednje vrijeme ističe kao vrlo pogodna zamjena organskim otapalima. Primjenjuje se u različitim područjima istraživanja, a u ovom radu ispitana je mogućnost primjene *DES*-a *Tbab-Mk* kao sekundarnog otapala u pročišćavanju modelnog *FCC* benzina. Cilj je bio šaržnom kapljevinskom ekstrakcijom ukloniti što veći udio tiofena, piridina i toluena. Da bi se ostvarila maksimalna djelotvornost ekstrakcije tih komponenti, bilo je potrebno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije, pogodan maseni odnos pojne smjese i otapala i broj okretaja miješala. Nadalje, ispitana je djelotvornost ekstrakcije regeneriranim otapalom, *Tbab-Mk* te je provedena višestupnjevita ekstrakcija sa svježim otapalom..

Budući da je kratko vrijeme za postizanje ravnoteže jedno od prednosti postupka ekstrakcije, ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije na djelotvornost ekstrakcije. Optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije, ispitano za $S=1$ i pri broju okretaja $n=500$ o/min, iznosilo je 20 minuta, budući da je za to vrijeme postignuta najveća djelotvornost ekstrakcije za sve tri ključne komponente (slika 1).

Produljenje vremena ekstrakcije, dulje od 20 minuta, nije rezultiralo većom djelotvornošću ekstrakcije, što ukazuje da je postupak ekstrakcije dostigao ravnotežno stanje. Djelotvornost ekstrakcije otapalom *Tbab-Mk* najveća je za piridin, potom za tiofen, a takav trend vidljiv je u rezultatima svih provedenih ekstrakcija. Istraženi *DES* prikladniji je za denitrifikaciju, nego desulfurizaciju i dearomatizaciju. Bolje uklanjanje piridina pripisuje se većoj topljivosti i većoj polarnosti u usporedbi s tiofenom (Zagajski Kučan i sur., 2019; Zolotareva i sur., 2019). Uz to, *DES Tbab-Mk* sadrži $-COOH$ skupinu, koja zbog povećanog dipolnog momenta doprinosi interakciji vodikove veze između *DES*-a i piridina, što je razlog dobre ekstrakcije dušikovih spojeva (Li i sur., 2013; Hizaddin i sur., 2014; Salleh i sur., 2018).



Slika 1. Vrijeme potrebno za postizanje ravnoteža u procesu ekstrakcije za $S=1,0$ i $n=500$ o/min

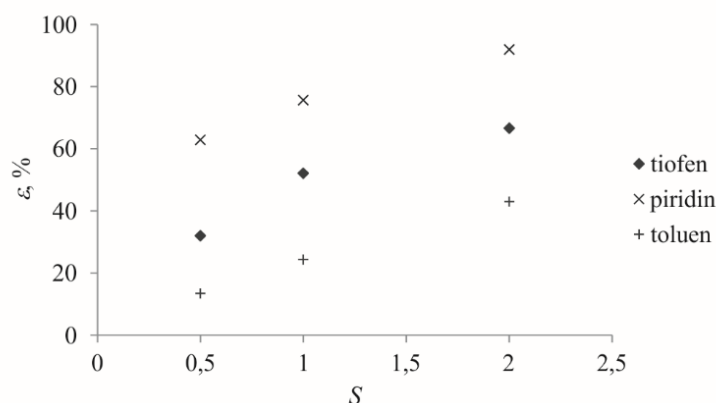
Figure 1. Time required to achieve equilibria in the extraction process for $S=1.0$ and $n=500$ rpm

Ispitan je utjecaj masenog odnos pojne smjese i otapala ($S=0,5$, $S=1,0$ i $S=2,0$) na djelotvornost ekstrakcije pri optimalnom vremenu i $n=500$ o/min. Slika 2 pokazuje da djelotvornost ekstrakcije očekivano raste s povećanjem masenog odnos pojne smjese i otapala, tj. veći omjer otapala rezultira djelotvornijim ekstrahiranjem ključnih komponenata. Međutim, veći maseni odnos pojne smjese i otapala znači i veće troškove provedbe ekstrakcije pa upotreba veće količine sekundarnog otapala mora biti financijski opravdana. U Tablici 4 prikazana je specifična masa ekstrahirane ključne komponente za različite uvjete provedbe ekstrakcije. Vidljivo je da se specifična masa smanjuje za svaki slijedeći stupanj ekstrakcije te se u 5. stupnju ekstrakcije tiofena ili piridina izdvoji manje od 10 % vrijednosti specifične mase ekstrahirane u 1. stupnju ekstrakcije. Osim toga, povećanjem masenog odnos pojne smjese i otapala smanjuje se specifična masa izdvojene ključne komponente. Iz navedenog se može zaključiti da ekstrahirana količina ključne komponente iz goriva ovisi o ravnotežnim uvjetima u sustavu te da *DES* ima znatno veću mogućnost ekstrakcije ključnih komponenti od ostvarenih vrijednosti. Pri ekstrakciji toluena, provođenje ekstrakcije u više stupnjeva ima smisla jer se količina ekstrahiranog toluena znatno sporije smanjuje što dokazuje njegovu inertnost zbog aromatske strukture.

Tablica 4. Specifična masa ekstrahirane ključne komponente pri različitim uvjetima provedbe procesa

Table 4. Specific mass of extracted key component at different process conditions

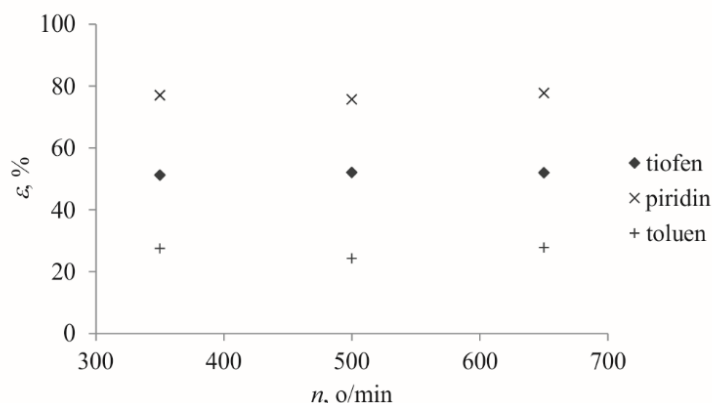
komponenta	S=1,0					S=0,5	S=2,0
	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 1	St. 1
$g_{\text{tiofen}}/g_{\text{DES}}$	0,0305	0,0171	0,0110	0,0033	0,0020	0,0410	0,0214
$g_{\text{piridin}}/g_{\text{DES}}$	0,0405	0,0218	0,0006	0,0001	0,0003	0,0801	0,0293
$g_{\text{toluen}}/g_{\text{DES}}$	0,0230	0,0212	0,0138	0,0128	0,0083	0,0065	0,0208



Slika 2. Utjecaj masenog odnos pojne smjese i otapala na djelotvornost ekstrakcije pri optimalnom vremenu i $n=500$ o/min

Figure 2. Influence of feed-solvent mass ratio on extraction efficiency at optimal time and $n=500$ rpm

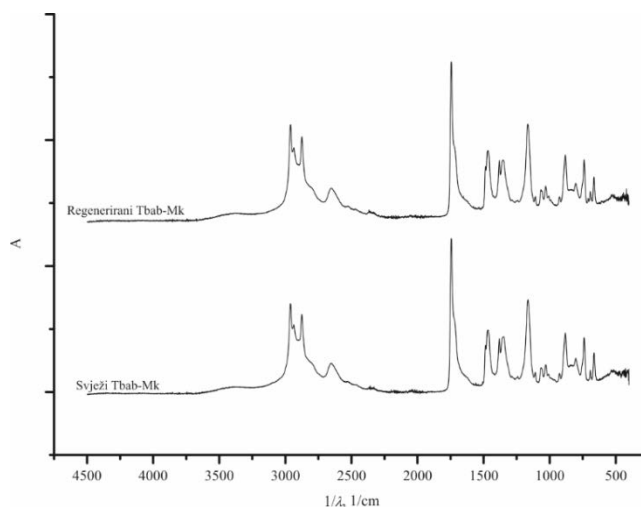
Na slici 3 prikazan je utjecaj broja okretaja miješala na djelotvornost ekstrakcije ključnih komponenti pri optimalnom vremenu ekstrakcije i za $S=1,0$. Uobičajeno je da se povećanjem broja okretaja miješala povećava površina prijenosa tvari, odnosno da se u sustavu pojavljuje veći broj kapljica (Khakpay i sur., 2010). Međutim, promjena broja okretaja miješala nije značajno utjecala na djelotvornost ekstrakcije. Za broj okretaja miješala $n=350$ o/min, vizualno je uočeno kako se miješanjem stvarao vrlo mali broj kapljica što ne pogoduje prijenosu tvari. S druge strane, za $n=650$ o/min uočena je puno veća količina sitnih kapljica koja bi moguće dovela do stvaranja emulzije čime bi se otežalo razdvajanje faza. Stoga, kako bi se izbjegle ove dvije krajnosti, $n=500$ o/min je odabran kao optimalni broj okretaja miješala.



Slika 3. Utjecaj broja okretaja miješala na djelotvornost ekstrakcije pri optimalnom vremenu i $S=1,0$

Figure 3. Influence of stirrer speed on extraction efficiency at optimal time and $S=1.0$

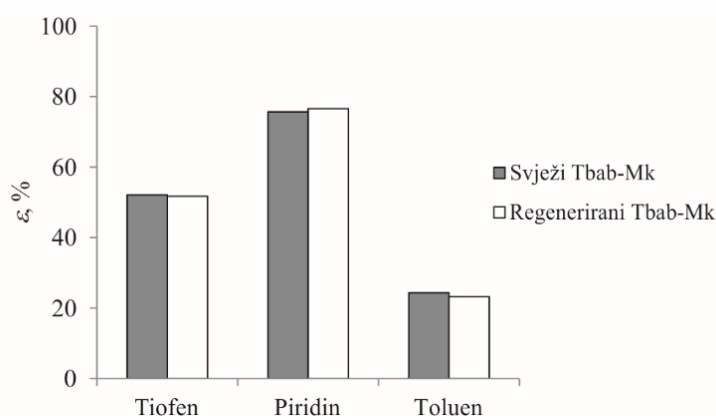
U svrhu ispitivanja ponovne upotrebe otapala bilo je potrebno regenerirati *Tbab-Mk*, odnosno ukloniti ključne komponente i primarno otapalo iz *DES*-a. Regeneracija je provedena isparavanjem u vakuum isparivaču pri temperaturi od $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od dva i pol sata dok tiofen, piridin, toluen i tragovi modelnog goriva nisu bili uklonjeni. Kako bi se potvrdila uspješnost regeneracije *DES*-a, uzorci svježeg i regeneriranog *Tbab-Mk* analizirani su Fourier-transformiranom infracrvenom spektroskopijom. Dobiveni spektri (slika 4) ukazuju na dobru regeneraciju *DES*-a budući da se na oba spektra očitavaju iste apsorpcijske vrpce pri valnim brojevima karakterističnim za komponente *DES*-a. FTIR spektri sadrže karakteristične apsorpcijske vrpce na $2960\text{--}2876\text{ cm}^{-1}$ (C-H istezanje). Apsorpcijski maksimumi uočavaju se na 1745 cm^{-1} koji odgovara karbonilnoj skupini (vibracije istezanja C=O), na 1465 cm^{-1} i 1381 cm^{-1} (savijanje C-H veze) te na 1165 cm^{-1} i $1066\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$ (vibracije istezanja C-O veze). Ekstrakcija s regeneriranim *Tbab-Mk* provela se pri optimalnom vremenu ekstrakcije uz maseni odnos pojne smjese i otapala $S=1,0$ i $n=500\text{ o/min}$.



Slika 4. FTIR spektri svježeg i regeneriranog otapala *Tbab-Mk*

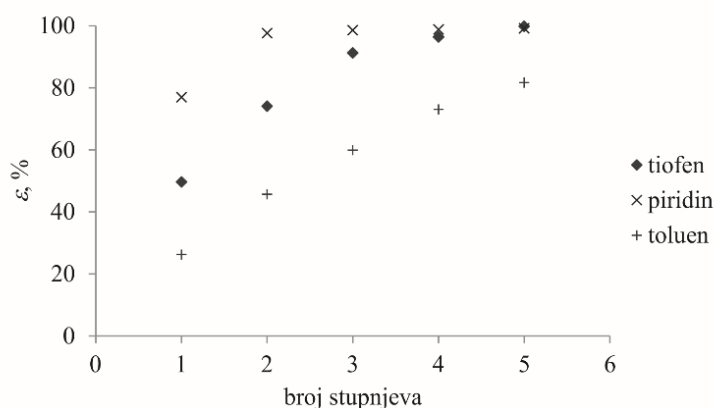
Figure 4. FTIR spectra of fresh and regenerated *Tbab-Mk* solvent

Prema rezultatima dobivenih kromatografskom analizom rafinatne faze (slika 5) može se zaključiti kako je djelotvornost ekstrakcije tiofena, piridina i toluena regeneriranim *Tbab-Mk* gotovo jednaka kao i djelotvornost ekstrakcije postignuta svježim otapalom. Ovakvi rezultati su zadovoljavajući, budući da se korištenjem regeneriranog otapala sprječavaju problemi oko zbrinjavanja otapala nakon korištenja, troškova nabave novog otapala te same pripreme istog. Nadalje da bi se u potpunosti iskoristilo otapalo, bilo bi potrebno ispitati njegovu sposobnost izdvajanja ključnih komponenti u više ciklusa.



Slika 5. Usporedba djelotvornosti ekstrakcijska svježeg i regeneriranog otapala *Tbab-Mk*.
Figure 5. Comparison of the extraction efficiency of fresh and regenerated *Tbab-Mk* solvent.

Provedena je i višestupnjevita ekstrakcija u pet stupnjeva pri optimalnom vremenu provedbe ekstrakcije za maseni odnos pojne smjese i otapala, $S=1,0$ i broj oketaja miješala, $n=500$ o/min. Višestupnjevitom ekstrakcijom ostvaruje se djelotvornost ekstrakcije tiofena i piridina od gotovo 100 % (slika 6).



Slika 6. Djelotvornosti višestupnjevite ekstrakcije pri optimalnom vremenu, $S=1,0$ i $n=500$ o/min
Figure 6. Efficiencies of multistage extraction at optimal time, $S=1.0$ and $n=500$ rpm

Usporedbom rezultata prikazanim na slikama 2 i 6, vidljivo je da se bolja djelotvornost postiže u 2. stupnju višestupnjevite ekstrakcije u odnosu na ekstrakciju s masenim odnosom pojne smjese i otapala $S=2$ iako se u oba eksperimenta troši jednaka količina *DES*-a. Naime, kod višestupnjevite ekstrakcije primjenom svježeg *DES*-a se povećava se pokretačka sila što rezultira poboljšanim prijenosom tvari odnosno većom djelotvornosti ekstrakcije.

Zaključci

Primjenom niskotemperaturnog eutektičkog otapala *Tbab-Mk* moguće je pročistiti modelni *FCC* benzin šaržnom kapljevinskom ekstrakcijom. Pri tome je važno odrediti optimalne uvjete ekstrakcije kako bi se postigla što veća djelotvornost ekstrakcije ključnih komponenti tiofena, piridina i toluena.

Nakon provedenog ispitivanja odabrani su optimalni uvjeti ekstrakcije: vrijeme trajanja ekstrakcije: $t=20$ min, maseni odnos pojne smjese i otapala, $S=1,0$, dok broj okretaja miješala nije značajno utjecao na djelotvornost ekstrakcije. Šaržnom kapljevinskom ekstrakcijom provedenom regeneriranim otapalom *Tbab-Mk* ostvarena je gotovo jednaka djelotvornost ekstrakcije tiofena, piridina i toluena kao i sa svježim *DES*-om. Višestupnjevatom ekstrakcijom u pet stupnjeva ostvarena je najbolja djelotvornost ekstrakcije ključnih komponenti, pogotovo tiofena i piridina od 99 %. Iako je regeneracija otapala energetski zahtjevnija, zbog njezine jednostavne provedbe te u cilju smanjenja potrošnje sekundarnog otapala, poželjno je provoditi višestupnjevitu ekstrakciju umjesto ekstrakcije s većim masenim odnosom pojne smjese i otapala.

Literatura

- Babich, I. V., Moulijn, J. A. (2003): Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: A review, *Fuel* 82 (6) 607–631.
- Chen, T. M., Gokhale, J., Shofer, S., Kuschner, W. G. (2007): Outdoor air pollution: Nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and carbon monoxide health effects, *Am. J. Med. Sci.* 333 (4), 249–256.
- Fabulic Ruszkowski, M., Telen, S., Podolski, Š., Romac Beer, I. (2003): Utjecaj *FCC* sirovine na svojstva kreking benzina, *Kem. u Ind.* 52 (10), 501–506.
- Fabulic Ruszkowski, M., Dukic, M., Srica, V., Podolski, Š., Telen, S., Tomic, T., Draženovic, D. (2005): Promjena destilacijskih granica, sadržaja sumpora, aromata i olefina u *FCC* benzinu, *Goriva i Maziva* 44 (4), 263–288.
- Han, Y., Wu, M., Hao, L., Yi, H. (2018): Sulfur dioxide derivatives alleviate cadmium toxicity by enhancing antioxidant defence and reducing Cd²⁺ uptake and translocation in foxtail millet seedlings, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 207–215.
- Hime, N. J., Marks, G. B., Cowie, C. T. (2018), June 8: A comparison of the health effects of ambient particulate matter air pollution from five emission sources, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15 (6), 1206.
- Hizaddin, H. F., Ramalingam, A., Hashim, M. A., Hadj-Kali, M. K. O. (2014): Evaluating the performance of deep eutectic solvents for use in extractive denitrification of liquid fuels by the conductor-like screening model for real solvents, *J. Chem. Eng. Data.* 59 (11), 3470–3487.

- Katsouyanni, K., Touloumi, G., Spix, C., Schwarte, J., Balducci, F., Medina, S., Rossi, G., Wojtyniak, B., Sunyer, J., Bacharova, L., Schouten, J. P., Ponka, A., Anderson, H. R. (1997): Short term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: Results from time series data from the APHEA project, *Br. Med. J.* 314 (7095), 1658–1663.
- Khakpay, A., Abolghasemi, H. (2010): The effects of impeller speed and holdup on mean drop size in a mixer settler with spiral-type impeller, *Can. J. Chem. Eng.* 88 (3), 329–334.
- Li, C., Li, D., Zou, S., Li, Z., Yin, J., Wang, A., Cui, Y., Yao, Z., Zhao, Q. (2013): Extraction desulfurization process of fuels with ammonium-based deep eutectic solvents, *Green Chem.* 15 (10), 2793–2799.
- Meng, Z. (2003): Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: Sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent, *Inhal. Toxicol.* 15 (2), 181–195.
- Rodríguez-Cabo, B., Rodríguez, H., Rodil, E., Arce, A., Soto, A. (2014): Extractive and oxidative-extractive desulfurization of fuels with ionic liquids 117 (PART A), *Fuel* 117, 882–889.
- Salleh, M. Z. M., Hadj-Kali, M. K., Hizaddin, H. F., Ali Hashim, M. (2018): Extraction of nitrogen compounds from model fuel using 1-ethyl-3-methylimidazolium methanesulfonate, *Sep. Purif. Technol.* 196, 61–70.
- Sang, N., Yun, Y., Li, H., Hou, L., Han, M., Li, G. (2010): SO₂ Inhalation contributes to the development and progression of ischemic stroke in the brain, *Toxicol. Sci.* 114 (2), 226–236.
- Valla, J. A., Mouriki, E., Lappas, A. A., Vasalos, I. A. (2007): The effect of heavy aromatic sulfur compounds on sulfur in cracked naphtha, *Catal. Today.* 127 (1–4), 92–98.
- Venners, S. A., Wang, B., Xu, Z., Schlatter, Y., Wang, L., Xu, X. (2003): Particulate matter, sulfur dioxide, and daily mortality in Chongqing, China., *Environ. Health Perspect.* 111 (4), 562–567.
- Wang, J., Zhang, L., Sun, Y., Jiang, B., Chen, Y., Gao, X., Yang, H. (2018): Deep catalytic oxidative desulfurization of fuels by novel Lewis acidic ionic liquids, *Fuel Process. Technol.* 177, 81–88.
- Zagajski Kučan, K., Rogošić, M. (2019): Purification of motor fuels by means of extraction using deep eutectic solvent based on choline chloride and glycerol, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (4), 1282–1293.
- Zolotareva, D., Zazybin, A., Rafikova, K., Dembitsky, V. M., Dauletbakov, A., Yu, V. (2019): Ionic liquids assisted desulfurization and denitrogenation of fuels, *J. Chem.* 57 (2), 133–163.

Simboli

- g - specifična masa, g/g
 n - broj okretaja miješala, o/min
 S - maseni odnos pojne smjese i otapala,
 t - vrijeme, min
 w - maseni odnos, %
 ε - djelotvornost ekstrakcije, %
 λ - valna duljina, cm

Application of deep eutectic solvent for model FCC gasoline purification

Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum*

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: jprilic@fkit.hr*

Summary

Processing of the crude oils usually results in the formation of high value products. One of such high value products, a motor gasoline with a high portion of FCC gasoline, can be obtained by mixing different oil fractions. Since FCC gasoline is a fraction with a significant amounts of sulfur, nitrogen, and aromatic compounds, fuel combustion produces exhaust gases enriched with SO_x and NO_x compounds, carbon monoxide, and solid particles. To prevent the emission of these harmful substances, it is necessary to purify the fuel, *i.e.* carry out the processes of desulfurization, denitrification, and dearomatization.

As deep eutectic solvents have proven to be a good substitute for harmful organic solvents, the possibility of purifying model FCC gasoline using deep eutectic solvent, prepared from tetra-*n*-butylammonium bromide and formic acid, in a batch extraction process has been investigated. The extraction process has been optimized to minimize the amounts of harmful substances, thiophene, pyridine and toluene in the *FCC* gasoline. The optimal extraction time, feed-solvent mass ratio and stirring speed were determined. Moreover, the extraction efficiency of the key components has been examined using regenerated *Tbab-Mk* and by multi-stage extraction.

The results have shown that the optimal extraction time is 20 min and suitable solvent ratio 1.0, while the change in stirring speed did not significantly affect the extraction efficiency. Satisfactory extraction efficiency has been accomplished by the use of regenerated solvent, so the optimal results could be expected in a multi-stage extraction with regenerated solvent.

Keywords: deep eutectic solvent, denitrification, desulfurisation, *FCC* gasoline, liquid-liquid extraction

Ekstrakcijsko pročišćavanje benzina primjenom niskotemperaturnih eutektičnih otapala modificiranih cinkovim kloridom

Kristina Zagajski Kučan*, Luka Vlašić, Marko Rogošić

*Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR - 10 000 Zagreb*

**Dopisni autor: kzkucan@fkit.hr*

Sažetak

Niskotemperaturna se eutektična otapala u posljednjih sedam godina istražuju kao 'zelena' otapala za ekstrakcijsku denitrifikaciju i desulfurizaciju tekućih goriva s ciljem razvoja metoda alternativnih sadašnjoj hidrodeshulfurizaciji. Obećavajući rezultati usmjerili su istraživanja ka povećanju ekstrakcijske djelotvornosti i selektivnosti eutektičnih otapala što podrazumijeva mijenjanje molarnog omjera i vrste komponenti eutektičnog otapala, ali i dodatak metalnih klorida.

U ovom radu pripravljeno je niskotemperaturno eutektično otapalo na bazi kolin-klorida i propilen-glikola uz dodatak cinkova klorida, molarnoga omjera 1:4:0,02. Primjena toga otapala kao ekstrakcijskog sredstva za desulfurizaciju i denitrifikaciju FCC-benzina i modelnog benzina koji sadrži 26 % *n*-heksana, 26 % *n*-heptana, 26 % *i*-oktana, 10 % toluena, 6 % tiofena i 6 % piridina ispitana je nizom ekstrakcijskih eksperimenata provedenih u blagim uvjetima u šaržnom ekstraktoru. Postignute vrijednosti djelotvornosti ekstrakcije u svim su eksperimentima veće za piridin nego tiofen. Denitrifikacija od 88 % postignuta je jednostupanjskom ekstrakcijom, dok je praktički potpuna denitrifikacija postignuta s istom količinom otapala u četiri ekstrakcijska stupnja. Sadržaj ukupnog dušika u realnom FCC-benzinu jednostupanjskom je ekstrakcijom smanjen za 43,29 %. Ekstrakcijski kapacitet niskotemperaturnog eutektičnog otapala moguće je održati regeneracijom putem vakuumske isparavanja ekstrahiranih komponenti. Ispitano niskotemperaturno eutektično otapalo ima potencijal za primjenu u denitrifikaciji benzina.

Ključne riječi: niskotemperaturna eutektična otapala, kolin-klorid:propilen-glikol:ZnCl₂, ekstrakcija, desulfurizacija, denitrifikacija

Uvod

Rafinerije i rafinerijski proizvodi općenito se smatraju velikim izvorom onečišćenja voda, tla i najviše zraka. Rafinerije ispuštaju jako toksične BTEX-spojeve (engl. *benzene, toluene, ethylbenzene, xylene*), ali glavni izvor onečišćenja zraka ipak su dušikovi oksidi (NO_x), ugljikov monoksid (CO) i sumporovi oksidi (SO_x). Spomenuti plinovi nastaju i sagorijevanjem sumporovih, dušikovih i aromatskih spojeva prisutnih u rafinerijskim proizvodima – tekućim naftnim gorivima (Naderpour, 2008). Osim na okoliš, negativan utjecaj dušikovih spojeva očituje se u smanjenju učinkovitosti industrijskih procesa jer zasićuju i truju katalizatore (Song, 2003, Anugwom i sur., 2011). Radi kontrole nad trenutnom ekološkom situacijom te njenoga poboljšanja, zakonom se definira maksimalan dozvoljen sadržaj sumpora u gorivu koji iznosi 10 mg/kg (Uredba o kvaliteti).

U industriji prerade nafte, za uklanjanje sumporovih i dušikovih spojeva iz goriva najčešće se primjenjuje hidrodesulfurizacija (HDS) (Stanislaus i sur., 2010). Smanjenje sadržaja sumpora u gorivu na 10 mg/kg zahtijevalo je preinake u procesnim jedinicama postrojenja za proizvodnju kvalitetnog goriva. U današnje vrijeme proizvodnja uspijeva zadovoljiti propise, iako još uvijek postoje poteškoće. One se odnose na reaktivnost sumporovih spojeva koja opada s rastom veličine molekule. Naime, jednostavne molekule kao alifatski sumporovi spojevi (merkaptani, sulfidi, disulfidi) jednostavno se uklanjaju HDS-procesom. Složenije molekule s tiofenskim prstenom (tiofen, benzotiofen i njihovi derivati) teže se uklanjaju. Najmanje su reaktivni alkilirani benzotiofeni, dibenzotiofeni i alkildibenzotiofeni (Song, 2003, Francisco i sur., 2010). Na smanjenje učinkovitosti HDS-a utječe i prisutnost dušikovih komponenti koje su sklone stvaranju taloga na katalizatoru (Ravilla, 2004, Anugwom i sur., 2011). Dodatni razlozi istraživanja alternativnih metoda pročišćavanja goriva koje bi se mogle integrirati kao zasebna jedinica u postojeći proces su i velika potrošnja vodika i energije te skupi katalizatori.

Ekstrakcija kapljevine-kapljevine primjenom niskotemperaturnih eutektičnih otapala pokazala se učinkovitom u uklanjanju sumporovih (Li i sur., 2013, Li i sur., 2016a, Rahma i sur., 2017, Lima i sur., 2018, Al-Azzawi i sur., 2019, Li i sur., 2019, Ali, 2018, Zagajski Kučan i sur., 2018, Rogošić, 2018, Rogošić, 2019, Zagajski Kučan, 2019) i dušikovih (Hizaddin i sur., 2014, Hizaddin i sur., 2016, Ali i sur., 2016, Li i sur., 2018, Ali i sur., 2018, Lima i sur., 2019, Zagajski Kučan i sur., 2018, Rogošić, 2018, Rogošić, 2019, Zagajski Kučan, 2019) spojeva iz modelnih i realnih goriva te ugljikovodičnih smjesa općenito. Niskotemperaturna eutektična otapala pogodna su ekstrakcijska sredstva jer se izborom komponenti od kojih su sastavljena može izravno utjecati na njihova svojstva (Garcia, 2015, Lopez-Porfiri, 2016), a time i na selektivnost, pa se unaprijed mogu kreirati za određeno područje primjene. Mogu se regenerirati različitim tehnikama, što je važna značajka ekstrakcijskog sredstva s industrijskog stajališta. Novija istraživanja usmjerena su usavršavanju ekstrakcijske desulfurizacije i denitrifikacije goriva. Uočeno je da se povećanje selektivnosti prema sumporovim i dušikovim komponentama može postići dodatkom metalnih soli eutektičnim otapalima (Li, 2016b, Shah, 2019, Xu, 2018, Shirazinia, 2020).

U ovom radu istražena je mogućnost primjene eutektičnog otapala na osnovi kolin-klorida i propilen-glikola modificiranoga cinkovim oksidom (ChCl:PG:ZnCl_2) u procesima denitrifikacije i desulfurizacije modelnog i realnog benzina, te mogućnost njegove regeneracije.

Materijali i metode

Priprava niskotemperaturnog eutektičnog otapala

Potrebne količine kolin-klorida, propilen-glikola i cinkova klorida, prethodno sušenih 8 h pri 60 °C u vakuumskom sušioniku, sukladne željenim molarnim omjerima 1:4:0,02, izvagane su (Radwag AS 220.RS analitička vaga s preciznošću $\pm 0,0001$) izravno u staklenu bočicu s čepom od 50 mL. Smjesa je zatim miješana na magnetskoj mješalici (LLG-uniSTIRRER 3) pri 80 °C do nastanka homogene prozirne kapljevine. Kriterij odabira molarnog omjera eutektičnog otapala je njegova kapljevovitost pri sobnoj temperaturi.

Priprava modelnog benzina

Modelni benzin svojim sastavom imitira frakciju FCC-benzina, a sastoji se od 26 % *n*-heksana, 26 % *n*-heptana, 26 % *i*-oktana, 10 % toluena, 6 % tiofena i 6 % piridina. Šesterokomponentna se otopina pripremila miješanjem potrebnih masa svih komponenti, a točan se sastav izračunao iz odvaga.

Ekstrakcijski eksperimenti

Svi ekstrakcijski eksperimenti provedeni su pri 25 °C i atmosferskom tlaku (blagi radni uvjeti) na magnetskoj mješalici, miješanjem određene količine modelnog benzina i eutektičnog otapala u staklenoj bočici od 50 mL s čepom kako bi se spriječilo neželjeno isparavanje komponenata modelnog benzina. Preliminarnim eksperimentom određeno je vrijeme ekstrakcije od 30 minuta potrebno za postizanje ravnoteže, a broj okretaja magneta potreban za potpuno dispergiranje iznosio je 1000 rpm. Nakon jednosatnog raslojavanja smjese u dvije faze, sastav rafinatne (gornje) faze određen je plinskom kromatografijom (GC-2010-Shimadzu / automatsko uzorkovanje / FID detektor / kapilarna kolona DB-624 sa silikonskom stacionarnom fazom duljine 30 m i unutarnjega promjera 0,53 mm). Iz dobivenih masenih udjela tiofena odnosno piridina u modelnom benzinu prije i nakon ekstrakcije izračunala se djelotvornost ekstrahiranih komponenti, *E*, u svakom ekstrakcijskom stupnju:

$$E / \% = \frac{w_F - w_R}{w_F} \times 100 \quad (1)$$

w_F označava maseni udio piridina odnosno tiofena u modelnom gorivu prije ekstrakcije, a w_R označava maseni udio piridina odnosno tiofena u rafinatnoj fazi nakon ekstrakcije. Sastav ekstraktne faze izračunao se iz bilance tvari.

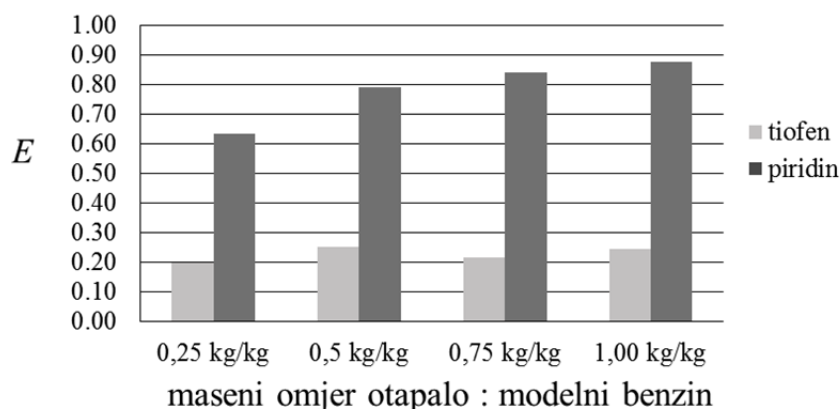
O tipu provedenog ekstrakcijskog eksperimenta ovisi izbor masenog omjera otapalo : modelni benzin. Jednostupanjski ekstrakcijski eksperimenti provedeni su pri masenim omjerima otapalo: modelni benzin od 0,25, 0,50, 0,75 i 1,00. Višestupanjski ekstrakcijski eksperimenti provedeni su pri masenom omjeru otapalo : modelni benzin od 0,25. Više stupanjskim ekstrakcijama pri masenom omjeru otapalo : modelni benzin od 1,00 ispitana je sposobnost otapala za ponovljenu ekstrakciju bez njegova pročišćavanja između ekstrakcijskih stupnjeva te s pročišćavanjem otapala između ekstrakcijskih stupnjeva. Pročišćavanje otapala provedeno je dvosatnim vakuumskim uparavanjem ekstrahiranih komponenti, tiofena i piridina pri temperaturi vodene kupelji 70 °C i tlaku 250 mbar na uređaju Rotavapor Heidolph Laborota 4000 opremljenom vodenom kupelji Heizbad WB.

Uz maseni omjer otapalo : FCC-benzin od 0,25 provedene su ekstrakcije s uzorcima realnog benzina, pri radnim uvjetima jednakim onima za modelni benzin. U tim je eksperimentima određen sadržaj ukupnog sumpora i dušika u rafinatnoj fazi prije i nakon ekstrakcije. Sadržaj ukupnog sumpora izmjeren je pomoću valno disperzivnog rentgenskog fluorescentnog spektrometra s nesigurnošću od 0,0002 (LAB-X 3000 Oxford) prema normi ISO 8754. Sadržaj ukupnog dušika izmjeren je kemiluminiscentnim spektrometrom s nesigurnošću od 0,0002 (Antek Instr. 720 C) prema standardu ASTM D4629. Djelotvornost ekstrakcije izračunala se prema jednadžbi (1) gdje u tom slučaju w_F i w_R označavaju sadržaj ukupnog dušika odnosno sumpora u FCC-benzinu prije i nakon ekstrakcije.

Rezultati i rasprava

Jednostupanjski ekstrakcijski eksperimenti

S ekonomskog i industrijskog stajališta idealna je situacija uz minimalnu potrošnju otapala postići maksimalnu djelatnost ekstrakcije. S tim je ciljem ispitan utjecaj masenog omjera otapalo : modelni benzin na djelatnost ekstrakcije tiofena i piridina. Rezultati su prikazani na slici 1.



Slika 1. Djelatnost ekstrakcije u ovisnosti o masenom omjeru otapalo: modelni benzin

Fig. 1. Extraction efficiency vs. mass ratio of solvent : model gasoline

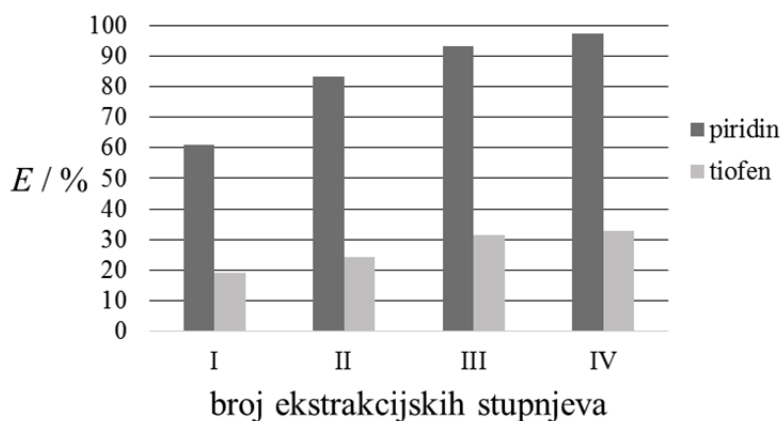
Djelatnost ekstrakcije piridina raste s povećanjem masenog omjera otapalo: modelni benzin, dok se djelatnost ekstrakcije tiofena može smatrati konstantnom. Prema tome, ispitano otapalo $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ pokazuje bolji afinitet za denitrifikaciju nego desulfurizaciju modelnog benzina. Budući da je piridin polarniji nego tiofen te s obzirom na polarnost eutektičnog otapala, takav se rezultat mogao očekivati. Najveća se djelatnost ekstrakcije piridina (oko 88 %) postigla s najvećim masenim omjerom otapalo : modelni benzin od 1,00 jer veća količina otapala može primiti više otopljene tvari.

Višestupanjski ekstrakcijski eksperimenti

Industrija općenito zahtijeva minimalnu potrošnju ekstrakcijskih sredstava. Stoga je ispitanu u koliko se stupnjeva s masenim omjerom otapalo : modelni benzin od 0,25 postiže jednaka djelatnost ekstrakcije kao i s omjerom 1,00 (oko 88 %). Rezultati su prikazani na slici 2.

Vidi se da se djelatnost ekstrakcije piridina oko 83 % postiže već u drugom stupnju, dok ona u trećem stupnju iznosi visokih 93 %. Prema tome, trostupanjska ekstrakcija, osim što je zbog masenog omjera od 0,75 ($3 \times 0,25$) ekonomičnija nego jednostupanjska s masenim omjerom od 1,00, postiže bitno veću ekstrakcijsku djelatnost (93 %). Uz utrošak jednake količine otapala kao kod jednostupanjske ekstrakcije, ekstrakcija u četiri stupnja s masenim omjerom od 0,25 postiže znatno viši stupanj denitrifikacije, oko 97 % u usporedbi s 88 %. Provedeni eksperimenti ukazuju na to da se istovremeno može mijenjati i maseni omjer otapalo : modelni benzin i broj ekstrakcijskih stupnjeva i pritom se mogu minimizirati ukupne troškovi. S povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva povećava se i djelatnost ekstrakcije tiofena, ali je taj porast mnogo sporiji nego kod piridina. Kao i u prethodnoj grupi

eksperimenta, i ovdje je očito da je $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ bolji za denitrifikaciju nego desulfurizaciju modelnog benzina.



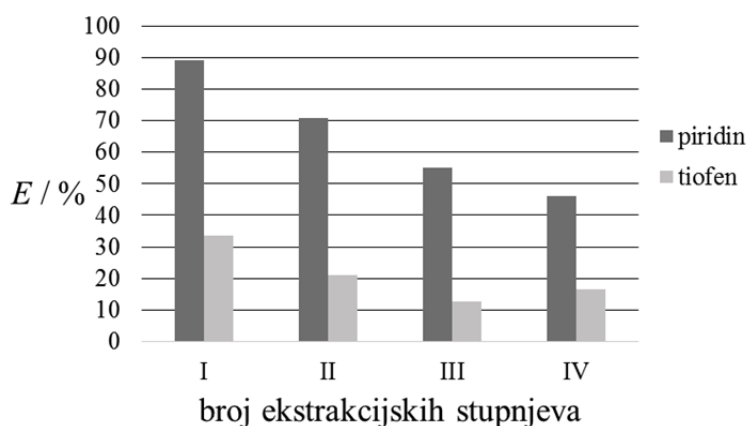
Slici 2. Djelotvornost ekstrakcije u ovisnosti o broju ekstrakcijskih stupnjeva

Fig. 2. Extraction efficiency vs. number of extraction stages

Ekstrakcijski kapacitet

Ekstrakcijski kapacitet ukazuje na mogućnost da se ista šarža otapala višekratno upotrijebi bez pročišćavanja između ekstrakcijskih stupnjeva. Eksperimenti su provedeni u četiri ekstrakcijska stupnja, a rezultati su prikazani na slici 3.

Rezultati pokazuju da se s povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva smanjuje djelotvornost ekstrakcije i piridina (s 88 % na 45 %) i tiofena (s 32 % na 12 %). Naime, ekstrahirane se komponente postupno akumuliraju u eutektičnom otapalu što nakon postizanja ravnotežne koncentracije onemogućava daljnju ekstrakciju.

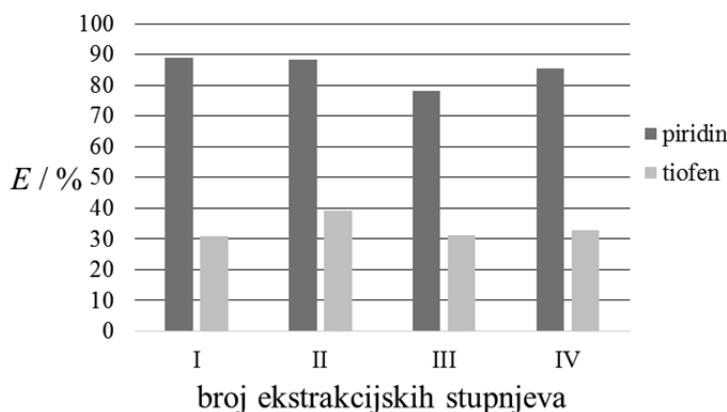


Slika 3. Djelotvornost ekstrakcije u ovisnosti o broju ekstrakcijskih stupnjeva bez pročišćavanja otapala između stupnjeva

Fig. 3. Extraction efficiency vs. number of extraction stages, without interstage purification of solvent

Regeneracija

Bitna karakteristika dobrog ekstrakcijskog sredstva je mogućnost njegove regeneracije i ponovne uporabe radi smanjenja troškova i kemijskog otpada. Kako je prethodno ustanovljeno da se ekstrakcijski kapacitet otapala smanjuje s ponovnom uporabom, ispitana je mogućnost pročišćavanja otapala između ekstrakcijskih stupnjeva. Rezultati su prikazani na slici 4.



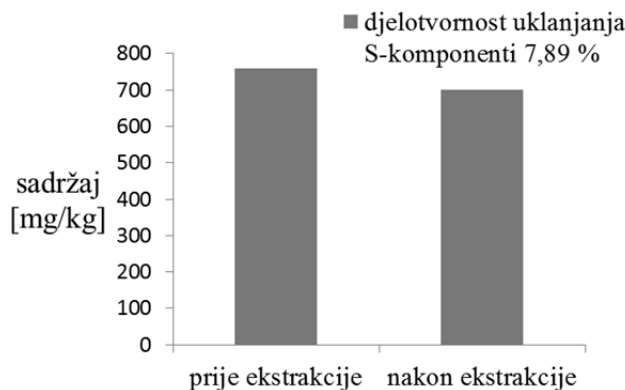
Slika 4. Djelotvornost ekstrakcije u ovisnosti o broju ekstrakcijskih stupnjeva s pročišćavanjem otapala između stupnjeva

Fig. 4. Extraction efficiency vs. number of extraction stages with interstage purification of solvent

Tijekom četiri ekstrakcijska stupnja ustanovljena je praktički konstantna djelotvornost ekstrakcije piridina i tiofena što znači da je uklanjanje ekstrahiranih komponenti iz otapala vakuumskim uparavanjem prikladno za njegovu regeneraciju.

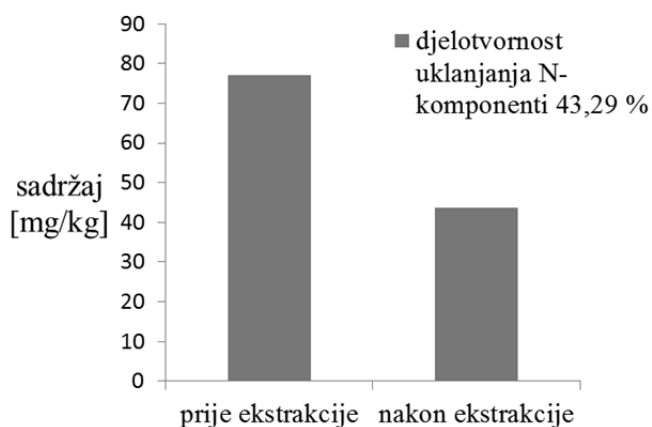
Realni benzin

Realni benzin sadrži veći broj različitih sumporovih i dušikovih spojeva za razliku od modelnog u kojem je prisutan po jedan predstavnik iz svake skupine. S ciljem primjene ekstrakcije u industrijskim procesima pročišćavanja, ispitana je djelotvornost $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ pri denitrifikaciji i desulfurizaciji na uzorcima realnog FCC-benzina. Rezultati su prikazani na slikama 5 i 6.



Slika 5. Sadržaj ukupnog sumpora u FCC-benzinu prije i poslije ekstrakcije

Fig. 5. Total sulfur content in FCC-gasoline before and after extract



Slika 6. Sadržaj ukupnog dušika u FCC-benzinu prije i poslije ekstrakcije
Fig. 6. Total nitrogen content in FCC-gasoline before and after extraction

Na slici 5 može se uočiti smanjenje sadržaja sumpora sa 760 mg/kg na 700 mg/kg, što odgovara djelotvornosti ekstrakcije sumporovih komponenti od 7,89 %. Slika 6 prikazuje smanjenje sadržaja dušika sa 77 mg/kg na 43,67 mg/kg, tj. djelotvornost ekstrakcije dušikovih spojeva iznosi 43,29 %. Kao i kod modelnog benzina, i eksperimenti na realnom benzinu pokazuju da je ispitano eutektično otapalo $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ prikladnije za denitrifikaciju nego desulfurizaciju.

Za konačnu ocjenu metode trebalo bi provesti usporedbu s postojećom, konvencionalnom metodom. Kako je već navedeno, u naftnoj se industriji uobičajeno primjenjuje HDS, koji je djelotvorniji u uklanjanju sumporovih spojeva od ekstrakcije ovdje istraženim otapalom. Međutim, integracijom ekstrakcijske denitrifikacije s HDS-procesom mogla bi se dodatno podignuti njegova djelotvornost zbog redukcije već spomenutog taloženja dušikovih spojeva na HDS-katalizatoru. Nažalost, takvo bi istraživanje trebalo provesti na razini barem pilotnoga postrojenja što je u ovom trenutku izvan dosega istraživačke skupine.

Zaključci

Na temelju eksperimentalno provedenih ekstrakcija eutektičnim otapalom $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ (1:4:0,02), s ciljem pročišćavanja benzina od nepoželjnih sumporovih i dušikovih komponenta, može se zaključiti kako je ispitano eutektično otapalo pogodno kao ekstrakcijsko sredstvo i k tome primjerenije za denitrifikaciju nego desulfurizaciju benzina. Jednostupanjskom ekstrakcijom s masenim omjerom otapalo : modelni benzin od 1,00 uklonjeno je 88 % dušika, dok je trostupanjskom ekstrakcijom s manjom potrošnjom otapala moguć i znatno veći stupanj denitrifikacije (93 %). Pri višestupanjskoj ekstrakciji otapalo je moguće regenerirati vakuumskim uparavanjem, što $\text{ChCl}:\text{PG}:\text{ZnCl}_2$ čini pogodnim ekstrakcijskim sredstvom.

Literatura

- Al-Azzawi, M., Mjalli, F. S., Al-Hashmi, A., Al-Wahaibi, T., Abu-jdayil, B. (2019): Optimal liquid fuel extractive desulfurization in micro and mini-channels, *Chem. Eng. Process.* 140, 43-51.
- Ali, M. C., Yang, Q., Fine, A. A., Jin, W., Zhang, Z., Xing, H., Ren, Q. (2016): Efficient removal of both basic and non basic nitrogen compounds from fuels by deep eutectic solvents, *Green Chem.* 18, 157-164.
- Ali, R. D., Kroon, M. C. (2018): Extraction of benzothiazole and thiophene from their mixtures with *n*-heptane using tetrahexylammonium bromide-based deep eutectic solvents as extractive denitrogenation and desulfurization agents, *Fluid Phase Equilib.* 477, 1-11.
- Anugwom, I., Mäki-Arvela, P., Salmi, T., Mikkola, J.-P. (2011): Ionic liquid assisted extraction of nitrogen and sulphur-containing air pollutants from model oil and regeneration of the spent ionic liquid, *J. Environ. Prot.* 2, 796-802.
- Francisco, M., Arce, A., Soto, A. (2010): Ionic liquids on desulfurisation of fuel oils, *Fluid Phase Equilib.* 294, 39-48.
- Garcia, G., Aparicio, S., Ullah, R., Atilhan, M. (2015): Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications, *Energy Fuels* 29, 2616-2644.
- Hizaddin, H. F., Ramalingam, A., Hashim, M. A., Hadj-Kali, M. K. O. (2014): Evaluating the performance of deep eutectic solvents for use in extractive denitrification of liquid fuels by the conductor-like screening model for real solvents, *J. Chem. Eng. Data* 59, 3470-3487.
- Hizaddin, H. F., Hadj-Kali, M. K., Ramalingam, A., Hashim, M. A. (2016): Extractive denitrogenation of diesel fuel using ammonium- and phosphonium-based deep eutectic solvents, *J. Chem. Thermodyn.* 95, 164-173.
- Li, C., Li, D., Zou, S., Li, Z., Yin, J., Wang, A., Cui, Y., Yao, Z., Zhao, Q. (2013): Extraction desulfurization process of fuels with ammonium-based deep eutectic solvents, *Green Chem.* 15, 2793-2799.
- Li, C., Zhang, J., Li, Z., Yin, J., Cui, Y., Liu, Y., Yang, G. (2016b): Extraction desulfurization of fuels with 'metal ions' based deep eutectic solvents (MDESs), *Green Chem.* 18, 3789-3795.
- Li, J.-J., Xiao, H., Tang, X.-D., Zhou, M. (2016a): Green carboxylic acid-based deep eutectic solvents as solvents for extractive desulfurization, *Energy Fuels* 30, 5411-5418.
- Li, Z., Cui, Y., Li, C., Shen, Y. (2019): Deep desulfurization of fuels based on deep eutectic theory, *Sep. Purif. Technol.* 219, 9-15.
- Li, Z., Liu, D., Men, Z., Song, L., Lv, Y., Wu, P.-P., Lou, B., Zhang, Y., Shi, N., Chen, Q. (2018): Insight into effective denitrification and desulfurization of liquid fuel with deep eutectic solvents: an innovative evaluation criterion to filtrate extractants using the compatibility index, *Green Chem.* 20, 3112-3120.
- Lima, F., Dave, M., Silvestre, A. J. D., Branco, L. C., Marrucho, I. M. (2019): Concurrent desulfurization and denitrogenation of fuels using deep eutectic solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 11341-11349.
- Lima, F., Gouvenaux, J., Branco, L. C., Silvestre, A. J. D., Marrucho, I. M. (2018): Towards a sulfur clean fuel: Deep extraction of thiophene and dibenzothiophene using polyethylene glycol based deep eutectic solvents, *Fuel* 234, 414-421.

- Lopez-Porfiri, P., Brennecke, J. F., Gonzalez-Miquel, M. (2016): Excess molar enthalpies of deep eutectic solvents (DESS) composed of quaternary ammonium salts and glycerol or ethylene glycol., *J. Chem. Eng. Data* 61, 4245-4251.
- Naderpour, N. (2008): Petrochemical Production Processes, Delhi, India: SBS Publishers
- Rahma, W. S. A., Mjalli, F. S., Al-Wahaibi, T., Al-Hashmi, A. A. (2017): Polymeric-based deep eutectic solvents for effective extractive desulfurization of liquid fuel at ambient conditions, *Chem. Eng. Res. Des.* 120, 271-283.
- Ravilla, U. K., Banerjee, T. (2012): Liquid liquid equilibria of imidazolium based ionic liquid + pyridine + hydrocarbon at 298.15 K: Experiments and correlations, *Fluid Phase Equilib.* 324, 17-27.
- Rogošić, M., Zagajski Kučan, K. (2018): Modelling of liquid–liquid equilibria in quasi-seven-component systems with deep eutectic solvents as extraction media, *Kem. Ind.* 67, 385-402.
- Rogošić, M., Zagajski Kučan, K. (2019): Deep eutectic solvents based on choline chloride and ethylene glycol as media for extractive denitrification/desulfurization/dearomatization of motor fuels, *J. Ind. Eng. Chem.* 72, 87-99.
- Shah, D., Gapeyenko, D., Urakpayev, A., Torkmahalleh, M. (2019): Molecular dynamics simulations on extractive desulfurization of fuels by tetrabutylammonium chloride based deep eutectic solvents, *J. Mol. Liq.* 274, 254-260.
- Shirazinia, S. R., Semnani, A., Nekoeinia, M., Shirani, M., Akbari, A. (2020): Novel sustainable metal complex based deep eutectic solvents for extractive desulphurisation of fuel, *J. Mol. Liq.* 301, 112364 (1–8).
- Song, C. (2003): An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel, *Catal. Today* 86, 211-263.
- Stanislaus, A., Marafi, A., Rana, M. S. (2010): Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production, *Catal. Today* 153, 1-68.
- Uredba o kvaliteti tekućih naftnih goriva, NN 113/2013, 76/2014, 56/2015
- Xu, H., Zhang, D., Wu, F., Wei, X., Zhang, J. (2018): Deep desulfurization of fuels with cobalt chloride-choline chloride/polyethylene glycol metal deep eutectic solvents, *Fuel* 225, 104-110.
- Zagajski Kučan, K., Perković, M., Cmrk, K., Načinović, D., Rogošić, M. (2018): Betaine + (glycerol or ethylene glycol or propylene glycol) deep eutectic solvents for extractive purification of gasoline, *ChemistrySelect* 3, 12582-12590.
- Zagajski Kučan, K., Rogošić, M. (2019): Purification of motor fuels by means of extraction using deep eutectic solvent based on choline chloride and glycerol, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 1282-1293.

Extractive purification of gasoline using deep eutectic solvents modified with zinc chloride

Kristina Zagajski Kučan*, Luka Vlašić, Marko Rogošić

*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia
Corresponding author: kzkucan@fkit.hr

Summary

Deep eutectic solvents (DES) have been investigated for the last seven years as ‘green’ solvents for extractive denitrification and desulfurization of liquid fuels with the aim of developing methods alternative to current hydrodesulfurization. Promising results have directed the research towards the increase of extraction efficiency and DES selectivity, by varying the molar ratio and type of DES components but also by the addition of metal chlorides.

In this work, a DES based on choline chloride and propylene glycol, with addition of zinc chloride, was prepared, in molar ratio of 1:4:0.02. The application of this solvent as an extractive agent for desulfurization and denitrification of FCC-gasoline and model gasoline containing 26% of *n*-hexane, 26% of *n*-heptane, 26% of *i*-octane, 10% of toluene, 6% of thiophene and 6% of pyridine was tested in a series of extraction experiments carried on in a batch extractor under mild conditions. The extraction efficiency values of all experiments were higher for pyridine than thiophene. Denitrification of 88% was achieved by single-stage extraction, while complete denitrification was achieved by four-stage extraction with the same amount of solvent. The total nitrogen content in real FCC-gasoline was reduced by single-stage extraction with an efficiency of 43.29%. The extraction capacity of DES can be maintained by solvent regeneration using vacuum evaporation of extracted components. The investigated deep eutectic solvent has a potential for use in gasoline denitrification.

Keywords: deep eutectic solvents, choline chloride – propylene glycol – ZnCl₂, extraction, desulfurization, denitrification

3

**Sekcija: PREHRAMBENA
TEHNOLOGIJA I BIOTEHNOLOGIJA**

**Topic: FOOD TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY**



Inhibition of α -glucosidase by polyphenols present in traditional apples varieties

Jozo Ištuk*, Lidija Jakobek, Ivica Strelec

*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

**Corresponding author: jozo.istuk@ptfos.hr*

Summary

This work aimed to evaluate polyphenols from two traditional apple varieties as α -glucosidase inhibitors. Polyphenols were extracted from the flesh and skin of two traditional apple varieties ('Božićnica' and 'Batulenka') by using ultrasonic-assisted extraction. Total polyphenols in extracts were determined by the spectrophotometric Folin-Ciocalteu method, expressed as gallic acid equivalents (GAE). The α -glucosidase activity was evaluated based on the spectrophotometric determination of *p*-nitrophenol (pNP) released from *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPG) substrate by the action of the enzyme. To inhibit enzyme activity, various polyphenol concentrations were added to the reaction mixture. IC₅₀ value was calculated (concentration of polyphenols that gives 50 % inhibition). 'Božićnica' and 'Batulenka' contained 337.24 and 202.17 mg GAE/kg in the flesh and 2132.91 and 824.43 mg GAE/kg in the peel, respectively. Polyphenols inhibited α -glucosidase activity and inhibition reached a steady state. IC₅₀ values, expressed as μ g of gallic acid equivalents (GAE) per mL of reaction solution, of the flesh of 'Batulenka' and 'Božićnica' were 1.69 and 1.47, respectively. Peel showed similar IC₅₀ values (1.07, and 0.33 μ g GAE/mL, for the peel of 'Batulenka' and 'Božićnica', respectively). These results suggest that polyphenols from the flesh and skin of traditional apple varieties are potent inhibitors of α -glucosidase activity.

Keywords: α -glucosidase, inhibition, polyphenols, apple

Introduction

Traditional apple varieties have proven to be a good source of polyphenols (Jakobek and Barron, 2016). Polyphenols are a large group of naturally occurring compounds, produced in plants as secondary metabolites. The structural complexity of these bioactive compounds led to a classification in major classes, like flavonoids, phenolic acids, stilbenes, lignans, and others (Belščak-Cvitanović et al., 2018). Major polyphenolic classes in apples are phenolic acids and flavonoids (flavanols, flavonols, dihydrochalcones, and anthocyanins) (Ceymann et al., 2012; Tsao et al., 2003). Polyphenols are studied extensively due to their ability to exert various potential bioactivities in the human body. Although there is a need for further research, some studies suggest that a diet rich in certain polyphenol groups might have beneficial effects on chronic diseases (Cvejić Hogervors et al., 2018). Polyphenols from apples have also shown potential positive effects on specific cancers (Wu et al., 2018; Kao et al., 2017), anti-allergic activities (Kojima et al., 2000), antiviral properties (Suárez et al., 2010), and possible therapeutic potential for obesity (Tamura et al., 2020).

All the proposed positive effects of apple polyphenols are not fully explained, and further research is necessary. Polyphenols are also studied for their potential antidiabetic effect (García-Pérez et al., 2017). Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by a chronic hyperglycemic condition (Chen et al., 2018). Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is caused by decreased sensitivity of target tissue to insulin along with impaired glucose tolerance and accounts for 90 % of total DM cases worldwide (Ozougwu et al., 2013). Regular high postprandial glucose spikes in the blood increase the chance of developing impaired glucose tolerance. Hydrolysis of starch by the action of digestive enzymes such as α -amylase and α -glucosidase is the main source of postprandial glucose in blood (Nyambe-Silavwe et al., 2015). Therefore, inhibition of these enzymes is one of the approaches for T2DM treatment.

α -glucosidase is a digestive enzyme located in the brush-border surface membrane of intestinal cells. It hydrolyzes oligosaccharides derived from starch to glucose and therefore is the key enzyme in the digestive process of carbohydrates (Nyambe-Silavwe et al., 2015; Kumar et al., 2011). α -glucosidase inhibitors, such as acarbose or miglitol, lower postprandial glucose in blood via competitive inhibition of α -glucosidase enzyme (Krentz et al., 2018). However, these drugs are associated with significant gastrointestinal side effects, like abdominal bloating, cramping, flatulence, or diarrhea, that affect over 50 % of individuals (Shmeltz and Metzger, 2007). Therefore, a need for natural α -glucosidase inhibitors was developed. Apple polyphenols have proven to be potent α -glucosidase inhibitors (Gong et al., 2020; Li et al., 2019). However, inhibition of α -glucosidase by polyphenols from old, traditional apple varieties from Croatia (to the best of our knowledge) has not been investigated.

This work aimed to evaluate polyphenols extracted from old traditional apple varieties as α -glucosidase inhibitors. Furthermore, possible differences in the inhibition activity of polyphenols from the peel and the flesh will be examined.

Materials and Methods

Chemicals

Chemicals used in this study were purchased from several firms. α -glucosidase (19.3 U/mg) from *Saccharomyces cerevisiae*, acarbose (≥ 95 %), and 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (p-NPG, ≥ 99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA). Sodium dihydrogen phosphate dihydrate (p.a.), disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (p.a.) and Folin-Ciocalteu reagent (p.a.) were obtained from Kemika (Zagreb, Croatia). The methanol (HPLC grade) was from J.T. Baker (Gliwice, Poland), while sodium carbonate anhydrous (p.a.) was from Gram-mol (Zagreb, Croatia).

Samples

Around 2 kg of apples was collected from local orchards (apple variety 'Božićnica' from Gornji Tkalec (45°58024.0" N 16°27012.0" E) and apple variety 'Batulenka' from Rude (45°46035.6" N 15°40035.8" E)). 'Božićnica' is a medium sized apple, with red peel and white flesh. 'Batulenka' is a medium sized apple, with distinctly green peel interspersed with white dots and white flesh.

The difference in peel colour, along with both apples being traditional varieties, was the main reasoning for this choice of apples since the red peel apples usually have more anthocyanins. Both apple varieties were harvested ripe. Approximately 1 kg of apples was peeled with a commercial peeler. For each variety, the peel was pooled together and homogenized with the help of a coffee grinder. The remaining apple flesh was then cut into four equal parts, the seeds were removed and the flesh pieces were pooled together. The flesh was homogenized with a stick blender. These samples were frozen, stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for no more than 30 days before extracts for the determination of polyphenolic compounds were made.

Extraction of polyphenolic compounds

Approximately 0.2 g of peel or flesh was weighed and added to a plastic cuvette. This procedure was repeated 10 times for each variety, both peel, and flesh. Then, 1 mL of a solvent consisting of 80 % methanol and 20 % water was added into each cuvette and the solution was homogenized in a vortex mixer. The extraction was performed on an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Germany) for 15 min. The solution was centrifuged (Eppendorf Minispin centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) for 10 min at 10,000 RPMs. Extracts were separated from the residue and combined to make a finale volume of approximately 10 mL. Lastly, methanol was removed from extracts using a rotary evaporator (IKA RV 10 Digital D Distilling Rotary Evaporator, Germany) and the finale volume was approximately 2 mL. Two parallel samples were prepared for each variety.

Spectrophotometric method for total polyphenols (Folin-Ciocalteu method)

Total polyphenol content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu micro method (Singleton et al., 1999). An aliquot (20 μl) of the extract was mixed with 1580 μl of distilled water and 100 μl of Folin-Ciocalteu reagent. Three hundred microliters of sodium carbonate solution (200 g/L) was added to the mixture. The mixture was incubated at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min (IN 30, Memmert, Schwabach, Germany). The absorbance was read at 765 nm on a UV–vis spectrophotometer (UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu UV-1280, Kyoto, Japan). Solutions of gallic acid from 0 to 500 mg/L were measured with the same procedure, for the creation of the calibration curve.

Inhibition of α -glucosidase

α -glucosidase activity, with or without the presence of the inhibitor, was assayed spectrophotometrically using pNPG as substrate. Stock solutions of α -glucosidase (0.55 U/mL), pNPG (0.3955 mg/mL), acarbose (2 mg/mL) and different concentrations (2–80 $\mu\text{g/mL}$) of polyphenolic extracts were prepared in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). The inhibition assay was conducted as presented in Table 1. Briefly, inhibition assay for every inhibitor contained negative control (0 % inhibition), negative control blank, inhibition, and inhibition blank. The assay solution containing 165 μL each of phosphate buffer and different concentrations of inhibitor and 85 μL of substrate (pNPG) was pre-incubated for 5 minutes at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IN 30, Memmert, Schwabach, Germany). For the negative control, the inhibitor was replaced with an equal amount of phosphate buffer, while acarbose (a well-known inhibitor)

was used as a positive control. The reaction was started by adding 85 µL of enzyme to the assay solution and was carried out at 37 °C for 17.5 min.

The reaction was stopped by adding 665 µl of 0.1 M sodium carbonate (Na₂CO₃) and absorbance was measured at 405 nm on a UV–vis spectrophotometer (UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu UV-1280, Kyoto, Japan). The rate of enzyme inhibition was calculated as a percentage of the control (without inhibitor) using the formula (Eq. 1):

$$\% = ((\text{Abs Control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}) * 100 \quad (1)$$

wherein, Abs Control represents the subtracted value between negative control and control blank, while Abs sample represents the subtracted value between inhibition and inhibition blank.

IC₅₀ values (concentration of inhibitor giving 50 % inhibition) were calculated graphically using dose-dependent inhibition.

Table 1. The conditions for α-glucosidase inhibition assay

	Control blank	Negative control (0 % of inhibition)	Inhibition blank	Inhibition
Buffer (0.1 M, pH 6.8)	250 µL	165 µL	85 µL	0
Acarbose/sample (different concentrations)	0 µL	0 µL	165 µL	165 µL
pNPG	85 µL	85 µL	85 µL	85 µL
Preincubation at 37 °C for 5 minutes				
α-glucosidase (0.55 U/mL)	0 µL	85 µL	0 µL	85 µL
Incubation at 37 °C for 17.5 minutes				
Na ₂ CO ₃ (0.1 M)	665 µL	665 µL	665 µL	665 µL
Absorbance measurement at 405 nm				

Statistical analysis

Total polyphenols determination was performed in duplicates, while inhibition assay was performed in triplicates. All results were expressed as a mean value. All figures were plotted by Excel 2016 software and the IC₅₀ value of enzyme activity was calculated using related equations.

Results and Discussion

Total phenolic content

The total phenolic content of the flesh and peel of two old traditional apple varieties was evaluated and results are reported in Fig. 1. The amount of polyphenols, for both varieties, was higher in the peel than in the flesh, which is the usual trend (Jakobek and Barron, 2016; Vieira et al., 2011). As can be seen from Fig. 1, the peel of 'Božićnica' had the highest TPC (2132.9 mg GAE/kg of fresh peel weight), while the flesh of 'Batulenka' had the lowest values (202.17 mg GAE/kg of fresh flesh weight). The amount is in the accordance with the

literature data for TPC determined with the Folin-Ciocalteu method for different apple varieties (Carbone et al., 2011; Iacopini et al., 2010; Podsędek et al., 2000; Sanoner et al., 1999; Vrhovsek et al., 2004). TPC of peeled cider and dessert apples reported by the Phenol explorer database was similar to these values (<http://phenol-explorer.eu/>). Higher amounts of polyphenols in the flesh and the peel of 'Batulenka' and 'Božićnica' were reported in our previous work (Jakobek et al., 2020), wherein the content of polyphenols was determined by High-performance liquid chromatography (HPLC). Slightly different extraction procedures, as well as different harvesting seasons (year 2018 for the HPLC and year 2019 for the Folin-Ciocalteu method), might explain this divergence (van der Sluis et al., 2001). However, the trend wherein the 'Božićnica' had higher amounts of polyphenols than 'Batulenka', both for the peel and the flesh, remained the same for both methods. When assessing apples as a source of polyphenols, it is worth mentioning that peel represents only about 10 % of the whole fruit and it is not always consumed. Hence, the flesh of apples, despite having lower amounts of polyphenols, contributes more to the total polyphenol intake (Jakobek and Barron, 2016).

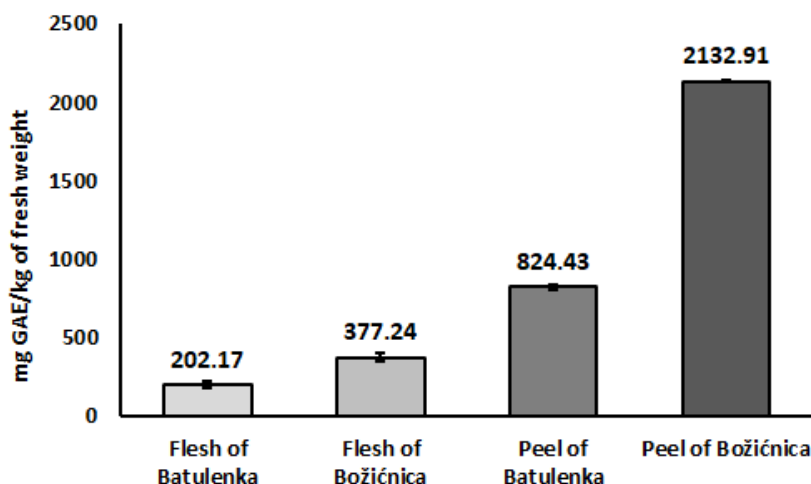


Figure 1. Mean values and standard deviations of the content of polyphenols in the flesh and the peel of the traditional apple varieties, expressed in mg of gallic acid equivalent per kg of fresh fruit.

α-glucosidase inhibition

To properly evaluate α -glucosidase inhibition activity of certain test samples it is important to have a reference compound (positive control). Acarbose, the first drug developed for prediabetes treatment, is most commonly used as a positive control (Granados-Guzmán et al., 2018). However, due to the minor modification of assay conditions, the mean inhibition concentration (IC_{50}) values of acarbose vary greatly from one study to another (Gong et al., 2020; Les et al., 2018; Yilmazer-Musa et al., 2012), making it difficult to compare results between laboratories. As can be seen from Fig. 2, acarbose inhibited α -glucosidase and the IC_{50} value of 206.1881 $\mu\text{g/mL}$ was determined. This value is in accordance with IC_{50} value determined by Granados-Guzmán et al. (2018) in a study whose main objective was to optimize and validate the *in vitro* method to assess the inhibition of α -glucosidase (Granados-Guzmán et al., 2018). The α -glucosidase inhibition activity of polyphenolic extracts from two

old traditional apple varieties was evaluated and IC₅₀ values are reported in Table 2. All of the polyphenolic extracts had tremendously higher IC₅₀ values than acarbose.

Similar findings, where polyphenolic extracts were more potent α-glucosidase inhibitors than acarbose, have been reported previously (de Oliveira Raphaelli et al., 2019; Les et al., 2018; Yilmazer-Musa et al., 2012).

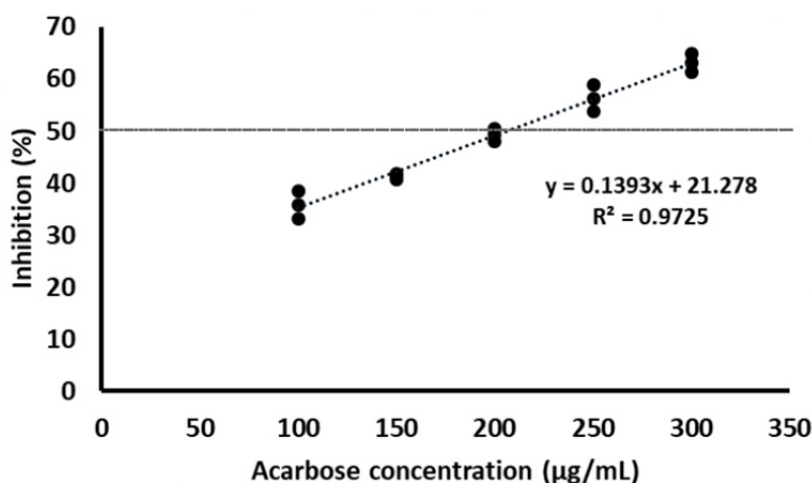


Figure 2. The inhibition of α-glucosidase by acarbose (each concentration was measured three times and analysis was done by the method of least squares).

Table 2. Experimental IC₅₀ values of acarbose and the flesh and the peel of the traditional apple varieties

Inhibitor	IC ₅₀ ^a
Flesh of 'Batulenka'	1.6979
Flesh of 'Božićnica'	1.4715
Peel of 'Batulenka'	1.0769
Peel of 'Božićnica'	0.3293
Acarbose	206.1881

^aThe IC₅₀ values of tested polyphenol extracts are expressed as mg of gallic acid equivalent per milliliter. For acarbose, IC₅₀ value is expressed in µg/mL

On the other hand, in a recent study done by Gong et al. (2020), young apple polyphenols had higher IC₅₀ values (≈15 µg/mL) compared to acarbose (0.76 µg/mL) (Gong et al., 2020). As can be observed from Table 2, the IC₅₀ values (µg GAE/mL) of the peel of 'Božićnica', the peel of 'Batulenka', the flesh of 'Božićnica' and the flesh of 'Batulenka' were 0.33, 1.08, 1.47 and 1.69, respectively. Similar results were observed by Ci et al. (2018) for the flesh and the peel of mini apple (*Malus domestica* cv. „Alps Otome“) (Ci et al., 2018). However, acarbose was not used as a positive control for this study, so the comparison might not be reliable. For both varieties, the peel polyphenols had stronger inhibition activity than the flesh polyphenols, and inhibition reached a steady state in all cases (Fig. 3). These findings are in agreement with literature data (Adyanthaya et al., 2010; Barbosa et al., 2010). Higher amounts of condensed tannins (procyanidin B1 and procyanidin B2) in the peel compared to the flesh of both apple varieties reported in our previous work (Jakobek et al., 2020) might

explain these differences. Namely, Wei et al. (2017) showed that proanthocyanidins extracted from *Pyrachanta fortuneana* were excellent α -glucosidase inhibitors, being more than 2000 times more effective than acarbose (Wei et al., 2017).

This is probably due to the fact the binding of polyphenols to an enzyme is the driving force for the inhibition of enzyme activity (Gong et al., 2020), and that binding is primarily through hydrogen bonds between hydroxyl groups of polyphenols and amino acid residues of α -glucosidase (Uddin et al., 2012). The higher condensed tannins (polyhydroxy compounds) content in the peel than in the flesh might explain better inhibitory effect of the peel polyphenols.

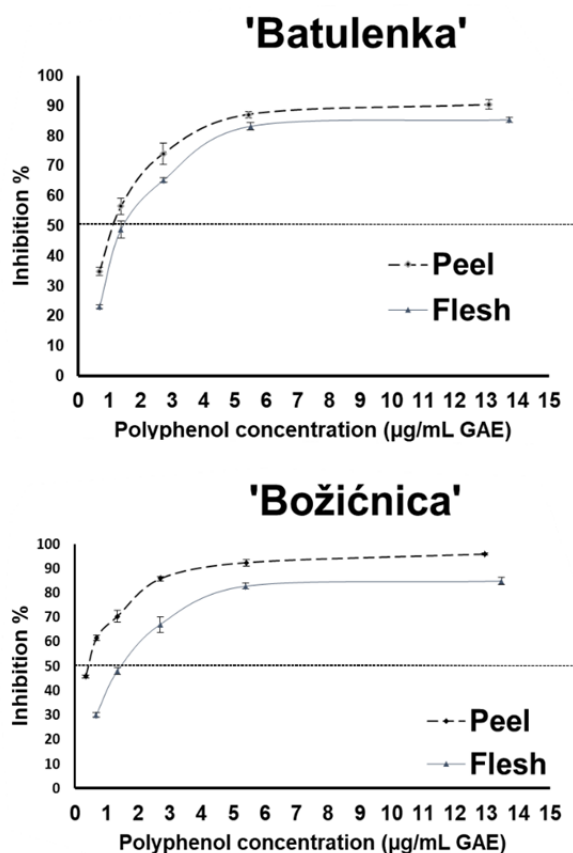


Figure 3. The inhibition of α -glucosidase by polyphenols extracted from the flesh and the peel of 'Batulenka' and 'Božićnica' (data points are expressed as mean with standard deviations(n=3)).

Conclusions

The polyphenolic extracts from flesh and the peel of two traditional apple varieties, strongly inhibit α -glucosidase, with the peel of 'Božićnica' being the most potent inhibitor (IC_{50} 0.33 μ g GAE/mL). Furthermore, polyphenols from peel showed better inhibitory effect than polyphenols from flesh, for both varieties.

References

- Adyanthaya, I., Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., Shetty, K. (2010): Health benefits of apple phenolics from postharvest stages for potential type 2 diabetes management using *in vitro* models, *J. Food Biochem.* 34, 31–49.
- Barbosa, A. C. L., Pinto, M. da S., Sarkar, D., Ankolekar, C., Greene, D., Shetty, K. (2010): Varietal influences on antihyperglycemia properties of freshly harvested apples using *in vitro* assay models, *J. Med. Food.* 13, 1313–1323.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018): Overview of polyphenols and their properties, in: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, pp. 3–44.
- Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R., Cecchini, F. (2011): Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chem.* 127, 493–500.
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Bozzi Nising, A., Hurrell, R. F. (2012): Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile, *J. Food Compost. Anal.* 26, 128–135.
- Chen, L., Cao, H., Xiao, J. (2018): Polyphenols, in: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, pp. 45–67.
- Ci, Z., Kikuchi, K., Hatsuzawa, A., Nakai, A., Jiang, C., Itadani, A., Kojima, M. (2018): Antioxidant activity, and α -glucosidase, α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenols in flesh, peel, core and seed from mini apple, *Am. J. Food Sci. Tech.* 6, 258–262.
- Cvejić Hogervors, J., Giorgio, R., Justyna, G., Neda, M. D., Natasa, S., Artur, B., Giuseppe, G. (2018): Beneficial effects of polyphenols on chronic diseases and ageing, in: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, pp. 69–102.
- de Oliveira Raphaelli, C., dos Santos Pereira, E., Camargo, T. M., Vinholes, J., Rombaldi, C. V., Vizzotto, M., Nora, L. (2019): Apple phenolic extracts strongly inhibit α -glucosidase activity, *Plant Foods Hum. Nutr.* 74, 430–435.
- García-Pérez, M. E., Kasangana, P. B., Stevanovic, T. (2017): Bioactive polyphenols for diabetes and inflammation in psoriasis disease, in: *Studies in natural products chemistry*. Elsevier, pp. 231–268.
- Gong, T., Yang, X., Bai, F., Li, D., Zhao, T., Zhang, J., Sun, L., Guo, Y. (2020): Young apple polyphenols as natural α -glucosidase inhibitors: *In vitro* and *in silico* studies, *Bioorg. Chem.* 96, 103625.
- Granados-Guzmán, G., Castro-Rios, R., de Torres, N. W., Salazar-Aranda, R. (2018): Optimization and validation of a microscale *in vitro* method to assess α -glucosidase inhibition activity. *Curr. Anal. Chem.* 14, 458–464.
- Iacopini, P., Camangi, F., Stefani, A., Sebastiani, L. (2010): Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus×domestica* Borkh. in a peroxyxynitrite-induced oxidative process. *J. Food Compost. Anal.* 23, 518–524.
- Jakobek, L., Barron, A. R. (2016): Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds, *J. Food Compost. Anal.* 45, 9–15.
- Jakobek, L., Ištuk, J., Buljeta, I., Voća, S., Žlabur, J. Š., Babojelić, M. S. (2020): Traditional, indigenous apple varieties, a fruit with potential for beneficial effects: Their quality traits and bioactive polyphenol contents, *Foods.* 9, 52.

- Kao, Y. L., Kuo, Y. M., Lee, Y. R., Chen, W. J., Lee, Y. S., Lee, H. J. (2017): Apple polyphenol decelerates bladder cancer growth involving apoptosis and cell cycle arrest in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced experimental animal model, *J. Funct. Foods*. 36, 1–8.
- Kojima, T., Akiyama, H., Sasai, M., Taniuchi, S., Goda, Y., Toyoda, M., Kobayashi, Y. (2000): Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study, *Allergol. Int.* 49, 69–73.
- Krentz, A. J. (2018): Evolution of glucose-lowering drugs for type 2 diabetes, in: Nutritional and therapeutic interventions for diabetes and metabolic syndrome. Elsevier, pp. 431–454.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. (2011): α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes, *Pharmacogn. Rev.* 5, 19–29.
- Les, F., Arbonés-Mainar, J. M., Valero, M. S., López, V. (2018): Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells, *J. Ethnopharmacol.* 220, 67–74.
- Li, D., Sun, L., Yang, Y., Wang, Z., Yang, X., Zhao, T., Gong, T., Zou, L., Guo, Y. (2019): Young apple polyphenols postpone starch digestion *in vitro* and *in vivo*, *J. Funct. Foods*. 56, 127–135.
- Nyambe-Silavwe, H., Villa-Rodriguez, J.A., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J. M., Williamson, G. (2015): Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols, *J. Funct. Foods*. 19, 723–732.
- Ozougwu, O. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus, *J. Physiol. Pathophysiol.* 4, 46–57.
- Podsędek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowski, J. (2000): Compositional characterisation of some apple varieties, *Eu. Food Res. Technol.* 210, 268–272.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., Drilleau, J.-F. (1999): Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.), *J. Agric. Food Chem.* 47, 4847–4853.
- Shmeltz, L., Metzger, B. (2007): Diabetes/Syndrome X, in: Comprehensive Medicinal Chemistry II. Elsevier, pp. 417–458.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 152–178.
- Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. del, Lobo, A. P., Parra, F. (2010): Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace, *Food Chem.* 120, 339–342.
- Tamura, Y., Tomiya, S., Takegaki, J., Kouzaki, K., Tsutaki, A., Nakazato, K. (2020): Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue, *J. Nutr. Biochem.* 77, 108299.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., Zhu, H. (2003): Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC), *J. Agric. Food Chem.* 51, 6347–6353.
- Uddin, G., Rauf, A., Al-Othman, A. M., Collina, S., Arfan, M., Ali, G., Khan, I. (2012): Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*, *Fitoterapia*. 83, 1648–1652.
- van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W. M. F. (2001): Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions, *J. Agric. Food Chem.* 49, 3606–3613.

- Vieira, F. G. K., Borges, G. D. S. C., Copetti, C., Di Pietro, P. F., Nunes, E. da C., Fett, R. (2011): Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil, *Sci. Hortic.* 128, 261–266.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004): Quantitation of polyphenols in different apple varieties, *J. Agric. Food Chem.* 52, 6532–6538.
- Wei, M., Chai, W.-M., Yang, Q., Wang, R., Peng, Y. (2017): Novel insights into the inhibitory effect and mechanism of proanthocyanidins from *Pyracantha fortuneana* fruit on α -glucosidase, *J. Food Sci.* 82, 2260–2268.
- Wu, K.-H., Ho, C.-T., Chen, Z.-F., Chen, L.-C., Whang-Peng, J., Lin, T.-N., Ho, Y.-S. (2018): The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter, *J. Food Drug Anal.* 26, 221–231.
- Yilmazer-Musa, M., Griffith, A.M., Michels, A. J., Schneider, E., Frei, B. (2012): Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity, *J. Agric. Food Chem.* 60, 8924–8929.

Effect of high hydrostatic pressure on the quality and shelf-life of fresh-cut potato

Branka Levaj*, Ana Ljubas, Zrinka Čošić, Zdenka Pelaić, Filip Dujmić, Maja Repajić

*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: blevaj@pbf.hr*

Summary

The influence of high hydrostatic pressure (HHP) treatment (400 MPa/0, 3, 5 and 10 min) on the quality and sensory properties as well as microbial stability of fresh-cut potato was investigated along with the stability of the best evaluated samples during 15 days' storage in vacuum packaging at 6 °C. Potato slices immersed in sodium ascorbate solution (NaAsc) were treated by HHP and afterwards, slices were analyzed for color (CIELAB), firmness (texture analyzer) and aerobic mesophilic bacteria count (AMB). Slices were also boiled and fried, and all samples were sensory evaluated. Treatment reduced AMB, and did not significantly affect firmness, but it did lightness, where slices treated for 5 and 10 min were brighter. Some samples showed mechanical damage during frying, and they were sensory lower graded. Consequently, the stability of 0 and 3 min HHP treated and vacuum-packaged samples (0'-HHP; 3'-HHP) were examined during storage (8, 11 and 15 days). AMB increased during storage, but it was lower in 3'-HHP. Storage duration did not significantly affect firmness, but it did lightness (increase). Only 0'-HHP was sensory acceptable till the 8th storage day. Despite the excellent results of HHP on AMB, potato slices treated by HHP in NaAsc showed poor sensory properties.

Keywords: fresh-cut potato, high hydrostatic pressure, sensory, firmness, color

Introduction

Regarding preservation method, fresh-cut fruit and vegetables are exception among other fruit and vegetable (F&V) products which are mostly preserved by thermal treatment (heat or freezing). They are produced by minimal processing, which includes washing, peeling and cutting without thermal treatment due to its main characteristic, freshness which they should fulfill. Further, they should be simple to use and be ready to eat or to make easier and faster meal preparation, respectively. Due to its freshness and convenience consumers prefer such products, but its weakness is susceptibility to enzymatic browning, microbiological growth and losing quality traits and accordingly undesirable short shelf-life (Lamikanra, 2002) In order to overcome its sensitivity, fast deterioration and to preserve and insure its freshness, safety and excellent sensorial attributes, alternative preservation techniques for thermal treatment and use of chemical preservatives are being explored. Although Larson et al. reported in 1918 that high hydrostatic pressure (HHP) treatment destroyed bacteria and even 4 years earlier Hite, Giddings and Weakly studied the possibility of preserving fruit and vegetables with HHP, it started to be interesting in industrial food processing in late eighties of the last century (Rastogi et al., 2007) and it is still very actual topic which preoccupies

scientists. In F&V processing, application of HHP could be desirable replacement for thermal treatment since it can be effective in enzyme and microbial (MO) inactivation as well in preserving some very sensitive components or traits. This is especially important in fresh-cut sector considering that thermal treatment is not applicable. In general, HHP mostly affects non-covalent but not covalent bonds, thus components responsible for flavor, color and nutritive value remain almost unchanged oppositely to thermal treatment (Rastogi et al., 2007). During HHP treatment the material is instantaneously and evenly compressed by pressure regardless of its shape and size, hence it could be effective to enzyme or MO inactivation at ambient temperature (Eshtiaghi and Knorr, 1993). Pressure from 100 to 1000 MPa [commercially, up to 600 MPa (Duardo et al., 2019)] could usually be applied, and its effectiveness mainly depends on the pressure strength, the exposure time and temperature (-20 to 60 °C), but there are also many other factors as well as nature of food matrix and MO as well as enzymes (Oey et al., 2008; Rendueles et al., 2011). In general, MO inactivation could be the result of permeabilization of cell membrane (Farr, 1990) and enzyme inactivation due to acting on non-covalent bonds and protein denaturation, some conformational changes and decompartmentalization (Gomes and Ledward, 1996). In spite of promising results, HHP showed some limitations, e.g., it seems that enzymes could not be completely inactivated if only HHP is applied (Gomes and Ledward, 1996). Numerous researches have dealt with the impact of application of HHP treatment in combination with other methods or anti-browning agents on F&V behavior and changes, where for example fruit could be immersed in a sugar solution with or without addition of anti-browning agents in adequate pouch. Therefore, Argyri et al. (2014) investigated apricot, peach, and pear immersed in sucrose solution with addition of ascorbic acid or SnCl₂ and their interaction influenced by HHP 600 MPa/5 min at 10 °C, while Wolbang et al. (2007) explored melon cubes immersed in sucrose solution influenced by 600 MPa/10 min at ambient temperature. Moreover, HHP treatment of vacuum packaged vegetable was also studied, e.g., green beans treated by HHP 500 MPa/1 min at ambient temperature (Krebbbers et al., 2002), carrots, green beans and broccoli treated by 600 or 400 MPa/2 min (McInerney et al., 2007) and onion by interactions of 5 min treatment by 100 – 400 MPa at 5 to 50 °C where 400 MPa/5 °C were the best conditions in preserving onion biological value Roldán-Marín (2009). Considering potato, Saraiva and Rodrigues (2011) found that HHP treatment of tubers by 50 and 100 MPa for 5 and 10 min was effective on sprouting prevention, what was generally confirmed later by Alexandre et al. (2015) reported that treatment of 30 MPa for 10 min at 60 °C was the most successful. In Eshtiaghi and Knorr (1993) study MO reduction and polyphenoloxidase inactivation was achieved in potato cubes immersed in citric acid solution and treated by 400 MPa for 15 min at 20 °C. Further, Al-Khusaibi and Niranjan (2012) reported that HHP treatment of vacuum packaged potato slices by 200 – 800 MPa/5 min at 25 °C caused higher oil uptake during frying when compared to control samples. However, Kuldiloke and Eshtiaghi (2008) reported opposite findings in case of HHP treated (400 or 600 MPa/5 min at 20 to 60 °C) vacuum packaged, subsequently frozen and then fried potato sticks. Duardo et al. (2019) gave an overview of HHP treatment application on potato, and pointed to an opening of the tissue structure exposed to HHP as well as the cell permeability increase what contributes to easier diffusion if pressure of 100 to 400 MPa was applied (Sopanangul et al., 2002). Still, HHP treatment could cause incomplete and ununiformed inactivation of enzymes, harder or even softer texture (Basak and Ramaswamy, 1998; Tangwangchai et al, 2000; Oey et al., 2008), color and flavor alteration (Oey et al., 2008).

In spite of general assume that HHP has no negative influence on sensory traits of F&V, obviously it depends on treatment conditions as well as nature of food matrix.

Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of HHP treatment (400 MPa/0, 3, 5 and 10 min) in NaAsc solution on the microbial stability and quality of raw fresh-cut potato and its sensory properties before and after thermal treatment as well as stability of the best evaluated and vacuum-packaged samples during 15 days at 6 °C.

Materials and Methods

Plant material

In this experiment potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers (cv. Birgit) harvested in 2019 and stored for one month in the dark (8 °C/RH app. 100 %) were used. Tubers originated from Slavonia region (Croatia).

Sample preparation and HHP treatment

Undamaged healthy potatoes of uniform size were washed under tap water, peeled with sharp hand peeled and sliced (0.4 cm) by hand slicer. Obtained slices (200 g) were packaged in 300 mL plastic jars and filled with NaAsc solution (2 %, w/v). Plastic jars were closed tightly and then vacuum packaged (LAVEZZINI START GAS, Italy) in polyamide/polyethylene (PA/PE) bags with film thickness 90 µm and afterwards HHP treated.

For HHP treatment Stansted Fluid Power device (Great Britain) was used. The pressure fluid was glycerol. Potato slices were treated by 400 MPa during 3, 5 and 10 min at ambient temperature and samples were coded as 3'-HHP, 5'-HHP and 10'-HHP, respectively. After treatment, slices were drained in colander to reduce surface moisture and packaged in vacuum in 90 µm PA/PE bags. Slices dipped for 3 min in SA solution, drained, and vacuum packed without HHP treatment were used as control sample (0'-HHP). After HHP and thermal treatments sensory evaluation of raw and thermally treated slices was conducted. The HHP treatment which gave the best sensory results was selected for further experiment. In order to examine stability during storage whole procedure under selected conditions was repeated followed by draining and vacuum packaging. Control samples and HHP treated samples were stored at 6 °C/15 days. At the same day of treatment and after 8, 11 and 15 days samples were analyzed, thermally treated and sensory evaluated.

Thermal treatment

All samples were boiled and fried. Slices were put in boiling (at 100 °C) distilled water (ratio water: sample=5:1) for 15 min and drained (boiled samples), while frying of slices was carried out in sunflower oil (ratio oil:sample=5:1) at initial temperature of 180 °C for 5 min (fried samples). The surface moisture or oil of cooked slices was removed with paper towel.

Microbiological analysis

Aerobic mesophilic bacteria count (AMB) was determined in several raw slices of each sample (n=2) by HRN EN ISO 4833-1:2013 (ISO 4833-1: 2013, EN ISO 4833-1:2013) method and the results were expressed as mean values of \log_{10} CFU/g.

Firmness analysis

The firmness of raw fresh-cut potato samples was determined using a texture analyzer by TA.HD.plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK) with 5 kg load cell and 2 mm stainless-steel punch probe. Pre-test speed was set to 1 mm/s and test speed to 0.5 mm/s. Firmness was determined by measuring the maximum force (N) required for probe to penetrate into the slices. The measurements were performed on three slices of each sample with 1 puncture on each slice (n=3) and the results were expressed as mean value \pm standard error (SE).

Color analysis

The color of raw FCP slices was measured by a colorimeter (CR-5, Konica Minolta, Tokio, Japan) equipped with D65 light source with 2° angle observer and measuring plate with 30 mm diameter hole. CIELAB color parameters L^* (lightness), a^* (red/green) and b^* (yellow/blue) were recorded, but only L^* values are presented. Measurements were performed on three slices (n=3) and results were expressed as the mean value \pm SE.

Sensory evaluation

Sensory evaluation was performed by 5 trained panelists and according to the procedure (ISO, 1985, 2012) and previously described method by Dite Hunjek et al. (2020b), slightly modified. Briefly, quantitative descriptive method was used with a standard five-point scale from 0 to 5. Color of the raw and boiled FCP was evaluated as intensity of browning, where 0=absent and 5=complete browning, while color of fried potato was evaluated as characteristic color (0=absence of characteristic color to 5=complete characteristic color). Intensity of characteristic potato taste and off-taste were evaluated by 0=absent to 5=very pronounced. Firmness of raw potatoes was tested by palpation of the slices, while firmness of thermally treated samples was evaluated by chewing, and scored from 0=very soft to 5=very firm. The sensory evaluation included more attributes but for this results presentation only the major ones were selected.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and marginal means were compared using Tukey's post-hoc test. The significance level for all tests was $\alpha \leq 0.05$. The analysis was performed using Statistica ver. 10.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Results and Discussion

Microbiological analysis

The started AMB count in the control sample was low (Fig. 1) and much lower than reported earlier (Estiaghi and Knor, 1993), but it was similar to data in our previous study related to fresh-cut apples also treated with anti-browning agents (Levaj et al., 2020; Putnik et al., 2017). The AMB reduction in 10'-HHP treated samples was 1 log₁₀CFU/g unlike of reported 4 log cycles also achieved with 400 MPa but during 15 min (Estiaghi and Knor, 1993). At the same time, it was the highest AMB reduction (50 % to 0'-HHP), while between 0'-HHP and 3'-HHP the reduction was only 15 %, between 3'-HHP and 5'-HHP only 5 % and between 5'-HHP and 10'-HHP even 38 %. In further part of the experiment only 0'-HHP and 3'-HHP were analyzed during storage. Although AMB was reduced by the treatment, it increased with storage time, but much slower in 3'-HHP when compared to 0'-HHP (Fig. 1). On the 15th day AMB in 3'-HHP was under the limit set by the Regulations although it refers to ready-to-eat fresh-cut F&V, which fresh-cut potato does not represent considering it is ready-to-use product intended for further thermal treatment.

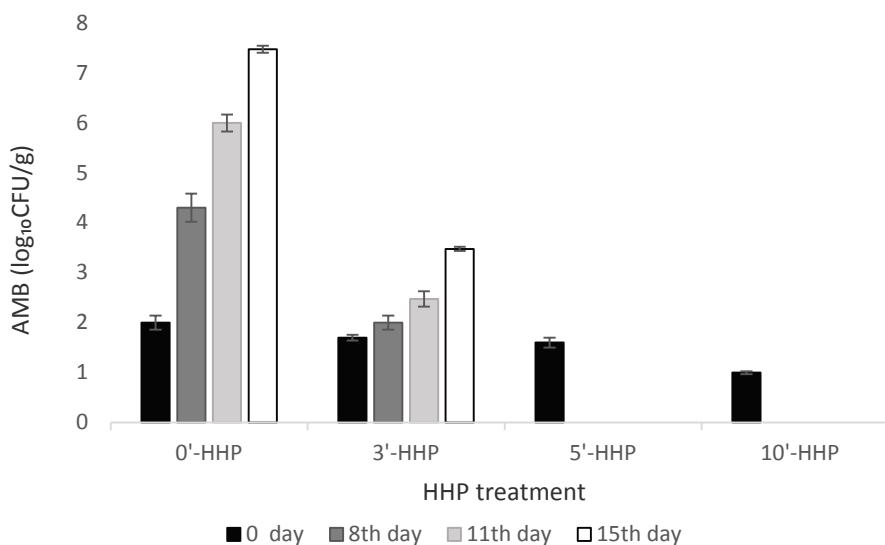


Figure 1. Microbial analysis of aerobic mesophilic bacteria (AMB) expressed as log CFU/g of raw fresh-cut potatoes during 15 days storage

Influence of HHP treatment

Treatment significantly affected sensory evaluated firmness, but not firmness instrumentally measured (Table 1) although according to numerical values treated samples were firmer (8.06 – 9.17 N) than 0'-HHP (7.32 N) (Fig 2a). Similar observation was reported by Al-Khuseibi et al. (2005). Firmness of 0'-HHP sample was similar to already obtained results for the same potato cultivar (Dite Hunjek et al., 2020a). HHP treatment could cause a cell disruption and incomplete enzymes inactivation, and consequently enabled contact of pectinmethylesterase and high methoxy-pectin what leads to its deesterification likely followed by gel-formation responsible to

firmer texture (Oey et al., 2018). If such alteration of molecular structure has occurred, it was not recognized sensorially. HHP treatment significantly affected lightness (Table 1) which was measured in the range of 61.06 (3'-HHP) – 66.17 (5'-HHP), where slices treated for 5 and 10 min were brighter (Fig. 2b). Such values are slightly lower to already obtained results for the same potato cultivar (Dite Hunjek et al., 2020a) likely due to different harvesting year. Sensory color was monitored in terms of browning appearance, and no browning was noticed at all. Cv. Birgit is known as very resistant to browning (European Cultivated Potato Database, 2017; Dite Hunjek et al. 2020a; Dite Hunjek et al., 2020b). Moreover, increase of L^* in HHP treated tomato purée was also reported by Sánchez-Moreno et al. (2006). Textural alterations which occur during HHP could influence on distribution of surface reflectance (Oey et al., 2018), what could be the reason for brighter slices and not the pigment losses (MacDougall, 2002).

Table 1. Influence of HHP treatment on firmness (instrumental and sensory) and color (L^*) of raw fresh-cut potatoes and sensory attributes of boiled and fried fresh-cut potatoes

HHP (min)	Raw		
	Firmness (N) p=0.10	L^* p=0.02*	Sensory-firmness p=0.05*
0	7.32±0.45 ^a	61.75±0.95 ^a	4.7±0.3 ^b
3	9.17±0.45 ^a	61.06±0.95 ^a	4.3±0.3 ^b
5	8.06±0.45 ^a	66.17±0.95 ^b	3.3±0.3 ^a
10	8.41±0.45 ^a	64.53±0.95 ^{ab}	3.3±0.3 ^a
	Boiled - sensory		
	Sensory-firmness p=0.97	Potato taste p=0.01*	Off-taste p=0.05*
0	1.7±0.6 ^a	4.3±0.5 ^b	0.7±0.6 ^a
3	1.3±0.6 ^a	3.0±0.5 ^b	1.0±0.6 ^a
5	1.3±0.6 ^a	1.7±0.5 ^{ab}	2.0±0.6 ^b
10	1.3±0.6 ^a	1.3±0.5 ^a	2.7±0.6 ^b
	Fried - sensory		
	Sensory-firmness p=0.92	Potato taste p=0.01*	Off-taste p=0.05*
0	2.7±0.8 ^a	4.7±0.5 ^b	0.3±0.3 ^a
3	2.7±0.8 ^a	4.3±0.5 ^b	0.7±0.3 ^a
5	2.3±0.8 ^a	3.0±0.5 ^{ab}	1.7±0.3 ^b
10	2.0±0.8 ^a	2.0±0.5 ^a	1.7±0.3 ^b

HHP=high hydrostatic pressure, *Statistically significant variable at $p \leq 0.05$. Results are expressed as mean±SE. Values with different letters within column are statistically different at $p \leq 0.05$.

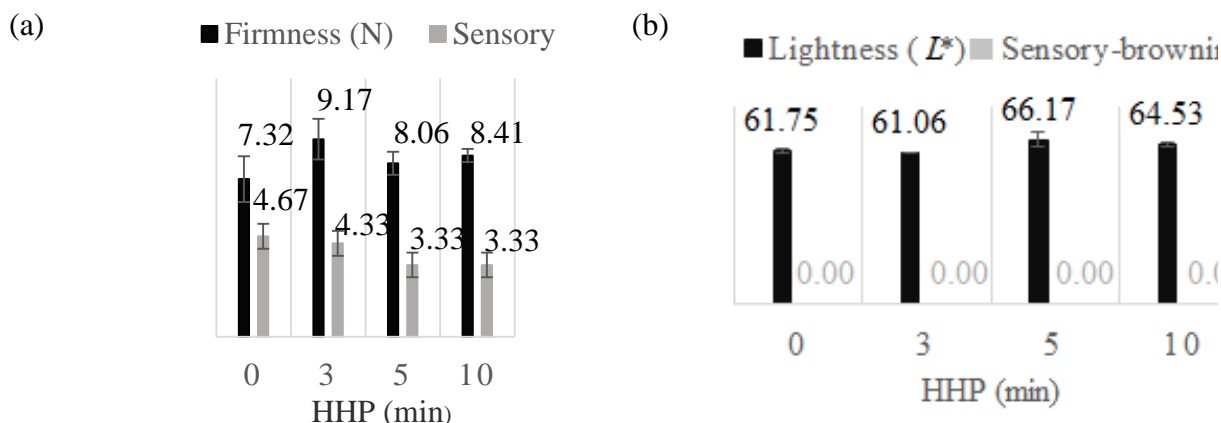


Figure 2. Firmness (a) and color (b) of raw fresh-cut potatoes influenced by HHP treatment (0, 3, 5, 10 min)

Sensory evaluation of boiled and fried HHP treated slices

Due to necessity of thermal treatment the potato prior its consumption and to obtain a complete insight of HHP influence on potato slices, its boiling and frying was performed. HHP significantly affected potato taste and off-taste, but not sensory evaluated firmness and color of boiled and fried slices (Table 1). In boiled potatoes there was no browning observed and in fried ones characteristic color was unchanged (Fig. 3). But longer HHP duration had a negative impact on potato taste and off-taste also appeared. Such results suggest that 5 and 10 min HHP treatment induced some reactions which resulted with the loss of typical potato taste and the appearance of off-taste in cooked potato.

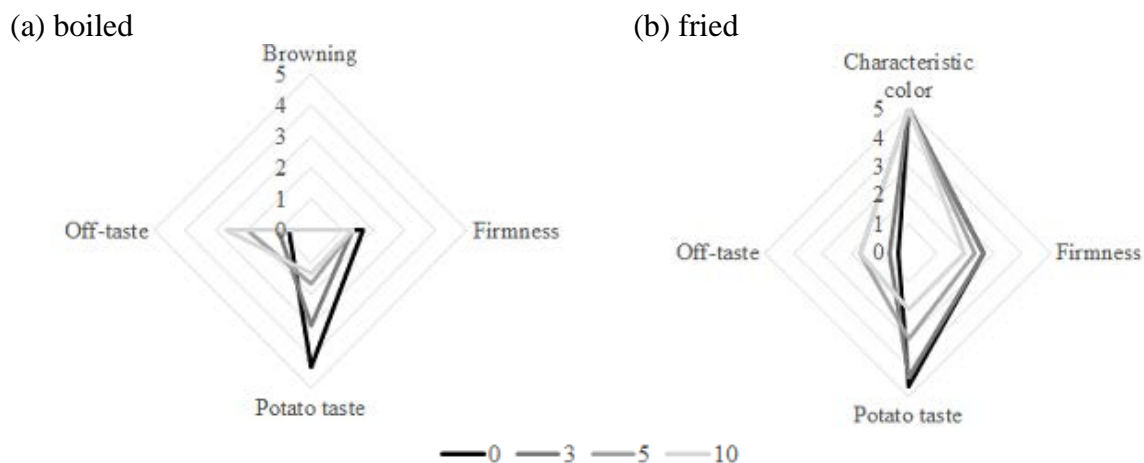


Figure 3. Sensory scores of boiled (a) and fried (b) fresh-cut potatoes influenced by HHP treatment (0, 3, 5, 10 min)

Generally, characteristic taste of boiled or fried potatoes is the result of complex content of different chemical compounds (Jansky, 2010, Thybo et al., 2006), and HHP treatment obviously affected it since HHP can stimulate or slow down enzymatic and chemical reactions

and consequently influence on taste (Oey et al. 2018). Further, Thybo et al. (2006) found that mechanical stress can contribute to potato off-flavor. In spite of no significant influence on firmness, 5'-HHP and 10'-HHP samples experienced certain mechanical damage during frying (Fig. 4) and the oil spattered strongly during their frying due to possible internal tissue damage and solution infusion (Sopanangkul et al., 2002).

Consequently, stability of untreated samples and only ones HHP treated for 3 min was examined during storage at 6 °C (after 8, 11 and 15 days).

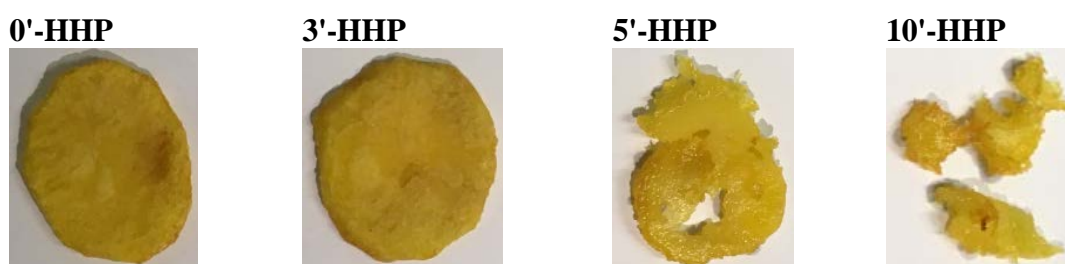


Figure 4. Photo of untreated and HHP-treated potato slices after frying

Influence of HHP treatment and storage

Storage and HHP treatment did not significantly affect sensory evaluated neither instrumentally measured firmness (Table 2) although according to marginal means of instrumentally measured values treated samples were firmer (9.11 N) than 0'-HHP ones (8.27 N). On Fig. 5a certain oscillations during storage can be seen what is similar to previous results (Dite Hunjek et al., 2020a; Dite Hunjek et al., 2020b) but without a statistical significance (Table 2).

Sensory evaluation of boiled and fried HHP treated slices during storage

Storage and HHP treatment significantly affected lightness (Table 2) which was measured in the range of 61.06 (3'-HHP/1st day) – 69.37 (3'-HHP/15th day), where 3'-HHP slices were brighter during storage than 0'-HHP, and during storage both of the samples became brighter (Fig. 5b). Sensory browning was not noticed with an exception of negligible browning of some 3'-HHP slices on 15th storage day, what is in accordance to earlier mentioned resistance to browning of cv. Birgit (European Cultivated Potato Database, 2017; Dite Hunjek et al., 2020a; Dite Hunjek et al., 2020b). Storage and HHP treatment significantly affected sensory evaluated color, potato taste and off-taste, but not firmness of boiled and fried slices (Table 2). During storage, especially on the 15th day in boiled samples slight browning was noticed (less in 3'-HHP) as well as a decrease of characteristic color of fried samples (more in 3'-HHP) (Fig. 6). With storage longer than 8 days a negative impact on potato taste of boiled samples was noticed as well as off-taste appeared and it was more pronounced in 3'-HHP than in 0'-HHP. Similar observations were recognized in fried samples but they were less pronounced. It was also previously reported by Dite Hunjek et al. (2020a, 2020b) that all negative impact on taste during storage is less noticed in fried than in boiled potatoes. Based on the sensory results, 0'-HHP was acceptable till the 8th day and in spite of HHP treatment had a slight positive effect on less pronounced browning of boiled slices, all other attributes were better evaluated in 0'-HHP.

Table 2. Influence of HHP treatment and storage on firmness and color (instrumental and sensory) of raw fresh-cut potatoes and on sensory attributes of boiled and fried fresh-cut potatoes

Source of variation	Raw			
	Firmness	L^*	Sensory-browning	Sensory-firmness
HHP (min)	p=0.06	p<0.01*	p=1.0	p=0.83
0	8.27±0.29 ^a	64.91±0.18 ^a	0.1±0.1 ^a	4.2±0.3 ^a
3	9.11±0.29 ^a	66.20±0.18 ^b	0.1±0.1 ^a	4.1±0.3 ^a
Storage (day)	p=0.52	p<0.01*	p=0.15	p=0.39
0	8.25±0.41 ^a	61.41±0.25 ^a	0.0±0.1 ^a	4.5±0.4 ^a
8	8.59±0.41 ^a	66.28±0.25 ^b	0.0±0.1 ^a	3.7±0.4 ^a
11	9.09±0.41 ^a	65.79±0.25 ^b	0.0±0.1 ^a	3.9±0.4 ^a
15	8.83±0.41 ^a	68.74±0.25 ^c	0.3±0.1 ^a	4.4±0.4 ^a
	Boiled - sensory			
	Browning	Sensory-firmness	Potato taste	Off-taste
HHP (min)	p=0.57	p=0.17	p<0.01*	p<0.01*
0	0.3±0.1 ^a	2.0±0.2 ^a	3.0±0.2 ^b	0.9±0.3 ^a
3	0.3±0.1 ^a	2.5±0.2 ^a	1.6±0.2 ^a	2.3±0.3 ^b
Storage (day)	p<0.01*	p=0.10	p<0.01*	p<0.01*
0	0.0±0.1 ^a	1.5±0.3 ^a	3.7±0.3 ^c	0.8±0.4 ^a
8	0.2±0.1 ^a	2.3±0.3 ^a	2.8±0.3 ^{bc}	1.0±0.4 ^a
11	0.0±0.1 ^a	2.7±0.3 ^a	2.2±0.3 ^b	1.5±0.4 ^a
15	1.0±0.1 ^b	2.7±0.3 ^a	0.5±0.3 ^a	3.2±0.4 ^b
	Fried			
	Characteristic color	Sensory-firmness	Potato taste	Off-taste
HHP (min)	p<0.01*	p=0.17	p<0.01*	p<0.01*
0	4.8±0.1 ^b	2.7±0.4 ^a	4.6±0.1 ^b	0.3±0.2 ^a
3	4.3±0.1 ^a	3.4±0.4 ^a	3.8±0.1 ^a	1.3±0.2 ^b
Storage (day)	p<0.01*	p=0.30	p<0.01*	p=0.05*
0	5.0±0.1 ^c	2.7±0.5 ^a	4.5±0.2 ^b	0.5±0.3 ^a
8	5.0±0.1 ^c	2.5±0.5 ^a	4.8±0.2 ^b	0.3±0.3 ^a
11	4.3±0.1 ^b	3.8±0.5 ^a	4.3±0.2 ^b	0.8±0.3 ^a
15	3.7±0.1 ^a	3.2±0.5 ^a	3.2±0.2 ^a	1.5±0.3 ^b

HHP=high hydrostatic pressure; *Statistically significant variable at $p \leq 0.05$. Results are expressed as mean±SE. Values with different letters within column are statistically different at $p \leq 0.05$.

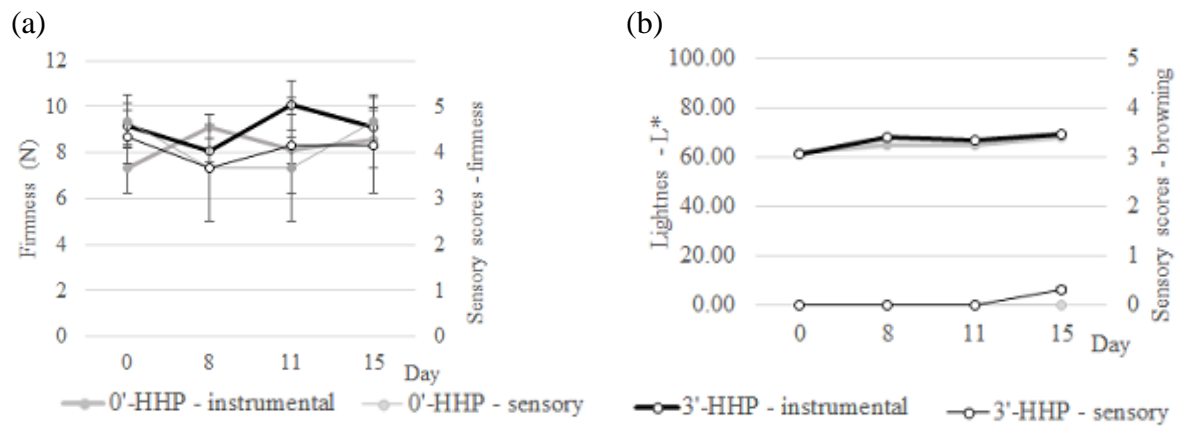


Figure 5. Texture (a) and color (b) of raw fresh-cut potatoes influenced by HHP treatment [0 (0'-HHP) and 3 min (3'-HHP) treated] and storage time (0, 8, 11, and 15 days)

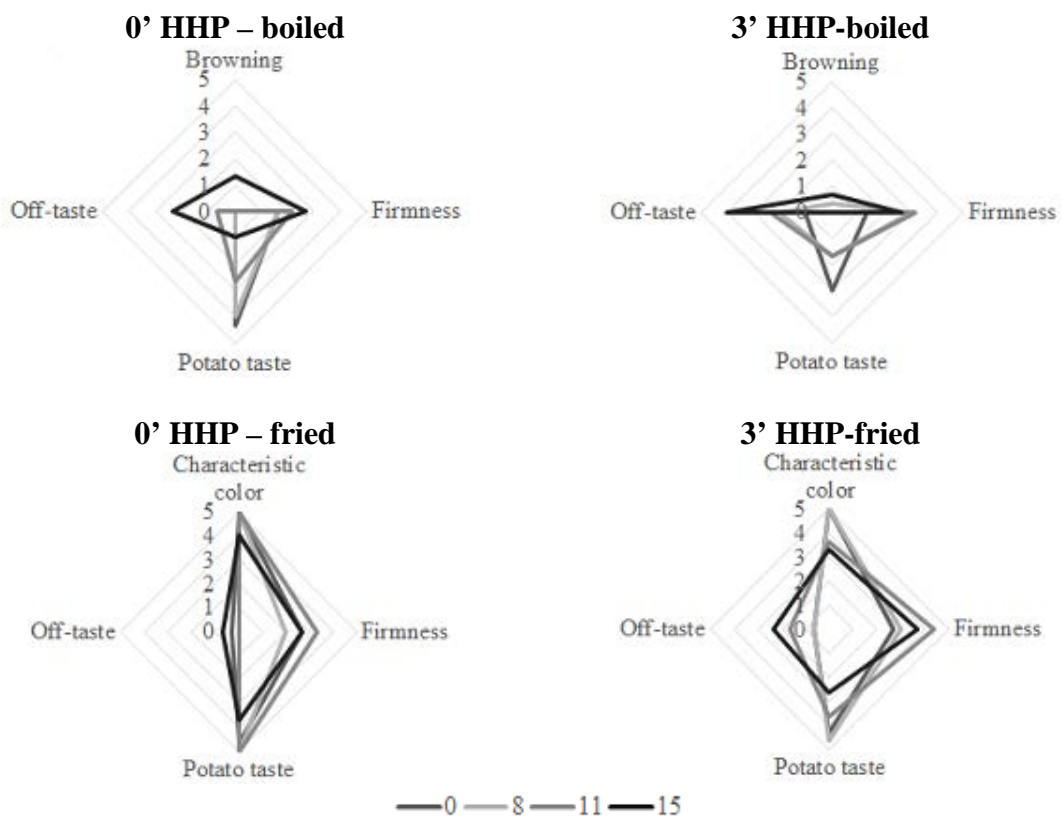


Figure 6. Sensory scores of boiled and fried fresh-cut potatoes influenced by HHP treatment [0 (0'-HHP) and 3 min (3'-HHP) treated] and storage time (0, 8, 11, and 15 days)

Conclusions

Regarding sensory properties, only 0'-HHP samples were acceptable till the 8th day of storage. In spite of the excellent results for aerobic mesophilic bacteria count in HHP treated samples (400 MPa/3 min) in sodium ascorbate solution, such treated potato slices showed

poor sensory properties. Moreover, to avoid water diffusion into the potato tissue which disables frying, for the fresh-cut potato intended for frying, treatments without immersing slices in liquid media during HHP should be investigated.

References

- Alexandre E. M. C., Rodrigues I. M., Saraiva J. A. (2015): Influence of thermal and pressure treatments on inhibition of potato tubers sprouting, *Czech J. Food Sci.* 33 (6), 524–530.
- Al-Khuseibi, M. K., Sablani, S. S., Perera, C. O. (2005): Comparison of water blanching and high hydrostatic pressure effects on drying kinetics and quality of potato, *Dry. Technol.* 23 (12), 2449-2461.
- Al-Khuseibi, M. K., Niranjana, K. (2012): The impact of blanching and high-pressure pretreatments on oil uptake of fried potato slices, *Food Bioprocess Tech.* 5 (6), 2392-2400.
- Argyri, A. A., Tassou, C. C., Samaras, F., Mallidis, C., Chorianopoulos, N. (2014): Effect of high hydrostatic pressure processing on microbiological shelf-life and quality of fruits pretreated with ascorbic acid or SnCl₂, *Biomed Res Int.* 2014 819209.
- Basak, S., Ramaswamy, H. S. (1998): Effect of high pressure processing on the texture of selected fruits and vegetables, *J. Texture Stud.* 29 (5), 587-601.
- Dite Hunjek, D., Repajić, M., Ščetar, M., Karlović, S., Vahčić, N., Ježek, D., Galić, K., Levaj, B. (2020a): Effect of anti-browning agents and package atmosphere on the quality and sensory of fresh-cut Birgit and Lady Claire potato during storage at different temperatures, *J. Food Process. Preserv.* 44 (4), e14391.
- Dite Hunjek, D., Pranjić, T., Repajić, M., Levaj, B. (2020b): Fresh-cut potato quality and sensory: Effect of cultivar, age, processing, and cooking during storage. *J. Food Sci.* 85 (8), 2296-2309.
- Dourado, C., Pinto, C., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Delgadillo, I., Saraiva, J. A. (2019): Innovative non-thermal technologies affecting potato tuber and fried potato quality, *Trends Food Sci. Tech.* 88, 274-289.
- Eshtiaghi, M. N., Knorr, D. (1993): Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure, *J. Food Sci.* 58 (6), 1371-1374.
- European Cultivated Potato Database. (2017): URL: <https://www.europotato.org/>
- Farr, D. (1990): High-pressure technology in food industry, *Trends Food Sci. Tech.* 1, 14–16.
- Gomes, M. R. A., Ledward, D. A. (1996): Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases, *Food Chem.* 56 (1), 1–5.
- HRN EN ISO 4833-1:2013: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique
- International Organization for Standardization (ISO). (2012): ISO 8586: Sensory analysis – General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. Geneva, Switzerland: Author.
- Jansky, S. H. (2010): Potato flavor, *American Potato J.* 87 (2), 209–217.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development of the Republic of Croatia. (2011). Guide for microbiological criteria for food (the third edition).
- Krebbes, B., Matser, A. M., Koets, M., Van den Berg, R. W. (2002): Quality and storage-stability of high-pressure preserved green beans, *J. Food Eng.* 54 (1), 27-33.

- Kuldiloke, J., Eshtiaghi, M. N. (2008): Impact of high hydrostatic pressure pretreatments on quality indicators of potato chips and french fries. 18th National Congress on Food Technology, Iran 15 – 16 October 2008, pp.1-11.
- Lamikanra, O. (Ed.). (2002): Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology, and market, Boca Raton: Crc Press, pp. Preface.
- Larson, W. P., Hartzell, T. B., Diehl, H. S. (1918): The effect of high pressures on bacteria, *J. Infect. Dis.* 271-279.
- Levaj, B., Matijević, B., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D., Lončarić, S., Pedisić, S., Elez Garofulić, I., Mrvčić, J., Čošić, Z., Repajić, M. (2020): The perspectives of fresh-cut fruits and vegetables on the Zagreb market, *Glasnik zaštite bilja*. 43 (4), 76-85.
- MacDougall, D. B. (2002): Colour measurement of food: principles and practice. In Colour in food, improving quality, MacDougall D. B. (ed.), Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, (pp. 33e63).
- McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., Bird, A. R. (2007): Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8 (4), 543-548.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2008): Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review, *Trends Food Sci. Tech.* 19 (6), 320-328.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Herceg, K., Levaj, B. (2017): Influence of respiration on predictive microbial growth of Aerobic mesophilic bacteria and Enterobacteriaceae in fresh-cut apples packaged under modified atmosphere, *J. Food Saf.* 37 (1), e12284.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., Knorr, D. (2007): Opportunities and challenges in high pressure processing of foods, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 47 (1), 69-112.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011): Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review, *LWT-Food Sci. Technol.* 44 (5), 1251-1260.
- Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloría, R., de Ancos, B., Cano, M. P. (2009): Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.* 42 (4), 835-841.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., Cano, M. P. (2006): Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato purée on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2), 171-179.
- Saraiva, J. A., Rodrigues, I. M. (2011): Inhibition of potato tuber sprouting by pressure treatments, *Int. J. Food Sci. Technol.* 46 (1), 61-66.
- Sopanankul, A., Ledward, D. A., Niranjana, K. (2002): Mass transfer during sucrose infusion into potatoes under high pressure, *J. Food Sci.* 67 (6), 2217-2220.
- Tangwongchai, R., Ledward, D. A., Ames, J. M. (2000): Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato, *J. Agric. Food Chem.* 48 (5), 1434-1441.
- Thybo, A. K., Christiansen, J., Kaack, K., Petersen, M. A. (2006): Effect of cultivars, wound healing and storage on sensory quality and chemical components in pre-peeled potatoes., *LWT-Food Sci. Technol.* 39 (2), 166–176.
- Wolbang, C. M., Fitos, J. L., & Treeby, M. T. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2), 196-200.

Utjecaj termina berbe i kvasaca na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva vina Graševina

Valentina Obradović, Josip Mesić, Maja Ergović Ravančić, Brankica Svitlica,
Helena Marčetić, Svjetlana Škrabal*

Veleučilište u Požegi, Poljoprivredni odjel, Vukovarska 17, HR - 34 000 Požega

**Dopisni autor: sskrabal@vup.hr*

Sažetak

Graševina je najznačajnija vinska sorta u Republici Hrvatskoj, a Vinogorje Kutjevo je među najpoznatijim vinogorjima u kontinentalnoj Hrvatskoj, idealno za razvoj maksimalnih sortnih potencijala. Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj različitih vrsta kvasaca i termina berbe na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva vina Graševina. Grožđe je uzgojeno u Vinogorju Kutjevo, na položaju Podgorje 2019. godine. Za proces fermentacije korištene su tri vrste komercijalnih kvasaca (Siha 9, Uvaferm CEG, Anchor vin 13), te autohtoni kvasac, a berba je provedena u dva termina, početkom rujna i početkom listopada 2019. godine. U uzorcima je određen udio alkohola, ukupne kiseline, ukupni ekstrakt i ekstrakt bez šećera, reducirajući šećeri, pH, vinska i jabučna kiselina, antioksidativna aktivnost DPPH metodom, te gustoća boje. Senzorsko ocjenjivanje vina proveo je panel profesionalnih ocjenjivača metodom 100 bodova. Autohtoni kvasci nisu uspješno završili fermentaciju u svrhu dobivanja suhog vina, osobito u kasnijem terminu berbe, te je takav stil poluslatkog vina ujedno i lošije senzorski ocijenjen. Najbolje ocijenjeno vino je vino iz kasnijeg termina berbe, uz upotrebu kvasca Siha 9, a isti kvasac je i u prvom terminu berbe pokazao bolji rezultat senzorskog ocjenjivanja od ostalih. Kasniji termin berbe rezultirao je većim udjelom šećera u grožđu i posljedično većim sadržajem alkohola u suhim vinima, manjim vrijednostima ukupne kiselosti i jabučne kiseline, dok nema značajnije razlike u antioksidativnoj aktivnosti. S druge strane, vina dobivena fermentacijom pomoću autohtonih kvasaca su pokazala nešto veću antioksidativnu aktivnost od vina dobivenih pomoću komercijalnih kvasaca.

Ključne riječi: Graševina, Kutjevo, kvasci, termin berbe

Uvod

Graševina je najraširenija vinska sorta u vinogradarskoj regiji Kontinentalna Hrvatska (Tupajić, 2001). Izvan Hrvatske poznata je i pod drugim imenima poput Talijanski rizling (Rumunjska), Olasz Rizling (Mađarska), Laški Rizling (Slovenija i Srbija), Welschriesling (Austrija, Njemačka i Švicarska) (Robinson i sur., 2012). Mirošević i sur. (2011) opisuju Graševinu kao vino zelenkasto žute do žute boje. Voćno cvjetna aroma je srednje izražena do izražena u kombinaciji sa živom svježinom. Razvoj poželjnih aroma koje potječu od acetatnih estera viših alkohola i etil estera masnih kiselina, uglavnom se događa tijekom alkoholnog vrenja. Naime, kvaščeve gljivice tijekom fermentacije, osim osnovnih produkata, proizvode i velik broj sekundarnih spojeva. Različite vrste i sojevi kvasaca mogu znatno utjecati na kemijski sastav i kakvoću vina (Ribereau-Gayon i sur., 2007). Iako je osnovna vrsta kvasca koja provodi fermentaciju mošta *Saccharomyces cerevisiae*, postoji veliki broj sojeva koji

imaju različita tehnološka svojstva i u konačnici određuju aromatski karakter vina (Robinson i sur., 2012). Danas proizvođači vina imaju na izbor stotine starter kultura kvasca *S. cerevisiae* koji su izabrani zbog različitih karakteristika uključujući njihovu sposobnost završetka alkoholne fermentacije u enološkim uvjetima, niskih koncentracija nepoželjnih aromatskih spojeva i poželjnog utjecaja na aromatski profil. Sve veća potražnja za vinima specifičnih karakteristika dovela je da istraživanja novih vrsta kvasaca u vinarstvu (Masneuf-Pomarede i sur., 2016). S druge strane, mnogi proizvođači vina i dalje koriste autohtone kvasce koji su najčešće miješana kultura različitih kvasaca. Moreira i sur. (2005) navode kako su brojni eksperimenti potvrdili značajnu razliku u kemijskom sastavu vina dobivenih pomoću miješane kulture kvasaca u odnosu na čiste kulture. Međutim, upotreba autohtone kulture kvasaca zbog često prisutnih apiculata kvasaca nosi određeni rizik zbog mogućeg stvaranja etil acetata i octene kiseline.

Cilj ovog rada je usporediti fizikalno-kemijska i senzorska svojstva vina Graševina (vinogorje Kutjevo, lokacija Podgorje) dobivenih pomoću različitih sojeva kvasaca, u dva termin berbe. Fermentacija je provedena pomoću tri komercijalne vrste kvasaca (hibrida *S. cerevisiae* i *S. bayanus*), te pomoću autohtone mikroflore.

Materijali i metode

Materijali

Istraživanje je provedeno u vinogradima i vinskom podrumu Veleučilišta u Požegi. Grožđe kultivara Graševina (*Vitis vinifera* L.) korišteno za eksperiment uzgojeno je u vinogradu koje pripada vinogradarskoj regiji Istočna kontinentalna Hrvatska, podregiji Slavonija, vinogorju Kutjevo, lokaciji Podgorje, na južnim obroncima Papuka na nadmorskoj visini 250 m. Berba je provedena ručno u dva različita termina: 5. rujna 2019. i 1. listopada 2019.

Nakon primarne prerade grožđa (muljanja, runjenja, prešanja) i taloženja od 24 sata, bistri mošt je nacijepljen sa starter kulturama kvasaca:

- SIHA Active Yeast 9 – *Saccharomyces bayanus* izoliran u Hrvatskoj (proizvođač Eaton)
- UVAFERM CEG - *Saccharomyces cerevisiae* selekcioniran u institutu za vinogradarstvo i vinarstvo Geisenheim, soj “Epernay-Champagne” (proizvođač Lallemant)
- ANCHOR VIN 13 - *Saccharomyces cerevisiae* projekt hibridizacije u Zavodu za mikrobiologiju i Institutu za vinarsku biotehnologiju u Stellenboschu, Južna Afrika (proizvođač Anchor Oenology).

Četvrta varijacija pokusa je fermentacija pomoću autohtone mikroflore. Svaka varijacija je provedena u tri ponavljanja u tankovima od 100 L, od nehrđajućeg čelika, s mogućnošću kontroliranja temperature fermentacije. Temperature fermentacije su bile 15 – 18 °C, ovisno o optimalnoj temperaturi za pojedini kvasac propisanoj od strane proizvođača. Kemijska analiza i senzorno ocjenjivanje provedeni su na bistrom vinu, čuvanom u tankovima od nehrđajućeg čelika 6 mjeseci nakon berbe.

Određivanje alkohola i ukupnog suhog ekstrakta

Alkohol i ukupni suhi ekstrakt su određeni destilacijom pomoću uređaja SuperDee proizvođača Gibertini, te je destilatu određena specifična gustoća pomoću hidrostatske vage SuperAlcomat tvrtke Gibertini, prema uputama proizvođača, sukladno OIV smjernicama.

Određivanje reducirajućih šećera, pH, ukupne kiselosti

Reducirajući šećeri, pH i ukupna kiselost određeni su prema službenim OIV metodama (OIV, 2020).

Određivanje ukupnih polifenola, jabučne i vinske kiseline

Određivanje ukupnih polifenola, te jabučne i vinske kiseline provedeno je na multiparametarskom analizatoru Wineflow tvrtke Gibertini kolorimetrijskim enzimatskim reakcijama, prema službenoj metodi proizvođača instrumenta.

Mjerenje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

U kivetu širine 1 cm otpipetira se 2 mL DPPH otopine i izmjeri se početna apsorbancija otopine radikala (A_0). U kivetu se potom doda 50 μ L vina ili soka tj. antioksidansa, smjesa se dobro promiješa i prati se promjena apsorbancija otopine tijekom pola sata pri valnoj duljini od 517 nm.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računati prema jednadžbi 1:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

A_0 - apsorbancija otopine DPPH radikala kod vremena $t = 0$ min

A_t - apsorbancija reakcione smjese kod vremena $T = X$ min (Obradović i sur., 2016).

Određivanje gustoće boje

Gustoća boje određena je pomoću uređaja Color & Phenols ISM for wine analysis HI 83742 (Obradović i sur., 2016).

Organoleptičko ocjenjivanje vina

Senzorno ocjenjivanje provedeno je metodom 100 bodova prema važećem Pravilniku za organoleptičko (senzorno) ocjenjivanje vina i voćnih vina (NN 106/04, 137/12, 142/13, 48/14). Ocjenjivanje je proveo panel profesionalnih ocjenjivača.

Rezultati i rasprava

U tablici 1 prikazani su dobiveni rezultati karakterizacije vina (udio alkohola, šećera i ekstrakta) za različite termine berbe i primjene različitih vrsta kvasaca.

Tablica 1. Udio alkohola, šećera i ekstrakta u uzorcima vina (*rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri ponavljanja ± standardna devijacija*)

Table 1. Alcohol strength, reducing sugar and extract in wine samples (*results were expressed as the mean of three repetitions ± standard deviation*)

Uzorak	Kvasac	Termin berbe	Alkohol (vol %)	Ukupni suhi ekstrakt (g/L)	Reducirajući šećeri (g/L)	Ekstrakt bez šećera (g/L)
1	Siha 9	5.9.2019.	13,03±0,07	19,70±0,22	2,59±0,28	17,28±0,26
2	Uvaferm CEG	5.9.2019.	12,97±0,03	18,43±0,68	1,86±0,23	16,57±0,47
3	Anchor VIN 13	5.9.2019.	13,00±0,10	19,53±1,65	1,67±0,41	17,86±0,60
4	Autohtoni	5.9.2019.	12,26±0,45	28,27±1,57	12,17±0,33	16,09±0,28
5	Siha 9	1.10.2019.	15,46±0,29	24,16±1,44	7,62±0,20	16,53±0,32
6	Uvaferm CEG	1.10.2019.	15,18±0,21	31,03±1,28	13,46±0,94	17,57±0,42
7	Anchor VIN 13	1.10.2019.	15,72±0,20	19,28±0,65	2,44±0,36	16,84±0,66
8	Autohtoni	1.10.2019.	13,13±0,19	64,31±3,46	24,38±0,50	39,93±2,97

Iako Mirošević i sur. (2011) navode kako je tipičan sadržaj alkohola u vinu Graševina 11,5 – 12,5 vol %, već u ranijem terminu berbe (5. rujna) sadržaj alkohola je oko 13 vol % (osim u uzorku 4, koji ima veći sadržaj neprevrelog šećera). To je u skladu s tvrdnjom Canonica i sur. (2016) kako je generalno sadržaj alkohola u vinima porastao tijekom posljednja dva desteljeća zbog klimatskih promjena. Dodatnoj akumulaciji šećera u grožđu korištenom u ovom eksperimentu pogoduje i pozicija vinograda na južnim obroncima planine Papuk sa izloženošću suncu kroz veći dio dana. Kao što se može vidjeti u Tablici 1. kasniji termin berbe rezultirao je većim udjelom alkohola u vinima što je rezultat i većeg sadržaja šećera u moštu. Međutim, autohtona mikroflora kvasaca u oba termina berbe nije provela fermentaciju šećera do kraja kako bi se dobila suha vina. U ranijem terminu berbe (uzorak 4) količina reducirajućih šećera je 12,17 g/L što je na granici između polusuhog i poluslatkog vina, a u kasnijem terminu berbe (uzorak 8) čak 24 g/L. Također treba istaknuti kako je tijekom fermentacije pomoću autohtonih kvasaca bio izuzetno spor osobito u kasnijem terminu berbe, te je fermentacija uzorka broj 8 trajala čak 2 mjeseca, za razliku od ostalih uzoraka gdje je fermentacija završila za 20 dana. Tako dugim stajanjem vina na talogu kvasaca došlo je i do djelomične autolize stanica kvasca što se očitovalo kao znatno veći udio ekstrakta bez šećera u uzorku 8 od svih ostalih uzoraka. Organske kiseline u vinu imaju veliku važnost: kao prvo obuhvaćaju jednu od najbitnijih okusnih grupa a to je kiselost. Međutim, osim ovog osnovnog svojstva, pojedine kiseline imaju i vlastite karakteristične okuse.

Npr. limunska kiselina ima svježiji okus različit od jabučne kiseline. Iako su osnovni biokemijski putevi pomoću kojih kvasci metaboliziraju organske kiseline poznati, sami kontrolni sustavi se razlikuju između pojedinih sojeva kvasaca (Whiting, 1976). Kao što se može vidjeti u Tablici 2. raniji termin berbe očekivano je rezultirao nešto višom ukupnom kiselošću (5,86 – 6,01 g/L), od kasnijeg termina berbe (5,20 – 5,35 g/L), osim u slučaju autohtone mikroflora. Sukladno tome i udio vinske kiseline je veći u vinima ranijeg termina berbe (2,29 – 2,35 g/L) od kasnijeg termina berbe (1,49 – 1,90 g/L). Sličan rezultat je i u slučaju jabučne kiseline, međutim vina s autohtonom mikroflorom u ranijem terminu berbe imaju nižu ukupnu kiselost kao i jabučnu kiselinu od vina dobivenih pomoću komercijalnih starter kultura kvasaca u istom terminu berbe.

Tablica 2. pH, ukupna kiselost, jabučna i vinska kiselina u uzorcima vina (*rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri ponavljanja ± standardna devijacija*)

Table 2. pH, total acidity, tartaric and mallic acid in wine samples (*results were expressed as the mean of three repetitions ± standard deviation*)

Uzorak	Kvasac	Termin berbe	pH	Ukupna kiselost (g/L)	Vinska kiselina (g/L)	Jabučna kiselina (g/L)
1	Siha 9	5.9.2019.	3,18±0,02	6,01±0,06	2,33±0,02	1,71±0,11
2	Uvaferm CEG	5.9.2019.	3,16±0,03	6,04±0,19	2,29±0,05	2,04±0,00
3	Anchor VIN 13	5.9.2019.	3,12±0,03	5,86±0,16	2,33±0,09	1,88±0,23
4	Autohtoni	5.9.2019.	3,23±0,02	5,28±0,29	2,35±0,06	0,57±0,20
5	Siha 9	1.10.2019.	3,47±0,05	5,20±0,33	1,56±0,07	0,75±0,14
6	Uvaferm CEG	1.10.2019.	3,40±0,01	5,49±0,23	1,58±0,02	1,59±0,12
7	Anchor VIN 13	1.10.2019.	3,39±0,02	5,35±0,18	1,49±0,01	1,50±0,14
8	Autohtoni	1.10.2019.	3,34±0,01	5,84±0,09	1,90±0,03	1,41±0,12

Fenolni spojevi u vinu pripadaju dvjema glavni skupinama: ne – flavonoidima (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati, stilbeni i fenolni alkoholi), te flavonoidima (antocijani, monomeri i polimeri flavan – 3 – ola, flavonoli dihidroflavonoli) (Castillo-Sanchez i sur., 2008). Fenoli vina se smatraju uspješnima u inhibiciji reaktivnih molekula kisika, inhibiciji oksidacije uljnih faza, te inhibiciji oksidacije ljudskih LDL proteina (Roussis i sur., 2008). Brojna istraživanja su pokazala kako enološki postupci tijekom proizvodnje vina snažno utječu na fenolni sastav kako crnih, tako i bijelih vina (Baiano i sur., 2009; Hernanz i sur., 2007; Hernanz i sur., 2009). Udio polifenola u uzorcima vina prikazan je u tablici 3, te se kreće od 254 mg/L do 365 mg/L, što je u skladu s rezultatima za bijela vina prikazanim u drugim radovima (Roussis i sur., 2008; Khallithraka, 2009). Termin berbe nije utjecao na udio polifenola, no uzorak broj 8 ima znatno veći udio od svih ostalih uzoraka, što se odrazilo i na gustoću boje, što je posljedica već spomenute spore i dugotrajne fermentacije. Antioksidativna aktivnost uzoraka nije u korelaciji s udjelom polifenola.

Naime, poznato je da su polifenoli najvažniji i napoznatiji antioksidansi u vinima, ali osim njih prisutne su i druge molekule s antioksidativnim svojstvima kao što su karotenoidi i produkti Maillardovih reakcija (Moreno i sur., 2007). Korelacija između udjela polifenola i antioksidativne aktivnosti također ovisi i o metodi koja se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti. DPPH metoda je stekla veliku popularnost zbog svoje jednostavnosti i brzine i bazirana je na aktivnosti uklanjanja slobodnih radikala. Lošu korelaciju između ovih parametara pokazali su i Baiano i sur. (2009). Također su zaključili da antioksidativna aktivnost ne ovisi samo o koncentraciji fenolnih spojeva, nego i o specifičnoj kemijskoj strukturi svakog spoja. Dobru korelaciju između navedenih parametara u crnim vinima pokazali su Büyüktuncel i sur. (2014), te Piljac-Žegarac i sur. (2007), dok je u bijelim vinima korelacija bila slaba (Piljac-Žegarac i sur., 2007).

Tablica 3. Ukupni polifenoli, antioksidativna aktivnost DPPH metodom i gustoća boje u uzorcima vina (*rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri ponavljanja ± standardna devijacija*)

Table 3. Total polyphenols, antioxidant activity by DPPH method and colour density in wine samples (*results were expressed as the mean of three repetitions ± standard deviation*)

Uzorak	Kvasac	Termin berbe	Ukupni polifenoli (mg/L)	% inhibicije DPPH radikala	Gustoća boje
1	Siha 9	5.9.2019.	292,90±10,82	46,19±1,12	0,09±0,003
2	Uvaferm CEG	5.9.2019.	301,47±7,09	49,94±1,41	0,07±0,004
3	Anchor VIN 13	5.9.2019.	290,10±6,91	45,45±1,52	0,08±0,006
4	Autohtoni	5.9.2019.	291,27±4,30	49,96±1,48	0,09±0,004
5	Siha 9	1.10.2019.	275,53±6,41	43,23±1,15	0,12±0,007
6	Uvaferm CEG	1.10.2019.	287,97±8,30	44,72±0,29	0,11±0,007
7	Anchor VIN 13	1.10.2019.	254,70±3,36	47,26±0,54	0,12±0,002
8	Autohtoni	1.10.2019.	365,50±11,87	48,91±2,40	0,17±0,005

U Tablici 4. Prikazani su izabrani najvažniji parametri organoleptičkog ocjenjivanja uzoraka vina. Intenzitet mirisa je ocjenjen najvišim ocjenama u vinima proizvedenima pomoću kvasca Siha 9, u oba termina berbe. Isti uzorci su dobili najviše ocjene i za kvalitetu okusa, s tim da je jednaku ocjenu dobilo i vino proizvedeno pomoću kvasca Anchor VIN 13, ali samo u kasnijem terminu berbe. Uzorci kasnijeg termina berbe su dobili nešto bolju ocjenu za opći dojam (osim kvasca Uvaferm CEG) od ranijeg termina berbe, gdje se istaknulo jedino vino dobiveno pomoću kvasca Siha 9. Najveći ukupan broj bodova 87/100 dobio je uzorak vina broj 5 (kasniji termin berbe, kvasac Siha 9), a slijede ga uzorci 1 (raniji termin berbe, kvasac Siha 9) i 7 (kasniji termin berbe, kvasac Anchor vin 13) s 85 bodova. Kvasac Siha 9 pokazao se kao vrlo uspješan u razvoju optimalnih aromatskih karakteristika vina Graševina.

Upotreba autohtonih kvasaca rezultirala je sporijom fermentacijom, i poluslatkim vinom koje se nije pokazalo kao poželjan tip vina pri organoleptičkom ocjenjivanju.

Tablica 4. Rezultati organoleptičkog ocjenjivanja uzoraka vina
Table 4. Results of the organoleptic evaluation of wine samples

Uzorak	Kvasac	Termin berbe	Intenzitet mirisa	Kvaliteta okusa	Opći dojam	Ukupno
1	Siha 9	5.9.2019.	7	19	10	85
2	Uvaferm CEG	5.9.2019.	6	16	9	81
3	Anchor VIN 13	5.9.2019.	6	16	9	78
4	Autohtoni	5.9.2019.	5	16	9	75
5	Siha 9	1.10.2019.	7	19	10	87
6	Uvaferm CEG	1.10.2019.	6	16	9	76
7	Anchor VIN 13	1.10.2019.	6	19	10	85
8	Autohtoni	1.10.2019.	6	16	10	81

Zaključci

Autohtoni kvasci, za razliku od komercijalnih kultura, nisu uspješno fermentirali sav šećer u oba termina berbe, te su dobivena vina s nešto nižim sadržajem alkohola i većim udjelom reducirajućih šećera. Premda je uzorak dobiven pomoću autohtonih kvasaca u kasnijem terminu berbe imao veći udio ekstrakta bez šećera, te polifenola, to nije prepoznato kao poželjno tijekom organoleptičkog ocjenjivanja vina. Najbolje organoleptički ocijenjeno vino je vino iz kasnijeg termina berbe, uz upotrebu kvasca Siha 9 (*Saccharomyces bayanus*), a isti kvasac je i u prvom terminu berbe pokazao bolji rezultat senzorskog ocjenjivanja od ostalih. Termin berbe, kao ni tip kvasca nisu imali utjecaj na antioksidativnu aktivnost uzoraka.

Literatura

- Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., La Notte, E. (2009): Phenolic content and Antioxidant Activity of Primitivo wine: Comparison among Winemaking Technologies, *J. Food Sci.* 74(3), 258-267.
- Büyüktuncel, E., Porgah, E., Colak, C. (2014): Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in local red wines determined by spectrophotometric methods, *Food and Nutrition Sciences* 5, 1660-1667.
- Canonica, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M. (2016): Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine, *Front. Microbiol.* 7, 278.
- Castillo-Sanchez, J. X., Garcia-Falcon, M. S., Garrido, J., Martinez-Carballo, E., Martins-Dias, L. R., Mejuto, X.C. (2008): Phenolic compounds and colour stability of Vinhao wines: Influence of wine-making protocol and fining agents, *Food Chem.* 106, 18-26.

- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A.F., Melendez-Martinez, A. J., Gonzalez-Miret, M. L., Heredia, F. J. (2009): Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from varieties Zalema and Colombard, *Food Chem.* 113, 530-537.
- Hernanz, D., Recamales, A. F., Gonzalez-Miret, M. L., Gomez-Miguez, M. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007): Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale, *J. Food Eng.* 80, 327-335.
- Kallithraka, S., Aliaj, L., Makris, D. P., Kefalas, P. (2009): Anthocyanin profiles of major red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Greece and their relationship with in vitro antioxidant characteristics, *Int. J. Food Sci. Tech.* 44(12), 2385-2393.
- Masneuf-Pomarede, J., Bely, M., Marullo, P., Albertin, W. (2016): The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges, *Front. Microbiol.* 6, 1563.
- Ministarstvo Poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (2014): Pravilnik o organoleptičkom (senzornom) ocjenjivanju vina i voćnih vina, NN 106/04, 137/12, 142/13, 48/14, Narodne novine, Zagreb, Hrvatska.
- Mirošević, N., Vranić, I., Soldo Čamak, V., Božičević, T., Jelaska, V., Maletić, E., Premužić, D., Ivanković, Z., Brkan, B., Ričković, M., Bolić, J. (2011): Kutjevačka Graševina nadarbina Zlatne doline (Vallis aurea) Kutjevo Graševina the gift of Golden valley (Vallis aurea), Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, Croatia.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2005): Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts, *Int. J. Food Microbiol.* 103(3), 285-294.
- Moreno, J., Peinado, J., Peinado, R. A. (2007): Antioxidant activity of musts from Pedro Ximenes grapes subjected to off-vine drying process, *Food Chem.* 104, 224-228.
- O. I. V. (2020): Compendium of International Methods of wine and must analysis, Vol 1., Paris, France: O. I. V.
- Obradović, V., Mesić, J., Svitlica, B., Ergović Ravančić, M. (2016): Influence of Mycorrhiza and Different Yeast Strains on Physical, Chemical and Organoleptic Properties of Graševina (*Vitis vinifera* L.) Wine, *Athens J. Sci.* 3(2), 101-111.
- Piljac-Žegarac, J., Martinez, S., Valek, L., Stipčević, T., Kovačević-Ganić, K. (2007): Correlation between the phenolic content and DPPH radical scavenging activity of selected Croatian wines, *Acta Aliment. Hung.* 36(2), 185-193.
- Ribereau – Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2007): Handbook of enology Volume 1 The mikrobiology of Wine and Vinification, second edition, John Wiley and sons, LTD, London, England.
- Robinson, J., Harding, J., Vouillamoz, J. (2012): Wine Grapes a complete guide to 1368 vine varieties, including their origin and flavours, Penguin Books Ltd, London, England.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkoulioti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D., Boutaris, I. (2008): Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts, *J. Food Compos. Anal.* 21, 614-621.
- Tupajić, P. (2001): Changes of Sugar, Acids and Glycerol Content in Must from Late-Harvested and *Botrytis cinerea* Infected Graševina Grapes, *Agric. Conspec. Sci.* 66, 217-223.
- Whiting, G. C. (1976): Organic Acid Metabolism of Yeast During Fermentation of Alcoholic Beverages – a Review, *J. Inst. Brew.* 82, 84-92.

Influence of harvest date and yeast strains on physical, chemical and organoleptic properties of Graševina wine

Valentina Obradović, Josip Mesić, Maja Ergović Ravančić, Brankica Svitlica,
Helena Marčetić, Svjetlana Škrabal*

Polytechnic in Požega, Agricultural Department, Vukovarska 17, 34 000 Požega, Croatia

**Corresponding author: sskrabal@vup.hr*

Graševina is the most important wine variety in the Republic of Croatia, and the Kutjevo vineyards are among the most famous vineyards in continental Croatia, ideal for the development of maximum varietal potential. The aim of this paper is to determine the influence of different types of yeasts and harvest dates on the physico-chemical and sensory properties of Graševina wine. The grapes were grown in Vinogorje Kutjevo, at the position of Podgorje in 2019. Three types of commercial yeasts (Siha 9, Uvaferm CEG, Anchor vin 13) and autochthonous yeast were used for the fermentation process, and the harvest was carried out in two terms, in early September and early October 2019. The content of alcohol, total acid, total extract and sugar - free extract, reducing sugars, pH, tartaric and malic acid, antioxidant activity by DPPH method, and color density were determined in the samples. Sensory evaluation of wine was conducted by a panel of professional evaluators using the 100-point method. Indigenous yeasts have not successfully completed fermentation for the purpose of obtaining dry wine, especially at a later harvest date, and this style of semi-sweet wine is also less sensory evaluated. The best rated wine is the wine from the later harvest period, with the use of yeast Siha 9, and the same yeast showed a better result of sensory evaluation in the first harvest period than the others. The later harvest term resulted in a higher sugar content in the grapes and consequently a higher alcohol content in dry wines, lower values of total acidity and malic acid, while there was no significant difference in antioxidant activity. On the other hand, wines obtained by fermentation using indigenous yeasts showed slightly higher antioxidant activity than wines obtained using commercial yeasts.

Keywords: Graševina, Kutjevo, yeasts, harvest date

Influence of conventional and innovative extraction techniques on bioactive properties of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.)

Danijela Šeremet¹, Ana Mandura¹, Aleksandra Vojvodić Cebin¹, Stela Jokić², Draženka Komes^{1*}

¹*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University in Zagreb, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology, Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

*Corresponding author: dkomes@pbf.hr

Summary

Ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) is a perennial plant commonly grown in Europe, Asia and America and used for generations in folk medicine. The aim of this study was to investigate the bioactive potential of *Glechoma hederacea* L. extracts prepared by conventional (infusion, decoction and maceration) and innovative (high hydrostatic pressure extraction, ultrasound assisted extraction and subcritical water extraction) techniques of extraction. The obtained water extracts were evaluated spectrophotometrically for total phenols and hydroxycinnamic acid derivatives, as well as antioxidant capacity (DPPH and ABTS assays). Individual phenolic compounds were determined using HPLC-DAD. The extract prepared by decoction (100 °C, 20 min) resulted in the highest total phenolic content (37.39 mg GAE/g dmb), antioxidant capacity (162.53 and 177.24 mmol Trolox/g dmb) and content of hydroxycinnamic acid derivatives (15.90 mg caffeic acid/g dmb), with rosmarinic acid as predominant (2.00 mg/g dmb). Generally, conventional techniques of extraction resulted in a higher extraction efficiency than innovative ones.

Keywords: *Glechoma hederacea* L., ground ivy, innovative extraction techniques, phenolic acids

Introduction

People looked for medicines in nature since ancient times and evidence of the use of medicinal herbs dates back even 5000 years ago (Petrovska, 2012). Even today it is estimated that approximately 80 % of the global population still relies on the use of herbal medicine as primary health care (WHO, 2019). Therefore, natural products and/or structures still have a significant role in the discovery of different drugs (Newman et al., 2012).

Ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) is a perennial herb common to temperate Asia, Europe and America where it can be found in shady places, dry ditches, waste grounds and on the sides of moist meadows. Although ground ivy has been used for generations in folk medicine for its cardiotonic, astringent, diuretic, pectoral, stimulant and tonic properties (Kumarasamy et al., 2002), its chemical and bioactive content is still not well investigated. The beneficial effect of medicinal herbs arises from their bioactive composition. Nowadays, many innovative extraction techniques, such as enzyme-, ultrasound- and microwave-assisted extraction, pulsed electric field extraction, subcritical water extraction, etc., have been implemented in

order to eliminate the degradative effect of conventional techniques, namely the high temperature, on polyphenols' stability during extraction (Azmir et al., 2013). Ultrasound-assisted extraction has been investigated for many years and has found industrial application in the form of ultrasonic reactors for the extraction and preparation of tinctures from different herbs (Vinatoru et al., 2017). Subcritical water extraction is based on improving the physical and chemical properties of water as a solvent by combining high pressures and temperatures above the boiling point to maintaining water in liquid state (Zakaria and Kamal, 2016). High hydrostatic pressure extraction utilizes high fluid pressure at room temperature, between 100 and 1000 MPa, which leads to the disruption of the sample at the cellular level resulting in the fast permeation of solvent into cells and efficient mass transfers and dissolution (Huang et al., 2013).

The aim of this study was to evaluate the impact of conventional (infusion, decoction and maceration) and innovative (subcritical water extraction, ultrasound assisted extraction and high hydrostatic pressure extraction) extraction techniques on the bioactive content of ground ivy. The obtained extracts were characterised for total phenolic and hydroxycinnamic acid derivatives contents, as well as antioxidant capacity (DPPH and ABTS assay) using spectrophotometric methods. Individual phenolic acids were determined using HPLC-DAD.

Materials and Methods

Materials

Ground ivy was bought from a local supplier. Hydrochloric acid and Folin–Ciocalteu's reagent were supplied from Kemika (Zagreb, Croatia). HPLC standards of rosmarinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid, (S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,20-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sodium hydroxide, sodium nitrite and sodium molybdate were purchased from Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Croatia). Methanol was supplied from Panreac (Barcelona, Spain). Ethanol, acetonitrile and formic acid were bought from Carlo Erba (Val de Reuil, France). All chemicals used for experimental procedures were of analytical or HPLC grade.

Methods

Conventional extraction techniques

Infusion (INF), decoction (DEC) and maceration (MAC) were performed using distilled water as solvent and sample to solvent ratio of 1:25, w/v. The parameters for infusion, decoction and maceration were as follows: 80 °C for 30 min, 100 °C for 20 min and room temperature for 48 h, respectively. The extracts were separated by centrifugation (9500 rpm, 20 min) and filtration (Whatman® filter papers 4) and stored at +4 °C until further analyses.

Innovative extraction techniques

All innovative techniques of extraction were performed using distilled water as solvent and sample to solvent ratio of 1:25, w/v. Subcritical water extraction (SWE) was performed in specially designed equipment, as previously described by Jokić et al. (2018). SWE was performed for 5 min at temperature of 150 °C with pressure of 30 bar. Ultrasound-assisted extraction was performed in an ultrasound bath (Elmasonic 2 120, Elma, Singen, Germany) operating at nominal power of 200 W and frequency of 37 kHz. The extraction was carried out for 30 (U30) and 60 (U60) min. High hydrostatic pressure extraction (HHPE) was performed in specialized apparatus (Stansted Fluid Power, Harlow, Great Britain) by varying pressure (200 and 400 MPa) and pressure holding time (10 and 20 min). The obtained extracts from all extractions were separated by centrifugation (9500 rpm, 20 min) and filtration (Whatman® filter papers 4) and stored at +4 °C until further analyses.

Determination of total phenolic content (TPC), antioxidant capacity and hydroxycinnamic acid derivatives

TPC was determined spectrophotometrically (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the method of Singleton and Rossi (1965). The calibration curve was constructed on gallic acid standard and the results were expressed as gallic acid equivalents on dry matter basis (mg GAE/g dmb). Antioxidant capacity was determined using DPPH and ABTS radical cation decolourization assays by Brand-Williams et al. (1965) and Re et al. (1999), respectively. Trolox was used for the external standard calibration curve, and the results were expressed as Trolox equivalent per dry matter basis of the sample (mg Trolox/g dmb). Content of hydroxycinnamic acid derivatives was performed following method described by Matkowski et al. (2008) and the results were expressed as mg caffeic acid/g dmb. All measurements were performed in triplicate.

HPLC determination of individual phenolic acids

The HPLC analysis was performed on an Agilent Series 1200 chromatographic system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a Zorbax Extend C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm i.d.) chromatographic column (Agilent Technologies, USA) and coupled with a Photodiode Array Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The elution was performed in a gradient with a two-component mobile phase consisting of (A) 1 % (v/v) formic acid solution in water and (B) 1 % (v/v) formic acid solution in acetonitrile, according to the following regimen: 0 min – 93 % A, 7 % B; 5 min – 93 % A, 7 % B; 45 min – 60 % A, 40 % B; 47 min – 30 % A, 70 % B; 52 min – 30 % A, 70 % B. The flow was 1 mL/min, the injection volume 5 µL and the column temperature 25 °C. The chromatograms were recorded at 320 nm. Identification of phenolic acids was conducted comparing the retention times and characteristic absorption spectrums (190–400 nm) with commercially available standards. Quantification was enabled by establishing calibration curves (20–100 µg/mL). The analysis was performed in a triplicate. All samples were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Nylon Membranes, Supelco, Bellefonte, PA, USA) prior to the analysis.

Results and Discussion

Total phenolic content (TPC) and content of hydroxycinnamic acid derivatives

TPC and content of hydroxycinnamic acid derivatives of differently prepared ground ivy extracts are presented on Figs. 1 and 2, respectively.

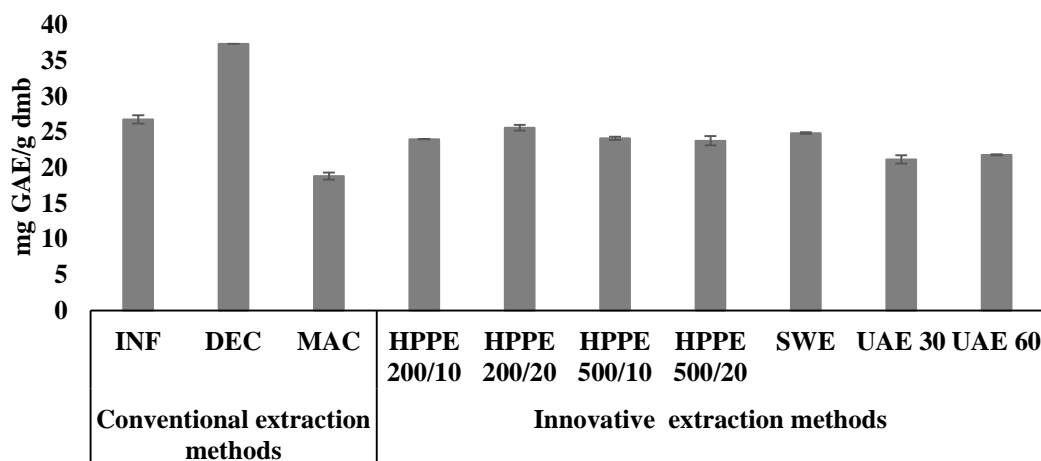


Figure 1. Total phenolic content of differently prepared extracts of ground ivy

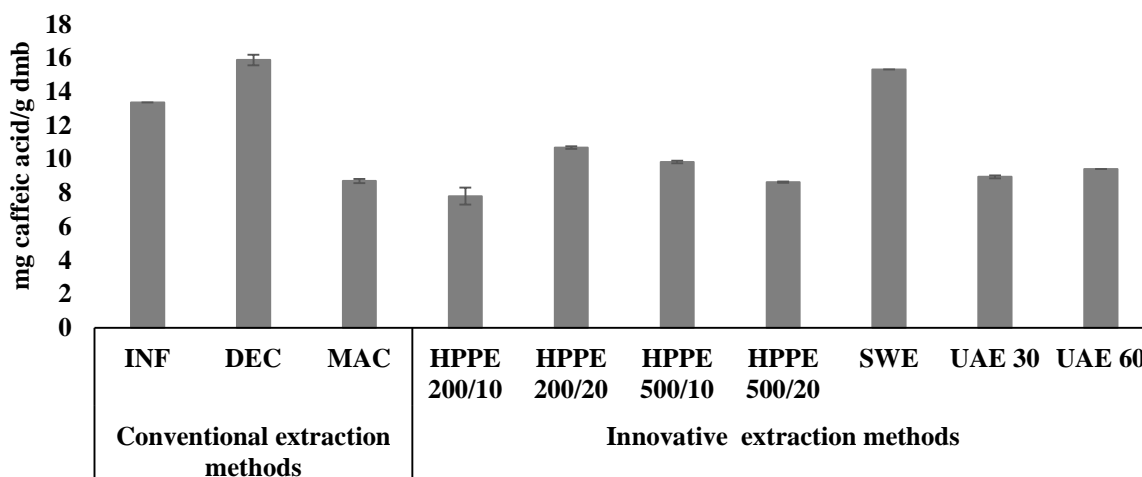


Figure 2. Content of hydroxycinnamic acid derivatives of differently prepared extracts of ground ivy

Conventional technique of extraction DEC resulted with the highest TPC (37.39 mg GAE/g dmb) and hydroxycinnamic acid derivatives content (15.9 mg caffeic acid/g dmb). Among the applied innovative techniques of extraction, HPPE 200/20 was the most successful in the extraction of total phenolics (26.20 mg GAE/g dmb), while SWE in the extraction of hydroxycinnamic acid derivatives (15.34 mg caffeic acid/g dmb).

Content of individual phenolic acids

Content of individual phenolic acids (rosmarinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid) is shown in Table 1.

Table 1. Content ($\mu\text{g/g}$ dmb) of individual phenolic acids of differently prepared extracts of ground ivy

SAMPLE	Rosmarinic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid	<i>p</i> -coumaric acid
INF	1200.9	189.8	411.7	/
DEC	2001.0	198.6	512.1	/
MAC	20.1	15.8	27.4	46.9
SWE	144.6	299.5	183.5	46.5
U30	483.7	374.0	59.3	103.6
U60	499.5	393.7	58.8	97.6
HPPE 200/10	687.7	404.9	79.4	112.1
HPPE 200/20	652.9	479.8	99.3	106.3
HPPE 400/10	507.1	377.8	62.4	86.8
HPPE 400/20	506.8	381.7	57.4	77.5

The highest content of rosmarinic (2001.0 $\mu\text{g/g}$ dmb) and chlorogenic (512.1 $\mu\text{g/g}$ dmb) acid was determined in DEC extract, characterized also with the highest TPC and hydroxycinnamic acids derivatives content. However, it is interesting to point out that *p*-coumaric acid was not identified in the DEC extract, either in INF. HHPE yielded extracts the richest in *p*-coumaric acid (200 MPa, 10 min) and caffeic acid (200 MPa, 20 min).

High content of rosmarinic acid is characteristic for species within *Lamiaceae* family and the obtained results are in accordance with previous studies (Belščak-Cvitanović et al., 2014). The content of rosmarinic, caffeic and chlorogenic acids in different parts of ground ivy was investigated by Döring and Petersen (2014). They reported the highest content of rosmarinic acid in flowers (12.53 %), then in roots (1.31 %), while significantly lower contents were quantified in leaves and stems - 0.88 and 0.64 %, respectively. Further, the results of the present study are in accordance with the study by Chou et al. (2019) who also reported the presence of chlorogenic, caffeic and ferulic acids in water extract of ground ivy, with rosmarinic acid as predominant (1397.90 mg/100 g). The same authors also reported the presence of other phenolic compounds in ground ivy water extract, such as daidzin, rutin, genistin and genistein.

Antioxidant capacity

Antioxidant capacity of obtained extracts, determined by ABTS and DPPH assays, are presented on Fig. 3.

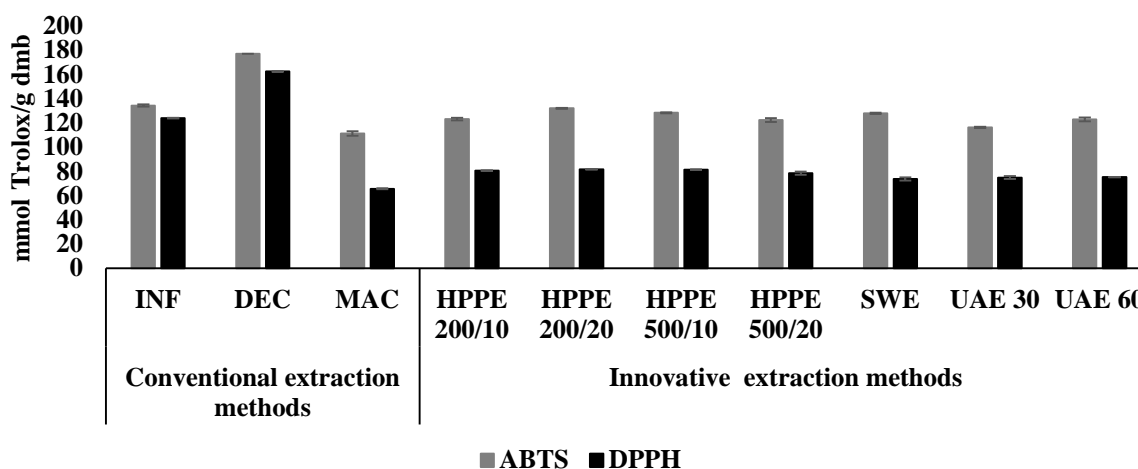


Figure 3. Antioxidant capacity of differently prepared extracts of ground ivy determined by ABTS and DPPH assays

Conventional technique of extraction DEC resulted in the extract with the highest antioxidant capacity (162.53 and 177.24 mmol Trolox/g dmb). High correlations between TPC and antioxidant capacity were observed, as well as with the content of hydroxycinnamic acids derivatives and individual phenolic acids. Among conventional extraction techniques it is evident that temperature was the main parameter to impact the extraction efficiency and antioxidant capacity. Higher extraction temperatures were in favour of higher contents of hydroxycinnamic acids in the extracts and their resulting antioxidant capacity.

Conclusions

Conventional extraction techniques, especially decoction, yielded extracts richer in total phenolic and hydroxycinnamic acid derivatives content, as well as in rosmarinic and chlorogenic acid, while high hydrostatic pressure was the most sufficient in the extraction of caffeic and *p*-coumaric acid.

Ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) proved to be a valuable source of natural bioactive compounds, especially phenolic acids.

Acknowledgement

This study was conducted in the framework of research project "*Formulating encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plants: mountain germander and ground ivy for the development of innovative functional food products.*", (IP-2019-045879) funded by the Croatian Science Foundation.

References

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M.M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013): Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* 117, 426–436.
- Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Bušić A., Franekić J., Komes D. (2014): Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (Hep2) cells, *J. Med. Food* 17, 206-217.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- Döring A. S., Petersen M. (2014): Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*, *Phytochem. Lett.* 718, 1-7.
- Chou, S. T., Lin, T. H., Peng, H. Y., Chao, W. W. (2019): Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities, *Life Sci.* 231, 116519.
- Huang, H. W., Hsu, C. P., Yang, B. B., Wang, C. Y. (2013): Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology, *Trends Food Sci. Techn.* 33, 54–62.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Jokić, S., Aladić, K., Šubarić, D. (2018): Subcritical water extraction laboratory plant design and application, *Annu. Croat. Acad. Eng.* 21, 247–258.
- Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D. (2002): Biological activity of *Glechoma hederacea*, *Fitoterapia* 73, 721-723.
- Matkowski A., Tasarz P., Szypuła E. (2008): Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily Lamioideae, *J. Med. Plants* 2, 321 - 330.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2012): Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.
- Petrovska, B. B. (2012): Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacogn. Rev.* 6, 1-5.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., Calinescu, I. (2017): Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plants materials, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 97, 159–178.
- WHO (2019): WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. URL: <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf?ua=1> (Accessed on 10 October 2020).
- Zakaria, S. M., Kamal, S. M. (2016): Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients, *Food Eng. Rev.* 8, 23–34.

Development and characterization of dopamine-loaded liposomes extracted from banana peel

Danijela Šeremet¹, Ana Mandura¹, Aleksandra Vojvodić Cebin¹, Stela Jokić²,
Draženka Komes^{1*}

¹*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University in Zagreb,
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

**Corresponding author: dkomes@pbf.hr*

Summary

Banana (*Musaceae*) is the second most consumed fruit in the world, after tomato. Approximately 30 % of banana fruit is comprised of peel, resulting in a substantial amount of waste from banana processing. The peel is abundant in bioactive compounds, especially in dopamine. The aim of this study was to develop liposomes containing dopamine extracted from banana peel. Aqueous extract (80 °C, 30 min) of freeze-dried banana peel was characterized spectrophotometrically for total phenolic content (25.50 mg GAE/g dmb) and antioxidant capacity using DPPH and ABTS assays (0.156 and 0.160 mmol Trolox/g dmb), while dopamine content (9.94 mg/g dmb) was determined by HPLC-DAD. Formulated liposomes were characterized by encapsulation efficiency, as well as by size and surface charge evaluated by light scattering and zeta potential, respectively. Antioxidant capacity of encapsulated extract was investigated in terms of inhibitory action on liposome peroxidation using TBARS assays. The encapsulation efficiency of dopamine into liposomes was 41.12 % and measured values of size, polydispersity index and zeta potential indicate relative homogeneity and uniformity of the formulated liposomes.

Keywords: agro-industrial waste, banana peel, dopamine, liposomes

Introduction

The bioactive content of agro-industrial waste, especially the presence of polyphenolic compounds, is gaining attention in the food industry. The outer layers of plant fruits used in human nutrition, like husks, peels and shells, usually discarded as waste, contain a higher content of polyphenolic compounds than the inner edible parts (Manach et al., 2004). Banana, tropical fruit from *Musaceae* family, is the second most consumed fruit in the world, after tomato. Banana production is growing every year. In 2018 it was estimated to 115 million tons, with India as the biggest producer (FAO, 2019). Since 30 % of banana fruit is comprised of peel, it is obvious that a lot of peel waste is generated annually on a global scale in an industrial banana processing and in households. Similar as with other secondary plant materials, banana peel has been recognized as a valuable source of various bioactive compounds. Banana peel contains a high content of dopamine, a strong water-soluble antioxidant from the group of catecholamines (Kanazawa and Sakakibara, 2000).

Polyphenols are bioactive compounds with positive effects on human health and are of great interest to many scientists, nutritionists, food engineers, etc. However, the retention of their biological activity is closely related to their stability upon in extraction and further formulation conditions (Fangand Bhandari, 2010). In addition, polyphenols can negatively affect the sensory perception of a food product, especially its taste. Encapsulation technology is one mechanism to overcome these problems. Encapsulation can be defined as a process to entrap one substance within another substance, thereby producing particles with diameters of a few nanometres to a few millimetres (Đorđević et al., 2015). Many encapsulation techniques have been developed and many of them are already implemented on an industrial scale. Liposomes are a form of encapsulated systems in which spherical-shell capsules consist of one or more phospholipid layers enclosing a liquid core. Due to the amphipathic character, they can be used for encapsulation both hydrophobic and hydrophilic compounds (Emami et al., 2016). Liposomes have been initially developed for pharmaceutical applications, such as for the delivery of vaccines, enzymes, hormones and vitamins into the body (Gibbs et al., 1999) and recently they started to gaining attention in the field of food technology.

The aim of this study was to develop liposomes loaded with banana peel extract rich in dopamine and other water-soluble polyphenols. Different combinations of blanching and drying were explored in order to preserve the polyphenolic compounds at a maximum scale. Obtained extracts were characterised with the determination of total phenolic content, antioxidant capacity and dopamine content. Extract with the best bioactive properties was encapsulated into liposomes. The encapsulation efficiency and physico-chemical parameters (size, zeta potential and polydispersity index) of formulated liposomes were determined. Additionally, the antioxidant capacity of the encapsulated extract was investigated in terms of its inhibitory action on liposome peroxidation.

Materials and Methods

Materials

Banana (var. Cavendish, produced by Costanza Organic Bananas, Ecuador) was purchased at a local store. Folin–Ciocalteu's reagent was supplied from Kemika (Zagreb, Croatia). Dopamine hydrochloride, (S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,20-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), gallic acid, 2-thiobarbituric acid, perchloric acid and trichloroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Methanol was supplied from Panreac (Barcelona, Spain) while ethanol (96 %) and acetonitrile from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Chloroform was supplied from Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Croatia). Phospholipon 90G (P90G) was supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). All chemicals used for experimental procedures were of analytical or HPLC grade.

Methods

Preparation of banana peel samples

The maturity stage of bananas was determined following the standard colour chart of Tapre and Jain (2012), by which they exhibited a value of 6 (full yellow).

Different preparation techniques of banana peel were explored, drying in the oven (D) (Instrumentaria ST-06, Zagreb, Croatia) and freeze-drying (Christ, Alpha 1-2 LD plus, Germany) (F) with (B) or without (NB) previous blanching in water (100 °C, 7 min) to inactivate endogenous enzymes. Dried banana peels were pulverized in a domestic coffee mill to obtain a representative sample. Water extracts were prepared by mixing powdered banana peel with water in ratio 1:20 (w/v), followed by heating to 80 °C for 30 min and the separation of the extract by centrifugation (Thermo Scientific SL8R, Fisher Scientific, Göteborg, Sweden). The extracts were prepared in duplicate. The extract selected to prepare liposomes was further concentrated in a vacuum evaporator (IKA RV8, Staufen, Germany) and freeze-dried (Christ, Alpha 1-2 LD plus, Germany). The obtained extracts were characterized spectrophotometrically by the determination of total phenolic content, antioxidant capacity by DPPH and ABTS assays and dopamine content by HPLC-DAD, as described in the following sections.

Determination of total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity

TPC was determined spectrophotometrically (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the method of Singleton and Rossi (1965). The calibration curve was constructed on gallic acid standard and the results were expressed as gallic acid equivalents on dry matter basis (mg GAE/g dmb). Antioxidant capacity was determined using DPPH and ABTS radical cation decolourization assays by Brand-Williams et al. (1965) and Re et al. (1999), respectively. Trolox was used for the external standard calibration curve, and the results were expressed as Trolox equivalent per dry matter basis of the sample (mg Trolox/g dmb). All measurements were performed in triplicate.

HPLC-PAD determination of dopamine

HPLC analysis was performed on Agilent Series 1200 chromatographic system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a Photodiode Array Detector (PAD, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and Zorbax Extend C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm i.d.) chromatographic column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The elution was performed in a gradient with three-component mobile phase consisting of (A) 100 % acetonitrile, (B) 2 % (v/v) formic acid solution in methanol and (C) 2 % (v/v) formic acid solution in water, as follows: 0 min – 0 % A, 3 % B, 97 % C; 5 min – 0 % A, 3 % B, 97 % C; 10 min – 0 % A, 5 % B, 95 % C; 30 min – 30 % A, 30 % B, 40 % C; 35 min – 30 % A, 30 % B, 40 % C; 45 min – 0 % A, 3 % B, 97 % C; 60 min – 0 % A, 3 % B, 97 % C. The flow was 1 mL/min, the injection volume 20 µL and the column temperature 25 °C. The chromatograms were recorded at 280 nm. Dopamine identification was performed by comparing the retention time of pure external standard and its characteristic absorption spectrum (190–400 nm). Quantification was enabled by establishing calibration curve for dopamine (20–100 µg/mL). All samples were filtered through a 0.45 µm syringe filter (Nylon Membranes, Supelco, Bellefonte, PA, USA) prior to the analysis.

Encapsulation of banana peel powdered extract into liposomes

Liposomes were prepared following the proliposome method as described by Perrett et al. (1991). Briefly, 1 g of P90G was dissolved in 1.25 mL of ethanol (96 %) and heated to 60 °C for 2 min in water bath with constant stirring. Freeze-dried banana peel extract was dissolved in 2 mL water in different concentrations: 25 mg/mL, 50 mg/ml and 100 mg/mL, and each mixed with the prepared P90G. The mixture was again heated at 60 °C for 2 min and left to cool down to room temperature. Finally, 48 mL of distilled water was added drop-wise (Perfusor Compact Plus, B. Braun, Germany) through a metal needle (G 23) into P90G-extract mixture while stirring to allow the formation of liposomes (L20, L10 and L5 liposome samples for the concentrations of the extract 25, 50 and 100 mg/mL, respectively).

Physico-chemical characterisation of liposomes

Size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of liposomes were measured using Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, UK).

Determination of encapsulation efficiency

The suspensions of liposomes were centrifuged (6000 rpm, 1 h) and the supernatants separated, while the liposomes concentrated in the residue were washed once with water, centrifuged (6000 rpm, 30 min, supernatant discarded) and then suspended in 1 mL of distilled water and dissolved in chloroform-methanol (1:1, v/v) mixture. The mixture was vortexed for 1 min and left until the phases separated. The upper water-methanol phase was collected and subjected to analyses. In order to measure the encapsulation efficiency, determination of TPC, antioxidant capacity and dopamine content, as described in previous chapters, were performed both in collected supernatants and water-methanol phases.

Thiobarbituric acid reacting substances assay (TBARS)

The peroxidation of the liposomes was determined spectrophotometrically (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, US) using the TBARS assay. Plain liposomes and liposomes with encapsulated powdered extract were placed into UV-pulsed device with radiant energy per pulse 1.27 J/cm² (Polytec, Germany). Small aliquots of samples were taken after 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110 and 130 UV pulses for the TBARS assay. Briefly, 0.2 mL of liposome sample was mixed with 3 mL of 20 % (w/v) trichloroacetic acid and 1 mL of solution containing 2 % (w/v) thiobarbituric acid and 20 % (v/v) perchloric acid in ratio (1:1, v/v). The mixture was well mixed and placed into water bath (100 °C) for 25 min. The reaction was stopped by placing the tubes into cold water for 5 min. To remove the resulting precipitate, the tubes were centrifuged (9500 rpm, 10 min). The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm.

Results and Discussion

Preparation of banana peel samples

In order to efficiently preserve polyphenolic compounds in banana peel, otherwise susceptible to enzymatic degradation by endogenous polyphenol oxidase, banana peel was prepared in 4 different ways by combining oven- and freeze-drying with or without blanching. The results of the TPC, antioxidant capacity and dopamine content in water extracts of differently prepared banana peels are shown in Table 1.

Table 1. Bioactive evaluation parameters of water extracts of differently prepared banana peel extracts

Sample	TPC (mg GAE/g dmb*)	Antioxidant capacity		Dopamine (mg/g dmb)
		DPPH (mmol Trolox/g dmb)	ABTS (mmol Trolox/g dmb)	
B&F banana peel	25.59 ± 0.38	0.156 ± 0.000	0.160 ± 0.000	9.94 ± 0.08
NB&F banana peel	15.55 ± 0.19	0.116 ± 0.010	0.110 ± 0.000	7.05 ± 0.15
B&D banana peel	17.73 ± 0.88	0.113 ± 0.010	0.134 ± 0.000	8.87 ± 0.09
NB&D banana peel	3.44 ± 0.04	0.025 ± 0.010	0.018 ± 0.000	0.23 ± 0.04

*B&L= blanching and freeze-dried; NB&L=non-blanching and freeze dried; B&D= blanching and oven-dried; NB&D=non-blanching and oven-dried; *dmb = dry matter basis of the sample*

The highest TPC (25.59 mg GAE/g dmb), antioxidant capacity (DPPH: 0.156 mmol Trolox/g dmb; ABTS: 0.160 mmol Trolox/g dmb) and dopamine content (9.94 mg/g dmb) were determined for banana peel prepared by combining blanching and freeze-drying, while the lowest values of the measured bioactive evaluation parameters were determined for oven-dried banana peel without previous blanching (TPC: 3.44 mg GAE/g dmb; DPPH: 0.025 mmol Trolox/g dmb; ABTS: 0.018 mmol Trolox/g dmb; 0.23 mg dopamine/g dmb). The results indicate that the blanching process (100 °C; 7 min) was sufficient to inactivate the enzyme polyphenol oxidase, while freeze-drying proved to be a better option than oven-drying. Similar results were obtained by Hsu et al. (2003) who reported that freeze-drying preserved more antioxidant capacity of the yam flours than hot air-drying and drum-drying. Blanching and freeze-dried banana peels were used further in the experimental work.

Physico-chemical characterization of liposomes

Size, zeta potential and PDI of formulated liposomes, prepared by varying the concentration of banana peel extract, are presented in Table 2. The size of plain liposomes was 316.1 nm, while the size of dopamine-loaded liposomes ranged between 317.6 nm (liposomes L5) to 350.8 nm (liposomes L20). Lin et al. (2018) stated that when the zeta potential is <-30 mV or >30 mV, as in the case of plain liposomes, then it can provide sufficient repulsive force to maintain a stable system. However, from the presented results, it is obvious that the addition of the banana peel extract into liposomes negatively affected their stability. Regarding the particle size distribution and system homogeneity, presented as PDI values, all formulated

liposomes were found to be monodisperse and homogenous since PDI values were below 0.5 (Balanč et al., 2016).

Table 2. Physico-chemical properties of liposomes

Sample	Size (nm)	Zeta potential (mV)	PDI
Plain liposomes	316.1 ± 6.4	-31.2 ± 0.5	0.369 ± 0.043
Liposomes L5	317.6 ± 5.8	-29.4 ± 0.5	0.338 ± 0.007
Liposomes L10	319.1 ± 1.7	-27.3 ± 1.6	0.333 ± 0.045
Liposomes L20	350.8 ± 7.2	-22.3 ± 1.7	0.303 ± 0.010

L20-liposomes prepared with 1 g of P90G and 50 mg of extract; L10-liposomes prepared with 1 g of P90G and 100 mg of extract; L5-liposomes prepared with 1 g of P90G and 200 mg of extract

Encapsulation efficiency (EE) of bioactive parameters of formulated liposomes

EE in terms of TPC, antioxidant capacity determined by DPPH and ABTS assays and dopamine content is presented in Table 3.

Table 3. Encapsulation efficiency evaluated by total phenolic content (TPC), antioxidant capacity (DPPH and ABTS) and dopamine content

Sample	Encapsulation efficiency (%)			Dopamine
	TPC	Antioxidant capacity DPPH	ABTS	
Liposomes L5	33.71	36.54	35.24	35.10
Liposomes L10	45.93	36.19	33.58	38.42
Liposomes L20	35.39	37.23	33.67	41.12

L20-liposomes prepared with 1 g of P90G and 50 mg of extract; L10-liposomes prepared with 1 g of P90G and 100 mg of extract; L5-liposomes prepared with 1 g of P90G and 200 mg of extract

It is evident that liposomes L20, prepared with the lowest ratio of P90G to extract dry matter, resulted in the highest EE with respect to dopamine content (41.12 %) and antioxidant capacity determined by DPPH assay (37.23 %), while liposomes L10 were characterised with the highest EE with respect to TPC (45.93 %). In the available literature, liposomes proved to be highly efficient in the encapsulation of different bioactive compounds, such as curcumin (Li et al., 2017) and resveratrol (Feng et al., 2019). Relatively low EE for dopamine can be attributed to the extremely hydrophilic character of dopamine. Further research on the development of dopamine-loaded liposomes is required.

Thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) assay

TBARS assay was used for the determination of lipid peroxidation induced by UV light exposure. The principle of the assay is the reaction between thiobarbituric acid and malondialdehyde, a carbonyl product of lipid hydroperoxide decomposition (Janero, 1990), that results in pink-coloured reaction mixtures. The results of TBARS assay are presented in Fig. 1.

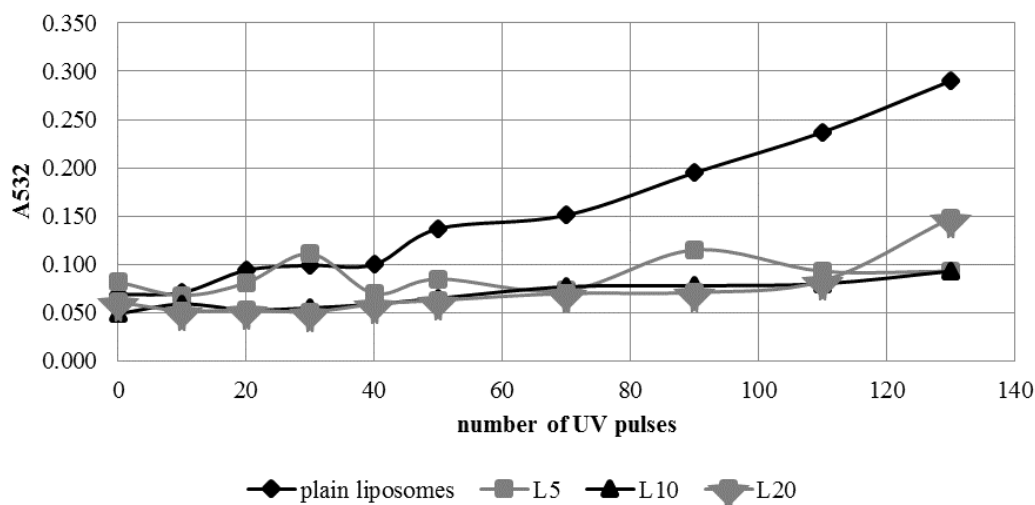


Figure 1. Results of the TBARS assays for plain and dopamine-loaded liposomes (*L20-liposomes prepared with 1 g of P90G and 50 mg of extract; L10 liposomes prepared with 1 g of P90G and 100 mg of extract; L5-liposomes prepared with 1 g of P90G and 200 mg of extract*)

It is obvious that plain liposomes showed much higher absorbance at the same amount of UV radiation than the loaded liposomes. The results indicate on the protective effect of encapsulated extracts on the overall peroxidation stability of liposomes, coming presumably from polyphenols and dopamine which both exert antioxidant activity (Scalbert et al., 2005; Kanazawa and Sakakibara, 2000). Plain liposomes were probably more susceptible to peroxidation reactions because they did not contain encapsulated polyphenols. Encapsulated banana peel extracts were efficient in preventing lipid peroxidation in all evaluated extract concentrations and for all examined UV exposure density.

Conclusions

Combination of blanching and freeze-drying enabled sufficient inactivation of endogenous polyphenol oxidase which resulted in the highest content of banana peel's bioactive compounds preserved. Banana peel presents a valuable source of dopamine (9.94 mg/g dmb). Liposomes prepared with the lowest ratio of banana peel extract to P90G were characterised with the highest encapsulation efficiency in terms of dopamine content (41.12 %) and the smallest PDI value (0.303), indicating a high homogeneity of the prepared liposome suspension. Liposomes prepared with the highest ratio of banana peel extract to P90G were the smallest in size (317.6 nm) and most stable according to determined zeta potential (-29.4 mV). Banana peel extract in the prepared liposomes inhibited malondialdehyde formation and thus showed lipid peroxidation-protecting efficiency acting as a high-level scavenger of radicals.

Acknowledgement

This study was conducted in the framework of research project “Sustainable production of biochemicals from waste lignocellulose containing feedstock” (OPB-SLS, 9717), funded by the Croatian Science Foundation.

References

- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., Bugarski, B. (2016): Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes, *Food Hydrocollid.* 61, 832–842.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D. (2015): Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds, *Food Eng. Rev.* 7, 452-490.
- Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S.H., Valizadeh, H., Hesari, J. (2016): Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector, *J. Exp. Sci.* 11, 737-759.
- Fang Z., Bhandari B. (2010): Encapsulation of polyphenols – a review, *Trends Food Sci. Tech.* 21, 510–523.
- FAO (2019): Banana facts and figures. URL: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.X1oTdlUzbiIU> (Accessed 10 August 2020).
- Feng, S., Sun, Y., Wang, P., Sun, P., Ritzoulis, C., Shao, P. (2019): Co-encapsulation of resveratrol and epigallocatechin gallate in low methoxyl pectin-coated liposomes with great stability in orange juice, *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 1872-1880.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. (1999): Encapsulation in the food industry: a review, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 213-224.
- Hsu, C. L., Chen, W., Weng, Y. M., Tseng, C. Y. (2003): Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods, *Food Chem.* 83, 85-92.
- Janero, D.R. (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity, *Free Radical Bio. Med.* 9, 515-540.
- Kanazawa, K., Sakakibara, H. (2000): High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana, *J. Agric. Food Chem.* 48, 844–848.
- Li, R., Deng, L., Cai, Z., Zhang, S., Wang, K., Li, L., Ding, S., Zhou, C. (2017): Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin, *Mater. Sci. Eng. C* 80, 156-164.
- Lin, L., Zhu, Y., Thangaraj, B., Abdel-Samie, M. A. S., Cui, H. (2018): Improving the stability of thyme essential oil solid liposome by using β -cyclodextrin as a cryoprotectant, *Carbohydr. Polym.* 188, 243–251.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.
- Perrett, S., Golding, M., Williams, P. (1991): A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 154-161.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. (2005): Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215S-217S.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Tapre, A. R., Jain, R. K. (2012): Study of Advanced Maturity Stages of Banana, *Int. J. Adv. Eng. Res. Stud.* 1, 272–274.

Fermentation process optimisation and characterisation of pear fruit wine

Darko Velić^{1*}, Valentina Bušić¹, Bruno Husnjak¹, Natalija Velić¹,
 Daniela Amidžić Klarić², Vlatka Petravić Tominac³, Ilija Klarić⁴

¹*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,
 Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

²*University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
 Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia*

³*University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology,
 Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

⁴*Department of Health, Subdivision of Public Health,
 R. Dž. Čauševića 1, 76 100 Brčko DC, Bosnia and Herzegovina*

*Corresponding author: dvelic@ptfos.hr

Summary

This study aimed to investigate the influence of two commercially available oenological yeasts (Uvaferm BDX and Cross Evolution) on fermentation kinetics, physicochemical properties, and total polyphenols content of organic pear juice with and without the addition of industrial pectolytic enzyme (Lallzym OE) and their respective wines. The alcoholic fermentation (AF) kinetics was monitored on a laboratory-scale (microfermentations), while the controlled fermentation (CF), as well as induced malolactic fermentation (MLF) of pear wine, was carried out on a pilot-scale custom made fermentation system. The pure culture of lactic acid bacteria (LAB) *Oenococcus oeni* was used for pear wine fermentation with the establishment of temperature optimum for selected LAB type. The results of the study showed that selected yeasts Uvaferm BDX and Cross Evolution could successfully ferment pear juice. The higher specific fermentation rate was achieved using Uvaferm BDX. In samples produced with the addition of the pectolytic enzyme Lallzym OE, a higher specific fermentation rate, as well as a higher total polyphenols content, were observed compared to other pear wine samples. The stimulated MLF led to decreased malic acid concentration, which usually leads to harmonisation of taste.

Keywords: fruit wine, pear wine, controlled fermentation, malolactic fermentation, total polyphenols

Introduction

Wines made from fruits other than grapes have recently been gaining wider acceptance at the market (Rivard, 2009), which may be connected to the enhanced consumers' interest in foods that are rich in bioactive compounds, *i.e.* have a beneficial effect on human health (Velić et al., 2018a). European regulations define fruit wines as beverages obtained by the fermentation of the juices of fruits other than grapes and with the permitted alcoholic strength between 1.2 % and 14 % by volume (Kosseva et al., 2017). Fruit varieties of different shape, colour, nutritive value have proven to be good raw materials for quality fruit wines production (Jagtap and Bapat, 2015; Velić et al., 2018b), *e.g.* apples, pears, berries, cherries, wild

apricots, plums, peaches, strawberries, currants, bananas, pineapples, kiwifruit, cashew nuts, pomegranates, oranges, lemons, tangerines, dates, and figs (Joshi et al., 2017). Various fruit wines have proved to be a good dietary source of phytonutrients (e.g. phenolic compounds), antioxidants and minerals (Rupasinghe et al. 2017). Pear wine is a fruit wine obtained by the alcoholic fermentation of juice or mash from fresh and technological suitable pears. In order to produce fruit wine of satisfactory quality, varieties containing more tannins such as Bartlett pear are used (Kosseva et al., 2017). Since alcoholic pear beverages, other than perry and brandy, are not widely present, pear wine production is both adding a value to pears and providing consumers with more choices when it comes to fruit wines (Yang et al., 2020). In a technological manner, perry is a drink similar to cider, but instead of apples, pears are used as the raw material. The difference between perry and pear (fruit) wine is that perry contains CO₂, and no selected yeasts are added during perry production (Kosseva et al., 2017). Pear wine has lower acidity and lower polyphenol content compared to other fruit wines. Lower acidity can reduce the overall taste, while lower polyphenol content is desirable because of the lower bitterness (associated with polyphenols). On the other hand, if polyphenols content is too low, the specific fruit taste of wine is lost. Therefore, it is necessary to achieve an appropriate balance between these compounds, so pear wine is often mixed with cider. Compared to other fruit wines, a lower antioxidant effect of pear fruit wine was found due to the lower content of polyphenolic compounds (Velić et al., 2018a). One of the main problems associated with the production and processing of pear wine is browning because it can cause irreversible defects in the quality (Yang et al., 2020). The fruit variety mostly determines the aroma and flavour of different fruit wines. However, wine yeast and fermentation conditions can also define the wine aroma and flavour, as well as the overall wine quality. Yeast strains with desirable (fermentative and other) properties are of utmost importance for quality fruit wine production. Apart from yeast, lactic acid bacteria also play a very significant role in carrying out a secondary process, known as malolactic fermentation (conversion of L-malic acid to L-lactic acid) that takes place during or at the end of primary alcoholic fermentation. Lactic acid has a softer, more mellow flavour that can create a beverage with a more desirable flavour profile (Herrero et al., 2005). Until now, the evaluation of yeast strains for pear fruit wine production was not conducted in Croatia. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of two commercially available oenological yeasts (Uvaferm BDX and Cross Evolution) on the fermentation kinetics, physico-chemical properties, and the total polyphenols content of organic pear juice and the respective wines produced with and without the addition of industrial pectolytic enzyme (Lallzym OE).

Materials and Methods

Commercially available organic pear juice (variety: *Abata Fétel*) was obtained from an organic producer in eastern Slavonia region and used as a fermentation medium.

The pear juice was supplemented by 108 g/L of sucrose and sulphited by 35 mg/L of potassium metabisulphite (K₂S₂O₅). Before fermentation, the pear juice contained 200 g/L of total sugars, 4.4 g/L of malic acid, 0.51 g/L of lactic acid and the pH was 3.68.

Microfermentations experiment

The alcoholic fermentation (AF) kinetics was monitored on a laboratory-scale (microfermentations) using Erlenmeyer flasks (2 L). A volume of 1.75 L of prepared pear juice was transferred to each flask. Flasks were then inoculated with 0.53 g (30 g/hL) of commercial dry yeasts (4 flasks by Uvaferm BDX and 4 by Cross Evolution). To investigate the influence of the pectolytic enzymes addition to the quality of the final product, enzyme Lallzyme POE was added (1.5 g/hL) to 2 flasks inoculated with each yeast (in total 4 flasks). Flasks were closed with fermentation airlocks and left to ferment at average fermentation temperature of 21 °C. All fermentations were carried out in duplicate. Additional Erlenmeyer flask, containing water, served as a control to correct evaporation loss, which was included in mass balance. The fermentation progress was evaluated by the weight loss caused by CO₂ production, and flasks were weighed at 24 hour-intervals using a digital scale (572, Kern, Germany). Fermentation activity was monitored by measuring CO₂ evolution and CO₂ production rate during microfermentation of organic pear juice.

Controlled fermentation (CF) – malolactic fermentation (MLF)

The controlled fermentation (CF), as well as induced malolactic fermentation (MLF) of pear juice, was carried out on a pilot-scale custom-made fermentation system. Identically prepared pear juice with enzyme Lallzyme POE addition was subjected to controlled fermentation in a fermentation system consisting of three double-wall fermenters (15 L × 3 pcs; AISI 304), compressor and cooling/heating medium preparation tank. The vertical fermenters with the conical bottom are equipped with valves, sight gauge glass, and fermentation airlock. The control panel enables the individual temperature control and regulation of each fermenter. The volume of pear juice per fermenter (2 fermenters) was 11 L, and each fermenter was inoculated with different investigated yeast. Upon completion of the alcoholic fermentation at 18 °C, a pure culture of lactic acid bacteria (LAB) *Oenococcus oeni* (LALVIN VP 41 MBR) was inoculated in both fermenters, with the establishment of the optimal temperature for the selected type of LAB (at 22 °C). After malolactic fermentation (MLF), the young wine was removed from the lees and poured into bottles for further ageing and maturation.

Numerical calculation

CO₂ evolution was calculated according to equation 1:

$$m = m_1 - m_2 \quad (1)$$

where:

m = mass of CO₂ released [g];

m_1 = mass difference between two weighing of fermentation flasks [g];

m_2 = mass difference between two weighing of control flask (containing water) [g].

The CO₂ production rate was calculated according to equation 2:

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \cdot \Delta t} \quad (2)$$

where:

$d\text{CO}_2/dt$ = CO_2 production rate [g/L day];

Δm = mass of CO_2 released during time interval Δt [g];

Δt = time interval between two measuring [day];

V = volume of medium [L].

Analytical methods

Standard AOAC INTERNATIONAL and OIV (*Organisation Internationale de la vigne et du vin*) methods of analysis were used for pear wines analysis, namely total dry extract, ethanol, free SO_2 , total SO_2 , volatile acids, total acids, residual sugar, total sugar and pH. The total polyphenol concentration (TPC) of pear juice and pear wine were estimated by Folin-Ciocalteu colorimetric assay based on the procedure described by Waterhouse (2019). Reflectometric determination (RQflex plus 10) after enzymatic reaction with malate dehydrogenase was used for malic acid. Lactic acid (lactate) is oxidized by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) under the catalytic effect of lactate dehydrogenase to a pyruvate. In the presence of diaphorase, the NADH formed in the process reduces a tetrazolium salt to a blue formazan that is determined reflectometrically on the RQflex.

Results and Discussion

The monitoring of fermentation by released CO_2 is based on the fact that CO_2 is stoichiometrically related to both consumed sugar and produced ethanol (Bely et al., 1990). Fermentation profiles in this study were monitored by measuring CO_2 gravimetrically, as described in our previous study dealing with microfermentation on blackberry must (Petravić Tominac et al., 2013). Figs. 1 and 2 show the fermentation characteristics comparison of both yeast strains. It can be seen that the fermentation has started during the first day regardless of the used yeast or the addition of enzymes. However, yeast K1 started fermentation slightly faster than yeast K2 (Fig. 1). In samples produced with the addition of the pectolytic enzyme Lallzym OE, a higher specific fermentation rate was observed than pear wine samples without the enzyme addition. The maximum fermentation rate was achieved during the second day for yeast K1 and the third day for yeast K2. The tumultuous phase of fermentation ended around the 17th day from the beginning of fermentation (as observed from Fig. 1 and Fig. 2), while silent fermentation lasted for the next 12 days. The total mass of CO_2 released at the end of fermentation by yeast K1 was 95.81 g, whereas, with yeast K2, it was slightly lower and amounted to 95.42 g (Fig. 1). This is in accordance with the previous study of Petravić Tominac et al. (2013) that reported a similar trend in fermentation kinetics during microfermentation of blackberry must containing the same initial sugar level as well as a very similar total mass of CO_2 released at the end of fermentation by the yeasts investigated.

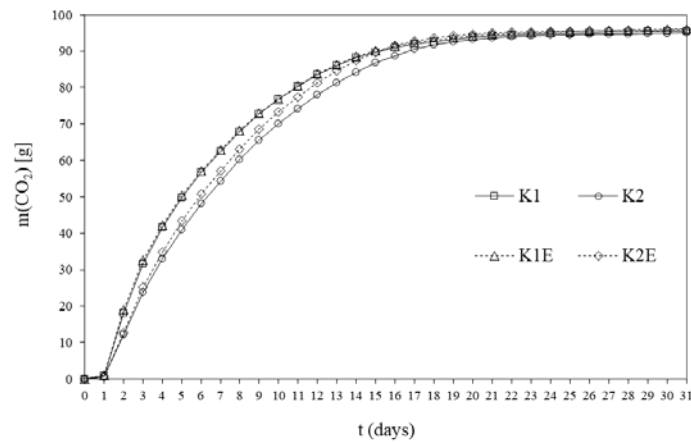


Figure 1. Fermentation activities of two commercial yeast strains during the production of pear wine at 21 °C (with and without the addition of industrial pectolytic enzyme); K1 - Uvaferm BDX, K2 - Cross Evolution, E - enzyme

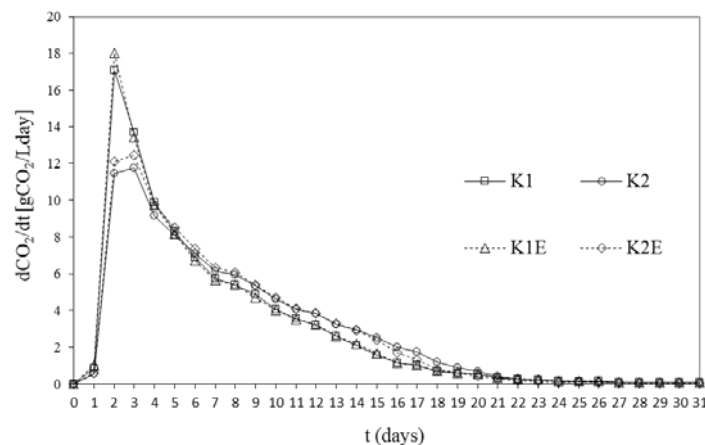


Figure 2. CO₂ production rate of two commercial yeast strains during the production of pear wine at 21 °C (with and without the addition of industrial pectolytic enzyme), K1 - Uvaferm BDX, K2 - Cross Evolution, E – enzyme

The total polyphenol concentration (TPC) determined by Folin-Ciocalteu method and expressed as mg/L gallic acid is presented in Table 1. It can be observed that a somewhat higher concentration of polyphenols is present in young pear wine obtained by yeast K1 (with and without enzyme) than by yeast K2 for the microfermentation experiments. The same trend can be observed in wine produced using the controlled fermentation system (CF). In samples produced with the addition of the pectolytic enzyme Lallzym OE a higher total polyphenols contents were observed compared to pear wine samples without the enzyme addition. The TPC is in accordance with the TPC of apple wine (451 mg GAE/L) and plum wine (555 mg GAE/L) reported by Rupasinghe and Clegg, (2007). However, TPC concentration is significantly lower than that of cherry wine (991 mg GAE/L) and almost four times lower than TPC of blueberry wines (676 mg GAE/L) reported by the same authors.

The higher polyphenol content of any fruit usually leads to oxidative browning which products strongly contribute to wine's final bouquet.

Table 1. The total polyphenol concentration (TPC) in samples expressed as mg/L gallic acid

Sample	TPC [mg _{GAE} /L]
Pear juice	514
Pear juice, sweetened	567
K1	551
K2	516
K1E	563
K2E	523
K1E - CF	563
K2E - CF	538

*K1 – wine yeast (Uvaferm BDX), K2 - wine yeast (Cross Evolution),
 E– enzyme, CF – controlled fermentation, TPC - total polyphenols
 concentration*

The results of the physico-chemical analysis of pear wine at the end of microfermentations are given in Table 2. The results indicate that the obtained pear wines meet the physico-chemical quality parameters prescribed by the Fruit Wine Ordinance (OG 73/06, 24/11, 120/12, 59/13).

Table 2. Analyses of pear wines at the end of microfermentation

Samples	K1	K2	K1E	K2E
Total dry extract (g/L)	78.4	78.4	77.6	77.5
Ethanol (vol %)	11.59	11.53	11.58	11.55
Free SO ₂ (mg/L)	6.4	20.48	7.04	8.96
Total SO ₂ (mg/L)	32.00	99.20	41.6	53.12
Volatile acids (g/L)	0.53	0.65	0.57	0.58
Total acids (g/L)	5.74	6.15	5.89	6.41
pH	3.69	3.68	3.67	3.67
Residual sugar (g/L)	51.77	51.20	53.18	53.10
Total sugar (g/L)	52.44	51.43	54.67	53.26

The concentrations of malic and lactic acid of pear wine samples during malolactic fermentation are shown in Table 3. The addition of a pure culture of lactic acid bacteria (LAB) *Oenococcus oeni* (LALVIN VP 41 MBR) in both samples resulted in a significant reduction in malic acid content. Most of the degraded malic acid was observed after the first week of MLF implementation (between 72 and 80 %). Sun et al. (2017) studied the implementation of MLF on cherry fruit wine and reported the reduction of malic acid content from 2.66 g/L to 0.44 g/L at initial pH of 3.55, which is in accordance with the data obtained in this study for pear fruit wine.

Table 3. The concentration of malic and lactic acid in the pear fruit wine samples (CF)

Samples	At the beginning of MLF		After one week of MLF		After one month of MLF	
	K ₁ E - CF	K ₂ E - CF	K ₁ E - CF	K ₂ E - CF	K ₁ E - CF	K ₂ E - CF
Malic acid (g/L)	4.35	4.45	1.205	0.88	0.715	0.68
Lactic acid (g/L)	0.85	0.97	2.65	2.75	3.24	2.98

K₁ – wine yeast (*Uvaferm BDX*), K₂ – wine yeast (*Cross Evolution*), E – enzyme, CF – controlled fermentation, MLF – malolactic fermentation

Conclusions

The results of the study showed that selected yeasts *Uvaferm BDX* and *Cross Evolution* could successfully ferment pear juice. The higher specific fermentation rate was achieved using *Uvaferm BDX*. In samples produced with the addition of the pectolytic enzyme *Lallzym OE*, a higher specific fermentation rate, as well as a higher total polyphenols content, were observed compared to pear wine samples without the enzyme addition. The stimulated MLF led to a decrease of malic acid concentration, which usually results in improved sensory properties of pear wine.

References

- Bely, M., Sablayroles, J., Barre, P. (1990): Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance, *Am. J. Enol. Viticult.* 40: 319–324.
- Fruit Wine Ordinance, Ministry of Agriculture, Republic of Croatia, OG 73/06, 24/11, 120/12, 59/13.
- Herrero, M., Noriega, E., García, L. A., Gennaro, M. (2005): Influence of a malolactic starter on the quality of the cider produced on an industrial scale, *Eur. Food Res. Technol.* 221 (1–2), 168–174.
- Jagtap, U. B., Bapat, V. A. (2015): Wines from fruits other than grapes: Current status and future prospectus, *Food Biosci.* 9, 80–96.
- Joshi, V. K., Sharma, S., Thakur, A. D. (2017): Wines: White, Red, Sparkling, Fortified, and Cider., In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Food Bever. Ind., Pandey et al. (ed.), Elsevier, pp. 353–406.
- Kosseva, M. R., Joshi, V. K., Panesar, P. S. (2017): *Science and technology of fruit wine production*, Elsevier Inc., Academic Press.
- Petravić-Tominac, V., Mesihović, A., Mujadžić, S., Lisičar, J., Oros, D., Velić, D., Velić, N., Srećec, S., Zechner-Krpan, V. (2013): Production of blackberry wine by microfermentation using commercial yeasts *Fermol Rouge*[®] and *Fermol Mediterranée*[®], *Agri. Conspec. Sci.* 78 (1), 49–55.
- Rivard, D. (2009): *The Ultimate Fruit Winemaker’s Guide*, 2nd ed., Bacchus Enterprises Ltd.
- Rupasinghe, HPV, Clegg, S. (2007): Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Comp. Anal.* 20 (2), 133–137.

- Sun, S. Y., Chen, Z. X., Jin, C. W. (2017): Influence of lactic acid bacteria starter and pH after alcoholic fermentation, and interaction between those factors, on the induction of malolactic fermentation, and on chemical and sensory properties of cherry wines, *LWT - Food Sci. Tech.* 89, 449–456.
- Rupasinghe, H. P. V, Joshi, V. K., Smith, A., Parmar, I. (2017): Chemistry of Fruit Wines. In: Science and Technology of Fruit Wine Production, Kosseva, M. R., Joshi, V. K., Panesar, P. S. (ed.), Elsevier Inc., Academic Press, pp. 105–176.
- Velić, D., Amidžić Klarić, D., Velić, N., Klarić, I., Petravić Tominac, V., Mornar, A. (2018a): Chemical Constituents of Fruit Wines as Descriptors of their Nutritional, Sensorial and Health-Related Properties. In: *Descriptive Food Science*, Díaz V., García-Gimeno, A., María, R. (ed.). London, GB: IntechOpen, pp. 59–91.
- Velić, D., Velić, N., Amidžić-Klarić, D., Klarić, I., Petravić Tominac, V., Košmerl, T., Vidrih R. (2018b): The production of fruit wines – a review, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 10 (2), 279–290.
- Waterhouse, A. (2019): Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, Department of Viticulture & Enology, University of California, Davis.
- Yang, H., Tian, T., Gu, H., Li, X., Cai, G., Sun, J., Wu, D., Lu, J. (2020): Analysis of factors related to browning of Dangshan pear (*Pyrus spp.*) wine. *Food Chem.* 5; 308: 125665.

Finalizacija vina Merlot i Cabernet Sauvignon pomoću enoloških drvenih pripravaka

Stanko Zrinščak*, Valentina Obradović, Josip Mesić, Ana Mrgan

Veleučilište u Požegi, Vukovarska 17, HR - 34 000 Požega

**Dopisni autor: szrinscak@vup.hr*

Sažetak

Poznato je da prilikom odležavanja vina u drvenim bačvama dolazi do ekstrakcije različitih kemijskih spojeva koji bitno doprinose kvaliteti vina, što su potvrdila dosadašnja istraživanja. Na kvalitetu vina prilikom odležavanja utječe i porijeklo drveta, jačina paljenja kao i vrijeme odležavanja. Pored klasičnih drvenih bačava, danas se koriste i različiti drveni pripravnici, popularno nazvani chips.

U ovom radu korišteno je osam vrsta različitih drvenih pripravaka u formi chipsa i blokova od američkog i francuskog hrasta. Uspoređena su vina s dodacima i vino bez dodataka, te je mjerena antioksidativna aktivnost vina DPPH metodom, udio antocijana i ukupnih polifenola, i provedena je deskriptivna analiza svih uzoraka. Kod vina Merlot pripravci od francuskog hrasta jakog paljenja su najbolje ocijenjeni, te su isti imali i najviše udjele polifenola i antocijana, kao i antioksidativnu aktivnost. U vinima Cabernet Sauvignon su najbolje ocijenjeni uzorci s dodacima Američkog bloka koji su imali i više vrijednosti za ukupne polifenole od ostalih uzoraka. Vina bez dodataka su znatno slabije ocijenjena.

Ključne riječi: vino, drveni dodaci, finalizacija

Uvod

Crna vina, a osobito najbolja po završetku fermentacije ponekad sve do punjenja u boce, na odležavanje idu u drvene bačve. Odležavanje u drvenim bačvama ima pozitivno djelovanje na razvoj vina u pogledu boje, bistrine, a osobito okusa vina, što usvojim radovima prezentira niz autora (Chiara, 2013; Eder, 1997). Odmah treba naglasiti, da takav postupak nije jednostavan i jeftin, te iziskuje puno prostora, vremena, i povećanja financijskih sredstava. Porijeklu i vrsti drveta posvećuje se posebna pažnja, tako da se danas u svijetu posebno ističu američki i francuski hrast iz posebnih regija, no isto tako nastoje i ostale zemlje stvoriti nacionalne brandove, poput Austrije i Hrvatske (Herjavec, 2007; Jeromel, 2017).

Odležavanjem vina u drvenim bačvama dolazi do ekstrakcije različitih kemijskih spojeva koji bitno doprinose kvaliteti vina. Na kvalitetu vina prilikom odležavanja pored podrijetla i vrste drveta utječe i jačina paljenja kao i vrijeme odležavanja (Ortega-Heras, 2007). Pored klasičnih drvenih bačava, zbog jednostavnosti postupka, a osobito niske cijene, danas se koriste i različiti komercijalni enološki drveni pripravci popularno nazvani čips (Robinson, 1995). U nekim zemljama su takvi pripravci zabranjeni, neki ih nazivaju „nužno zlo“, međutim prvenstveno zbog velike razlike u cijeni, njihova primjena biva sve veća.

Cilj rada je istražiti trenutnu situaciju s komercijalnim drvenim dodacim na tržištu i ispitati na vinima može li se utvrditi očekivani pozitivan doprinos na ispitivanih vina u tijeku odležavanja, koliki je on i koje su razlike u odnosu na vina odležavana u inox posudama.

Materijal i metode

Priprema uzoraka

U radu su korištena slijedeća vina: Cabernet Sauvignon, berba 2018., udio alkohola 14,3 % vol. i 5,18 g/L, te Merlot također berba 2018., udio alkohola 14,6 % vol. i reducirajući šećeri 4,2 g/L. U oba vina su dodani hrastovi dodaci prikazani u Tablici 1, te je također za usporedbu korišteno i vino bez dodataka.

Tablica 1. Hrastovi dodaci korišteni u istraživanju

Table 1. Oak supplements used in the study

Vrsta dodatka	Intenzitet paljenja	Doziranje
„Odyse“ Amer CHIPS MT	srednje paljenje	
„Odyse“ Amer BLOCK MT	srednje paljenje	
„Odyse“ French Chips HT	jako paljenje	
„Odyse“ French BLOCK HT	jako paljenje	
„Ambrosia“ Amer CHIPS sweet	srednje paljenje	2 g/L
„Ambrosia“ Amer BLOCK complex	srednje paljenje	
„Ambrosia“ French CHIPS sweet	jako paljenje	
„Ambrosia“ French BLOCK sweet	jako paljenje	

Određivanje ukupnih polifenola i antocijana

Ukupni polifenoli i antocijani u uzorcima određeni su na multiparametarskom analizatoru Wineflow tvrtke Gibertini kolorimetrijskim enzimatskim reakcijama prema službenoj metodi proizvođača.

Određivanje antioksidativne aktiv DPP (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)metodom

Za pripremu DPPH otopine potrebno je otopiti 4 mg DPPH u 100 mL etanola. U kivetu se odpipetira 2 mL DPPH otopine te se izmjeri početna apsorbancija otopine radikala (A_0). U kivetu se potom doda 50 μ L vina, smjesa se dobro promiješa i prati se promjena apsorbancija otopine tijekom pola sata pri valnoj duljini od 517 nm.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računati prema jednadžbi (1):

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

A_0 - apsorbancija otopine DPPH radikala kod vremena $t = 0$ min

A_t - apsorbancija reakcije smjese kod vremena $T = X$ min

Organoleptičko ocjenjivanje vina

Nakon tri mjeseca odležavanja, u vinima je pomoću deskriptivne analize ocijenjeno šest različitih tonova vina: hrast, kava, vanilija, čokolada, voće, i ukupni dojam, uspoređujući vina s dodacima sa vinima bez dodataka.

Rezultati i rasprava

U tablici 2. prikazana je vrijednost ukupnih polifenola i antocijana sa prosječnom ocjenom ukupnog dojma u vinu Merlot.

Tablica 2. Ukupni polifenoli i antocijani u vinu Merlot s ukupnim dojmom

Table 2. Total polyphenols and anthocyanins in Merlot wine with overall impression

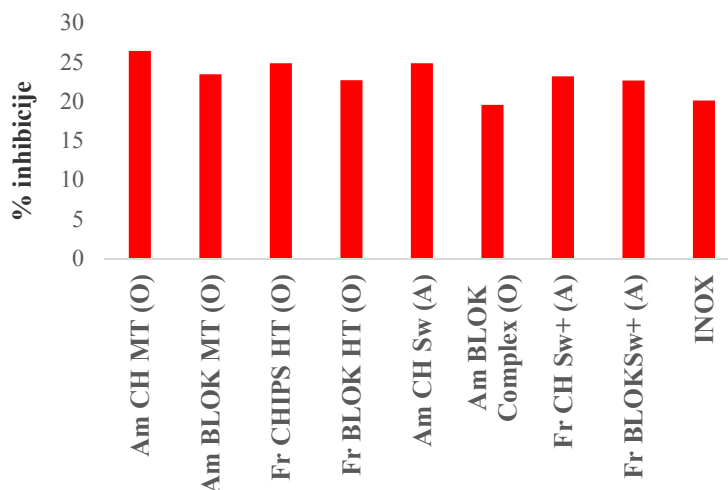
Naziv dodatka u vinu	Ukupni polifenoli (mg/L)	Ukupni antocijani (mg/L)	Ukupni dojam (prosječna ocjena)
Amer CHIPS MT (O)	2672	683,8	4
Amer BLOCK MT (O)	2660	707,0	4
French CHIPS HT (O)	2683	703,5	5
French BLOCK HT (O)	2684	702,2	4
Amer CHIPS Sweet (A)	2679	690,9	5
Amer BLOCK Complex (A)	2668	688,7	4
French CHIPS Sweet (A)	2663	697,6	3
French BLOCK Sweet (A)	2656	695,4	3
INOX	2633	675,5	2

Najviše ukupnih polifenola izmjereno je u uzorku vina Merlot sa dodatkom French oak Viniblock HT (*Odyse*), 2684 mg/L, a najviše ukupnih antocijana izmjereno je u uzorku sa dodatkom American oak Viniblock MT (*Odyse*), 707,0 mg/L. Najveću ocjenu za ukupni dojam dobili su uzorci sa dodacima French oak Chips HT (*Odyse*) i American oak Chips Sweet boose (*Ambrosia*), a to je ocjena 5. Najmanje ukupnih polifenola izmjereno je u uzorku vina bez dodataka, inox vinu, 2633 mg/L. Najmanje ukupnih antocijana izmjereno je također u uzorku vina bez dodataka, inox vinu, 675,5 mg/L. Vino iz inox posude, bez drvenih dodataka, za ukupni dojam, ocijenjeno je najmanjom prosječnom ocjenom 2. U Tablici 3. Prikazana je vrijednost ukupnih polifenola i antocijana sa prosječnom ocjenom ukupnog dojma u vinu Cabernet Sauvignon. Najviše ukupnih polifenola izmjereno je u uzorku vina Cabernet Sauvignon sa dodatkom American oak Viniblock Complex boose (*Ambrosia*, 2703 mg/L. Najviše ukupnih antocijana izmjereno je u uzorku sa dodatkom American oak Viniblock MT (*Odyse*), 418,9 mg/L. Najveću prosječnu ocjenu za ukupni dojam su dobili uzorci American oak Viniblock MT (*Odyse*), American oak Viniblock Complex boose (*Ambrosia*) i French oak Chips special sweet plus (*Ambrosia*), ocjenu 5. Najmanje ukupnih polifenola izmjereno je u uzorku vina bez dodataka, inox vinu, 2594 mg/L, a najmanje ukupnih antocijana izmjereno je također u inox vinu bez dodataka, 373,7 mg/L. Vino iz inox posude bez drvenih dodataka za ukupni dojam je ocijenjeno najmanjom ocjenom 2.

Tablica 3. Ukupni polifenoli i antocijani u vinu Cabernet-sauvignon s ukupnim dojmom
Table 3. Total polyphenols and anthocyanins in Cabernet-sauvignon wine with overall impression

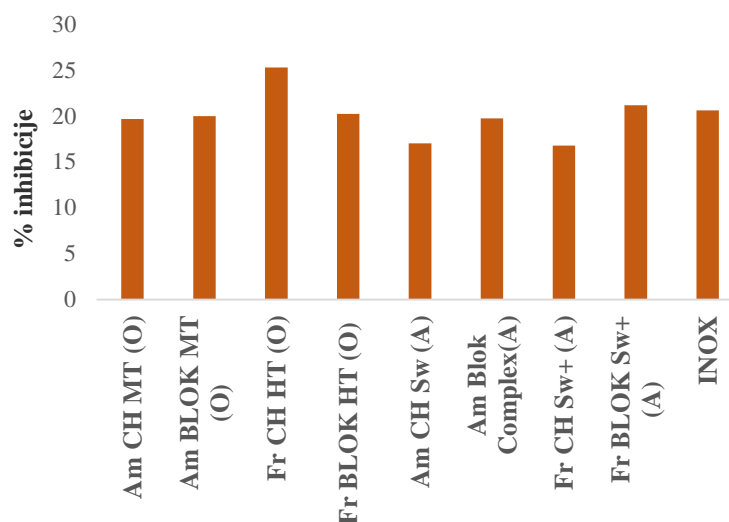
Naziv dodatka u vinu	Ukupni polifenoli (mg/L)	Ukupni antocijani (mg/L)	Ukupni dojam (prosječna ocjena)
Amer CHIPS MT (O)	2624	407,0	4
Amer BLOCK MT (O)	2638	418,9	5
French CHIPS HT (O)	2615	399,7	4
French BLOCK HT (O)	2608	408,4	4,5
Amer CHIPS Sweet (A)	2619	407,9	4
Amer BLOCK Complex (A)	2703	399,3	5
French CHIPS Sweet (A)	2610	406,5	3,5
French BLOCK Sweet (A)	2601	405,0	5
INOX	2594	373,7	2

Slika 1 prikazuje postotke inhibicije za uzorke vina Merlot. Najveću vrijednost ima uzorak Amer Chips MT (*Odyse*), iznosi 26,43 %. Najmanju vrijednost ima uzorak Amer Chips Sweet boose (*Ambrosia*), iznosi 19,57 %.



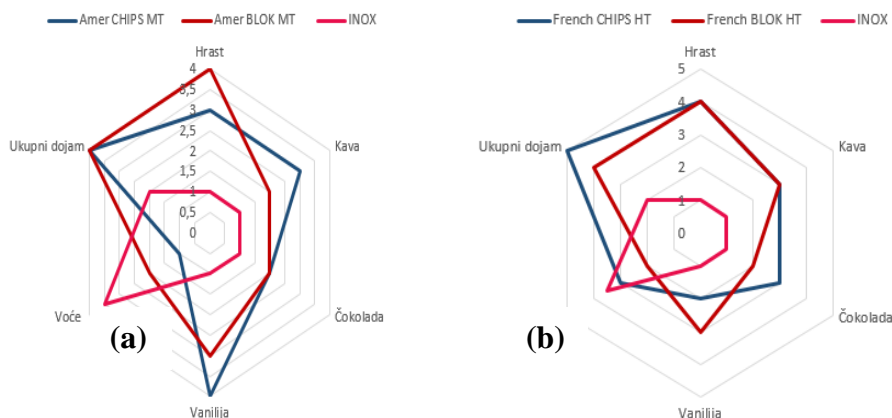
Slika 1. Postotak inhibicije DPPH radikala u uzorcima vina Merlot
Figure 1. Percentage of DPPH radical inhibition in Merlot wine samples

Slika 2 prikazuje postotak inhibicije za uzorke vina Cabernet Sauvignon. Najveću vrijednost ima uzorak French Block MT (*Odyse*), iznosi 25,30 %. Najmanju vrijednost ima uzorak French Chips sweet plus (*Ambrosia*), iznosi 16,81 %.



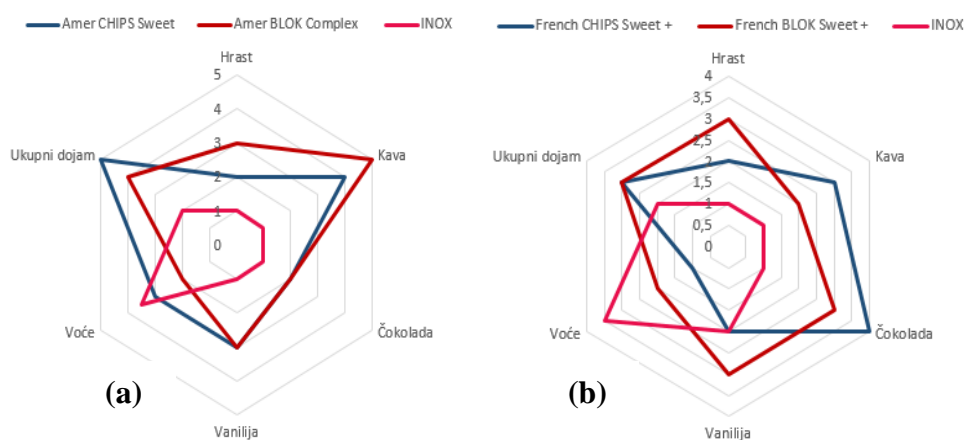
Slika 2. Postotak inhibicije DPPH radikala u vinu Cabernet Sauvignon
Figure 2. Percentage of DPPH radical inhibition in Cabernet Sauvignon wine samples

Na slikama 3 i 4 prikazane su prosječne ocjene uzoraka za mirise u vinu Merlot sa ukupnim dojmom. Najvišu ocjenu, 5 je dobio uzorak American oak Viniblock Complex boose (*Ambrosia*) za aromu kave, slika 5. Najvišu ocjenu 5 za ukupni dojam su dobili uzorci French oak Viniblock MT (*Odyse*) i American oak Chips Sweet boose (*Ambrosia*), slika 3b i 4a. Najmanju prosječnu ocjenu 2 za ukupni dojam dobilo je vino iz inox posude bez drvenih dodataka, slike 3 i 4. Međutim potrebno je istaknuti voćnost, koja je kod vina iz inox posude ocjenjena ocjenom 3,5, više nego kod vina s dodacima.



Slika 3. Rezultati deskriptivnog ocjenjivanja vina Merlot s dodacima (a) *Odyse*, Amer CHIPS MT i BLOK MT i (b) *Odyse* French CHIPS HT i BLOK HT u usporedbi s vinom bez dodataka

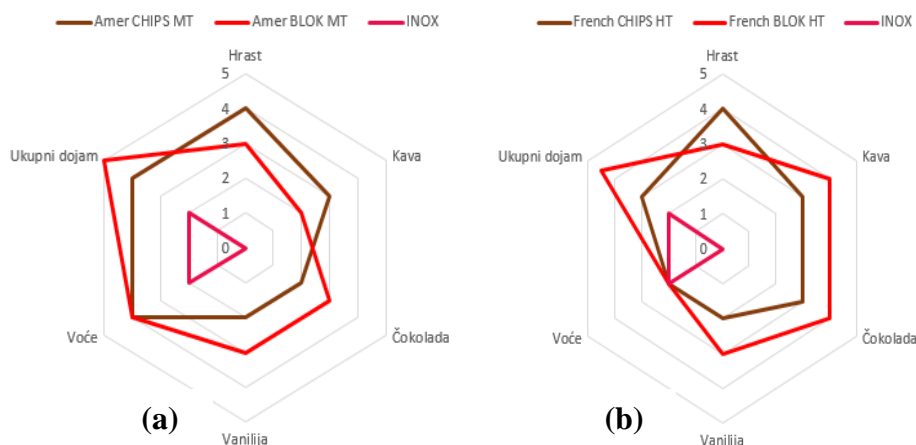
Figure 3. Results of the descriptive evaluation of Merlot wines with additives (a) *Odyse*, Amer CHIPS MT and BLOK MT and (b) *Odyse* French CHIPS HT and BLOK HT in comparison with wine without additives



Slika 4. Rezultati deskriptivnog ocjenjivanja vina Merlot s dodacima (a) *Ambrosia Amer CHIPS Sweet i BLOCK Complex* i (b) *Ambrosia French CHIPS Sweet i BLOCK Sweet* u usporedbi s vinom bez dodataka

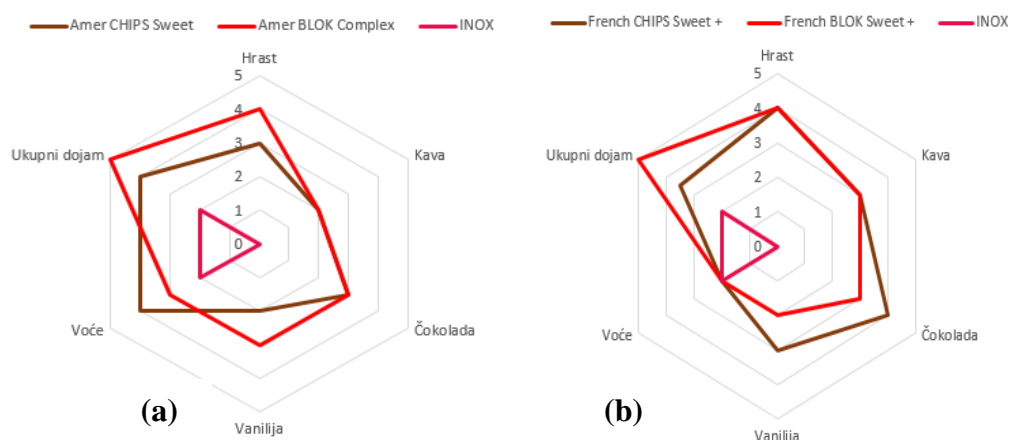
Figure 4. Results of the descriptive evaluation of Merlot wines with additives (a) *Ambrosia Amer CHIPS Sweet i BLOCK Complex* and (b) *Ambrosia French CHIPS Sweet i BLOCK Sweet* in comparison with wine without additives

Na slikama 5 i 6 prikazane su prosječne ocjene uzoraka za mirise u vinu Cabernet Sauvignon sa ukupnim dojmom. Najvišu ocjenu za ukupni dojam, ocjenu 5 dobila su tri uzorka, American oak Viniblock MT (*Odyse*), American oak Viniblock Complex boose (*Ambrosia*), French oak Viniblock sweet plus (*Ambrosia*), što se vidi na slikama 5a, 6a i 6b. Nijedan uzorak sa aromama nije dobio ocjenu 5. Najmanju prosječnu ocjenu za ukupni dojam dobilo je vino iz inox posude bez drvenih dodataka.



Slika 5. Rezultati deskriptivnog ocjenjivanja vina Cabernet-Sauvignon s dodacima (a) *Odyse, Amer CHIPS MT i BLOCK MT* i (b) *Odyse French CHIPS HT i BLOCK HT* u usporedbi s vinom bez dodataka

Figure 5. Results of the descriptive evaluation of Cabernet-Sauvignon wines with additives (a) *Odyse, Amer CHIPS MT and BLOCK MT* and (b) *Odyse French CHIPS HT and BLOCK HT* in comparison with wine without additives



Slika 6. Rezultati deskriptivnog ocjenjivanja vina Cabernet-Sauvignon s dodacima (a) *Ambrosia Amer CHIPS Sweet* i *BLOCK Complex* i (b) *Ambrosia French CHIPS Sweet* i *BLOCK Sweet* u usporedbi s vinom bez dodataka

Figure 6. Results of the descriptive evaluation of Cabernet-Sauvignon wines with additives (a) *Ambrosia Amer CHIPS Sweet* i *BLOCK Complex* and (b) *Ambrosia French CHIPS Sweet* i *BLOCK Sweet* in comparison with wine without additives

Zaključci

Degustacijom i organoleptičkom analizom uzoraka vina utvrđeno je kako hrastovi dodaci različitih oblika i granulacija poboljšavaju organoleptička svojstva vina. Vina s hrastovim dodacima su dobila više ocjene za ukupni dojam, izmjerena je veća ukupna količina polifenola i antocijana, viši su postotci inhibicije od vina iz inox posude te se može zaključiti da hrastovi dodaci poboljšavaju organoleptička svojstva. Najbolje ocjene dobila su vina s dodacima French oak CHIPS (*Ambrosia*) i American oak CHIPS (*Ambrosia*), vina sa dodacima čipsa imala izraženije arome hrasta i kave. Sorta Cabernet Sauvignon je dobila više ocjene od sorte Merlot, što znači da su kod sorte Cabernet Sauvignon prisutne veće promjene aroma. Sorta Merlot je dobila zadovoljavajuće ocjene i više se osjetila aroma voća nego kod Caberneta Sauvignona.

Literatura

- Chira, K., Teissedre, P. L. (2013): Extaction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profyl of wine aged with French woods subjected to different toasting methods: Behavior during storage, *Food Chem.* 140(1) 168-177.
- Eder, R. (1997): Chemische und sensorische veränderung durch Barrique-Weinausbau, *Der Winzer*, 2 str. 12-17.
- Herjavec, S. Jeromel, A., Orlic, S., Kozina, B. (2007): Changes in volatile composition and sensory properties of vugava wines age din Croatian oak barrels, *J. Cent. Eur. Agric.* 2 195-204.

- Jeromel, A., Orbanić, F., Tomaz, I., Andabaka, Ž., Jagetić-Korenika, A. (2017): Kakvoća crnih vina (*V. vinifera* L.) dozrijevanih u bačvama od slavonske hrastovine, *Glasnik zaštite bilja* 6 19-27.
- Ortega-Heras, M., Gonzales-Sanjose, M. L., Gonzales-Huerta, C. (2007): Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines, *Food Chem.* 103(4), 1434-1448.
- Robinson, J. (1995): Jancis Robinson Wine Course, BBC Books, London.

Finalization wine Merlot and Cabernet Sauvignon with different enological wooden material

Stanko Zrinščak*, Valentina Obradović, Josip Mesić, Ana Mrgan

Polytechnic in Požega, Agricultural Department, Vukovarska 17, 34 000 Požega, Croatia

**Corresponding author: szrinscak@vup.hr*

Summary

It is known that during the aging of wine in wooden barrels, various chemical compounds are extracted that significantly contribute to the quality of wine, which has been established by a number of authors. The quality of wine during aging is also affected by the origin of the wood, the intensity of burning and the time of aging. In addition to the classic wooden barrels, various wooden preparations, popularly called chips, are also used today. Eight types of different wood preparations in the form of chips and blocks, from American and French oak, were used in this work. Antioxidant activity of wine samplese was measured by the DPPH method, the content of anthocyanins and total polyphenols were determined and a descriptive analysis of all samples was performed. In the case of Merlot wine, wines containing high toasted French oak were rated the best, and they also had the highest proportions of polyphenols and anthocyanins, as well as antioxidant activity. The best rated Cabernet Sauvignon wines were samples containing American Block wooden additives. The same samples also had higher values for total polyphenols than other samples. Wines without additives were rated significantly lower.

Keywords: wine, wooden additives, finalization

4

Sekcija: MEDICINSKA KEMIJA I FARMACIJA

**Topic: *MEDICAL CHEMISTRY AND
PHARMACY***



Razine nastalih produkata oksidacijskih proteina kao biljeg oksidacijskog stresa kod miševa s hiperglikemijom

Irena Landeka Jurčević^{1*}, Irena Crnić¹, Tajana Frančić¹,
 Petar Dragičević², Verica Dragović-Uzelac¹, Domagoj Đikić³

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
 Pierotijeva 6, HR -10 000 Zagreb

²Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3, HR - 10 000 Zagreb

³Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagreb,
 Rooseveltov trg 6, HR - 10 000 Zagreb

*Dopisni autor: ilandeka@pbf.hr

Sažetak

U ovom radu željelo se utvrditi da li razina nastalih oksidacijskih proteina (AOPP) može poslužiti kao biljeg oksidacijskog stresa kod miševa sa hiperglikemijom. Cilj ove studije bio je utvrditi oksidacijski stres u miša C57BL/6 nakon subkroničnog (10 dana) davanja polifenola u dozi od 25 mg/kg tjelesne mase. Hiperglikemija kod miševa inducirana je sa 150 mg/kg aloksana. Eksperiment je trajao 10 dana na C57BL/6 miševima koji su bili podijeljenih u četiri grupe: grupa 1 kontrola (C), grupa 2 ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L. (ECT), grupa 3 aloksan (AL) i grupa 4 AL+ECT. Razine AOPP u homogenatu tkiva (jetra i bubrezi) izmjerene su spektrofotometrijskom metodom. Razine AOPP u homogenatu tkiva (jetra, bubreg) bile su značajno veće u skupini s aloksanom (jetra: 52,18±3,2 ng/mL; bubreg: 36,12±2,29 ng/mL) nego u kontrolnoj skupini (jetra: 31,4±1,91 ng/mL; bubreg: 23,73±1,78 ng/mL). Pored toga, koncentracija AOPP u homogenatu tkiva u aloksanskoj skupini bila je značajno viša od koncentracije AOPP u homogenatu tkiva u AL + ECT skupini (jetra: 36,15±4,96 ng/mL; bubreg: 27,69±1,75 ng/mL). AOPP mogu predstavljati novu klasu proupalnih molekula koje su uključene u oksidacijski stres u hiperglikemiji, te se AOPP može koristiti kao biljeg oksidacijskog stresa u bolesnika s hiperglikemijom.

Ključne riječi: produkti oksidacijskih proteina (AOPP), hiperglikemija, oksidacijski stres, *Prunus spinosa* L., C57BL/6 miš

Uvod

Polifenolni spojevi imaju antioksidacijsku aktivnost i smanjuju oksidacijski stres u organizmu i upalne procese uzrokovane slobodnim radikalima. Kao hvatači slobodnih radikala, kelatori prijelaznih metala, inhibitori proupalnih enzima, modifikatori signalnih staničnih puteva, polifenoli imaju zaštitnu ulogu za stanice. Upravo zbog toga polifenoli koji se nalaze u trnini u velikim količinama, imaju vazoprotektivno, antiaterogeno, antitrombotičko i antiapoptičko djelovanje (Marchelak i sur., 2017). Zbog izraženog antioksidacijskog djelovanja polifenola, trnina (*Prunus spinosa* L.) bi potencijalno mogla imati kemoprotektivan učinak. Smanjenjem koncentracije slobodnih radikala, kroničnih upala, lipidne peroksidacije, oštećenja proteina i signalnih puteva između stanica, smanjuje se vjerojatnost nastanka neželjenih mutacija i nastanak kancerogenih stanica (Guimarães i sur.,

2013). Hiperglikemija je stanje u kojem je razina glukoze u krvi veća od 125 mg/dL tijekom posta i veća od 180 mg/dL 2h nakon obroka. Pacijenti s predijabetičnim stanjem, tijekom posta imaju razinu glukoze u krvi između 100 mg/dL i 125 mg/dL. Pacijentu se dijagnosticira dijabetes kad na tašte ima veću koncentraciju glukoze u krvi od 125 mg/dL. Ukoliko se hiperglikemija ne liječi, može dovesti do brojnih komplikacija koje uključuju oštećenje očiju, bubrega, živaca, srca i perifernog krvožilnog sustava (Hammer i sur., 2019). Stanju hiperglikemije pridonose faktori kao što su smanjena sekrecija inzulina, smanjena upotreba glukoze i povećana proizvodnja i oslobađanje glukoze. Koncentracija glukoze u krvi varira ovisno o oralnom unosu glukoze, proizvodnji glukoze u jetri i iskorištavanju glukoze kao izvoru energije. U metabolizmu glukoze i njenoj koncentraciji u krvi, najveću ulogu ima hormon inzulin (Yari i sur., 2019; Simon i Witmann, 2019). Hiperglikemija je primijećena i kod kritično bolesnih pacijenata kod kojih je organizam u stanju izrazitog stresa. U proupalnoj fazi kritičnih bolesnika, metabolički stres vodi do raspada glikogena, kateholamina, sinteze adenokortikotropnih hormona, sinteze glukagona i inzulinske rezistencije čime se povećava vjerojatnost razvijanja sepse, sindroma sustavnog upalnog odgovora i traumatske ozljede mozga (Bar-Or i sur., 2019). Neliječena i ne tretirana hiperglikemija kroz određeni period vremena uzrokuje mikrovaskularne komplikacije (Seino i sur., 2010). Kronična hiperglikemija kod dijabetesa inducira oksidaciju i glikozilaciju mnogih biološki važnih molekula. Glikozilacija i oksidacija su procesi poznatiji pod nazivom glikooksidacija. Glikooksidacijski proteinski produkti uzrokuju oštećenja lipida, DNA, membrana i endotela (Piwowar i sur., 2008). Sve te strukturalne promjene uzrokuju abnormalnosti u funkcijama makromolekula, te dolazi do njihovog nakupljanja. Pretpostavka je da su produkti glikooksidacije glavni uzrok nastanka vaskularnih komplikacija kod dijabetesa (Abou-Seif i Youssef, 2004). AOPP sadrži velike količine ditirozina, koji omogućuje mrežno povezivanje sa disulfidnim mostovima i karbonilnim skupinama. AOPP-ovi primarno nastaju od radikala koji sadrže klor, uključujući hipokloritnu kiselinu i kloramine koji su rezultat mijeloperoksidazne aktivnosti (Krokmaz i sur., 2013). Povišene razine AOPP-a su identificirane kod pacijenata s koronarnom arterijskom bolesti, nedonoščadi, hipoksične dojenčadi, pacijenata s dijabetesom i sistemskom sklerozom, reumatskom bolesti, kolorektalnim rakom i akutnom mijeloidnom leukemijom (Selmeci, 2011). Descamps-Latscha i suradnici (2005) su zamijetili statistički značajnu korelaciju između AOPP u plazmi i koncentracije fibrinogena kod pacijenata s kroničnim zatajenjem bubrega. Strugala i suradnici (2019) su ispitali kako polifenoli iz plavog krumpira (blue congo) utječu na oksidacijski stres i razinu AOPP-a. Zaključili su da je korištenjem polifenola iz plavog krumpira došlo do povećanja koncentracije GSH i aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GPx) u leukocitima. Također je zamijećeno da se smanjila koncentracija AOPP-a kao i modificiranih oksidacijskih proteina u krvnoj plazmi štakora nakon administracije ekstrakta plavog krumpira. Ove aktivnosti su bile povezane s antidijabetičnim učincima, što se dokazalo i smanjenom koncentracijom glukoze u krvi i koncentracijom glikiranog hemoglobina kod dijabetičnih štakora, nakon primjene ekstrakta.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti na *in vivo* modelu normalnog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša antioksidacijski učinak polifenola izoliranih iz cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na biljeg oksidacijskog stresa, nastalih produkata oksidacije proteina (AOPP), kao pokazatelja oštećenja proteina u stanju hiperglikemije. U dosadašnjim istraživanjima nema dostupnih i relevantnih znanstvenih radova o utjecaju polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na oksidacijski stres i hiperglikemiju.

Materijali i metode

Izvor biljnog materijala, priprema vodenog ekstrakta cvijeta trnine, proces mikrovalne detekcije, mjerenje ukupnih i pojedinačnih koncentracija polifenola detaljno su opisani u radu Lovrić i sur. (2017).

Pokusne životinje

Pokusi su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 10 dana. Po osam životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22 °C, uz neograničen pristup hrani i vodi. Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 60 % vlažnosti. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

Indukcija (izazivanje) hiperglikemije u C57BL/6 miša

Aloksan-monohidrat injektiran je intraperitonealno u dozi od 150 mg/kg tjelesne mase. Indukcija dijabetesa izazvana aloksanom potvrđena je mjerenjem razine glukoze u krvi. Miševi s razinom glukoze iznad 140 mg/dL odabrani su za daljnje istraživanje.

Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja ($n = 8$ životinja po grupi) i to: C – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine); ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. (25 mg/kg/dan); AL – aloksan (Aloksan-monohidrat 150 mg/kg tjelesne mase); ECT + AL – ekstrakt cvijeta trnine + aloksan. Unos ekstrakta cvijeta trnine je životinjama apliciran intraperitonealno (ip). Životinje su žrtvovane 10.-ti dan pokusa te su uzeti organi jetre i bubrega za daljnju analizu. Životinje su anestezirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi, izvagani te pohranjeni na -80 °C za daljnju analizu.

Priprema tkiva (jetra, bubreg) za određivanje AOPP-a

Tkivo organa homogenizirano je u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v). Organi su potom homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorci su tijekom homogenizacije cijelo vrijeme držani na ledu. Homogenati bubrega i jetre su potom centrifugirani pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4 °C. Homogenizacija tkiva je provedena unutar dva dana od žrtvovanja životinja.

Određivanje produkta oksidacijskih proteina (AOPP) u homogenatu tkiva jetre i bubrega

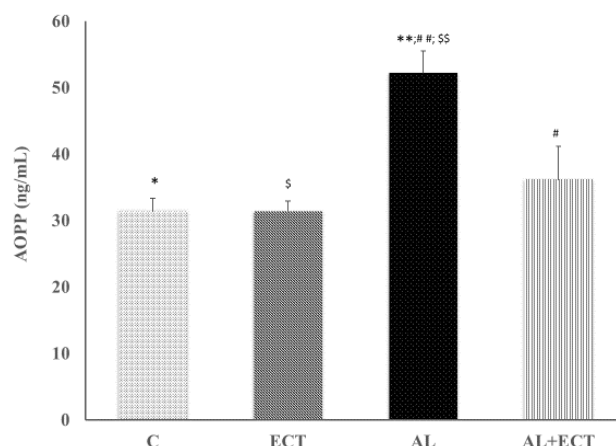
Određivanje produkata oksidacijskih proteina u ovom radu je napravljeno pomoću Elisa kit-a (Elisa, cat.no: MBS263319, MyBioSource, San Diego, SAD) koji se bazira na tehnici dvostrukih protutijela.

Statistička analiza

Statistička analiza podataka napravljena je pomoću SPSS Statistics verzija 17 (SPSS Inc, Chicago, IL). Dobiveni podaci izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba netretiranih i tretiranih skupina miševa napravljena je ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti podešen je na $p < 0,05$. Post-hoc analize su napravljene koristeći Kruskal-Wallis ANOVA test kako bi ustanovili razlike između pokusnih grupa.

Rezultati i rasprava

Sve je više dokaza da su komplikacije dijabetesa povezane s oksidacijskim stresom izazvanim stvaranjem slobodnih radikala. Slobodni radikali mogu dovesti do poremećaja staničnih funkcija i oksidacijskog oštećenja membrane. Kod hiperglikemije je utvrđeno da je oksidacijski stres uglavnom posljedica povećane proizvodnje radikala bez kisika i velikog smanjenja antioksidacijske obrane. Dakle, spojevi s hipoglikemijskim i antioksidacijskim svojstvima mogu biti korisni antiglikemijski agensi. Dijabetes melitus (DM) karakterizira oštećenje stanica uzrokovano upalnim i metaboličkim mehanizmima induciranim izmjenom redukcijско-oksidacijskog statusa. Karbonilni derivati (aldehidi i ketoni) nastaju izravnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka ROS-om ili neoksidacijskim reakcijama s oksidiranim lipidima koje sadrže karbonile (Gyurászová i sur., 2017). Razine karbonila najčešće su korišteni biljeg oksidacijskog oštećenja proteina zbog relativno rane tvorbe i stabilnosti (Weber i sur., 2015). Produkti oksidacijskih proteina (AOPP) su proteini koji sadrže ditrozin i umreženi su proteini koji se nalaze u aterosklerotskim lezijama i potiču krvožilnu akumulaciju, aktivaciju monocita i endotelnu disfunkciju prekomjernom ekspresijom adhezijskih molekula (Guo i sur., 2008). Produkti oksidacijskih proteina u serumu (AOPP) novi su biljezi oštećenja proteina induciranih oksidacijskim stresom. Na slici 1. prikazani su rezultati mjerenja AOPP u homogenatu tkiva jetre C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Statistički je značajna razlika između kontrolne (C) ($31,40 \pm 1,909$ ng/mL) i aloksanske (AL) ($52,18 \pm 3,292$ ng/mL) skupine, ali i između AL i AL+ECT ($36,15 \pm 4,964$ ng/mL) skupine. Također je statistički značajna razlika između ECT ($31,33 \pm 1,553$ ng/mL) i AL skupine. Nema značajne razlike između kontrolne skupine (K) i skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT). Iz slike 1. se vidi da su razine AOPP najviše u aloksanskoj skupini, što je i logično obzirom da stanje hiperglikemije uzrokuje oštećenja na proteinskoj strukturi. Hiperglikemija uzrokuje nastajanje upalnih markera i oštećenje organizma, odnosno oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju. Uspoređujući aloksansku skupinu s aloksanskom skupinom tretiranom ekstraktom cvijeta trnine (ECT) došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije AOPP-a u tkivu jetre.



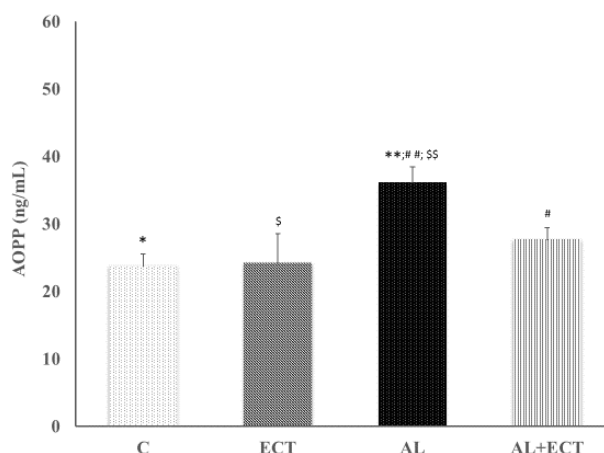
Slika 1. Koncentracija AOPP u tkivu jetre, 10. dan, (ng/mL). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (*-C vs. AL; #-AL+ECT vs. AL; \$-ECT vs. AL; *,#, \$ – Srednje vrijednosti su značajno različite; $p < 0,05$ (ANOVA).

C – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.); AL – aloksan; AL+ECT aloksan+ekstrakt cvijeta trnine)

Figure 1. AOPP concentration in the liver tissues, 10. days (ng/mL). Results are expressed as mean value \pm SD (*-C vs. AL; #-AL+ECT vs. AL; \$-ECT vs. AL; *,#, \$ – The mean values are significantly different; $p < 0.05$ (ANOVA).

C - control group; ECT - Trnina flower extract; AL - aloxan; AL+ECT – Aloxan + Trnina flower extract)

Time je potvrđen utjecaj polifenolnih spojeva na markere oštećenja proteina induciranih oksidacijskim stresom. Prehrana obogaćena polifenolnim spojevima ima pozitivno djelovanje na hiperglikemiju i smanjenje nastanka markera oštećenja proteina. Podaci istraživanja su pokazali da jetra i slezena imaju veliku ulogu u eliminaciji AOPP-a (Iwao i sur., 2006). Na slici 2. prikazani su rezultati mjerenja AOPP u homogenatu tkiva bubrega C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Statistički je značajna razlika između kontrolne (C) ($23,73 \pm 1,786$ ng/mL) i aloksanske (AL) ($36,12 \pm 2,296$ ng/mL) skupine, ali i između AL i AL+ECT ($27,69 \pm 1,752$ ng/mL) skupine. Također je statistički značajna razlika između ECT ($24,20 \pm 4,373$ ng/L) i AL skupine. Nema značajne razlike između kontrolne skupine i skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine. Bolest bubrega predstavlja ozbiljan globalni zdravstveni problem. Jedna od glavnih briga je kasna dijagnoza, izvediva samo u napredovalom bolesnom stanju. Nedostatak kliničke manifestacije u ranim fazama i činjenica da su obično izmjereni parametri bubrežne funkcije značajno smanjeni samo tijekom uznapredovalih stadija bolesti glavni su uzrok. Promjene na molekularnoj razini bubrežnog tkiva događaju se i prije nego što se dušične tvari, poput kreatinina i uree, počnu nakupljati u krvi. Bubrežni proksimalni tubuli sadrže veliki broj mitohondrija i kritični su za energetski zahtjevan proces reapsorpcije vode i otopina. Mitohondriji su najveći proizvođači kisikovih radikala koji povećavaju osjetljivost bubrega na oksidacijsko oštećenje uzrokovano stresom. Slobodni radikali i prooksidansi proizvedeni tijekom akutne ili kronične ozljede bubrega mogu dodatno pogoršati tijek bolesti i igrati ulogu u patogenezi naknadnih komplikacija (Gyurászová i sur., 2020).



Slika 2. Koncentracija AOPP u tkivu bubrega, 10. dan, (ng/mL). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (*-C vs. AL; #-AL+ECT vs. AL; \$-ECT vs. AL; #, \$ – Srednje vrijednosti su značajno različite; $p < 0,05$ (ANOVA)
 C – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnina (*Prunus spinosa* L.); AL – aloksan; AL+ECT aloksan+ekstrakt cvijeta trnina)

Figure 2. AOPP concentration in the kidney tissues, 10. days (ng/mL). Results are expressed as mean value \pm SD (*-C vs. AL; #-AL+ECT vs. AL; \$-ECT vs. AL; #, \$ – The mean values are significantly different; $p < 0.05$ (ANOVA)
 C - control group; ECT - Trnina flower extract; AL - aloxan; AL+ECT – Aloxn + Trnina flower extract)

Hiperglikemija uzrokuje pojačano stvaranje ROS-a u organizmu što rezultira s povećanom razinom AOPP kod bolesnika. To dovodi do sistemske upale u organizmu što može rezultirati razvijanjem dodatnih bolesti uz prethodno razvijeni dijabetes. Brahmi i sur. (2018) promatrali su utjecaj polifenola modrozelenne alge *Chaetomorpha gracilis* (AECG) na različite biokemijske i hematološke parametre kod miševa, među kojima je bio i AOPP. Najzastupljeniji polifenoli u algi su galna kiselina, kumarinska kiselina, apigenin i katehin. Miševi su bili podijeljeni u četiri skupine (kontrolna skupine, HFD-dijeta s visokim udjelom masti, HFD+AECG-dijeta s visokim udjelom masti uz dodatak ekstrakta alge, AECG-normalna dijeta tretirana s ekstraktom algi). U istraživanju je došlo do statistički značajnog smanjenja produkata oksidacijskih proteina (AOPP) u eritrocitima i trombocitima u skupini miševa HFD+AECG u odnosu na HFD skupinu. Također je došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije AOPP-a u AECG skupini u odnosu na kontrolnu i ostale dvije skupine. Mohammed Yusof i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su promatrali utjecaj polifenola ekstrakta *Hibiscus sabderiffa* (HPE) na tkivo srca kod dijabetičnih štakora (DM). Štakori su bili podijeljeni u 4 skupine (NDM- nedijabetični štakori, DM- dijabetični štakori, DM+HPE-dijabetični štakori tretirani ekstraktom, DM+MET-dijabetični štakori tretirani metforminom. Dijabetes uzrokuje povećanje markera oksidacijskog stresa u tkivu srca kod DM, DM+HPE i DM+MET skupina ($p < 0,05$), međutim, koncentracija AOPP u tkivu srca je bila statistički značajno smanjena u DM+HPE skupini u odnosu na DM i DM+MET skupinu. Smanjenje upalnih markera, među kojima je i AOPP, može smanjiti vjerojatnost nastanka kardiovaskularnih bolesti i oštećenja krvožilnog sustava kod dijabetičara. Svježi listovi čaja

bogati su derivatima flavan-3-ola, ponajviše katehinima, epikatehinima i epigalokatehinima, epikatehin galatom i epigalokatehin galatom koji je najzastupljeniji. 3T3-L1 preadipociti su u istraživanju Ramlagan i sur. (2017) tretirani crnim i zelenim čajem te se promatrao njihov utjecaj na razinu AOPP. Razina AOPP-a u glukozom i ribozom glikiranom albuminu iz goveđeg seruma (BSA) je statistički značajno porastao u odnosu na neglikirani BSA. Crni i zeleni čaj su smanjili ($P < 0,01$) AOPP razine u ribozom glikiranom BSA, dok je sam crni čaj statistički značajno smanjio razinu AOPP-a kod BSA glikiranog glukozom. Povećana produkcija ROS-a izaziva oksidaciju proteina što uzrokuje modifikaciju proteina kao što su karbonilirani proteini i AOPP. Polifenoli inhibiraju nastanak karboniliranih proteina i AOPP u BSA u prisutnosti oksidacijskog stresa. Polifenolni spojevi poput galne kiseline, kamferola i rutina statistički značajno inhibiraju formiranje AOPP u BSA glikiranom ribozom. Fu i sur. (2018) nastojali su dokučiti utjecaj resveratrola na štakorima kod kojih je izazvana ishemijsko-reperfuzijska ozljeda leđne moždine. Istraživanje je provedeno na 5 skupina štakora: 1. kontrolna skupina bez operacije (Con), 2. štakori tretirani resveratrolom (10 mg/kg tjelesne mase) (Res), 3. štakori podvrgnuti laparotomiji i infrarenalnoj disekciji abdominalne aorte bez stezanja aorte (Sham), 4. štakori s ishemijskom-reperfuzijskom ozljedom leđne moždine (IRI), 5. štakori koji su tretirani resveratrolom (10 mg/kg tjelesne mase) i kod kojih je izazvan IRI (IRI+Resv). Primijećeno je da je u IRI skupini povećana koncentracija AOPP. Primjenom resveratrola kod štakora sa IRI došlo je do statistički značajnog smanjenja AOPP u serumu u odnosu na IRI skupinu koja nije bila tretirana resveratrolom. Sham skupina je imala manju koncentraciju AOPP u serumu nego IRI skupina. IRI skupina tretirana resveratrolom imala je manju koncentraciju AOPP u krvi u odnosu na Sham skupinu. AOPP je marker proteinske oksidacije te je statistički značajno povećan u IRI skupini u odnosu na kontrolu skupinu. Diabetes mellitus (DM) se danas smatra heterogenom skupinom bolesti koju karakterizira stanje kronične hiperglikemije, što uzrokuje niz sekundarnih komplikacija poput kardiovaskularnih, bubrežnih i neuroloških. Regulacija DM uključuje vježbanje, prehranu i farmakoterapiju. Međutim, lijekovi razvijeni za liječenje dijabetesa iako mogu spriječiti dugotrajne komplikacije dijabetesa mogu imati brojne nuspojave. Novi terapijski modaliteti koji omogućavaju bolje upravljanje dijabetesom i bolju toleranciju pacijenata bili bi važno poboljšanje. Trenutno se navodi da više od 400 biljaka ima potencijal snižavanja razine glukoze u krvi. Poznato je da su ove ljekovite biljke učinkovite u liječenju dijabetesa i očekuje se da postižu visoku razinu antihiperglikemijskog učinka bez nuspojava, za razliku od uobičajenih antidijabetičkih lijekova. Biljni ekstrakti ostvaruju antidijabetička djelovanja pomoću farmakoloških mehanizama, uključujući inzulinu sličnu aktivnost (Broadhurst i sur., 2000), kao i povećanje osjetljivosti na inzulin (Miura i sur., 2006), izlučivanje inzulina (Mai i Chuyen, 2007), antioksidacijsku aktivnost (Chen i Yen, 2007) i smanjenja aktivnosti crijevne glikozidaze (Kimura i sur., 2007). Prekomjerna produkcija slobodnih radikala korelacijski je povezana s produkcijom produkata oksidacijskih proteina u serumu (AOPP). Nastavno na to, AOPP je medijator oksidacijskog stresa, a njegove povećane koncentracije su također povezane s razinom citokina (molekule koje izazivaju upalu) u organizmu.

Zaključci

Koncentracije AOPP u ispitivanim uzorcima jetre i bubrega statistički su značajno smanjene u (AL+ECT) grupama miševa u odnosu na aloksansku grupu, što kazuje na antioksidacijski učinak ECT i smanjenje oksidacijskog stresa, pošto stanje hiperglikemije uzrokuje oštećenja

na proteinskoj strukturi. Dakle, ovo istraživanje ukazuje na to da bioaktivne molekule iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L., kao suportivna terapija, mogu imati pozitivan učinak na oksidacijski stres i hiperglikemiju u miša C57BL/6.

Zahvala

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenih projekta: Hrvatska zaklada za znanost – HRZZ (201.-2018), "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE-FF) i IRI projekta Ulaganje u Znanost i inovacije Europski strukturni i investicijski fondovi (2019-2022) "Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi" (KK.01.1.1.04).

Literatura

- Abou-Seif, M. A., Youssef, A. A. (2004): Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin. Chim. Acta.* 346, 161-170.
- Act on Animal Welfare Zagreb, Croatia (2013): Official Gazette of the Republic of Croatia NN 55/2013, (1129) (in Croatian).
- Bar-Or, D., Rael, L. T., Madayag, R. M., Banton, K. L., Tanner, A., Acuna, D. L., Lieser, M. J., Marshall, G. T., Mains, C. W., Brody, E. (2019): Stress hyperglycemia in critical ill patients: insight into possible molecular pathways, *Front. Med.* 6, 54.
- Bioethic approval of the experimental procedure within the project (2014): Document No. 251-58-10617-14-37, Faculty of Science, University of Zagreb, Croatia (in Croatian).
- Brahmi, N., Saoudi, M., Kadri, Y., Kallel, C., Euch, A. E., Ayadi, F. M., Harrath, A. H., El Feki, A., Allagui, M. S. (2018): Protective effect of *Chaetomorpha gracilis* aqueous extract against erythrocytes oxidative damage induced by high fat diet in treated mice, *Arch. Physiol. Biochem.* 125, 220-227.
- Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., Anderson, R. A. (2000): Insulin-like biological activity of culinary and medical plant aqueous extracts in vitro, *J. Agric. Food Chem.* 48, 849-852.
- Chen, H. Y., Yen, G. C. (2007): Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves, *Food Chem.* 101, 686-694.
- Descamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Gausson, V., Mothu, N. (2005): Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.* 45, 39-47.
- Fu, S., Lv, R., Wong, L., Hou, H., Liu, H., Shao, S. (2018): Resveratrol, an antioxidant, protects signal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway, *Saudi. J. Biol. Sci.* 25, 259-266.
- Guide for the care and use of laboratory animals (2011): Washington DC, USA: National Academies Press: 86-123.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz, M. J. R. P., Santos Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013): Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal, *Food Chemist.* 141(4), 3721-3730.
- Guo, Z. J., Niu, H. Y., Hou, F. F., Zhang, L., Fu, N., Nagai, R., Lu, X., Hong Chen, B., Shan, Y. X., Tian, Y. W., Nagaraj, R. H., Xie, D., Zhang, X. (2008): Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway, *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1699–1712.

- Gyurászová, M., Gurecká, R., Bábíčková, J., Tóthová, L. (2020): Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers, *Oxid. Med. Cel. Longev.* Article ID 5478708.
- Hammer, M., Storey, S., Hershey, D. S., Brady, V. J., Davis, E., Mandolfo, N., Bryant, A. L., Olausson, J. (2019): Hyperglycemia and cancer: a state the science review, *Oncol. Nurs. Forum.* 46(4), 459-472.
- Iwao, Y., Anraku, M., Hiraike, M., Kawai, K., Nakajou, K., Kai, T. (2006): The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP), *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 140-146.
- Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., Miyazawa, T. (2007): Food-grade mulberry power enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in human, *J. Agric. Food Chem.* 55, 5869-5874.
- Krokmaz, G. G., Altinoglu, E., Civelek, S., Sozer, V., Erdenen, F., Tabak, O., Uzun, H. (2013): The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome, *Metabolism.* 62, 828-835.
- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V. (2017): Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers, *Food Technol. Biotechnol.* 55(2), 243-250.
- Mai, T. T., Chuyen, N. V. (2007): Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 69-76.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M. A. (2017): Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro*, *Front Phatmacol.* 8, 680.
- Miura, T., Ueda, N., Yamada, K., Fukushima, M., Ishida, T., Kaneko, T., Matsuyama, F., Seino, Y. (2006): Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice, *Biol. Pharm. Bull.* 29, 585-587.
- Mohamed Yusof, N. L., Zainalabidin, S., Fauzi, N. M., Budin, S. B. (2018): *Hibiscus sabdariffa* (roselle) polyphenol-rich extract averts cardiac functional and structural abnormalities in type 1 diabetic rats, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 43, 1224-1232.
- Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M., Szezecińska, J., Warwas, M. (2008): Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropaty, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 549-553.
- Ramlagan, P., Rondeau, P., Planesse, C., Neerghen-Bhojun, V. S., Bourdean, E., Bahorun, T. (2017): Comperative suppressing effects of black and green teas on the formation of advanced glycation and products (AGEs) formation and AGEs-induced oxidative stress, *Food Funct.* 8, 4194-4209.
- Selmeci, L. (2011): Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome), *Free Radic. Res.* 45, 1115-1123.
- Simon, K., Witmann, I. (2019): Can blood value really be referred to as a metabolic parameter?, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 20, 151-160.
- SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)
 URL:<https://www.hks.harvard.edu/.../A%20SPSS%20Manuals/SPSS%20>

- Strugala, P., Dzydzan, O., Brodyak, I., Kucharska, A. Z., Kuropka, P., Liuta, M., Kaleta-Kuratewicz, K., Przewodowska, A., Michalowska, D., Gabrielska, J., Sybirna, N. (2019): Antidiabetic and antioxidative potential of the blue congo variety of purple potato extract in streptozotocin-induced diabetic rats, *Molecules*. 24, 3126.
- Weber, D., Davies, M. J., Grune, T. (2015): Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions, *Redox Biol.* 5, 367–380.
- Yari, Z., Behrooz, V., Zand, H., Pourvali, K. (2019): New insight into diabetes management: from glycemic index to dietary insulin indeks, *Curr. Diabetes Rev.* 16, 293-300.

Advanced oxidation protein product levels as a marker of oxidative stress in mice with hyperglycemia

Irena Landeka Jurčević^{1*}, Irena Crnić¹, Tajana Frančić¹, Petar Dragičević², Verica Dragović-Uzelac¹, Domagoj Đikić³

¹Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia

²School of Medicine University of Zagreb, Šalata 3, 10 000 Zagreb, Croatia

³Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: ilandeka@pbf.hr

Summary

We aimed to determine whether advanced oxidation protein product (AOPP) levels can serve as a marker of oxidative stress in mice with hyperglycemia. The aim of this study was to establish the oxidation stress of *Prunus spinosa* L. flower extract (PSE) polyphenol glycosides in C57/BL6 mice organs after repeated subchronic (10 days) administration of entry dose of 25 mg/kg/bw of total polyphenols by gavage. Hyperglycemia in mice induced with 150 mg/kg bw of alloxan. The experiment lasted 10 days using C57BL/6 mice divided in four groups: group 1 as control (C), group 2 as *Prunus spinosa* L. flower extract (PSE), group 3 as aloxan (AL) and group 4 as AL with PSE. AOPP levels in the tissue homogenate (liver and kidney) were measured by the spectrophotometric method (microplate reader). Tissue homogenate (liver, kidney) AOPP levels were significantly higher in the aloxan group (liver: 52.18±3.29 ng/mL; kidney: 36.12±2.29 ng/mL) than in the control group (liver: 31.4±1.91 ng/mL; kidney: 23.73±1.78 ng/mL). In addition, the mean AOPP level in the homogenate tissue in the aloxan group was significantly higher than the mean homogenate tissue AOPP levels in the AL+ECT group (liver: 36.15±4.96 ng/mL; kidney: 27.69±1.75 ng/mL). AOPPs may represent a novel class of pro-inflammatory molecules that are involved in oxidative stress in hyperglycemia. AOPPs may be used as a marker of oxidative stress in patients with hyperglycemia.

Keywords: Advanced oxidation protein products (AOPPs), Hyperglycemia, Oxidative stress, *Prunus spinosa* L., C57BL/6 mice

Hepatoprotektivni učinak *Aronia melanocarpa* u C57BL/6 miša

Irena Landeka Jurčević^{1*}, Valentina Vučinić¹, Mandica-Tamara Tolić¹,
Petar Dragičević², Domagoj Đikić³

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Pierotijeva 6, HR -10 000 Zagreb

²Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3, HR - 10 000 Zagreb

³Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagreb,
Rooseveltova trg 6, HR - 10 000 Zagreb

*Dopisni autor: ilandeka@pbf.hr

Sažetak

Aronia melanocarpa je voće bogato fenolnim spojevima – uglavnom flavonoidima iz podrazreda antocijana. Antocijani su u vodi topljivi biljni pigmenti s antioksidacijskim, protuupalnim, antimikrobnim, hepatoprotektivnim i gastroprotektivnim svojstvima. Proučavan je učinak praha *A. melanocarpa* (PAM) u miša sa 2 %-tnim kolesterolom izazvanom hiperkolesterolemijom. PAM (1 g/kg/dan) je primjenjen oralno. Malondialdehid (MDA), superoksid dismutaza (SOD) i glutation (GSH) određeni su u jetri miša i korišteni kao biokemijski markeri oksidacijskog stresa. Primjena kolesterola izazvala je lipidnu peroksidaciju u jetri za 46,68 % u odnosu na kontrolnu grupu životinja (izmjereno preko malondialdehida - MDA). U usporedbi s kontrolom, SOD (12,3 %) i GSH (58,8 %) znatno su povećani ($p < 0,05$) u grupi miševa koji su tretirani sa prahom aronije.

Ključne riječi: hepatoprotektivni učinak, *Aronia melanocarpa*, MDA, SOD, GSH

Uvod

Poznata je činjenica da reaktivne kisikove vrste (ROS) i druge prooksidacijske vrste nastaju kao sporedni proizvodi važnih biokemijskih procesa aerobnih organizama. Tijekom evolucije razvijeni su zaštitni mehanizmi koji sprječavaju nastanak ili razlažu već nastale prooksidacijske vrste, popravljaju i mijenjaju oštećene molekule. Pod normalnim uvjetima produkcija prooksidacijskih vrsta je u ravnoteži sa antioksidacijskom zaštitom organizma. Međutim, pod utjecajem različitih endogenih i/ili egzogenih faktora koji djeluju stresno, ova ravnoteža se može narušiti, odnosno može dovesti do povećane produkcije prooksidansa i/ili smanjenja antioksidacijske zaštite organizma. Ovakvo stanje naziva se oksidacijski stres, i uzrok je ili prateći faktor u patologiji mnogih bolesti (Ferrari, 2001).

S obzirom da naš endogeni antioksidacijski sustav obrane nije adekvatan da u potpunosti spriječi prekomjernu produkciju slobodnih radikala i oksidacijski stres, neophodno je unošenje dodatnih količina antioksidansa. Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidacijske procese i smanjuju ili onemogućavaju oksidaciju supstrata čak i ako su prisutni u značajno nižim koncentracijama od oksidiranog supstrata (Gutteridge i Halliwell, 2010). U novije vrijeme, zbog dokazanih toksičnih efekata, upotreba sintetičkih antioksidansa se napušta, a interes za primjenu prirodnih stalno raste. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučuje dnevni unos od najmanje 400 g voća i povrća u cilju smanjenja kancerogenih

bolesti i bolesti izazvanih starenjem (Hoffmann i sur., 2003.). Aronija je biljka koja pripada porodici ruža (*Rosacea*), porijeklom je s istoka Sjedinjenih Američkih Država i graničnih dijelova Kanade (Wawer, 2009). Glavnu skupinu aktivnih tvari u aroniji čine polifenoli, pogotovo antocijani i procijanidini, te su isti zaslužni za antioksidacijska svojstva biljke. Ukupan sadržaj fenola varira između 2000-8000 mg/100g osušene mase (Benvenuti i sur., 2004.). Pozitivni učinci aronije postoje upravo zbog bogatog izvora antioksidansa koji svojim djelovanjem vežu slobodne radikale i na taj način sprečavaju njihovo štetno djelovanje na organizam (Oszmianski i Wojdylo, 2005). Znanstvena istraživanja su pokazala da se među bobičastim voćem, po antioksidacijskoj aktivnosti odnosno sadržaju polifenola, izdvajaju plodovi aronije. Sok dobiven od plodova aronije ispoljava čak i do 4 puta veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ostale polifenolima bogate napitke, kao što su sok od borovnice, sok od ribizle i crveno vino (Seeram i sur., 2008). Slobodni radikali nastali u krvi i tkivima mogu izazvati oksidaciju na višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje sadrže visoko reaktivne dvostruke veze. Time započinje proces lipidne peroksidacije (LPO). Zasićene masne kiseline su kemijski stabilne dok kod nezasićenih masnih kiselina brzina oksidacije raste s povećanjem stupnja nezasićenosti. Lipidi u biološkim sustavima sadrže višestruko nezasićene masne kiseline u obliku fosfolipida, estera, triacilglicerola, kolesterola, slobodnih masnih kiselina tako da se LPO potaknuta slobodnim radikalima nesmetano odvija i u fiziološkim uvjetima (Catala, 2009). Aronija se može koristiti kao učinkoviti antioksidans koji štiti α -tokoferole i nezasićene lipide u prehrambenim proizvodima. Antioksidacijski potencijal aronije je dokazan brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Također, pozitivno djelovanje na oksidacijski stres, mjereno brojnim biokemijskim markerima navodi se od strane mnogih autora. Kardioprotektivna aktivnost crnoplodne aronije se može pripisati sposobnosti njenih ekstrakta bogatih antocijanima pri snižavanju koncentracije lipida u krvi, antiagregacijskom i vazoaktivnom učinku. Također, aronija sadrži i značajnu količinu niacina koji blagotvorno djeluje na snižavanje koncentracije lipida u krvi (Ganji i sur., 2003). Mješavina antocijana, procijanidina i fenolnih kiselina u aroniji, predstavlja jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidansa. Zahvaljujući ovome, plodovi aronije i od njih dobiveni proizvodi smatraju se efikasnim u očuvanju zdravlja. Ovo se prije svega odnosi na povoljne efekte na kardiovaskularno zdravlje, održavanje normalnih funkcija urinarnog trakta, zaštitu od virusa i bakterija te poboljšanje memorije. Također proizvodi od aronije pokazali su inhibicijsko djelovanje na proliferaciju kancerogenih stanica, kao i hepatoprotektivno i antidijabetičko djelovanje kroz smanjenje hiperglikemije i hiperlipidemije (Chrubasik i Chrubasik, 2010). Cilj ovog rada bio je ispitivanje konzumacije praha aronije na markere oksidacijskog stresa i mogućnosti korištenja iste u terapijske svrhe.

Materijali i metode

Pokusne životinje

Pokusi su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 30 dana. Miševi su bili na temperaturi od 22 °C, uz neograničen pristup hrani i vodi. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje

se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja ($n = 8$ životinja po grupi): KO - kontrolna grupa; CH – 2 % kolesterol; PAM - prah aronije (1 g/kg/dnevno); CH + PAM – 2 % kolesterol + prah aronije. Životinje su žrtvovane 30.-ti dan pokusa te su uzeti organi jetre za daljnju analizu. Životinje su anestetizirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Organi su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi, izvagani te pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ za daljnju analizu.

Priprema tkiva za određivanje antioksidacijskih enzima

Svježe tkivo homogenizirno je u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v). Organi su potom homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorci su cijelo vrijeme držani na ledu. Homogenati jetre potom su centrifugirani pri $20\,000 \times g$ tijekom 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mjerenje lipidne peroksidacije

Prisutnost lipidne peroksidacije određivana je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2008). Ova metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malondialdehid reagira sa tiobarbiturnom kiselinom i stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski. Uzorcima jetre mase 100 mg dodano je 1 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.0) i potom su uzorci homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10 %. Homogenati su centrifugirani centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm. 200 μL supernatanta pomiješano je sa 200 μL 8,1 %-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20 %-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3.5) i 1,5 mL 0.81 %-tne vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Smjesa je zagrijavana 60 minuta pri temperaturi od $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ohlađenim uzorcima izmjerena je apsorbancija pri 532 nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Koncentracija je izračunata prema formuli (jed. 1):

$$c(\text{MDA}) = A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \varepsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL}) \quad (1)$$

gdje: $\varepsilon = 1,56 \times 10^5$ 1/M cm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao nmol MDA/mg proteina.

Aktivnost reduciranog glutationa

Postupak određivanja koncentracije GSH se temelji na reakciji GSH i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri 412 nm, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003). Koncentraciju smo izračunali prema formuli (jed. 2):

$$c(GSH) = \Delta A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \varepsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL}) \quad (2)$$

gdje ε (DTNB) = 8,22 1/mM cm. Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izražena je kao mU/mg proteina.

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza katalizira dismutaciju superoksidnih radikala (O_2^*) u vodikov peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula H_2O_2 oksidira u O_2 , a druga reducira u H_2O_2 . Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata jetre inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i sur. (1971). U staklenu kivetu s 1,45 mL otopine A dodano je 25 μl uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7,8 bez EDTA-e) i reakcija je započeta dodatkom 25 μl otopine B. Vrijeme reakcije mjereno je 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak termostatiran je na 25 °C. Kako aktivnost ksantin-oksidge može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Aktivnost SOD-a izražena je kao U/mg proteina.

Statistička analiza

Statistička analiza podataka napravljena je pomoću SPSS Statistics verzija 17 (SPSS Inc, Chicago, IL). Dobiveni podaci izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba netretiranih i tretiranih skupina miševa napravljena je ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti podešen je na $p < 0,05$. Post-hoc analize su napravljene koristeći Kruskal-Wallis ANOVA test kako bi ustanovili razlike između pokusnih grupa.

Rezultati i rasprava

Uloga namirnica biljnog porijekla u prevenciji kardiovaskularnih bolesti pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, polifenolima. Polifenoli predstavljaju najznačajnije dijetetske antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama biljnog porijekla i da imaju visok antioksidacijski kapacitet

(Scalbert i sur., 2005). Faktori rizika za nastanak KVB često su praćeni poremećajima oksidacijskog statusa. Iako se veća efikasnost dijetetskih antioksidansa očekuje kod ljudi s prisutnim faktorima rizika ili već razvijenim bolestima, njihova dugotrajna konzumacija može ispoljiti povoljne efekte na pojedine markere oksidacijskog stresa i u slučaju zdravih ispitanika (Zamora-Ros i sur., 2013). Zreli plodovi aronije sadrže veliku količinu biološki aktivnih spojeva poznatih pod imenom polifenolni spojevi. U aroniji najzastupljeniji su proantocijanini, antocijanini te flavonoli. Udio polifenolnih spojeva u aroniji je mnogo veći u usporedbi s ostalim bobičastim voćem kao što su borovnica, kupina i malina (Jakobek i sur., 2012). Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres odnosno indukciju “antioksidacijskih” enzima. Ujedno polifenoli imaju sposobnost keliranja metala te vezanja ugljikohidrata i proteina s pomoću hidroksilnih skupina. U posljednjih nekoliko godina mnogo se govori o učinku aronije na zdravlje ljudi. Nedavne studije su ukazale na njeno antioksidacijsko, antimutageno, hepatoprotektivno, kardioprotektivno, antidijabetičko, kao i antiupalno djelovanje (Jurgoński i sur. 2008; Kulling i Rawel, 2008; Soriano Sancho i Pastore, 2012).

U cilju eventualnog razjašnjenja potencijalnog antioksidacijskog djelovanja praha aronije, ispitan je utjecaj na aktivnost antioksidacijskih enzima. Tri najznačajnija unutarstanična, enzimatska antioksidacijska obrambena sustava su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx). Ovi enzimi su prisutni u plazmi i djeluju pretvarajući reaktivne vrste kisika i reaktivne dušikove vrste u stabilne forme. Superoksid dismutaza sudjeluje u dismutaciji superoksida u vodikov peroksid, a do njegova uništavanja može doći katalazom ili glutation peroksidazom. U tablici 1. prikazani su rezultati utjecaja praha aronije na aktivnost GSH i SOD u jetri životinja. Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0,05$) aktivnosti GSH u jetri zabilježeno je kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu tretirana sa CH ($40,87 \pm 0,51$ mU/mg proteina) u odnosu na KO ($54,78 \pm 0,42$ mU/mg proteina), što dovodi stanice jetre u opasnost od oksidacijskih oštećenja te razvoja bolesti.

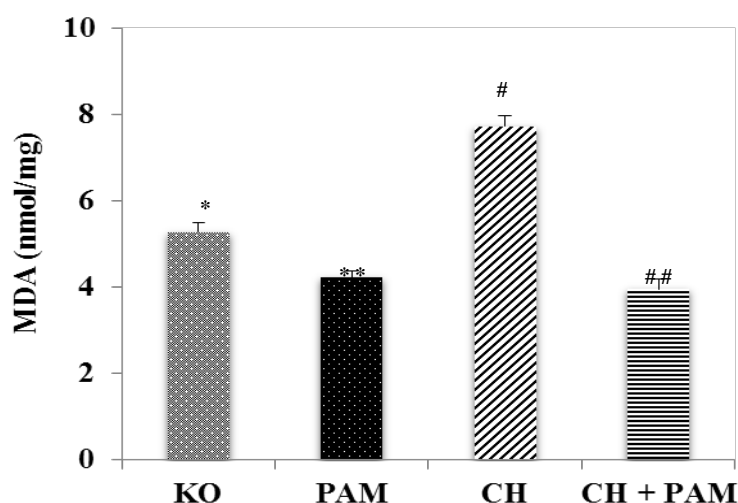
Također, došlo je i do povećanja (ANOVA, $p < 0,05$) aktivnosti GSH kod grupe koja je tretirana sa PAM ($85,35 \pm 0,44$ mU/mg proteina) i grupe koja je uz komercijalno dostupnu hranu tretirana sa CH+PAM ($76,06 \pm 0,48$ mU/mg proteina) u odnosu na kontrolnu vrijednost. Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p < 0,05$) aktivnosti SOD u jetri zabilježeno je kod grupa koje su uz komercijalno dostupnu hranu tretirane sa PAM ($53,05 \pm 3,4$ U/mg proteina) i CH+PAM ($47,38 \pm 3,2$ U/mg proteina) u odnosu na KO ($47,23 \pm 3,2$ U/mg proteina) tretiranih životinja. Kod grupe koja je tretirana sa CH došlo je do statistički značajnog smanjenja (ANOVA, $p < 0,05$) aktivnosti SOD ($29,81 \pm 3,0$ U/mg proteina) u odnosu na KO ($47,23 \pm 3,2$ U/mg proteina). Dakle, aktivnost SOD je za 12,32 % povišena u jetri miševa tretiranih prahom aronije u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što znači da prah aronije ima povoljan učinak na razinu SOD zdrave populacije, a time i hepatoprotektivan učinak. S obzirom na to da je došlo do smanjenja razine SOD u jetri kolesterolom tretiranih miševa za 36,88 % u odnosu na kontrolnu grupu životinja, može se zaključiti da je došlo do pojave oksidacijskog stresa u jetri te skupine životinja, odnosno do pojave hiperkolesterolemije. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Broncel i sur. (2010) pokazali su porast aktivnosti SOD i GPx poslije 2 mjeseca suplementacije ekstraktom aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Porast aktivnosti GPx pokazan je i kod ispitanika sa hiperholesterolemijom koji su konzumirali ekstrakt izoliranih antocijana aronije u trajanju od mjesec dana (Kowalczyk i sur. 2005).

Tablica 1. Koncentracija SOD i GSH u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD. (*KO vs. PAM; #CH vs. CH+PAM. *,# – Srednje vrijednosti su značajno različite; $p < 0,05$ (ANOVA). KO – kontrolna grupa; PAM – prah aronije; CH – kolesterol; CT+PAM - kolesterol+prah aronije)

Table 1. SOD and GSH concentration in the tissues of the liver of the control animals and the treated groups compared to the control. Results are expressed as mean value±SD. (*KO vs. PAM i CH+PAM; #CH vs. CT+PAM. *,# – The mean values are significantly different; $p < 0,05$ (ANOVA). KO - control group; PAM - Aronia melanocarpa powder; CH – cholesterol; CT+PAM – cholesterol+ Aronia melanocarpa powder)

Grupe	KO	PAM	CH	CH+PAM
SOD (U/mg)	47,23±3,2*	53,05±3,4**	29,81±3,0#	47,38±3,2##
GSH (mU/mg)	54,78±0,42*	85,35±0,44**	40,87±0,51#	76,06±0,48##

Također, sok od aronije pokazao je smanjenje oksidacijskog stresa induciranog fizičkom aktivnošću veslača, kroz stimulaciju antioksidacijskih enzima eritrocita nakon jednog mjeseca redovite konzumacije (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005). U animalnim eksperimentalnim modelima, sok od aronije pokazao je povoljan efekt na hiperlipidemiju, snižavanjem povišenih nivoa triglicerida, ukupnog i LDL kolesterola (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2007). Smatra se da je ovakav efekt posljedica antioksidacijskog djelovanja, što je također potvrđeno i u *in vitro* uvjetima. Tako je u plazmi tretiranoj ekstraktom aronije uočen porast u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu, dok je smanjenje stvaranja superoksid-anion radikala pokazano u trombocitima zdravih osoba i pacijenata oboljelih od karcinoma dojke (Kedzierska i sur., 2012; Malinowska i sur., 2012). Mali broj studija u kojima je ispitivan utjecaj kronične konzumacije proizvoda od aronije na oksidacijski status kod ljudi pokazao je porast u aktivnosti antioksidacijskih enzima kao i smanjenje nivoa produkata lipidne peroksidacije (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005). Hepatoprotektivna aktivnost soka aronije je utvrđena u eksperimentu sa štakorima s induciranim oštećenjima jetre primjenom CCl₄, gdje je dodatak soka značajno reducirao histopatološke promjene u jetri poput nekroze, degeneracije hepatocita te upalni infiltrat limfocita, što se pripisuje antioksidacijskim svojstvima aronije, te sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2004). Na slici 1. prikazani su rezultati hepatoprotektivnog učinka praha aronije na koncentraciju MDA u jetri životinja. Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0,05$) koncentracije MDA zabilježeno je kod 2 suplementa u jetri: PAM (4,23±0,16 nmol/mg proteina) i CH+PAM (3,96±0,22 nmol/mg proteina) u odnosu na KO (5,27±0,22 nmol/mg proteina). Kod tretmana sa 2 % kolesterolom došlo je do statistički značajnog povećanja (ANOVA, $p < 0,05$) koncentracije MDA u CH grupi (8,73±0,24 nmol/mg proteina) u odnosu na KO (5,27±0,22 nmol/mg proteina).



Slika 1. Koncentracija MDA u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (*[#] – razlike između tretmana; $p < 0,05$ (ANOVA). KO – kontrolna grupa; PAM – prah aronije; CH – kolesterol; CH+PAM – kolesterol+prah aronije)

Figure 1. MDA concentration in the tissues of the liver of the control animals and the treated groups compared to the control. Values are expressed as means \pm SD (*[#] – differences between treatments; $p < 0.05$ (ANOVA). KO - control group; PAM - Chokeberry powder; CH – cholesterol; CH+PAM – cholesterol+ Chokeberry powder)

Pozitivni efekti aronije i njenih proizvoda na markere oksidacijskog stresa ispitivani su u malom broju dijetetskih interventnih studija kod ljudi. Rezultati tih studija potencijalno antioksidacijsko djelovanje baziraju upravo na smanjenju koncentracije MDA. Značajno smanjenje koncentracije MDA u serumu pokazano je nakon osam tjedana konzumacije ekstrakta aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom (Broncel i sur., 2010), kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije prije izvođenja ergonometrijskog testa (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005). Lipidi, odnosno masne kiseline sa većim brojem dvostrukih veza smatraju se biološkim komponentama koje su najpodložnije oksidacijskom oštećenju. U slučaju narušene ravnoteže između stvaranja ROS i antioksidacijske zaštite dolazi do oksidacije PUFA u staničnoj membrani, što mijenja njene fizičko-kemijske karakteristike i narušava uobičajenu funkciju (Ozbay i Dülger, 2002). Ovo se zasniva na činjenici da je stanična membrana prva linija odbrane stanice od slobodnih radikala kao i da ima visok sadržaj lipida, odnosno PUFA. Među brojnim indeksima koji se uz primjenu odgovarajućih metoda koriste za ocjenu oksidacijskog statusa najčešće su korišteni pokazatelji nivoa lipidne peroksidacije. Polifenoli se smatraju bioaktivnim sastojcima plodova aronije i njihovih proizvoda, zaslužnim za povoljne efekte na očuvanje zdravlja ljudi. Među prisutnim klasama polifenola, najviše pažnje posvećuje se antocijanima, koji čine oko 25 % ukupnih polifenola u plodovima aronije. Smatra se da njihov doprinos antioksidacijskoj aktivnosti soka od aronije iznosi i do 40 % (Zheng i Wang, 2003). Antocijani su u plodovima aronije prisutni u formi cijanidin-3-glikozida, i to kao arabinozid, glukozid, galaktozid i ksilozid. Da bi polifenoli, kao i druge komponente hrane, djelovali u organizmu, moraju putem krvi doći do tkiva, odnosno stanica ciljnih organa. Zbog toga je neophodno identificiranje formi i metabolita u kojima su polifenoli prisutni u organizmu.

Za većinu polifenolnih spojeva pokazano je da se intenzivno metaboliziraju, te se molekularne forme u kojima su prisutni u cirkulaciji razlikuju od oblika u kojima su prisutni u hrani. Kao rezultat metaboličkih transformacija, polifenoli su u organizmu najčešće prisutni u formi metabolita, konjugata, odnosno glukuronida i sulfata, koji mogu biti dodatno metilirani (Kroon i sur., 2004). Iako je zabilježen značajan pomak u identifikaciji formi u kojima su polifenoli prisutni *in vivo*, podaci koji se tiču bioraspoloživosti i metabolizma antocijana nisu u potpunosti uniformirani. U literaturi se antocijani često navode kao klasa polifenola sa slabom apsorpcijom i brzom eliminacijom, te veoma niskom bioraspoloživošću. U skladu sa tim, kompromitirani su zaključci o njihovom djelovanju *in vivo* (Manach i sur., 2005). Ipak, novije istraživanje identificiralo je cijanidin-glikozide u neizmjenjenoj formi i u formi metabolita u organizmu, nakon konzumacije soka od aronije koji je sadržavao antocijane u relevantnim dnevnim dozama. Prisustvo neizmjenjenih formi antocijana, njihovih glukuronida i metiliranih derivata, pokazano je u plazmi i urinu u toku 24 h po unošenju soka (Wiczowski i sur., 2010). Suprotno pojedinim literaturnim navodima da se antocijani u cirkulaciji nalaze isključivo u formi nemetaboliziranih glikozida, Kay i sur. su nakon administracije cijanidin-3- glikozida odraslim muškarcima, kao najzastupljenije forme u serumu detektirali konjugirane metabolite (Kay i sur., 2005). Studije provedene na štakorima pokazale su da se antocijani brzo apsorbiraju u želucu i tankom crijevu, kao i da imaju široku distribuciju u organizmu (Felgines i sur., 2009; Talavéra i sur., 2004). Njihovo prisustvo u različitim organima, uključujući srce i masno tkivo svjedoči o potencijalnim povoljnim efektima koje bi antocijani mogli ispoljiti na očuvanje zdravlja ljudi i prevenciju KVB i drugih kroničnih bolesti.

Zaključci

U provedenom istraživanju hepatoprotektivnog učinka praha aronije na jetri C57BL/6 miša došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije MDA kod grupe životinja koja je tretirana prahom aronije (PAM) za 19,73 %, dok je kod grupe koja je tretirana sa 2 % kolesterola (CH) radi izazivanja hiperkolesterolemije došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije MDA za 46,68 % u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO). Također je došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti GSH kod grupe tretirane sa CH za 25,39 %, no također je došlo i do povećanja aktivnosti GSH kod grupa koje su tretirane sa PAM za 55,8 % i CH+PAM za 38,85 % u odnosu na kontrolnu vrijednost. Statistički značajno povećanje aktivnosti SOD zabilježeno je i kod grupe koja je tretirana sa PAM za 12,32 %, dok je kod grupe koja je tretirana sa CH došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti SOD za 36,88 % u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Povećanje koncentracije GSH i SOD u jetri kod ispitivanog dodatka praha aronije ukazuje na protektivnu antioksidacijsku aktivnost praha aronije. U istom dodatku došlo je do značajnog smanjenja koncentracije MDA te prema tome možemo zaključiti kako prah aronije snižava rizik od pojave oksidacijskog stresa, kao i lipidne peroksidacije.

Literatura

Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D. (2004): Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes and Aronia, *J. Food Sci.* 69, 164-169.

- Broncel, M., Kozirog, M., Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., Sikora, J., Chojnowska-Jeziarska, J. (2010): Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome, *Med. Sci. Monit.* 16, 28-34.
- Catala, A. (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions, *Chem Phys Lipids.* 157, 1-11.
- Chrubasik, C., Li, G., Chrubasik, S. (2010): The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review, *Phytother. Res.* 24, 1107-1114.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A. (2003): Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal. Biochem.* 312, 224–227.
- Felgines, C., Texier, O., Garcin, P., Besson, C., Lamaison, J. L., Scalbert, A. (2009): Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet, *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1098-1103.
- Ferrari, C. K. B. (2001): Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection, *Int. Med. J.* 8, 175-185.
- Ganji, S. H., Kamanna, V. S., Kashyap, M. L. (2003): Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease, *J. Nutr. Biochem.* 14, 298-305.
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B. (2010): Antioxidants: Molecules, medicines, and myths, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561-564.
- Hoffmann, K., Boeing, H., Volatier, J. L., Becker, W. (2003): Evaluating the potential health gain of the World Health Organization's recommendation concerning vegetable and fruit consumption, *Publ. Health Nutr.* 6, 765-772.
- Jakobek, L., Drenjančević, M., Jukić, V., Šeruga, M. (2012): Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries, *Sci. Hortic.-Amsterdam.* 147, 56-63.
- Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P. A., Geraldine, P. (2008): Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain, *Chem. Biol. Interact.* 176, 108-120.
- Jurgonski, A., Juskiwicz, J., Zdunczyk, Z. (2008): Ingestion of black chokeberry fruit extracts leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia, *Plant Food Hum. Nutr.* 4:178-182.
- Kay, C. D., Mazza, G. J., Holub, B. J. (2005): Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men, *J. Nutr.* 135, 2582-2588.
- Kedzierska, M., Olas, B., Wachowicz, B., Głowacki, R., Bald, E., Czernek, U., Szydłowska-Pazera, K., Potemski, P., Piekarski, J., Jeziorski, A. (2012): Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy, *Fitoterapia.* 83, 310-317.
- Kowalczyk, E., Fijałkowski, P., Kura, M., Krześciński, P., Błaszczuk, J., Kowalski, J., Smigielski, J., Rutkowski, M., Kopff, M. (2005): The influence of anthocyanins from Aronia melanocarpa on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia, *Pol. Merkur. Lekarski.* 19, 651-653.
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., Williamson, G. (2004): How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?, *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 15-21.

- Kulling, S., Rawel, H. M. (2008): Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-a review on the characteristic components and potential health effects, *Planta. Med.* 74, 1625-1634.
- Malinowska, J., Babicz, K., Olas, B., Stochmal, A., Oleszek, W. (2012): Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma, *Nutrition.* 28, 793-798.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230-242.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A. (2005): Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity, *Eur. Food Res. Technol.* 221, 809–813.
- Ozbay, B., Dülger, H. (2002): Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking, *Tohoku. J. Exp. Med.* 197, 119-124.
- Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., Horoszkiewicz-Hassan, M. (2005): The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise, *Int. J. Sport Nutr Exerc. Metab.* 15, 48-58.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
- Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008): Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States, *J. Agric. Food Chem.* 56, 1415-1422.
- Soriano Sancho, R. A., Pastore, G. M. (2012): Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes, *Food Res. Int.* 46, 378.-386.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J. L., Rémésy, C. (2004): Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats, *J. Nutr.* 134, 2275-2279.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev. I., Belcheva, A. (2004): Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats, *Exp. Toxicol. Pathol.* 56, 195–201.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, K., Tancheva, S., Belcheva, A. (2007): Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats, *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 29, 101–105.
- Wiczowski, W., Romaszko, E., Piskula, M. K. (2010): Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans, *J. Agric. Food Chem.* 58, 12130-12136.
- Zamora-Ros, R., Serafini, M., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. M., Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Lapetra, J., Arós, F., Covas, M. I., Andres-Lacueva, C. (2013): PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning, *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* 23, 1167-1174.
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2003): Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries, *J. Agric. Food Chem.* 51, 502-509.

Hepatoprotective effect of *Aronia melanocarpa* in C57BL/6 mice

Irena Landeka Jurčević^{1*}, Valentina Vučinić¹, Mandica-Tamara Tolić¹,
Petar Dragičević², Domagoj Đikić³

¹*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*School of Medicine University of Zagreb, Šalata 3, 10 000 Zagreb, Croatia*

³*Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

*Corresponding author: ilandeka@pbf.hr

Summary

Aronia melanocarpa fruits are rich in phenolic substances—mainly flavonoids from the anthocyanin subclass. The anthocyanins are water-soluble plant pigments with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, hepatoprotective, gastroprotective and other activities. We studied the effect of *A. melanocarpa* powder (PAM) on 2 % cholesterol induced hypercholesterolemia in mice. PAM (1 g/kg/day) was applied orally. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase and also glutathione (GSH) in mouse liver were determined and used as biochemical markers of the oxidative status. The administration of cholesterol increased liver lipid peroxidation in liver of 46.68 % compared to the control group (as measured by malondialdehyde - MDA). Compared with the control, SOD (12,3 %) and GSH (58,8 %) were significantly increased ($p < 0.05$) in the group of mice treated with powder chokeberry.

Keywords: Hepatoprotective effect, *Aronia melanocarpa*, MDA, SOD, GSH

Peptide Derivatives as Inhibitors of SARS-CoV-2-S Protein: Molecular docking study

Vesna Rastija^{1*}, Domagoj Šubarić¹, Maja Karnaš¹, Vijay H. Masand²

¹*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek,
Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia*

²*Vidya Bharati Mahavidyalaya, Department of Chemistry, Amravati,
Maharashtra, 444 602, India*

*Corresponding author: vrastija@fazos.hr

Summary

Molecular docking study was performed to identify new lead inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein (S protein) from the set of 62 peptide derivatives and evaluate their interactions with the receptor. Peptide-type compounds are previously proven peptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors. However, highest binding affinity towards S protein has compound **21** ($E = -127.2$ kcal/mol), which showed the very low inhibitory activity against SARS-CoV 3CL protease. Compound **21** is in conformation that tightly fits along only the subunit S1, making the interactions with RBD and SD2 residues. Formation of a cluster of H-atom acceptor (O and N atoms), allows stronger binding to S1 subdomain. Antiviral drug Remdesivir demonstrated low binding affinity toward the S protein. Compounds that interact with receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike glycoprotein may be potential therapeutic targets for drug design against COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 spike glycoprotein, peptide-type compounds, molecular docking

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes COVID-19, disease which confirmed cases of continues to rise worldwide during the 2020. Till the 25 October 2020, over 42 million cases and 1.1 million deaths have been reported globally (WHO, COVID-19 Weekly Epidemiological Update, 2020). Coronaviruses contain at least four structural proteins: spike (S) protein, envelope (E) protein, membrane glycoprotein (M) protein, and envelope protein (E). Spike surface glycoprotein (S protein) is a component of coronavirus virion particle, which it is responsible for viral recognition of Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2). S protein is a homotrimer composed of three monomers (chains A, B, and C). Each monomeric protein contains an N-terminal ACE2 binding domain (receptor binding domain; RBD), a central helix/heptad repeat, and a C-terminal region that interacts with the plasma membrane (Fig. 1). Binding to the human ACE2, uses it as an entry receptor to invade target cells (Vankadari and Wilce, 2020). S protein is cleaved at the boundary between two subunits, S1 and S2, which remain non-covalently bound in the prefusion conformation (Walls et al, 2020). S1 subunit is responsible for the binding to the host cell receptor, while the S2 subunit for the fusion of the viral and cellular membranes. S1 subunit contains the receptor binding domain (RBD), which consists of two subdomain: the

core and external subdomains (Yuan et al, 2017). Although a novel coronavirus, named SARS-CoV-2, and SARS-CoV S protein share about 96% nucleotide sequence identities and the same functional host cell receptor, ACE2 (Walls et al, 2020), recent study demonstrated that the SARS-CoV-2 S protein binds to ACE2 with higher affinity (Wrapp et al, 2020). Based on that, we assume that SARS-CoV infection could be blocked by inhibitors that bind to the RBD and induce conformational changes in S glycoprotein, preventing the binding to the ACE2.

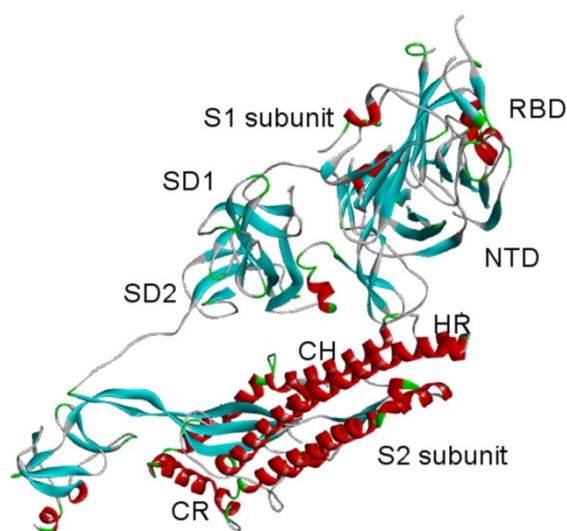


Figure 1. The architecture of SARS-CoV-2 S glycoprotein single protomer (prefusion conformation) (NTD: N-terminal domain; RBD: receptor-binding domain; SD: subdomain; CR: connecting region; HR: heptad repeat; CH: central helix)

In order to research abilities for binding to the SARS-CoV-2 spike glycoprotein (S protein) of previously proven peptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors, predict the preferred binding orientation, and evaluate interactions of the ligand with amino acid residuals of protein, we performed the molecular docking study. Beside of recently recommended combination of remdesivir, hydroxychloroquine, and azithromycin, specific anti-viral treatment against COVID-19 still not exists. SARS-CoV infection could be blocked by inhibitors that bind to the RBD and induce conformational changes in S glycoprotein, preventing the binding to the ACE2. Molecular docking is useful technique for the identification of new lead drug candidates and evaluation of interactions with the receptor with which the drug interacts. Recently, an anti-asthmatic drug Zafirlukast was found by virtual screening to be high affinity binders that may have a potential to inhibit RBD – receptor interaction (Senathilake et al, 2020). Peptide-type compounds have received the attention of researchers because of their confirmed activity against SAR-CoV 3 chymotrypsin-like protease (3CL^{Pro}) (Thanigaimalai et al, 2013a; Thanigaimalai et al, 2013b; Konno et al, 2013). In our recently QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) analysis of a series of peptide-type SARS-CoV main protease (MPro) inhibitors, structural features that govern the MPro inhibitory have been identified (Masand et al, 2020a; Masand et al, 2020b).

Methods

The three dimensional prefusion structure of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein in complex with N-acetyl-D-glucosamine as ligand (NAG) (pdb: 6VSB) was downloaded from the Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Water molecules were removed from protein structure using BIOVIA Discovery Studio 4.5 (Dassault Systems, USA). Set of ligands, 62 peptide-type compounds (**1-62**) have been selected from literature (Thanigaimalai et al, 2013a; Thanigaimalai et al, 2013b; Konno et al, 2013). The general structure of peptide-type compounds is presented in Fig. 2. The structures of ligands and antiviral drug Remdesivir were optimized by the force field MMFF94 available in TINKER (Rackers et al, 2018). Molecular docking on 62 optimized structures of peptide-type compounds (**1-62**), and antiviral drug Remdesivir on S protein was performed using iGEMDOCK (BioXGEM, Taiwan). Genetic parameters for molecular docking were set on: population size 200; generations 70; number of solution or poses: 3).

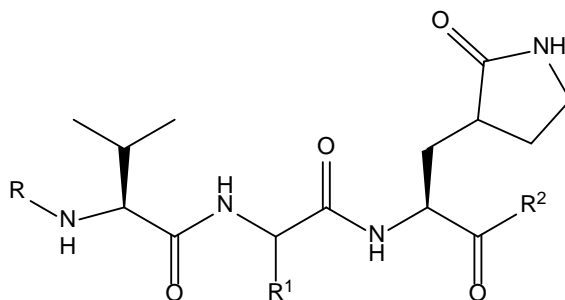


Figure 2. General chemical structure of peptide-type compounds

Binding site of radius 8 Å was defined according the NAG ligand. After the docking procedure, protein-compound interaction profiles of electrostatic (Elec), hydrogen-bonding (Hbond), and van der Waals (vdW) interactions were generated. Docking poses were ranked by combining the pharmacological interactions and energy-based scoring function is: $E = \text{vdW} + \text{Hbond} + \text{Elec}$. Results were viewed and analysed with BIOVIA Discovery Studio 4.5.

Results and Discussion

Ranking of some screened compounds by scoring function are presented in Table 1. According to the results of drug screening, the highest binding affinity towards S protein has compound **21** in docked pose 2 ($E = -127.2$ kcal/mol), but it showed the very low inhibitory activity against SARS-CoV 3CL protease ($pK_i = 6.076$) (Thanigaimalai et al, 2013^a) (Table 1). The compound **47**, which exhibited highest inhibitory activity ($pK_i = 8.523$) against protease (Konno et al, 2013) showed the lower binding affinity to the S protein ($E = -114$ kcal/mol), even of the compound **33** ($E = -117.1$ kcal/mol) ($pK_i = 6.796$) (Konno et al, 2013). The structures of compounds **47**, **33**, and **21** were presented in the Fig. 3. Antiviral drug Remdesivir demonstrated low binding affinity to the S protein. It is obvious that potent SARS-CoV 3CL protease inhibitors have the adverse effect on the S protein. A possible explanation for this opposite effect lies in the binding mode of the observed compounds.

Fig. 4 presents a hydrogen bonds surface of SARS-CoV-2 spike glycoprotein in complex with compounds **47**, **33**, **21**.

Table 1. Some docking scores of the docked poses of dipeptide-type inhibitors and standard antiviral drug Remdesivir in complex with SARS-CoV-2 spike glycoprotein

Compound (pose)	Total energy / kcal/mol	VDW interactions	Hbond
21 (2)	-127.23	-99.86	-27.37
62 (2)	-124.44	-101.61	-22.83
58 (0)	-119.40	-96.30	-23.10
33 (0)	-117.12	-92.41	-24.71
26 (2)	-116.40	-90.70	-25.70
55 (1)	-114.38	-90.02	-24.36
47 (0)	-114.00	-101.327	-12.66
Remdesivir	-110.65	-80.69	-29.95

In Table 2 are given the energies of interactions for these three compounds. Fig. 5 shows two-dimensional diagrams of the main interactions in the binding site of S protein of these three compounds. As can be observed from Figs. 4 and 5, compounds **47** and **33** made poses in a way that they create interactions between the both subunit, S1 and S2. On contrary, compound **21**, which has shown the highest binding affinity, tightly fits along only the subunit S1, making the interactions with RBD and SD2 residues. All three compounds generate H bonds with residuals of RBD of S1 subunit (residues 318-513) through the benzothiazoyl and oxopyrrolidin-3-yl structural moiety. While the compound **47** generates only one H bond with Lys 310, compounds **21** and **33** form additional H bonds with Thr 307 and Glu 309. S1 subunit contains receptor binding domain (RBD), which directly binds to the peptidase domain (PD) of the ACE-2, mediated mainly through polar interactions, and use it to enter the target cell (Yan et al, 2020).

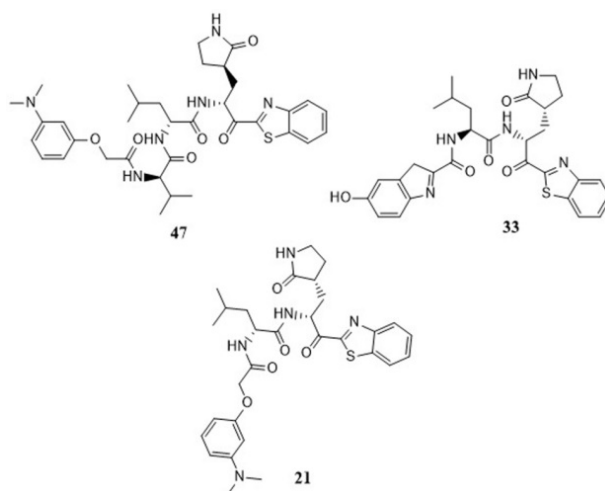


Figure 3. The structures of compounds **47**, **33**, and **21**

Therefore, compounds that bind within the RBD domain may have the potential to inhibit RBD – receptor interaction. Moreover, compound **21** generates one strong H bond with Thr 604 that is the part of the S1 subunit. Compound **21** is in conformation that forms a cluster of H-atom acceptor (O and N atoms) (Fig. 5c), which allows stronger binding to S1 subdomain (Fig. 4).

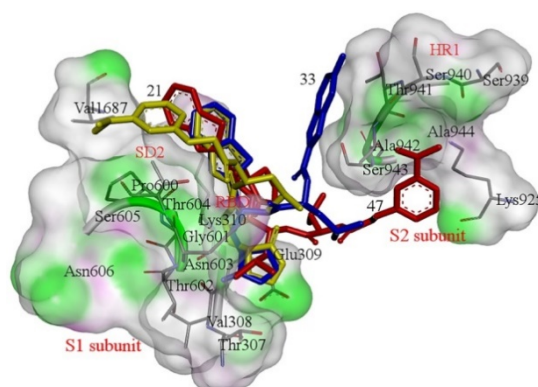


Figure 4. Surface of SARS-CoV-2 spike glycoprotein colored by hydrogen bond type, with receptor donors colored in green and receptor acceptors in cyan in complex with compounds **47** (red), **33** (blue), **21** (yellow). They are visible two subunits of S protein: S1 subunit with the receptor binding domain (RBD) and subdomain 2 (SD2); S2 subunit with heptad repeat 1 region (HR)

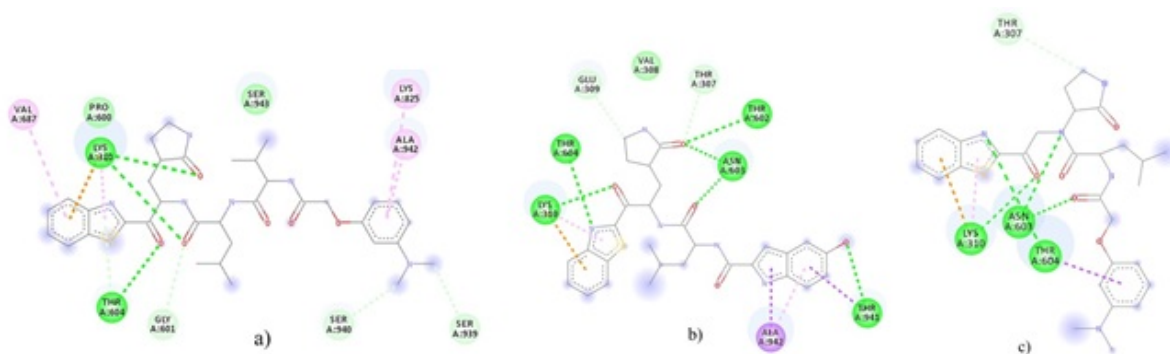


Figure 5. Two-dimensional diagrams of main interactions in the binding site of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and compounds: a) **47**; b) **33**; c) **21**. (Green = conventional hydrogen bond; very light green = carbon hydrogen bond; light green = van der Waals interactions; purple = π - σ interactions, light purple = π -alkyl interactions; light blue = π -donor hydrogen bond; brown = π -anion interaction)

Table 2. Energies of the main interactions between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and molecules **47**, **33**, **21** (M = main chain; S = side chain)

Compound	H bonds		vdW interactions	
	Residual	Energy	Residual	Energy
47	M-Lys 310	-5.87	M-Thr 307	-2.10
	M-Pro 600	-6.50	S-Glu 309	-10.30
	S-Thr 604	-2.50	S-Lys 310	-12.05
			M-Pro 600	-6.66
			M-Gly 601	-3.23
			S-Thr 604	-5.57
			S-Lys 825	-4.91
			M-Ser 940	-2.48
			M-Ala 942	-5.32
			M-Ser 943	-2.87
	33	S-Thr 307	-3.42	M-Thr 307
M-Lys 310		-3.50	M-Val 308	-4.87
M-Pro 600		-2.75	S-Glu 309	-6.98
M-Thr 602		-3.50	S-Lys 310	-10.83
S-Asn 603		-3.50	M-Pro 600	-5.45
S-Thr 604		-3.01	M-Gly 601	-6.57
S-Thr 941		-2.43	S-Thr 604	-5.27
			M-Ser 940	-3.19
			M-Thr 941	-6.40
			M-Ala 942	-9.64
21		S-Glu 309	-1.46	M-Thr 307
	M-Lys 310	-3.50	M-Val 308	-4.44
	M-Pro 600	-3.50	S-Glu 309	-9.08
	S-Asn 603	-6.93	S-Lys 310	-11.79
	S-Thr 604	-11.97	M-Pro 600	-6.77
			M-Gly 601	-4.68
			S-Asn 603	-11.30
			M-Thr 604	-11.00
			S-Thr 604	-11.20
			M-Ser 605	-1.15
			S-Ser 605	-1.41
			S-Val 687	-2.18

Also, compounds **47** and **33** form interaction with residues of S2 subunit: connecting region (Lys 825) and heptad repeat (Ser 940, Thr 941, Ala 942, Ser 943). S2 subunit is responsible for viral and host cell membrane fusion process. When S1 binds to the host receptor ACE-2, cleavage site on S2 is exposed and S protein is proteolytically cleaved at the S1-S2 boundary by host proteases (Belouzard et al, 2009). Molecular docking study of binding human immunoregulatory factor for hijacking and virulence, CD26 to S1 domain of COVID-19 spike glycoprotein, also highlighted interactions with residues of S1 domain that interact with the ACE-2 (Walls et al, 2020). Consider that compound **21** binds only with the residues of S1, it

can strongly inhibit the host cell receptor recognition. Therefore, compound **21** and other compounds that interact with receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike glycoprotein may be potential therapeutic targets for drug design against COVID-19.

Conclusions

Molecular docking study has predicted that some of the tested compounds have ability to bind on receptor binding domain of spike surface glycoprotein of SARS-CoV-2 virus and thus may inhibit the binding to the host cell membrane. Structure-based rational design of ligands with enhanced affinities to the S protein may help in the development of inhibitor SARSCoV viral infection.

References

- Belouzard, C., Chu, C. V., Whittaker, G. R. (2009): Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 5871-5876.
- Konno, S., Thanigaimalai, P., Yamamoto, T., Nakada, K., Kakiuchi, R., Takayama, K., Yamazaki, Y., Yakushiji, F., Akaji, K., Kiso, Y., Kawasaki, Y., Chen, S.-E., Freire, E., Hayashi, Y. (2013): Design and synthesis of new tripeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors containing an electrophilic arylketone moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 412–424.
- Masand, V.H., Rastija, V., Patil, M.K., Gandhi, A., Chapolikar, A. (2020a): Extending the identification of structural features responsible for anti-SARS-CoV activity of peptide-type compounds using QSAR modelling, *SAR QSAR Environ. Res.* 31, 643-654.
- Masand, V. H., Akasapu, S., Gandhi, A., Rastija, V., Patil, M. K. (2020b): Structure features of peptide-type SARS-CoV main protease inhibitors: Quantitative structure activity relationship study, *Chemometr. Intell. Lab.* 206, 104172.
- Rackers, J. A., Wang, Z., Lu, C., Laury, M. L., Lagardere, L., Schnieders, M. J., Piquema, J.-P., Ren, P., Ponder, J. W. (2018): Tinker 8: Software tools for molecular design, *J. Chem. Theory Comput.* 14, 5273-5289.
- Senathilake, K. S., Samarakoon, S. R., Tennekoon, K. H. (2020): Virtual screening of inhibitors against spike glycoprotein of SARS-CoV-2: a drug repurposing approach, *Preprints*, 2020030042.
- Thanigaimalai, P., Konno, S., Yamamoto, T., Koiwa, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Yakushiji, F., Akaji, K., Kiso, Y., Kawasaki, Y., Chen, S.-E., Naser-Tavakolian, A., Schön, A., Freire, E., Hayashi, Y. (2013a): Design, synthesis, and biological evaluation of novel dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors: Structure–activity relationship study, *Eur. J. Med. Chem.*, 65, 436-447.
- Thanigaimalai, P., Konno, S., Yamamoto, T., Koiwai, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Yakushiji, F., Akaji, Chen, S.-E., Naser-Tavakolian, A., Schön, A., Freire, E., Hayashi, Y. (2013b): Development of potent dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors with novel P3 scaffolds: Design, synthesis, biological evaluation, and docking studies, *Eur. J. Med. Chem.*, 68, 372-384.

- Vankadari, N., Wilce, J. A. (2020): Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26, *Emerg. Microbes Infect.*, 9, 601.
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., Veesler, D. (2020): Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell* 180, 281-292.
- WHO, COVID-19 Weekly Epidemiological
URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological> (Accessed 27. october 2020).
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., McLellan, J. S. (2020): Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, 367, 1260-1263.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., Zhou, Q. (2020): Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2, *Science*, 367, 1444-1448.
- Yuan, Y., Cao, D., Zhang, Y., Ma, J., Qi, J., Wang, Q., Lu, G., Wu, Y., Yan, J., Shi, Y., Zhang, X., Gao, G. F. (2017): Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains, *Nat. Commun.*, 8: 15092.

5

**Sekcija: KEMIJA U POLJOPRIVREDI
I ŠUMARSTVU**

**Topic: CHEMISTRY IN AGRICULTURE
AND FOREST**



Ekstrakcija metala i metaloida iz uzoraka tla razrijeđenim kiselinama

Vibor Roje*, Darko Grba

Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska cesta 25, HR-10 002 Zagreb

*Dopisni autor: vroje@sumfak.hr

Sažetak

U znanstvenoj literaturi prikazane su brojne analitičke metode za određivanje metala i metaloida u tlima, a u svrhu procjene njihove mobilnosti, odnosno ekološkog rizika uslijed prisutnosti toksičnih elemenata u tragovima ('teških metala') u tlima. Ključni analitički korak pri procjeni biorasploživosti takvih kemijskih elemenata u tlima jest njihova ekstrakcija iz uzorka tla, preciznije izbor ekstrakcijskog sredstva i ostalih ekstrakcijskih uvjeta. Kontekst pojedinog istraživanja često zahtjeva primjenu nekog blagog, odnosno ekstrakcijskog sredstva koje je blaže od, primjerice, ponajčešće primjenjivane zlatotopke.

U ovom radu provedene su analize odabranih kemijskih elemenata u uzorcima tla koja se sastojala od ekstrakcije pomoću razrijeđenih kiselina (klorovodične odnosno octene kiseline, 0,1 mol/L) u jednom koraku te kvantifikacije analitâ tehnikom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Kao modelni uzorak korišten je certificirani referentni materijal za tlo Metranal-33. Za analizu je odabrano 25 kemijskih elemenata: Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, Zn. Opisanim metodama moguće je kvantificirati 21 od odabranih 25 elemenata. Prezentirani rezultati moći će poslužiti u budućim upotrebama Metranala-33 u sličnim istraživanjima.

Ključne riječi: ekstrakcija, elementi u tragovima, ICP-OES, razrijeđene kiseline, tlo

Uvod

Tlo je dio ekosustava te je ujedno vrlo složen sustav. Izloženo je unosu različitih, pa i potencijalno toksičnih, tvari. Štoviše, tlo može biti shvaćeno i kao moćan rezervoar takvih tvari stoga što, zahvaljujući fizičko-kemijskim karakteristikama, ima mogućnost vezivanja različitih tvari na površini svojih čestica (Dube i sur., 2001). Među takvim, nepoželjnim, tvarima koje mogu dospjeti i biti vezane na površinu čestica tla su metali i metaloidi. Analiza prisutnosti metala i metaloida u tlu, može ići u dva glavna pravca: 1) određivanje prirodno, geogeno, prisutnih elemenata i 2) određivanje antropogeno unesenih metala i metaloida. Nadalje, dvije su moguće svrhe analiziranja antropogeno unesenih toksičnih elemenata u tlo: 2a) procjena biorasploživosti, odnosno mogućnosti njihova ulaska u hranidbeni lanac (Chojnacka i sur., 2005) i 2b) procjena prisutnosti metalâ u zraku, tj. zagađenosti u urbanim i industrijskim područjima (Kingston i sur., 1997). Procjena biorasploživosti, koja podrazumijeva i procjenu mobilnosti elemenata u tragovima u tlu, zahtjeva primjenu odgovarajućih metodologija laboratorijskog dijela istraživanja koje se sastoje od: (i) prevođenja analitâ (dakle, metalâ i metaloidâ) u vodenu otopinu, i (ii) kvantificiranja ('određivanja') odabranih elemenata u priređenim otopinama nekom pogodnom mjernom tehnikom.

Analitičke tehnike koje se uobičajeno koriste u takvim suvremenim istraživanjima su atomske spektrometrijske tehnike, najčešće one s induktivno spregnutom plazmom u kojoj se odvija atomizacija i pobuđivanje atomâ analita: ICP-AES, odnosno još osjetljivija ICP-MS.

Međutim, prilikom planiranja analize potrebno je posebnu pozornost posvetiti izboru metode (reagensa i reakcijskih uvjeta) za prevođenje analitâ u vodenu otopinu. U analitici kemijskih elemenata u tlu, za prevođenje u otopinu uobičajeno se ekstrakcija provodi u drastičnim uvjetima, najčešće zlatotopkom (Kingston i sur., 1997), a s ciljem potpunije geokemijske karakterizacije primjenjuju se i kiselinske smjese koje sadrže fluorovodičnu i/ili perklornu kiselinu (Chandrasekaran i sur., 2015). Nedvojbeno je da su to preagresivni uvjeti raščinjavanja za procjenu bioraspodivnosti metalâ i metaloidâ, zato što se čestice tla raščinjavaju na način da se u vodenu otopinu otpušta veća količina teških metala nego što se to događa u uobičajenim prirodnim uvjetima koji vladaju u tlu. Zbog toga, rađena su mnoga istraživanja prevođenja – dakle, ekstrakcije – različitih metala i metaloida iz uzoraka tla blagim sredstvima, pri sobnoj temperaturi. Slijedom toga, u znanstvenoj su literaturi opisane brojne metode ekstrakcije u jednom koraku, kao i metode sekvencijske ekstrakcije, koje podrazumijevaju primjenu nepuferiranih otopina pojedinih soli (npr. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, itd.), razrijeđenih kiselina (npr. CH_3COOH , HCl , HNO_3), kompleksirajućih reagensa (EDTA, DTPA), ali i sâme deionizirane vode (Lebourg i sur., 1996; Sahuquillo i sur., 2003; Meers i sur., 2007; Rao i sur., 2008; Groenenberg i sur., 2017).

Ovaj rad nastao je u širem kontekstu naših istraživanja metala i metaloida u tlima uz primjenu blagih sredstava za ekstrakciju (Roje i sur., 2015; Roje i Galinec, 2019). U tekstu su opisane metode za analizu 24 odabrana kemijska elementa u uzorcima tla, a sastoje se od: (i) ekstrakcije razrijeđenom – octenom ili klorovodičnom – kiselinom množinske koncentracije $c = 0,1 \text{ mol/L}$, te (ii) kvantifikacije analitâ atomskom emisijskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Kao modelni uzorak tla upotrijebljen je certificirani referentni materijal Metranal-33. Rezultati prikazani u ovom radu pružaju uvid u različite ekstrakcijske moći korištenih reagensa te će ujedno moći poslužiti kao orijentacijske vrijednosti u budućim primjenama ovog certificiranog referentnog materijala u sličnim istraživanjima, poglavito zbog toga što su podaci o udjelima elemenata u referentnim materijalima za tla dobiveni nakon ekstrakcije u blagim uvjetima malobrojni.

Materijali i metode

Kemikalije i pribor

U ovom istraživanju korišten je certificirani referentni materijal za tlo Metranal-33 (Analytika, Prague, Czech Republic). Otopine za ekstrakciju pripravljene su razrjeđivanjem octene kiseline (CH_3COOH , min. 99,5 %, *p.a.*, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) odnosno klorovodične kiseline (HCl , 36 %, *p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za pripravu otopina za kalibraciju ICP-spektrometra korišteni su multielementni standardi:

– *Multi-element Standard Solution* (Al, Ag, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn; 5 % HNO_3), 100 mg/L, Carl Roth, Njemačka

– *Multi-element standard solution III for ICP* (Ca, Mg, K, Na; 5 % HNO_3), Fluka, Švicarska.

Provedena je matrici prilagođena eksterna kalibracija; u priređene otopine standarada dodane su klorovodična odnosno octena kiselina do konačne koncentracije od $c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$.

Sve otopine priređivane su ultračistom vodom (0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Siemens Ultra clear). Ultračista dušična kiselina (HNO_3 , 65 %, Suprapur[®], Fluka) dodavana je u otopine do konačnog $v/v = 1$ %, radi sprječavanja hidrolize. Ista kemikalija korištena je i u otopini za ispiranje spektrometra. Sve posuđe korišteno u radu je od polipropilenske (PP) plastike. Prije upotrebe, posuđe je bilo namočeno u dušičnoj kiselini 10 % (v/v), HNO_3 , 65 %, *p.a.*, Carlo Erba Reagenti, Italija te potom isprano ultračistom vodom.

Ekstrakcija

Uzorci tla (~ 1,0000 g) izvagani su u polipropilenske scintilacijske posudice volumena 20 mL. Rađeno je po pet paralelnih replika ($N = 5$). Kao ekstraktanti korištene su razrijeđene kiseline: octena odnosno klorovodična, svaka koncentracije $c = 0,1$ mol/L. Omjer (m/V) uzorka i ekstrakcijske otopine bio je 1 g/10 mL. Priređene smjese mućkane su na tresilici 24 h, 200 okr/min. Za mućkanje je korištena tresilica Tehtnica Vibromix 403 EVT.

Odvajanje ekstrakata od krutih ostataka uzoraka provedeno je filtriranjem (Sartorius, 0,45 μm) pomoću injekcijskih šprica. Priređene otopine zakiseljene su ultračistom dušičnom kiselinom (v/v 1 %).

Paralelno s uzorcima tla, na isti način tretirane su i slijepa probe ($N = 5$). Detekcijske granice metode (MDL) izračunate su kao trostruka standardna devijacija mjerenja proceduralnih slijepih proba, uvažavajući faktor razrjeđenja.

Multielementna analiza tehnikom ICP-AES

Određivanje analita u ekstraktima obavljeno je atomskim emisijskim spektrometrom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) Thermo Fisher iCAP6300 Duo. Parametri rada instrumenta bili su namješteni u skladu s prethodnom praksom i iskustvima (Roje i Galinec, 2019). Više podataka o spektrometru dano je u tablici 1.

Rezultati i rasprava

Rezultati kvantitativne analize odabranih metala i metaloida u certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33, nakon ekstrakcije octenom, odnosno klorovodičnom kiselinom prikazani su u tablicama 2 i 3.

Ekstrakcija octenom kiselinom

Iz podataka prikazanih u tablici 2, vidljivo je da je, od 25 elemenata odabranih za analizu, uspješno kvantificirano njih 22. Iznimke su Mo i Sb za koje je ustanovljeno da su se u octenokiselim ekstraktima ispitivanog certificiranog referentnog materijala za tlo nalazili u količinama koje su niže od njihovih detekcijskih granica za ovu metodu te Ca čija količina je bila previsoka za kvantifikaciju. Vrijednosti relativnih standardnih devijacija koje su navedene u posljednjem stupcu upućuju na zaključak da su rezultati dobiveni analizom paralelnih uzoraka ('replika') međusobno zadovoljavajuće podudarni. Takav zaključak proizlazi iz činjenice da su vrijednosti RSD za gotovo sve određivane elemente niže od 5 %, a za veliku većinu niže od 10 %.

Iznimke od posljednjeg predstavljaju As, Be i Se što se može protumačiti niskim koncentracijama tih elemenata u ekstraktima, odnosno činjenicom da su kvantificirane vrijednosti razmjerno bliske vrijednostima detekcijskih granica.

Tablica 1. Glavni radni parametri ICP-spektrometra
Table 1. Main operating parameters of the ICP-spectrometer

Parametar	Vrijednost
Instrument	Thermo Fisher iCAP6300 Duo
Snaga RF-generatora	1150 W
Protok rashladnog plina	12 L/min
Protok plina za uzorak	0,65 L/min
Protok pomoćnog plina	0,5 L/min
Sustav za uvođenje uzorka	– automatski uzorkivač CETAC ASX-260 – koncentrični raspršivač s vrtložnom komorom za raspršivanje
Brzina peristaltičke pumpe	45 okr/min
Cijevčice peristaltičke pumpe	– uzorak: narančasto-bijela – ispiranje: bijelo-bijela
Vrijeme uvođenja uzorka	45 s
Vrijeme ispiranja	60 s
Analiza plazme (Plasma view)	Automatska (Auto View)
Maksimalno vrijeme mjerenja	– niske valne duljine (160-230 nm): 15 s – visoke valne duljine (230-847 nm): 5 s
Mjerene linije (nm)	Al – 167,079 Cu – 224,700 Ni – 231,604 As – 189,042 Fe – 238,204 Pb – 220,353 Ba – 455,403 K – 766,490 Sb – 217,581 Be – 234,861 Li – 670,784 Se – 196,090 Ca – 393,366 Mg – 279,553 Sr – 407,771 Cd – 214,438 Mn – 257,610 Ti – 334,941 Co – 228,616 Mo – 202,030 Tl – 190,856 Cr – 205,552 Na – 589,592 Zn – 213,856
Kalibracijske otopine	– 0; 1; 10; 100 µg/L – 1000 µg/L Na, 200 µg/L K, 400 µg/L Mg, 2000 µg/L Ca – priređene u otopinama za ekstrakciju (matrično prilagođena kalibracija)
Otopina za ispiranje sustava	Dušična kiselina, HNO ₃ , Suprapur [®] , 1 % (v/v)

Za octenu kiselinu se općenito smatra da ekstrahira elemente iz karbonatne frakcije čestica tla (Ure, 1996; Rao i sur., 2008). Štoviše, slabe kiseline simuliraju učinak unosa kiselina (npr. prilikom kiselih kiša) u tlo (Sahuquillo i sur., 2003). Metranal-33, koji je bio korišten u ovom istraživanju, predstavlja glineno-ilovasto tlo s normalnim, prirodnim, razinama teških metala pa stoga niski postoci iscrpaka što su navedeni u predzadnjem stupcu tablice 2 nisu neočekivani.

Uočava se da su najveći iscrpci pronađeni za K (17,3 %), Mn (23,8 %) te Co (9,3 %) i Cd (11,5 %). Za većinu ostalih analiziranih elemenata, za koje ih je bilo moguće izračunati, vrijednosti iscrpaka su manje od 1 %.

Tablica 2. Rezultati analize odabranih elemenata u octenom kiselinom priređenim ekstraktima certificiranog referentnog materijala za tla Metranal-33, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$, $N = 5$

Table 2. Results of the analyses of the selected elements in the extracts of the soil certified reference material Metranal-33, that were prepared by acetic acid as an extractant, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0.1 \text{ mol/L}$, $N = 5$

	Certificirane vrij. – totalni maseni udjeli	MDL* mg/kg	Određeno		
			sr.vrij. ± std.dev.	iscrpak %	RSD %
Al	65095	0,008	24,3 ± 0,8	0,04	3,2
As	16,7	0,013	0,033 ± 0,004	0,2	11,4
B	-	0,006	2,42 ± 0,09	n.d.	3,8
Ba	495	0,003	7,55 ± 0,22	1,5	2,9
Be	2,18 ± 0,16	0,008	0,025 ± 0,003	1,1	13,7
Ca	9860	1,20	n.d.	n.d.	n.d.
Cd	0,32 ± 0,04	0,0004	0,037 ± 0,001	11,5	3,6
Co	11,5 ± 0,7	0,010	1,07 ± 0,03	9,3	2,8
Cr	79,8 ± 6,7	0,001	0,102 ± 0,003	0,12	3,2
Cu	29,1 ± 0,8	0,007	0,165 ± 0,005	0,6	3,2
Fe	29030	0,049	2,34 ± 0,20	0,008	8,7
K	18350	0,966	238 ± 8	17,3	3,8
Li	-	0,031	0,526 ± 0,026	n.d.	4,9
Mg	6150	0,032	211 ± 8	3,4	3,8
Mn	600 ± 37	0,021	143 ± 5	23,8	3,5
Mo	-	0,003	< 0,002	n.d.	n.d.
Na	5490	0,222	44,3 ± 1,8	0,8	4,0
Ni	31,3 ± 1,5	0,003	0,857 ± 0,023	2,73	2,6
Pb	33,5 ± 2,4	0,010	0,099 ± 0,008	0,3	7,8
Sb	-	0,022	< 0,022	n.d.	n.d.
Se	-	0,023	0,073 ± 0,007	n.d.	10,1
Sr	-	0,006	9,86 ± 0,39	n.d.	3,9
Ti	4080	0,032	0,193 ± 0,014	0,005	7,1
Tl	-	0,018	0,226 ± 0,008	n.d.	3,7
Zn	81,0 ± 7,6	0,063	1,07 ± 0,05	4,4	5,1

* Detekcijska granica (od engl. Method detection limit)

Ekstrakcija klorovodičnom kiselinom

Rezultati prikazani u tablici 3 sugeriraju da su analize, općenito, provedene sa zadovoljavajućim stupnjem međusobne podudarnosti.

Tablica 3. Rezultati analize odabranih elemenata u klorovodičnom kiselinom priređenim ekstraktima certificiranog referentnog materijala za tla Metranal-33, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$, $N = 5$

Table 3 Results of the analyses of the selected elements in the extracts of the soil certified reference material Metranal-33, that were prepared by hydrochloric acid as an extractant, $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}$, $N = 5$

	Certificirane vrij. – totalni maseni udjeli	MDL* mg/kg	Određeno		
			sr.vrij. ± std.dev.	iscrpak %	RSD %
Al	65095	0,108	133 ± 7	0,2	5,1
As	16,7	0,011	0,298 ± 0,019	1,8	6,5
B	-	0,009	1,64 ± 0,05	n.d.	3,2
Ba	495	11,1	78,4 ± 2,0	15,8	2,5
Be	2,18 ± 0,16	0,017	< 0,017	n.d.	n.d.
Ca	9860	0,751	n.d.	n.d.	n.d.
Cd	0,32 ± 0,04	0,0001	0,185 ± 0,002	59,3	1,2
Co	11,5 ± 0,7	0,015	3,63 ± 0,04	31,6	1,1
Cr	79,8 ± 6,7	0,004	1,89 ± 0,08	2,4	4,3
Cu	29,1 ± 0,8	0,001	4,34 ± 0,20	14,9	4,6
Fe	29030	0,076	407 ± 27	1,40	6,6
K	18350	1,21	667 ± 12	48,6	1,8
Li	-	0,046	1,52 ± 0,05	n.d.	3,0
Mg	6150	0,042	437 ± 12	7,1	2,8
Mn	600 ± 37	0,014	320 ± 4	53,3	1,3
Mo	-	0,002	< 0,002	n.d.	n.d.
Na	5490	0,360	59,5 ± 0,8	1,1	1,3
Ni	31,3 ± 1,5	0,017	5,41 ± 0,10	17,3	1,9
Pb	33,5 ± 2,4	0,005	5,31 ± 0,24	15,8	4,5
Sb	-	0,022	< 0,022	n.d.	n.d.
Se	-	0,003	0,141 ± 0,007	n.d.	4,7
Sr	-	0,010	18,3 ± 0,2	n.d.	1,1
Ti	4080	0,029	0,373 ± 0,020	0,009	8,4
Tl	-	0,024	0,430 ± 0,008	n.d.	1,9
Zn	81,0 ± 7,6	0,022	11,4 ± 0,2	14,1	1,8

* Detekcijska granica (od engl. Method detection limit)

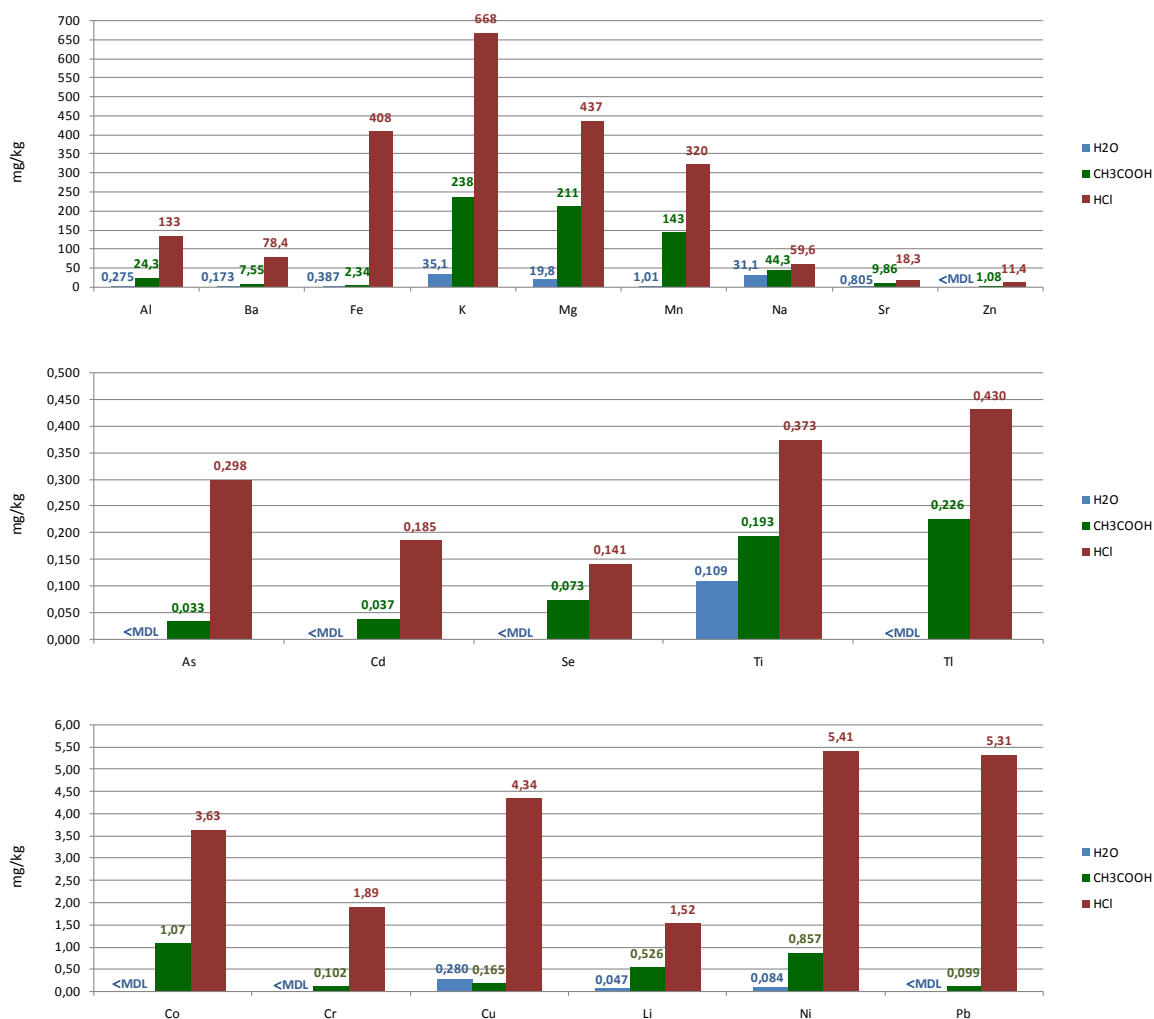
Vrijednosti relativnih standardnih devijacija (RSD), navedene u posljednjem stupcu ove tablice, gotovo sve su niže od 5 %, a sve redom su niže od 10 %. Nadalje, može se uočiti da je od 25 elemenata odabranih za analizu uspješno kvantificirano njih 21. Elementi koje ovom metodom nije bilo moguće kvantificirati u ispitivanim uzorcima su Be, Mo i Sb, zato što su u ekstraktima bili prisutni u koncentracijama nižim od njihovih detekcijskih granica ustanovljenih za ovu metodu. Osim ovih triju elemenata, nije bilo moguće odrediti Ca, zato što se u ekstraktima nalazio u koncentracijama koje su bile previsoke za kvantifikaciju. Za kvantifikaciju kalcija ovakvom metodom ekstrakte bi bilo potrebno podvrći odgovarajućem razrjeđivanju, no to bi izašlo izvan svrhe ovog istraživanja. Za klorovodičnu kiselinu kao

ekstrakcijsko sredstvo u literaturi se može naći da iz uzoraka tla ekstrahira kiselinsko ekstraktabilnu (engl. 'acid-extractable') frakciju metala i metaloida (Rao i sur., 2008). Također, serijom različitih eksperimenata, istraživači su pronašli visoku korelaciju ekstraktabilnosti nekih metala iz uzoraka tla s prisutnošću tih elemenata u nekim biljnim vrstama koje rastu na tim istim tlima (Lindsay i Cox, 1985). Uvidom u vrijednosti iscrpaka danih u tablici 3 uočava se da je određeni broj analiziranih elemenata bio ekstrahiran u razmjerno visokim postocima (Ba – 15,8 %; K – 48,6 %; Mn – 53,3 %; te elementi u tragovima Cd – 59,3 %; Co – 31,6 %; Cu – 18,1 %; Ni – 17,3 %; Pb – 15,8 % te Zn – 14,1 %), dok su ostali elementi za koje je iscrpak bilo moguće izračunati ekstrahirani u mnogo (pa i nekoliko redova veličina) nižim postocima (npr. Al, As, Fe, Ti) što je, osim s kemijskim svojstvima ekstrakcijskog sredstva, prije svega u vezi sa svojstvima ispitivanog tla. Iako u literaturi nije moguće pronaći rezultate ekstrakcije metala ili metaloida blagim sredstvima u jednom koraku iz uzoraka certificiranih referentnih materijala za tlo, već se objavljeni rezultati odnose na analizu realnih uzoraka tla, a ekstraktabilnost pojedinih elemenata uvelike ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama analiziranog tla, moguće je uočiti da su ovdje prezentirani rezultati iscrpaka Cu, Mn te donekle Pb u suglasju s rezultatima koje su Grønflaten i Steinnes (2005) dobili analizom uzoraka šumskog tla.

Usporedba ekstrakcijskih moći

Budući da je ovo istraživanje provedeno na (aliquotnim) uzorcima istog certificiranog referentnog materijala, a uz primjenu dvaju kiselinskih ekstraktanata jednakih koncentracija i jednakih trajanja ekstrahiranja, dobiveni rezultati omogućuju i usporedbu ekstrakcijskih moći upotrijebljenih sredstava za ekstrakciju. Osim toga, budući da je na istom certificiranom materijalu za tlo već obavljeno ispitivanje ekstrakcije odabranih metala i metaloida deioniziranom vodom (Roje i Galinec, 2019), moguća je usporedba rezultata analize dobivenih primjenom tih triju (H_2O , CH_3COOH , HCl) ekstrakcijskih sredstava. Slika 1. usporedno prikazuje srednje vrijednosti masenih udjela odabranih elemenata u referentnom materijalu Metranal-33, a koji su kvantificirani primjenom triju spomenutih ekstrakcijskih sredstava. Prikaz rezultata dobivenih ekstrakcijom vodom načinjen je na osnovi prethodno objavljenih rezultata (Roje i Galinec, 2019).

Usporedbom rezultata prikazanih na slici 1, lako je uočiti da je redosljed triju promatranih ekstrakcijskih sredstava, prema rastućoj ekstrakcijskoj moći za gotovo sve odabrane elemente sljedeći: $H_2O < CH_3COOH < HCl$. Pritom je vidljivo da razrijeđena klorovodična kiselina ekstrahira višestruko u usporedbi s octenom kiselinom, dok octena kiselina jednake koncentracije izvlači mnogo više pojedinog elementa nego što se to događa prilikom ekstrakcije pomoću deionizirane vode. Jedinu iznimku od posljednjeg, prema ovim rezultatima, predstavlja Cu, koji je nešto više ekstrahiran vodom nego octenom kiselinom što može biti tumačeno slabijom topljivošću acetata bakra(II) (Wakeshima i sur., 1992). Imajući u vidu da octena kiselina razara karbonatni sloj ekstrahirajući time tzv. karbonatnu frakciju metala i polumetala s čestice tla, ali i slabije vezane tzv. izmjenjive katione kao i one koji predstavljaju frakciju topljivu u vodi (Ure, 1996; Rao i sur., 2008), razvidno je da klorovodična kiselina čak i razrijeđena, uslijed veće jakosti, ima sposobnost oslobađanja elemenata koji su čvršće vezani za čestice tla, tj. teže se oslobađaju s čestice tla. Voda, pak, ekstrahira one elemente koji su slabim interakcijama vezani na čestice tla (Rao i sur., 2008).



Slika 1. Usporedba masenih udjela (mg/kg) odabranih metala i metaloida određenih u certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33, nakon ekstrakcija provedenih trima različitim ekstrakcijskim sredstvima (deionizirana H₂O; CH₃COOH, 0,1 mol/L; HCl, 0,1 mol/L)

Figure 1. Comparison of the mass fraction values (mg/kg) of the selected metals and metalloids in soil certified reference material Metranal-33, that were measured after extraction procedures performed by using the three different extractants (deionised H₂O; CH₃COOH, 0.1 mol/L; HCl, 0.1 mol/L)

Zaključci

U ovom radu istražene su metode multielemente kvantitativne analize tla, koje se sastoje od ekstrakcije razrijeđenom kiselinom (octenom, odnosno klorovodičnom kiselinom) u jednom koraku te susljedne kvantifikacije odabranih kemijskih elemenata u priređenim otopinama pomoću tehnike ICP-AES. Istraživanje je provedeno na certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33, koji predstavlja čisto, nezagađeno glineno-ilovasto tlo. Analizirano je 25

odabranih elemenata, što elemenata u tragovima što tzv. glavnih elemenata: Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, Zn. Istraživanjem metodama moguće je kvantificirati 21 element. U ekstraktima priređenim klorovodičnom kiselinom nije bilo moguće odrediti Be, Mo i Sb, dok u octeno kiselim ekstraktima nisu kvantificirani Mo i Sb, zato što su ondje bili prisutni u količinama nižima od detekcijskih granica. Također, ovako predviđenim postupcima multielementnog određivanja nije moguće kvantificirati Ca, uslijed njegovih previsokih koncentracija u ekstraktima. Rezultati, u okvirima očekivanog, pokazuju da se klorovodičnom kiselinom iz tla ekstrahiraju veće količine analitâ, negoli je to moguće octenom kiselinom, a obje kiseline iz tla mobiliziraju veće količine elemenata nego što se to postiže deioniziranom vodom. Budući da su na certifikatima referentnih materijala za tlo rijetko prikazane vrijednosti masenih udjela metala i metaloida koje se kvantificiraju blažim ekstrakcijskim sredstvima (tj. ondje su najčešće navedene tzv. 'totalne koncentracije'), rezultati prezentirani u ovom radu moći će poslužiti kao informativne vrijednosti u budućim upotrebama Metranala-33 u sličnim istraživanjima.

Zahvala

Ovo istraživanje nastalo je u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta „Procjena mobilnosti elemenata u tragovima u tlu Medvednice“, koji je financirala tvrtka „Hrvatske šume d.o.o.“.

Literatura

- Chandrasekaran, K., Mamatha, P. R., Karunasagar, D. (2015): Development of a Method for the Microwave-assisted Digestion of Soils Using Dilute Acids and the Simultaneous Determination of 18 Trace Elements by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *At. Spectrosc.* 36 (5), 202-209.
- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H., Górecki, H. (2005): Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants, *Sci. Total Environ.* 337 (1-3), 175-182.
- Dube, A., Zbytniewski, R., Kowalkowski, T., Cukrowska, E., Buszewski, B. (2001): Adsorption and Migration of Heavy Metals in Soil, *Pol. J. Environ. Stud.* 10 (1), 1-10.
- Groenenberg, J. E., Romkens, P. F. A. M., Van Zomeren, A., Rodrigues, S. M., Comans, R. N. J. (2017): Evaluation of the Single Dilute (0.43 M) Nitric Acid Extraction to Determine Geochemically Reactive Elements in Soil, *Environ. Sci. Technol.* 51(4) 2246-2253.
- Grønflaten, L. K., Steinnes, E. (2005): Comparison of Four Different Extraction Methods to Assess Plant Availability of Some Metals in Organic Forest Soil, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36 (19-20), 2699-2718.
- Kingston, H. M., Walter, P. J., Chalk, S., Lorentzen, E., Link, D. (1997): Environmental microwave sample preparation: fundamentals, methods, and applications. In: Microwave-enhanced chemistry – fundamentals, sample preparation, and applications, Kingston, H. M. (Skip), Haswell, S. J. (eds.), Washington DC, USA: American Chemical Society, str. 223-349.
- Lebourg, A., Steckerman, T., Ciesielski, H., Proix, N. (1996): Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol, *Agronomie* 16 (4), 201-215.
- Lindsay, W.L., Cox, F.R. (1985): Micronutrient soil testing for the tropics, *Fert. Res.* 7 (1-3), 169-200.

- Meers, E., Samson, R., Tack, F. M. G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M. G. (2007): Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*, *Environ. Exp. Bot.* 60 (3), 385-396.
- Rao, C. R. M., Sahuquillo, A., Lopez Sanchez, J. F. (2008): A Review of the Different Methods Applied in Environmental Geochemistry for Single and Sequential Extraction of Trace Elements in Soils and Related Materials, *Water Air Soil Pollut.* 189(1-4), 291-333.
- Roje, V., Dujmović, M., Perković, I., Bakšić, D., Pernar, N. (2015): Assessment of mobility of the trace elements in soils from the Medvednica mountain forests. U: XXIV. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 21-24. travnja 2015. – Book of Abstracts, Ukić, Š., Bolanča, T. (eds.), str. 164.
- Roje, V., Galinec, F. (2019): Water as a mild extractant of metals and metalloids from the samples of the selected certified reference materials and subsequent multi-elemental quantification by ICP-AES, *Environ. Monit. Assess.* 191 (9), 534.
- Sahuquillo, A., Rigol, A., Rauret, G. (2003): Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments, *Trends Anal. Chem.* 22 (3), 152-159.
- Ure, A. M. (1996): Single extraction schemes for soil analysis and related applications, *Sci. Total Environ.* 178(1-3), 3-10.
- Wakeshima, I., Yamaoka, K., Kijima, I., Hirai, K., Nagao, Y., Misono, T., Abe, Y. (1992): Synthesis of β -Diketone and β -Keto Ester Complexes of Yttrium(III), Barium(II) and Copper(II), *Nippon Kagaku Kaishi* 6, 619-626.

Extraction of metals and metalloids from soil samples by using diluted acids

Vibor Roje*, Darko Grba

Faculty of Forestry, University of Zagreb Svetošimunska cesta 25, 10 002 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: vroje@sumfak.hr

Summary

In the scientific literature, there are presented various analytical methods for analysis of metals and metalloids in soil. The aim of such analyses is to assess their mobility, *i.e.* the ecological risk that can be posed by presence of toxic elements (so-called 'heavy metals') in the soil. The most important analytical step in the context of an assessment of their bioavailability in soil is extraction of the analytes from soil samples, namely the selection of the extraction medium and other extraction conditions. A context of a research often requires the application of a mild extractant, namely the extractant that is milder than *aqua regia* which is one of the most often used in soil testings.

Two analytical procedures of selected chemical elements in samples of soil certified reference material were performed and are described herein. The analyses consisted of the single-step extraction procedure by using diluted acid (hydrochloric acid or acetic acid, 0.1 mol dm^{-3}) and subsequent quantification of the analytes by inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry (ICP-AES). Soil certified reference material Metranal-33 was used as a model sample. 25 chemical elements were subject to measurement: Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, Zn. With the described procedures it was possible to quantify 21 out of 25 selected elements. The results presented in this paper are useful for future uses of Metranal-33 in similar testings.

Keywords: diluted acids, extraction, ICP-OES, soil, trace elements

6

Sekcija: ZAŠTITA OKOLIŠA

Topic: ENVIRONMENTAL PROTECTION



Učinkovitost uklanjanja P u anoksičnom uvjetu uz NO₃-N kao akceptor elektrona

Dijana Grgas¹, Fran Andrašec¹, Sanja Radman², Mirna Habuda-Stanić³, Tea Štefanac¹,
Tibela Landeka Dragičević^{1*}

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Pierottijeva 6, HR - 10 000 Zagreb

²Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Ruđera Boškovića 35, HR – 21 000 Split

³Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, HR - 31 000 Osijek

*Dopisni autor: tlandekadragicevic@pbf.hr

Sažetak

Uklanjanje fosfata (PO₄-P) istraženo je uz nitrat (NO₃-N) kao akceptor elektrona u anoksičnim uvjetima, uz natrijev acetat kao izvor ugljika. Pokusi su provedeni pri omjeru NO₃-N/PO₄-P 3 i C/N 3 za početnih 20 mg NO₃-N/L i 60 mg NO₃-N/L, kao i pri NO₃-N/PO₄-P 8,5 za početnih 60 mg NO₃-N/L, pri C/N 2. Postignuto je uklanjanje 74-75 % PO₄-P, potpuna denitrifikacija u pokusima pri C/N 3, te denitrifikacija od 66 % pri C/N 2.

Ključne riječi: DPAOs, nitrat

Uvod

Napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) je proces uklanjanja fosfora iz otpadne vode pomoću fosfat akumulirajućih organizama (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*). Iako se većina uklanjanja fosfora iz EBPR procesa postiže anaerobno/aerobnim cirkuliranjem aktivnog mulja, anaerobno/anoksični režim također omogućuje uklanjanje fosfora zahvaljujući sposobnosti skupine PAOs, denitrificirajući PAOs ili DPAOs, koji koriste nitrat (NO₃-N) i/ili nitrit (NO₂-N) umjesto kisika kao elektron akceptor i provode istovremeno unos fosfora i denitrifikaciju. Denitrificirajuća defosfatacija se temelji na metabolizmu, brojnosti i aktivnosti DPAOs, koji anaerobno unose hlapljive mase kiseline (VFA, engl., *Volatile Fatty Acids*) i pohranjuju ih kao polihidroksi alkanooate (PHA), a potrebnu energiju za taj proces dobivaju iz hidrolize polifosfata (poliP), čime se fosfati ispuštaju iz mikrobnih stanica u miješanu tekućinu. Također, u anaerobnoj fazi se troše zalihe glikogena. Zatim, u anoksičnoj fazi DPAOs koriste nitrate i/ili nitrite kao akceptore elektrone za unos fosfata u stanice. U ovoj fazi se nadopunjavaju zalihe glikogena, troše rezerve PHA, te se odvija rast stanica. U anoksičnoj fazi DPAOs asimiliraju više fosfora nego što ga ispuste iz stanica tijekom anaerobne faze, a konačno uklanjanje fosfora iz otpadne vode se postiže uklanjanjem viška aktivnog mulja iz bioreaktora, koji je bogat s polifosfatima. Budući da se u anaerobno/anoksičnoj konfiguraciji procesa tijekom anoksične faze istovremeno uklanjaju dušik i fosfor, postiže se ušteda 50 % na kemijskoj potrošnji kisika (KPK), 30 % potrošnji energije te 50 % manja proizvodnja mulja, denitrificirajuća defosfatacija ima prednost pred konvencionalnim procesom aktivnog mulja, posebno pri obradi otpadnih voda koje karakterizira nizak omjer C/N (ugljik prema

dušiku) jer je KPK često limitirajući čimbenik za denitrifikaciju i uklanjanje fosfora (Kuba i sur., 1993; Kuba i sur., 1996a; Kern-Jespersen i Henze, 1993; Flowers i sur., 2009; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Bunce i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Gnida i sur., 2020).

Iako je većina istraživanja denitrificirajuće defosfatacije usmjerena na anaerobno/anoksičnu konfiguraciju u kojoj su elektron donor – ugljik i elektron akceptor – nitrat i/ili nitrit fizički odijeljeni jer upravo sposobnost DPAOs da unose i pohranjuju organske sastojke u anaerobnim uvjetima im omogućava selektivnu prednost nad običnim heterotrofnim organizmima (OHOs, engl., *Ordinary Heterotrophic Organisms*) (Kuba i sur., 1993; Kuba i sur., 1996a; Kuba i sur., 1996b; Smolders i sur., 1994; Flowers i sur., 2009; Oehmen i sur., 2007; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Bunce i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Gnida i sur., 2020), provedena su istraživanja denitrificirajuće defosfatacije kada su elektron donor i elektron akceptor istovremeno prisutni u bioreaktoru (Jena i sur., 2016; Casey i sur., 1994). Jena i sur. (2016) smatraju da prisutnost elektron akceptora u obje faze dovodi do eliminacije faze feasting/starvation (engl., feasting/starvation, hrv., obilje/gladovanje) (anaerobna faza), čime se mijenja cjelokupni mehanizam procesa. Casey i sur. (1994) nisu zabilježili inhibiciju unosa fosfata u prisutnosti nitrata u anoksično/aerobnoj konfiguraciji. Kuba i sur. (1996b) u kinetičkom modelu neizravno podupiru unos fosfata u prisutnosti nitrata izvještavajući o tome da iscrpljenje nitrata u anoksičnom uvjetima inhibira rast stanica, unos polifosfata i sintezu glikogena. Jena i sur. (2016) su proveli dugotrajne pokuse (180 dana) u anoksično/aerobnoj konfiguraciji u kojoj su obrađivali sintetsku otpadnu vodu s acetatom kao izvorom ugljika, 4000 mg KPK/L, 1000 mg nitrata/L i omjerom KPK/fosfat 137. Postigli su tijekom anoksične faze istovremeno uklanjanje KPK (72 %), nitrata (98 %) i fosfata (86 %), u narednoj aerobnoj fazi uklanjanje još 26 % od preostalog KPK ali uz otpuštanje P što je rezultiralo u konačnici uklanjanjem P od 76 %.

Cilj ovog rada bio je istražiti uklanjanje fosfora u anoksičnim uvjetima, izostavljanjem anaerobne faze procesa, uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona.

Materijali i metode

Otpadna voda i aktivni mulj

U pokusima je korištena sintetska otpadna voda priređena otapanjem soli u destiliranoj vodi sastava: 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0,4/L g FeSO_4 , 0,5 g/L MgSO_4 , 0,4 g/L NaCl , 1 g/L MgCO_3 , 1 g/L CaCO_3 . Sintetskoj otpadnoj vodi je dodano 0,3 mL/L otopine elemenata u tragovima sastava: 1,5 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L H_3BO_3 , 0,03 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g/LKI, 0,12 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L EDTA (Smolders i sur., 1994). Kao izvor ugljika je korišten natrijev acetat, te je dodan u odgovarajućoj količini za željene početne C/N omjere. Početna količina nitrata i fosfata je postignuta dodavanjem odgovarajuće količine otopine 1 g/L KNO_3 i 1 g/L KH_2PO_4 .

Aktivni mulj je dobiven iz lokalnog postrojenja za biološku obradu otpadne vode grada Zagreba, Hrvatska. Aktivni mulj je prije provedbe pokusa radio 3 mjeseca u ustaljenom stanju u roditeljskom SBR (engl., *Sequencing Batch Reactor*, hrv., šaržni reaktor koji radi po fazama).

Dizajn pokusa

Pokusi su vođeni kao šaržni pokusi u laboratorijskim čašama volumena 0,6 L, radnog volumena 0,5 L, postavljenim na magnetsku miješalicu pri 100 o/min. Aktivnom mulju, 2 g MLSS/L (engl., *Mixed Liquor Suspended Solids*, hrv., suspendirane čestice miješane tekućine), je dodana sintetska otpadna voda, natrijev acetat za postizanje C/N omjera 2 i 3, te otopine nitrata i fosfata. Vođeni su pokusi uz omjer $\text{NO}_3\text{-N}/\text{PO}_4\text{-P}$ 3 i C/N 3, uz početnih 60 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$ i 20 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$, kao i pokus pri omjeru $\text{NO}_3\text{-N}/\text{PO}_4\text{-P}$ 8,5 i C/N 2 uz početnih 60 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$. Koncentracija otopljenog kisika tijekom svih pokusa je bila niža od 0,2 mg/L. Pokusi su vođeni pri 22 ± 1 °C. Vrijednost pH je motrena bez korekcije. Pokusi su provedeni u 3 ponavljanja, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost.

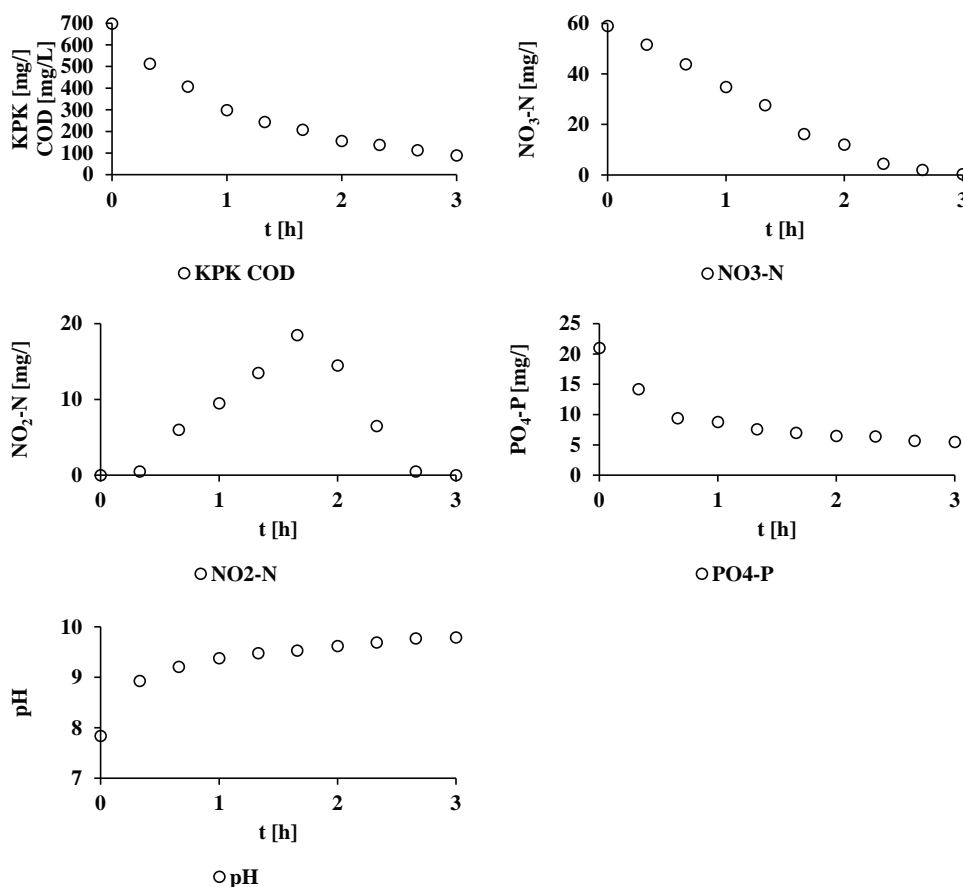
Analitika

U odgovarajućim vremenskim razmacima uzimani su uzorci miješane tekućine, filtrirani kroz 0,45 μm filter papir i analizirani. Određivane su vrijednosti KPK, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ i MLSS prema Standardnim metodama (APHA, 2005), te su motrene vrijednosti otopljenog kiska, pH vrijednosti i temperature pomoću WTW Multi 3420 SET KS1, Njemačka.

Rezultati i rasprava

Rezultati uklanjanja C, N i P pri omjeru C/N 3 prikazani su slikama 1 i 2. Postignuto je potpuno uklanjanje N, uz uklanjanje KPK od 87 % u pokusu sa početnih 60 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$ i 75 % uklanjanje KPK u pokusu sa početnih 20 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$. U tim pokusima, pri omjeru $\text{NO}_3\text{-N}/\text{PO}_4\text{-P}$ 3, ostvareno je uklanjanje P od 74-75 %. U pokusu pri C/N 2 i omjeru $\text{NO}_3\text{-N}/\text{PO}_4\text{-P}$ 8,5 KPK je limitirajući čimbenik denitrifikacije koja je iznosila 66 %, a uklanjanje P iznosilo je 74 %. U većini sustava za obradu otpadne vode biološko uklanjanje dušika i fosfata su najčešće integrirani u jedan sustav s aktivnim muljem. Kombinacija EBPR i konvencionalnih bioloških metoda uklanjanja dušika (nitrifikacija i denitrifikacija) može naići na probleme jer je KPK često ograničavajući faktor za uklanjanje fosfata i denitrifikaciju. To ograničenje se može nadvladati kada su u sustavu za obradu otpadne vode prisutni organizmi sposobni provoditi simultanu denitrifikaciju i asimilaciju fosfora pri anoksičnim uvjetima (DPAOs) (van Loosdrechti sur., 1998; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Bunce i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Gnida i sur., 2020).

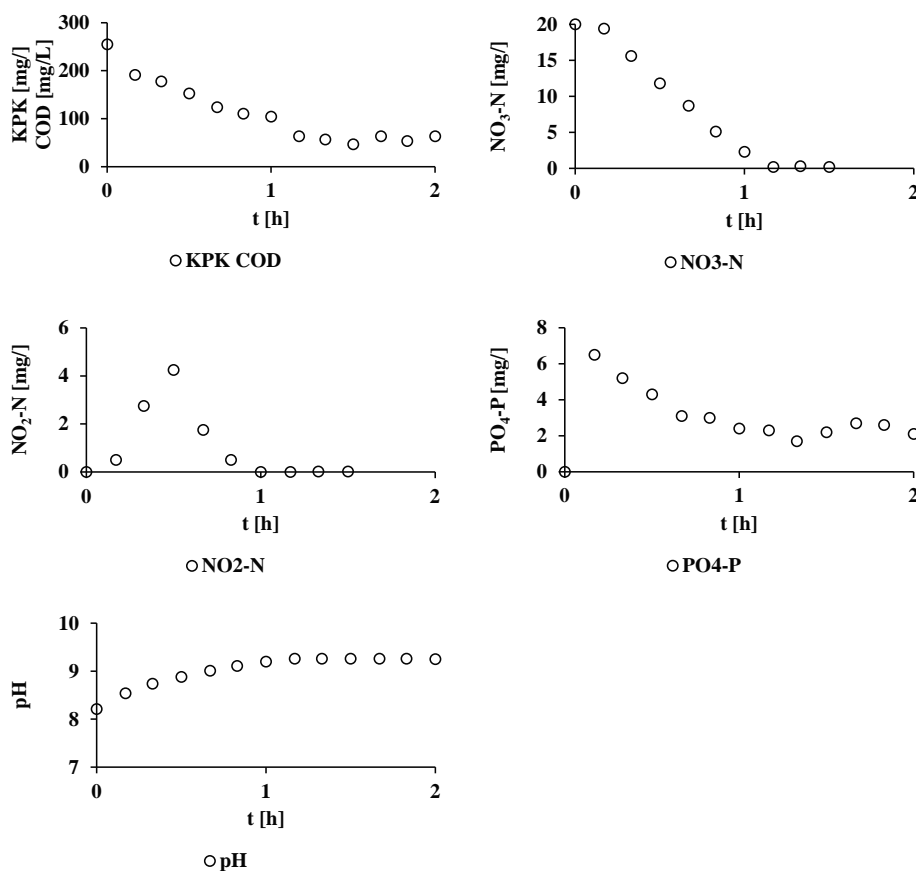
Uklanjanje C, N i P u pokusima pri omjeru C/N 3 (slike 1 i 2) se zbivalo istovremeno, uz denitrifikaciju i prevođenje $\text{NO}_3\text{-N}$ u $\text{NO}_2\text{-N}$ te daljnju redukciju do N_2 , smanjenje KPK do vrijednosti za ispušt u okoliš, kao i istovremeni unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice uz ostvareno smanjenje od 74-75 % $\text{PO}_4\text{-P}$ (Slike 1 i 2). U pokusu pri C/N 2 uklanjanje $\text{NO}_3\text{-N}$ zbivalo se dok je bilo raspoloživog KPK koji je bio dostatan za 66 % uklanjanje N. Također je postignuto uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$ od 74 %.



Slika 1. C, N i P uklanjanje pri anoksičnim uvjetima, pri NO₃-N/PO₄-P 3 i C/N 3, uz početnih 60 mg NO₃-N/L
Figure 1. C, N and P removal at anoxic condition, at ratio NO₃-N/PO₄-P 3 and C/N 3, with initial 60 mg NO₃-N/L

Izvor organskog ugljika je neophodan za postizanje denitrifikacije i EBPR (Oehmen i sur., 2007; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Bunce i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Gnida i sur., 2020). Oehmen i sur. (2007) ističu omjer KPK/P 10-20 povoljan za dominaciju PAOs u EBPR sustavu, a pri omjeru KPK/P >50 GAOs (GAOs, *Glikogen Akumulirajući Organizmi*) dominiraju u EBPR sustavu (Mino i sur., 1998).

U ovom radu pokusi su provedeni pri omjeru KPK/P 34,9 odnosno 36, uz početnih 60 mg NO₃-N/L odnosno 20 mg NO₃-N/L (slike 1 i 2), i nisu imali negativan učinak na uklanjanje PO₄-P, što je u suglasju sa Mino i sur. (1998). DPAOs koriste acetat i pohranjuju ga kao PHA u anaerobnim uvjetima, te ga koriste kao elektron donore u anoksičnim uvjetima (Kuba i sur., 1993; Kuba i sur., 1996a; Kerrn-Jespersen i Henze, 1993; Flowers i sur., 2009; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Bunce i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Gnida i sur., 2020). U pokusima u ovom radu, elektron donor i elektron akceptor su bili istovremeno prisutni i odvijalo se istovremeno uklanjanje KPK, N i P (slike 1 i 2), a slično ponašanje su zabilježili Jena i sur. (2016) i Grgas i sur. (2019).



Slika 2. C, N i P uklanjanje pri anoksičnim uvjetima, pri NO₃-N/PO₄-P 3 i C/N 3, uz početnih 20 mg NO₃-N/L
Figure 2. C, N and P removal at anoxic condition, at ratio NO₃-N/PO₄-P 3 and C/N 3, with initial 20 mg NO₃-N/L

Prisutnost nitrata u anaerobnoj fazi EBPR sustava je poguban za uklanjanje fosfora zbog kompeticije za VFA između PAOs i običnih denitrifikanata (Barker i Dold, 1996). Ipak, kada su istovremeno prisutni nitrati i mulj bogat sa PHA, primjerice kada nakon anaerobne faze slijedi anoksična faza, postižu se istovremena denitrifikacija i uklanjanje fosfora. Denitrifirajuće uklanjanje fosfora se javlja zbog sposobnosti barem jedne frakcije PAOs da koriste nitrat i/ili nitrit kao elektron akceptor za uklanjanje fosfora umjesto kisika (Kern-Jespersen i Henze, 1993; Kuba i sur., 1993).

Denitrifikacija je proces redukcije NO₃-N do plinovitog dušika, kroz slijed reakcija NO₃-N → NO₂-N → NO → N₂O → N₂. U pokusima sa početnih 60 mg NO₃-N/L tijekom denitrifikacije zabilježeno je prevođenje NO₃-N do maksimalne koncentracije od 18,5 mg NO₂-N/L (Slika 1), te potpuna denitrifikacija do kraja pokusa. Biokemijski put denitrifikacije uključuje stupnjevitu pretvorbu NO₃-N do plinovitog N₂, preko intermedijera NO₂-N, NO i N₂O (della Rocca i sur., 2007). Većina istraživanja na metabolizmu DPAOs je provedena koristeći nitrat kao elektron akceptor. Istraživanja sa nitritom su se uglavnom usmjeravala na njegovo

inhibitorno djelovanje te su pokazala da može biti jako toksičan već pri niskim koncentracijama (Bortone i sur., 1996; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Wang i sur., 2019). Nitrit djeluje inhibirajuće i na aerobni i na anoksični unos fosfora (Kuba i van Loosdrecht, 1996; Saito i sur., 2004; Li i sur., 2017; Zeng i sur., 2017; Wang i sur., 2019). Saito i sur. (2004) su istaknuli da je i brzina rasta PAOs također inhibirana tijekom perioda kada je bio prisutan nitrit. Kuba i sur. (1996a) su otkrili smanjenje u unosu fosfora zbog akumulacije nitrita. Meinhold i sur. (1999) su pokazali da nitrit pri niskim koncentracijama (4-5 mg NO₂-N/L) ne utječe negativno na asimilaciju fosfora pri anoksičnim uvjetima i može se koristiti kao elektron akceptor, dok >8 mg NO₂-N/L može potpuno inhibirati asimilaciju fosfora. Ahn i sur. (2001) su ispitali korištenje kisika, nitrata i nitrita kao elektron akceptore u EBPR procesu i rezultati su pokazali da se svo troje može uspješno koristiti. Lee i sur. (2001) su pokazali da se nitrit (do 10 mg NO₂-N/L) može koristiti kao elektron akceptor te da je brzina asimilacije fosfora čak i brža nego kada se kao elektron akceptor koristi nitrat. Korištenje nitrita kao elektron akceptora je moguće ukoliko se on dodaje polukontinuirano u malim obrocima te koncentracija održava ispod 15 mg/L (Ma i sur., 2013). U ovom istraživanju (Slika 1) NO₂-N nije imao inhibicijski učinak na unos P. Rezultati ovih pokusa (Slike 1 i 2) sugeriraju da uklanjanje P nije limitirano raspoloživom količinom elektron akceptora pri istraženim N/P omjerima 3 i 8,5. Grgas i sur. (2019) su istraživali denitrificirajuću defosfataciju preko nitrita pri N/P omjeru 2,1, pri početnih 24,5±1,3 mg NO₂-N/L, pri C/N omjerima 1, 2, 3, 4 i 7. Potpunu denitrifikaciju su postigli pri C/N 4, pri čemu je zabilježeno 72,1% uklanjanje P. Povećanje omjera C/N 7 je smanjilo učinkovitost uklanjanja P, nije narušilo uklanjanje N, te je KPK preostao u obrađenoj vodi. Istaknuli su da pri omjerima C/N 4 i 7 DPAOs nisu bili limitirani s raspoloživom količinom ugljika, međutim, autori sugeriraju moguću limitaciju s raspoloživom količinom elektron akceptora. Oehmen i sur. (2007) sugeriraju da je moguće da *Accumulibacter* skupina sadrži brojne podskupine različitih fenotipskih karakteristika (Carvalho i sur., 2006; He i sur., 2006), poput sposobnosti za denitrifikaciju. Malo je poznato o raznolikosti organizama koji asimiliraju fosfor, no studije pokazuju da je *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, organizam koji pripada redu *Rhodocyclales*, jedan od glavnih PAOs povezanih s uklanjanjem fosfora (Oehmen i sur., 2007). Denitrificirajuća sposobnost *Accumulibacter* organizma nije još potpuno razjašnjena. Pokazano je da PAOs kulture mogu potpuno denitrificirati koristeći nitrat (Zeng i sur., 2003), dok su drugi autori predložili postojanje dvije različite populacije, jedna koja ima denitrificirajuće sposobnosti te druge koja nema sposobnost denitrifikacije (Freitas i sur., 2005; Ahn i sur., 2002; Meinhold i sur., 1999; Kern-Jespersen i Henze, 1993). Na temelju diferencijacije polifosfat kinaza gena (ppk1) pokazano je da postoje dva tipa *Accumulibacter* organizma. Tip I ima sposobnost denitrifikacije koristeći nitrat, dok tip II nema (He i sur., 2007). Ta činjenica pokazuje da postoje dvije različite populacije *Accumulibacter* organizma s različitim afinitetima za nitrat ovisno o morfotipovima i afinitetima za ugljik i dušik. Tip I *Accumulibacter* ima sposobnost denitrifikacije koristeći nitrat, dok tip II nema. To je u korelaciji s prijašnjim studijama koje su pokazale da neke zajednice *Accumulibacter* mogu koristiti nitrat za uklanjanje fosfora dok druge mogu samo nitrit (Carvalho i sur., 2007). Wang i sur. (2007) su ispitali utjecaj temperature na asimilaciju fosfora denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama. Ispitana je brzina asimilacije pri 8-10 °C te 25-26 °C i pokazano je da brzina asimilacije raste s temperaturom, no ne značajno s obzirom na ukupnu količinu asimiliranog fosfora. Pokusi u ovom radu su vođeni pri 22±1 °C, temperaturi koja je povoljna za asimilaciju fosfora, te temperatura nije bila ograničavajući čimbenik u uklanjanju fosfora. U ovom radu pokusi su vođeni bez korekcije pH. Tijekom denitrifikacije vrijednost pH je

rasla. S utroškom KPK, vrijednost pH je postala konstantna. U svim pokusima je pH vrijednost porasla s početnih pH $7,7 \pm 0,5$ na maksimalnih pH $9,5 \pm 0,2$ (Slike 1 i 2).

Profili pH su bili tipični za denitrifikaciju i uklanjanje fosfora. Kuba i sur. (1997) su pokazali da denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi otpuštaju fosfor s porastom pH. Inicijalni pH između 7,0 i 8,0 je pogodan za akumulaciju DPAOs u sustavu koji koristi acetat kao izvor ugljika. Filipe i sur. (2001) ističu vrijednost pH 7,5-8,5 pogodnu za denitrificirajuću defosfataciju, a pri pH većem od 8 dolazi do kemijskog taloženja P (Wang i sur., 2007; Vargas i sur., 2009). U našim pokusima nije zabilježeno kemijsko taloženje P jer je tijekom trajanja cijelog pokusa prisutan P (slike 1 i 2), tako da se u ovom slučaju uklanjanje P može pripisati aktivnosti DPAOs.

Zaključci

Uklanjanje $PO_4\text{-P}$ od 74-75 % i potpuna denitrifikacija postignuto je pri anoksičnim uvjetima uz $NO_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona uz početnu koncentraciju 20 mg $NO_3\text{-N/L}$ i 60 mg $NO_3\text{-N/L}$, i omjer $NO_3\text{-N}/PO_4\text{-P}$ 3, pri omjeru C/N 3. Pri omjeru $NO_3\text{-N}/PO_4\text{-P}$ 8,5 uz početnih 60 mg $NO_3\text{-N/L}$ i C/N 2 postignuto je uklanjanje $NO_3\text{-N}$ od 66 % i 74 % uklanjanje $PO_4\text{-P}$.

Literatura

- Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2001): Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions, *J. Biosci. Bioeng.* 92, 442-446.
- Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2002): Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay, *Water Res.* 36, 403-412.
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, 2005.
- Barker, P. S., Dold, P. L. (1996): Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems, *Water Res.* 30, 769-780.
- Bortone, G., Saltarelli, R., Alonso, V., Sorm, R., Wanner, J., Tilche, A. (1996): Biological anoxic phosphorus removal - the dephanox process, *Water Sci. Technol.* 34, 119-128.
- Bunce, J. T., Ndam, E., Ofiteru, I.D., Moore, A., Graham, D. W. (2018): A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems, *Front. Environ. Sci.* 6, 8.
- Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., Crespo, M. T. B., Reis, M. A. M. (2006): Microbial diversity of the *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade in denitrifying phosphorus removal systems. In: Proceedings of the 11th International Symposium on Microbial Ecology-ISME 11, Vienna, Austria, August 20-25, 2006.
- Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., Reis, M. A. M. (2007): Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure, *Water Res.* 41, 4383-4396.

- Casey, T. G., Wentzel, M. C., Ekama, G. A., Loewenthal, R. E., Marais, G. R. (1994): Hypothesis for the causes and control of anoxic–aerobic (AA) filament bulking in nutrient removal activated sludge systems, *Water Sci. Technol.* 29, 203-212.
- della Rocca, C., Belgiorno, V., Meriç, S. (2007): Overview of *in-situ* applicable nitrate removal processes, *Desalination* 204, 46-62.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001): pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms, *Water Environ. Res.* 73, 223-232.
- Flowers, J. J., He, S., Yilmaz, S., Noguera, D. R., McMahon, K. D. (2009): Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different „*Candidatus Accumulibacter*“ clades, *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 583-588.
- Freitas, F., Temudo, M., Reis, M. A. M. (2005): Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28, 199-209.
- Gnida, A., Żubrowska-Sudoł, M., Sytek-Szmeichel, K., Podedworna, J., Surmacz-Górska, J., Marciocha, D. (2020): Effect of anaerobic phases length on denitrifying dephosphatation biocenosis—a case study of IFAS-MBSBBR, *BMC Microbiology* 20, 222.
- Grgas, D., Štefanac, T., Marković, N., Šipalo, T., Radman, S., Landeka Dragičević, T. (2019): Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita, International Conference 17th Ružička days „Today science – tomorrow industry“, September 19-21, 2018, Vukovar, Croatia, 155-164.
- He, S., Gall, D. L., McMahon, K. D. (2007): „*Candidatus Accumulibacter*“ population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5865-5874.
- He, S., Gu, A. Z., McMahon, K. D. (2006): Fine-scale differences between *Accumulibacter*-like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge, *Water Sci. Technol.* 54, 111-117.
- Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016): Anoxic–aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities, *Biochem. Eng. J.* 105, 80-89.
- Kern-Jespersen, J. P., Henze, M. (1993): Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions, *Water Res.* 27, 617-624.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M. (1996): Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removing bacteria, *Water Sci. Technol.* 34, 33-40.
- Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1993): Biological Phosphorus Removal from Wastewater by Anaerobic-Anoxic Sequencing Batch Reactor, *Water Sci. Technol.* 27, 241-252.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1996a): Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system, *Water Res.* 30, 1702-1710.
- Kuba, T., Murnleitner, E., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1996b): A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms, *Biotechnol. Bioeng.* 52, 685-695.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Brandse, F. A., Heijnen, J. J. (1997): Occurrence of denitrifying phosphorus removing bacteria in modified UCT-type wastewater treatment plants, *Water Res.* 31, 777-786.

- Lee, D. S., Jeon, C. O., Park, J. M. (2001): Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system, *Water Res.* 35, 3968-3976.
- Li, W., Sun, H. Z., Wei, W., Liu, J., Fu, J. X., Wang, J. (2017): Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ.Sci.* 82, 012090.
- Ma, B., Wang, S., Zhu, G., Ge, S., Wang, J., Ren, N., Peng, Y. (2013): Denitrification and phosphorus uptake by DPAOs using nitrite as an electron acceptor by step-feed strategies, *Front. Environ. Sci. Eng.* 7, 267-272.
- Meinhold, J., Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Isaacs, S. (1999): Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal, *Water Sci. Technol.* 39, 31-42.
- Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1998): Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process, *Water Res.* 32, 3193-3207.
- Oehmen, A., Lemos, P. C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L. L., Reis, M. A. M. (2007): Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale, *Water Res.* 41, 2271-2300.
- Saito, T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M. (2004): Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms, *Water Res.* 38, 3760-3768.
- Smolders, G. J., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994): Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 461-470.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Brandse, F. A., de Vries, A. C. (1998): Upgrading of waste water treatment processes for integrated nutrient removal — The BCFS® process, *Water Sci. Technol.* 37, 209-217.
- Vargas, M., Cassas, C., Baeza, J. A. (2009): Maintenance of phosphorus removal in an EBPR system under permanent aerobic conditions using propionate, *Biochem. Eng. J.* 43, 288-296.
- Wang, X., Zhao, J., Yu, D., Chen, G., Du, S., Zhen, J., Yuan, M. (2019): Stable nitrite accumulation and phosphorous removal from nitrate and municipal wastewaters in a combined process of endogenous partial denitrification and denitrifying phosphorus removal (EPDPR), *Chem. Eng. J.* 355, 560-571.
- Wang, Y., Pan, M., Yan, M., Peng, Y., Wang, S. (2007): Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequence batch reactor, *J. Environ. Sci.* 19, 776-782.
- Zeng, R. J., Lemaire, R., Yuan, Z., Keller, J. (2003): Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 84, 170-178.
- Zeng, W., Bai, X., Guo, Y., Li, N., Peng, Y. (2017): Interaction of “*Candidatus Accumulibacter*” and nitrifying bacteria to achieve energy-efficient denitrifying phosphorus removal via nitrite pathway from sewage, *Enzyme Microb. Technol.* 105, 1-8.

P removal efficiency under anoxic condition with NO₃-N as electron acceptor

Dijana Grgas¹, Fran Andrašec¹, Sanja Radman², Mirna Habuda-Stanić³,
Tea Štefanac¹, Tibela Landeka Dragičević^{1*}

¹*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva ulica 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

¹*Faculty of Chemistry and Technology, University of Split,
Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia*

³*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

**Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr*

Summary

Phosphate removal (PO₄-P) was investigated with nitrate (NO₃-N) as an electron acceptor under anoxic conditions, with sodium acetate as a carbon source. The experiments were performed at a ratio of NO₃-N/PO₄-P 3 and C/N 3 for the initial 20 mg NO₃-N/L and 60 mg NO₃-N/L, as well as at NO₃-N/PO₄-P 8.5 for the initial 60 mg NO₃-N/L, at C/N 2. Removal of 74-75 % PO₄-P, complete denitrification in experiments at C/N 3, and denitrification of 66 % at C/N 2 were achieved.

Keywords: DPAOs, nitrate

Influence of graphene oxide on photocatalytic properties of titan (IV) oxide

Igor Jajčinović^{1*}, Don Vito Lukšić¹, Kristina Tolić², Ivan Brnardić¹,
 Tamara Holjevac Grgurić¹

¹Faculty of Metallurgy, University of Zagreb, Aleja narodnih heroja 3, 44 000 Sisak, Croatia

²Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
 Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: jajcinovic@simet.unizg.hr

Summary

Pollution of the environment, especially on water causes increasing pressure on mankind. The use of pharmaceuticals, cleaning agents and pesticides appears to have caused the emergence of new types of pollution in the environment, called micropollutant. Micropollutant cause major changes in plants and animals living in the aquatic environment. One of the processes that cause the total degradation of this type of pollution is photocatalysis. For the process of photocatalysis photocatalyst such as titanium (IV) dioxide (TiO₂) is required. The efficiency of using TiO₂ on a daily sun light is limited due to the high energy banned zone (3-3.2 eV). One of the methods showing the potential is the use of graphene oxide (GO).

In this paper a TiO₂ / GO composites with various concentrations of GO were prepared. The concentrations of GO ranged from 5, 10 and 25 wt. % GO relative to the mass of TiO₂. It was observed that the concentration of GO affects the photocatalytic activity of the obtained composite. Photocatalytic activity was followed by a degradation of salicylic acid in prepared modal solution, in a pilot reactor followed by UV-ViS spectrometry. The prepared catalysts were characterized by scanning electron microscopy (SEM) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

Keywords: photocatalysis, titanium (IV) dioxide, graphene oxide

Introduction

Water is one of the essential requirements for life on Earth which means that it is needed by: humans, plants, animals, and even microorganisms for normal functioning and maintenance of life functions. Water is an irreplaceable resource because it is used in the household for drinking, washing and food preparation, in agriculture for irrigation, while in industry it is used for almost all processes of washing, cooling, dilution, transportation, etc. The quantities of drinking water are not, as previously thought, unlimited (Yu, 2014). This is why it is imperative to actively contribute to water conservation. With the rapid growth of humanity and the advancement of industry, the consumption of clean water is increasing, henceforth increasing amounts of polluted water by various organic and inorganic substances. It does not include pollution, and it should, thermal pollution caused by the discharge of undercooled industrial water directly into the rivers. Much of the water used, either in households or industry, is not treated before it is released into waterways, thus polluting the water, causing a reduction in drinking water resources (Thomas, 2005). Drains and sewage are also one of the potential sources of drinking water pollution. Water pollutants can be at the micro or macro

level, which determines the purification methods. Microscopic contaminants represent the greatest danger arising from their potential properties that cause adverse chemical reactions in the environment that affect human health, and because of their small quantities and size, are very difficult to remove by standard mechanical filtration (Vrček, 2017). The most common water treatment methods are based on the use of activated carbon, ozone, flotation and ozonation. Those methods require higher financial cost, so it is necessary to find and / or use cost-effective methods such as advanced oxidation processes - photocatalysis, the process of complete degradation of a pollutant (Gogate, 2004). Photocatalytic reactions are triggered by photocatalysts - a substance that uses light to accelerate chemical processes that lead to the degradation of a pollutant into harmless compounds (Altmann, 2014). The most commonly photoreactors use suspended or immobilized photocatalysts in which the photocatalyst comes in the form of a thin film. The suspension has a strong oxidizing power and a large surface area available for reactions. The downside of the suspension is the need to subsequently remove the fine dispersed catalyst from the sludge, which is a costly and time consuming process that can be solved by immobilizing the catalyst onto supports such as glass meshes (Plavac, 2017). Photocatalysis is performed with semiconductors such as: TiO_2 , Fe_2O_3 , CdS and ZnO. TiO_2 is one of the most commonly used substance in photocatalytic reactions. Photocatalytic reactors using TiO_2 are very effective in removing the organic and inorganic contaminants present in water with the help of UV light. The end products of the reactions are CO_2 and H_2O (Martinsa, 2018). TiO_2 is characterized by strong oxidizing power, low toxicity, high photocatalytic activity, chemical and photochemical stability and is therefore used in wastewater treatment technologies (Hu, 2017). In this paper, we examined the efficiency of removing pharmaceuticals using glass meshes coated with a layer of a mixture of TiO_2 and graphene oxide in various concentrations.

Materials and Methods

Graphene oxide (GO) and TiO_2 , Aeroxide® P25, Evonik, Germany, tetraethoxysilane (TEOS), VWR Cemical, USA, acetic acid from VWR Chemicals, France, salicylic acid (SA), Kemika Croatia and ethanol, GramMol, Croatia used as received. As a carrier the glass mesh from Keltex, Croatia (CM 300/300, $\rho = 610 \text{ g / m}^2$) was purchased.

Photocatalyst preparation

For the preparation of the immobilized layer TiO_2 and GO were applied to the glass mesh using sol-gel method. Glass meshes are cut into the reactor's dimension and weighed. The suspension from which TiO_2 and GO were applied to the glass mesh was prepared by mixing TiO_2 and MWCNT with distilled water and ethanol (water : ethanol = 1 : 1) on a magnetic stirrer. Three different solutions with different concentrations of GO were prepared. The concentrations of GO ranged from 5, 10 and 25 wt. % GO relative to the mass of TiO_2 . The pH of the suspension was adjusted by adding acetic acid with stirring to pH 1.5-2. After achieving the desired pH, the suspension was mixed for 15 minutes, after which the homogenization was performed with ultrasound for 6 minutes (ultrasonic bath 120W, frequency 40 kHz). After homogenization, TEOS was added and further stirred over a period of 60 minutes at a temperature of 50 °C. Glass mesh is immersed in the prepared suspension and dried. Drying was carried out in a 70 °C drier for 20 minutes. The immersion and drying

procedure was repeated 4 times. The prepared glass meshes were left in air for 7 days, after which they were washed with distilled water, dried and weighed to determine the mass of the applied layer. Clean meshes and meshes with TiO₂ / GO obtained by the described procedure were recorded by scanning electron microscope (SEM, FEG QUANTA 250) operated at 20kV. The presence of TiO₂ and/or GO on fiber glass mesh was determined by using energy dispersion spectroscopy (EDX) mapping analysis. For mapping analysis SEM microscope was operating at 20 kV while working distance was set at 20 mm. Mesh for SEM / EDX analysis were previously fixed to the carrier using double-sided self-adhesive carbon-guided stripes and then then coated with gold-palladium layer. The photocatalytic properties of the catalyst were investigated through the degradation of salicylic acid in the prepared 0.2 mmol / L model solution. The UV-VIS spectrophotometer (Perkin Elmer LAMBDA 35, 200-700 nm with a recording speed of 480 nm / min) was used to monitor the photocatalytic degradation reaction.

Conducting an experiment

Tests for photocatalytic properties were carried out in a batch pilot photoreactor of rectangular geometry (size 4.5 x 17.5 cm) with recirculation by peristaltic pumps with a flow rate of 48 mL/min. The source of the simulated solar radiation (UV-B 2 % / 26 W) is placed 7 cm above the surface of the reaction solution and is covered with a shadow / reflective surface of Al-sheet in order to evenly illuminate the reactor space. The immobilized photocatalyst meshes was placed at the bottom of the reactor and a model solution of SA 100 mL was added. At the beginning of the procedure, a sample of SA 2 mL was taken, after which the reactor was left in the dark for 30 minutes and the sampling was repeated. At the end of the phase in the dark, the source of the simulated solar radiation was included, and the samples were taken periodically 15, 30, 60, 90, 120 minutes.

Results and Discussion

The sol-gel method was use to immobilize the TiO₂ and TiO₂ / GO layers. Fig. 1a shows a clean glass mesh before immobilizing the photocatalyst obtained by SEM. Fig. 1b and 1c shows the glass mesh with the immobilized TiO₂ layer (1b) and the immobilized TiO₂ / GO layer (1c) obtained by SEM.

Comparison of the particle size of the photocatalysts in Fig. 1b and 1c shows that larger particles was formed by immobilization of the TiO₂ / GO (1c) photocatalysts, which negatively affects the active surface of the photocatalyst. EDX analysis determined the chemical composition of the immobilized layer shown in Fig. 1c. The results of EDX analysis was shown in Fig. 2.

EDX analysis showed that TiO₂ and GO immobilized to the glass fibers, and the composition of the analyzed area was shown as evidence of the presence of Ti and C. Other elements present such as silicon (Si) originate from the glass mesh, while gold (Au) and palladium (Pd) as a result of coated Au Pd layer. The immobilized success of the TiO₂ and TiO₂ / GO layers is evident in Fig. 3. Fig. 3 clearly shows the color difference of the meshes without and with the photocatalyst. Binding quality tests of immobilized photocatalysts showed that good bonding occurred because no loss of photocatalyst mass occurred during the analysis. Photocatalytic decomposition of salicylic acid in modal solution was performed as an

example of micropollutant in the environment. Photocatalytic degradation was performed in the reactor as explained in the previous section. The results of photocatalytic degradation are shown in Fig. 4.

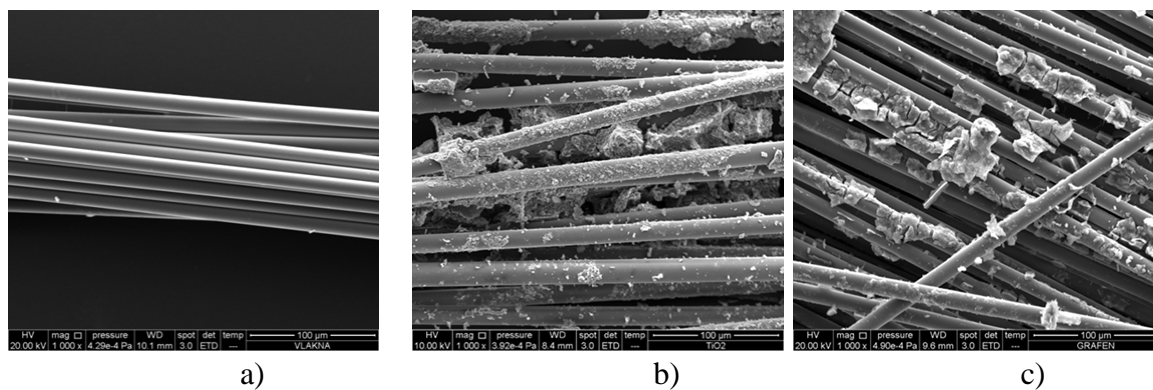


Figure 1. a) Clean glass mesh, b) mesh with immobilized TiO₂, c) mesh with immobilized TiO₂ / GO

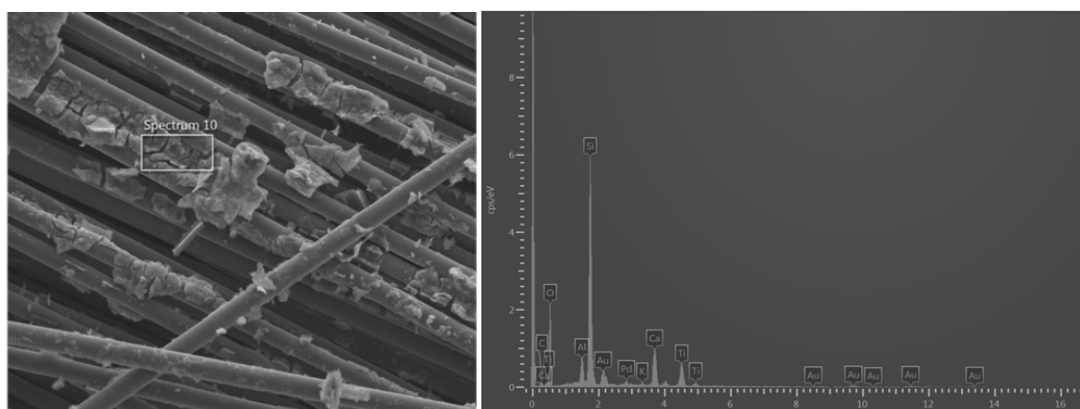


Figure 2. EDX analysis of the immobilized TiO₂ / GO layer

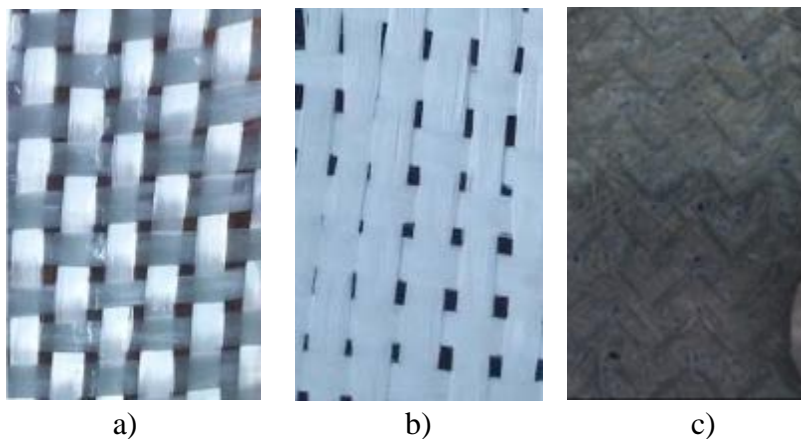


Figure 3. a) Clean glass mesh, b) mesh with TiO₂ layer, c) mesh with TiO₂ / GO layer

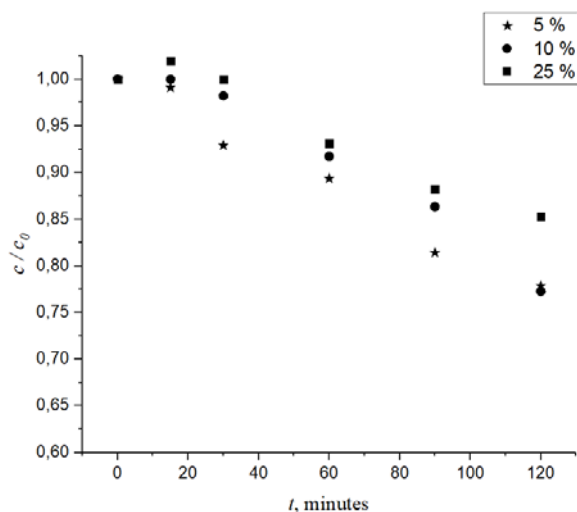


Figure 4. Degradation results of salicylic acid with different concentrations of GO in the TiO₂ / GO photocatalyst

Fig. 4 shows that, after 120 minutes, the best degradation of salicylic acid occurs with the use photocatalyst of a 10 wt.% GO. Increasing or decreasing the GO content leads to a decrease in the photocatalytic activity of the prepared photocatalyst (Tayel et al., 2018).

The photocatalytic degradation results shown in Fig. 5. pointing that the use of pure TiO₂ immobilized on a glass mesh has better photocatalytic properties than immobilized TiO₂/GO.

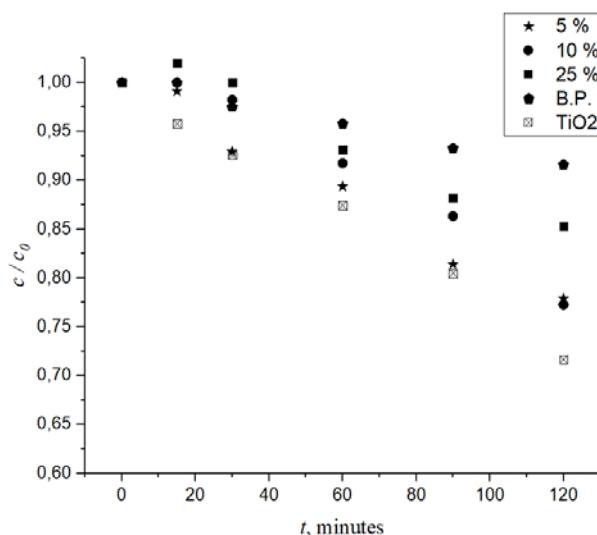


Figure 5. Comparison of salicylic acid degradation with photocatalyst TiO₂ and TiO₂ / GO

Using TiO_2 resulted in a 7 % better degradation than using 10 wt.% GO / TiO_2 . Low photocatalytic degradation is also possible due to the size of the photocatalyst particles (Fig. 1), thereby reducing the active surface of the photocatalyst.

GO inhibits electrical conductivity thus negatively affecting the photocatalytic properties of TiO_2 / GO photocatalysts (Morimoto et al., 2016).

Conclusions

In this paper two types of photocatalysts were prepared by sol-gel method, glass meshes with immobilized TiO_2 and TiO_2 / GO with various concentrations of GO. The concentrations of GO ranged from 5, 10 and 25 wt. % GO relative to the mass of TiO_2 . After preparation, photocatalytic property was investigated through the degradation of salicylic acid in pilot reactor. Comparing the results of the photocatalysis it was concluded that the best result is achieved using the clean TiO_2 . After photocatalysis, SEM and EDX analysis of prepared photocatalysts demonstrated the presence of TiO_2 and GO on glass meshes that confirm the stability of immobilized TiO_2 and TiO_2 / GO.

Acknowledgement

This work has been supported by following projects "Waste & Sun for photocatalytic degradation of micropollutants in water" (OS-Mi), supported by European Regional Development Fund, KK.01.1.1.04.0006. and "PV-WALL" PZS-2019-02-1555 in Research Cooperability Program of the Croatian Science Foundation funded by the European Union from the European Social Fund under the Operational Programme Efficient Human Resources 2014-2020.

References

- Altmann, J., Ruhl, A. S., Zietzschmann, F., Jekel, M. (2014): Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment, *Water Res.*, 55(1), 185-193.
- Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2004): A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions, *Adv. Environ. Res.* 8(3-4), 501-551.
- Hu, J., Li, H., Muhammad, S., Wu, Q., Zhao, Y., Jiao, Q., (2017): Surfactant-assisted hydrothermal synthesis of TiO_2 /reduced graphene oxide nanocomposites and their photocatalytic performances, *J. Solid State Chem*, 253(1), 113-120.
- Martinsa, P. M., Ferreira, C. G., A. R. Silva, Magalhães, B., Alves M. M., Pereira, L., Marques, P. A. A. P., Melle-Francod, M., Lanceros-Méndez, S. (2018): TiO_2 /graphene and TiO_2 /graphene oxide nanocomposites for photocatalytic applications, A computer modeling and experimental study, *Compos. B*, 145(1), 39-46.
- Morimoto, N., Kubo, T., Nishina, Y. (2016): Tailoring the oxygen content of graphite and reduced graphene oxide for specific applications. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep21715>.

- Plavac, B., Grčić, I., Brnardić, I., Grozdanić, V., Papić, S. (2017): Kinetic study of salicylic acid photocatalytic degradation using sol-gel anatase thin film with enhanced long-term activity, *React. Kinet. Mech. Cat.*, 120(1), 385-401.
- Thomas, P. M., Foster, D. G., (2005): Tracking acidic pharmaceuticals, caffeine, and triclosan through, *Environ. Toxicol. Chem.* 24(1), 25-30.
- Tayel, A., Ramadan, A. R., & El Seoud, O. A. (2018): Titanium dioxide/graphene and titanium dioxide/graphene oxide nanocomposites: Synthesis, characterization and photocatalytic applications for water decontamination. *Catalysts.* 8(11) 491.
- Vrček, V. (2017): Farmakoekologija – okolišna sudbina lijekova, *Kem. Ind.* 66(3-4), 135-144.
- Yu, C., Zhou, W., Li, G., Jin, R. (2014): Some Strategies in Designing Highly Efficient Photocatalysts for Degradation of Organic Pollutants in Water, In: *Green Technologies for the Environment*; Obare, et al. (ed.); ACS Symposium Series, Washington, pp. 139-160.

Biorazgradnja LDPE i PS mikroplastike mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*

Dajana Kučić Grgić^{1*}, Martina Miloloža¹, Antonija Kovačević¹,
Ema Lovrinčić¹, Vesna Očelić Bulatović², Kristina Bule¹,
Marija Sigurnjak Bureš¹, Viktorija Prevarić¹, Matija Cvetnić¹,
Šime Ukić¹, Marinko Markić¹, Tomislav Bolanča¹

¹Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR-10 000 Zagreb

²Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Aleja narodnih heroja 4, HR-44 000 Sisak

*Dopisni autor: dkucic@fkit.hr

Sažetak

Stalno povećanje proizvodnje plastike i loše gospodarenje plastičnim otpadom doveli su do ogromnog porasta odlaganja otpada u okoliš. Razgradnjom makroplastike ili ciljanom proizvodnjom čestica mikro veličina nastaju čestice mikroplastike (< 5 mm). Mikroplastika (MP) predstavlja potencijalno štetni učinak na organizme u okolišu te ju je potrebno ukloniti.

U ovom radu ispitala se učinkovitost biorazgradnje dviju vrsta mikroplastike, polistirena (PS) i polietilena niske gustoće (LDPE), primjenom mješovite bakterijske kulture *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*. Istraživanja su se provodila 22 dana pri 160 o/min, $T = \pm 25$ °C, veličini čestica PS i LDPE 300 μm – 500 μm i koncentraciji od 100 mg/L.

Ispitana mješovita kultura učinkovito je razgradila LDPE i PS tijekom 22 dana, što je dokazano smanjenjem koncentracije otopljenog kisika u uzorcima s MP, povećanjem CFU te nastajanjem anorganskog ugljika. Nadalje, spektri dobiveni FTIR-ATR analizom prije i nakon biorazgradnje ukazuju na nastajanje novih skupina, smanjenje intenziteta pikova te pomicanja pikova prema manjim valnim duljinama.

Ključne riječi: mikroplastika, biorazgradnja, *Bacillus* sp., *Pseudomonas alcaligenes*

Uvod

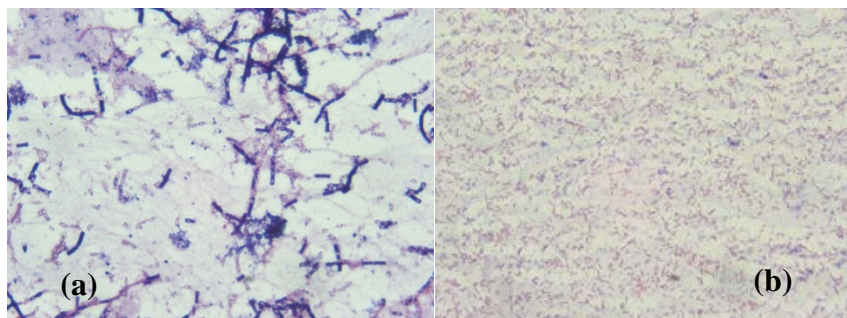
S razvojem znanosti i tehnologije te porastom globalnog stanovništva, potražnja za plastikom sve je veća. Plastični materijali koriste se u svim aspektima ljudskog života i industrije. Globalna proizvodnja plastike iznosi oko 322 milijuna tona godišnje (Ho, 2018). Procjenjuje se da plastika čini otprilike 20 % - 30 % čvrstog komunalnog otpada na odlagalištima u SAD-u, Njemačkoj i Australiji (Ho, 2018). Proizvodnja plastike povećala se tijekom posljednjih 50 godina s 15 milijuna tona 1964. godine na gotovo 350 milijuna tona u 2017. godini. Očekuje se da će se tijekom sljedećih 20 godina udvostručiti (Jenkins, 2019). Zbog svojih izvrsnih mehaničkih svojstava, niske cijene, male težine, stabilnosti, izdržljivosti te kemijske inertnosti plastika se koristi za izradu ambalaže, namještaja, kućanskih potrepština te u građevini, poljoprivredi i transportu (Raddadi, 2019).

Pet najčešće proizvedenih sintetičkih polimera (plastike) u EU su polietilen (PE), polivinil klorid (PVC), polipropilen (PP), polistiren (PS) i polietilen tereftalat (PET) (Raddadi, 2019). PE se najčešće koristi za proizvodnju jednokratnih plastičnih vrećica, ambalaže i cijevi, dok se PS koristi u građevinskim materijalima, transportu i jednokratnom priboru za jelo (Ho, 2018.; Restrepo-Flórez, 2014). Primjena PET je najveća u proizvodnji jednokratne ambalaže za pića; PP se koristi za proizvodnju laboratorijskog posuđa, posuda za hranu i tekstila, a PVC u stolariji i izradi cijevi (Gong, 2018; Iheanacho, 2020; Peacock, 2006). MP se definira kao plastične čestice veličine < 5 mm. One mogu nastati ciljanom proizvodnjom (primarna mikroplastika) ili razgradnjom većih plastičnih potrošačkih proizvoda (sekundarna mikroplastika). S obzirom na puno izvora (proizvodi za osobnu higijenu, otpadne vode, kanalizacija, tekstil itd.) mikroplastika je pronađena u gotovo svim kopnenim i vodenim staništima (Auta, 2017; Gong, 2018). Zbog relativno male veličine, vodeni organizmi lako gutaju mikroplastiku, a potvrđeno je da se ona zatim akumuliraju u tkivima, krvožilnom sustavu i mozgu (Auta, 2017). Brojna istraživanja ukazuju na niz problema koje MP može uzrokovati, primjerice: smanjenje brzine rasta i kretanja, smanjenje mogućnosti obavljanja fotosinteze, fizičke deformacije, unos toksičnih elemenata, smanjenje plodnosti i promjene u metaboličkim ciklusima. Iz tog razloga MP predstavlja opasnost za cijeli ekosustav (Auta, 2017). Jedna od glavnih karakteristika plastike, a time i MP, je njezina izdržljivost. Upravo zbog toga je proces razgradnje mikroplastike dugotrajan. Kombinacija fizikalno-kemijskih (abiotičkih) i bioloških (biotičkih) procesa pokazala se najuspješnijim načinom uklanjanja MP iz okoliša (Gewert, 2015). Procesima abiotičke razgradnje smatraju se toplinska, mehanička, foto- i kemijska razgradnja (Gewert, 2015). Biorazgradnja je ekološki i ekonomski prihvatljiv način uklanjanja MP-a iz okoliša, a dosadašnja istraživanja su pokazala da mikroorganizmi poput *Bacillus subtilis* (Li, 2018), *Rhodococcus* sp. (Stevenson, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Das, 2012), *Pseudomonas citronellolis* (Giacomucci, 2019), *Zalerion maritimum* (Paco, 2017), *Penicillium variabile* (Tia, 2017), i *Aspergillus niger* (Esmaili, 2013) učinkovito ju razgrađuju. U ovom radu ispitala se biorazgradnja MP-a PS i LDPE u vodenom mediju primjenom mješovite bakterijske kulture *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*. Dobiveni rezultati ukazuju da je proces biorazgradnje PS-a i LDPE-a započeo, odnosno da je za potpunu biorazgradnju potrebno duže kontaktno vrijeme.

Materijali i metode

Mikroplastika i bakterijske kulture

Prilikom provedbe pokusa biorazgradnje korištene su dvije vrste MP-a, PS i LDPE, veličine čestica $300 \mu\text{m} - 500 \mu\text{m}$. Bakterijske kulture *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* pohranjene su u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Navedene kulture, *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* (slika 1) izolirane su iz aktivnog mulja s uređaja za obradu komunalnih otpadnih voda grada Vrgorca te iz sedimenta rijeke Kupe.



Slika 1. Bakterijske kulture, *Bacillus* sp. (G (+)) (a) i *Pseudomonas alcaligenes* (G (-)) (b), obojane po Gramu
Figure 1. Gram stained bacterial cultures, *Bacillus* sp. (G (+)) (a) and *Pseudomonas alcaligenes* (G (-)) (b)

Hranjive podloge i mineralni medij

Za uzgoj bakterijske kulture, odnosno određivanje *Colony Forming Unit* (CFU) (Duraković, 2002) pripremljen je hranjivi agar prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991). Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm. Biorazgradnja MP-a provodila se u mineralnom mediju početne pH – vrijednosti 7,2. Mineralni medij pripremljen je prema literaturi (Kyaw, 2012).

Instrumenti i aparatura

Za vaganje MP-a i kemikalija koristila se analitička vaga Kern ALJ 220-4NM, a pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici Heindolph Unimax 1010. Za praćenje koncentracije kisika, pH-vrijednosti i temperature korišten je prijenosni uređaj WTW Multimetar 3430, a optička gustoća se određivala pomoću spektrofotometra HACH, DR2400, SAD ($\lambda = 600$ nm) (Yu, 2017). Ioni (anioni i kationi) su se detektirali na ionskom kromatografu, DIONEX ICS SERIES, AS-DV. Materijali, LDPE i PS karakterizirani su pomoću Infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrometra, PerkinElmer, Spectrum One. Ukupni organski (TOC), anorganski ugljik (IC) te ukupni ugljik (TC) određivali su se na uređaju TOC-VCSH, Shimadzu. Svi uzorci prije nego što su podvrgnuti analizi kationa i aniona kao i TOC-a, su filtrirani kroz 0,45 μ m filtar papir.

Provedba pokusa biorazgradnje

Prilikom provedbe ovog pokusa korišteni su plastični proizvodi koji se nalaze u svakodnevnoj upotrebi, LDPE vrećice i PS jednokratni pribor za jelo. Proizvodi su bili prvo usitnjeni na manje komade a potom su LDPE vrećice usitnjene u blenderu sa suhim ledom (slika 2), a PS žlice u blenderu s ledom. Nakon što su se dobivene čestice osušile, uslijedilo je prosijavanje na veličine 300 μ m – 500 μ m u mehaničkom situ. Nakon usitnjavanja i prosijavanja MP-a (PS i LDPE), čestice MP-a su sterilizirane u etanolu (w = 70 %) na rotacijskoj tresilici 15 minuta na 160 o/min. Zatim su čestice filtrirane kroz membranski filtar, veličine pora 0,45 μ m.



Slika 2. Postupak pripreme LDPE mikroplastike
Figure 2. Procedure for preparation of LDPE microplastics

Dan prije provedbe pokusa bakterijske kulture *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* precijepile su se na hranjivi agar te inkubirane na temperaturi od 37 °C. Na dan postavljanja pokusa priredila se suspenzija mješovite bakterijske kulture s optičkom gustoćom, OG = 3,21, koja je u sustavu bila razrijeđena 10x. Pokus se provodio u Erlenmeyer tikvicama od 250 mL, radnog volumena 100 mL, tijekom 22 dana ($\gamma = 100,0$ mg/L) pri 160 o/min na rotacijskoj tresilici. U točno određenim vremenskim intervalima izuzimao se određeni volumen uzorka te su se provodile analize određivanja CFU-a, koncentracije otopljenog kisika, TC-a, TOC-a, IC-a te analiza kationa i aniona. Početni radni uvjeti dani su u Tablici 1.

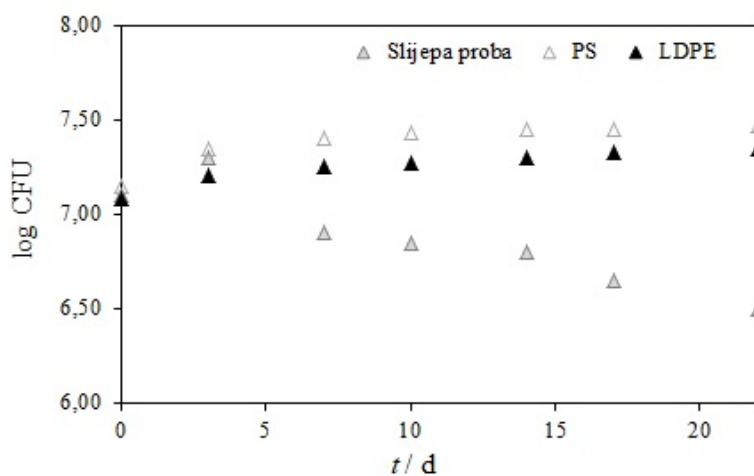
Tablica 1. Početni radni uvjeti za provedbu procesa biorazgradnje
Table 1. Initial working conditions for biodegradation experiment

Bakterijska kultura	γ (MP) / mg/L	pH ₀ / -	T ₀ / °C	γ (O ₂) / mg/L	log CFU
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> + <i>Bacillus</i> sp.	100	7,148	25,210	8,330	7,204

Rezultati i rasprava

U posljednjih nekoliko godina sve je više pažnje posvećeno MP i i njezinom potencijalnom štetnom djelovanju na ljude i okoliš. MP u okoliš najčešće dospjeva razgradnjom nepravilno odloženog plastičnog otpada ili iz proizvoda za osobnu njegu. Cilj ovog rada bio je ispitati biorazgradnju PS i LDPE mikroplastike s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*. Promjena CFU tijekom biorazgradnje PS i LDPE mikroplastike s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* prikazana je u slici 3. S obzirom na početni broj, broj kolonija mješovite kulture se tijekom 22 dana povećao i u prisutnosti PS i LDPE, dok u slijepoj probi (SP) (bez MP-a) se smanjivao, što ukazuje da je mješovita kultura koristila PS i LDP kao izvor ugljika.

U prvih pet dana CFU u SP je rastao jer je mješovita bakterijska kultura koristila mineralni medij kao izvor nutrijenata, što i potvrđuje smanjenje koncentracije kisika (slika 4). Nakon petog dana CFU se u SP smanjivala, a koncentracija kisika povećavala. Za razliku od SP, u uzorcima s MP-om tijekom 22 dana koncentracija kisika se smanjivala, odnosno nakon 10 dana se nije značajno mijenjala u oba uzorka kao i CFU što ukazuje na uspostavljanje stacionarne faze (Duraković, 2002). Prema dosadašnjim istraživanjima (Auta, 2017; Suresh, 2011) stacionarna faza može trajati i više od 3 mjeseca. Nadalje prema slici 3 i 4. može se primijetiti da je rast mješovite bakterijske kulture kao i pad kisika bio veći u uzorku PS nego u uzorku LDPE, što ukazuje da je PS bio dostupniji mikroorganizmima od LDPE što i potvrđuje literatura (Auta, 2017). Prema navedenom istraživanju unutar 40 dana masa PS smanjila se za 7,4 %, dok je masa LDPE zabilježila pad od samo 1,6 %. Dosadašnja istraživanja (Gewert, 2015; Suresh, 2011) ukazuju da bi mješovita kultura trebala brže razgraditi MP jer imaju širi spektar enzima i sposobne su razgraditi veći broj spojeva. Međutim, u mješovitoj kulturi može doći do kompeticije za supstratom. Iako se *Pseudomonas alcaligenes* na početku pokazao kao jači kompetitor u ovoj ispitivanoj mješovitoj bakterijskoj kulturi, u 14. danu bilo je vidljivo da je *Bacillus* sp. prevladao. Razlog tome može biti što je *Bacillus* sp. G (+) bakterija koja stvara endospore tj. može preživjeti ekstremne uvjete, poput visoke ili niske temperature, pH-vrijednosti ili nedostatak hrane (Duraković, 2002).

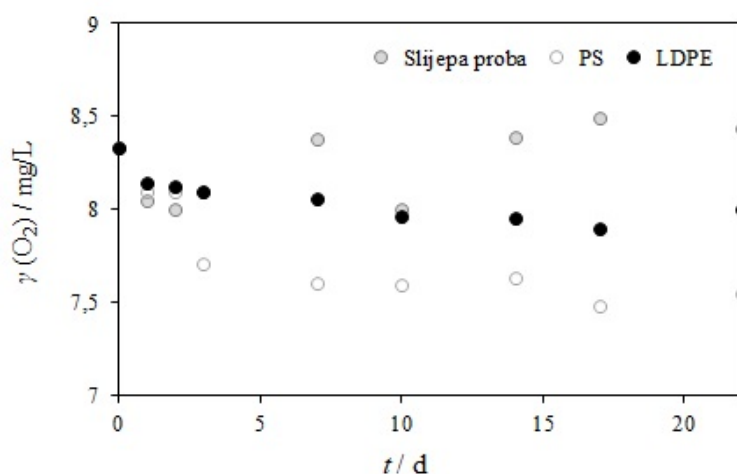


Slika 3. Vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje LDPE i PS s miješanom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp . i *Pseudomonas alcaligenes*
Figure 3. CFU values during biodegradation of LDPE and PS with mixed bacterial culture of *Bacillus* sp . and *Pseudomonas alcaligenes*

Na slici 5. (a) – (c) prikazana je promjena koncentracije TC, TOC i IC tijekom 22 dana biorazgradnje PS-a i LDPE-a s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*. Koncentracija TC-a (slika 5a) je rasla u uzorcima PS-a i LDPE-a tijekom cijelog procesa. Koncentracija TOC-a (slika 5b) u uzorcima PS i LDPE je isto rasla tijekom cijelog procesa što može ukazivati na otpuštanje aditiva s površine MP-a kao i organskih produkta nastalih uslijed narušavanja strukture PS-a i LDPE-a, što nije bio slučaj kod uzorka slijepe probe (SP).

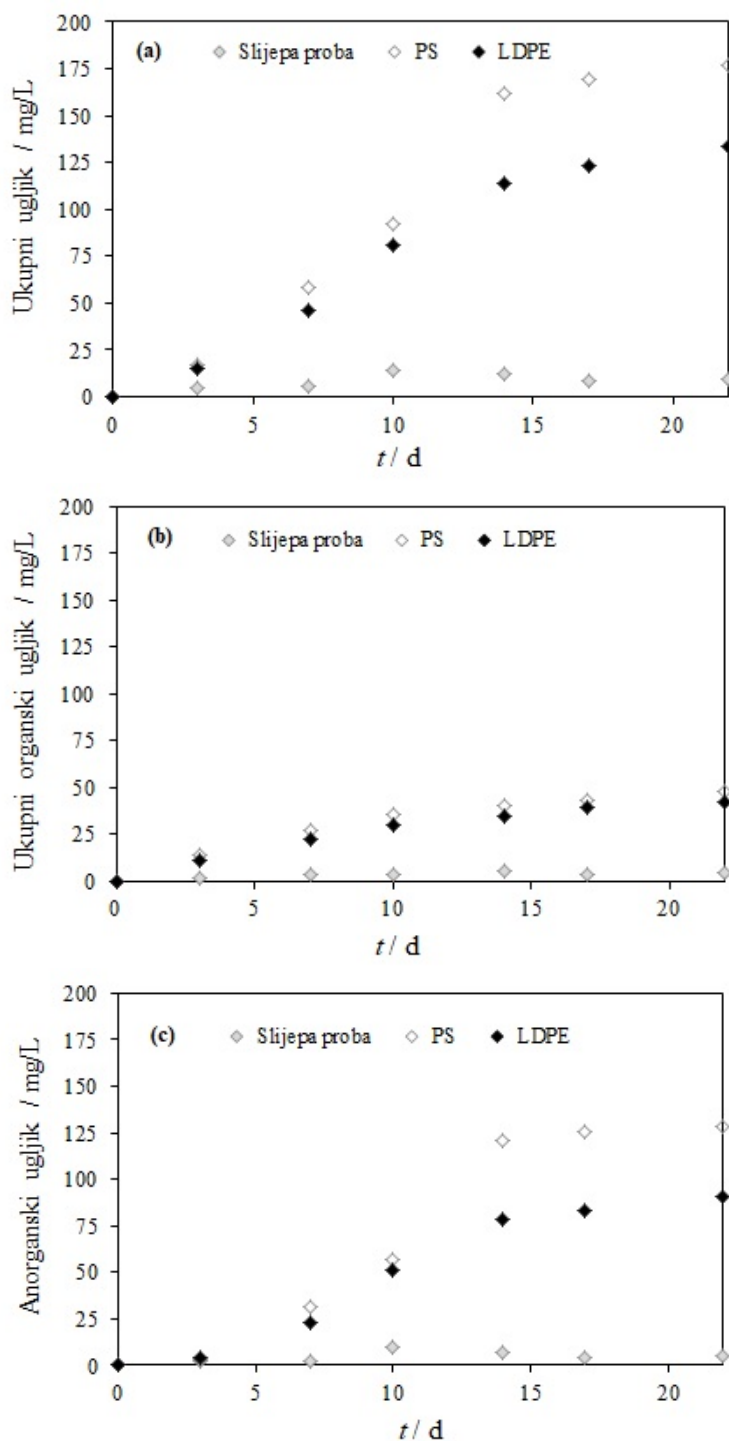
Koncentracija IC-a (slika 5c) se u SP-u neznatno mijenjala, dok je koncentracija fosfata (slika 6a) i kalija (slika 7a) naglo počela rasti u 10 danu, a CFU se smanjivao što ukazuje da je došlo do liziranja bakterijskih stanica, odnosno raspadanja stanične membrane (Duraković, 2002). Naime, bakterijska stanica se poput svih ostalih stanica sastoji od ugljika, vodika, kisika, dušika, fosfora i drugih elemenata (Duraković, 2020). Koncentracija IC-a u uzorcima PS-a i LDPE-a je rasla od 10 dana do kraja procesa kao i CFU-a i TOC-a što ukazuje da je došlo do razgradnje PS-a i LDPE-a tj. razvijanja CO₂ kao jednog od produkata biorazgradnje.

Tijekom biorazgradnje uzoraka PS i LDPE koncentracija fosfata (slika 6 (b) – (c)) se u isto vrijeme smanjivala za razliku od uzorka slijepe probe (slika 6 (a)) gdje je uočen konstantni porast koncentracije PO₄³⁻ aniona. Ovaj rezultat ukazuje da u periodu najintenzivnije razgradnje nije došlo do odumiranja stanica, nego da su bakterije koristile slobodni anorganski fosfat iz okoline kao energiju u procesima biorazgradnje (Auta, 2017; Duraković, 2002). Od 14 dana biorazgradnje uzoraka PS i LDPE koncentracija fosfata je lagano počela rasti jer je nastupila stacionarna faza u kojoj je broj umrlih i novonastalih stanica bio podjednak. Koncentracije ostalih aniona (Cl⁻, SO₄²⁻ i NO₃⁻) tijekom 22 dana biorazgradnje svih uzorka nisu se značajno mijenjale. Koncentracije ostalih kationa (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ i Ca²⁺) (slika 7 (a) – (c)) se tijekom procesa biorazgradnje nisu značajno mijenjale. Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti kako PS uzorak podliježe najintenzivnijoj biorazgradnji na što ukazuje veća koncentracija IC-a (slika 6(c)), TOC-a (slika 6(b)), ali smanjena koncentracija fosfata (slika 7(c)).



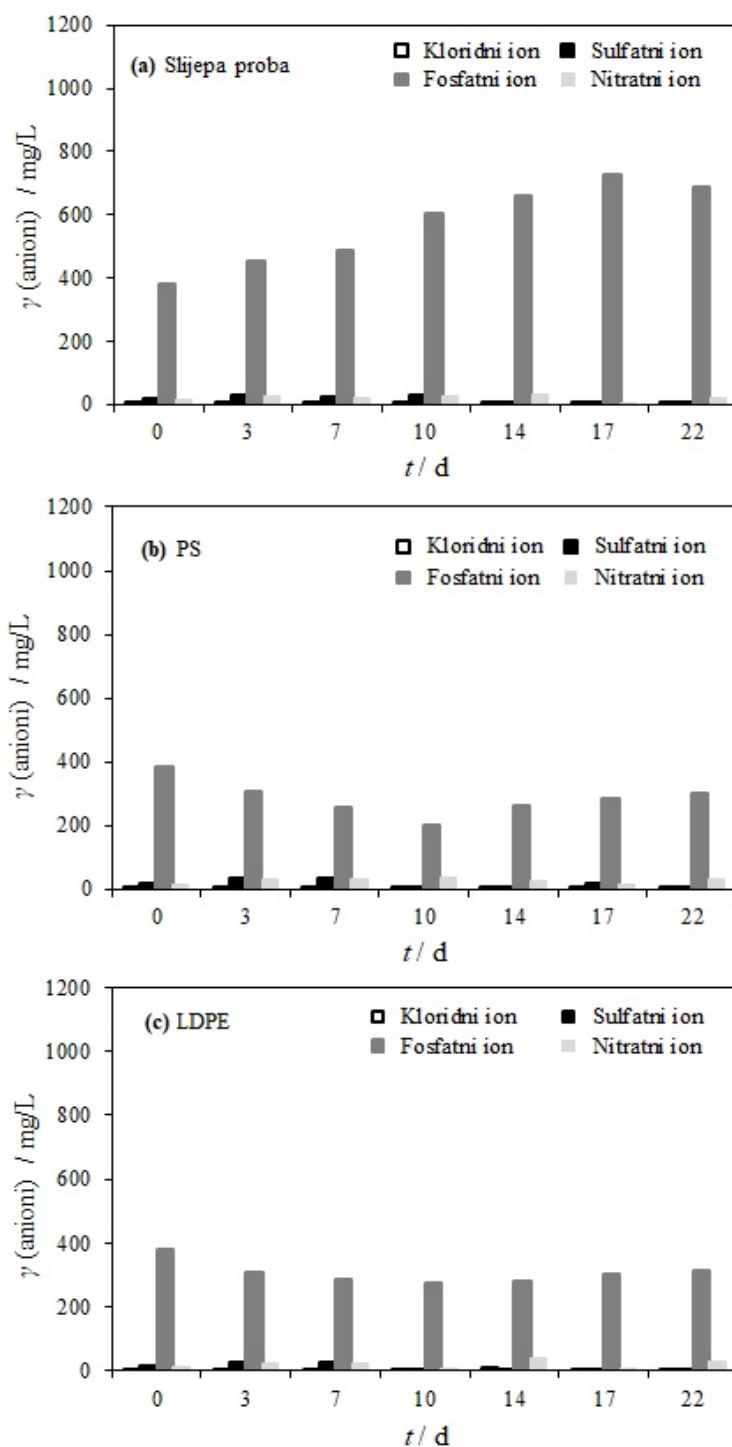
Slika 4. Koncentracija otopljenog kisika tijekom biorazgradnje LDPE i PS s miješanom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*

Figure 4. Dissolved oxygen concentration during biodegradation of LDPE and PS with mixed bacterial culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas alcaligenes*



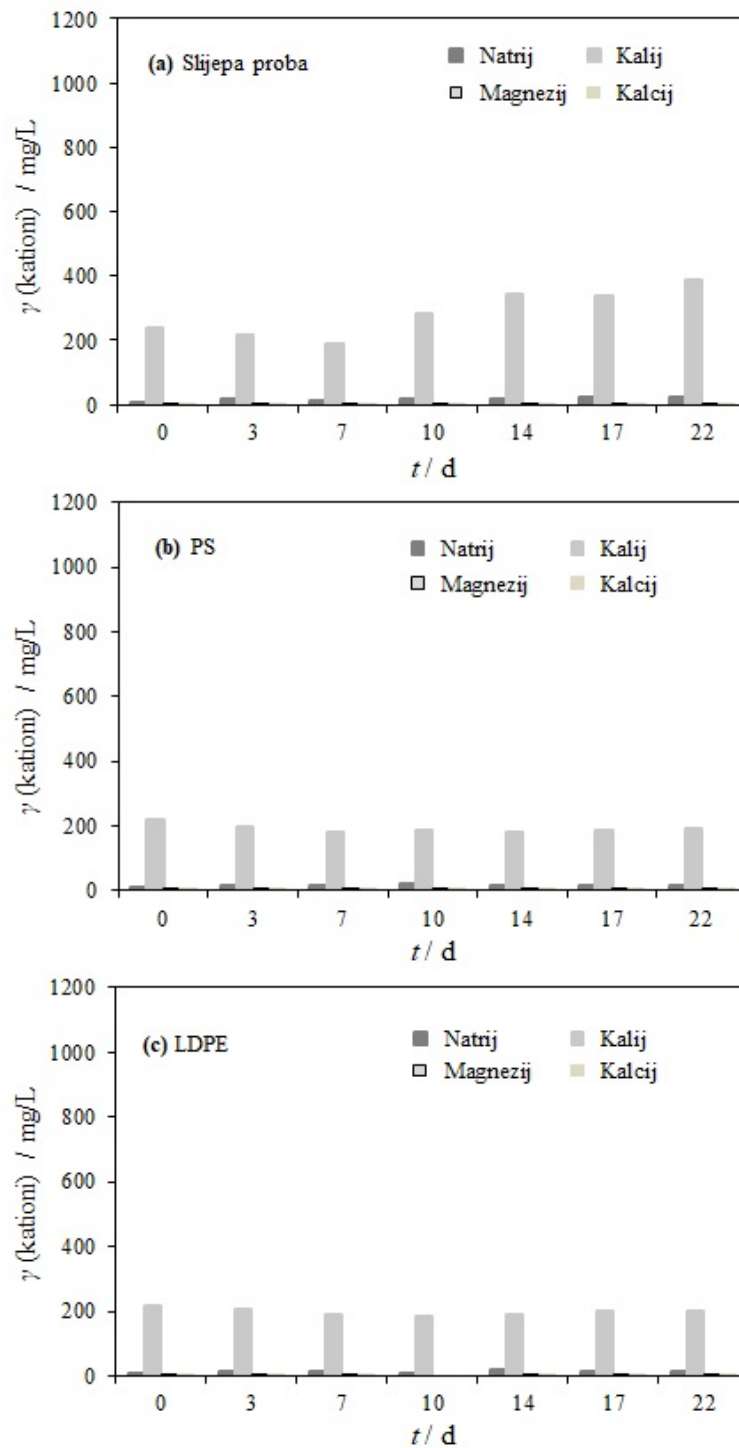
Slika 5. Vrijednosti ukupnog ugljika (a), organskog ugljika (b) i anorganskog ugljika (c) tijekom biorazgradnje LDPE i PS s miješanom bakterijskom kulturom *Bacillus sp.* i *Pseudomonas alcaligenes*

Figure 5. Total carbon (a), total organic carbon (b) and inorganic carbon (c) during biodegradation of LDPE and PS with mixed bacterial culture of *Bacillus sp.* and *Pseudomonas alcaligenes*



Slika 6. Koncentracije aniona (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i NO_3^-) u uzorku SP (a), PS (b) i LDPE (c) tijekom biorazgradnje s miješanom bakterijskom kulturom *Bacillus sp.* i *Pseudomonas alcaligenes*

Figure 6. Concentration of anions (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} and NO_3^-) in SP (a), PS (b) and LDPE (c) during biodegradation with mixed bacterial culture of *Bacillus sp.* and *Pseudomonas alcaligenes*

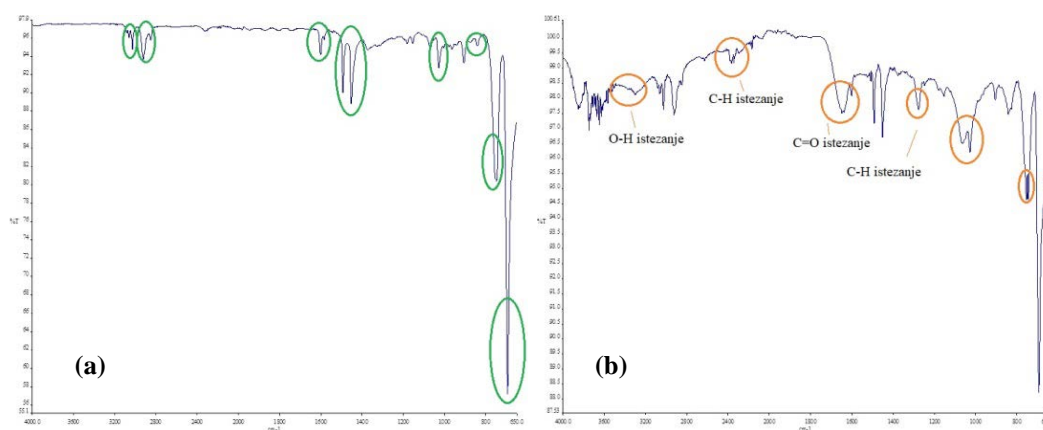


Slika 7. Koncentracije kationa (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} i Ca^{2+}) u uzorku SP (a), PS (b) i LDPE (c) tijekom biorazgradnje s miješanom bakterijskom kulturom

Bacillus sp. i *Pseudomonas alcaligenes*

Figure 7. Concentration of cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}) in SP (a), PS (b) and LDPE (c) during biodegradation with mixed bacterial culture of *Bacillus sp.* and *Pseudomonas alcaligenes*

Kako bi se potvrdila biorazgradnja MP-a načinjena je FTIR-ATR analiza na uzorcima PS-a i LDPE-a prije i nakon procesa biorazgradnje (slike 8 (a i b) i 9 (a i b)). PS spektar karakterizira pik oko 3000 cm^{-1} koji pripadaju C-H istezanju aromatske skupine. Zatim pik na $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H istezanje te pikovi oko $1500 - 1550\text{ cm}^{-1}$ karakteristični za istezanje aromatskog prstena. Pikovi na $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ predstavljaju CH_2 savijanje, odnosno savijanje C-H veza u aromatskom prstenu. Savijanje aromatskih skupina vidljivo je iz pikova na ~ 670 , ~ 780 i $\sim 850\text{ cm}^{-1}$. Spektar je analiziran u skladu s literaturnim podacima (Jung, 2018). Nakon procesa biorazgradnje PS-a s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* dobiven je FTIR spektar na slici 8 (b). Intenzitet pikova nije previše smanjen, međutim došlo je do stvaranja novih pikova i pomicanja postojećih. Na $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ i 3300 cm^{-1} primijećeni su pikovi malih intenziteta koji su karakteristični za istezanje O-H skupine kod alkohola. Pretpostavka je da je taj pik potječe od ispiranja MP-a etanolom ($w = 70\%$) prije same analize. Na $\sim 2450\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ dolazi do stvaranja novih pikova. Prvi spomenuti pik upućuje na C-H istezanje kod aldehida dok drugi govori o istezanju veza $\text{C}=\text{O}$ skupine koja potječe od ketona. Naime, stvaranje karbonilnih skupina, koje najčešće pripadaju ketonima, najčešći je pokazatelj da je došlo do biorazgradnje MP-a (Rajandas, 2012; Subramani, 2016). Također, stvaranjem novih skupina kao što, uz navedene, pokazuje i pik na valnoj duljini $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ (C-H istezanje) sugerira da je zaista došlo do biorazgradnje, odnosno cijepanja polimernog lanca stirena na manje dijelove. Do vidljive promijene došlo je i na valnoj duljini od $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$. Prije pokusa biorazgradnje na toj valnoj duljini zabilježen je jedan pik manjeg intenziteta. Nakon biorazgradnje primijećen je dvostruki pik, većeg intenziteta. Još jedan dvostruki pik, pojavio se na 850 cm^{-1} kao i prilikom biorazgradnje s čistim kulturama.

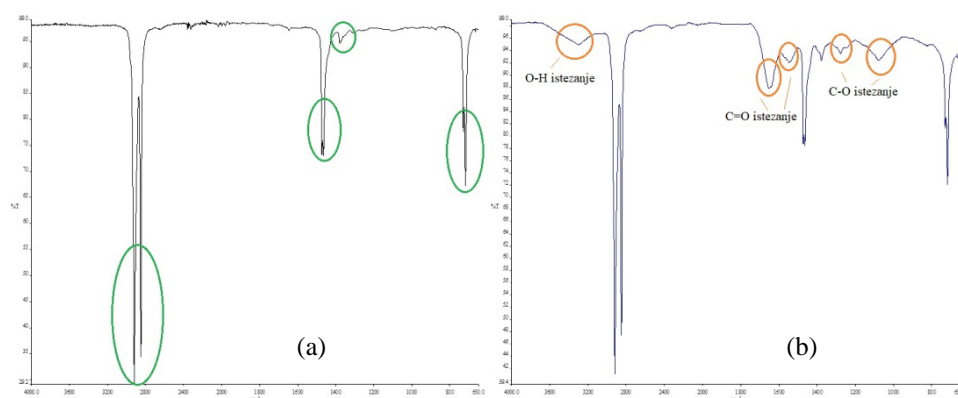


Slika 8. FTIR spektar PS snimljen prije početka biorazgradnje (a) te nakon biorazgradnje s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* (b)

Figure 8. FTIR spectrum of PS before the biodegradation process (a) and after biodegradation with a mixed bacterial culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas alcaligenes* (b)

Prilikom karakterizacije LDPE vrlo je bitno uočiti male razlike pomoću kojih se određuje o kojoj vrsti PE radi. HDPE i LDPE imaju istu glavnu strukturnu jedinicu, funkcionalne skupine i kemijske veze. Međutim, različito grananje bočnih skupina rezultira malim, ali važnim razlikama u spektralnom području od 1400 cm^{-1} do 1330 cm^{-1} , pri čemu LDPE ima veći intenzitet na 1377 cm^{-1} zbog deformacije metilnog savijanja krajeva razgranatog lanca.

Na slici 9 (a) prikazan je FTIR – ATR spektar uzorka LDPE što je vidljivo iz karakterističnih pikova koji se pojavljuju na $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ te $\sim 750\text{ cm}^{-1}$. Vrijednosti dobivenih pikova slažu se s literaturnim podacima (Rajandas, 2012; Subramani, 2016). Prilikom biorazgradnje LDPE s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* došlo je do stvaranja novih pikova te smanjenja intenziteta postojećih na FTIR spektru. Kao i u prethodnom analiziranom spektru kod uzorka PS-a i ovdje se pojavio pik na $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ koji karakterizira savijanje O-H veze u alkoholima. Zatim slijede pikovi na $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ koji karakteriziraju C=O skupinu kod aldehida ili ketona tj. C=C kod cikličnih alkena. Još dva novonastala pika nalaze se na valnoj duljini od $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ koji karakteriziraju istezanje C-O veza kod etera, estera ili karboksilnih kiselina. Na kraju procesa biorazgradnje intenzitet navedenih pikova je bio manji u odnosu na 0 dan. Upravo to smanjenje intenziteta sugerira da je bakterijska kultura razgradila polimer na manje intermedijare i koristila ga kao izvor ugljika.



Slika 9. FTIR spektar LDPE snimljen prije početka biorazgradnje (a) te nakon biorazgradnje s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes* (b)
Figure 9. FTIR spectrum of LDP before the biodegradation process (a) and after biodegradation with a mixed bacterial culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas alcaligenes* (b)

Zaključci

Napretkom industrije i masovnijim korištenjem plastike u svakodnevnom životu, drastično se povećava količina MP-a koja završi u okolišu. Neadekvatno zbrinjavanje, skupa, dugotrajna i niska mogućnost razgradnje razlozi su pojave MP-a u okolišu koju je danas moguće pronaći u morima, jezerima, rijekama, zraku, tlu i otpadnim vodama.

U ovom radu se ispitala učinkovitost biorazgradnje PS i LDPE mikroplastike s mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*. Dobiveni rezultati, povećanje CFU-a, smanjenje koncentracije kisika i fosfata, kao i povećanje koncentracije TOC-a i IC, ukazuju da je biorazgradnja PS-a i LDP-a nastupila tijekom 22 dana procesa. FTIR analizom dobiveni su spektri koji su potvrdili da je tijekom 22 dana proces biorazgradnje mikroplastike započeo. Međutim, kako bi postigli bolju učinkovitost procesa biorazgradnje MP, potrebno je produžiti trajanje procesa te optimirati uvjete.

Zahvala

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Literatura

- Auta, H. S., Emenike, C. U., Fauziah, S. H. (2017): Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation, *Environ. Pollut.* 231, 1 – 8.
- Das, G., Bordoloi, N. K., Rai, S. K., Mukherjee, A. K., Karak, N. (2012): Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly(vinyl chloride): thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp., *J. Hazard. Mater.* 209-210, 434 – 442.
- Duraković, S., Redžepović, S. (2002): Uvod u opću mikrobiologiju, Zagreb, Kugler, str. 665.
- Esmaili, A., Pourbabae, A. A., Alikhani, H. A., Shabani, F., Esmaili, E. (2013): Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil, *PLoS One.* 8(9), e71720.
- Gewert, B., Plassmann, M. M., MacLeod, M. (2015): Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment, *Environ. Sci.: Processes Impacts.* 17, 1513-1521.
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., Fava, F. (2019): Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnol.* 52, 35 – 41.
- Gong, J., Kong, T., Li, Y., Li, Q., Li, Z., Zhang, J. (2018): Biodegradation of Microplastic Derived from Poly(ethylene terephthalate) with Bacterial Whole-Cell Biocatalysts, *Polymers.* 10, 1326.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., Lucas, S. (2018): An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38(2), 308 – 320.
- Iheanacho, S. C., Odo, G. E. (2020): Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 232, 108741.
- Jenkins, S., Martínez, A., Fonseca, C., Varrone, C. (2019): Microbial Degradation of Plastics: New Plastic Degraders, Mixed Cultures and Engineering Strategies, In: *Soil Microenvironment for Bioremediation and Polymer Production*, Wiley, pp. 215 – 238.
- Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., Royer, S.-J., Hyrenbach, K. D., Jensen, B. A., Lynch, J. M. (2018): Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Mar. Pollut. Bull.* 127, 704 – 716.
- Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Kishore Sakharkar, M., Lim, C. S., Sakharkar, K. R. (2012): Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species, *Indian J. Microbiol.* 52(3), 411 – 419
- Li, J., Liu, H., Paul Chen, J. (2018): Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection, *Water Res.* 137, 362 – 374.

- Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. A. (2017): Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*, *Sci. Total Environ.* 586, 10 – 15.
- Peacock, A. J., Calhoun, A. (2006): Polymer chemistry, Hanser publisher, Munich, pp. 267 – 363.
- Raddadi, N., Fava, F. (2019): Biodegradation of oil-based plastics in the environment: Existing knowledge and needs of research and innovation, *Sci. Total Environ.* 679, 148 – 158.
- Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., Yin, L. S. (2012): A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation, *Polym. Test.* 31, 1094 – 1099.
- Restrepo-Flórez, J.-M., Bassi, A., Thompson, M. R. (2014): Microbial degradation and deterioration of polyethylene: A review, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 88, 83 – 90.
- Stevenson, K., Stallwood, B., Hart, A. G. (2008): Tire rubber recycling and bioremediation: a review, *Biorem. J.* 12(1), 1 – 11.
- Subramani, M., Sepperumal, U. (2016): FTIR analysis of bacterial mediated chemical changes in Polystyrene foam, *Ann. Biol. Res.*, 7 (5), 55 – 61.
- Suresh, B., Maruthamuthu, S., Palanisamy, N., Ragunathan, R., Navaneetha Pandiyaraj, K., Muralidharan, V. S. (2011): Investigation on biodegradability of polyethylene by *Bacillus cereus* strain Ma-Su isolated from compost soil, *Res. J. Microbiol.* 2(8), 292 – 302.
- Tian, L., Kolvenbach, B., Corvini, N., Wang, S., Tavanaie, N., Wang, L., Ma, Y., Scheu, S., Corvini, P. F., Ji, R. (2017): Mineralisation of (14)C-labelled polystyrene plastics by *Penicillium variabile* after ozonation pre-treatment, *New Biotechnol.* 38 (B), 101 – 105.
- Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T., Latt, Z. K., Aung, A., Sev, T. M., Nwe, M. T., Mon, W. W. (2017): The correlation of carbon source and ammonium accumulation in culture broth by nitrogen-fixing bacterial isolates, *Int. J. Sci. Innov. Res.* 6(2), 63 – 67.

Biodegradation of LDPE i PS microplastics with mixed bacterial culture *Bacillus sp.* and *Pseudomonas alcaligenes*

Dajana Kučić Grgić^{1*}, Martina Miloloža¹, Antonija Kovačević¹,
 Ema Lovrinčić¹, Vesna Očelić Bulatović², Kristina Bule¹,
 Marija Sigurnjak Bureš¹, Viktorija Prevarić¹, Matija Cvetnić¹,
 Šime Ukić¹, Marinko Markić¹, Tomislav Bolanča¹

¹Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
 Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia

²Faculty of Metallurgy, University of Zagreb, Aleja narodnih heroja 4, 44 000 Sisak, Croatia

*Corresponding author: dkucic@fkit.hr

Summary

The constant increase in plastic production and poor management of plastic waste has led to a huge increase in waste disposal in the environment. Degradation of macroplastics or targeted production of micro-sized particles results in microplastic particles (<5 mm). Microplastics (MP) represent a potentially harmful effect on organisms in the environment and need to be removed. In this paper, the biodegradation efficiency of two types of microplastics, polystyrene (PS) and low density polyethylene (LDPE), was examined using a mixed bacterial culture of *Bacillus sp.* and *Pseudomonas alcaligenes*. The studies were performed for 22 days at 160 rpm, T = ± 25 ° C, particle size PS and LDPE 300 µm - 500 µm and a concentration of 100 mg / L. The tested mixed culture effectively degraded LDPE and PS over 22 days, as evidenced by a decrease in dissolved oxygen concentration in the samples with MP, an increase in CFU, and the formation of inorganic carbon. Furthermore, the spectra obtained by FTIR-ATR analysis before and after biodegradation indicate the formation of new groups, a decrease in peak intensity, and a shift of the peaks toward smaller wavelengths.

Keywords: microplastics, biodegradation, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas alcaligenes*

Statičko/anoksična konfiguracija procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona

Ivan Mikac¹, Tea Štefanac¹, Dijana Grgas¹, Sanja Radman², Mirna Habuda-Stanić³,
Tibela Landeka Dragičević^{1*}

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Pierottijeva 6, HR – 10 000 Zagreb

²Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Ruđera Boškovića 35, HR – 21 000 Split,

³Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, HR - 31 000 Osijek

*Dopisni autor: tlandekadragicevic@pbf.hr

Sažetak

Denitrificirajuća defosfatacija u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti istražena je uz nitrit (NO₂-N) i nitrat (NO₃-N) kao akceptore elektrona i natrijev acetat kao donor elektrona. Pokusi uz NO₂-N kao akceptor elektrona provedeni su uz početnu koncentraciju 15 mg PO₄-P /L i pri omjeru C/N 3, 5 i 7, dok je početna koncentracija od 10 mg PO₄-P/L i omjere C/N 5 i 7 odabrana za pokuse s NO₃-N kao akceptorom elektrona. Pokusi su provedeni pri omjeru N/P 2, a pH vrijednost nije kontrolirana. Veće brzine uklanjanja N i P postignute su u pokusima uz NO₂-N kao akceptor elektrona u odnosu na NO₃-N. Najveća brzina uklanjanja NO₂-N od 26,2 mg NO₂-N/Lh postignuta je pri C/N 3 i pri tome je uklonjeno 75,8 % PO₄-P.

Ključne riječi: DPAOs, NO₂-N, NO₃-N, statički/anoksični uvjeti

Uvod

Biološko uklanjanje nutrijenata N i P široko je rasprostranjena metoda obrade otpadnih voda kojom se sprječava eutrofikacija, onečišćenje podzemnih voda ili negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Biološko uklanjanje provodi se pomoću mješovite zajednice mikroorganizama pri različitim uvjetima (Henze i sur., 2008).

Denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAOs, engl. *Denitrifying phosphorus accumulating organisms*) imaju sposobnost anoksičnog unosa P u stanicu, uz istovremenu denitrifikaciju. DPAOs u anaerobnim uvjetima asimilira vanjske izvore ugljika (acetat) u stanicu i prevodi u unutarstanično pohranjene polihidroksialkanoate (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoates*) – polihidroksibutirat (PHB, engl. *Polyhydroxybutyrate*) i polihidroksivalerat (PHV, engl. *Polyhydroxyvalerate*). Otpuštanje orto-fosfata (O-PO₄) iz unutarstanično pohranjenog poliP oslobađa energiju koja se koristi za unos acetata u stanicu i produkciju PHB. Zatim, u anoksičnim uvjetima DPAOs koriste NO₂-N i/ili NO₃-N kao akceptore elektrona za unos O-PO₄ u stanicu oksidacijom PHA. Odvođenjem viška mikrobne biomase iz sustava se uklanja P (Hu i sur., 2003). Brojni su čimbenici procesa denitrificirajuće defosfatacije poput: koncentracija mikrobne biomase (MLSS, engl. *Mixed liquor suspended solids*), koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved oxygen*), pH vrijednost, temperatura i omjer C/P (Jena i sur., 2016; Wong i sur., 2013; Oehmen i sur., 2006).

Brojni autori istaknuli su inhibirajući učinak $\text{NO}_2\text{-N}$ u rasponu koncentracije 3-93,7 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ na proces denitrificirajuće defosfatacije (Peng i sur., 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999). Ma i sur. (2013) su istaknuli da se stupnjevitim dodavanjem $\text{NO}_2\text{-N}$ izbjegava inhibicijski učinak. Istaknuli su daje za uspješnu denitrificirajuću defosfataciju potrebno održavanje koncentracije $\text{NO}_2\text{-N} < 15 \text{ mg/L}$.

Cilj ovog rada bio je istražiti učinak odabranog akceptora elektrona ($\text{NO}_2\text{-N}$ ili $\text{NO}_3\text{-N}$) na učinkovitost uklanjanja P u anoksičnim uvjetima, te učinak omjera C/N, uz natrijev acetat kao izvor C na učinkovitost denitrifikacije i unos P u stanice, pri omjeru N/P 2. Proces denitrificirajuće defosfatacije, vođen u konfiguraciji statički/anoksični uvjet proveden je uz dodatak izvora C u statičkom periodu procesa i uz dodatak akceptora elektrona ($\text{NO}_2\text{-N}$ ili $\text{NO}_3\text{-N}$) i izvora $\text{PO}_4\text{-P}$ u anoksičnom periodu procesa.

Materijali i metode

Dizajn pokusa

Mulj korišten u diskontinuiranim pokusima denitrificirajuće defosfatacije uzet je iz SBR (engl. *Sequencing batch reactor*) na kraju aerobne faze procesa, te tri puta opran vodovodnom vodom. Statički uvjeti vođeni su 4 sata uz miješanje sadržaja 5 s svakih 15 minuta. Za postizanje anoksičnih uvjeta laboratorijske čase radnog volumena 500 mL postavljene su na magnetske miješalice pri 100 o/min. pH nije korigiran. Natrijev acetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), izvor ugljika, odvagano je u odgovarajućoj količini za odabrani C/N omjer i dodan na početku statičkog perioda procesa. Kao izvor fosfata korištena je vodena otopina kalijeva dihidrogen fosfata (KH_2PO_4), dodana u odgovarajućoj količini na početku anoksičnog perioda procesa. Vodene otopine NaNO_2 i KNO_3 služile su kao izvor $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, a dodane su u ciljani pokus u odgovarajućoj količini na početku anoksičnog perioda procesa. U statičkom periodu procesa određivan je KPK (kemijska potrošnja kisika) i $\text{PO}_4\text{-P}$, a u anoksičnom periodu procesa KPK, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, te pH, DO i temperatura. Pokusi su vođeni uz početnu koncentraciju 15 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i pri C/N 3, 5, i 7, odnosno uz 10 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_3\text{-N}$ i pri C/N 5 i 7. Koncentracija mikrobne biomase iznosila je $3,8 \pm 0,2 \text{ gMLSS/L}$. Sve kemikalije korištene u provedbi pokusa su p.a. čistoće. Pokusi su vođeni u 3 paralele, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna devijacija.

Analitičke i mikrobiološke metode

$\text{PO}_4\text{-P}$ u obliku orto-fosfata, $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ određivani su fotometrijski, pomoću kivetnog testa Merck Spectroquant 1.14842, Merck Spectroquant 1.14773 i Merck Spectroquant 1.14776. KPK i MLSS su određivani prema Standardnim metodama (APHA, 2005). pH vrijednost motrena je pomoću pH-metra WTW 330i i pH elektrode SenTix41. Koncentracija otopljenog kisika određivana je pomoću kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210. Temperatura je očitavana pomoću temperaturnog senzora s kisikove i pH elektrode.

Rezultati i rasprava

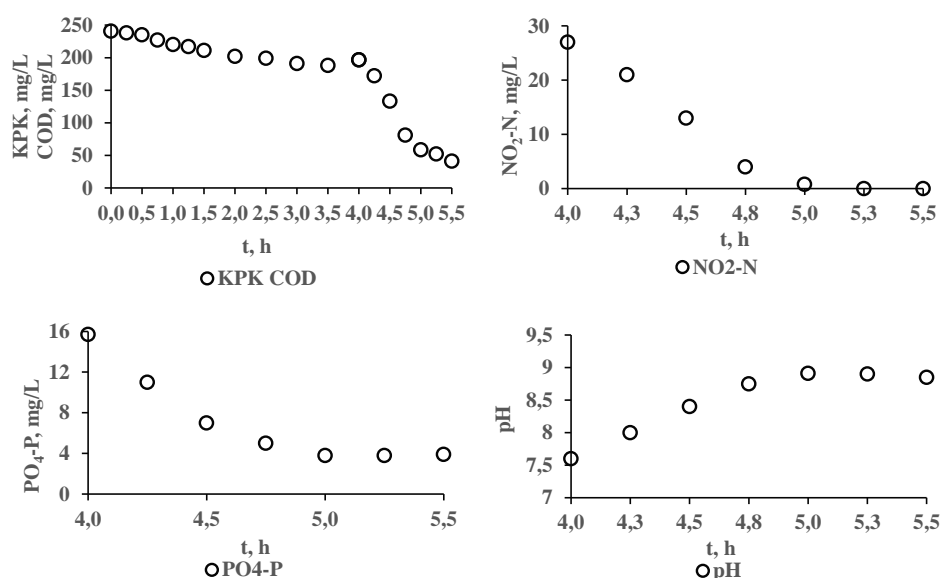
Pokusima denitrificirajuće defosfatacije pri statičko-anoksičnoj konfiguraciji procesa istražen je učinak akceptora elektrona, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, na učinkovitost uklanjanja P i učinak odabranog omjera C/N na učinkovitost procesa i brzinu denitrificirajuće defosfatacije. Brojni su čimbenici koji utječu na proces denitrificirajuće defosfatacije, poput vrste i koncentracije izvora C, koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, pH vrijednosti, DO, anaerobne faze procesa i drugo (Li i sur., 2017; Jena i sur., 2016; Tayà i sur., 2013; Pan i sur., 2013).

Denitrificirajuća defosfatacija uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

U statičkom periodu procesa, u provedbi pokusa denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$, određeno je smanjenje KPK od $16,5 \pm 1,5$ % pri C/N 3, 5 i 7, bez otpuštanja orto-fosfata u ML (engl. *Mixed liquor*). Daljnjim tijekom procesa, u anoksičnim uvjetima uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona, zbivalo se istovremeno uklanjanje P i N kao i smanjenje KPK. Unos P neovisan je o omjeru C/N i iznosio je $75,2 \pm 0,6$ pri čemu je utrošen sav $\text{NO}_2\text{-N}$. U tim pokusima pri omjeru C/N 5 i 7 izvor C je dodan u suvišku te preostaje u obrađenoj otpadnoj vodi na kraju pokusa. Promjene KPK, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ i pH vrijednosti pri C/N 3 u procesu denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu prikazani su na slici 1. Raspoloživi KPK utrošen je tijekom 5 sati procesa uz istovremenu denitrificaciju 30 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri čemu je postignuto uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$ od 75,8 %. Unos P je najintenzivniji tijekom prvih 30 minuta anoksičnih uvjeta za sve odabrane omjere C/N.

López-Vázquez i sur. (2008) navode da unos fosfata u stanicu ovisi o uvjetima u kojima se mikroorganizmi nalaze. U aerobnim uvjetima postigli su prosječan unos fosfata od 10 ± 4 mg $\text{PO}_4\text{-P/gVSSh}$ a pri anoksičnim uvjetima unos je iznosio 3 ± 2 mg $\text{PO}_4\text{-P/gVSSh}$. Prosječan unos fosfata u anoksičnim/aerobnim uvjetima iznosio je 24 ± 16 %. Jena i sur. (2016) provodili su pokus tijekom 180 dana u anoksično-aerobnoj konfiguraciji procesa i postigli 86,7 % unos $\text{PO}_4\text{-P}$ i 98 % uklanjanje $\text{NO}_3\text{-N}$ tijekom anoksične faze. Rezultati denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ u statičko/anoksično vođenom procesu (slika 1) su u suglasju sa rezultatima Jena i sur. (2016) koji su istaknuli najintenzivniji unos P u stanice u prvoj trećini anoksične faze. Za odabrani omjer C/N 3 brzina denitrificacije iznosila je 26,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, a brzina defosfatacija 11,9 mg P/Lh (slika 1). Profil pH pokazuje rast vrijednosti.

U odabranom načinu vođenja procesa – statički/anoksični uvjeti, $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona, omjer N/P 2, omjere C/N 3, 5 i 7, unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice DPAOs nije bio limitiran količinom elektron donora ni početnom količinom elektron akceptora. U literaturi je navedeno da $\text{NO}_2\text{-N}$ može imati inhibicijski učinak na aktivnost DPAOs u koncentraciji 3-93,7 mg/L (Peng i sur., 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999), a da je moguće rješenje tog problema impulsno dodavanje $\text{NO}_2\text{-N}$ niske koncentracije (Ma i sur., 2013; Vargas i sur., 2011).



Slika 1. KPK (statički i anoksični period procesa), NO₂-N, PO₄-P i pH (anoksični period procesa) tijekom denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 3

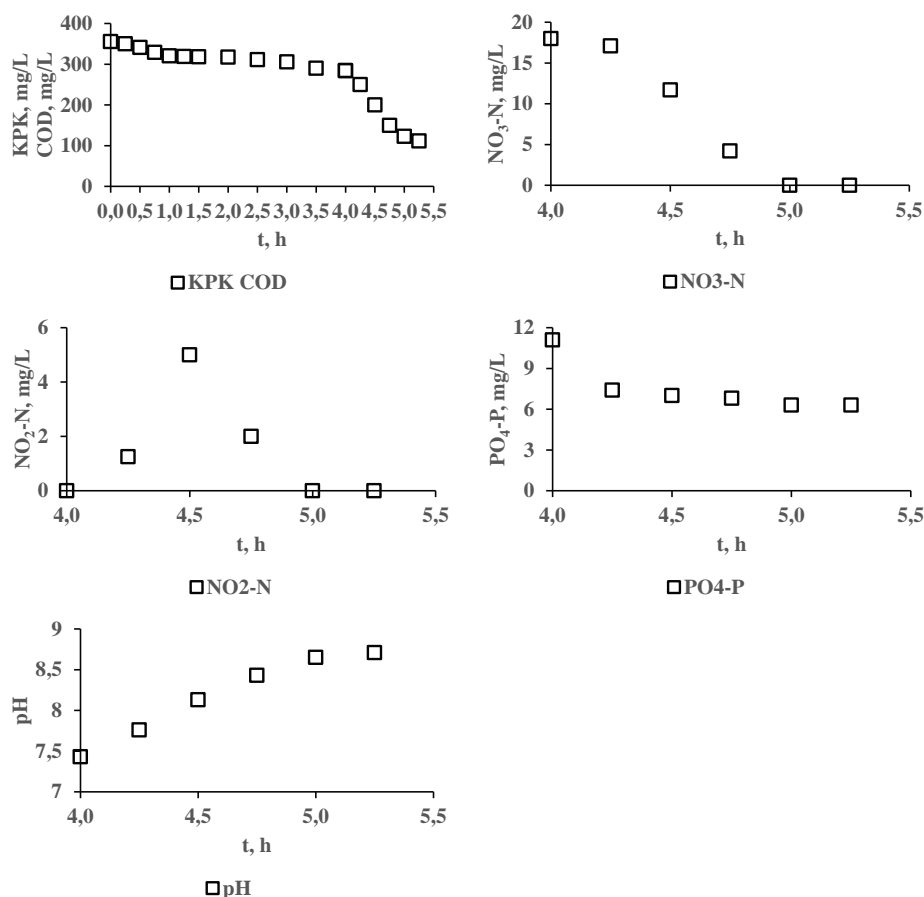
Figure 1. COD (static and anoxic process), NO₂-N, PO₄-P and pH (anoxic process) during denitrifying dephosphatation via NO₂-N as electron acceptor at static/anoxic configuration, at N/P 2 and C/N 3

Denitrificirajuća defosfatacija uz NO₃-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

Pokusi denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona provedeni su također pri omjeru N/P 2, uz početnu koncentraciju 10 mg PO₄-P /L, pri C/N 3 i 5. Tijekom statičkog perioda ostvareno je smanjenje KPK od 19±1 %, što je slično vrijednostima postignutim u pokusima uz NO₂-N kao akceptor elektrona. Omjer C/N 3 ne osigurava dovoljno organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju – u procesu preostaje NO₃-N, a u takvim uvjetima limitiranim izvorom C unos P je iznosio 50,9 %. Denitrifikacija i unos P bili su limitirani nedovoljnom količinom elektron donora.

Promjene KPK, NO₃-N, NO₂-N, PO₄-P i pH pri C/N 5 u procesu denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu prikazani su na slici 2. U anoksičnom periodu procesa istovremeno se unosi P u stanice, zbiva se denitrifikacija uz prevođenje NO₃-N u NO₂-N, te smanjenje koncentracije NO₂-N i KPK. Organski sastojci pri C/N 5 dodani su u suvišku, te je na kraju anoksične faze preostalo 122,9 mg KPK/L. Provedena je potpuna denitrifikacija, a unos P iznosio je 43 %. Profil pH pokazao je rast pH vrijednosti tijekom procesa. Postignuta je brzina denitrifikacije od 18 mg NO₃-N/Lh i brzina uklanjanja P od 4,8 mg P/Lh pri C/N 5 (slika 2). Iz rezultata proizlazi da je minimalna potreba na organskim sastojcima za denitrificirajuću defosfataciju s NO₃-N kao akceptorom elektrona 3<C/N<5 uz omjer N/P 2. Rezultati pokusa denitrificirajuće defosfatacije u statičko-anoksičnom režimu sa NO₂-N i NO₃-N kao akceptorima elektrona (slike 1 i 2) pokazuju da je manja potreba na organskim sastojcima sa NO₂-N kao akceptorom

elektrona u odnosu na $\text{NO}_3\text{-N}$, što je u suglasju sa literaturom (Pan i sur., 2017; Rubio-Rincón i sur., 2017; Zeng i sur., 2016; Zhou i sur., 2010). Rezultati ovih istraživanja (Slike 1 i 2) ukazuju da je $\text{NO}_2\text{-N}$ povoljniji akceptor elektrona u procesu denitrificirajuće defosfatacije u statičko/anoksičnoj konfiguraciji procesa od $\text{NO}_3\text{-N}$, dok su Zhou i sur. (2010) postigli veće uklanjanje P s $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptorom elektrona, u odnosu na $\text{NO}_2\text{-N}$.



Slika 2. KPK (statički i anoksični period procesa), $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 5

Figure 2. COD (static and anoxic process), $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ and pH (anoxic process) during denitrifying dephosphatation via $\text{NO}_3\text{-N}$ as electron acceptor at static/anoxic configuration, at N/P 2 and C/N 5

Zaključci

U statičko/anoksičnoj konfiguraciji procesa DPAOs provode denitrificirajuću defosfataciju uz natrijev acetat kao donor elektrona i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore. U statičkom periodu procesa postignuto je smanjenje KPK bez otpuštanja $\text{PO}_4\text{-P}$. Anoksični period procesa karakteriziran je intenzivnim unosom $\text{PO}_4\text{-P}$ tijekom prvih 15-30 minuta procesa uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, a daljnjom provedbom pokusa u anoksičnim uvjetima uklanjanje P odvija se manjim intenzitetom. Uklanjanje P od 75,8 % pri C/N 3 postignuto je uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor

elektrona, i uklanjanje P od 43,2 % uz NO₃-N pri C/N 5. Veće brzine uklanjanja N i P postignute su u pokusima uz NO₂-N kao akceptor elektrona.

Literatura

- APHA (2005): Standard methods for the examination of water and waste water, 21. izd., American Public Health Association, Washington, DC.
- Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008): Biological wastewater treatment. IWA Publishing London. ISBN: 1843391880.
- Hu, J. Y., Ong, S. L., Ng, W. J., Lu, F., Fan, X. J. (2003): A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors, *Water Res.* 37, 3463 – 3471.
- Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016): Anoxic-aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities, *Biochem. Eng. J.* 105, 80 – 89.
- Li, W., Sun, H. Z., Wei, W., Liu, J., Fu, J. X., Wang, J. (2017): Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism. 3rd International Conference on Water Resource and Environment (WRE 2017), IOP Conf. Series: Earth and Environment Science 82, 012090.
- López-Vázquez, C., Hooijmans, C., Brdjanovic, D., Gijzen, H., van Loosdrecht, M. (2008): Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands, *Water Res.* 42, 2349 – 2360.
- Ma, B., Wang, S., Zhu, G., Ge, S. (2013): Denitrification and phosphorus uptake by DPAOs using nitrite as an electron acceptor by step-feed strategies, *Front. Environ. Sci. Eng.* 7(2), 267 – 272.
- Meinhold J., Arnold E., Isaacs S. (1999): Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge, *Water Res.* 33, 1871 – 1883.
- Oehmen, A., Carvalho, G., Lopez-Vazquez, C., van Loosdrecht, M. C., Reis, M. A. M. (2010): Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms, *Water Res.* 44, 4992 – 5004.
- Pan, M., Chen, T., Hu, Z., Zhan, X. (2013): Assessment of nitrogen and phosphorus removal in an intermittently aeration sequencing batch reactor (IASBR) and a sequencing batch reactor (SBR), *Water Sci. Technol.* 68, 400 – 405.
- Peng, Y. Z., Wu, C. Y., Wang, R. D., Li, X. L. (2011): Denitrifying phosphorus removal with nitrite by a real-time step feed sequencing batch reactor, *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 86, 541 – 546.
- Rubio-Rincón, F. J., Lopez-Vazquez, C. M., Welles, L., van Loosdrecht, M. C. M., Brdjanovic, D. (2017): Cooperation between *Candidatus* Competibacter and *Candidatus* Accumulibacter clade I, in denitrification and phosphate removal processes, *Water Res.* 120, 156 – 164.
- Saito, T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M. (2004): Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms, *Water Res.* 38, 3760 – 3768.
- Tayà, C., Garlapati, V. K., Guisasola, A., Baeza, J. A. (2013): The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition, *Chemosphere* 93, 612 – 618.

- Vargas, M., Guisasola, A., Artigues, A., Casas, C., Baeza, J. A. (2011): Comparison of a nitrite-based anaerobic–anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors, *Process Biochem.* 46, 714 – 720.
- Wong, P., Cheng, K., Kaksonen, A., Sutton, D., Ginige, M. (2013): A novel post denitrification configuration for phosphorus recovery using polyphosphate accumulating organisms, *Water Res.* 47(17), 6488 – 6495.
- Zeng, W., Li, B., Wang, X., Bai, X., Peng, Y. (2016): Influence of nitrite accumulation on “*Candidatus Accumulibacter*” population structure and enhanced biological phosphorus removal from municipal wastewater, *Chemosphere* 144, 1018 – 1025.
- Zhou, S., Zhang, X., Feng, L. (2010): Effect of different types of electron acceptors on the anoxic phosphorus uptake activity of denitrifying phosphorus removing bacteria, *Bioresour. Technol.* 101, 1603 – 1610.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z. (2007): Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms, *Biotechnol. Bioeng.* 98, 903 – 912.

Static/anoxic configuration of denitrifying dephosphatation process with NO₂-N and NO₃-N as electron acceptors

Ivan Mikac¹, Tea Štefanac¹, Dijana Grgas¹, Sanja Radman², Mirna Habuda-Stanić³,
Tibela Landeka Dragičević^{1*}

¹*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva ulica 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*Faculty of Chemistry and Technology, University of Split,
Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia*

³*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*

*Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr

Summary

Denitrifying dephosphatation at static/anoxic configuration of process was investigated. Sodium acetate was electron donor, and nitrite and nitrate electron acceptors. At ratios C/N 3, 5, 7 with NO₂-N as electron acceptors initial concentration of PO₄-P was 15 mg/L, and at ratios C/N 3 and 5 with NO₃-N as electron acceptors initial concentration was 10 mg PO₄-P/L. The experiments were carried out at ratio N/P 2 and pH was not controlled. Higher removal rates of both N and P, in experiments with NO₂-N as electron acceptors relative to NO₃-N as electron acceptor, were observed. The highest removal rate of 26.2 mg NO₂-N/Lh and PO₄-P uptake of 75.8 % was achieved at C/N 3 and NO₂-N as electron acceptor.

Keywords: DPAOs, NO₂-N, NO₃-N, static/anoxic condition

Interfacial phenomena in material

Vesna Ocelić Bulatović^{1*}, Dajana Kučić Grgić², Martina Miloloža²

¹*Faculty of Metallurgy, University of Zagreb, Aleja narodnih heroja 3, 44 000 Sisak, Croatia*

²*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev tg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: vocelicbu@simet.hr*

Summary

Low density polyethylene (LDPE) is a worldwide leading material with excellent mechanical properties and unattainable low cost. Due to its non-degradability, it poses a risk to the ecosystems and exposed organism. In order to reduce the dependence on the depleting petrochemical resources and highlighted biodegradability of the material, the innovative approach is blending LDPE with biopolymers such as thermoplastic starch (TPS). Since LDPE and TPS are immiscible polymers, the usage of a compatibilizer is inevitable. The properties of polymer blend, besides depending on the properties, composition and structure of individual components in the blends; greatly depend on the interfacial interactions between the polymers at which the usage of a compatibilizer has an important role.

The focus of this investigation was exploring the effect of incorporation of a block copolymer styrene–ethylene/butylene–styrene, grafted with 2 wt % maleic anhydride (MA-g-SEBS), as a compatibilizer on the miscibility of the LDPE/TPS blends for improving the application properties. Blends were produce by melt blending using Brabender plasticorder. The miscibility of components in blend was predicted by surface free energy calculations using various models and theories. The adhesion between compatibilizer and phases in the polymer blends was predicted on the basis of the calculated adhesion parameters (interfacial surface free energy, coefficient of wetting and thermodynamic work of adhesion) obtained from the surface free energy of the components.

According to the values of adhesion parameters, significant interactions can be expect between the TPS and the compatibilizer, which are expected due to the formation of an ester bond confirmed by FTIR analysis. The optimal phase interactions are necessary because they are responsible for the miscibility of the components in the blend and thus to the final application properties.

Keywords: LDPE, thermoplastic starch, compatibilizer, FTIR, interfacial properties

Introduction

Plastic packaging as a waste contributes to the environmental pollution (Thomas et al., 2013). Disposal of plastic packaging waste into the environment presents serious problems affecting the ecosystems balance and is a major hazard to living organisms. Furthermore, plastics waste contaminates water resources, and thereby endangering marine organisms that ingest plastic waste unconsciously. Due to the non-degradability of plastic waste for many years, land closure is also a threat for the indigenous animals. On the other hand, the possibility of burning plastic wastes causes serious health issues and contributing to the air pollution and

consequently the environmental pollution (Thomas et al., 2013). Therefore, reducing the application of plastic packaging is a strong motivation for replacing commonly used plastics with biodegradable materials. Moreover, the packaging industry, in order to sustain itself in the demanding market, prefers simple, easily applicable and economical processing technologies such as melt blending approaches (Armentano et al., 2015, Arrieta et al., 2014). Blending of polymers is an effective way and economically profitable because it provides an easy route for obtaining materials with improved property/cost performances without the necessity for synthesization of new polymers. Therefore, in order to obtain a cost-effective biodegradable polymer of the desired properties, a novelty approach is blending a natural biopolymer with synthetic commercial polymers. The obtained biodegradable polymer can be decomposable and/or compostable when there is a sufficient amount of natural biopolymer in the blend, which becomes adequate substrate for microorganisms in a waste disposal environment (Yamak, 2016, Shah et al., 2008). In the packaging industry, low density polyethylene (LDPE) is the leading material due to excellent mechanical properties and unattainable low cost. Due to its non-degradability, hydrophobicity, the high molecular weight, and absence of functional groups susceptible to microorganisms, thus, the growing LDPE waste is a major global environmental risk. The inability of LDPE to degrade in the landfill presents a great challenge for reducing his amount in the environment.

Polysaccharides such as starches offer a lot of advantages for the blending with synthetic commercial polymers in plastics packaging industries due to their low cost, non-toxicity, biodegradability and large availability (Babu et al., 2013, Imre et al., 2013). Native starch has a stiff, granular structure incapable of flow and cannot be melting processed like a plastic. In order to process the starch by standard polymer processing procedures, it needs to be plasticized. The plasticization process is the conversion of native starch to thermoplastic starch, i. e. the crystalline structure of native starch is destroyed by the use of a plasticizer. In the plasticization process, the hydrogen bond between adjacent glucose molecules is broken, and the granular structure of native starch is broke down. Despite the swelling of the starch after absorbing plasticizers through hydrogen bonding with its free hydroxyl groups, they still retain their order and crystallinity (Oduola et al., 2015).

In order to completely decomposing of the semicrystalline structure of starch and changing it to a homogeneous one, heat and shear is required, which promotes hydrogen bonding between the plasticizer and starch. Then the plasticization process is complete and such thermoplastic starch (TPS) can be blending with other synthetic commercial polymers and easily processed. Incorporating starch into the polyolefin matrix TPS/polyolefin blends are obtained. This kind of blends keeps production costs low and emphasize biodegradability. But, TPS / polyolefin blends are not often represented in the literature because the general bias is that they are two completely different materials that are immiscible and their blends form two separate phases and it is almost impossible to obtain a controlled, homogeneous blend (Vrsaljko et al., 2008). to overcome problems caused by incompatibility of LDPE and starch, the focus of this investigation was to produce the low density polyethylene (LDPE) based biodegradable films blended with starch biopolymer with the usage of a compatibilizer, which have reactive groups such as maleic anhydride, with the aim to obtain maximum synergy between components.

The purpose of this study was to predict the miscibility of components in a LDPE/TPS blends by surface energy calculations using different models and theories.

Furthermore, the processability through the melt flow index and detailed chemical characterization of the investigated samples was also performed.

Materials and Methods

Low density polyethylene (LDPE), Dow 150 E, was supplied from Dow Chemical Company. The native wheat starch “Srpanjka” was purchased from the Agricultural Institute, Osijek, Croatia. The glycerol with 99.5 % purity was used as a plasticizer for native wheat starch and was obtained from Gram Mol, Zagreb, Croatia. As a compatibilizer was used maleic anhydride grafted styrene–ethylene/butylene–styrene block copolymer, grafted with 2 wt % maleic anhydride (MA-g-SEBS), Kraton FG 1901X, fabricated by the Shell Chemicals Company, USA.

Thermoplastic starch (TPS) was prepared by blending native wheat starch with glycerol added as a plasticizer with ratio of 60 (native wheat starch)/40 (glycerol). The TPS was extruded in a laboratory single-screw extruder (Model 19/20DN; Brabender GmbH, Germany).

The temperature profile was ranged from 100 °C to 130 °C with the screw speed 40 rpm and dosing speed of 15 rpm. The extruded TPS sample was cut and granulated in pellet form and then stored in sealed plastic bags at room temperature overnight. Varying amount of TPS (10, 20, 30, 40, 50 wt %) was then blended together with LDPE pellets within a Brabender plasticorder for 9 min at 160 °C with a rotor speed of 60 rpm. Finally, the blends were moulded in laboratory hydraulic press Fontune, Holland, at a temperature of 150 °C, the pressure of 25 kPa during 5 min, with a preheating of 1 min to obtain the test samples for further analysis. First, TPS and LDPE were initially mixed, and after their preparation and homogenization the compatibilizer was added. The amount of MA-g-SEBS as compatibilizers were 3 wt % for all ratios of LDPE/TPS blends. Fig. 1 shows the prepared LDPE_TPS blends without and with the compatibilizer.

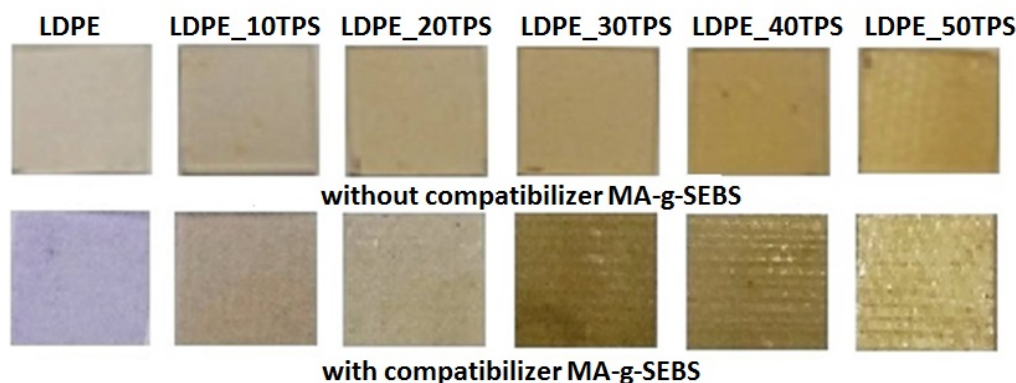


Figure 1. Prepared LDPE_TPS blends without and with the compatibilizer

Processability

The melt flow index, MFI, of the blends were determined using an apparatus (Zwick 4100, Germany), with a capillary die of 8-mm length and 2-mm diameter. Seven grams of each sample was loaded into the barrel of the apparatus, which has been heated to 190 °C. A driving weight of 5 kg for the material was applied to the plunger and the molten sample was forced through a die. The extrudates were collected and weighed. The MFI values were calculated in g (10 min)^{-1} .

Chemical structure characterization

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses in attenuated total reflection (ATR) mode with Diamant Durascope ATR accessory were performed using a Perkin Elmer FT-IR Spectrum One spectrometer (Perkin Elmer, USA) at room temperature with a resolution of 4 cm^{-1} in the frequency range from 650 to 4000 cm^{-1} .

Interfacial properties

Surface free energies, as well as the corresponding dispersive and polar component of the materials, were determined by measuring the contact angles. The contact angles of the blends without and with compatibilizer were measured on a contact angle goniometer, DataPhysics OCA 20 Instrument GmbH, at a temperature of $23\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$. As a polar test liquids distilled water, H_2O , (twice distilled $\lambda=1.33\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}$) and formamide, CH_3NO , (p.a. 99.5 %, Fluka) were used while di-iodomethane, CH_2I_2 , (p.a. 99.0 %, Aldrich) was used as non-polar liquid respectively. The volume of the test liquid drop was $2\text{ }\mu\text{l}$. According to the literature (Ström et al., 1987, Wu, 1973) the surface tensions of the test liquids are presented in Table 1.

Table 1. Surface free energy (γ_l), dispersion (γ_l^d), and polar component (γ_l^p) of test liquids

Test liquids	γ_l (mJ/m ²)	γ_l^d (mJ/m ²)	γ_l^p (mJ/m ²)
Water	72.8	21.8	51.0
Formamide	58.0	39.0	19.0
Di-iodomethane	50.8	50.8	0.0

Results and Discussion

Processability

The results of MFI value for LDPE, LDPE_TPS and LDPE_TPS_MA-g-SEBS blends are presented on Fig. 2. The importance of MFI measurement is due to connections to the molecular weight and viscosity of the materials, and also is critical to anticipating and controlling processing ability of polymers. The higher MFI value, the lower is viscosity of the material. Also, the MFI of the blends is useful because it provides indirect information on the dispersion and interaction between the polymers, since the flowability of polymer blends is influenced by the interfacial characteristics and their structure (Agboola et al., 2011). However, it should be noted that MFI only provides with a very crude and approximate assessment. Hence, MFI testing is mainly utilized for industrial application where it is used as a quality control for determination of polymer quality and attributes before it is processed (Oduola et al. 2015, Ahamed et al., 2016). It was not possible to determine the MFI value of thermoplastic starch with a load of 2.16 kg due to high viscosity of the TPS, in which case the machine would be blocked. According to that, the load of 5 kg was used to obtain a certain MFI value for thermoplastic starch. In spite of the excessively long period of TPS exit through the die, it was possible to define the MFI value of TPS which is extremely low with

value of 0.31 g/10 min. The LDPE shows MFI value of 2.2 g/10 min. The MFI values for LDPE_TPS blends decreased with increasing thermoplastic starch content. Since the MFI is an indirect measurement of viscosity, it follows that the thermoplastic starch must act as a rigid component in the blends, since the main effect of rigid component is to increase the elastic modulus of a blend or the viscosity of a fluid suspension (Beg et al., 2016). The reduction of MFI is also due to the fact that thermoplastic starch is more viscous than LDPE. Further, the MFI values are improved when a compatibilizer is added into the LDPE_TPS blends. The use of MA-g-SEBS as a compatibilizer in the blends causes better interactions between the TPS and MA-g-SEBS due to the chemical reactions between hydroxyl groups in the thermoplastic starch and anhydride in MA-g-SEBS as confirmed by FTIR-ATR analysis. TPS and the compatibilizer molecules may favor the desired LDPE_TPS interactions thus improving the compatibility between LDPE and thermoplastic starch (Beg et al., 2016). The improved interactions between the blend components and additionally possible inter diffusion of starch molecules in the LDPE can cause the increase in viscosity and MFI values. So, the MFI value was improved with addition of the MA-g-SEBS as a compatibilizer.

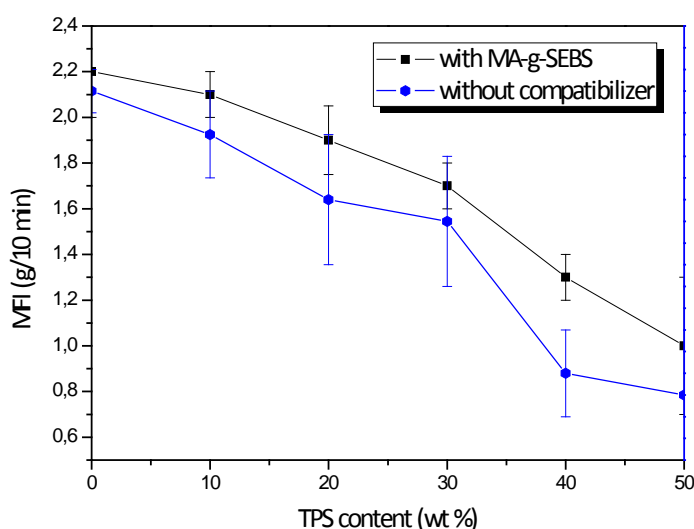


Figure 2. MFI of the investigated samples

Chemical structure characterization

Chemical characterization of the native wheat starch, pure polymers (LDPE and TPS) without and with the addition of MA-g-SEBS as a compatibilizer, and also for blend LDPE_50TPS_MA-g-SEBS, were recorded using the ATR technique with a Perkin Elmer One FT-IR system between 4000 and 400 cm^{-1} (Fig. 3 to Fig. 6). The FTIR spectrum (Fig. 3) of LDPE shows the characteristic absorption bands at 2915 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} , 1463 cm^{-1} and 1377 cm^{-1} ascribed to $-\text{CH}_2$ asymmetric, $-\text{CH}_2$ symmetric, bending deformation and $-\text{CH}_3$ symmetric deformation vibrations, respectively. The characteristic bands noticed at 729 and 719 cm^{-1} are due to stretching of methylene and they are specific for LDPE (Guzmán et al., 2017). Also, the bands for $-\text{OH}$ groups were seen as a broad band at 3332 cm^{-1} . The vibration peak at 1377 cm^{-1} related to $-\text{CH}_3$ symmetric deformation vibration is one of the most

important indicators to distinguish poly(olefin), specifically for LDPE (Dođana et al., 2018, Labo et al., 2003). The FTIR spectrum of LDPE_MA-g-SEBS (Fig. 3), not only contains all the above characteristic absorption peak related to LDPE and SEBS (Sangeetha et al., 2016), but also contains a new characteristic absorption band at 1720 cm^{-1} that belongs to C=O stretching of cyclic anhydride, which indicates maleic anhydride (MA) in the MA-g-SEBS compatibilizer. The absorption band is at the same location without any shifting, as the band of the pure compatibilizer (Bulatovic et al., 2018). Except this new band at 1720 cm^{-1} that was observed, other new bands or perhaps an increase in peaks intensity that would indicate an interaction between the LDPE and the compatibilizer are not observed.

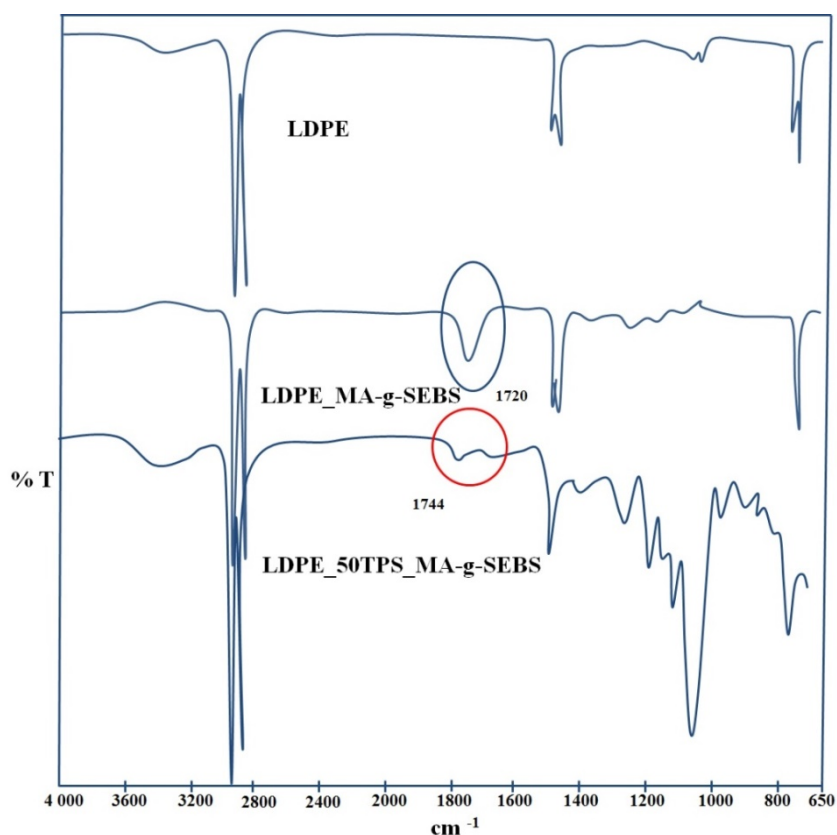


Figure 3. FTIR spectrum of LDPE, LDPE_MA-g-SEBS and LDPE_50TPS_MA-g-SEBS blend

The FTIR spectrum of natural wheat starch shows (Fig. 4) the characteristic bands for polysaccharides as a glucopyranose rings. The broad characteristic band at 3282 cm^{-1} belongs to stretching and vibrations of intramolecular O-H-groups from the absorbed water, a band at 2928 cm^{-1} corresponds to -C-H asymmetrical stretching vibrations of aliphatic groups, signals at 1640 cm^{-1} belongs to H-O bending vibration due to adsorbed water, and C-O-C asymmetrical stretching and vibration at 1150 cm^{-1} (Musa et al., 2013). The vibration at 1080 cm^{-1} corresponds to glucopyranose and hydroxyl linked C-O stretching and vibration. The characteristic bands observed at $1150\text{--}980\text{ cm}^{-1}$ are the typical region of the polysaccharides, where band at 925 cm^{-1} belongs to glucosidic bond vibration. These bands show the most intensive absorbance in the FTIR spectrum. The FTIR spectrum of TPS (Fig. 4) is quite

similar to the FTIR spectrum of native wheat starch but with appearance of two new characteristic absorption bands at 2854 cm^{-1} and 1102 cm^{-1} due to the formation of inter and intramolecular bonding between hydroxyl group of natural wheat starch and glycerol used as plasticizer (Glavcheva-Laleva et al., 2015). Also, from FTIR spectrum of TPS (Fig. 4) it is observed that the plasticizer caused a slight shift of the characteristic bands such as O – H and C – H stretching. These shifts indicate a hydrogen bonding between plasticizer and starch during the plasticization process due to heat and shear while bonds that hold the starch molecules together are break down; i.e the action of hydroxyl groups of starch molecules is interrupted by process of plasticization. Therefore, the addition of the plasticizer causes that plasticizers occupy spaces between the starches chains and therefore the bending vibrations are alleviate and the wave number of the C–H bend are increased. These results proved the plasticization effect of glycerol, due to the hydrophilic nature of glycerol and starch (Musa et al., 2013, Xiao et al., 2004). Addition of MA-g-SEBS to pure TPS results in the formation of a new characteristic absorption band at approximately at 1743 cm^{-1} which correspond to the carbonyl group of maleic anhydride (C=O stretching vibration), suggesting the maleic anhydride ring is fully open.

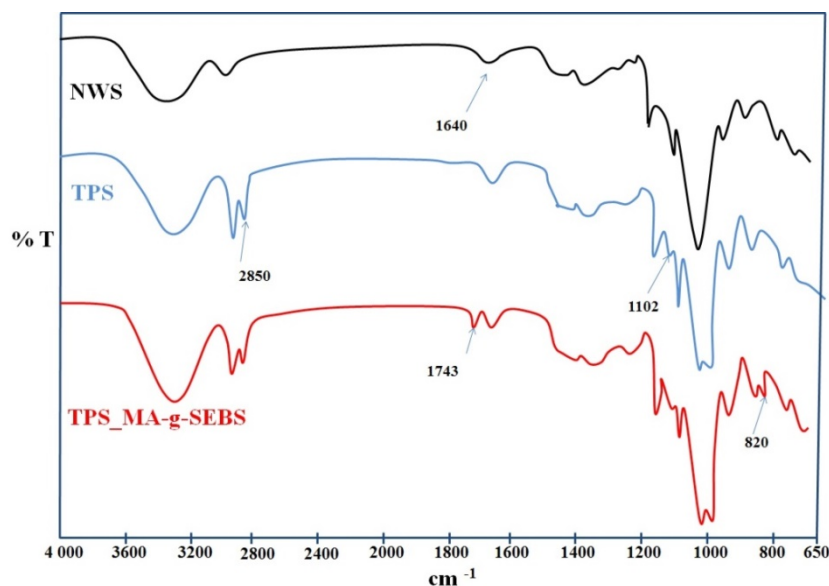


Figure 4. FTIR spectrum of wheat starch, TPS and TPS_MA-g-SEBS samples

The intensity of characteristic bands at 1240 cm^{-1} , which correspond to C-O-O stretching, is increased due to more C-O groups. Additionally, band at 820 cm^{-1} belongs to the butyl group which is formed in the starch by ring opening and esterification of maleic anhydride. Examination of the FTIR spectrum of the TPS_MA-g-SEBS indicates the existence of C-O-O and C=O groups from ester bonds which confirms the esterification of starch. The formation of ester groups is caused by the reaction between a hydroxyl group of starch and anhydride groups from a compatibilizer (MA-g-SEBS). The anhydride ring grafted onto MA-g-SEBS is opened and the ester link with O-H group from TPS is formed (Fig. 5).

The FTIR spectrum of TPS_MA-g-SEBS also shows the appearance of a new characteristic absorption band at 698 cm^{-1} , which is characteristic of the styrene benzene rings from the MA-g-SEBS (Tang et al., 2018). To confirm the existence of ester bond by adding a compatibilizer to the LDPE_TPS blend, the FTIR spectrum of the LDPE_50TPS_MA-g-SEBS blend is also shown at Fig. 3. The absorption band at 1744 cm^{-1} confirms that, the formation of an ester bond in the blend LDPE_50TPS_MA-g-SEBS, and it is important to note again that the formation of ester groups is caused by the reaction between a hydroxyl group of starch and anhydride groups from a compatibilizer (MA-g-SEBS), which was also reflected in the blend.

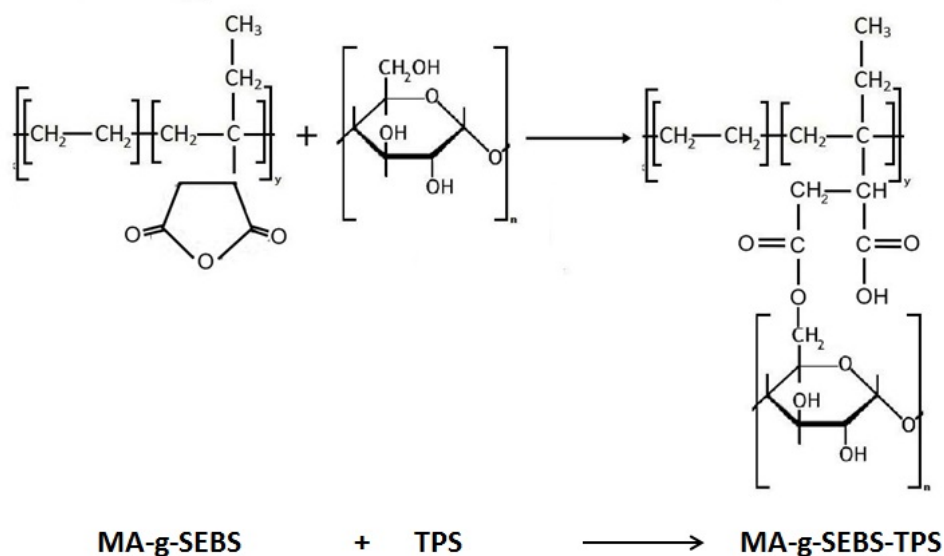


Figure 5. Simplified schematic representation of an ester bond formation

Interfacial properties

Knowledge of the surface characteristic is important in the assessment of the interactions at the interface in blends and composites. The surface free energy and its component were obtained via contact angle measurements with different test liquids (water and formamide as polar liquids and di-iodomethane as nonpolar liquids). Fig. 6 shows drops of test liquids on the LDPE, TPS and MA-g-SEBS surfaces. The contact angle with water is related to the hydrophobic or hydrophilic nature of polymer surface. High value of contact angle with water and LDPE surface (99.3°) indicates poor wetting, low interactions with polar liquids and confirming its hydrophobic character. On the other hand, the TPS showed a water contact angle value of 55.6° suggesting a better wetting of surface and high interaction between TPS and water molecules, indicated a hydrophilic character of the TSP sample. Block copolymer, MA-g-SEBS, used as a compatibilizer for LDPE/TPS blends, consists of hard (polystyrene), soft (ethylene-butylene) blocks and highly polar units of maleic anhydride grafted on nonpolar ethylene-butylene block., MA-g-SEBS copolymer has contact angle values with water 87.0° . This value suggesting a possible positive impact of MA-g-SEBS as a compatibilizer due to nonpolar domain and on the other side grafted maleic anhydride group as polar hydrophilic domain.

Table 2. Contact angle for LDPE, TPS and MA-g-SEBS polymers

Polymer	Contact angle (°)		
	Water	Formamide	Di-iodomethane
LDPE	99.3	104.4	67.2
TPS	55.6	55.4	63.8
MA-g-SEBS	87.0	79.8	53.2

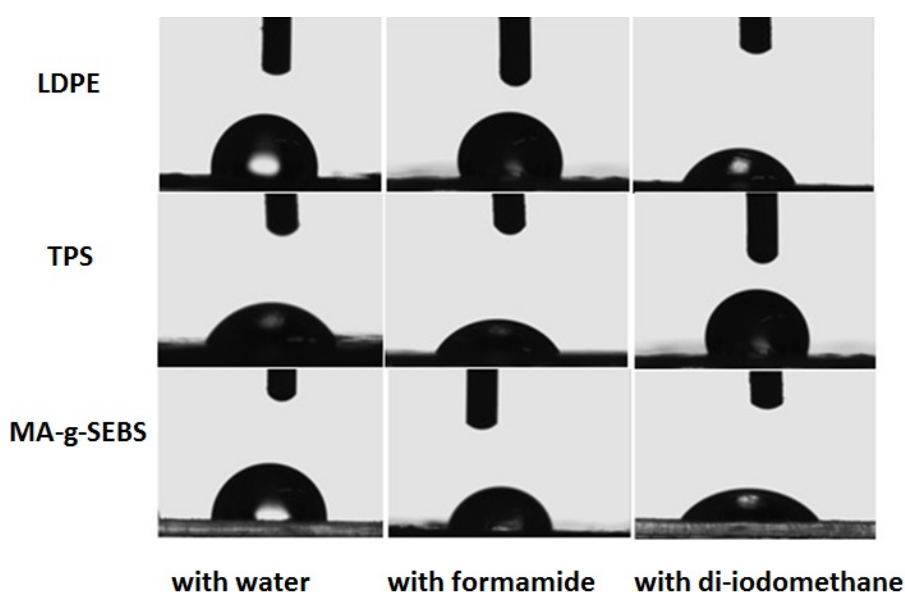


Figure 6. Test droplets on the surface of LDPE, TPS, and MA-g-SEBS polymers

Based on the obtained values of contact angle with different liquids, the surface free energy of the polymers were calculated using two theoretical models; Wu's and Owens-Wendt's. Obtained values are shown in Table 3. It is obvious that the values obtained with the Owens-Wendt model are lower than the values obtained by Wu's model because of the use of the geometric mean equation of the surface free energy components. The value of a dispersion component of LDPE is much higher than the polar component whose value is close to zero (1.27 mJ/m^2) calculated by Owens-Wendt model, while the polar component calculated by Wu model is equal to zero. It can be seen that the disperse component made the major contribution to the total surface free energy for all investigates polymers. The thermoplastic starch has high polar component (21.68 mJ/m^2), which confirms its hydrophilic character. According to calculated surface free energy of MA-g-SEBS it has more similarity with LDPE. It has more expressed dispersion component while its polar component is extremely low. Degree of polarity of MA-g-SEBS is 12.58 %, due to grafted maleic anhydride as a polar domain. Based on the obtained values of contact angle with water, it is assumed that the non-polar, hydrophobic groups or blocks of the ethylene-butylene elastomer are predominantly housed on the surface of the compressed samples of the MA-g-SEBS copolymer.

Table 3. Surface free energies, dispersive and polar components and polarity of LDPE, TPS and MA-g-SEBS polymers

Polymers	Surface free energy (mJ/m ²)						Polarity* (%)
	Owens Wendt			Wu			
	γ_s^d	γ_s^p	γ_s	γ_s^d	γ_s^p	γ_s	
LDPE	17.26	1.27	18.53	24.10	0.00	24.10	0.00
TPS	22.55	21.68	44.23	24.71	22.70	47.41	47.88
MA-g-SEBS	27.07	2.85	29.92	29.82	4.29	34.11	12.58

*Polarity— γ_s^p/γ_s 100 (percentage of polar component in overall surface free energy)

Adhesion parameters in blends

From the surface free energy of neat polymers adhesion parameters are calculated in order to estimate the interaction between the components in polymer blends. Properties of the polymer blend depend upon the degree of miscibility of the two polymers, structure and composition of the blend. Properties of the polymer blend depend upon the properties of the polymer, one of which is matrix while the other is dispersed phase of the blend. In order to improve the compatibility or interaction between two immiscible or partially miscible polymers, the third component that serves as a compatibilizer, is added to the blends. To achieve the best properties of the blends, the object is to achieve optimal adhesion parameters.

Thermodynamic work of adhesion and adhesion parameters, that are important for predicting the strength of interactions in the blends, are interfacial surface free energy, γ , thermodynamic work of adhesion, W , and coefficient of wetting, S , represented in Eqs. 1–3:

$$W_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12} \quad (1)$$

$$S_{12} = \gamma_1 - \gamma_2 - \gamma_{12} \quad (2)$$

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - \frac{4 * \gamma_1^d * \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} - \frac{4 * \gamma_1^p * \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \quad (3)$$

In order to achieve optimal adhesion at the interface, it is necessary to meet the conditions of maximum thermodynamic work of adhesion ($W = \max$), positive coefficient of wetting that tend to zero ($S = 0$) and minimal interfacial surface free energy ($\gamma = \min$) (Mittal, 1976). If the conditions of the adhesion parameters are satisfied, then interaction between components in polymer blends will be established resulting in effective adhesion at the interface (Siročić et al., 2013). Adhesion in immiscible blends such LDPE/TPS is very poor and requires surface modification, i.e. addition of a compatibilizer as the third component in the blend. The main role of the compatibilizer addition is to decrease the surface free energy at the interface in order to improve compatibility between immiscible components in the blend. The thermodynamic parameters of the adhesion are calculated from the surface free energy data and its dispersive and polar components, using the harmonic mean equation (Wu model), which is more commonly used to calculate the surface characteristics of nonpolar solids. The values of calculated adhesion parameters of LDPE_TPS, LDPE_ MA-g-SEBS and TPS_ MA-g-SEBS polymer pairs are given in Table 4. The analysis of interface surface free energy was performed to validate the ‘minimum interfacial energy hypothesis’ in blends when graft

copolymers (MA-g-SEBS) containing polar side chains (MA) and nonpolar main chains were applied (SEBS). The surface of blends will restructure itself to reduce interfacial surface free energy, which tends to be zero or negative. If this criterion is satisfied, the compatibilizer will be located at the interface and adhesion of two components in polymer blend will be increased (Siročić et al., 2013). In other words, the interactions of the compatibilizer with both polymers in blends are approximately the same; otherwise, a compatibilizer will migrate into one phase (Siročić et al., 2013). The lower values of the interfacial surface free energy indicate stronger interactions between polymer pairs. From Table 4 is visible that the highest value of the interfacial surface free energy is between LDPE and TPS samples. This indicates low interactions between LDPE and TPS in the blend. The value of the interfacial surface free energy of the LDPE_MA-g-SEBS and TPS_MA-g-SEBS polymer pairs is lower relative to a polymer pair of LDPE_TPS indicating stronger adhesion on the interface. Minimal interfacial surface free energy and positive but minimal wetting coefficient is required in order to enhance good adhesion between two phases in the polymer blend, which is achieved in the TPS_MA-g-SEBS blend.

Table 4. Calculated adhesion parameters of polymer pairs: LDPE_TPS, TPS_MA-g-SEBS and LDPE_MA-g-SEBS

Polymer pairs	Adhesion parameters, mJ/m ²		
	Surface free energy of interphase, γ_{12}	Work of adhesion, W_{12}	Wetting coefficient, S_{12}
LDPE_TPS	22.71	48.80	-46.02
TPS_MA-g-SEBS	13.04	68.48	0.26
LDPE_MA-g-SEBS	4.90	53.31	-14.91

The work of adhesion for TPS_MA-g-SEBS blend is 68.48 m J m⁻² indicates the good interaction between TPS and MA-g-SEBS as a compatibilizer. Positive values of the wetting coefficient indicate on good wetting of compatibilizer surface by polymer matrix. Based on the obtained adhesion parameters, it can be concluded that the most expressed interactions are for a pair of TPS_MA-g-SEBS due to the formation of the ester bond as confirmed by the FTIR analysis. It is apparent that the optimal adhesion conditions best meet the TPS_MA-g-SEBS system and stronger or optimum phase interaction is expected, which will contribute to the improvement of application properties such as mechanical, thermal, barrier properties and etc. that are planned for further research on these blends.

Conclusions

This study is motivated to create a biodegradable polymer blends by simple blending the low density polyethylene with thermoplastic starch. The compatibilizer based on maleic anhydride was used to improve the compatibility of the LDPE_TPS blends. The MFI values are improved when a compatibilizer is added into the LDPE_TPS blends which pointing out the better processability of the blends. The absorption band at 1744 cm⁻¹ confirms the formation

of an ester bond in the blend LDPE_TPS_MA-g-SEBS between hydroxyl group in the thermoplastic starch and anhydride in MA-g-SEBS suggesting the better interactions between LDPE and TPS by the addition of a compatibilizer. Minimal interfacial surface free energy and positive but minimal wetting coefficient is achieved in the TPS_MA-g-SEBS blend. The work of adhesion for TPS_MA-g-SEBS blend indicates the good interaction between TPS and MA-g-SEBS as a compatibilizer. Based on the obtained results, it can be concluded that the optimal adhesion conditions best meet the TPS_MA-g-SEBS system and stronger or optimum phase interaction is expected, which will contribute to the improvement of application properties LDPE_TPS blends such as mechanical, thermal, barrier properties and etc. that are planned for further research on these blends.

Acknowledgement

This work was financial supported from Croatian Science Foundation through a project entitled “Advanced Water Treatment Technologies for Microplastics Removal” (AdWaTMiR) (IP-2019-04).

References

- Agboola, O., Sadiku, R., Adegbola, A. Biotidara, O. (2011): Rheological Properties of Polymers: Structure and Morphology of Molten Polymer Blends, *MSA* 2, 30-41.
- Ahamed, F., Phang, S. W., Sin, L. T. (2016): Mechanical behaviour of thermoplastic starch/montmorillonite/alumina trihydrate nanocomposites, *J. Eng. Sci. Technol.* 11 (9), 1344-1359.
- Armentano, I., Fortunati, E., Burgos, N., Dominici, F., Luzi, F., Fiori, Jiménez, S. A., Yoon, Ahn, K. J., Kang, S., Kenny, J. M. (2015): Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems, *eXPRESS Polym. Lett.* 9 (7), 583–596.
- Arrieta, M. P., Fortunati, E., Dominici, F., Rayón, E., López, J., Kenny, J. M. (2014) PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties, *Polym. Degrad. Stab.* 107, 139–149.
- Babu, R. P., O'Connor, K., Seeram, R. (2013): Current progress on bio-based polymers and their future trends, *Prog. Biomater.* 28 (8), 1-16.
- Beg, M. D. H., Kormin, S., Bijarimi, M., Zaman, H. U. (2016): Preparation and Characterization of Low-Density Polyethylene/Thermoplastic Starch Composites, *Adv. Polym. Technol.* 35 (1) 21521.
- Bulatović, V. O., Mihaljević, A., Bajsić, E. G. (2018): Mechanical and interfacial properties of compatibilized polyurethane blends, *Polym. Eng. Sci.* 58 (11), 1911-1922.
- Dođana, F., Širinb, K., Kolcua, F., Kaya, İ. (2018) Conducting polymer composites based on LDPE doped with poly (aminonaphthol sulfonic acid), *J. Electrostat.* 94, 85-93.
- Glavcheva-Laleva, Z., Kerekov, S., Pavlov, D., Glavchev, I. (2015): Obtaining of modifiers for Reduced Friction by esterification of waste glycerol from biodiesel production and sylvat 2, *Chem. Eng. Sci.* 3 (1), 1-6.
- Guzmán, M., Giraldo, D., Murillo, E. (2017): Hyperbranched polyester polyol plasticized tapioca starch/low density polyethylene blends, *Polímeros* 27 (1), 1-7.

- Imre, B., Pukánszky, B. (2013): Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends, *Eur. Polym. J.* 49 (6), 1215-1233.
- Labo, H. J., Bonialla, V. (2003): Handbook of plastics analysis, Marcel Dekker, Inc, NY.
- Mittal, K. L. (1976): Adhesion measurement of thin film, *Electrocomp. Sci. Tech.* 3(1976)1, pp. 21-42.
- Musa, M. B., Yoo, M. J., Kang, T. J., Kolawole, E. G., Ishiaku, U. S., Yakubu, M. K., Whang, D. J. (2013): Characterization and thermomechanical properties of thermoplastic potato starch, *J. Eng. Technol.*, 2 (4), 9-16.
- Oduola, M. K., Akpeji, P. O. (2015): Effect of starch on the mechanical and rheological properties of polypropylene, *Am. J. Chem. Eng.* 3(2-1), 1-8.
- Sangeetha, V. H., Varghese, T. O., Nayak, S. K. (2016): Toughening of polylactic acid using styrene ethylene butylene styrene: Mechanical, thermal, and morphological studies, *Polym. Eng. Sci.* 56 (6), 669-675.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008): Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 26 (3), 246-265.
- Siročić, A. P., Hrnjak-Murgić, Z., Jelenčić, J. (2013): Evaluation of compatibility in SAN/EPDM blends by determination of the adhesion parameters, *J. Adhes. Sci. Technol.* 27 (15), 1652-1665.
- Ström, G., Fredriksson, M., Stenius, P. (1987): Contact angles, work of adhesion, and interfacial tensions at a dissolving Hydrocarbon surface, *J. Colloid Interface Sci.* 119, 352-361.
- Tang, S., Xu, Y., Su, G., Bao, J., Zhang A. (2018): Photoelectric and flexible poly(styrene-b-ethylene/butylene-b-styrene)-zinc porphyrin-graphene hybrid composite: synthesis, performance, and mechanism, *RSC Adv.* 8, 35429-35436.
- Thomas, R. T., Sandhyarani, N. (2013): Enhancement in the photocatalytic degradation of low density polyethylene-TiO₂ nanocomposite films under solar irradiation, *RSC Adv.* 3 (3), 14080-14087.
- Vrsaljko, D., Leskovac, M., Blagojević, S. L., Kovačević, V. (2008): Interphase phenomena in nanoparticulate filled polyurethane/poly(vinyl acetate) polymer systems, *Polym. Eng. Sci.* 48 (10), 1931-1938.
- Wu, S. (1973): Polar and nonpolar interactions in adhesion, *J. Adhes.* 39.
- Xiao, F. M., Jiu, G. Y., Jin, F. A. (2004): Mixed plasticizer for the preparation of thermoplastic starch, *Chin. Chem. Lett.* 15(6) 741-744.
- Yamak, H. B. (2016): Thermal, Mechanical and water resistance properties of LDPE/starch bio-based polymer blends for food packing applications, *JOTCSA* 3 (3) 637-656.

Antropogeni utjecaj na dinamiku organskog opterećenja u komunalnim otpadnim vodama

Monika Šabić Runjavec^{1*}, Sanja Ivanušić¹, Marin Ganjto²,
Marija Vuković Domanovac¹

¹Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
Marulićev trg 19, HR - 10 000 Zagreb

²Zagrebačke otpadne vode – upravljanje i pogon d.o.o.,
Čulinečka cesta 287, HR - 10 040 Zagreb

*Dopisni autor: msabic@fkit.hr

Sažetak

Kvaliteta života i antropogene aktivnosti utječu na složenost sastava komunalnih otpadnih voda. Pročišćavanje komunalnih otpadnih voda predstavlja jedan od osnovnih uvjeta održivog upravljanja vodenim resursima te unaprjeđenje zaštite okoliša. Proces s aktivnim muljem je najčešći izbor za uklanjanje organskog opterećenja iz otpadnih voda. Mikroorganizmi i održavanje aktivne populacije su ključni dio procesa. Na aktivnost mikroorganizama utječu mnogi procesni parametri čime se izravno utječe na učinkovitost postupka pročišćavanja, a u konačnici rezultira određenom kvalitetom pročišćene vode.

U ovom radu praćena je promjena organskog opterećenja u komunalnim otpadnim vodama iz Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Tijekom procesa su praćene vrijednosti kemijske potrošnje kisika i petodnevne biokemijske potrošnje kisika, taložive krute tvari, ukupne suspendirane tvari te koncentracije ukupnog dušika i ukupnog fosfora. Mikroskopskom analizom je dobiven uvid u učinkovitost pročišćavanja otpadnih voda. Učinkovitosti uklanjanja taložive krute tvari i ukupne suspendirane tvari te smanjenja KPK i BPK₅ iznosile su više od 90 % u prosjeku, a koncentracija ukupnog dušika i ukupnog fosfora smanjena je za 44 %, odnosno 45 %. Mikroskopskom analizom omogućen je brzi uvid u proces s aktivnim muljem kako bi se na vrijeme mogli osigurati optimalni uvjeti za biološku obradu komunalne otpadne vode.

Ključne riječi: organsko opterećenje, komunalna otpadna voda, proces s aktivnim muljem

Uvod

Porast stanovništva, ubrzana urbanizacija i gospodarski razvoj globalno utječu na povećanu razinu onečišćenja i nastanak sve većih količina otpadnih voda. Pravilno upravljanje otpadnim vodama, od izvora nastanka, skupljanja, pročišćavanja te vraćanja u okoliš, od izuzetne je važnosti (Oliveira i sur., 2020). Otpadne vode predstavljaju potencijalno pristupačan i obnovljiv izvor vode, energije i hranjivih tvari (Silvestre i sur., 2015). Mnoge svjetske i europske organizacije u svojim strategijama uključuju poboljšanja koja obuhvaćaju gospodarenje otpadnim vodama. Jedan od ciljeva Svjetske zdravstvene organizacije je do 2030. godine poboljšati kakvoću voda smanjenjem onečišćujućih tvari u njihovom sastavu te povećanjem udjela obrađenih otpadnih voda i njihovu sigurnu upotrebu na globalnoj razini (WHO, 2018). Kako bi se osigurala zaštita voda donose se zakonski propisi kojima se

zabranjuje ispuštanje onečišćujućih tvari u vode, provode se nadzori nad stanjem kakvoće voda, izvorima onečišćenja, grade se građevine za odvodnju i pročišćavanje otpadnih voda, sve u svrhu očuvanja i poboljšavanja kakvoće te namjenske korisnosti voda (Zakon o vodama, NN 66/2019). Unapređenje kvalitete života utječe na nastanak složenijeg sastava komunalnih otpadnih voda što predstavlja izazov u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Učinkovitijom obradom osigurava se zaštita okoliša te sprečava negativan utjecaj otpadnih voda na zdravlje čovjeka. Za pročišćavanje otpadnih voda dostupne su razne tehnologije, a nove su konstantno u razvoju (Salgot i Folch, 2018). Pročišćavanje komunalnih otpadnih voda obuhvaća mehaničke, fizikalno-kemijske i/ili biološke postupke, a odvija se na uređajima za pročišćavanje otpadnih voda koji su dizajnirani za ispunjavanje zahtjeva za propisanom kvalitetom otpadnih voda koje reguliraju vladina i međuvladina tijela. Fizikalna obrada obuhvaća rešetanje i taloženje. Kemijska obrada uključuje koagulaciju, flokulaciju i elektrokemijske procese, a biološka obrada aerobne i/ili anaerobne procese. Uređaji za pročišćavanje razlikuju se po stupnju pročišćavanja s obzirom na postupak obrade te učinkovitost pročišćavanja, odnosno ispunjavanje zahtjeva propisanih zakonom. Ovisno o tome razlikuju se prethodni i prvi stupanj te drugi i treći stupanj pročišćavanja otpadnih voda (Muralikrishna i sur., 2017). Drugi stupanj pročišćavanja obuhvaća biološku obradu otpadne vode. Najčešće se primjenjuje postupak s aktivnim muljem, koji se pokazao ekonomičnim i učinkovitim (Oliveira i sur., 2020). Otopljene organske tvari u otpadnoj vodi izvor su hranjivih tvari aerobnim heterotrofnim mikroorganizmima aktivnog mulja (Gerba i Pepper., 2019). Sastav i raznolikost mikrobne zajednice utječu na rad uređaja i učinkovitost pročišćavanja. Poznavanje zajednice mikroorganizama aktivnog mulja olakšava optimizaciju procesa i poboljšava rad uređaja (Yang i sur., 2020). Mikrobiološkom analizom aktivnog mulja i mikroskopskim praćenjem pojavljivanja određenih vrsta protozoa u sustavu dobiva se uvid u učinkovitost pročišćavanja otpadnih voda (Foissner, 2016).

U ovom radu praćeni su fizikalno-kemijski pokazatelji komunalne otpadne vode te uloga mikrobne zajednice aktivnog mulja pri učinkovitom pročišćavanju komunalnih otpadnih voda u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (CUPOVZ) u periodu od siječnja do prosinca 2019. godine.

Materijali i metode

Za praćenje fizikalno-kemijskih pokazatelja komunalne otpadne vode na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba korišteni su kompozitni uzorci (24 h) ulazne i izlazne otpadne vode na dnevnoj i tjednoj dinamici. Kompozitni uzorak ulazne otpadne vode uzorkovan je nakon prethodne obrade s grubim i finim rešetkama, a prije pjeskolova i mastolova. Kompozitni uzorak izlazne otpadne vode uzorkovan je nakon naknadnih taložnika, a prije glavnog odvodnog kanala koji utječe u rijeku Savu. Uzorci aktivnog mulja uzorkovani su iz aeracijskih bioreaktora na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Korišteni su za praćenje pokazatelja učinkovitosti obrade komunalne otpadne vode te mikroskopsku analizu mulja. Tijekom 2019. godine na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Zagreba praćeni su propisani pokazatelji komunalne otpadne vode. Provedene su analize ulazne i izlazne otpadne vode za kemijsku potrošnju kisika (KPK), petodnevnu biokemijsku potrošnju kisika (BPK₅), taložive krute tvari (TT), ukupne suspendirane tvari (UST) te koncentracije ukupnog dušika (UN) i ukupnog fosfora (UP) prema standardnim metodama (APHA, 2012). Uzorak suspenzije aktivnog mulja i otpadne

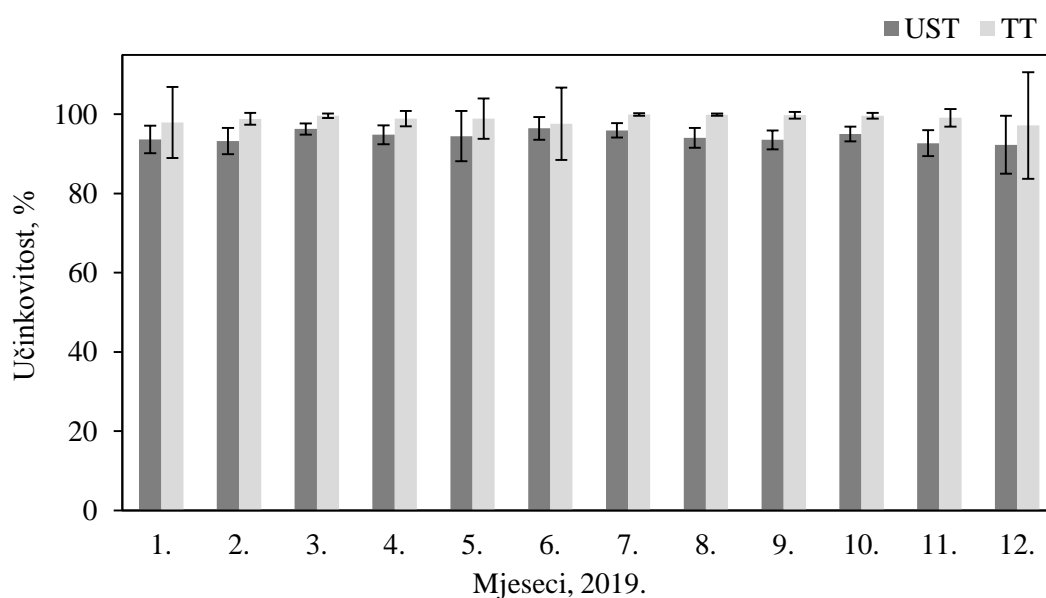
vode je pregledavan pomoću svjetlosnog mikroskopa (Primo Star, Carl Zeiss, Njemačka) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Power Shot A640, Canon).

Rezultati i rasprava

Obrada otpadnih voda važna je zbog očuvanja zdravlja ljudi i okoliša (WHO, 2018). Može se provoditi mehaničkim i/ili biološkim postupcima, a omogućava ispunjavanje zahtjeva za propisanom izlaznom kakvoćom (Zakon o vodama, NN 66/2019). Biološki postupci su najjeftiniji te najprihvatljiviji za okoliš jer se zasnivaju na upotrebi mikroorganizama. Konvencionalni proces s aktivnim muljem temelji se na sposobnosti mikroorganizama da svojim metabolizmom i enzimatskim procesima razgrađuju biorazgradiva onečišćenja prisutna u otpadnim vodama (Gerba i Pepper, 2019; Šabić i sur., 2015). Mikrobnna zajednica ovisi o sastavu otpadne vode te svaki uređaj za pročišćavanje ima karakterističnu zajednicu mikroorganizama, na što mogu utjecati fizikalno-kemijski parametri (Foissner, 2016; Xu i sur., 2018). Na slici 1 prikazane su prosječne vrijednosti učinkovitosti uklanjanja ukupne suspendirane tvari i taložive krute tvari u komunalnoj otpadnoj vodi CUPOVZ tijekom svih mjeseci 2019. godine. Prosječna vrijednost učinkovitosti uklanjanja ukupne suspendirane tvari tijekom godine dana iznosila je 94 %, dok je najviša vrijednost iznosila 96 %. Najmanja prosječna učinkovitost uklanjanja ukupne suspendirane tvari ostvarena je tijekom prosinca i iznosila je 92 %, dok najmanja vrijednost uklanjanja propisana Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020) iznosi 90 %. Na drugim uređajima za pročišćavanje otpadnih voda, učinkovitost uklanjanja suspendirane tvari kreće se od 80 % do 95 % (Yang i sur., 2020). Prosječna učinkovitost uklanjanja taložive krute tvari tijekom 2019. godine iznosila je 98 %. Važno je napomenuti da se taložive tvari CUPOVZ-a uklanjaju fizikalnim putem, kao i dio suspendiranih tvari (Tušar i sur., 2009).

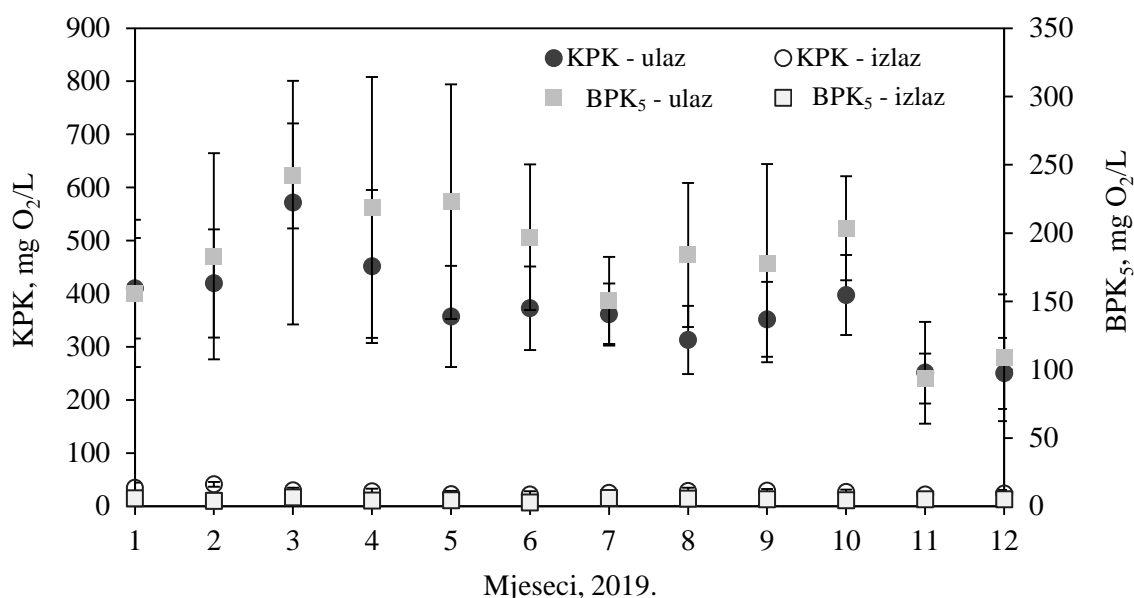
Prosječne vrijednosti KPK i BPK₅ za ulaznu i izlaznu komunalnu otpadnu vodu tijekom 2019. godine prikazane su slikom 2. Vrijednost KPK u ulaznoj otpadnoj vodi u prosjeku je iznosila 376 mg O₂/L. Minimalna zabilježena vrijednost iznosila je 250 mg O₂/L, a maksimalna vrijednost 571 mg O₂/L. Maksimalno odstupanje od prosjeka za 52 % zabilježeno je tijekom ožujka. U izlaznoj otpadnoj vodi prosječna vrijednost je iznosila 28 mg O₂/L, a maksimalno odstupanje od prosjeka zabilježeno je tijekom veljače kada je vrijednost za 46 % bila viša od prosječne vrijednosti. Najniža vrijednost KPK u izlaznoj otpadnoj vodi zabilježena je u studenom, koja je za 6 mg O₂/L niža od prosjeka. Minimalne i maksimalne vrijednosti KPK prate trend vrijednosti taloživih i suspendiranih tvari. Minimalne vrijednosti objašnjavaju se dužim kišnim razdobljem, a maksimalne, prvim snažnijim oborinama (nakon nekog vremenskog razdoblja bez oborina) koje ispiru urbane površine i kanalizacijske cijevi. Vrijednosti KPK izmjerene tijekom istraživanja na drugim uređajima za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda u svijetu kreću se od 571 do 1046 mg O₂/L za ulaznu otpadnu vodu, odnosno od 32 do 52 mg O₂/L za izlaznu otpadnu vodu. Karakteristike ulazne otpadne vode znatno se razlikuju od uređaja do uređaja. Vrijednosti dobivene ovim istraživanjem slažu se s literaturnim podacima (Silvestre i sur., 2015; Salgot i Folch, 2018; Latrach i sur., 2018; Odjadjare i sur. 2010). Prosječna vrijednost BPK₅ u ulaznoj otpadnoj vodi iznosila je 178 mg O₂/L. Najveće odstupanje od prosjeka je izmjereno tijekom studenog kada je vrijednost bila niža za 48 %.

U izlaznoj otpadnoj vodi prosječna vrijednost je iznosila 5 mg O₂/L, a maksimalno odstupanje od prosjeka zabilježeno je tijekom ožujka i lipnja kada je vrijednost BPK₅ iznosila 7 mg O₂/L odnosno 3 mg O₂/L, što je odstupanje od 40 %. Vrijednosti BPK₅ prate vrijednosti KPK. Slabija učinkovitost pročišćavanja uzrokuje povišenu koncentracija BPK₅ na izlazu (Latrach i sur., 2018; Trygar, 2009). Na učinkovitost pročišćavanja utječe i vrijeme zadržavanja otpadne vode u aeracijskom bioreaktoru koje može biti prekratko za potpunu razgradnju biorazgradive organske tvari, gdje se kraće vrijeme zadržavanja otpadne vode javlja pri višim protocima (Gerardi, 2002). Omjer vrijednosti BPK₅/KPK u ulaznoj otpadnoj vodi u prosjeku je iznosio 0,5 što ukazuje na biorazgradivost sadržanih organskih tvari u otpadnoj vodi. Za 60 % niža vrijednost omjera u izlaznoj otpadnoj vodi ukazuje da je veći dio biorazgradive organske tvari razgrađen (Santos i sur., 2012). Na temelju vrijednosti KPK može se pretpostaviti vrijednost BPK₅. Poznavanje omjera omogućuje predviđanje BPK₅ vrijednosti (Trygar, 2009).



Slika 1. Učinkovitost uklanjanja UST i TT u komunalnoj otpadnoj vodi na CUPOVZ tijekom 2019. godine

Figure 1. Removal efficiency of UST and TT from municipal wastewater from CUPOVZ during the year 2019

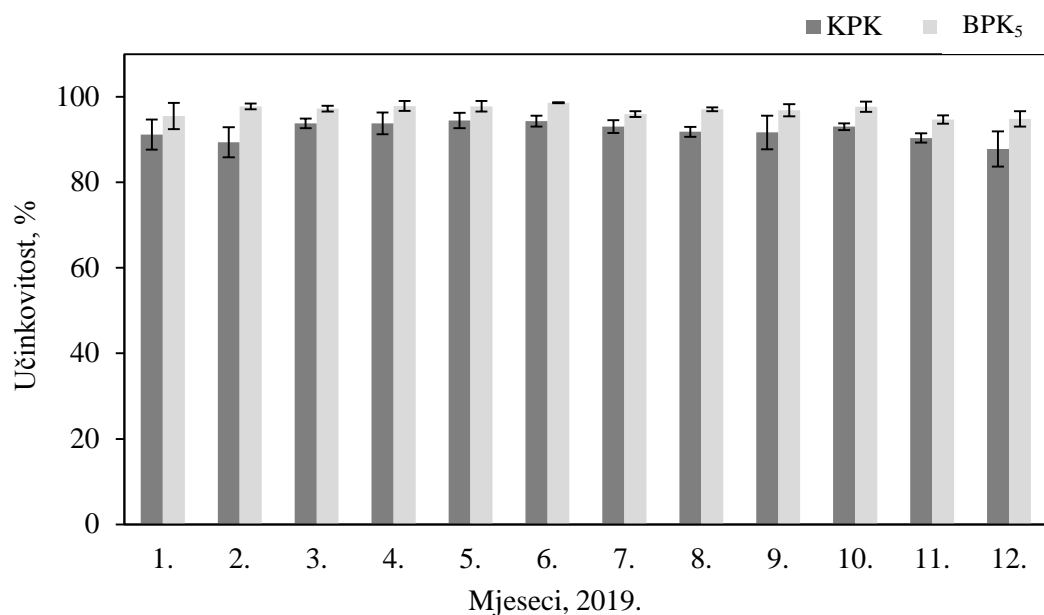


Slika 2. Promjene vrijednosti KPK i BPK₅ u ulaznoj i izlaznoj komunalnoj otpadnoj vodi na CUPOVZ tijekom 2019. godine

Figure 2. Changes in COD and BOD₅ values in influent and effluent of municipal wastewater from CUPOVZ during the year 2019

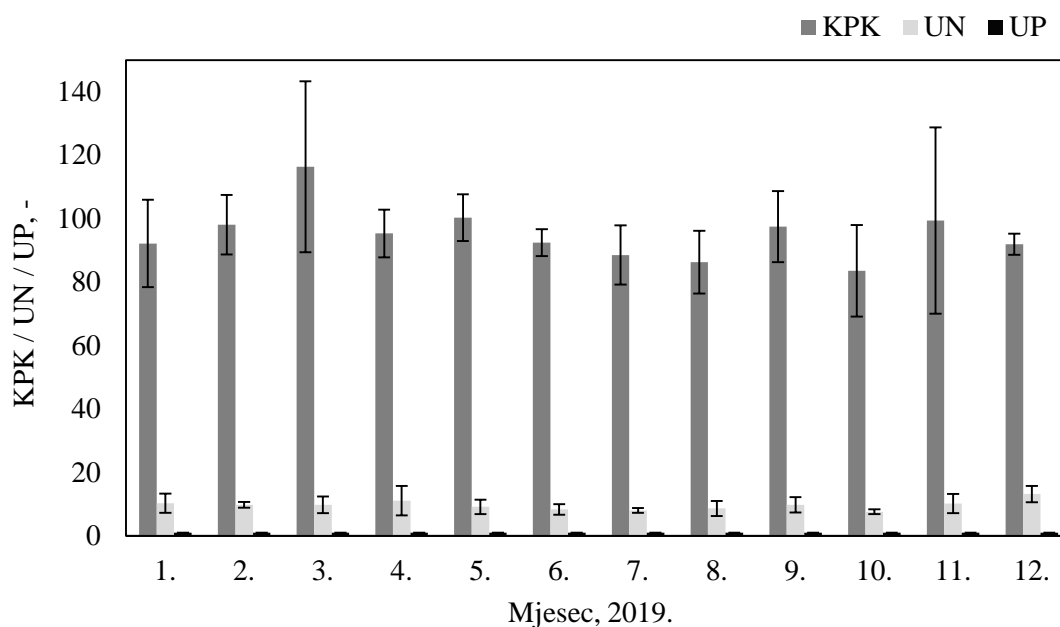
Na slici 3 prikazane su vrijednosti učinkovitosti uklanjanja KPK i BPK₅ u komunalnoj otpadnoj vodi CUPOVZ tijekom 2019. godine. Prosječna učinkovitost uklanjanja organskog opterećenja izraženog preko KPK iznosila je 92 %, dok je najveća učinkovitost uklanjanja iznosila 94 %, a najmanja 90 %. Prosječna učinkovitost uklanjanja biorazgradivog organskog opterećenja izraženog preko BPK₅ iznosila je 97 %, uz najmanju postignutu vrijednost od 95 %. Prosječna učinkovitost uklanjanja KPK i BPK₅ znatno je viša od propisanih vrijednosti prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020). Prema Yang i suradnicama (2020) učinkovitost uklanjanja vrijednosti KPK i BPK₅ na uređajima s aktivnim muljem kreće se od 80 do 98 %. Karakteristike ulazne otpadne vode značajno ovise o geografskom položaju, priključenosti i navikama stanovništva, kao o i priključku i vrstama industrijskih i drugih djelatnosti. Vrijednosti izlazne otpadne vode ovise o izvedbi uređaja, vođenju procesa i operativnim parametrima, koje bi trebalo uzeti u obzir pri usporedbi vrijednosti (Salgot i Folch, 2018; Odjadjare i sur., 2010).

Slika 4 prikazuje vrijednosti omjera KPK, UN i UP ulazne komunalne otpadne vode tijekom 2019. godine. Preko ovih vrijednosti se izražava omjer ugljika, dušika i fosfora, odnosno C/N/P omjer. U prosjeku je tijekom 2019. godine navedena vrijednost omjera iznosila je 95/10/1. Tijekom ožujka vrijednost omjera bila je viša za 19,8 %, zbog povećane KPK vrijednosti ulazne otpadne vode (slika 2). Također, iz slike 4 može se primijetiti da tijekom ljetnih mjeseci dolazi do pada vrijednosti omjera. Ako je omjer C/N u ulaznoj otpadnoj vodi izrazito visok, što je slučaj kod naglih opterećenja, heterotrofni organizmi troše više raspoloživog amonijaka i dušika od nitrificirajućih organizama (Gerba i Pepper, 2019). Omjer C/N/P utječe na brojnost mikroorganizama, koji omogućuju uklanjanje različitih vrsta molekula te učinkovito pročišćavanje otpadne vode (Xu i sur., 2018).



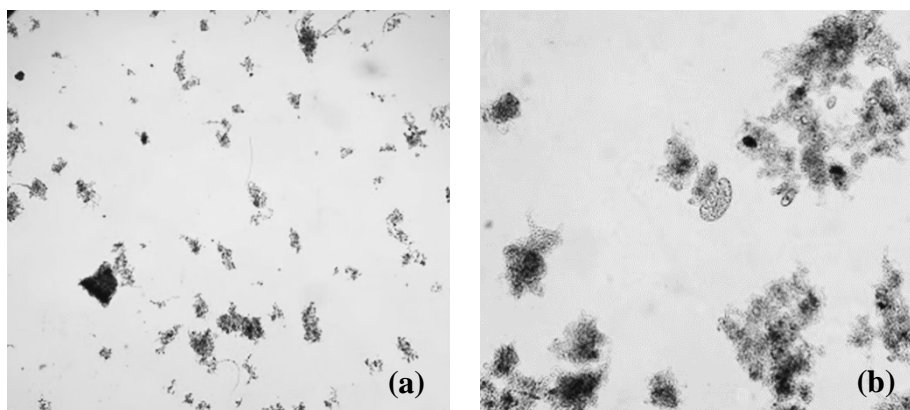
Slika 3. Učinkovitost uklanjanja KPK i BPK₅ u komunalnoj otpadnoj vodi CUPOVZ tijekom 2019. godine

Figure 3. COD and BOD₅ removal efficiency from municipal wastewater from CUPOVZ during the year 2019



Slika 4. Promjene vrijednosti omjera KPK, UN i UP u ulaznoj komunalnoj otpadnoj vodi na CUPOVZ tijekom 2019. godine

Figure 4. Changes values of COD, TN and TP ratio in influent of municipal wastewater from CUPOVZ during the year 2019



Slika 5. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u obradi komunalne otpadne vode na CUPOVZ tijekom 2019. godine, pri povećanjima $P = 40\times$ (a) i $P = 100\times$ (b)

Figure 5. Microphotographs of activated sludge flocs during municipal wastewater treatment from CUPOVZ during the year 2019, at magnification $M = 40\times$ (a) and $M = 100\times$ (b)

Mikroskopskom analizom određene su karakteristika pahuljica aktivnog mulja i prisutnosti indikatora kakvoće aktivnog mulja. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja pri povećanju različitim povećanjima prikazane su slikom 5. Mogu se uočiti veće potpuno formirane pahuljice aktivnog mulja te manje pahuljice koje su u procesu formiranja (slika 5a). Prisutnost nove biomase ukazuje na dobar rast i razmnožavanje mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju (Xu i sur., 2018). Radi boljeg uočavanja morfologije pahuljica aktivnog mulja te pobliže identifikacije indikatora kakvoće mulja, slikom 5b prikazane su pahuljice aktivnog mulja pri većem povećanju. Iz navedene slike mogu se uočiti kompaktne pahuljice, uz prisustvo manjih pahuljica koje međusobnim povezivanjem počinju stvarati veću pahuljicu. Tamnija boja pahuljica ukazuje na kompaktnost i starost mulja. Prisutni mikroorganizmi u sustavu utječu na stvaranje i kakvoću pahuljica, koje se ovisno o svojoj morfologiji lakše ili teže talože u naknadnim taložnicima (Xu i sur., 2018). Također, iz navedene slike 5b, može se uočiti i prisutnost protozoa. Prisutnost indikatora kakvoće mulja, kao što su amebe, bičaši, trepetljikaši i metazoe, u biološkom sustavu pokazatelji su njegova zdravlja i starosti (Foissner, 2016).

Zaključci

Na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreb tijekom 2019. godine postignuta je učinkovitost uklanjanja taložive krute tvari i ukupne suspendirane tvari u prosjeku od 98 % te 94 %. Prosječne vrijednosti KPK i BPK_5 u ulaznoj otpadnoj vodi iznosile su 375,4 mg O_2/L i 178,2 mg O_2/L , dok su učinkovitosti uklanjanja istih parametara iznosile su više od 90 %. Prosječne vrijednosti koncentracija ukupnog dušika i ukupnog fosfora u ulaznoj otpadnoj vodi iznosile su 35,8 mg/L i 4,0 mg/L, a tijekom procesa su smanjene za 44 %, odnosno 45 %. Brojnost prisutnih protozoa u aktivnom mulju ukazuje na dobru kakvoću aktivnog mulja te da su zadovoljeni uvjeti u kojima se aktivni mulj može održavati.

Literatura

- APHA (2012): Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, Washington.
- Foissner, W. (2016): Protists as bioindicators in activated sludge: Identification, ecology and future needs, *Eur. J. Protistol.* 55, 75-94.
- Gerardi, H. (2002): Settleability Problems and Loss of Solids in the Activated Sludge Process, Hoboken, USA: John Wiley & Sons, str. 153-156.
- Gerba, C. P., Pepper, I. L. (2019): Municipal Wastewater Treatment. U: Gerba, C.P., Pepper, I.L., Gentry T.J., Environmental and Pollution Science, Brusseau, M. L., Pepper, I. L., Gerba, C.P. (ur.), London, United Kingdom, Elsevier, str. 393-418.
- Latrach, L., Ouazzani, N., Hejjaj, A., Mahi, M., Masunaga, T., Mandi, L. (2018): Two-stage vertical flow multi-soil-layering (MSL) technology for efficient removal of coliforms and human pathogens from domestic wastewater in rural areas under arid climate, *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 221, 64-80.
- Muralikrishna, I. V., Manickam, V. (2017): Wastewater Treatment Technologies. U: Muralikrishna, I. V., Manickam, V., Environmental Management: Science and Engineering for Industry, Muralikrishna, I.V., Manickam, V. (ur.), Oxford, United Kingdom, Butterworth-Heinemann, str. 249-293.
- Odjadjare, E. E. O., Okoh, A. I. (2010): Physicochemical quality of an urban municipal wastewater effluent and its impact on the receiving environment, *Environ. Monit. Assess.* 170, 383-394.
- Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., Migliolo, L., (2020): Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 705, 135568.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 26/2020.
- World Health Organization and UN-Habitat (2018): Progress on safe treatment and use of wastewater: piloting the monitoring methodology and initial findings for SDG indicator 6.3.1., str. 1-40.
- Salgot, M., Folch, M. (2018): Wastewater treatment and water reuse, *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 2, 64-74.
- Silvestre, G., Fernández, B., Bonmatí, A. (2015): Significance of anaerobic digestion as a source of clean energy in wastewater treatment plants, *Energ. Convers. Manage.* 101, 255-262.
- Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E. (2015): Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode, *Kem. Ind.* 64 (5-6) 229–236.
- Trygar, R. (2009): Nitrogen control in wastewater treatment plants. CET and the University of Florida Center for Training, Research and Education for Environmental Occupations. str. 1-34.
- Tušar, B., Pavić, A., Tedeschi, S. (2009): Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu (CUPOVZ), *Hrvatske vode*, 17 (69-70) 241-250.
- Xu, S., Yao, J., Ainiwaer, M., Hong, Y., Zhang, Y. (2018): Analysis of Bacterial Community Structure of Activated Sludge from Wastewater Treatment Plants in Winter, *Biomed Res. Int.* 8278970.
- Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., Qiao, Z. (2020): Activated Sludge Microbial

Community and Treatment Performance of Wastewater Treatment Plants in Industrial and Municipal Zones, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17 (2) 436.
Zakon o vodama, NN 66/2019.

Anthropogenic impact on the organic load dynamics of municipal wastewater

Monika Šabić Runjavec^{1*}, Sanja Ivanušić¹, Marin Ganjto²,
Marija Vuković Domanovac¹

¹*Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb,
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

²*Zagrebačke otpadne vode – upravljanje i pogon d.o.o.,
Čulinečka cesta 287, 10 040 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: msabic@fkit.hr*

Summary

Quality of life and anthropogenic activities affect the composition complexity of municipal wastewater. Municipal wastewater treatment is one of the basic requirements for sustainable management of water resources and environmental protection improvement. Activated sludge process is one of the most commonly used biological processes for organic load removal from wastewater, where active microorganisms play key part in the process. Activity of microorganisms is under the influence of many process parameters, which directly affect wastewater treatment efficiency and ultimately results in a certain quality of treated wastewater.

In this paper, the change of organic load in municipal wastewater of Central wastewater treatment plant Zagreb was monitored. During the process, the values of chemical oxygen demand and five day biochemical oxygen demand, settleable solids, total suspended solids as also concentrations of total nitrogen and phosphorus were monitored. Microscopic analysis gives an insight into the wastewater treatment efficiency. Removal efficiency of settleable solids and total suspended solids, as the reduction in COD and BOD₅ was in average more than 90 %, while concentrations of total nitrogen and phosphorus were decreased by 44 % and 45 %. Microscopic analysis provides a quick insight into the system with activated sludge, in order to ensure optimal conditions for the biological treatment of municipal wastewater.

Keywords: organic load, municipal wastewater, activated sludge process

Comparative study of mercury(II) removal onto natural and iron-modified zeolite

Marin Ugrina^{1*}, Teja Čeru², Ivona Nuić¹, Marina Trgo¹, Petra Prnjak¹,
Martin Gaberšek², Miloš Miler², Mateja Gosar²

¹*Faculty of Chemistry and Technology, University of Split,
Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia*

²*Geological Survey of Slovenia, Dimičeva ulica 14, 1 000 Ljubljana, Slovenia*

**Corresponding author: mugrin@ktf-split.hr*

This paper compares the sorption abilities of natural (NZ) and iron-modified zeolite (FeZ) for removal of mercury(II) ions from aqueous solutions. The influence of pH, initial concentration, solid/liquid ratio and contact time on the sorption efficiency of both sorbent materials was investigated. At the optimal pH=2, the maximum amount of sorbed mercury(II) on the NZ was 0.28 mmol/g and 0.54 mmol/g on the FeZ. It has been observed that a minimum contact time of 600 minutes is required to achieve the maximum sorption capacity for both sorbents. The results showed that the FeZ has a better sorption ability compared to the NZ. The leaching of mercury from saturated sorbents was examined according to the standard leaching method DIN 38414. In a wide pH range, $4.01 \leq \text{pH} \leq 11.08$, the leaching of mercury(II) was observed in the amount of only 0.28 %–0.78 % from NZ and 0.07 %–0.51 % from FeZ. At extreme pH conditions, $\text{pH} \leq 3.02$ and $\text{pH} \geq 12.05$, leaching of mercury(II) in an amount of 4–7 % occurs on both sorbents. In conclusion, both sorbent materials could be used for remediation purposes but modification significantly improves the sorption properties of zeolite.

Keywords: natural zeolite, iron-modified zeolite, mercury(II), sorption, leaching

Introduction

Environmental mercury pollution comes from the natural, anthropogenic and reemitted resources where the most significant are the anthropogenic ones (Xu et al., 2015). The toxicity of mercury in all its forms is well known, due to its non-biodegradable properties and tendency to bioaccumulate and biomagnify through the food chain (Davis et al., 1997). In order to prevent the migration of mercury into the environment, it is necessary to carry out the remediation of contaminated sites in an appropriate manner. Various remediation techniques have been developed, among which *in situ* techniques are the most applicable due to ease of performance (Mayas et al. 2018; Xu et al., 2015; Wang et al., 2020). This involves removing contaminants on the site, by setting up a barrier that is filled with active material or by sprinkling the contaminated area with active material. Therefore, the choice of appropriate material is very challenging because it should be very efficient in keeping mercury within the structure, as well as be compatible with the environment without causing additional environmental pollution (Thiruvengkatachari et al., 2008). For this purpose, low-cost and easily available materials such as natural zeolites could be used. Natural zeolites are already recognized as efficient materials in environment remediation (Wang et al., 2010; Shi et al., 2009; Misealidis, 2011). They are compatible with nature since they do not cause additional

contaminations of the environment. The structure of zeolites consists of three-dimensional frameworks of SiO_4 and AlO_4 tetrahedra. The negative charge of the zeolite structure is a consequence of isomorphous replacement of Si^{4+} with Al^{3+} which is balanced by the presence of exchangeable cations, mostly Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} . These cations have the ability to participate in the ion exchange process with heavy metal cations in the solutions. In order to enhance zeolite sorption capacity, the modifications with acids, bases, surfactants and inorganic salts are performed (Wang et al., 2010). Inorganic compounds such as Fe- or Mn-oxide and oxyhydroxide have shown strong affinity for heavy metal ions. Many researchers have confirmed a significant increase in the sorption capacity of zeolite modified with Fe(III) salts for Cu(II), Mn(II), Zn(II), Pb(II) and Cd(II) (Doula, 2006; Dimirkou, 2007; Doula, 2007; Han et al., 2009; Kragović et al. 2012; Ugrina et al., 2015).

The paper compares sorption properties of natural (NZ) and iron-modified zeolite (FeZ) for Hg(II) from aqueous solutions. The investigations of different parameters that affect the sorption processes, as well as leaching of sorbed mercury from the saturated zeolites by using the standard leaching test have been performed.

Materials and Methods

Sample preparation

The starting sample, natural zeolite (NZ) was collected from the Vranjska Banja deposit in Serbia. The sample was milled, sieved, and a particle size fraction of 0.6–0.8 mm was separated. Thereafter, sample was washed in ultrapure water and dried at 60 °C.

Iron-modified zeolite (FeZ) was prepared by treatment of NZ according to the procedure published previously (Ugrina et al., 2015). Briefly, the procedure consisted of three separated stages: firstly, sample was mixed with 1 mol/L $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ freshly prepared solution by dissolving iron salts in acetate buffer at pH=3.6, followed by 1 mol/L NaOH and 4 % NaNO_3 solutions. The prepared sample was dried at 40 °C and kept in a desiccator until use. Detailed physico-chemical characterization of the both, NZ and FeZ (chemical composition, SEM/EDS, XRD, FTIR, BET, TG/DTG) has been performed and explained in detail in a previously published paper (Ugrina et al., 2015).

Sorption experiments

The salt, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, was used for the preparation of the stock solution, from which the solutions of lower concentrations were prepared by dilution in ultrapure water. The pH of solutions was adjusted by adding a few drops of 0.1 or 1 mol/L HNO_3 . All experiments were performed in the batch mode by using an incubator shaker, within 24 hours, at 230 rpm and at 25 °C. The concentration of Hg(II) before and after the performed experiments was determined by using a Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (PinAAcle 900F) and the equilibrium pH_e was measured.

The effect of the pH was studied at pH=2.09 and 2.30. The 1.000 g of NZ or FeZ was mixed with 100 mL of the 4.006 mmol Hg/L solution.

The effect of the solid/liquid ratio, S/L, was performed at pH=1.98. Different mass of the NZ in the range of 0.2–3.6 g (S/L=2, 6, 10, 14, 18, 26, 30, 36 g/L) and FeZ in the range of 0.2–1.8 g (S/L=2, 6, 10, 14, 18 g/L) was mixed with 100 mL of the 4.056 mmol Hg/L solution.

The effect of the initial concentration, 0.461–12.258 mmol Hg/L and initial pHs $1.99 < \text{pH} < 2.01$, was examined by mixing 1.0000 g of NZ or FeZ with 100 mL of Hg(II). The effect of the contact time was performed by mixing 20.0000 g of NZ with 2 L of 7.917 mmol Hg/L with $\text{pH}_0 = 1.98$ i.e. 20.000 g of FeZ with 2 L of 9.933 mmol Hg/L with $\text{pH}_0 = 1.99$. In desired time intervals, samples were collected, and the total sampling volume was less than 5–6 % of the total solution volume.

The amount of Hg(II) sorbed onto zeolite in time t , q_t (mmol/g) as well as removal efficiency in time t expressed in percentage, α_t (%), were calculated by Eqs. (1) and (2):

$$q_t = (c_o - c_t) \cdot \frac{V}{m} \quad (1)$$

$$\alpha_t = \frac{(c_o - c_t)}{c_o} \cdot 100 \quad (2)$$

where c_o and c_t are the concentrations of Hg(II) at $t=0$ and time t (mmol/L), V is the volume of the solution (L) and m is the mass of zeolite (g).

Leaching experiments

The saturated samples (marked as NZHg and FeZHg) were collected, washed in ultrapure water and dried in order to examine their leaching properties and. The leaching of Hg(II) from saturated samples was examined according to the standard leaching method (DIN 38414 S4, 1984) in ultrapure water in the wide pH range 2.00–12.05. The mass of 1.0000 g of NZHg or FeZHg was mixed with 10 mL of ultrapure water with different initial pHs for 24 h at 25 rpm and 25 °C. After 24 hours suspensions were filtered and the concentration of leached Hg(II) was determined in filtrates by using AAS.

The amount of Hg(II) leached from saturated zeolite, q_{leach} (mmol/g) and the percentage of Hg(II) leached from saturated zeolite, α_{leach} (%) were calculated by Eqs. (3) and (4):

$$q_{\text{leach}} = c_{\text{leach}} \cdot \frac{V}{m} \quad (3)$$

$$\alpha_{\text{leach}} = \frac{q_{\text{leach}}}{q_e} \cdot 100 \quad (4)$$

where c_{leach} is the concentration of the Hg(II) leached from zeolite (mmol/L).

Results and Discussion

Sorption properties of the natural and iron-modified zeolite

Fig. 1 shows the distribution of mercury species in relation with pH based on the hydrolysis constants represented by Eqs. (5)–(7) (Nazarenko et al., 1979).



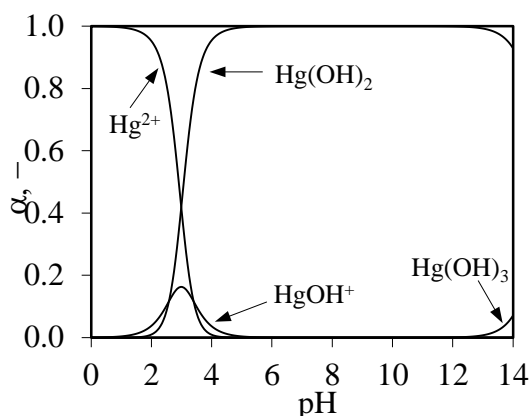


Figure 1. Distribution of Hg(II) species as a function of pH

From Fig. 1 it is clear that mercury precipitation occurs at $\text{pH} \approx 2.4$, therefore sorption experiments were performed in a very narrow pH range, at $\text{pH} = 2.09$ and at $\text{pH} = 2.30$ in order to avoid precipitation effect. For this reason, pH value at which precipitation starts to occur (pH_{ppt}) is calculated according to the Eq. (8) (Nazarenko et al., 1979; Minceva et al., 2008):

$$\text{pH}_{\text{ppt}} = 14 - \log \sqrt{\frac{c_o(\text{Hg}^{2+})}{K_{\text{sp}}[\text{Hg}(\text{OH})_2]}} \quad (8)$$

The measured pH_e and calculated pH_{ppt} values for given initial Hg(II) concentration as well as removal efficiency, α as a function of pH_o are shown in Fig. 2 a and b.

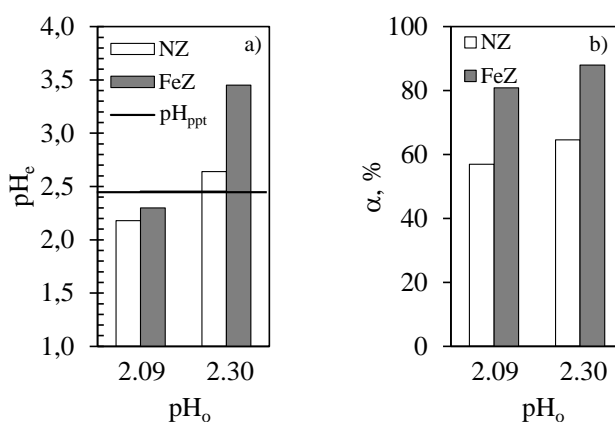


Figure 2. a) pH_e vs. pH_o after sorption of Hg(II) onto NZ and FeZ; b) The effect of pH_o on removal efficiency, α of Hg(II) onto NZ and FeZ

At $pH_0=2.30$ in Fig. 2 a, the pH_e values for both NZ and FeZ are above the calculated pH_{ppt} which confirms that the precipitation of mercury in the form of hydroxide occurs in solution, while at $pH_0=2.09$ precipitation is excluded. Therefore, $pH_0=2.09$ is selected as the optimal pH for Hg(II) sorption onto NZ and FeZ, at which the obtained removal efficiency was 57 % for NZ and 81 % for FeZ (Fig. 2 b).

Dependence of the removal efficiency of Hg(II) onto NZ and FeZ for different S/L ratios is shown in Fig. 3.

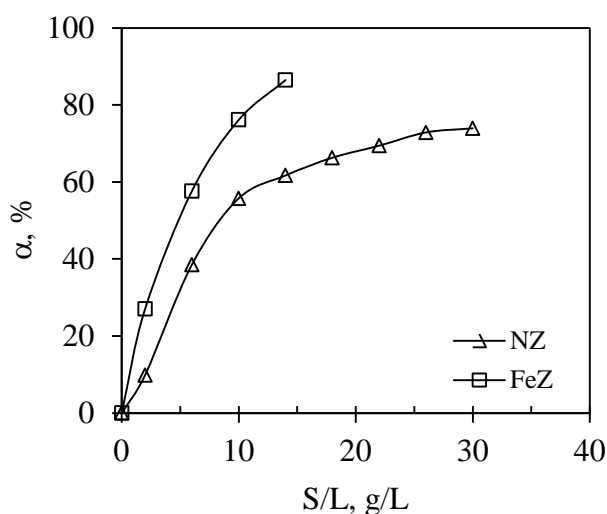


Figure 3. Effect of S/L ratio on the removal efficiency, α of Hg(II) onto NZ and FeZ

A rapid and then gradual increase in the α value for NZ was observed, and at $S/L > 26$ g/L plateau is reached, while the increase in α for FeZ was rapid and plateau was not achieved. At $S/L=18$ g/L for FeZ and $S/L=36$ g/L for NZ, mercury precipitation was observed since the measured equilibrium pH_e of the suspensions was higher than calculated pH_{ppt} (results are not shown here). This indicates that determining the optimal S/L ratio is one of the key parameters in order to avoid precipitation with achieving maximum efficiency by using a minimum dose of zeolite. Maximum removal efficiency of 74 % for NZ is achieved at $S/L=30$ g/L while for FeZ this value was 87 % at $S/L=14$ g/L. This indicates that with a double S/L ratio using NZ the lower efficiency is achieved, which justifies the modification of the natural zeolite. The effect of the contact time on the amount of Hg(II) sorbed onto NZ and FeZ as well as removal efficiency is presented in Fig. 4. The results show that sorption of Hg(II) onto both NZ and FeZ takes place in two stages, the initial stage within 240 minutes accompanied by rapid increases in q_t and α_t , followed by a second stage with a gradual increase in q_t and α_t until equilibrium is reached. The observed two sorption stages suggest that initially sorption is rapid due to the readily available active sorption sites, and becomes slower as a consequence of sorption of Hg(II) at less available sites. A minimum contact time of 600 minutes is required to achieve a maximum removal efficiency of 35 % or 0.28 mmol Hg/g for NZ and 54 % or 0.53 mmol Hg/g for FeZ for the given experimental conditions. Under the used experimental conditions, precipitation of Hg(II) was not possible since the measured pH_e was lower than the calculated pH_{ppt} (results are not shown here).

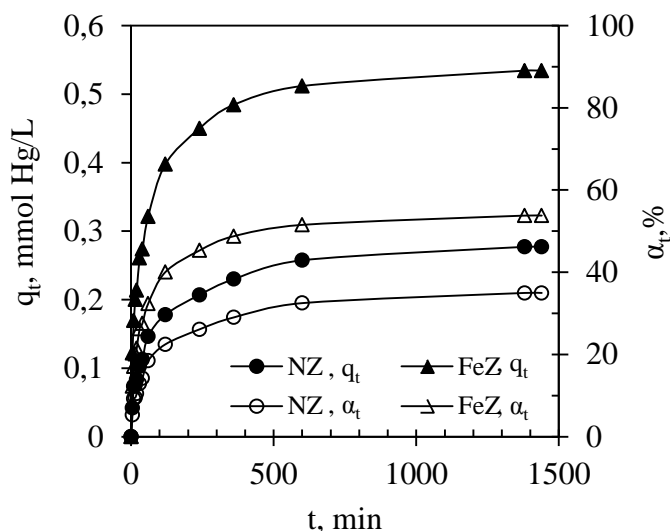


Figure 4. The amount of Hg(II) sorbed onto NZ and FeZ as well as removal efficiency in relation to contact time

The influence of initial Hg(II) concentration on the amount of Hg(II) sorbed per gram of NZ and FeZ, as well as on removal efficiency is presented in Fig. 5a and 5b.

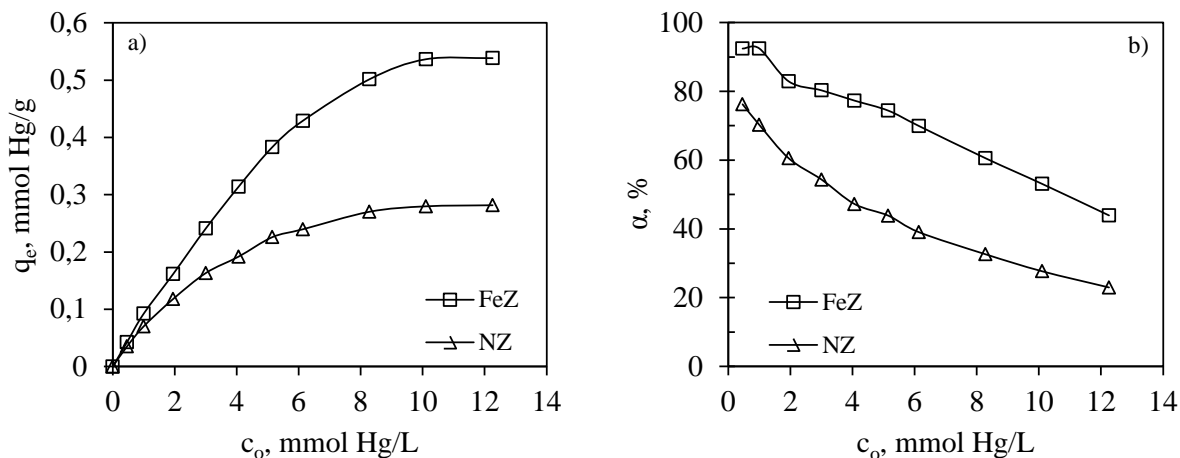


Figure 5. a) The amount of Hg(II) sorbed per gram of NZ and FeZ vs. c_0 ; b) Removal efficiency of Hg(II) vs. c_0

An almost linear increase in q_e was observed with an increase in initial concentration up to 6 mmol/L for FeZ, while an increase in q_e was gradual for NZ. It was also noted that initial concentration of Hg(II) >8 mmol Hg/L for NZ and >10 mmol Hg/L for FeZ do not increase q_e since all available sorption sites are saturated. This indicates that NZ is effective for Hg(II) concentrations up to 8 mmol/L and FeZ for concentrations up to 10 mmol/L. The maximum amount of sorbed Hg(II) was reached at the specified concentration conditions, when the plateau was reached and equals to 0.28 mmol Hg/g for NZ and 0.54 mmol Hg/g for FeZ. From Fig. 5b, the decreasing trend in removal efficiency can be noticed with increasing in

initial Hg(II) concentration, i.e. the highest removal efficiencies of 76 % for NZ and 92 % for FeZ where obtained for the lowest initial concentration of 0.47 mmol Hg/L. Significant efficacy observed for FeZ, especially for lower Hg(II) concentrations, makes it a very promising sorbent for remediation of the mercury contaminated environment.

Leaching properties of the mercury saturated zeolites

Leaching properties of saturated NZHg and FeZHg were investigated in order to determine possible application of NZ and FeZ to *in situ* remediation of mercury contaminated sites. The leaching test is performed in ultrapure water in the pH range of 2.00–12.05 according to the standard leaching method (DIN 38414 S4, 1984). The results of the amount of leached Hg(II) from saturated zeolites are shown in Fig. 6.

Results presented in Fig. 6 show that in a wide pH range, $4.01 \leq \text{pH} \leq 11.08$, the amounts of leached mercury were small, only 0.28–0.78 % from NZHg and 0.07–0.51 % from FeZHg. This indicates that mercury is firmly bound to both zeolites. At extreme pH conditions, $\text{pH} \leq 3.02$ and $\text{pH} \geq 12.05$, leaching of mercury in an amount of 4–7 % occurred from both zeolites. At $\text{pH} \leq 3.02$, leaching occurs due to high quantity of hydrogen ions which displace the mercury from the zeolite structure. The reason for leaching at extremely high $\text{pH} \geq 12.05$ is due to the rupture of Si-O bonds (desilication) and degradation of the zeolite structure resulting in an increase in leached mercury.

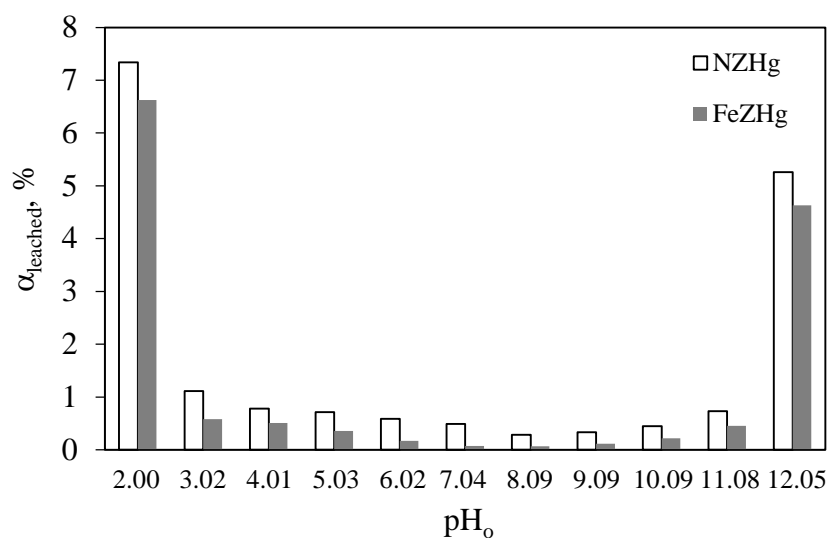


Figure 6. Amount of leached Hg(II) from saturated NZHg and FeZHg as a function of pH_0 .

Comparing the percentage of leached mercury at all observed pH values, it can be noticed that the percentage of leached mercury is higher from NZHg than from FeZHg, which suggests a higher affinity of Hg(II) towards FeZ. Furthermore, the amount of leached mercury in relation to the amount of mercury bound to NZ and FeZ is not significant at $4.01 \leq \text{pH} \leq 11.08$ which suggests that NZ and especially FeZ have the ability to bind and retain mercury in its structure in a wide pH range. This indicates that both NZ and FeZ could be applied to *in situ* remediation of mercury contaminated environment.

Conclusions

This study has provided valuable information of Hg(II) sorption onto NZ and FeZ. It has been noted that the sorption of Hg(II) is highly sensitive to the effect of pH and S/L ratio, especially onto FeZ, where $\text{pH} \approx 2$ and $\text{S/L} = 10$ are found to be optimal for both zeolites. The quantity of Hg(II) removed onto FeZ was found to be two times higher than onto NZ (0.28 mmol Hg/g compared to 0.54 mmol Hg/g, respectively). The leaching test confirmed that the Hg(II) was leached under extreme pH conditions, $\text{pH} \leq 3.02$ and $\text{pH} \geq 12.05$, while in wide pH range, $4.01 \leq \text{pH} \leq 11.08$, the amount of leached Hg(II) is not significant indicating that both zeolites are effective materials for binding and retaining Hg(II) in their structure. In conclusion, both zeolites could be used in remediation purposes while the results suggest that modification significantly improves the sorption properties of zeolite.

Acknowledgment

This work has been financially supported by the bilateral Croatian-Slovenian project “*Natural modified sorbents as materials for remediation of mercury contaminated environment*” (2020-2023) and the research programmes “*Groundwater and Geochemistry (P1-0020)*” and “*Mineral Resources (P1-0025)*” carried out by the Geological Survey of Slovenia.

References

- Davis, A., Bloom, N.S., Quee He, S. S. (1997): The environmental geochemistry and bioaccessibility of mercury in soils and sediments: a review, *Risk Anal.* 17, 557-569.
- Dimirkou, A. (2007): Uptake of Zn^{2+} ions by a fully iron-exchanged clinoptilolite. Case study of heavily drinking water samples, *Water Res.* 41, 2763-2773.
- DIN 38414 S4 German standard procedure for water, wastewater and sediment testing – sludge and sediment. Determination of leachability. Institute Institut für Normung, Berlin, 1984.
- Doula, M. K. (2006): Removal of Mn^{2+} ions from drinking water by using Clinoptilolite and a Clinoptilolite-Fe oxide system, *Water Res.* 40, 3167-3176.
- Doula, M. K. (2007): Synthesis of a clinoptilolite-Fe system with high Cu sorption capacity, *Chemosphere* 67, 731-740.
- Han, R., Zou, L., Zhao, X., Xu, Y., Xu, F., Li, Y. (2009): Wang, Y. Characterization and properties of iron oxide-coated zeolite as adsorbent for removal of copper (II) from solution in fixed bed column, *Chem. Eng. J.* 149, 123-131.
- Kragović, M., Daković, A., Sekulić, Ž., Trgo, M., Ugrina, M., Perić J., Gatta, G. D. (2012): Removal of lead from aqueous solutions by using the natural and Fe(III)-modified zeolite, *Appl. Surf. Sci.* 258, 3667-3673.
- Mayas, D. C.; Scheibe, T. D. (2018): Groundwater contamination, subsurface processes, and remediation methods: overview of the special issue of Water on Groundwater contamination and remediation. *Water* 10, 1708.
- Minceva, M., Fajagar, R., Markovska, L., Meshko, V. (2008): Comparative study of Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} removal from water solution using natural clinoptilolitic zeolite and commercial granulated activated carbon. Equilibrium and adsorption, *Sep. Sci. Technol.* 43, 2117-2143.

- Misealidis, P. (2011): Application of natural zeolites in environmental remediation: a short review, *Microp. Mesopor. Mater.* 144, 15-18.
- Nazarenko, Y. A., Antonovich, V. P., Neveskaja, E. E. (1979): Hydrolysis of metal ions in diluted solutions, *Atomizad*, Moscow, 1979, pp 458-503.
- Shi, W., Shao, H., Li, H., Shao, M., Du, S. (2009): Progress in the remediation of hazardous heavy metal-polluted soils by natural zeolite, *J. Hazard. Mater.* 170, 1-6.
- Thiruvengkatachari, R., Vigneswaran, S., Naidu, R. (2008): Permeable reactive barrier for groundwater remediation, *J. Ind. Eng. Chem.* 14, 145-156.
- Ugrina, M., Vukojević Medvidović, N., Daković A. (2015): Characterization and environmental application of iron-modified zeolite from the Zlatokop deposit, *Desalin. Water Treat.* 53, 3557-3569.
- Wang, L., Hou, D., Cao, Y., Sik Ok, Y., Tack, F. M. G., Rinklebe, J., O'Connor, D. (2020): Remediation of mercury contaminated soil, water, and air: A review of emerging materials and innovative technologies, *Environ. Int.* 134, 105281-105300.
- Wang, S., Peng, Y. (2010): Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment, *Chem. Eng. J.* 156, 11-24.
- Xu, J., Garcia Bravo, A., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J. (2015): Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil, review, *Environ. Int.* 74, 42-53.

7

Sekcija: 7. SUSRET MLADIH KEMIČARA

Topic: 7th MEETING OF YOUNG CHEMISTS



Utjecaj otpadne vode na onečišćenje Dunava

Andrea Bilušković, Đurđevka Pecikozić*

Tehnička škola Nikole Tesle Vukovar, Blage Zadre 4, HR - 32 010 Vukovar

**Dopisni autor: djurdjevka.pecikozic@yahoo.com*

Sažetak

Opstanak svake vrste ovisi o vodi - bez nje život u postojećem obliku ne bi bio moguć. Svi biološki procesi odvijaju se u vodenoj sredini. Može se reći da voda nije samo oko nas nego i u nama, budući da je ona sastavni dio svake žive stanice te da čini 60-70 % tjelesne mase odraslog čovjeka. Iz tog razloga onečišćenje voda predstavlja ozbiljan problem. Onečišćivači voda su: otpadne vode, industrija, promet, odlagališta otpada i kemikalije koje se koriste u poljoprivredi. Cilj ovog rada je bio pratiti i usporediti pH-vrijednost, električnu provodnost, koncentraciju otopljenoga kisika, temperaturu uzvodno i nizvodno od ispusta otpadne vode u Dunav kod Vukovara. Uočeno je da koncentracija otopljenog kisika ovisi o tlaku i temperaturi. Što je tlak veći, a temperatura manja, koncentracija otopljenog kisika je veća. Opskrbljenost Dunava kisikom je bila zadovoljavajuća. Koncentracija otopljenog kisika kretala se od 9,55 mg/L do 12,46 mg/L. Razlike u izmjerenim vrijednostima provodnosti i pH-vrijednosti uzvodno i nizvodno od ispusta su neznatne što potvrđuje da je otpadna voda bila prethodno obrađena.

Ključne riječi: koncentracija otopljenog kisika, električna provodnost, pH-vrijednost, onečišćenje, rijeka Dunav

Uvod

Voda je najvažniji kemijski spoj na Zemlji bez kojega život u postojećem obliku nije moguć. Bitan je sastojak živih organizama. Voda je medij kojim se u većine višestaničnih živih organizama odvija transport hranjivih tvari, plinova i metala. Ona je sastavni dio svake žive stanice i čini više od polovice tvari koja tvori žive organizme. Voda nije samo oko nas, nego i u nama. Stanica je ustvari vodena otopina organskih i anorganskih tvari odijeljena staničnom membranom od okoliša (Šafarek, 2020). Membrana odjeljuje i koncentrira najvažnije spojeve. U tome malenom prostoru stanice, u citoplazmi, događaju se sve najvažnije reakcije vezane za život – enzimi prerađuju tvari u sve moguće oblike koji nam trebaju. Mitochondriji proizvode energiju, ribosomi pomoću DNK i RNK stvaraju proteine, u jezgri se čuva i dijeli DNK i još mnogi procesi (Šafarek, 2020). Sve se to odvija u vodenome mediju. Također, ima i ključnu ulogu u metabolizmu. Molekula vode odvaja se od većih molekula kad nastaju proteini ili škrob za skladištenje zaliha energije. S druge strane, u katabolizmu ona se dodaje kada se oni razgrađuju. U fotosintezi biljke se koriste energijom Sunca, fotoni razdvajaju molekulu vode – vodik se koristi za nastanak glukoze dok biljke ispuštaju kisik kao „višak“ koji je životinjama (kao uostalom i samim biljkama) potreban za disanje. služi za transport, prenoseći kisik i hranjive tvari, a odnoseći štetne proizvode, bilo da je riječ o prijenosu unutar odnosno izvan stanica, kao i preko krvi i limfe na sve dijelove tijela. Njezina uloga u našem životu je mnogoznačna. Upotrebjavamo ju za kuhanje, čišćenje, tuširanje i ispiranje. Voda se

upotrebljava u proizvodnji hrane, odjeće, mobilnih telefona, automobila i knjiga. Upotrebljavamo ju za izgradnju domova, škola i cesta, te za grijanje zgrada i hlađenje elektrana. S pomoću električne energije koja nastaje njezinim kretanjem, osvjetljavamo gradove i domove. Voda je i sredstvo za povezivanje i kretanje ljudi i robe (Bryninckx, 2018). Ona služi kao prirodna prometna mreža po cijelom svijetu koja povezuje obalne gradove i gradove u unutrašnjosti duž plovidbenih rijeka te tako omogućavajući globalnu trgovinu. Drugim riječima, voda je prisutna u svakom aspektu našeg života. Voda na Zemlji neprestano prelazi iz jedne faze u drugu i kruži u prirodi. Čitav se proces naziva hidrološki ciklus ili kruženje vode u prirodi. Taj je proces vrlo spor, ali omogućava miješanje dubinske i površinske vode (Črnek, 2018). Voda prilikom kruženja u prirodi mijenja svoju kvalitetu i time dolazi do onečišćenja vode. Onečišćenje voda općenito je prilično širok pojam, a pod njime se obično podrazumijeva smanjivanje kvalitete vode zbog naknadno primljenih primjesa (Bryninckx, 2018). Promjena kakvoće vodnih ekosustava ili kopnenih ekosustava izravno ovisnih o vodnim ekosustavima, što dovodi do štete po materijalnu imovinu, remeti značajke okoliša, zaštićene prirodne vrijednosti te utječe na druge pravovaljane oblike korištenja okoliša. Onečišćenje vode je veliki problem današnjice jer zbog velikog porasta broja stanovništva i globalnog razvoja povećava se i količina onečišćene vode. Otpadne vode utječu na kvalitetu površinskih i podzemnih voda (Vojvodić, 2018). Otpadne vode su tekućine koje se sastoje od tekućeg otpada otopljenog ili emulgiranog u vodi, odnosno disperzije krutog otpada u vodi. Otpadne vode potječu iz kućanstava naselja i gradova (uključuju i organski, fekalni otpad), tvornica i industrijskih pogona ili poljoprivrednih djelatnosti. Njihovim ispuštanjem, bilo putem kanalizacije (točkasti ispusti) bilo izravnim ispiranjem tla (oborinske otpadne vode), u površinske kopnene vode (rijeke, jezera ili mora), može se onečistiti, odnosno smanjiti uporabna vrijednost vodenoga sustava u koji dospijevaju. S obzirom na mjesto nastanka komunalne otpadne vode mogu se podijeliti na: sanitarne, industrijske i oborinske (Hrvatska enciklopedija, 2020). Onečišćenje vode utječe na sve aspekte okoliša te na sva živa bića. Povećanjem koncentracije štetnih tvari u vodi ona postaje onečišćena te uzrokuje onečišćenje drugih sastavnica okoliša što dovodi do smanjenja količine ukupne pitke vode na Zemlji, mnogih bolesti i u najgorem slučaju smrti. Onečišćenje vode možemo podijeliti na fizikalno, biološko, kemijsko (organsko i anorgansko) te radiološko onečišćenje. Fizikalno onečišćenje vode je negativna promjena fizikalnih svojstava vode, manifestira se kao povećanje temperature vode, pojava mutnoće vode te pojava boje, okusa i mirisa. Povećanje temperature vode najčešće je posljedica ispuštanja rashladne vode iz industrije i energetskih postrojenja bez prethodnog hlađenja, a uzrokuje smanjenje koncentracije otopljenog kisika u vodi što uzrokuje smanjenu razgradnju organskih tvari (Havidić, 2015). Pojava mutnoće posljedica je prisutnosti suspendiranih čestica u vodi koje s vodom čine suspenzije ili koloidne otopine. Promjena boje, okusa i mirisa samo su posljedica neke druge vrste onečišćenja (Marković i sur. 2007). Biološko onečišćenje očituje se u prisutnosti patogenih bakterija i virusa te ostalih mikroorganizama koji mogu štetno utjecati na ljudsko zdravlje. Mikroorganizmi najčešće dospijevaju u površinske vode iz otpadnih voda ili protjecanja voda iz poljoprivrede, dok u podzemne vode mikroorganizmi dolaze iz propusne kanalizacije ili loše izvedenih sabirnih (septičkih) jama. Neadekvatnim postupcima obrade vode za piće mikroorganizmi mogu uzrokovati razne bolesti, pa se biološko onečišćenje smatra jednim od najopasnijih onečišćenja vode (Havidić, 2015). Kemijsko onečišćenje manifestira se kao prisutnost nekih iona, atoma ili molekula kojih u prirodnim vodama nema ili su prisutni u manjim koncentracijama, a njihovo postojanje uzrokuje

negativne posljedice na okoliš i ljude (Havidić, 2015). U vodi mogu biti prisutni brojni anorganski spojevi poput lužina, kiselina, soli, metala, pijesak. Organski spojevi prisutni u vodi najčešće su otpaci iz domaćinstva, klaonica, šećerana, tvornica papira i raznih drugih industrija. To su najčešće razni ugljikohidrati, masti, sapuni, proteini, amidi i amino kiseline (Havidić, 2015). Radiološko onečišćenje je posljedica doticaja podzemne vode s različitim prirodnim radioaktivnim elementima ili umjetnim radio-izotopima. Izvori takvog onečišćenja mogu biti ležišta uranskih ruda, nuklearne elektrane ili odlagališta nuklearnog otpada (Havidić, 2015)

Materijali i metode

U ovom radu mjerena je temperatura, električna provodnost, otopljeni kisik i pH - vrijednost vode iz rijeke Dunav kod Vukovara. Mjerenja su rađena na terenu. Odabrane su dvije lokacije. Prva lokacija je uzvodno od ispusta otpadne vode, a druga lokacija je nizvodno od ispusta. Mjerenja su rađena jednom tjedno od 19. 11. 2019. do 3. 03. 2020. pomoću multimetra HQ40d, Hach i pripadajućim sondama za mjerenje pH- vrijednosti, električne provodnosti i koncentracije otopljenog kisika.

Potenciometrija

Potenciometrijska metoda korištena je za određivanje pH-vrijednosti. Potenciometrijska metoda temelji se na ovisnosti potencijala indikatorske elektrode o koncentraciji određene ionske vrste s kojom je ona u aktivnom, reverzibilnom kontaktu u ispitivanoj otopini. Osim indikatorske, u otopinu je uronjena i usporedbena, referentna elektroda, čiji potencijal ne ovisi o koncentraciji iona u ispitivanoj otopini. Razlika potencijala u ispitivanoj otopini posljedica je spontane kemijske reakcije tzv. redoks reakcije tj. reakcija oksidacije i redukcije. Kod reakcije oksidacije dolazi do otpuštanja elektrona, a kod reakcije redukcije do primanja elektrona. Tvar koja gubi elektron zovemo oksidans, a tvar koja prima elektron reducens. Oksidans i reducens zajedno čine redoks par. Veza između oksidansa (O_x) i reducensa (R_e) tijekom kemijske reakcije može se opisati jednadžbom (1) (Pitinac i sur., 2016):



ne^- , ukupno otpušten/ primljen naboj.

Elektrodni potencijal na granici faza elektroda – otopina kvantitativno se izražava Nernstovom jednadžbom, jednadžba (2):

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{a_0}{a_R} \quad (2)$$

E , standardni elektrodni potencijal (potencijal za koncentraciju iona 1 mol/L i temperaturu 25 °C), R , opća plinska konstanta, 8,134 J/K mol, T , termodinamička temperatura, n , valencija otpuštenih iona, F , Faradijeva konstanta, 96.500 C/mol, a_0 i a_R , aktiviteti oksidiranog i reduciranog oblika tvari koja sudjeluje u elektrodnoj reakciji (Pitinac i sur., 2016).

Konduktometrija

Električna provodnost uzoraka dunavske vode određivana je konduktometrijskom metodom. Električna vodljivost, G/S, je električno svojstvo vodenih otopina. Električna vodljivost se definira kao mogućnost otopine elektrolita da u električnom polju, između dvije elektrode migracijom iona provodi struju. Vodene otopine, ovisno o koncentraciji iona koji su u njima prisutni, mogu provoditi struju. Vodljivost ovisi o ionima elektrolita prisutnim u vodi (primjerice ioni Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} i drugi), njihovoj koncentraciji, pokretljivosti, kao i o temperaturi na kojoj se određuje vodljivost. Električna vodljivost se može povezati sa stupnjem onečišćenja vode anorganskim solima. Konduktometrom mjerimo otpor, R , koji elektrolit između dvije elektrode pruža prolasku struje. Suvremeni uređaji za mjerenje vodljivosti su opremljeni setom odgovarajućih konduktometrijskih ćelija definirane konstante. Unošenjem vrijednosti konstante ćelije na instrumentu se izravno očitava vrijednost električne provodnosti (Pitinac i sur., 2016).

Optička metoda za mjerenje koncentracije otopljenog kisika

Mjerenje koncentracije otopljenoga kisika u uzorku vode provedeno je pomoću digitalne sonde LDO101. Sonda LDO101 pripada skupini optičkih sonda i sastoji se od dvije led diode koje bacaju crveno i plavo svjetlo. Unutrašnjost mjerne kapice presvučena je reagensom koji ima luminiscentna svojstva. Plava svjetlost led diode obasjava luminiscirajuću tvar na kapici, pobuđuje ju i pri povratku u osnovno stanje oslobađa se crvena svjetlost. Zatim fotodioda detektira crvenu svjetlost i mjeri vrijeme potrebno da se luminiscentni materijal vrati u početno stanje. Što je koncentracija kisika u uzorku veća na senzor dolazi manje svjetla, a time je kraće i vrijeme povratka luminiscirajućeg materijala u osnovno stanje. Koncentracija kisika je obrnuto proporcionalna vremenu potrebnom za povratak luminiscentnog materijala u početno stanje. U senzoru se nalazi i led dioda koja zrači svjetlost crvene valne duljine i čija je svrha usporedba s crvenom svjetlosti dobivenom luminiscencijom reagensa na kapici (Pitinac i sur., 2016).

Rezultati i rasprava

Rezultati fizikalne analize vode, koncentracije kisika, tlaka, temperature, pH-vrijednosti i električne provodnosti, uzvodno i nizvodno od ispusta otpadnih voda u rijeku Dunav kod Vukovara u periodu od 19.11.2019 do 3.03. 2020. prikazani su tablično (Tablice 1 i 2) i grafički (slike 1-5). Temperatura je jedan od fizikalnih pokazatelja kakvoće vode. Promjena temperature utječe na fizikalno- kemijska svojstva vode kao i na ekološke uvjete u vodnom sustavu. Temperatura vode ovisi o klimatskim prilikama, geološkoj građi terena, vezi podzemnih voda s površinskim vodama i dinamici vode (Vugrin, 2019). Povezana je sa temperaturom atmosfere stoga je sklona promjenama tijekom godine. Dnevne promjene temperature utječu na površinske i podzemne vode s razinom vode od 1 do 2 metra ispod površine terena dok sezonske promjene u umjerenom klimatskom pojasu utječu na površinske i podzemne vode s razinom podzemne vode do 20 metara ispod površine (Vugrin, 2019). Ispod te dubine nalazi se neutralni temperaturni sloj i na toj je dubini temperatura podzemne vode konstantna i jednaka prosječnoj godišnjoj temperaturi zraka na površini terena.

Rast temperature ovisi o dubini, litološkoj građi stijena, toplinskoj vodljivosti stijena i blizini magmatskih tijela. Na promjenu temperature površinske vode najčešće utječe ispuštanje otpadne vode iz industrijskih energetskih objekata (željezare, rafinerije nafte, tvornice celuloze i papira i dr.). Iz slike 1. i tablica 1 i 2 vidimo da su temperature uzvodno i nizvodno od ispusta otpadne vode gotovo podjednake i kreću se od 2,5 °C do 10,5 °C.

Tablica 1. Fizikalna analiza vode nizvodno od ispusta rijeke Dunav

Table 1. Physical analysis of water downstream of the Danube river outflow

Datum	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	p / hPa	$T(\text{H}_2\text{O})$ / °C	pH / -	χ / $\mu\text{S/cm}$
19.11.2019.	9,55	1011	10,4	10,03	273
27.11.2019.	10,25	1003	9,7	10,25	254
4.12.2019.	10,06	1024	6,5	10,06	265
20.12.2019	11,14	1002	7,0	9,30	310
10.01.2019.	11,76	1015	4,0	9,92	299
18.01.2019.	11,83	1020	3,8	9,52	336
27.01.2019.	11,92	1012	3,8	10,44	328
14.02.2020.	11,14	1011	7,9	10,49	258
25.02.2020.	11,13	1000	7,2	9,68	305
3.03.2020.	10,65	1007	7,7	9,80	279

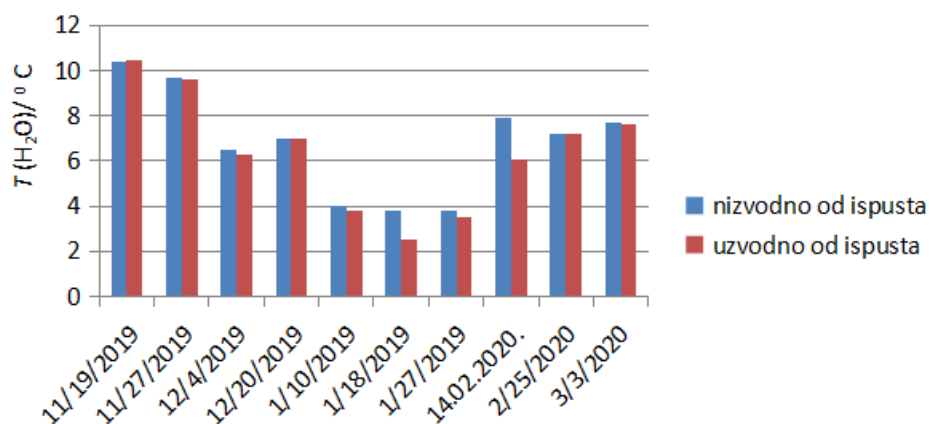
Odstupanje je vidljivo dana 14.02. kada je temperatura nizvodno od ispusta iznosila 7.9 °C i za 1,8 °C je bila viša od temperature uzvodno od ispusta. Najniža zabilježena temperatura je bila dana 18.01.2020. Uzvodno od ispusta iznosila je 2,5 °C, a nizvodno od ispusta 3,8 °C. Razlika izmjerenih temperatura na dvije promatrane lokacije na dan 18.01.2020. iznosila je 1,3 °C. Povećanje temperature vode nizvodno od ispusta ukazuje na ispuštanjem ne rashlađene otpadne vode u rijeku Dunav.

Tablica 2. Fizikalna analiza vode uzvodno od ispusta rijeke Dunav

Table 2. Physical analysis of water upstream of the Danube river outflow

Datum	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	p / hPa	$T(\text{H}_2\text{O})$ / °C	pH / -	χ / $\mu\text{S/cm}$
19.11.2019.	9,89	1012	10,5	9,54	280
27.11.2019.	10,85	1012	9,6	9,20	255
4.12.2019.	11,35	1026	6,0	9,85	269
20.12.2019.	11,21	1004	7,0	9,50	312
10.01.2019.	11,80	1017	3,8	9,69	308
18.01.2019.	12,26	1022	2,5	9,44	332
27.01.2019.	12,46	1015	3,5	10,44	324
14.02.2020.	11,10	1012	6,1	10,51	263
25.02.2020.	11,06	1001	7,2	9,83	305
3.03.2020.	10,86	1009	7,6	9,87	286

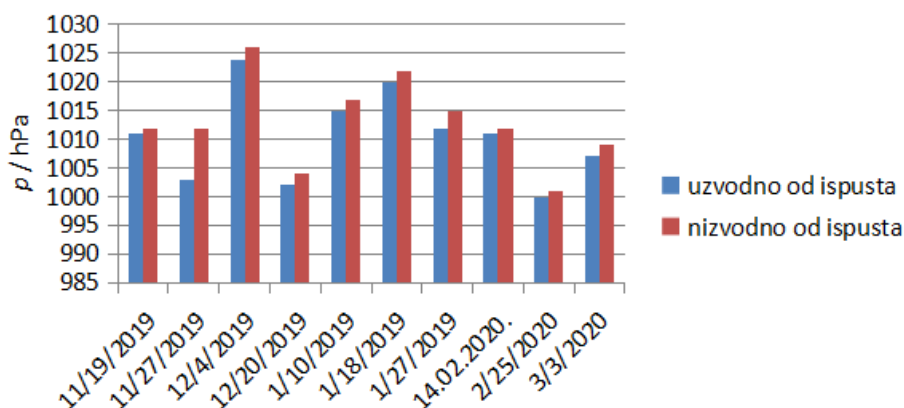
7. SUSRET MLADIH KEMIČARA | 7th MEETING OF YOUNG CHEMISTS



Slika 1. Promjena temperature vode u rijeci Dunav kod Vukovara u periodu od 19.11.2019. do 3.3.2020.

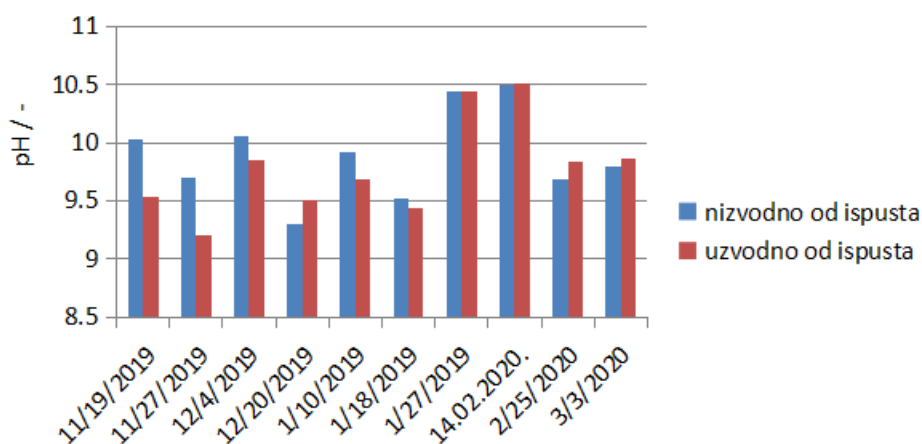
Figure 1. Change in water temperature in the Danube River near Vukovar in the period from 19.11.2019 to 03.03.2020.

pH-vrijednost je mjera kiselosti neke otopine. Određuje se prema koncentraciji oksonijevih H_3O^+ iona. Ako u vodi prevladavaju oksonijevi ioni, voda ima kiselu reakciju, ako prevladavaju hidroksilni ioni, ima lužnatu reakciju. Ako je odnos aniona i kationa u vodi jednak voda je neutralna (Nöthing Hus, 2006). pH-vrijednost je važna za određivanje kvalitete vode. Iz slike 3 i tablica 1 i 2 vidljivo je da se pH- vrijednost neravnomjerno mijenja u rasponu od 9,2 do 10,1. Kako većina prirodnih voda ima pH od 4,5 do 8,3 (Marković i sur., 2007) može se primijeniti povećanje pH- vrijednosti rijeke Dunav kod Vukovara u periodu od 19.11.2019 do 03.03.2020. pH – vrijednosti uzvodno od ispusta nešto su niže od 18.01.2020. sve do 27.01.2020. 27.01.2020. i 14.02.2020. na obje lokacije izmjerene su približno iste i nešto veće pH- vrijednosti. Kako su pH- vrijednosti približne na obje lokacije uzrok povećanja pH- vrijednosti nije otpadna voda iz ispusta nego nekontrolirani izvor koji se nalazi uzvodno od Vukovara.



Slika 2. Promjena vrijednosti tlaka zraka u Vukovaru u periodu od 19.11.2019. do 03.03.2020.

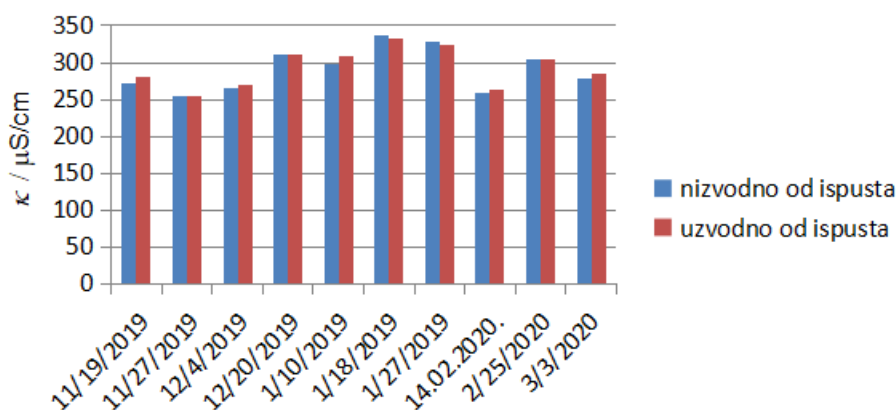
Figure 2. Change in air pressure in Vukovar for the period from 19.11.2019. to 03.03.2020.



Slika 3. Promjena pH - vrijednosti rijeke Dunav kod Vukovara za period od 19.11.2019. do 03.03.2020.

Figure 3. Changing the pH value of the Danube River near Vukovar in the period from 11.19.2019. to 03.03.2020.

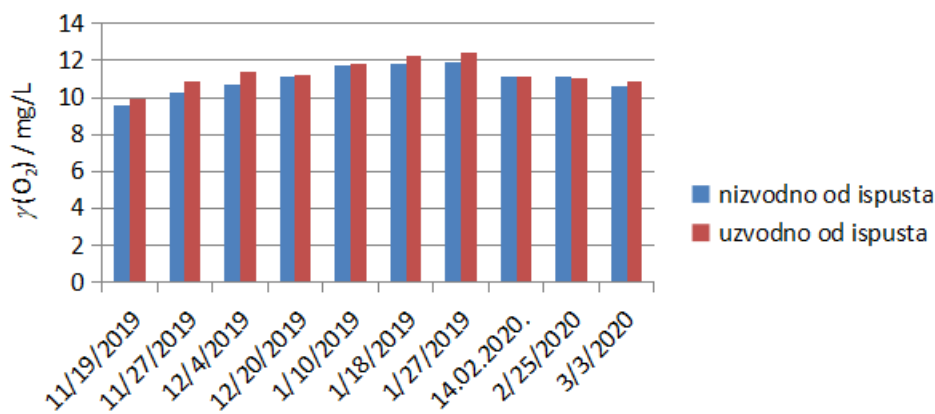
Električne provodnost je sposobnost neke tvari da provodi električnu struju. Struja prolazi kroz ioniziranu vodu ili vodu koja sadrži otopljene minerale. Destilirana voda je slab vodič električne energije. Povećanjem primjesa u vodi povećava se električna vodljivost (Metonićkin Kebdžija, 2020). Provodljivost ovisi o ionima prisutnim u vodi, o koncentraciji iona, pokretljivosti iona i o temperaturi na kojoj se određuje provodljivost (Vugrin, 2019). Električna provodnost se izražava u $\mu\text{S}/\text{cm}$. Mjerenjem električne provodnosti uzorka vode, možemo procijeniti količinu otopljenih tvari u vodi (Mihanović, 1982). Zakonski maksimalna dopuštena vrijednost za provodljivosti je $2500 \mu\text{S}/\text{cm} / 20^\circ\text{C}$ (NN 125/17). Iz slike 4 i tablica 1 i 2 vidljivo je da u periodu od 19.11.2019. do 3.03.2020. izmjerene vrijednosti električne provodnosti jednake su na obje lokacije i kreću se od $273 \mu\text{S}/\text{cm}$ do $336 \mu\text{S}/\text{cm}$.



Slika 4. Promjena provodnosti vode rijeke Dunav kod Vukovara u periodu od 19.11.2019. do 03.03.2020.

Figure 4. Change in water conductivity of the Danube River near Vukovar in the period from 19.11.2019. to 03.03.2020.

Na koncentraciju otopljenoga kisika utječu čimbenici kao što su onečišćenost vode, manjak ili višak svjetla, proces fotosinteze u vodi, temperatura vode i protok vode. Godišnje i dnevne varijacije koncentracije otopljenoga kisika najviše ovise o tlaku zraka i temperaturi vode (Habuš, 2020). Kisik u vodi dolazi iz atmosfere - difuzijom, mehaničkim putem – aeracijom, te fotosintezom autotrofnih biljaka. Na dinamičku ravnotežu kisika utječe i potrošnja kisika u vodi. Kisik se troši disanjem biljnih i životinjskih organizama i drugim oksidacijskim procesima u vodi, koji su posljedica ispuštanja komunalnih otpadnih voda i voda iz tehnoloških procesa, u prijemnike. Koncentracija otopljenog kisika jedan je od najvažnijih pokazatelja ekoloških uvjeta vode, odnosno općenito kvalitete površinskih voda. Definiira se količinom otopljenoga kisika u mg O₂/L vode i zasićenošću vode kisikom koja se dobije računski iz omjera izmjerene vrijednosti i teoretske vrijednosti otopljenoga kisika pri istim uvjetima tlaka i temperature (Metoničkin Kebdžija, 2020.) Bez kisika ili u uvjetima nedovoljne količine kisika, uvjeti za život u vodi su ograničeni ili ih uopće nema. Topljivost kisika u vodi ovisi o parcijalnom tlaku kisika u zraku, temperaturi vode i salinitetu (Mihanović, 1982). Pri tlaku zraka 1 bar i temperaturi vode 0 °C uz 100 %-tno zasićenje kisikom topljivost kisika je 14,57 mg/L. Iz slike 5 i tablica 1 i 2 vidimo da je koncentracije otopljenog kisika podjednaka na obje lokacije i kreće se od 9,55 mg/L do 12,46 mg/L. Uspoređivanjem vrijednosti iz slika 1, 2 i 5 možemo primijetiti da se koncentracija otopljenog kisika mijenja ovisno o temperaturi i tlaku zraka, odnosno porastom temperature se koncentracija kisika smanjivala, a porastom tlaka povećavala. Malo odstupanje vidi se 12.02.2020. kada koncentracija otopljenog kisika nije usklađena s naglim porastom tlaka zraka.



Slika 5. Promjena koncentracije O₂ u rijeci Dunav kod Vukovara u periodu od 19.11.2019. do 03.03.2020.

Figure 5. Change in O₂ concentration in the Danube River near Vukovar in the period from 19.11.2019. to 03.03.2020.

Zaključci

Topljivost kisika ovisi o tlaku i temperaturi što je tlak veći, a temperatura niže topljivost kisika je bolja što je u skladu s Henry-evim zakonom o topljivosti plinova. Kakvoća vode vrlo je bitan faktor kvalitetnog i zdravog života svih živih organizama, pogotovo danas, kada je onečišćenje vode uslijed urbanizacije, industrijalizacije i porasta životnog standarda ljudi na

vrhuncu. Antropogeno onečišćenje znatno nadmašuje onečišćenje uzrokovano prirodnim putem čime se zalihe pitke i čiste vode smanjuju. Voda se koristi u raznim industrijskim procesima, poljoprivredi, proizvodnji energije, građevinarstvu i rudarstvu uslijed čega dolazi do velikih količina otpadne vode koja ne nestaje nego se vraća u vodeni sustav čime se narušava kakvoća vode. Zbog porasta populacije na Zemlji raste i potreba za vodom, koja nije obnovljivi resurs, stoga je od značajne važnosti ekološki osvijestiti pojedince o kontroliranom odlaganju otpada, korištenju agrotehničkih sredstava poput pesticida, obradi otpadnih voda i očuvanju voda i okoliša. Možda još uvijek nije prekasno poduzeti određene mjere kako bismo sačuvali svjetske vodne zalihe od onečišćenja i osigurali opstanak života na našem planetu. Velike odluke, nažalost, ne donosimo sami. Onečišćena mora, rijeke, jezera, podzemne vode, pojava kiselih kiša, efekt staklenika, samo su neke od posljedica loših odluka s kojima se moramo nositi.

Literatura

- Bruyninckx, H. (2018): Voda je život, Europska agencija za okoliš, str. 4-11.
- Črnek, N. (2018): Onečišćenje i zaštita voda, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac;
URL: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/vuka%3A1024/datastream/PDF/view> (Pristupljeno 20.08.2020).
- Habuš, A., Barić T., M., Liber, S., Bajić, D. (2020): Kemija 2, Profil kleti, Zagreb, str.55.
- Havidić, K. (2015): Utjecaj kemijske regeneracije fotokatalizatora na učinkovitost razgradnje diklofenaka u vodi UV-A/TiO₂ procesom, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 2-4.
- Hrvatska enciklopedija, Otpadne vode, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslava Krlež 2020 (Pristupljeno 5. 6. 2020.).
- Marković, D., Veselinović, D., Tomić, V., Agatonović-Malinović, V. (2007): Praktikum za vežbe iz ispitivanja tla, vode i vazduha, Zavod za udžbenike, Beograd, str.97-98.
- Metoničkin Kebdžija, R. Istraživanje voda, URL: <https://globe.pomsk.hr/prirucnik/voda> (Pristupljeno 20.08.2020.).
- Mihanović, B., Perina, I. (1982): Fizikalno i kemijsko ispitivanje zagađenosti vode, Školska knjiga, Zagreb, str. 77.
- Nöthing Hus, D., Herak, M., Novosel, F. (2006): Opća kemija 2, Školska knjiga, Zagreb, str. 113-121.
- Pitinica, N., Pecikozić, Đ. (2016): Praktikum za instrumentalne metode ispitivanja sastavnica okoliša u strukovnim školama, Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek, str. 35-39, 47, 51-52.
- Rupčić-Petelinc, S., Weihnacht, Z. (2005): Praktikum iz fizikalne kemije za strukovne škole, Školska knjiga, Zagreb, str.102-105.
- Šafarek, G., Voda- Priroda Hrvatske, URL: <http://priodahrhatske.com/voda/> (Pristupljeno 08.09. 2020.).
- Vojvodić, V. (2019): Uporaba vode u Europi – količina i kvaliteta suočavaju se s velikim izazovima, *Kem. Ind.* 68 (8), str. 332–334.
- Vugrin, K. (2019): Pokazatelji kakvoće vode i metode određivanja, Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet, Varaždin, str. 5-13.

Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe NN 125/2017. (pristupljeno 15.12.2017.).

The impact of wastewater on Danube pollution

Andrea Bilušković, Đurđevka Pecikozić*

Technical School Nikola Tesla Vukovar, Blage Zadre 4, 32 010 Vukovar

**Corresponding author: djurdjevka.pecikozic@yahoo.com*

Summary

The survival of each species depends on water - without it life in its existing form would not be possible. All biological processes take place in the aquatic environment. It can be said that water is not only around us but also in us, since it is an integral part of every living cell and makes up 60-70 % of the body weight of an adult. For this reason, water pollution is a serious problem. Water pollutants are: wastewater, industry, transport, landfills and chemicals used in agriculture.

The aim of this study was to monitor and compare pH-value, electrical conductivity, concentration of dissolved oxygen and temperature upstream and downstream of wastewater discharge into the Danube near Vukovar. It has been observed that the concentration of dissolved oxygen depends on pressure and temperature. The concentration of dissolved oxygen is higher with higher pressure and lower temperature. The supply of oxygen to the Danube was satisfactory. The concentration of dissolved oxygen ranged from 9.55 mg/L to 12.46 mg/L. The differences in the measured values of conductivity and pH-values upstream and downstream of the discharge are insignificant, which confirms that the wastewater has been pre-treated.

Keywords: concentration of dissolved oxygen, electrical conductivity, pH-value, pollution, Danube river

Kemijska analiza tala na području općine Žepče (Bosna i Hercegovina)

Nikolina Grlić, Nikolina Pravdić, Matea Jukić, Marko Tomas*

*Katolički školski centar „Don Bosco” Tehničko-obrtnička škola,
Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, Bosna i Hercegovina*

**Dopisni autor: marko.tomas2020@gmail.com*

Sažetak

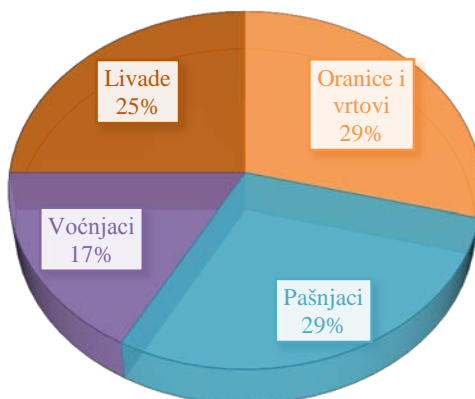
Kemijska analiza tla ključna je za dobivanje visokih prihoda, odnosno racionalnu, profitabilnu i učinkovitu primjenu agrotehnike, posebice gnojidbe, obrade, sjetve pa sve do žetve. U tom smislu treba shvatiti da cjelovit i učinkovit sustav kontrole plodnosti tla koji sustavno prikuplja sve relevantne fizikalno-kemijske podatke o tlu, njegovoj plodnosti i korištenju, doprinosi boljoj raspodjeli mineralnih i organskih gnojiva, uklanjanju akutnih deficita hranjiva, kemijskoj i fizikalnoj popravci tla, profitabilnijoj proizvodnji, odnosno očuvanju i podizanju efektivne plodnosti tla. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi pogodnost tala za ratarsku proizvodnju na području općine Žepče. Na uzorcima tala uzetih s poljoprivrednih površina na dubini do 30 cm provedene su laboratorijske analize osnovnih kemijskih svojstava tla: pH tla, određivanje zamjenjivog aluminijskog metodom po Sokolovu, supstitucijska kiselost, kvalitativno određivanje karbonata u tlu te hidrolitička kiselost. Osim osnovnih agrokemijskih analiza, provedene su dodatne analize kojima je utvrđena koncentracija nitrita (NO_2^-), nitrata (NO_3^-), fosfata (PO_4^{3-}) i koncentracija amonijevih iona (NH_4^+) u vodenim filtratima tala. Utvrđeno je da je u istraživanim uzorcima na području općine Žepče prosječna pH reakcija tla neutralna. Također je utvrđeno da su skoro sva tla bezkarbonatna ili imaju slab udio karbonata, dok je zasićenost ionima najveća na tlima uz rijeku Bosnu.

Ključne riječi: Žepče, tlo, pH reakcija tla, metoda po Sokolovu

Uvod

Općina Žepče smještena je u središnjem dijelu Bosne i Hercegovine. Graniči s općinama Zenica, Maglaj i Zavidovići. Šesta je po veličini općina u Zeničko-Dobojskoj županiji i zauzima površinu od 282 km². Klima je umjereno kontinentalna s umjereno oštrim zimama i toplim ljetima. Od ukupne površine općine, na poljoprivredno zemljište otpada 4.489 ha (slika 1). Ratarska zona se nalazi uz dolinu rijeke Bosne na 219 metara nadmorske visine. Čine je plodna aluvijalno deluvijalna tla koja su izuzetno pogodna za razvoj poljoprivrede, a obuhvaćaju Žepačko polje, Orahovičko polje, Bistričko polje, Lupoglavsko polje i Radovlje. Od ukupnog broja stanovništva i raspoloživog poljoprivrednog zemljišta, prema procjenama, na svakog stanovnika otpada 0,20 ha poljoprivrednog zemljišta. Jedan od ograničavajućih čimbenika postizanja visokih i stabilnih prinosa u poljoprivredi je smanjena produktivnost tla. Budući da poljoprivredni proizvođači nemaju praksu obavljanja kemijske analize tla, kao i neracionalno korištenje mineralnih gnojiva dovodi do smanjenja produktivnosti tla.

UKUPNO POLJOPRIVREDNO ZEMLJIŠTE



Slika 1. Ukupno poljoprivredno zemljište općine Žepče (Razvojna agencija Žepče, 2017.)
Figure 1. Total agricultural land of Žepče municipality (Razvojna agencija Žepče, 2017.)

Materijali i metode

Terenska istraživanja

Terenska istraživanja obuhvatila su prostor općine Žepče. Na istraživanom području uzorkovan je sloj tla do dubine od 30 cm na sedam lokacija, Orahovica, Gornje Ravne, Donje Ravne, Ljubatovići, Dubravica, Vrbica i dvorište Katoličkog školskog centra u Žepču. Lokacije Orahovica i dvorište KŠC-a spadaju u dolinu rijeke Bosne, a lokacije G. Ravne, D. Ravne, Ljubatovići, Dubravica i Vrbica spadaju u brdsko-brežuljkasto područje. Svaki prosječni uzorak tla težio je 2 do 3 kg i sačinjen je od dobro izmiješanih pojedinačnih uzoraka ravnomjerno uzetih s proizvodne površine do dubine 30 cm. Prikupljeni uzorci su označeni, dopremljeni u laboratorij tj. kabinet kemije, očišćeni od primjesa, osušeni na sobnoj temperaturi i prosijani kroz sito. Nakon usitnjavanja i prosijavanja provela se metoda četvrtanja za svaki pojedini uzorak tla (slika 2).



Slika 2. Metoda četvrtanja
Figure 2. Quartering method

Laboratorijska istraživanja

Na uzorcima tala uzetih s poljoprivrednih površina na dubini do 30 cm provedene su laboratorijske analize osnovnih kemijskih svojstava tla: pH tla (aktualna kiselost), supstitucijska kiselost, određivanje sadržaja karbonata u tlu, hidrolitička kiselost i određen je zamjenjivi aluminij metodom po Sokolovu. Osim osnovnih agrokemijskih analiza, provedene su dodatne analize kojima su određeni fosfati, nitrati, nitriti i amonijevi ioni.

Osnovne kemijske analize uzoraka tla

Određivanje pH reakcije tla

Reakcija tla, izražena kao pH-vrijednost, pokazatelj je niza agrokemijskih svojstava tla važnih za svojstva tla. pH-vrijednost (aktualna kiselost) uzoraka tla određena je elektrometrijski pH metrom u suspenziji tla s destiliranom vodom, na način da je u 25 mL destilirane vode otopljeno 10 g tla. Određena je i supstitucijska kiselost na sličan način. U 25 mL 1 M KCl-a je otopljeno 10 g tla, a mjerenje je izvršeno na pH metru. Za interpretaciju rezultata supstitucijske kiselosti korištene su granične vrijednosti prema Škorić (1982.) prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Granične vrijednosti supstitucijske kiselosti u tlu (Škorić, 1982.)

Table 1. Limit values of substitution acidity in soil (Škorić, 1982)

Interpretacija	Rezultat
jako kisela	< 4,5
kisela	4,5–5,5
slabo kisela	5,5–6,5
neutralna	6,5–7,2
alkalna	> 7,2

Kvalitativno određivanje karbonata

Ova metoda spada u kvalitativne kemijske metode kojom se utvrđuje prisutnost karbonata i intenzitet karbonatnosti tla, ali se ne dobiva točna vrijednost ukupnih karbonata izražena u postocima CaCO₃. Uzorci tla prikazani su u slici 3.



Slika 3. Uzorci tla
Figure 3. Soil samples

Tretiranjem tla 10 %-tnom klorovodičnom kiselinom (HCl) u prisutnosti karbonata dolazi do pjenjenja i šumljenja tla. Izostanak reakcije tla pokazatelj je da se radi o tlu koje nije karbonatno. Slabije pjenjenje i šumljenje pokazatelj je slabe, a burna reakcija jake karbonatnosti tla (Tablica 2).

Tablica 2. Sadržaj karbonata u tlu na osnovu kvalitativne analize (Čoga, Slunjski, 2018.)

Table 2. Carbonate content in soil based on qualitative analysis (Čoga, Slunjski, 2018)

Intenzitet reakcije	Sadržaj CaCO ₃ %
Vrlo slabo	<1
Slabo	1-3
Jako i kratko	3-5
Jako i dugo	>5

Određivanje hidrolitičke kiselosti tla

Za određivanje hidrolitičke kiselosti tla koriste se otopine alkalnih soli, uglavnom natrijev ili kalcijev acetat. Princip metode zasniva se na reakciji ovih soli s tlom, odnosno vrši se zamjena H⁺ iona s alkalnim ionima acetata. Kao rezultat te zamjene u otopini se pojavljuje octena kiselina čija se količina određuje s 0,1 M NaOH (JDPZ, 1966). Hidrolitička kiselost kao ukupna potencijalna kiselost tla određena je ekstrakcijom 20 g tla s 50 mL 1 M natrijevim acetatom kao alkalnom hidrolitičkom soli pri čemu dolazi do zamjene kiselih H⁺ i Al₃⁺ iona tla s alkalnim ionom Na⁺ iz acetata. U navedenoj reakciji nastaje octena kiselina, pri čemu je količina kiseline ekvivalentna količini vodikovih iona na adsorpcijskom kompleksu tla te se utvrđuje titracijom odnosno neutralizacijom nastale kiseline 0,1 M natrijevim hidroksidom. Hidrolitička kiselost izražava se u cmol (+) kg⁻¹ nezasićenosti adsorpcijskog kompleksa tla alkalnim ionima. Vrijednost hidrolitičke kiselosti tla koristi se za izračunavanje kapaciteta adsorpcije kationa i stupnja zasićenosti tla alkalijama, te je osobito važna za određivanje potrebe u kalcizaciji.

Određivanje zamjenjivog aluminijskog metodom po Sokolovu

Aluminij je treći element po zastupljenosti u litosferi i sudjeluje u građi sekundarnih minerala gline. Postoje podaci o njegovom povoljnom utjecaju na rast i razvoj pojedinih biljnih vrsta, no u zadnje vrijeme sve je više podataka koji ukazuju na njegov štetan utjecaj. Toksičnost aluminijskog smatra se glavnim ograničavajućim faktorom poljoprivredne proizvodnje na kiselim tlima (Škorić, A., 1973). Pri smanjenju pH vrijednosti s 5,0 na 3,5 povećava se topljivost aluminijskih iona koji utječu na pristupačnost hranjiva posebice fosfora, kao i na rast korijena (Martinović, J., 1997). Određivanje zamjenjivog aluminijskog ispitivanih tala je određeno na sljedeći način: 100 g tla je otopljeno u 250 mL 1 M KCl-a i homogenizirano sat vremena. Nakon homogenizacije, smjesa tla i kalijeva klorida je profiltrirana i 50 mL filtrata se otpipetiralo u Erlenmeyerovu tikvicu i kuhalo 5 min. Nakon toga se dodalo nekoliko kapi reagensa fenoftaleina i titriralo s 0,01M NaOH do pojave blijedo ružičaste boje (slika 4).



Slika 4. Obojenje reakcijske smjese
Figure 4. Staining of the reaction mixture

Određivanje iona

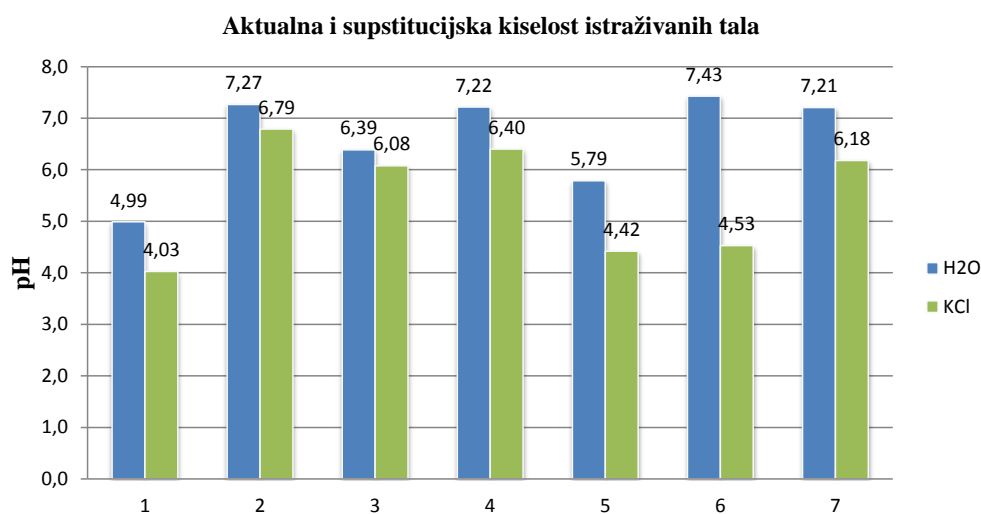
Na rast i razvoj biljaka znatno utječe prisutnost i količina pojedinih iona suspendiranih u tlu. Iz tog razloga se odredila koncentracija fosfata, nitrata, nitrita i amonijevih iona u ispitivanim tlima. Koncentracija pojedinih iona utvrdila se na osnovi boje koja se dobila dodatkom reagensa za svaki pojedini ion u otopini tla. Za probu korišten je uzorak tla sa lokaliteta Dubravica. Kako bi se utvrdio najbolji intenzitet reakcije tj. postupak koji će dati najbolji rezultat, provela su se dva načina ekstrakcije. U oba slučaja otopilo se 20 g tla u 50 mL destilirane vode. U prvom slučaju uzorak se promućkao i profiltrirao, a u drugom slučaju se prije filtracije uzorak prvo prokuhao 5 min, pa zatim filtrirao do bistrog filtrata (slika 5). Za svako ispitivanje iona koristilo se 5 mL filtrata i postupak se ponovio 3 puta za svaki pojedini uzorak tla i izračunala se srednja vrijednost.



Slika 5. Filtracija
Figure 5. Filtration

Rezultati i rasprava

U ovom radu analizirana su osnovna agrokemijska svojstva tla na sedam lokaliteta s područja Općine Žepče. Rezultati analiza osnovnih agrokemijskih svojstava tla koriste se za procjenu plodnosti tla i za utvrđivanje potreba gnojidbe tla. pH-vrijednost tala na području općine Žepče kreću se od blago alkalne do jako kisele vrijednosti. Bitno je istaknuti da su uzorci prikupljeni u dolini rijeke Bosne imali višu pH-vrijednost od onih uzetih na brdsko-brežuljkastom reljefu. pH-vrijednost je jako bitna za raspoloživost hranjiva u tlima, a samim time i na učinkovitost i primjenu gnojiva. S obzirom na očekivani veliki utjecaj pH-vrijednosti tla na pristupačnost hranjiva u istraživanim tlima, utvrđena je aktualna i supstitucijska kiselost tla (slika 6). Aktualna reakcija (pH H₂O) analiziranih tala kretala se od 4,99 na lokalitetu Vrbica do 7,43 na lokalitetu G. Ravne, dok se izmjenjiva reakcija (pH KCl) analiziranih tala kretala od 4,03 do 6,79 pH jedinica (slika 6). Aktualna pH-vrijednost tla s brdsko-brežuljkastih lokacija imala je utvrđene vrijednosti od 4,99 do 7,43, uz prosječnu vrijednost od 6,36 pH jedinica. Izmjenjiva pH reakcija analiziranih brdsko-brežuljkastih tala kretala se od 4,03 do 6,40, uz utvrđenu prosječnu vrijednost od 5,09 pH jedinica. Aktualna pH reakcija tala iz doline rijeke imala je vrijednosti od 7,21 do 7,27 uz prosjek od 7,24 pH jedinica, dok je izmjenjiva reakcija istih analiziranih tala imala raspon od 6,18 do 6,79 pH jedinica uz prosječnu vrijednost od 6,48 (Tablica 3).



Slika 6. Usporedni prikaz aktualne i supstitucijske kiselosti tla
Figure 6. Comparative approach of actual and substitution soil acidity

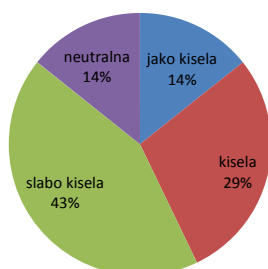
Prema utvrđenim vrijednostima (slika 7) supstitucijske kiselosti istraživani uzorci tla nalaze se u širokom rangu kiselosti. Utvrđeno je da 14 % istraživanih tala pripada grupi jako kiselih tala s utvrđenim vrijednostima ispod 4,5 pH jedinica. U grupi kiselih tala pripada 29 % istraživanih tala, a 43 % istraživanih tala pripada grupi slabo kiselih tala. Samo 14 % ispitivanih tala pripada grupi neutralnih tala. Prema analizama Poljoprivrednog zavoda općine Žepče, pH zemljišta u dolini rijeke se kreće od kiselog do blago alkalnog, dok je pH u brežuljkasto brdskom reljefu blago kisela, što je slično rezultatima ovog istraživanja (slika 8). Ukupni karbonati su određeni kvalitativno što znači da nije određen točan postotak karbonata na ispitivanim tlima.

Sadržaj karbonata se iščitao iz tablice 2 (Čoga, L., Slunjski, S., 2018) na osnovu intenziteta reakcije. Kod bezkarbonatnih uzoraka utvrđena je hidrolitička kiselost tla, a kao granična vrijednost se uzima njen iznos veći od 4 cmol/kg tla (Vukadinović i Lončarić, 1998.), što znači da se na istraživanim lokalitetima kalcijacija može preporučiti kao obavezna agrotehnička mjera popravka tla.

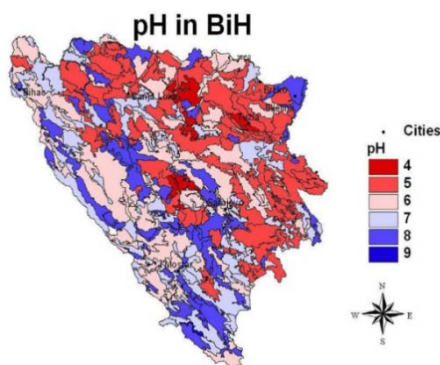
Tablica 3. Srednje vrijednosti pH prema istraživanim lokalitetima
Table 3. Mean pH values according to the investigated localities

pH	Srednja vrijednost
pH (H ₂ O) svi uzorci	6,61
pH (H ₂ O) (brdsko brežuljkasti)	6,36
pH (H ₂ O) (dolina rijeke)	7,24
pH (KCl) svi uzorci	5,49
pH (KCl) (brdsko brežuljkasti)	5,09
pH (KCl) (dolina rijeke)	6,48

Zastupljenost uzoraka prema supstitucijskoj kiselosti tla

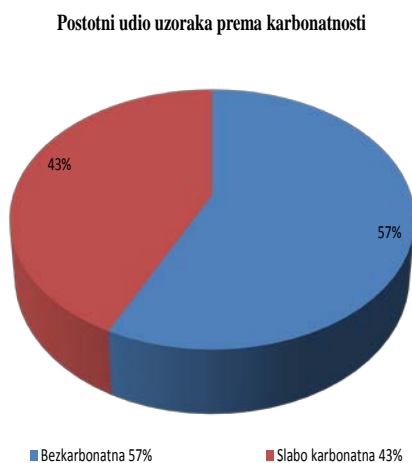


Slika 7. Postotni udio uzoraka prema supstitucijskoj kiselosti tla
Figure 7. Percentage of samples according to soil substitution acidity



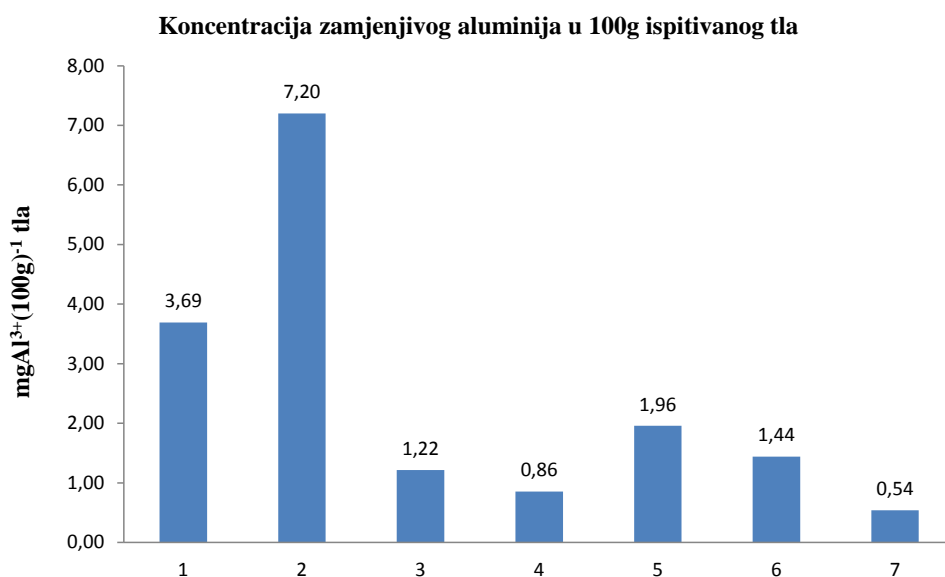
Slika 8. pH-vrijednost tala u Bosni i Hercegovini (FAO, 2011)
Figure 8. pH-value of soils in Bosnia and Herzegovina (FAO, 2011)

S obzirom da analizirana tla pokazuju uglavnom neutralnu ili slabo kiselu reakciju nema potrebe za značajnijim agrotehničkim mjerama, osim na pojedinim lokalitetima (Vrbica i Dubravica) na brežuljkasto brdskom krajoliku, gdje bi kalcizacija poboljšala pH reakciju tla. Kalcizacija je agrotehnička mjera koja može izazvati promjene u raspoloživosti hranjiva, posebno fosfora i teških metala, pa se ona mora provoditi pažljivo. Poželjno je postupno utjecati na promjenu pH tla, jer nagla promjena mijenja uvjete (biološko-fizičko-kemijska svojstva tla), što onda zahtjeva meliorativne doze mineralnih gnojiva, prvenstveno fosfora i mikroelemenata, te unošenje većih količina organskih gnojiva (Lončarić i sur., 2015). Na osnovi podataka iz slike 9 može se zaključiti da su tla na prostoru Općine Žepče većinom bezkarbonatna do slabo karbonatna.



Slika 9. Postotni udio uzoraka prema karbonatnosti
Figure 9. Percentage of samples by carbonate

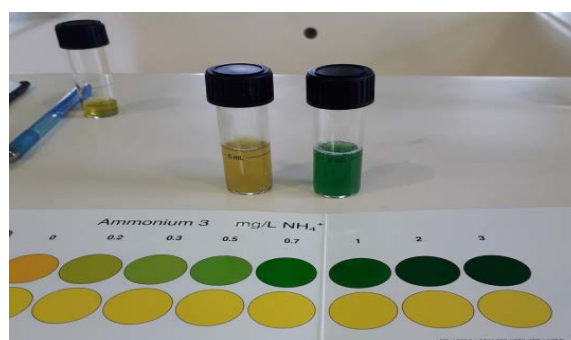
Na temelju dobivenih podataka (slika 10) koji se izražavaju u $\text{mgAl}^{3+}/100\text{g}$ tla zaključujemo da je na lokalitetu 7 tj. u dvorištu KŠC-a najmanja koncentracija aluminija i iznosi 0,54, a na lokalitetu 2 (Orahovica) najveća koncentracija aluminija sa vrijednošću od 7,20. Na osnovu podataka dobivenih tijekom mjerenja koncentracije aluminija u tlima, zaključujemo da je koncentracija aluminija u ispitivanim tlima relativno niska. Iznimka je lokalitet Orahovica koji pokazuje značajniju koncentraciju aluminija u odnosu na ostala ispitivana tla. Povećana koncentracija aluminija može biti posljedica povremenog izlivanja rijeke Bosne iz svog korita na ispitivanu površinu čime čestice aluminija zaostaju u tlu. Podatak koji potvrđuje prethodnu rečenicu jest i povećana koncentracija ispitivanih iona na istom lokalitetu. Dodatni razlog povećane koncentracije aluminija može biti i blizina prometnice jer ispušni plinovi dizelskih motora u sebi sadrže čestice aluminija koje se talože na tlo. Koncentracija pojedinih iona utvrđuje se na osnovu boje koja se dobije dodatkom reagensa za svaki pojedini ion u filtrat tla (slika 11). Za probu korišten je uzorak tla iz lokaliteta Dubravica. Uzorak koji je korišten u probi pokazao je da je najbolji intenzitet reakcije i pokazatelj prisutnosti pojedinih iona onaj koji je prokuhan. To možemo vidjeti i po obojenosti otopine na slici 12.



Slika 10. Prikaz koncentracije zamjenjivog aluminija u ispitivanim tlima
Figure 10. Representation of the concentration of replaceable aluminum in the tested soils



Slika 11. Obojenost filtrata tla nakon dodatka reagensa za pojedini ion
Figure 11. Coloration of soil filtrate after addition of reagent for each ion



Slika 12. Prikaz koncentracije NH₄⁺ iona u neprokuhanom – lijeva boca i prokuhanom uzorku – desna boca
Figure 12. Display of NH₄⁺ ion concentration in unboiled - left bottle and boiled sample - right bottle

Nakon utvrđivanja postupka, napravljeno je ispitivanje koncentracije fosfata, nitrita, nitrata i amonijevih iona. Koncentracije iona izražene su u mg/L i prikazane su u tablici 4. Utvrđena je najmanja koncentracija fosfata na lokalitetu 3 i iznosi 0,2 mg/L, a najveća na lokalitetu 2 i iznosi 1,5 mg/L. Koncentracija amonijevih iona je najveća na lokalitetu 2 i iznosi 3 mg/L, a najmanja na lokalitetu 6 i iznosi 0,5 mg/L. Najveća koncentracija nitrata iznosi 120 mg/L na lokalitetu 2, a najmanja 4 mg/L na lokalitetu 3. Koncentraciju nitritnih iona nije bilo moguće utvrditi kod svih uzoraka jer je obojenost pojedinih uzoraka premašivala skalu. Od utvrđenih koncentracija najveća je na lokalitetu 1 i iznosi 0,5 mg/L, a najmanja na lokalitetu 7 i iznosi 0,01 mg/L. Ispitivanjem je utvrđeno da je lokalitet 2 (Orahovica) najbogatiji ispitivanim ionima, a lokalitet 3 (Ljubatovići) najsiromašniji s ispitivanim ionima.

Tablica 4. Koncentracije pojedinih iona u istraživanim filtratima tala
Table 4. Concentrations of individual ions in the investigated soils filtrates

Red. br.	lokalitet	NH ₄ ⁺ , mg/L	PO ₄ ³⁻ , mg/L	NO ₃ ⁻ , mg/L	NO ₂ ⁻ , mg/L
1	Vrbica	1	0,7	70	0,5
2	Orahovica	3	1,5	120	Prekoncentrirani uzorak
3	Ljubatovići	0,9	0,2	4	0,07-0,1
4	D.Ravne	0,7	0,4	50	0,3
5	Dubravica	0,8	0,5	40	Prekoncentrirani uzorak
6	G.Ravne	0,5	0,3	90	Prekoncentrirani uzorak
7	KŠC	1,5	0,4	20	0,01
/	Srednja vrijednost	1,2	0,57	56,28	/

Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja i utvrđenih rezultata može se zaključiti kako istraživana brežuljkasto-brdska tla pokazuju ograničenja koja u određenoj mjeri određuju produktivnost tla za ratarsku proizvodnju na području općine Žepče. Poboljšanje svojstava tla moguće je postići melioracijskim zahvatima koji uključuju dubinsko rahljenje tla, gnojidbu organskim gnojivima odnosno humizaciju, kalcizaciju te meliorativnu gnojidbu fosforom i kalijem. Tlo uz rijeku Bosnu (Žepačka polja) pokazuje najbolja svojstva za poljoprivrednu proizvodnju i nije potrebno provoditi značajnu gnojidbu. Na osnovu svih dobivenih podataka tijekom analize i uzimajući u obzir određene melioracijske zahvate, te geografski položaj i klimu, na području općine Žepče je moguće proizvoditi sljedeće kulture:

- Voće: jabuka, šljiva, kruška, malina, kupina, lješnjak, aronija
- Povrtne kulture: paprika, rajčica, grah, krastavac, luk, špinat
- Ratarske kulture: pšenica, ječam, kukuruz, krumpir

Literatura

- Agencija za sigurnost hranu BiH (2009): Procjena rizika iz oblasti sigurnosti hrane. Bosna i Hercegovina-Republički zavod za statistiku, Socijalistička Republika Bosna i Hercegovina: osnovni pokazatelji razvoja, Sarajevo, 1984.
- Bukalo i sur. (2013.): Monitoring tala u Federaciji BiH, 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma, Dubrovnik, .str. 65-69.
- Čoga, L., Slunjski, S. (2018): Dijagnostika tla u ishrani bilja, priručnik za uzorkovanje i analitiku tla. Sveučilište u Zagrebu agronomski fakultet, str. 48-106
- Dunder L. (2012): Povijest poljoprivrede u općini Žepče, URL: <http://www.opcina-zepce.com/index.php/news/poljoprivreda/14-o-opcini-zepce> (Pristupljeno 25.5.2020.).
- Đurđević, B. (2014): Praktikum iz ishrane bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, str. 3-18
- Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO) (2011.): Bosnia and Herzegovina, URL: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BIH> (Pristupljeno 24.5.2020.)
- JDPZ (1967.): Metodika terenskog ispitivanja zemljišta i izrade pedoloških karata. Priručnik. Beograd.
- Lončarić, Z. (2014.): Uzorkovanje tla i biljke za agrokemijske i pedološke analize. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Lončarić, Z., Gross Bošković, A., Parađiković, N., Rozman, V., Kralik, Z., Baličević, R., Bursić, V., Miloš, S. (2015.): Utjecaj poljoprivrede na kakvoću hrane u pograničnome području. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek. 108.
- Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine, Biljna proizvodnja, URL:<http://www.mvteo.gov.ba/Content/Read/poljoprivreda-i-ruralni-razvoj-biljna-proizvodnja> (Pristupljeno 25.5.2020.)
- Martinović, J. (1997): Tlo znanstvo u zaštiti okoliša. Pokret prijatelja prirode Lijepa Naša. Zagreb.
- Razvojna agencija Žepče, RAŽ (2017): Opći podaci o poljoprivrede o poljoprivredi općine, URL:<https://www.razepce.com/wp-content/uploads/2018/04/POLJOPRIVREDA-%C5%BDep%C4%8De-2018.pdf>, (Pristupljeno 18.5.2020.)
- Škorić, A. (1965): Pedološki praktikum (Pedology guide), Zagreb, 1965, pp. 18–23
- Škorić A. (1982): Priručnik za pedološka istraživanja, Fakultet poljoprivrednih znanosti, Zagreb.
- Škorić A. (1973): Pedološki praktikum, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Vukadinović, V., Bertić B. (1989): Praktikum iz agrokemije i ishrane bilja, Poljoprivredni fakultet, Osijek, str. .126
- Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1998): Ishrana bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.

Chemical analysis of soil in the municipality of Žepče (Bosnia and Herzegovina)

Nikolina Grlić, Nikolina Pravdić, Matea Jukić, Marko Tomas*

*Catholic School Center "Don Bosco" Technical and Craft School,
Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, Bosnia and Herzegovina*

**Corresponding author: marko.tomas2020@gmail.com*

Summary

Chemical analysis of the soil is crucial for obtaining high incomes, i.e. rational, profitable and efficient application of agricultural techniques, especially fertilization, cultivation, sowing and harvest. Concerning that, it should be understood that a comprehensive and effective soil fertility control system systematically collects all relevant physicochemical data on soil; its fertility and use; contribution to the better distribution of mineral and organic fertilizers; elimination of acute nutrient deficiencies; chemical and physical soil repair; profitable production; i.e. preservation and rising of effective soil fertility. The aim of this research was to determine the suitability of soil for field production in the municipality of Žepče. Laboratory analyses of basic soil chemical properties were performed on soil samples taken from agricultural areas at depth up to 30 cm: soil pH, determination of replaceable aluminium by the Sokolov method, substitution acidity, qualitative determination of carbonates in soil and hydrolytic acidity. In addition to basic agrochemical analyses, additional analyses were performed to determine the concentration of nitrites (NO_2^-), nitrates (NO_3^-), phosphate (PO_4^{3-}) and concentration of ammonium ions (NH_4^+) in aqueous soil filtrates. It was established, in analysed samples of the municipality of Žepče, that the average pH reaction of the soil is neutral. It was also determined that almost all types of soils are carbonate-free or have low carbonate content, while ion saturation is highest in soils along the Bosna River.

Keywords: Žepče, soil, soil pH reaction, Sokolov method

Ispitivanje kvalitete paste za zube od zelene gline

Sandra Jozinović, Zoran Jurić, Ivona Pranjić, Slavica Jukić*

*Katolički školski centar "Don Bosco", Opća gimnazija,
Stjepana Radića b.b., 72230 Žepče, Bosna i Hercegovina
Dopisni autor: slavica.perkovic71@gmail.com

Sažetak

Cilj ovog rada bio je dobiti proizvod koji ne sadrži štetne kemikalije, a može ukloniti zubni plak, inhibirati rast mikroorganizama i osigurati svjež dah. Pasta za zube pripremljena za ovu analizu sadrži zelenu glinu i druge prirodne sastojke poput hidrolata kadulje i eteričnog ulja čajevca. Zelena glina sadrži prirodne i netretirane nutrijente koji djeluju remineralizirajuće i detoksirajuće te podižu imunitet organizma. Sinergijom kadulje i čajevca dobiva se proizvod moćnog antibakterijskog i protuupalnog djelovanja. Kvaliteta ispitivane paste utvrđena je mikrobiološkom analizom prema Pravilniku o analizi sredstava za održavanje osobne higijene („Sl. List SFRJ“, br. 46/83), te recenzijom koju su dali učenici naše škole.

Ključne riječi: pasta za zube, zelena glina, mikrobiološka analiza

Uvod

Pasta za zube je jedan od najvažnijih proizvoda za održavanje oralne higijene. Osnovna namjena zubne paste je uz pomoć mehaničkog djelovanja četkice za zube, ukloniti zubni plak, eliminirati štetne bakterije iz usta te aromatizirati dah (Herenda, 2019). Osim navedenih namjena zubne paste, cilj ovog rada bio je i napraviti prirodnu pastu za zube bez štetnih kemikalija. Jedan od najčešćih sastojaka komercijalnih pasti za zube je fluor, koji se smatra jednim od najvećih otkrića 20. stoljeća u dentalnoj medicini. Iako pomaže u borbi protiv karijesa, veće količine fluora mogu biti vrlo opasne za zdravlje i uzrokovati oštećenje zuba (Verazik i sur., 2007). Biološka ispitivanja dokazuju kako su fluoridi vrlo štetni za čovjekovo zdravlje i mogu remetiti funkcije u čovjekovom organizmu (Linčir i sur., 1992). Prekomjerne količine fluora u pasti za zube uzrokuju trajne promjene i na zubima u obliku bijelih mrlja. Zbog ovog rizika u ispitivanoj pasti se nastojalo naći prirodno rješenje za remineralizaciju zubne cakline. Prirodna pasta za zube koja je bila predmet istraživanja u ovom radu izrađena je od zelene ventilirane gline, kalcijevog karbonata, sode bikarbone, hidrolata kadulje, glicerola i eteričnog ulja čajevca.

Zelena glina sadrži korisne minerale (magnezij, kalcij i silicij) koji pomažu u remineralizaciji zubne cakline (Elmore, 2018). Kad bakterije i drugi mikroorganizmi napadnu vanjsku površinu zuba, oni razgrađuju zubnu caklinu bogatu mineralima. Minerali u slini pomažu u obnovi cakline kako bi se spriječilo propadanje zuba. Minerali u zelenoj glini predstavljaju osnovu za ovu remineralizaciju (Elmore, 2018). Tako zelena glina zapravo može pomoći u zacjeljivanju manjeg karijesa i oštećene cakline. Zelena glina je poznata i po svom detoksirajućem djelovanju. Molekule zelene gline nose negativni električni naboj, dok toksini i nečistoće (virusi, paraziti, gljivice, bakterije itd.) nose pozitivan naboj (Elmore, 2018).

Negativno nabijene čestice gline vežu s pozitivno nabijenim česticama toksina i nečistoća. Slijedom toga, glina neutralizira bakterije i druge nečistoće iz usta i površine zuba. Na taj način poboljšava cjelokupno oralno zdravlje, kao i uklanjanje neugodnog zadaha. Minerali u zelenoj glini neutraliziraju i kiseline koje oslabljuju zubnu caklinu. Struktura čestica gline izvrsna je i u poliranju zubi. Ove čestice nježno pročišćavaju površinu zuba bez grubih abraziva koji oštećuju zubnu caklinu (Herenda, 2019). Osim zelene gline, kalcijev karbonat ima nježnu abrazivnu ulogu u struganju naslaga sa zubi i inhibiranju rasta mikroorganizama. U kombinaciji s ribanjem četkice kalcijev karbonat čisti površinu zuba. Višenamjenska soda bikarbona je pogodno sredstvo za higijenu usne šupljine zbog oštine kristalića. Prirodno je rješenje za izbjeljivanje zubi i pomaže u sprječavanju krvarenja desni i otklanjanju kamenca (Brzić i sur., 2018). Glicerinova najvažnija uloga jest ovlaživanje paste. Kadulja je biljka nevjerojatno širokog spektra djelovanja. Ima snažno protuupalno, antivirusno, antibakterijsko i protugljivično djelovanje (Narayanan i sur., 2015). Ljekovita kadulja svojim djelovanjem smiruje i liječi upalu. Sadrži supstance koje ubrzavaju zacjeljivanje rane. Liječi afte, ranice u ustima i sprječava naticanje i krvarenje desni. Zaslužna je za oporavak gingive i učvršćavanje zubi. Eterično ulje čajevca ima antiseptičko i antibakterijsko djelovanje te zbog toga pridodaje svježem dahu nakon pranja zubi i produljuje rok trajanja paste za zube (Herenda, 2019).

Materijali i metode

Zadatak ovog rada bio je napraviti pastu za zube od prirodnih sastojaka (Tablica 1), ispitati mikrobiološku čistoću proizvoda i mišljenje korisnika.

Tablica 1. Sastojci za izradu paste za zube

Table 1. Ingredients for production of the toothpaste

Sastojci	<i>m</i> (uzorka) / g
Zelena ventilirana glina, Argital, Italija	20
Kalcijev karbonat, Mayam, Rumunjska	40
Soda bikarbona, Encian, Hrvatska	1
Hidrolat kadulje, vlastita proizvodnja	20
Glicerol, Mayam, Rumunjska	18
Eterično ulje čajevca, Dietpharm, Hrvatska	2 kapi

Postupak izrade paste za zube

Prilikom pripreve proizvoda korištena je zaštitna maska i rukavice. Alkoholom je dezinficirana radna površinu, posuđe i pribor. Odvagana zelena glina i kalcijev karbonat izmiješani su u tarioniku (slika 1).



Slika 1. Priprava paste za zube od zelene gline
Figure 1. Preparation of green clay paste

U drugoj posudi izmiješani su glicerol, hidrolat kadulje i soda bikarbona. Soda bikarbona otopljena je u vodenoj kupelji. Tekuća faza ulivena je u smjesu krutih tvari i miješana do odgovarajuće konzistencije. Gotova pasta prenesena je u odgovarajuću ambalažu (slika 2.).



Slika 2. Pasta za zube od zelene gline
Figure 2. Green clay toothpaste

Mikrobiološka analiza paste za zube

Zdravstvena ispravnost ovog proizvoda utvrđena je mikrobiološkom analizom koja je provedena na Institutu za zdravlje i sigurnost hrane u Zenici (Bosna i Hercegovina), prema metodama za određivanje mikrobiološke ispravnosti sredstava za održavanje osobne higijene, njegu i uljepšavanje lica i tijela (Pravilnik „Sl. List SFRJ“, br. 46/83). Ispitivani su mikroorganizmi: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, te je određen ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija i gljiva.

Određivanje prisutnosti, izolacija i identifikacija mikroorganizama

Uzorak se priredio tako što se iz originalnog uzorka (10 g u 100 mL) uzeo 1 mL i otpipetirao u 9 mL sterilne fiziološke vode.

1. Određivanje ukupnog broja mezofilnih aerobnih bakterija i ukupnog broja kvasaca i spora plijesni

U četiri Petrijeve zdjelice otpipetirano je po 1 mL od svakog pripremljenog razrjeđenja i odmah je u dvije dodano po 15 mL otopljenog i na temperaturi od 40 do 45 °C ohlađenog hranjivog agara. Za uzgoj bakterija, uzorci su inkubirani dva dana na temperaturi od 35 do 37 °C, a zatim još dva dana na temperaturi od 20 do 25 °C. U druge dvije Petrijeve zdjelice dodano je po 15 ml Sabouraud maltoznog agara, ohlađenog na temperaturi od 40 do 45 °C i dobro promiješano. Nakon što je podloga očvrstnula, zdjelice su inkubirane pet dana na temperaturi od 24 do 26 °C za uzgoj gljiva (plijesni i kvasci).

Poslije inkubacije, izbrojane su izrasle kolonije, za koje je utvrđeno da su bakterije, odnosno kvasci ili plijesni. Svaka porasla kolonija može se razviti ili iz pojedinačne bakterijske stanice ili iz nakupine pojedinačnih bakterijskih stanica. Radi usporedivosti rezultata, dogovorom je usvojeno da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu. Tako se broj mikroorganizama u uzorku izračunava na osnovi broja poraslih kolonija prema formuli (Volner, Z., 2008), jednadžba (1):

$$c = \frac{n}{Sxd} \quad (1)$$

c – koncentracija, CFU/mL

n – broj kolonija

S – volumen prenesen na hranjivu podlogu

d – faktor razrjeđenja

Dobivena vrijednost predstavlja ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija, odnosno ukupan broj kvasaca i plijesni u 1 g (1 mL) uzorka.

2. Izoliranje i identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka

Otpipetiran je 1 mL pripremljenog razrjeđenja 10^{-1} u 9 mL slanog bujona sa 10 %-nim natrijevim kloridom i inkubiran 24 do 48 sati na temperaturi od 35 do 37 °C. Poslije inkubacije, sterilnom mikrobiološkom ezom je precijepljen na površinu ETGP agara po Baird Parkeru. Zasađene podloge inkubirane su 24 do 48 sati na temperaturi od 35 do 37 °C. Izrasle kolonije, karakteristične za koagulaza pozitivne stafilokoke, provjerene su na sposobnost koaguliranja plazme, odnosno na prisutnost fermenta koagulaze.

3. Izoliranje i identifikacija *Pseudomonas aeruginosa*

Otpipetiran je 1 mL razrjeđenja 10^{-1} u 9 mL hranjivog bujona i inkubiran 24 do 48 sati na temperaturi od 35 do 37 °C. Poslije inkubacije, precijepljen je mikrobiološkom sterilnom ezom na površinu Cetrimid agara. Podloga je inkubirana 24 sata na temperaturi od 35 do 37 °C. Sumnjive kolonije testirane su na prisustvo citrokrom-oksidge. Kolonije s pozitivnim oksidaznim testom precijepljene su na podlogu za određivanje pigmenta piocijanina King A i fluorescina King B i na kosi agar. Podloge King A i King B inkubirane su 24 sata na temperaturi 37 °C u termostatu, a kosi agar 24 sata na 42 °C u vodenoj kupelji. Karakteristične reakcije ukazuju na prisustvo bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Izoliranje i identifikacija *Escherichia coli*

Jedan mililitar razrjeđenja 10^{-1} otpipetiran je u epruvete s Durhamovim cjevčicama i s brilijantzelenim laktoza žučnim bujonom. Epruvete su inkubirane 24 do 48 sati na temperaturi 44 °C. Stvaranje plina u Durhamovim cjevčicama poslije 24 do 48 sati označava kako je u podlozi došlo do porasta *Escherichie coli*. Iz epruveta s pozitivnim rastom, sadržaj je sterilnom mikrobiološkom ezom precijepljen na površinu ljubičasto-crvenog žučnog agara ili eozin-metilen-plavog agara i inkubiran 24 do 48 sati na temperaturi 44 °C. Karakteristične laktoza pozitivne kolonije precijepljene su na dvostruki šećer po Kligeru i inkubirane 18 do 24 sata na temperaturi 35 do 37 °C. Kulture svojstava karakterističnih za *Escherichiu coli* identificirane su kratkim biokemijskim nizom. Kulture su precijepljene na peptonsku vodu za indol, podlogu za ureu, podlogu za izvođenje MR (Metil red) i VP (Voges-Proskauer) ogleda i podlogu za dokazivanje korištenja citrata po Simonsu. Podloge su inkubirane 24 do 48 sati na temperaturi 35 do 37 °C. Karakteristične reakcije ukazuju na prisustvo *Escherichia coli*.

5. Izoliranje i identifikacija *Proteus* vrsta

Otpipetiran je 1 mL razrjeđenja 10^{-1} u 9 mL hranjivog bujona i inkubiran 18 do 24 sata na temperaturi 35 do 37 °C. Poslije inkubacije, na površinu SS agara i brilijantzelenog agara mikrobiološkom sterilnom ezom je precijepljena izrasla kultura i inkubirana 18 do 24 sata na temperaturi 35 do 37 °C. Karakteristične kolonije precijepljene su na dvostruki šećer po Kligleru i inkubirane 18 do 24 sata na temperaturi 35 do 37 °C. Kulture s dvostrukog šećera, osobina karakterističnih za *Proteus*, identificirane su dalje kratkim biokemijskim nizom. Karakteristične reakcije ukazuju na prisustvo *Proteus* vrsta.

Rezultati i rasprava

Rezultati mikrobiološke analize

Rezultati mikrobiološke analize ispitivane paste za zube pokazali su kako određivani mikroorganizmi nisu prisutni ili su zastupljeni u minimalnim količinama koje ne mogu prouzročiti nikakve zdravstvene probleme. Odsutnosti patogenih mikroorganizama u ispitivanoj pasti zasigurno su doprinijeli, osim zelene gline, i eterično ulje čajevca i hidrolat kadulje koji imaju dokazanu antimikrobnu aktivnost. Najpoznatije i najčešće korišteno antimikrobno svojstvo eteričnih ulja je njihovo antibakterijsko djelovanje za koje su zaslužni fenolni spojevi (Burt, 2004). Uočena je manja osjetljivost gram-negativnih bakterija na djelovanje eteričnih ulja u odnosu na gram-pozitivne bakterije budući da gram-negativne bakterije posjeduju hidrofilni lipopolisaharidni omotač koji ograničava difuziju hidrofobnih spojeva (Burt, 2004). Osim antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja poznata je i njihova antifungalna aktivnost (Burt, 2004). Kod plijesni dolazi do narušavanja strukture stanične membrane, blokiranja njezine izgradnje te inhibiranja klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja što dovodi do smrti stanice (Harris i sur., 2002).

Eterična ulja su smjese tvari različitih mehanizama djelovanja, zbog toga bakterije još uvijek nisu uspjele razviti rezistenciju na eterična ulja za razliku od antibiotika. Hidrolati su vodene mase koje zadržavaju slična molekulska svojstva kao i ulje, i za razliku od njih topiva su u vodi. Sinergijom hidrofobnih eteričnih ulja i hidrofilnih hidrolata značajno je učinkovitija borba protiv svih vrsta mikroba.

Fenolni spojevi, poput karvakrola i timola, koji se nalaze u hidrolatu kadulje, prepoznati su kao jaka antibakterijska sredstava (Lambert i sur., 2001). Timol je također poznat i po antifungalnim svojstvima (Morcia i sur., 2012).

Tablica 2. Rezultati mikrobiološke analize paste za zube
Table 2. Results of microbiological analysis of toothpaste

Mikroorganizam	Jedinica mjere	Rezultat ispitivanja	Referentna vrijednost
<i>E. coli</i>	0,1 g/l	odsutna	odsutna
Ukupan broj gljiva	1 g/l	<10	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1 g/l	odsutna	odsutna
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1 g/l	odsutna	odsutna
<i>Proteus</i>	0,1 g/l	odsutna	odsutna
Ukupan broj bakterija	g/l	<1	1000

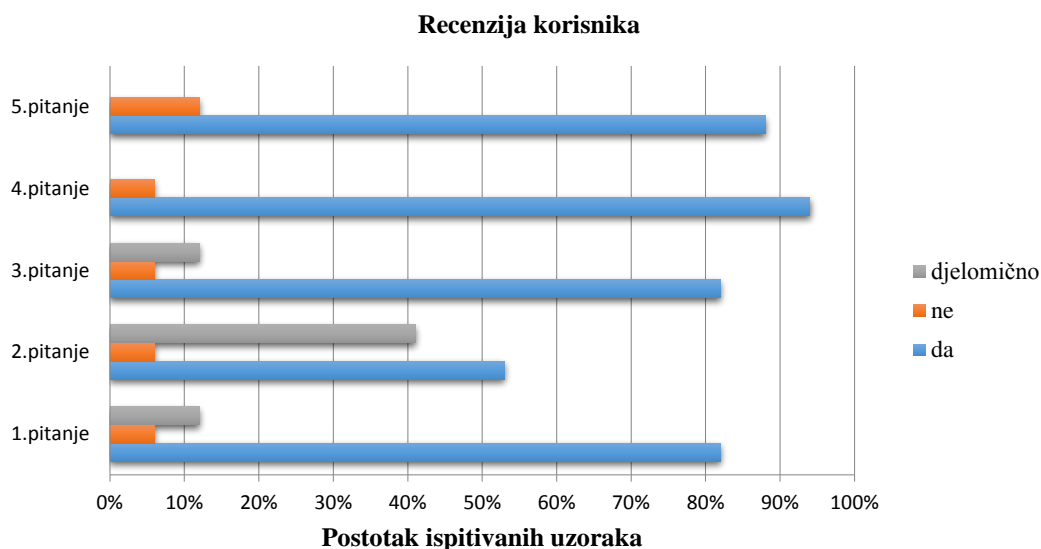
Recenzija korisnika

Zadnji dio istraživačkog rada bio je recenzija korisnika, odnosno potrošača (slika 3). Za svaki proizvod, pa tako i za prirodnu pastu za zube, najvažniji kriterij je upravo ocjena korisnika i njihovo mišljenje o korištenom proizvodu. U anketi od pet pitanja sudjelovalo je 30 ispitanika te je dobiveno općenito mišljenje o ovoj zubnoj pasti. Ispitanici su bili različite životne dobi, s različitim životnim navikama, ali i problemima i stanjima zubi.

Dobiveni su sljedeći rezultati:

- 1. pitanje:** *Jeste li zadovoljni proizvodom i rezultatom nakon korištenja:* 82 % korisnika je odgovorilo s da, 6 % s ne i s djelomično njih 12 %.
- 2. pitanje:** *Je li zubna pasta pomogla ili ublažila problem, odnosno stanje koje imate:* većina korisnika je rekla kako je pasta potpuno ili djelomično pomogla rješavanju njihovih problema.
- 3. pitanje:** *Na ljestvici usporedite ispitivanu pastu za zube s pastama koje inače kupujete i koriste.* Otkriveno je kako 80 % korisnika preferira prirodnu pastu za zube.
- 4. pitanje:** *Bi li preporučili prirodnu pastu svojim bližnjima:* 94 % korisnika dalo je pozitivan odgovor.
- 5. pitanje:** *Planirate li nastaviti koristiti prirodnu pastu za zube,* gotovo 90 % korisnika je odgovorilo kako žele koristiti upravo ovu pastu.

Na kraju ankete, korisnici su mogli dati svoj osobni komentar ili posebno mišljenje oko ispitivane paste. Sumiranjem komentara dobivena je informacija da velika većina korisnika želi koristiti i druge prirodne proizvode poput ispitivane paste na svakodnevnoj bazi. Ispitivana pasta jako dobro čisti, izbjeljuje zube te osigurava svježiji dah, te je ekološki prihvatljiva, te pogodna za korištenje i kod male djece.



Slika 3. Rezultati ankete
Figure 3. Survey results

Zaključci

Na temelju rezultata dobivenih ispitivanjem kvalitete paste za zube od zelene gline mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Mikrobiološkom analizom prirodne paste za zube utvrđeno je kako je ista zdravstveno ispravna za oralnu primjenu
- Rezultati mikrobiološke analize također potvrđuju činjenicu kako odabrani sastojci kao što su zelena glina, hidrolat kadulje i eterično ulje čajevca imaju snažno antimikrobno svojstvo
- Rezultati ispitivanja korisnika proizvoda govore kako je većina ispitanika zadovoljna i planira i dalje koristiti ispitivanu pastu za zube
- Ispitivanjem korisnika može se zaključiti kako su ispitanici zainteresirani i žele koristiti i druge prirodne proizvode, koji su svakako zdravija i kvalitetnija alternativa proizvodima koji se inače kupuju i koriste na svakodnevnoj bazi
- Potrebno je istražiti što više prirodnih proizvoda kako bi se očuvao okoliš od štetnih kemikalija te smanjilo širenje patogenih organizama koji postaju sve veća prijetnja za čovječanstvo

Literatura

- Brzić, I., Kondža, M. (2018): Primjena kalcijevog karbonata u medicinske svrhe, *e-Zbornik*, 8 (Posebno izdanje), 7-15.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Elmore, L. (2018): Bentonite clay the secret to healthy gums and teeth, URL: <https://lindseyelmore.com/bentonite-clay-the-secret-to-healthy-gums-and-teeth/> (Pristupljeno 10.12. 2018.)

- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., Nielsen, J. B. (2006): A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil, *Food Chem. Toxicol.* 44, 616 – 625.
- Harris, R. (2002): Progress with superficial mycoses using essential oils, *Int. J. Aromather.* 12, 83-91.
- Herenda, F. (2019): Prirodna kozmetika, Panacea, Zadar.
- Kuzman, I., Schönwald, S. (2000): Infektologija, Medicinska naklada, Zagreb.
- Lambert, M. J. (2001): Psychotherapy outcome and quality improvement: Introduction to the special section on patient-focused research, *J. Consult. Clin. Psychol.* 69, 147.
- Linčir, I., Rošin-Grget, K. (1992): Neželjeni učinak fluora - dentalna fluoroza, *Acta Stomatol. Croat.* 26(1), 47-53.
- Morcia, C., Malnati, M., Terzi, V. (2012): In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens, *Food Addit. Contam. Part A.* 29, 415-422.
- Narayanan, N., Thangavelu, L. (2015): *Salvia officinalis* in dentistry, *Dent Hypotheses*, 6, 27-30.
- Pravilnik („Sl. List SFRJ“, br. 46/83), metode G.
- Verzak, Ž., Burazin, A., Černi, I., Čuković-Bagić, I. (2007): Fluoridi i karijes, *Medix.* 13 (71) 155-156.
- Volner, Z. (2008): Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom, Školska knjiga, Zagreb. URL: <https://holisticdentistryusa.com/is-bentonite-clay-good-for-teeth/>, (Pristupljeno 10.12. 2018.).

Testing the quality of green clay toothpaste

Sandra Jozinović, Zoran Jurić, Ivona Pranjić, Slavica Jukić*

*Catholic School Center "Don Bosco" Technical and Craft School,
Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, Bosnia and Herzegovina*

**Corresponding author: slavica.perkovic71@gmail.com*

Summary

The aim of this work was to obtain a product that does not contain harmful chemicals, can remove dental plaque, inhibit the growth of microorganisms and provide fresh breath. The toothpaste prepared for this analysis contains green clay and other natural ingredients such as sage hydrolate and tea tree essential oil. Green clay contains natural and untreated nutrients that have a remineralizing and detoxifying effect. It also increases the body's immunity. The synergy of sage and tea tree produces a product with powerful antibacterial and anti-inflammatory effects. The quality of the tested paste was determined by microbiological analysis according to the Ordinance on the analysis of personal hygiene products („Sl. List SFRJ“, n. 46/83) and the review given by the students of our school.

Keywords: toothpaste, green clay, microbiological analysis

Uzorkovanje i analiza bunarskih voda

Kristina Nikolić, Đurđevka Pecikozić*

Tehnička škola Nikole Tesle Vukovar, Blage Zadre 4, HR - 32010 Vukovar

**Dopisni autor: djurdjevka.pecikozic@yahoo.com*

Sažetak

Voda je oduvijek imala važno mjesto u svakodnevnom životu čovjeka. Kako u društvenom, tako i u kulturnom razvoju čovječanstva kroz povijest. Bunari su iskopine ili bušotine kreirane u zemlji kopanjem, probijanjem ili bušenjem kako bi se pristupilo podzemnim vodama odnosno izdanima. Kakvoća podzemnih voda ovisi o prirodnim karakteristikama kao i antropogenim utjecajima. Prije izgradnje javnih vodoopskrbnih sustava bunari su bili glavni izvor pitke vode u naseljima i značili su život. Danas su bunar spomenici pitke vode i ukras dvorišta, a poneki se još koristi za pranje ili zalijevanje vrtova. Cilj rada je izmjeriti pH-vrijednost, električnu provodnost, koncentraciju NH_4^+ iona, mutnoću i ukupnu tvrdoću uzoraka vode iz bunara u Vukovarsko-srijemskoj i Osječko-baranjskoj županiji. Mjerenja su rađena multimetrom HQ40d, Hack primjenom odgovarajućih sondi, turbidimetrom 2100Qis, Hack i digitalnim TDS Metar testerom. Rezultati mjerenja pokazuju da su bunarske vode tvrde do vrlo tvrde. Specifična električna provodnost je veća nego što je slučaj kod obrađene pitke vode, mutnoća je ispod maksimalne dozvoljene granice 4 NTU (NN 125/2013), a koncentracija amonijevih iona je u svim ispitivanim uzorcima iznad maksimalno dozvoljene granice od 0,5 mg/L (NN 125/2013).

Ključne riječi: bunari, podzemne vode, kruženje vode, onečišćenje

Uvod

Voda je vrlo važan uvjet života čovjeka, biljaka i životinja (Ivoš, 1953), najzastupljenija je tvar u prirodi, na Zemlji nalazi se u tri agregacijska stanja: tekuće (slane i slatke vode), krutom (polarni led i ledenjaci), plinovitom (vodena para u atmosferi). Voda je osnova života i sredina iz koje je život potekao, neophodna namirnica za svaku biocenu i čovjeka, univerzalno otapalo, izvor hrane i minerala, bitan klimatski čimbenik, izvor energije, mjesto rekreacije, općedruštveno dobro. Prema trenutnim saznanjima i podacima Svjetske zdravstvene organizacije ukupne zalihe čiste vode su vrlo male iako Zemlja kao planet ima velike rezerve vode, 94,7 % je pretežno vezano za minerale (kristalna voda, strukturna voda) koja se može osloboditi visokim temperaturama. Voda u prirodi nije kemijski čista jer apsorbira različite anorganske i organske tvari. Kemijski sastav voda je promjenjiv. Prirodne vode prema podrijetlu možemo podijeliti na: oborinske (atmosferske), površinske i podzemne (Kralj, 2017). Od ukupne količine slatke vode na Zemlji 30 % se nalazi u podzemlju kamo dolazi infiltracijom ili gravitacijskim procjeđivanjem s površine. Podzemna voda je voda koja se nalazi ispod površine Zemlje unutar šupljina i pora u tlu i u stijenama često je glavni ekonomski resurs, osobito u sušnim područjima gdje u pravilu nedostaje. U mnogim gradovima i naseljima velike količine vode dobivaju se iz bušenih bunara ili zdenaca.

Čak i u velikim gradovima smještenim na rijekama, voda se najčešće crpi iz podzemlja, jer je uglavnom manje onečišćena, pa je i isplativija od one iz riječnih tokova. Arteška voda je naziv za podzemnu vodu u vodonosnom sloju između dvaju nepropusnih slojeva ili više njih. Vodonosni sloj mora biti nagnut i barem na jednom kraju u vezi s površinom zemlje, odakle se oborinska voda cijedi u dubinu. Zato se arteška voda najčešće nalazi u sinklinalno i fleksurno građenim zemljištima, gdje je pod hidrostatskim tlakom. Ako se na tome mjestu probuši nepropusni sloj, voda će izbijati kroz cijev bušotine, jer je pod tlakom (Hrvatska enciklopedija, 2020 a). Bunar, hladenac, kladenac, studenac ili zdenac je iskopina duboka i podgrađena jama u koju se hvata ili skuplja podzemna voda. U seoskim područjima jama je iznutra ograđena kamenom ili opekam. Voda se crpi posudom (metalnom, ranije i kožnim ili drvenim vjedrom), ovješenoj o drvenu kuku ili pričvršćenom na uže. Uže može biti namotano na vodoravno položen vitao, koji se pokreće kolom; takvi su bunari zaštićeni i nadstrešnicom. Bunari su većinom na dvorištima pojedinačnih kućanstava, ali mogu biti i zajednički za zaselak ili selo; tada su i uobičajena mjesta okupljanja (Hrvatska enciklopedija, 2020 b) Javni gradski i samostanski bunari često su bogato umjetnički oblikovani. Arteški bunar je mjesto gdje podzemna voda, koja se nalazi pod tlakom, sama izbija na površinu. Kvaliteta vode ovisi o promijenjeni fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških svojstva. Prema Zakonu o vodama iz Narodnih novina (NN 56/2013) pod onečišćenjem podzemnih voda smatra se: “Onečišćenje podzemnih voda je izravno ili neizravno ispuštanje tvari ili energije u podzemne vode, rezultat čega može biti ugrožavanje ljudskog zdravlja ili opskrbe vodom, nanošenje štete živim resursima i vodnom ekosustavu ili ugrožavanje drugih zakonitih korištenja voda, odnosno ugrožavanje i negativan utjecaj na druge resurse zaštićene posebnim propisima”. Najčešći izvori onečišćenja voda su površinski vodotoci, otpadne vode naselja (kanalizacijski sustavi i/ili septičke jame), industrijske otpadne vode, odlagališta otpada (komunalni (gradski), industrijski (tehnološki), bolnički (patogeni) te poljoprivredni otpad), poljoprivreda, prometnice, nuklearni objekti, uređaji za proizvodnju, transport i distribuciju nafte (Štrkalj, 2014). Zaštita vodnih resursa jedna od najvažnijih znanstvenih i stručnih aktivnosti u svijetu. Onečišćenja podzemnih voda u pravilu su slabo vidljiva, a ponekad se uočavaju tek na eksploatacijskim objektima nakon dugo vremena. Zaštita voda u Republici Hrvatskoj se provodi već tridesetak godina, 90 % javne vodoopskrbe vezano je uz podzemne vode i stoga je zaštita podzemnih voda izuzetno važna. Površinske vode zaslužuju sličan tretman jer su povezane s podzemnim vodama (Mayer, 1993).

Materijali i metode

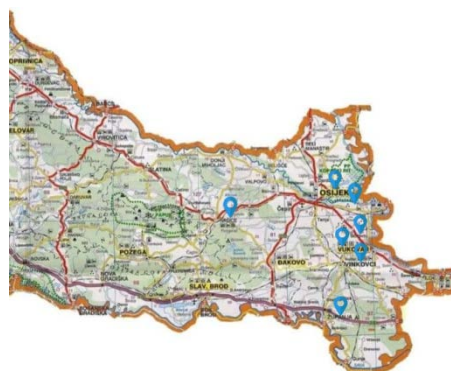
U ovom radu određene su koncentracije NH_4^+ iona, pH - vrijednosti, vrijednosti električne provodnosti, tvrdoće i mutnoće u uzorcima bunarske vode uzetih na različitim lokacijama. pH - vrijednosti i koncentracije NH_4^+ iona određeni su potenciometrijski (Pitinac, 2016). Za mjerenje električne provodnosti korištena je konduktometrijska metoda, a mutnoća je određena optičkom metodom pomoću turbidimetre. Tvrdoća bunarske vode izmjerena je TDS Metar testerom. Za mjerenje koncentracije NH_4^+ iona, pH - vrijednosti, vrijednosti električne provodnosti korišten je HQ40d, Hack multimetar i odgovarajuće sonde. Mutnoća uzoraka bunarske vode određena je turbidimetrom 2100Qis, Hack.

Uzimanje uzoraka

Uzorci vode uzeti su na sedam lokacija s područja Vukovarsko- srijemske i Osječko-baranjske županije (slika 1) u ožujku 2019 godine. Uzorci su prikupljeni iz bunara zatvorenog tipa i nalaze se na privatnim posjedima. Uzorak vode iz bunara zahvaćen je posudom koja se uobičajeno koristi. Boca za uzorak napunjena je izlivanjem vode iz kante u bocu pazeći da se ne dira grlo boce i unutarnji dio čepa (slika 2). Uzorci su dopremljeni u školski laboratorij gdje su rađena mjerenja.



Slika 1. Lokacije uzimanja uzoraka
Figure 1. Sampling locations



Slika 2. Uzimanje uzorka vode iz bunara
Figure 2. Water sampling from well

Prije samog mjerenja instrumenti su kalibrirani i pripremljeni za rad. Električna provodnost i pH - vrijednosti odredila su se na multimetru HQ40d, Hach primjenom odgovarajućih sondi (slika 3 i 4).



Slika 3. Mjerenje pH- vrijednosti
Figure 3. pH measurement



Slika 4. Mjerenje električne provodnosti
Figure 4. Measurement of electrical conductivity

Digitalnim TDS Metar Testom izmjerena je tvrdoća uzoraka vode u ppm jedinicama (slika 5). Očitane vrijednosti ppm preračunate su Nj^0 ($1 Nj^0 = 17 \text{ ppm}$). Mutnoća je mjerena na

Turbidimetru 2100 Qis, Hach. Vrijednosti mutnoće u uzorcima vode očitani su u NTU jedinicama (slika 6).



Slika 5. Mjerenje tvrdoće vode
Figure 5. Measurement of water hardness



Slika 6. Mjerenje mutnoće turbidimetrom
Figure 6. Turbidimeter turbidity measurement

Rezultati i rasprava

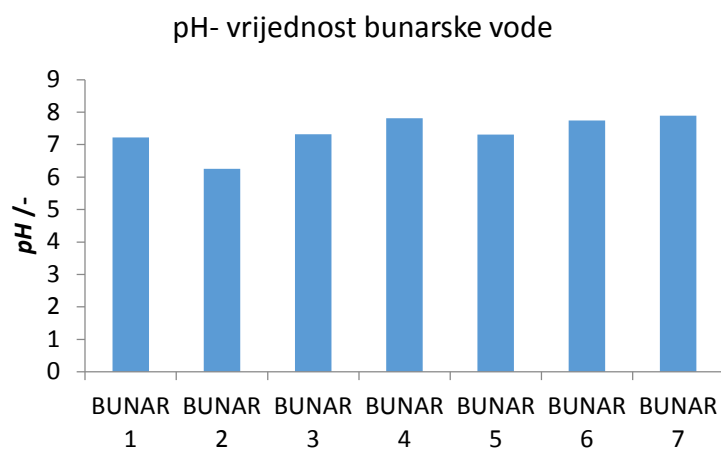
Kontrola zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju definirana je Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju iz Narodnih novina (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18, 16/20) i Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe objavljen u Narodnim novinama (NN 125/17) (tablica 1). Izmjerene pH-vrijednosti vode kreću se od 6,25 (uzorak 2) do 7,89 (uzorak 7) (slika 7). Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće preporučuje mjerenje vodljivosti uzoraka kao indikator agresivnosti. Postavljena je dopuštena granica od 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Električna provodnost pokazuje ukupnu količinu u vodi otopljenih iona. Najmanja vrijednost električne provodnosti izmjerena je u uzorku 7 i iznosi 274 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dok je najveća vrijednost izmjerena u uzorku 3 i iznosi 926 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (slika 8). Uzrok povišenim koncentracijama amonijaka može biti utjecaj kanalizacijskih voda i prirodnih gnojiva na pojedine motrene vodne objekte. Općenito je poznato da kanalizacijske vode i prirodna gnojiva imaju visoke sadržaje amonijevih iona, a tijekom razgradnje organske tvari nastaje amonijak (Canter, 1997). Koncentracija amonijevih iona je najmanja u uzorku 5 i iznosi 0,84 mg/L, dok je u uzorku 4 najveća i iznosi 21,9 mg/L (slika 9). Mutnoća vode posljedica je prisutnosti suspendiranih tvari u vodi u ispitivanim uzorcima kreće se od 0,39 NTU, uzorak 7 do 7,19 NTU, uzorak 3 (slika 10). Tvrdoća vode se kreće u rasponu od 11,59 Nj^0 do 40,65 Nj^0 (slika 11).

Tablica 1. Obavezni parametri ispitivanja u monitoringu voda za ljudsku potrošnju (NN 125/17)

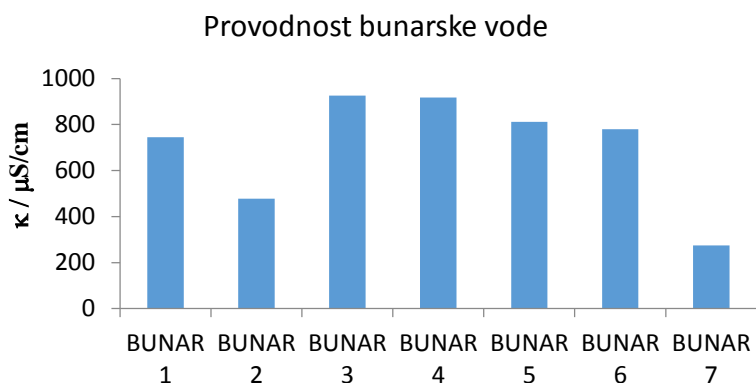
Table 1. Mandatory test parameters in water monitoring for human consumption (NN 125/17)

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki pokazatelji	MDK vrijednost*	Mjerna jedinica
Boja	20	PtCo skale
Mutnoća	4	NTU
Okus	bez	-
Miris	bez	-
pH - vrijednost	6,5-9,5	pH jedinica
Vodljivost	2500	$\mu\text{S}/\text{cm}/20\text{ }^\circ\text{C}$
Amonij	0,50	mgNH_4^+/L
Nitriti	0,50	mgNO_2^-/L
Klorit, klorat	400	$\mu\text{g}/\text{L}$
Temperatura	25	$^\circ\text{C}$
Aluminij	200	$\mu\text{g}/\text{L}$
Željezo	200	$\mu\text{g}/\text{L}$
Arsen	10	$\mu\text{g}/\text{L}$
Mangan	50,0	$\mu\text{g}/\text{L}$
<i>Escherichia coli</i>	0	broj/100mL
Ukupni koliformi	0	broj/100mL
Enterokoki	0	broj/100mL
Broj kolonija 22 $^\circ\text{C}$	100	broj/1mL
Broj kolonija 36 $^\circ\text{C}$	100	broj/1mL
<i>Clostridium perfringens</i> (uključujući spore)	0	broj/100mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	broj/100mL

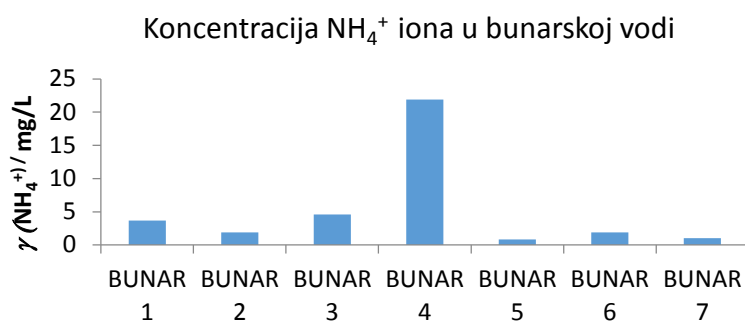
*MDK Maksimalno dozvoljena količina prema pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće



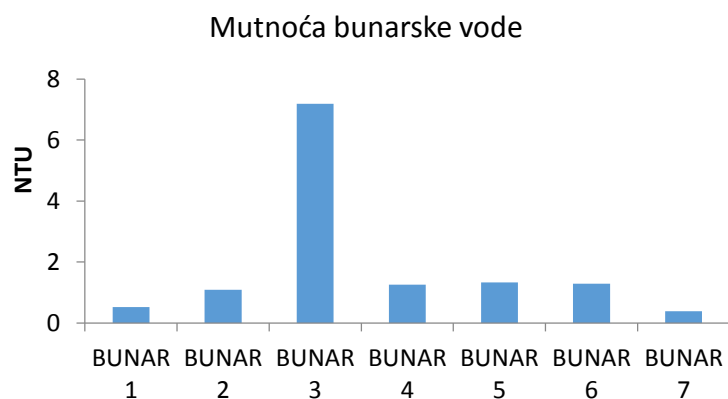
Slika 7. Grafički prikaz pH- vrijednosti uzoraka vode
Figure 7. Graphic representation of the pH value of water samples



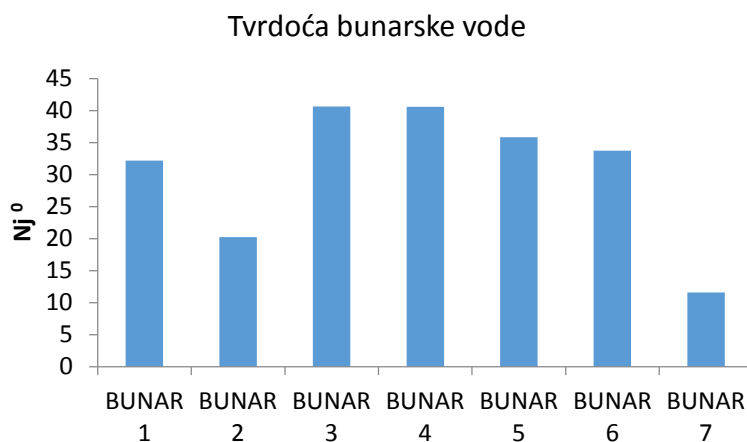
Slika 8. Grafički prikaz električne provodnosti uzoraka vode
Figure 8. Graphical representation of the electrical conductivity of water samples



Slika 9. Grafički prikaz koncentracije amonijevih iona u uzorcima vode
Figure 9. Graphical representation of the concentration of ammonium ions in water samples



Slika 10. Grafički prikaz mutnoće u uzorcima vode
Figure 10. Graphic representation of turbidity in water samples



Slika 11. Grafički prikaz tvrdoće vode
Figure 11. Graphic representation of water hardness

Zaključci

Bunari se često nalaze u blizini stambenih zgrada, poljoprivrednih zemljišta, septičkih jama, industrijskih objekata ili sličnih izvora onečišćenja te često sadrže opasne količine mikroorganizama, nitrita i nitrata, pesticida, teških metala i drugih nečistoća. Uspoređujući rezultate mjerenja možemo zaključiti da su bunarske vode blago lužnate, specifična električna provodnost je veća što je slučaj kod prerađene pitke vode. Koncentracija amonijevih iona je u svim ispitivanim uzorcima iznad maksimalno dozvoljene granice od 0,5 mg/L. Mutnoća je ispod maksimalne dozvoljene granice 4 NTU što ukazuje na malu količinu suspendiranih tvari. Bunarske vode su tvrde do vrlo tvrde. Prije izgradnje javnih vodoopskrbnih sustava bunari su bili glavni izvor pitke vode u naseljima i značili su život. Danas su bunari spomenici pitke vode i ukras dvorišta, a poneki se još koristi za pranje ili zalijevanje vrtova.

Literatura

- Dadić, Ž. (2011): Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj, Zagreb.
- Ivoš, Š. (1953): O vodi i njenome značaju za život, zdravlje i produkciju, *Mljekarstvo*, 3(11) 261-263.
- Kralj, E. (2017): Pokazatelji i indeksi kakvoće podzemnih i površinskih voda istočne Hrvatske, disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, str. 70-82.
- Mayer, D. (1993): Kvaliteta i zaštita podzemnih voda, Hrvatsko društvo za zaštitu voda i mora, Zagreb, str. 50-60.
- Pitinac, N., Pecikozić, Đ. (2016): Priručnik za instrumentalne metode ispitivanja sastavnica okoliša u strukovnim školama, Osijek, str. 41- 47, 76-78.
- Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe NN 125/2017.

Rupčić- Petelinc, S., Weihnacht, Z. (2005): Praktikum iz fizikalne kemije za srednje strukovne škole, Školska knjiga, Zagreb, str. 102- 103.

Štrkalj, A (2014): Onečišćenje i zaštita voda, Metalurški fakultet, Sisak, str. 7.

Zakon o vodi za ljudsku potrošnju, NN 56/2013.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju, NN 64/2015.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju, NN 104/2017.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona za ljudsku potrošnju, NN 115/2018.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju, NN 16/2020.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020 a.

URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=10158> (Pristupljeno 5. 6. 2020.).

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020 b.

URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=4052> (Pristupljeno 5. 6. 2020.).

Sampling and analysis of well waters

Kristina Nikolić, Đurđevka Pecikozić

Technical School Nikola Tesla Vukovar, Blage Zadre 4, 32010 Vukovar, Croatia

**Corresponding author: djurdjevka.pecikozic@yahoo.com*

Summary

Water has always had an important place in the daily life of man. Wells are excavations or wells created in the ground by digging, drilling or drilling to access groundwater or releases. Groundwater quality depends on natural characteristics as well as anthropogenic influences. Prior to the construction of public water supply systems, wells were the main source of drinking water in settlements and meant life. Today, the well is a monument of drinking water and a decoration of the yard, and some are still used for washing or watering gardens. The aim of this paper is to measure the pH value, electrical conductivity, NH_4^+ ion concentration, turbidity and total hardness of water samples from wells in Vukovar-Srijem and Osijek-Baranja counties. Measurements were performed with a multimeter HQ40d, Hack using appropriate probes, turbidimeter 2100Qis, Hack and digital TDS Meter tester. The results of measurement hardness show that the well waters are hard to very hard. The specific electrical conductivity is higher than in the case of treated drinking water, the turbidity is below the maximum permissible limit of 4 NTU (NN 125/2013), and the concentration of ammonium ions in all tested samples is above the maximum permissible limit of 0.5 mg/L (NN 125/2013).

Keywords: wells, groundwater, water circulation, pollution

8

KAZALO AUTORA *AUTHOR INDEX*



A

Amidžić Klarić, Daniela, 141
Andrašec, Fran, 197, 206

B

Blažić, Roko, 1
Barbaro, Tea, 83
Bilušković, Andrea, 266
Bolanča, Tomislav, 214
Brnardić, Ivan, 207
Bule, Kristina, 214
Bušić, Valentina, 141

C

Crnić, Irena, 157
Cvetnić, Matija, 214

Č

Čeru, Teja, 257
Čošić, Zrinka, 104

D

Dias, Rolando C. S., 11
Dragičević, Petar, 157, 167
Dragović-Uzelac, Verica, 157
Dujmić, Filip, 104
Duplančić, Marina, 19

Đ

Đikić, Domagoj, 157, 167

E

Ergović Ravančić, Maja, 116

F

Frančić, Tajana, 157

G

Gaberšek, Martin, 257
Ganjto, Marin, 248
Gilja, Vanja, 19
Gomes, Catarina, 11
Gosar, Mateja, 257
Grba, Darko, 186

Grgas, Dijana, 197, 228
Grlić, Nikolina, 276

H

Habuda-Stanić, Mirna, 197, 228
Holjevac Grgurić, Tamara, 207
Husnjak, Bruno, 141

I

Ištuk, Jozo, 94
Ivanušić, Sanja, 248

J

Jajčinović, Igor, 207
Jakić, Miće, 33
Jakobek, Lidija, 94
Jokić, Stela, 125, 132
Jozinović, Katarina, 46
Jozinović, Sandra, 288
Jukić, Matea, 276
Jukić, Slavica, 288
Jurić, Zoran, 288

K

Karnaš, Maja, 178
Klarić, Ilija, 141
Komes, Draženka, 125, 132
Kosar, Vanja, 60
Koštić, Ante, 60
Kovačević, Antonija, 214
Kučić Grgić, Dajana, 214, 235

L

Landeka Dragičević, Tibela, 197, 228
Landeka Jurčević, Irena, 157, 167
Levaj, Branka, 104
Lovrinčić, Ema, 214
Lukić, Marija, 60, 73
Lukšić, Don Vito, 207

LJ

Ljubas, Ana, 104

M

Mandura, Ana, 125, 132

Marčetić, Helena, 116

Markić, Marinko, 214

Masand, Vijay H., 178

Mesić, Josip, 116, 149

Mikac, Ivan, 228

Miler, Miloš, 257

Miloloža, Martina, 214, 235

Mitar, Anamarija, 83

Mrčela, Filipa, 11

Mrgan, Ana, 149

N

Nikolić, Kristina, 296

Nuić, Ivona, 257

O

Očelić Bulatović, Vesna, 214, 235

Obradović, Valentina, 116, 149

P

Pecikozić, Đurđevka, 266, 296

Pelaić, Zdenka, 104

Perinović Jozić, Sanja, 33

Petravić Tominac, Vlatka, 141

Pranjić, Ivona, 288

Pravdić, Nikolina, 276

Prevarić, Viktorija, 214

Prlić Kardum, Jasna, 83

Prnjak, Petra, 257

R

Radman, Sanja, 228

Rastija, Vesna, 178

Repajić, Maja, 104

Rogošić, Marko, S-93

Roje, Vibor, 186

S

Sander, Aleksandra, 46

Sigurnjak Bureš, Marija, 214

Slatina, Tina, 33

Smoljko, Ivana, 11

Storić, Mihaela, 33

Strelec, Ivica, 94

Svitlica, Brankica, 116

Š

Šabić Runjavec, Monika, 248

Šeremet, Danijela, 125, 132

Škrabal, Svjetlana, 116

Štefanac, Tea, 228

Šubarić, Domagoj, 178

T

Tolić, Kristina, 207

Tolić, Mandica-Tamara, 167

Tomašić, Vesna, 19

Tomas, Marko, 276

Trgo, Marina, 257

U

Ugrina, Marin, 257

Ukić, Šime, 214

V

Velić, Darko, 141

Velić, Natalija, 141

Vidović, Elvira, 1

Vlašić, Luka, S-93

Vojvodić Cebin, Aleksandra, 125, 132

Vrbanec, Gordana, 46

Vrsaljko, Domagoj, 73

Vučinić, Valentina, 167

Vuković Domanovac, Marija, 248

Z

Zelić, Ivana Elizabeta, 19

Zrinščak, Stanko, 149

Zagajski Kučan, Kristina, S-93

9

SPONZORI, DONATORI I IZLAGAČI *SPONSORS, DONORS, AND EXHIBITORS*



Zlatni sponzori | Gold Sponsors



Srebrni sponzor | Silver Sponsor



Brončani sponzori | Bronze Sponsors



Sponzori, donatori, izlagači | Sponsors, Donors, Exhibitors



Excellence in Routine and Science

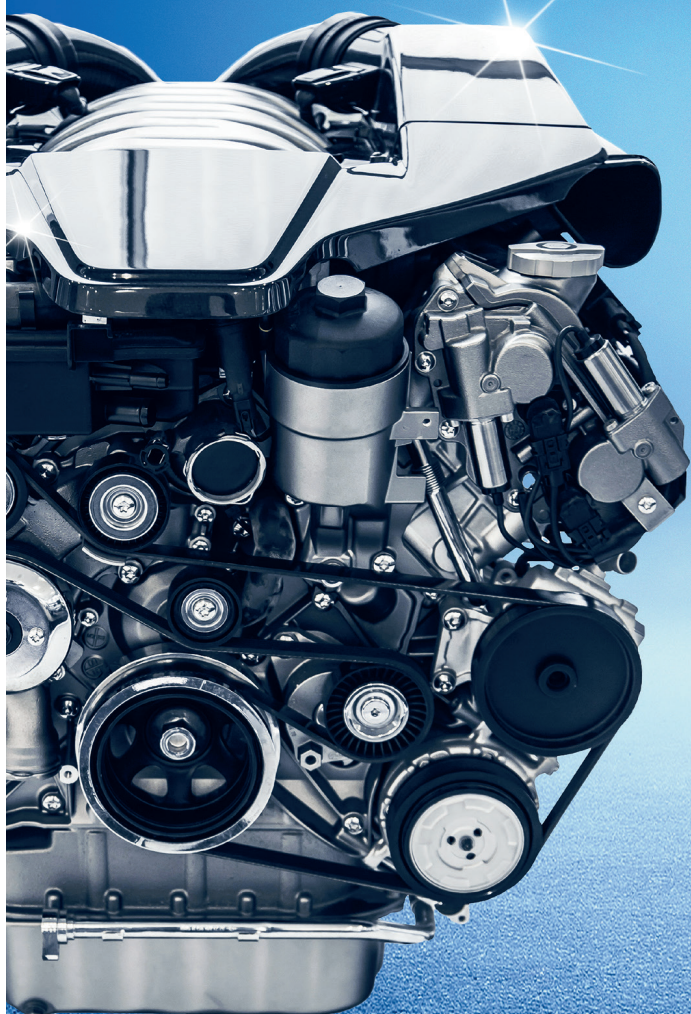


Zlatni sponzori | *Gold sponsors*



ČISTA SNAGA

INA CLASS PLUS GORIVA




Class Plus goriva čiste naslage, povećavaju snagu i trajnost motora

Svaka kap INA Class Plus goriva sadrži godine istraživanja i usavršavanja formule beskompromisne kvalitete. Class Plus goriva čiste naslage, smanjuju trenje i pomažu spriječiti koroziju osiguravajući optimalan rad i povećanu snagu vašeg motora. Jedinstvene karakteristike naše formule produžuju vijek trajanja motora pružajući vam sigurniju i bezbrižniju vožnju. To je čista snaga Class Plus goriva. Putuj sigurno s Inom! **INA, dokazano najbolja.**

INA

#DRŽIRAZMAK



Već generacijama
znanje vraćamo
zajednici.



TEVA

PLIVA

Srebrni sponzori | *Silver sponsors*



Xellia Pharmaceuticals is a specialty pharmaceutical company focused on providing important anti-infective treatments against serious and often life-threatening infections. Our anti-infective treatments are generics that combat serious bacterial and antibiotic resistant infections as well as certain fungal diseases. We are a world leader in the development, manufacturing and supply of fermented anti-infectives sold as active pharmaceutical ingredients and finished dosage forms to key pharmaceutical industry companies. Headquartered in Copenhagen, Denmark and owned by Novo Holdings A/S, Xellia Pharmaceuticals has more than 1500 employees globally. From state-of-the-art manufacturing sites in the U.S., China, Denmark and Hungary to R&D sites in Norway and Croatia; Xellia Pharmaceuticals excels within innovative product development to deliver high quality products to its customers.

Our product portfolio of anti-bacterial and anti-fungal products used for the treatment of severe infections, including infections caused by multi-resistant bacteria and fungi, is the foundation for our growth strategy within the antibiotics sector. Xellia is the leading supplier of important anti-infectives Vancomycin and Colistimethate Sodium (CMS). Our success and strong market position is built on more than 100 years experience in the pharmaceutical industry. Xellia Pharmaceuticals' focus its R&D investments within inhalable and injectable product technologies as we are committed to researching solutions, which not only improve patients' quality of life, but will also save lives. Based on our long-term expertise, we bring value for our stakeholders and signify a patient-centric mindset through an embedded corporate motivation of integrating science and innovation to save lives.



xellia.com



xellia
PHARMACEUTICALS

www.xellia.com

ROBUST & RELIABLE INSTRUMENTS FOR ALL ANALYSES

MASS SPECTROMETERS

PERFORM ANALYSIS WITH UNPARALLELED THROUGHPUT

- Equipped with Shimadzu`s UFMS™ patented technology
- Increase specificity using the Library Screening MRM Spectrum mode
- Reduce instrument maintenance with excellent robustness
- Versatile configurations to fit your specific analysis
- Suitable for various agricultural and food contaminants analyses



MultiNA Microchip Electrophoresis System



- Automated microfluidic device
- Wide range of amplicon detection (food allergens, pathogens, etc.)
- Higher sample throughput compared to conventional gel electrophoresis
- Compatible with 96-well PCR plates

CHROMATOGRAPHS

LIQUID CHROMATOGRAPHS
SIMPLIFY YOUR STARTUP

- Quick method setup for your specific applications
- Reduce method development cost



GAS CHROMATOGRAPHS
FLEXIBLE CONFIGURATION

- (Carrier gas save) mode reduces operation costs
- Tool-free routine maintenance



NEXERA UC
SUPERCRITICAL FLUID BASED TECHNOLOGY

- Suitable for both polar and non-polar samples
- Fully automated online sample preparation and analysis



AXIMA Series MALDI-TOF MS

- Bacterial characterization with high discriminatory capacity
- Automated microbial identification with high accuracy



SPECTROSCOPIES

- Routine toxic metal and foreign substance analysis



EDX



FTIR



UV-VIS



ICP

ANALYTICAL BALANCES

SHORT RESPONSE TIME

- Accurate trace measurement with UniBloc Technology





Tetra Pak je jedna od vodećih svjetskih kompanija za rješenja za preradu i pakiranje hrane. U suradnji s našim kupcima i dobavljačima pružamo sigurne, inovativne i ekološki prihvatljive proizvode koji svakodnevno zadovoljavaju potrebe stotine milijuna ljudi u više od 160 zemalja svijeta. S više od 25.000 zaposlenika diljem svijeta vjerujemo u društveno odgovorno vodstvo u industriji te održiv pristup poslovanju. Naš moto „ŠTITI ŠTO JE DOBRO™” odražava našu viziju da učinimo prehrambene proizvode sigurnima i dostupnima, svugdje.

Potrošači diljem svijeta svakodnevno konzumiraju milijarde litara vode, mlijeka, soka i druge tekuće hrane. Tvrtka Tetra Pak razvila je asortiman pakiranja kako bismo zaštitili i nutritivnu vrijednost i okus proizvoda unutar pakiranja. Zahvaljujući tehnologiji tvrtke Tetra Pak pakiranje i distribucija tekućih i prehrambenih proizvoda potrošačima znatno je olakšana.

Usto, Tetra Pak pruža integrirana rješenja za procesiranje, pakiranje i distribuciju na području proizvodnje hrane te nudimo strojeve za pakiranje za različite opcije pakiranja. Iz naše mreže proizvodnih pogona, također isporučujemo ambalažni materijal za više od 8.800 strojeva za pakiranje diljem svijeta.

Više informacija o Tetra Paku dostupno je na <http://tetrapak.com/hr>.





Brončani sponzori | Bronze sponsors

Karolina d.o.o. članica Kraš grupe

Karolina je počela s proizvodnjom još davne 1909. godine kada je Stjepan Piller kupio mlin za proizvodnju brašna 'Slavonija' i promijenio mu ime u Dragica mlin ili njemački Karolina Mühle.

Bogato dugogodišnje iskustvo i tradicija u proizvodnji dovelo je do stvaranja najpoznatijih Karolininih brandova Jadro i Moto. Već od 1962. godine proizvodi se vafel **Jadro** koji je svojom kvalitetom i okusom do današnjih dana stekao velik broj vjernih potrošača, a svojom jedinstvenom kombinacijom dvaju okusa – mlijeka i najfinijeg kakaa u zagrljaju hrskavog vafela bio i ostao pravi doživljaj za ljubitelje poslastica. Osim toga znak «Hrvatske kvalitete», čiji je nositelj, daje kupcu jamstvo da se radi o proizvodima koji predstavljaju sam vrh svjetske ponude u svojoj klasi.

Moto punjeno čajno pecivo prisutno je na tržištu regije od 1972., a poznato je osim po kvaliteti i po obliku: cvijet s rupicom u sredini, punjen bogatom kremom. U raznim okusima prihvaćen je od potrošača kao domaći proizvod vrhunske kvalitete i u segmentu punjenih čajnih peciva drži leadersku poziciju već dugi niz godina.

U dugoj povijesti tvrtka je promijenila vlasništvo nekoliko puta, pa tako i imena: Karolina, Sloboda, Lura-keksi, opet Karolina (kao članica Lorenz Bahlsen grupe) i konačno je danas članica Kraš grupe.

Zagrebački Kraš, koji je u ožujku 2011. godine preuzeo Tvornicu keksa i vafela Karolina, uložio je značajna sredstva u proširenje proizvodnih kapaciteta, te omogućio i otvaranje novih radnih mjesta. Nastavljajući tradiciju i slijedeći postojeće vrijednosti Karolina je započela s novim razvojnim ciklusom koji je upotpunjen iskustvima najvećeg konditorskog proizvođača u regiji – Kraša. Integracijom Karoline u Kraš grupu ostvaren je dio vizije gdje Osijek postaje najjači centar za proizvodnju ravnih vafela u regiji. Danas Karolina proizvodi na ukupno 12 proizvodnih linija i zapošljava oko 350 radnika, a rekordnu proizvodnju poslijeratnog razdoblja od 9.200 tona dostigla je 2019. godine. Suvremena tehnologija, recepture, tradicija, inovativnost i kvaliteta proizvoda osnovni su temelji razvoja i proizvodnje proizvoda u Karolini i Krašu – to je jamstvo egzistencije i prosperiteta na hrvatskom, ali i širenje na još neosvojena tržišta.



KEFO[®]
SINCE 1949



Sve za vaš
laboratorij
na jednom mjestu





Sponzori, donatori, izlagači | Sponsors, donors, exhibitors



AGROPROTEINKA

Do zdravlja u suradnji s okolišem

Agroproteinka je moderna hrvatska tvrtka i lider u ekološkom zbrinjavanju nusproizvoda životinjskog podrijetla i biorazgradivog otpada. U tri odvojena pogona zbrinjava nusproizvode životinjskog podrijetla i biorazgradivi otpad. Agroproteinka iz izdvojenih životinjskih nusproizvoda i otpada naše svakodnevice, stvara nove proizvode i nove vrijednosti. Kao tvrtka s nekoliko desetljeća iskustva u svojoj djelatnosti, ima snažnu tradiciju usmjerenosti na zdravlje ljudi, životinja i okoliša. Skupljanjem nusproizvoda sprječava njihovo gomilanje u okolišu, te njihovom preradom, načinom kružnog gospodarstva, prenamjenjuje nusproizvode za daljnje korištenje. U brizi za životno okruženje Agroproteinka se ne zaustavlja i pokreće nova ulaganja i modernizaciju. U skladu s orijentacijom prema održivom poslovanju, Agroproteinka, upravo ulagačkim kontinuitetom u modernizaciji vlastitih pogona opremljenih suvremenim biofiltrima i uređajima za pročišćivanje voda, doseže i visoku razinu etičke odgovornosti za okruženje u kojem djeluje.

Odgovorni član zajednice

Svoju javnu odgovornost prenosi i na druge razine i ciljne skupine javnosti i društva. Čini to, suradnjom s institucionalnom akademskom zajednicom. Širokom edukacijom i pozitivnim primjerima, prenosi znanja i poslovne standarde na širu zajednicu. Kao odgovorni član zajednice u kojoj djeluje, u Agroproteinki postoji puna svijest da društvena odgovornost ne završava samo na zaštiti zdravlja ljudi i okoliša. Svojim ukupnim poslovnim aktivnostima, otvorenošću prema okruženju, putem edukacije, raznih vrsta potpore, sudjeluje u poticanju aktivnijeg, ugodnijeg i uspješnijeg društva. Poticanjem i uključivanjem u različite ekološke akcije, stvara i njeguje novu kulturu i spoznaju o vrijednosti očuvanja prirode kao temeljnog preduvjeta opstanka života. To je najbolji i najuvjerljiviji način vraćanja prirodi i okolišu ono što od njih i dobiva. I konačno, potvrđuje da priroda svoju cjelovitost, i svoje zdravlje može vratiti i sačuvati samo ako s njom surađuje. U tom smislu Agroproteinka ne ostaje na deklariranju odgovornog poslovanje, već i odgovornog življenja. Time pokazuje da živi sa svojim okruženjem. Pokazuje, najživotnije, i brigu za budućnost sredine u kojoj i sama ostvaruje svoju misiju.



Liquid Chromatography | Gas Chromatography | Mass Spectrometry – Q, QQQ, Q-TOF | Atomic spectroscopy – AAS, ICP-OES, MP-AES, ICP-MS, ICP-MSMS | Molecular spectroscopy – FTIR, UV/Vis/NIR, Fluorescence, FTIR imaging | Stable isotope analyzers and gas quantification | Dissolution | Consumables and supplies | Laboratory chemicals | Life science – PCR, Microarray, electrophoresis, microplate readers, Hi-content imaging | Education/training programs | Service & support | Partner company ASOLUTIC – lab water, microwave technology & mercury analyzers, TOC/TN flow analysis, thermal analysis, autoclaves, climate chambers, laboratory equipment & furniture etc.



Authorized
Distributor

Honeywell

Authorized Distributor



Asolutic

a member of AlphaChrom Group

www.asolutic.hr

AlphaChrom d.o.o.

Karlovačka cesta 24, Blato HR-10000 Zagreb, Croatia
t: 01 550 2200 | f: 01 550 2299 | e: prodaja@alphachrom.hr
www.alphachrom.hr | eshop.alphachrom.hr

stručnost na SVAKOM KORAKU

u oblikovanju znanstvenih i tehnoloških
rješenja u svim područjima prirodnih
znanosti – odjel Life Science

Supelco.
Trusted Analytical
Products

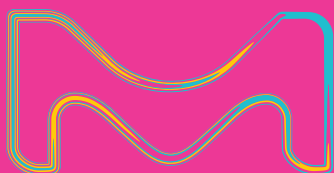
Milli-Q.
Pioneering Lab
Water Solutions

Sigma-Aldrich.
Lab & Production Materials

BioReliance.
Expert Pharma & Biopharma
Manufacturing & Testing Services

SAFC.
Tailored Pharma & Biopharma
Raw Material Solutions

Millipore.
Proven Preparation,
Separation, Filtration
& Monitoring Products



Merck je ujedinio vodeće svjetske brendove laboratorijskih i procesnih rješenja. S kojim se god problemom susreli u područjima prirodnih znanosti, Merck Vam može pomoći stručnim proizvodima i servisima.

Da bi saznali kako, posjetite našu e-platформу
SigmaAldrich.com/advancinglifescience

Za više informacija možete se i obratiti na:
Željka Vrbanić, Viši stručnjak za prodaju, Merck LS,
Hrvatska
e-mail: zeljka.vrbanic@merckgroup.com

#howwesolve

Merck Life science u SAD-u i Kanadi radi pod nazivom MilliporeSigma.

Merck, vibrant M, Milli-Q, Millipore, SAFC, BioReliance, Supelco i Sigma-Aldrich su zaštićeni znakovi Merck-a KGaA, Darmstadt, Njemačka ili njegovih podružnica. Svi ostali zaštitni znakovi pripadaju njihovim vlasnicima. Detaljnijim informacijama o zaštićenim znakovima može se pristupiti na javno dostupnim izvorima.

© 2019 Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka i/ili njegove podružnice. Sva prava pridržana.

MERCK



Osnovni mali laboratorijski uređaji

Analitičke i precizne vage,
vlagomjeri



Sustavi za ultra čistu vodu

Pipete, nastavci,
automatizirani pipetori,
priprema uzoraka



Liofilizatori, perilice,
koncentratori, glove box

i mnogi drugi...



kemolab.hr



+385 1 660 5233



Nadinska 11, 10000 Zagreb



IZDAVAČI | PUBLISHERS

Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa
Croatian Society of Chemical Engineers

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Faculty of Food Tehnology Osijek

Zagreb i Osijek, 2021.