



Två-fas extraktion av polyfenoler från blåbär

Two-phase extraction of polyphenols out of bilberry

Simon Vikström

**Arbetsrapport 10 2017
Examensarbete 30hp A2E
Jägmästarprogrammet**

**Handledare:
Josefina Nyström**

Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för skogens biomaterial och teknologi
S-901 83 UMEÅ

www.slu.se/sbt

Tfn: 090-786 81 00

Rapport från Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi



Interreg
Botnia-Atlantica
Euroopan aluekehitysrahasto



Österbottens förbund
Pohjanmaan liitto



Länstyrelsen
Västerbotten

Två-fas extraktion av polyfenoler från blåbär

Two-phase extraction of polyphenols out of bilberry

Simon Vikström

Nyckelord: Blåbär, Polyfenol, Antocyanin, Två-fas Extraktion, RBR, Natriumfosfat, Ammoniumsulfat

Arbetsrapport 10 2017

Jägmästarprogrammet

EX0772, A2E

Examensarbete i skogshushållning vid Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi, 30hp

Handledare: Josefina Nyström, SLU, Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Examinator: Mehrdad Ashadi, SLU, Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Sveriges lantbruksuniversitet

Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Utgivningsort: Umeå

Utgivningsår: 2017

Rapport från Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Förord

Denna studie är ett examensarbete motsvarande 30 hp som har utförts vid institutionen för skogens biomaterial och teknologi, SLU i Umeå.

Jag vill först och främst rikta ett stort tack till min handledare, Josefina Nyström på SLU, för ditt engagemang och handledning genom arbetets gång. Jag vill även tacka min biträdande handledare Torgny Mossing för att du tagit dig tid och haft konstruktiva synpunkter på arbetet. Jag vill även passa på att tacka Paul Geladi för givande föreläsningar och instruktioner under arbetets gång.

Jag vill även rikta ett särskilt tack till Ubbie Östman och Carina Jonsson som har på ett hjälpsamt och tålmodigt vis stöttat och instruerat mig i labbet. Utan era värdefulla vägledning i labbets värld hade detta arbete pågått fortfarande.

Simon Vikström, februari 2017, Umeå

Sammanfattning

I de svenska skogarna produceras det varje år ca 250 000 ton blåbär och av det tillvaratas endast ca 7 %. Blåbär innehåller höga halter av antocyanin vilket är väldigt attraktivt på hälsokostmarknaden. I och med att en stor del av det som plockas exporteras så går vi miste om potentiella intäkter som förädlingen av blåbär kunde ge oss.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka effekterna av olika extraktionsbetingelser och kunna bestämma det optimala förhållandet mellan de olika faktorerna för att kunna extrahera ut maximalt med fenoler. Försöket utfördes genom en två-fas extraktion med hjälp av en RBR (Rotating Bed Reactor). Faktorerna som testades var temperatur och TS-halt, dessutom utfördes försöket med två olika saltlösningar, Natrium-väte-fosfat di-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) och Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Proverna mättes med UV/vis-spektroskopi och NIR-spektroskopi för att fenolkoncentration kunde bestämmas. För de statistiska analyserna användes mjukprogramvarorna Modde och Evince.

Resultaten från försöket visade att Salt B, Ammoniumsulfat, var mest effektivast och mest stabilt. Natrium väte-fosfat di-hydrat (Salt A) gav sämre utbyte och var mer ostabilt, vilket gjorde resultaten mer svårtolkade. Av faktorerna var det främst TS-halten som påverkade resultatet, där utbytet blev högre ju högre TS-halt. Temperaturen hade ingen signifikant påverkan för Salt A och en viss påverkan för Salt B. Utbytet blev högre ju längre extraktionstid men tidseffektsskillnaden var mindre än vad jag förväntade mig.

Nyckelord: Blåbär, Polyfenol, Antocyanin, Två-fas Extraktion, RBR, Natriumfosfat, Ammoniumsulfat

Abstract

The Swedish forest annually produce 250 000 ton bilberry and of this 250 million only 7 % is used. Bilberries contain high levels of anthocyanin, which is very attractive in the health food market. The fact that a large part of the bilberries from the Swedish forest is exported, we get a loss of potential revenue that the processing of bilberries could give us.

The purpose of this study was to investigate the effects of different extraction factors and to determine the optimal ratio between the different factors in order to extract the maximum amount of phenols. The experiment was made in a two-phase extraction by using RBR (Rotating Bed Reactor). The factors who was tested were temperature and dry solids content, additionally the experiment was conducted with two different salt-solutions, Salt A (Sodium hydrogen phosphate dihydrate) and Salt B (Ammonium sulfate). The samples were analyzed both by UV/vis spectroscopy and NIR spectroscopy to the phenol-concentration could be determined. For the statistical analyzes is the software program Modde version 10.1 and Evince version 2.7.5 used.

The result of the study indicated that the salt, Ammonium sulfate was most effective and most stable. Sodium hydrogen phosphate dihydrate gave less concentration of phenols and were more unstable, which made the results more difficult to interpret. Of the factors it was mainly dry solids content which affected the result. The temperature had no significant effect on Salt A and a certain influence of Salt B. The phenol-concentration was higher the longer extraction time but the different was less than expected.

Keywords: Bilberry, Polyphenol, Anthocyanin, Two-phase extraction, RBR, Sodiumphosphate, Ammonium sulfate

Innehållsförteckning

Introduktion.....	6
Bakgrund.....	6
Antocyaniner.....	6
Marknad.....	7
Två-fas extraktion(ATPE).....	7
Mål och syfte.....	8
Avgränsningar.....	8
Material och metoder.....	9
Provberedning.....	9
Två-fas extraktionen.....	9
Standardkurva.....	10
Gallsyra-lösning.....	10
Natriumkarbonat-lösning.....	10
Beredning av kalibreringskurvan.....	10
Kemikalier.....	10
Design.....	10
Analyser.....	11
UV/vis-spektroskopi.....	12
NIR – Nära infraröd spektroskopi.....	12
Resultat.....	13
Diskussion.....	24
Referenser.....	26

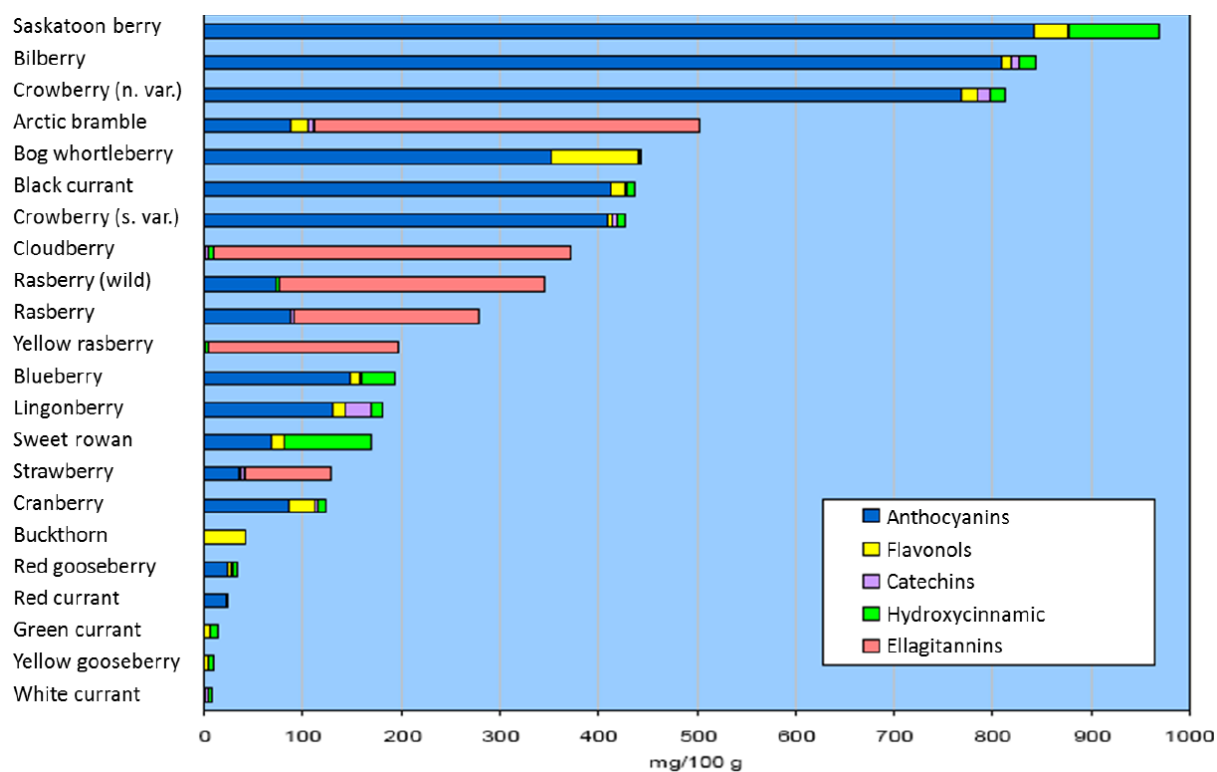
Introduktion

Bakgrund

Blåbär (*Vaccinium myrtillus* L.) är ett flerårigt lågväxande ris som återfinns i norra Europa men förekommer även i delar av Nordamerika och Asien. En stor del av Sveriges yta är täckt av blåbärsris, så mycket som 17 %. Det gör Blåbär till en av Sveriges vanligaste växter. Sverige är en av de största producenterna av vilda bär och varje år produceras ca 250 miljoner kg blåbär i dom svenska skogarna, varav endast 7 % tas tillvara (Berglöf, 2008). Våra Nordiska skogsbär är attraktiva på världsmarknaden, inte bara som bär men även som råmaterial för produktion av näringstillskott, kosmetika och hälsoprodukter. Med en ökning av förädlingsgraden med hjälp av ny teknik och innovationer så finns det stora ekonomiska värden inom detta att tillvarata.

Antocyaniner

Blåbär är en av de naturligt rikaste källorna till antocyanin. Antocyanin är en polyfenol som ger blå, röda och violetta färger åt många växter och frukter (Patras, 2010). Blåbär innehåller höga halter av antioxidanter. De viktigaste gruppen antioxidanterna i blåbär är flavonoider. En undergrupp av flavonoider är antocyaniner och blåbär har ett högt innehav av antocyaniner jämfört med andra bär, ca 90 % av alla flavonoider i blåbär är antocyaniner. Se figur 1.



Figur 1. Fenolinnehåll i olika bär (Riihinen, 2005).

Figure 1. Phenolic content of different berries (Riihinen, 2005)

Det finns 5 olika basstrukturer av antocyanin i blåbär, dessa är cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin och petunidin. Cyanidin och delphinidin är de vanligaste i blåbär (Berglöf, 2008). Högst koncentration av antocyanin i blåbär återfinns i epidermala celler, vilket till stor del är skalet på blåbäret och skador på skalet i samband med plockning minskar antocyaninhalten (Prior, et al., 1998) (Upton, 2001). Antocyaninhalten varierar även mellan olika arter men beror också på miljörelaterade faktorer som temperatur, solstrålning, regnmängd, växtplats och plockningstidpunkt (Lillhonga, et al., 2015) (Upton, 2001) Presskakan från blåbär som är en biprodukt från juice och syltproduktionen innehåller till stor del skal och frön från blåbäret som är en stor källa för extraktion av antocyanin, vilket senare kan vidareförädlas till produkter inom hälsovårdsindustrin.

Tidigare studier har visats att den totala halten av antocyaniner i färska blåbär är mellan 550-850 mg/100g (Määttä-Riihinen, et al., 2004). En annan studie visar att polyfenoler effektivt kan extraheras ur en presskaka från industriell bearbetning enbart med hett vatten. Studien visade att utbytet vid extraktion av antocyaniner blir högre med ökad temperatur och extraktionstid upp till en viss brytpunkt (Aaby, et al., 2013). Studier har även visats att antocyanin stabiliteten påverkas av lagringstemperatur och att halveringstiden blir kortare ju högre temperatur materialet förvaras i (Hellström, 2010).

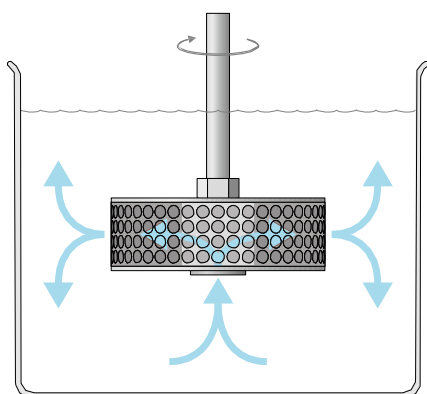
Antocyaniner anses vara främjande för människors hälsa på grund av dess förmåga att minska risken för sjukdomsutveckling eller hjälpa till vid behandling av cancer, hjärt- och kärlsjukdomar, fetma, diabetes, åldersrelaterade sjukdomar, urinvägsinfektioner och tandlossning (Su, 2012). Förutom antocyaninets hälsofördelar så är blåbär även en viktig källa till färgämnen i livsmedel och till farmaceutiska substanser (Wu, et al., 2011).

Marknad

Idag finns det en stor marknad för blåbärsextrakt och efterfrågan har ökat på grund av blåbärens positiva hälsoegenskaper. Till Sverige kommer varje år ett stort antal bärplockare som anställs och säljer bären till uppköpare eller grossister som rensar, sorterar och fryser bären som sedan går till export till andra länder då främst till Asien. Ca 80 % av de vilda bär som plockas kommersiellt i Sverige exporteras (Öberg, 2013). Varje år mognar ca 250 000 ton blåbär i de svenska skogarna och ur varje ton blåbär går det att utvinna blåbärsextrakt för ca 60 000 kr (Andersson, 2010). Varje år produceras ca 150-200 ton pulver från blåbärsextrakt men i Sverige sker ingen produktion utan det är framförallt i Asien det produceras. I Kina sker den största produktionen av blåbärsextrakt där antocyanin utvinns och som blir till en viktig beståndsdel i olika hälsoprodukter som sedan säljs vidare till andra länder då främst till Japan. Sedan används det starka nordiska varumärket i paketeringen och säljs vidare, bland annat till tillbaka till Sverige. I svenska hälsokostbutiker säljs t.ex. kosttillskottet *Blue Berry Plus* från New Nordic för 439 kr för 120 tabletter. Vilket betyder att en tablett kostar ca 3,66 kr och innehåller 200 mg blåbärsextrakt vilket motsvarar 1 gram torkade blåbär (Nordic, u.d.).

Två-fas extraktion(ATPE)

Extraktionen görs på en så kallad Rotating Bed Reactor(RBR) (se figur 2) som är utvecklad av SpinChem. RBR är utformad för att maximera massöverföringen av reaktanter mellan lösningen och det fasta materialet. RBR skyddar även det fasta materialet genom sin utformning och håller reaktionslösningen fri från fasta ämnen.



Figur 2. Bild på Rotating Bed Reactor.

Figure 2. Picture of Rotating Bed Reactor.

Vattenbaserad två-fas extraktion (ATPE) består av en blandning av alkohol, vatten och ett oorganiskt salt. Det höga vatteninnehållet ger denna metod en mild och giftfri arbetsmiljö. ATPE har även andra fördelar gentemot andra extraktionsmetoder, den ger snabbare reaktioner, högre utbyten, lägre omkostnader, inget filtreringssteg, kort processtid och har en minskad förbrukning av reagens samtidigt som den bibehåller den biologiska aktiviteten hos molekylerna. ATPE har visats sig vara en användbar metod för extraktion av antocyaniner och för separering av socker. Upptill 90 % av de fria sockerarterna kan tas bort samtidigt som antocyaninerna isoleras i etanolfasen. Vilket ger en hög grad rening av naturliga antocyanin. (Wu, et al., 2011)

Mål och syfte

Målet med denna studie är att undersöka effekterna av olika extraktionsbetingelser och bestämma det optimala förhållandet mellan de olika faktorerna för att kunna extrahera ut maximalt med fenoler. De faktorer som kommer att testas är temperatur och TS-halt. Dessutom kommer två olika saltlösningar med givna koncentrationer att testas. För att hitta de optimala extraktionsbetingelserna kommer försöken att göras med en CCC-design (Central Composite Circumscribed). När blåbären är extraherade kommer fenol-koncentrationen att mätas med hjälp av UV/vis-spektroskopi samt nära-infraröd(NIR) spektroskopi. Designen kommer utvärderas i Predikteras Evince Version 2.7.5 och Umtrics Modde Version 10.1.

Frågeställningar:

- Hur förändras extraktionsutbytet i relation till tid?
- Hur mycket påverkar temperaturen utbytet?
- Vilken TS-halt ger högst utbyte?
- Blir utbytet högre i en två-fas extraktion jämfört med en traditionell extraktion?
- Vilket av de två testade salterna är effektivast?

Avgränsningar

Denna undersökning kommer att avgränsas till blåbär och utgångsmaterialet i arbetet är blåbärspulver som har malts ned från en frystorkad presskaka. Försöket utförs utifrån en design, detta för att kunna erhålla maximal information från försöket samt att antalet körningar reduceras för att spara tid. Saltlösningarnas koncentrationer kommer inte att testas utan recept på koncentrationerna tas ifrån liknande tidigare studier.

Material och metoder

Provberedning

Extraktionen sker på blåbärspulver och utgångsmaterialet kommer från presskaka från Kamrose Scandinavian Berries. Bären är plockade i Västerbottens län. Presskakan fryses sedan ned för att bibehålla färskheten samt för att det är en förutsättning för frystorkning att bären är frysta. När materialet har frusits tas ett prov av presskakan för att bestämma torrsubstansen. Den bestäms genom att ta ut ca 40 g presskaka som torkas i 105°C i 24 timmar.

Materialet frystorkas sedan i 72 timmar i en Edwards E2M5, den har sex fack och ca 300 g av den frysta presskakan portioneras ut. Den frysta presskakan vägdes före och efter frystorkning och TS beräknades. Se tabell 1.

Tabell 1. Torrsubstans för prov respektive frystorkat
Table 1. Dry solid of the sample and freeze-dried

Torkmetod	Presskaka(g)	Torkat(g)	TS(%)
105°C i 24h	43,75	8,895	20,33
Frystork 72h	330,53	73,77	22,32

Den frystorkade presskakan mals ned till ett pulver med en kulkvarn (Reutsch Mixer Mill MM 400) och den har en satsstorlek på 2*20ml. Den ställdes in på en hastighet av 19 Hz och presskakan maldes i en minut. Pulvret förvaras sedan fryst i en behållare för att undvika att viktiga ämnen oxideras.

Två-fas extraktionen

Försöken görs på två saltlösningar, tre temperaturer (30°C, 40°C och 50°C) och tre olika TS(3g, 6g och 9g). För de högre temperaturerna värms lösningen upp genom ett vattenbad. Dessutom görs försök med två extremer för TS och temperatur. För TS testas 1,758 g samt 10,242 g. För temperatur testas 25°C och 55°C. Koncentrationerna för saltlösningarna är konstanta och förutbestämda enligt vad tidigare studier har visats. Koncentrationerna för salt A (Natrium-väte-fosfat di-hydrat) var 27 % (v/v) och etanolkoncentrationen 25 % (v/v) (Wu, et al., 2014). Koncentrationen för salt B (Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄) var 19 % (v/v) och etanolkoncentrationen 30 % (Hua, et al., 2013).

För saltlösningen A vägdes 96 g H₂O och 54 g av saltet Natrium väte-fosfat di-hydrat (Na₂HPO₄ * 2 H₂O). För saltlösning B vägdes 102 g H₂O och 38 g av Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄. Saltet blandades med vattnet och för att lösa saltet så tillfördes svag värme under omrörning med hjälp av en magnetloppa. När saltet har löst sig i vattnet så tas magnetloppan upp och 50 g Etanol tillsattes till saltlösning A och 60 g Etanol till saltlösning B. Denna skakades tills en tydlig klarfas uppenbarades sig. Sedan vägs blåbärspulvret upp och RBR-behållaren fylls upp.

Extraktionen startas och prover på 12 ml tas ut efter 2, 4, 8, 16, och 64 minuter. Efter varje provtagningstillfälle tillsattes motsvarande volym av saltlösningen till provet. Proverna fick stå och sedimentera i 5 min för sedan separeras till en salt- respektive etanolfas, därefter tas 1 ml prov från både saltfasen och etanolfasen. Proverna sparas i eppendorfrör och fryses för senare analyseras.

Standardkurva

Vid varje avläsningstillfälle för UV-mätning behövs en kalibreringskurva, därför upprättas en standardkurva som är en metod som används för att räkna ut koncentrationen genom plottning av data. Denna standardkurva tillreds enligt följande:

Gallsyra-lösning

I en 100 ml behållare så löses 0,500 g av torr gallussyra (3,4,5-trihydroxibensoesyra) som har torkats i 105°C i 24 timmar och sedan avsvolat i Exsickator, i 10 ml etanol och späds upp till 100 ml med vatten.

Natriumkarbonat-lösning

200 g av vattenfri natriumkarbonat löses i 800 ml vatten och lösningen kokas upp. När lösningen har kallnat så tillsätts några kristaller av natriumkarbonat och efter 24 timmar filtreras lösningen och späds med vatten till en totalvolym på 1 liter.

Beredning av kalibreringskurvan

1, 3, 10, 15 och 20 ml tillsätts av ovan nämnda lösning i 100 ml mätkolvar och späds upp med vatten. Dessa lösningar har då en fenol-koncentration på 50, 150, 500, 750 och 1000 mg/L gallussyra som är den effektiva räckvidden för analysen.

Från varje kalibreringslösning pipetteras 20 µl i separata provrör och till varje provrör tillsätts 1,58 ml vatten. Sedan tillsätts 100 µl av Folin-Ciocalteu reagens i varje provrör. Lösningen blandas väl och vilar mellan 30 sek och 8 min, sedan tillsätts 300 µl av natriumkarbonat-lösningen. Dessa blandas väl och får stå i 30 min i 40°C, sedan läses absorbansen för varje lösning vid 765 nm med vatten som referensprov. De uppmätta absorbanserna plottas sedan mot koncentration.

Kemikalier

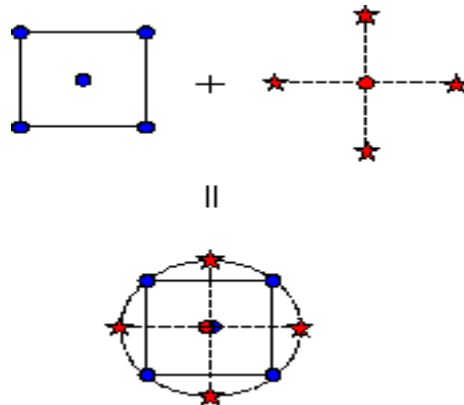
För saltlösningarna används salterna Natrium väte-fosfat di-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) och Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) samt Etanol 99,5 % ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). För UV-analyserna och kalibreringskurvorna används Folin-Ciocalteu reagens, Gallussyra ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), Etanol 99,5 % och vattenfri Natriumkarbonat (Na_2CO_3). Destillerat vatten har används till samtliga experiment.

Design

Försöksdesign används för att kunna hitta kombinationer av flera faktorer som ger det optimala resultatet och ta fram linjära samband samt samverkans effekter mellan faktorerna. En fördel med att använda sig av en design är att hitta var de experimentella gränserna bör vara och kunna undvika kombinationerna som är extrema och på så sätt kunna reducera antalet kombinationer för att spara tid. Dessutom vill vi veta:

- Vilka faktorer och interaktioner som är viktiga för försöket
- Var optimum för försöket ligger
- Riktningen mot optimum
- Ytan runt omkring optimum

Denna två-fas extraktion kommer att optimeras enligt en CCC-design (Central Composite Circumscribed) som är en typ av CCD-design (Central Composite Design). CCC-design är en av de mest använda responsyta-designerna för statistiska experiment. CCC-design är en faktoriell eller ofullständig faktoriell design med mittpunkter förstärkta med en grupp av så kallade stjärnpunkter som är axiella punkter. En CCC-design har alltid dubbelt så många stjärnpunkter som det finns faktorer i designen. Stjärnpunkterna representerar nya extremvärden, höga som låga, för varje faktor i designen. Figuren visar förhållandet mellan dessa.



Figur 3. Generering av en CCD-design för två faktorer (Anon., u.d.).
Figure 3. Generation of a two factors CCD-design (Anon., u.d.).

Analys

Kvantifieringen av polyfenoler i de uttagna proverna mättes med NIR-spektroskopi (Foss 6500) och UV (Shimadzu UV-1800). Dessa kommer att läsa av den totala fenol-koncentrationen på proverna. Modeller byggs sedan upp av NIR-data och korreleras sedan mot UV-data. För att analysera resultaten från UV och NIR-mätningarna kommer två statistiska programvaror, Modde Version 10.1 och Evince version 2.7.5.

Programmet Modde kommer att användas för analys av modellen med hjälp av resultatet från UV-mätningarna. I Modde kommer MLR (Multiple Linear Regression) att skapas utifrån faktorerna för modellering och förutsägelse av responsen. Modde ger två resultatindikatorer för modellen. R² beskriver procenten av variationen i responsen som förklaras av modellen. En hög R² är nödvändig för en bra modell. Q² beskriver hur väl modellen förutsäger nya data.

Mjukvaruprogrammet Evince används för att ta fram olika modeller med hjälp av PCA och PLS utifrån spektrat från NIR-provtagningarna.

PCA (Principal Component Analysis) är inom multivariat statistik ett av de mest använda statistiska verktygen. PCA bryter ned den ursprungliga datamatriken till en uppsättning av huvudkomponenter som förklarar huvudparten av variansen som finns i data. Visualiseringar av huvudkomponenter är ett kraftfullt sätt att upptäcka grupper och extremvärden inom det analyserade data. PCA är en standardmetod för att kunna beskriva och visualisera likheter och olikheter i ett multivariat dataset där data har en linjär respons. Med PCA beskriver man relationen mellan ett antal korrelerade variabler. PCA-metoder går ut på att göra om dessa korrelerade variabler till okorrelerade variabler som kallas för principalkomponenter.

Varje sådan komponent är en linjärkombination av ursprungsvariablerna. Sedan rangordnas principalkomponenterna efter hur stor varians de har (Westerbergh, u.d.). PCA är en bra metod för att få ut relevant information från en komplex datauppsättning och på så sätt kunna få en förenklad struktur att analysera.

PLS (Partial Least Squares) är en metod som först skapar ett antal oberoende linjära regressioner precis som PCA. Skillnaden för PLS är att det används två datamatriser för regression, X och Y. Det bildas regressioner och kovariansen maximeras mellan Y och X istället för variansen inom X som är fallet i PCA. Detta för att regressionerna med hjälp av kovariansen till Y ska bli bättre anpassade till denna matris och ge en bättre prediktion av Y (Westerbergh, u.d.).

UV/vis-spektroskopi

För analyserna av polyfenoler används UV(Shimadzu UV- 1800) som läser absorbansen vid 765 nm. Extraktionsproverna späds innan mätning för att hålla sig inom standardkurvas fenolkoncentration. Extraktions-proverna analyseras enligt Folin-Ciocalteu för bestämning av total fenolkoncentration. Först pipetteras 20 µL från de spädda extraktionsproven till separata provrör. Sedan tillsätts 1,58 ml vatten och 100 µL Folin-Ciocalteu-reagens i varje provrör och blandas väl. Efter det får blandningen vila mellan 30 sekunder och 8 minuter innan det tillsätts 300 µL natriumkarbonatlösning. Sedan ställs proven i en klimatkammare med en temperatur på 40°C i 30 minuter innan absorbansen mäts med UV. För varje prov tas två replikat.

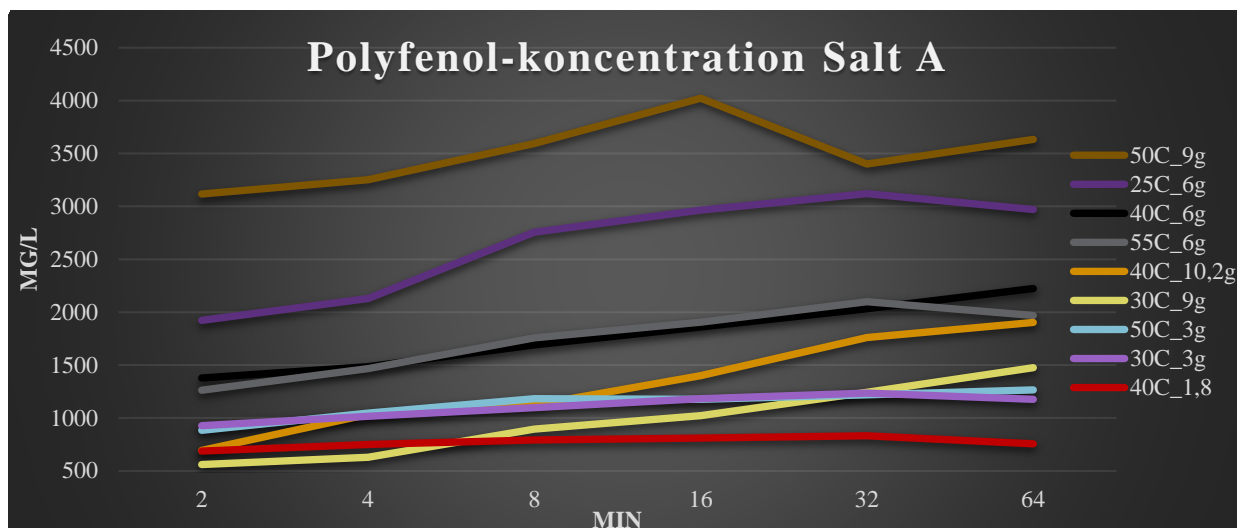
NIR – Nära infraröd spektroskopi

Nära infraröd spektroskopi omfattar strålning inom det elektromagnetiska spektrumet 700-2500 nm. De absorptionsband som förekommer i NIR-området är främst relaterade till övertoner och kombinationer av vibrationer som framträder i bindningar mellan funktionella grupper. NIR-spektra består vanligen av ett brett överlappande absorptionsband som innehåller fysikalisk och kemisk information av förekommande komponenter i provet (Räsänen & Sandler, 2007). NIR är en snabb analysmetod där det går enkelt att göra båda kvalitativa och kvantitativa mätningar. Ytterligare fördelar med NIR är att ingen skyddsutrustning behövs på grund av den låga strålningen och att provet inte påverkas av mätningen och därmed kan sparas för fler mätningar.

Vid analyserna för detta försök med NIR-spektroskopi används Foss 6500 som har ett spektralt område mellan 400-2500 nm, med en resolution på 2 nm. Det gör att instrumentet även mäter delar av det visuella området. För varje prov kommer tre stycken replikat att tas.

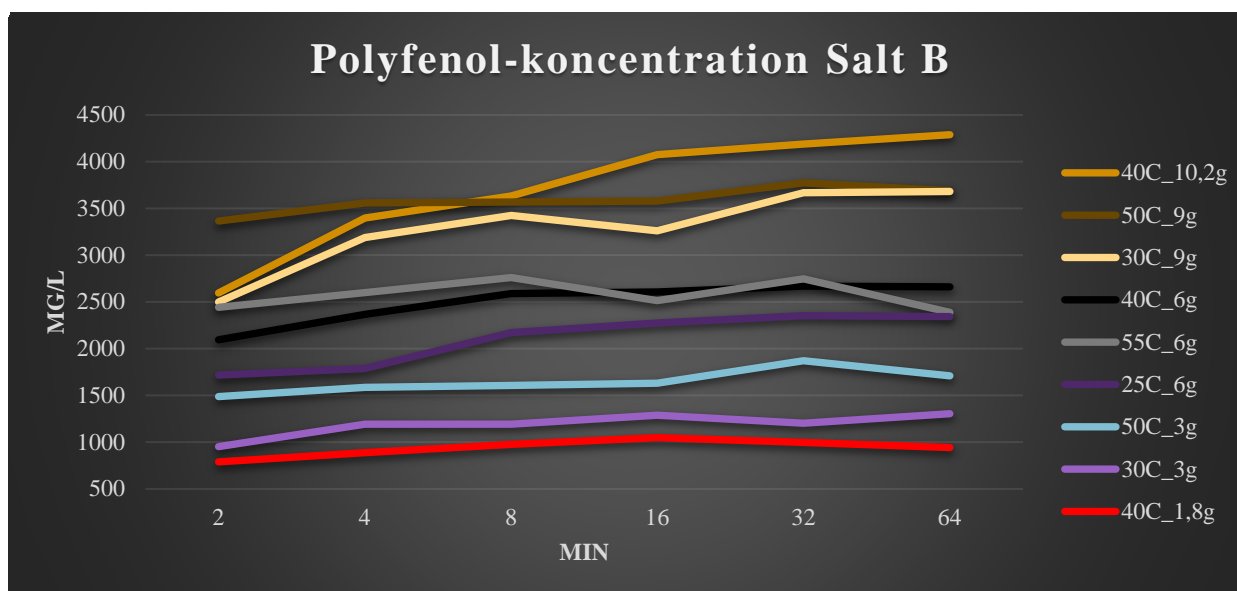
Resultat

Figurerna 4 och 5 visar koncentrationen av polyfenoler för de individuella körningarna och hur utbytet påverkas av extraktionstiden. För Salt B (figur5) är det tydligt att det är TS-halten som är den viktiga faktorn då koncentrationen av polyfenol ökar med ökande TS-halt. Även för Salt A (figur 4) kan det urskiljas att det är främst TS-halten som styr men det finns körningar som avviker.



Figur 4. Polyfenol-koncentration för alla försök med Salt A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) vid varje provtagningstid. De fyra replikaten (40C_6g) är ihop slagna och ett medel har räknats ut.

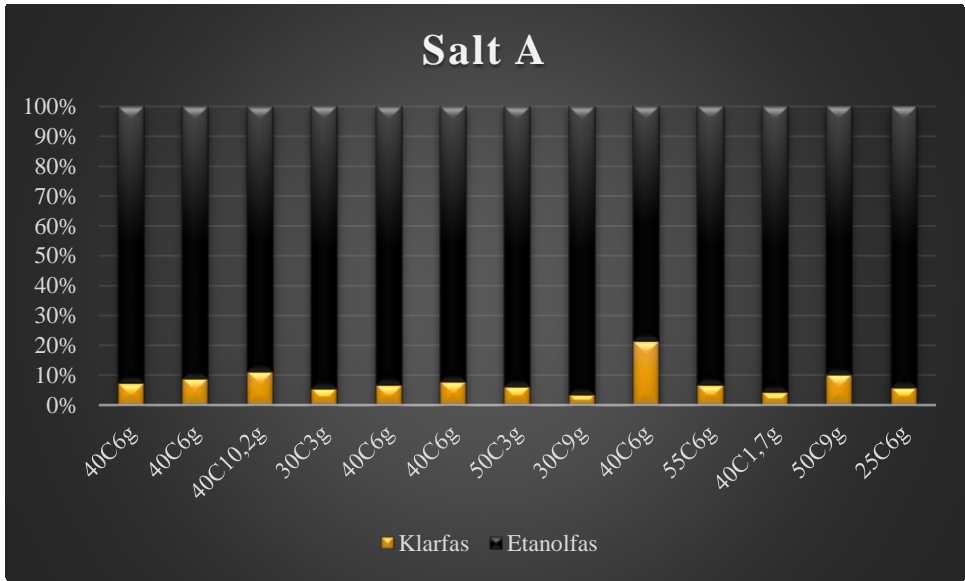
Figure 4. Polyphenol-concentration for all experiments with Salt A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) at each sampling time. The four replicates (40C_6g) are pooled and an average have been calculated.



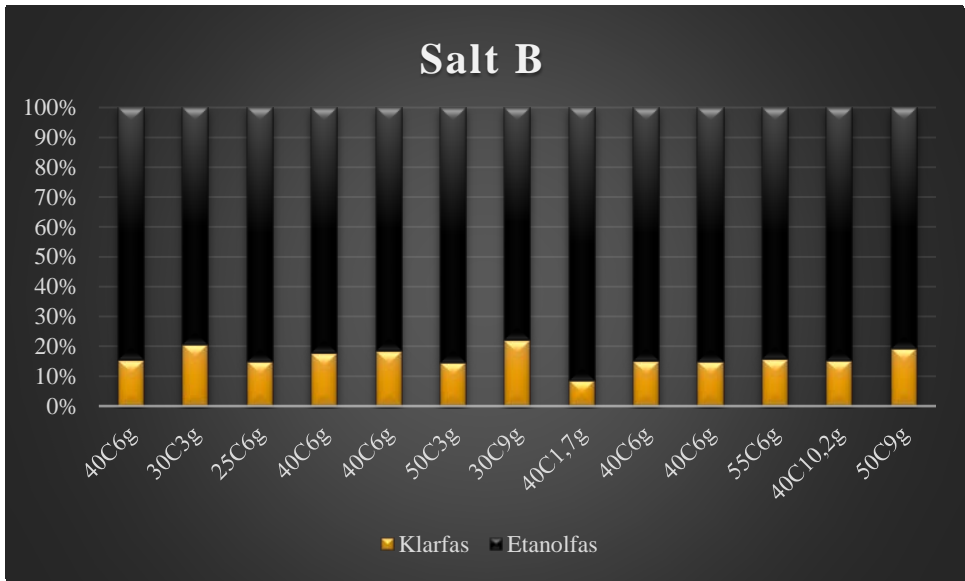
Figur 5. Polyfenol-koncentration för alla försök med Salt B ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) vid varje provtagningstid. De fyra replikaten (40C_6g) är ihopslagna och ett medel har räknats ut.

Figure 5. Polyphenol-concentration for all experiments with Salt B ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) at each sampling time. The four replicates (40C_6g) are pooled and an average have been calculated.

Figurerna 6 och 7 visar på fördelningen av fenol-koncentrationen mellan etanolfasen och klarfasen. För Salt A är medel fördelningen 9,15 % av fenolerna i klarfasen och för Salt B 19,71 %.

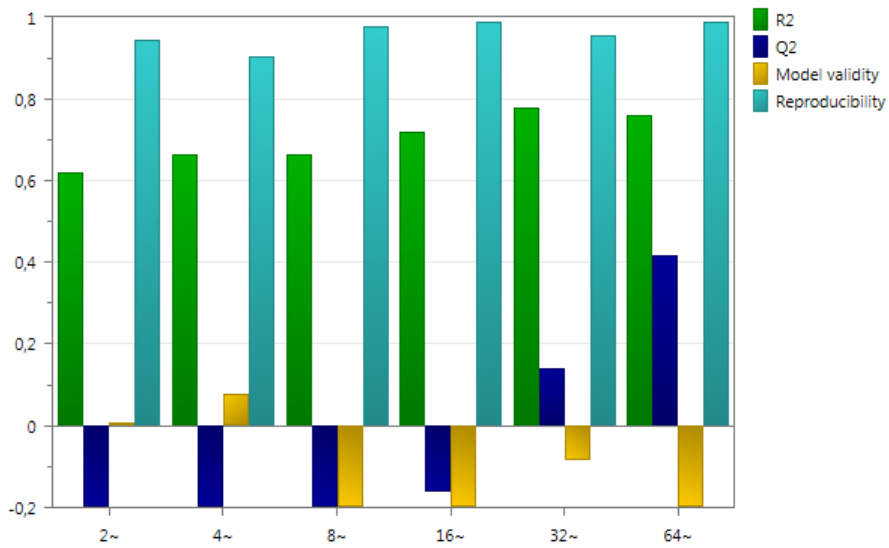


Figur 6. Fördelningen av fenoler för Salt A mellan etanolfasen och klarfasen för respektive försök.
Figure 6. Distribution of phenols of Salt A between the ethanol phase and the clear phase for each experiment.



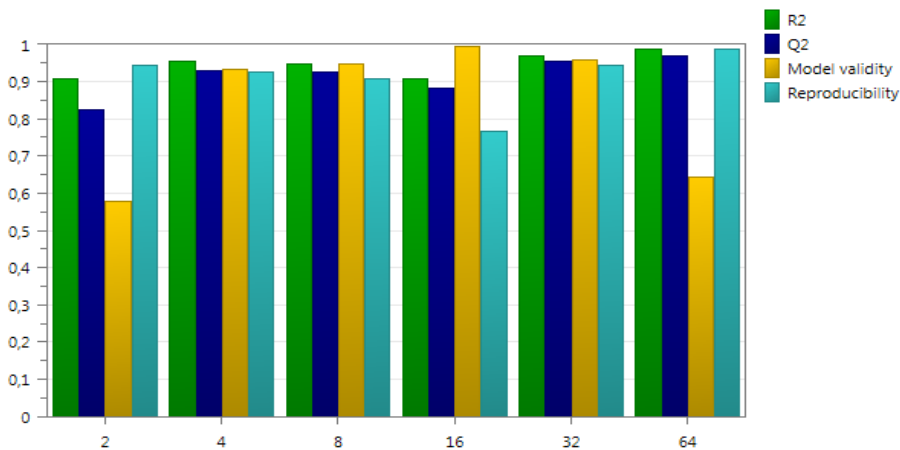
Figur 7. Fördelningen av fenoler för Salt B mellan etanolfasen och klarfasen för respektive försök.
Figure 7. Distribution of phenols of Salt B between the ethanol phase and the clear phase for each experiment.

Figurerna 8 och 9 illustrerar hur väl modellerna för respektive salt beskriver försöket. Figur 8 visar att modellen för Salt A passar försöket sämre än vad modellen för Salt B gör. Figur 9 visar på en bra modell då samtliga kolumner är höga.



Figur 8. "Summery of fit" för Salt A förklarar hur väl modellen beskriver försöket, när samtliga kolumner är höga innebär det att modellen är bra.

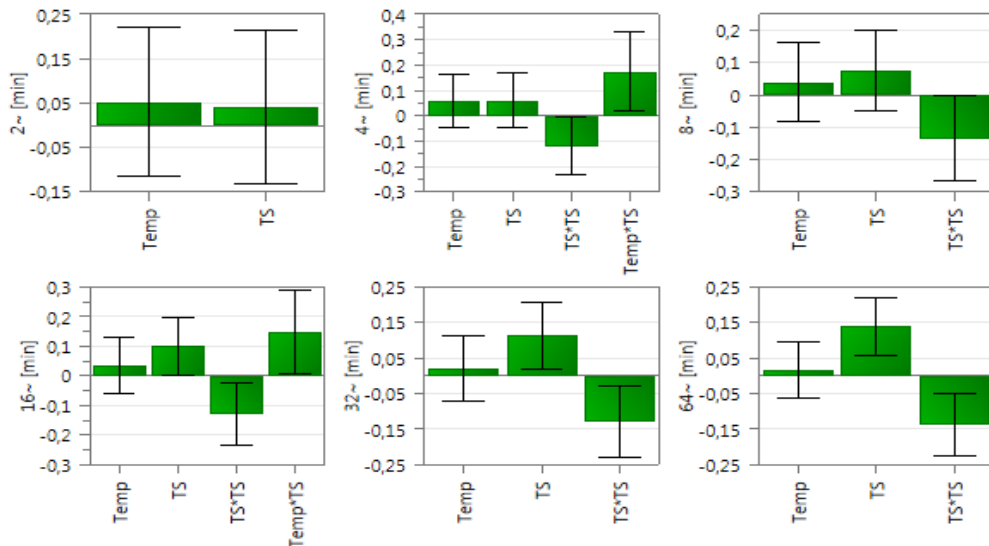
Figure 8. "Summery of fit" of Salt A explains how well the model describes the experiment, when all columns are high it means that the model is good.



Figur 9. "Summery of fit" för Salt B förklarar hur väl modellen beskriver försöket, när samtliga kolumner är höga innebär det att modellen är bra.

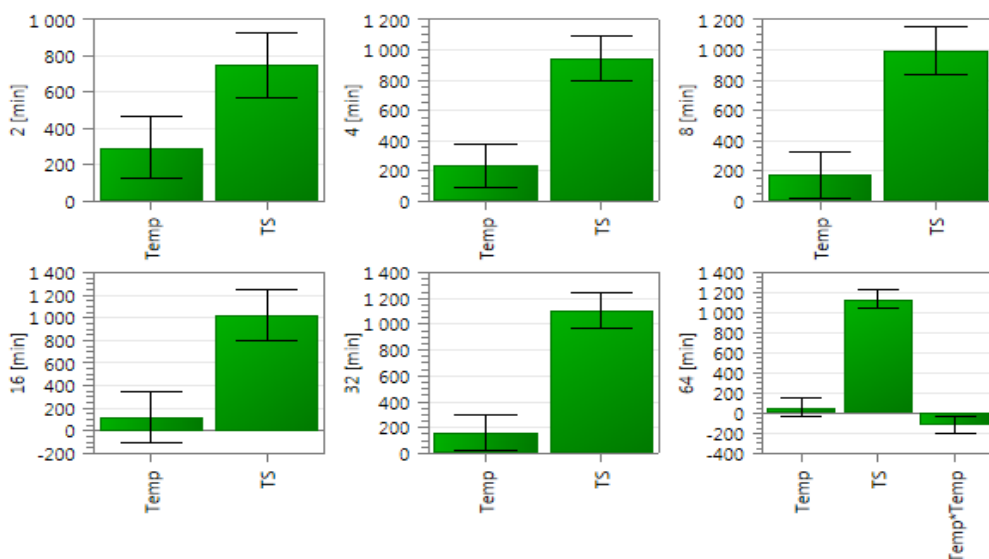
Figure 9. "Summery of fit" of Salt B explains how well the model describes the experiment, when all columns are high it means that the model is good

Figurerna 10 och 11 visar vilka faktorer som har signifikant betydelse för försöket. För Salt A (figur 10) har temperaturen ingen påverkan på utbytet. TS har påverkan först efter 16 minuter och ökar över tiden och har störst signifikant 64 minuter. TS*TS har en negativ påverkan efter 4 minuter. Temp*TS har en liten påverkan för 4 samt 16 minuter. Försöket med Salt B (figur 11) visar att temperaturen har betydelse i början av försöket för sedan avta och för 16 minuter och 64 minuter har temperaturen ingen signifikant betydelse. Precis som figur 5 visar är det TS som har absolut mest påverkan. Temp*Temp har en liten negativ påverkan efter 64 minuter.



Figur 10. Koefficient-diagram för Salt A över vilka faktorer som är signifikanta. Koefficienten är signifikant när konfidensintervallet inte korsar noll.

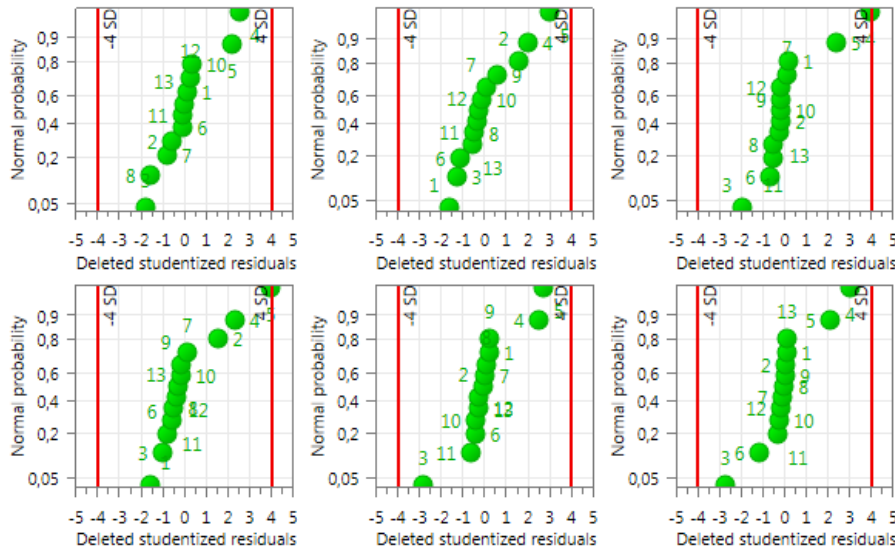
Figure 10. Coefficient-plot for Salt A of which factors who are significant. The coefficient is significant when the confidence interval does not cross zero.



Figur 11. Koefficient-diagram för Salt B över vilka faktorer som är signifikanta. Koefficienten är signifikant när konfidensintervallet inte korsar noll.

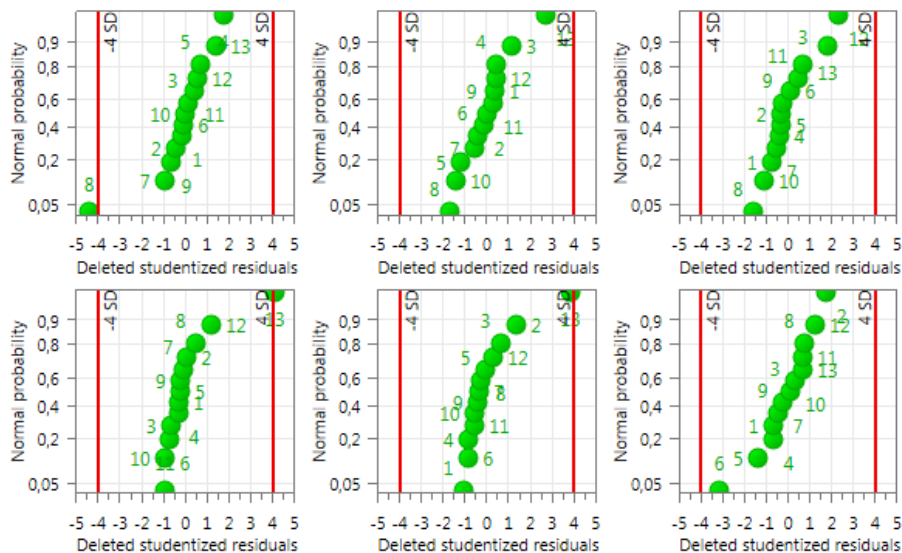
Figure 11. Coefficient-plot for Salt B of which factors who are significant. The coefficient is significant when the confidence interval does not cross zero.

Figurerna 12 och 13 visar hur normalfördelade residualerna är vid varje provtagningstidpunkt och om dessa ligger inom 4 standardavvikelser. Med en bra modell faller punkterna längs en linje. Figurerna identifierar även extremvärden. Om residualerna är randomiserade och normalfördelade ligger alla punkter på en rak linje mellan -4 och 4 standardavvikelser. I en jämförelse mellan salterna visar det sig att Salt B (figur 13) är mer koncentrerad efter en linje än Salt A (figur 12). Det finns vissa punkter som kan vara en outliers och störa modellen, för Salt A ligger körning 4 och körning 5 vid 8 respektive 16 minuter just på gränsen. För Salt B är det körning 8 vid 2 minuter som ligger utanför -4 standardavvikelser.



Figur 12. Normalfördelad sannolikhetskurva för Salt A vid varje provtagningstid. Kurvan ger möjlighet att identifiera extremvärden samt utvärdera normalfördelningen av residualerna.

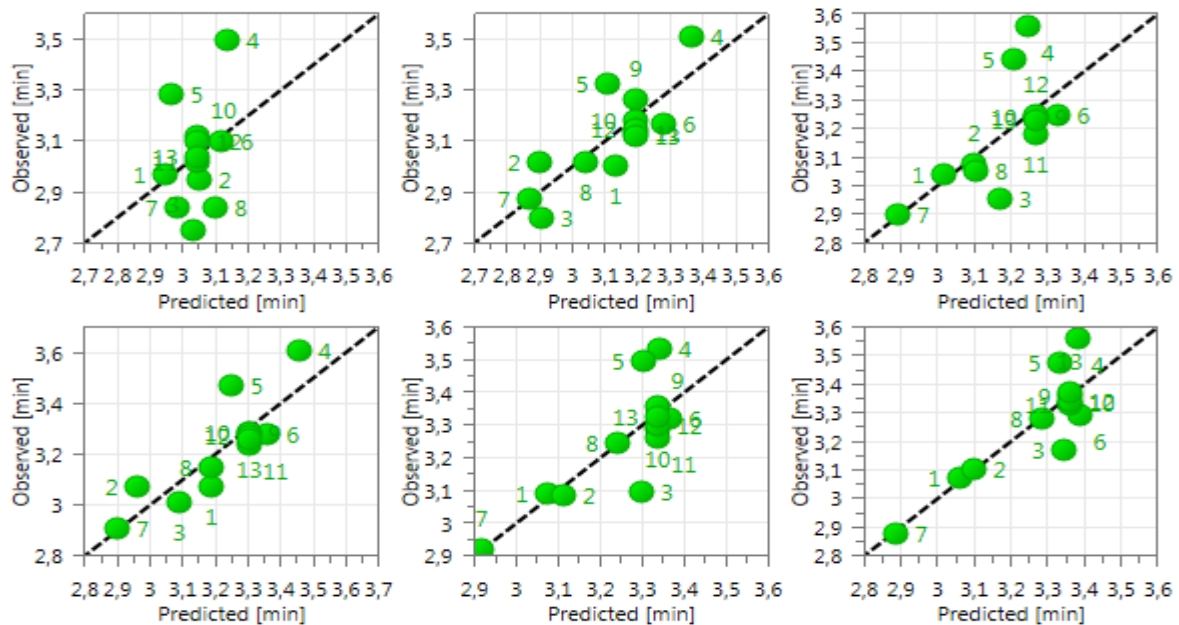
Figure 12. Normal probability plot for Salt A at each sampling time. The curve makes it possible to identify outliers and estimate the normal distribution of the residuals.



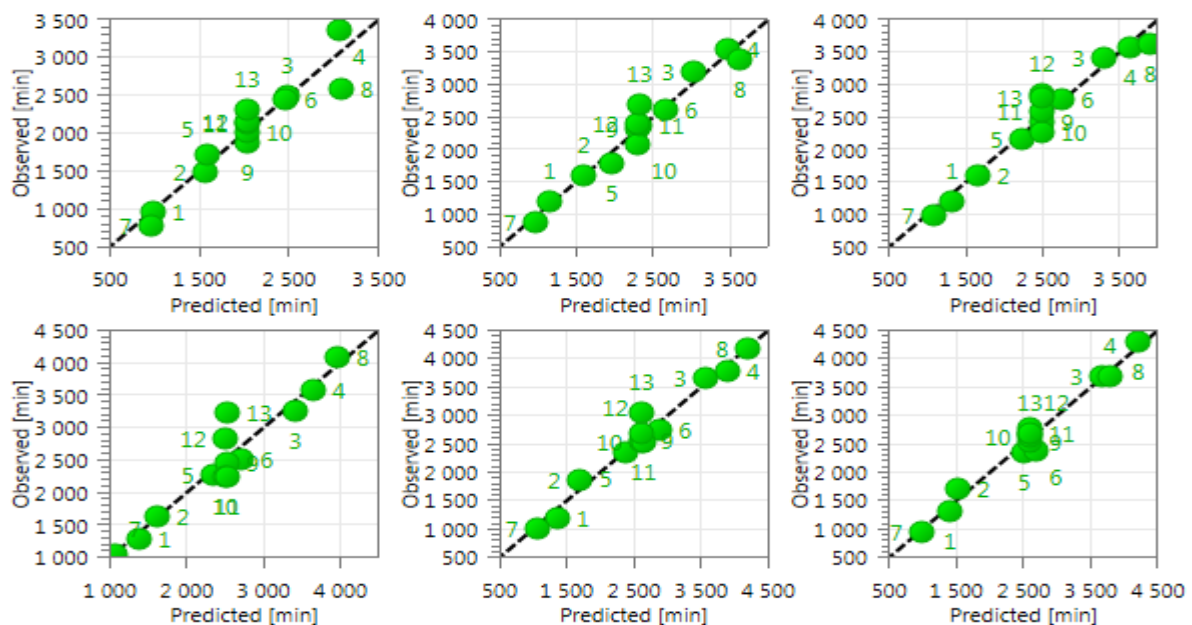
Figur 13. Normalfördelad sannolikhetskurva för Salt B vid varje provtagningstid. Kurvan ger möjlighet att identifiera extremvärden samt utvärdera normalfördelningen av residualerna.

Figure 13. Normal probability plot for Salt B at each sampling time. The curve makes it possible to identify outliers and estimate the normal distribution of the residuals.

Figurerna 14 och 15 visar observerade mot de predikerade värdena för responsen. Med en bra modell faller alla punkterna längs linjen. Med en mindre bra modell är punkterna utspridda runt linjen. Modellen för Salt A (figur 14) indikerar på en sämre modell med utspridda punkter medan Salt B (figur 15) visar på en bra modell med punkter längs linjen där replikaten är väl samlade kring varandra.



Figur 14. Kurvan visar de observerade värdena kontra de predikerade för Salt A.
Figure 14. The line shows the observed values versus the predicted values of Salt A.



Figur 15. Kurvan visar de observerade värdena kontra de predikerade för Salt B.
Figure 15. The line shows the observed values versus the predicted values of Salt A.

Figurerna 16 och 17 visar konturdiagram för respektive salt. För Salt A (figur 16) visar figuren att högst utbyte av polyfenoler fås vid höga temperaturer och höga TS-halter. Optimum nås vid 16 minuter på hög temperatur och TS. Salt B (figur 17) följer en mer tydlig trend där optimum ökar med tiden. En hög TS-halt ger ett högt utbyte och temperaturen blir mindre viktigare ju längre extraktionstid.

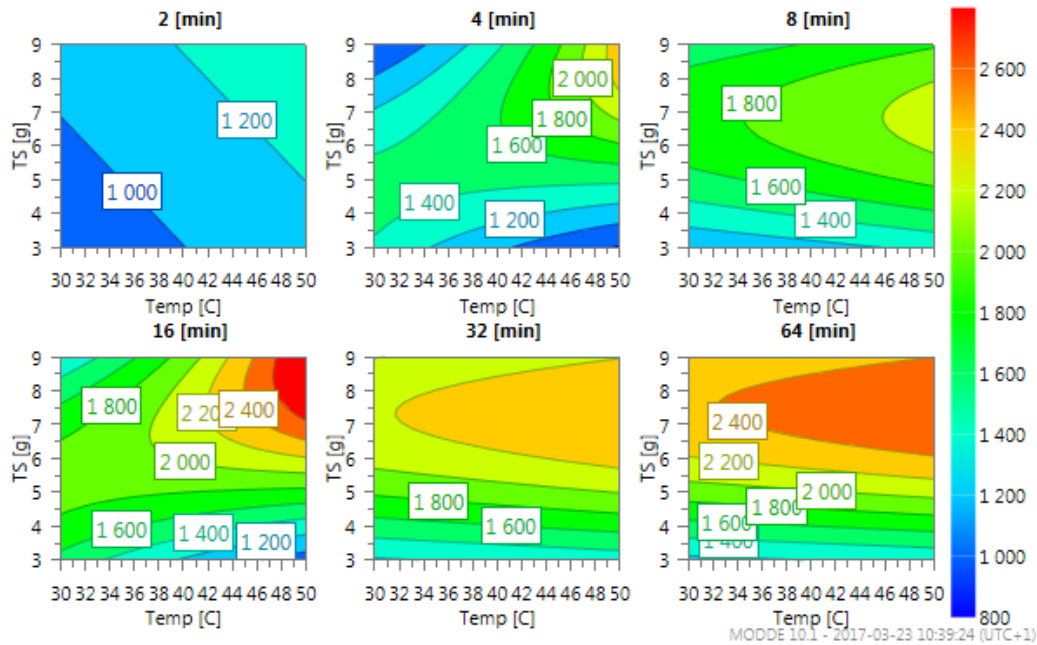


Figure 16. Konturdiagram för Salt A vid varje provtagningstid. Diagrammen visar när utbytet av polyfenoler är som högst och var optimum ligger.
Figure 16. Contour plot of Salt A at each sampling time. The plot show where the yield of polyphenols is highest and where optimum is

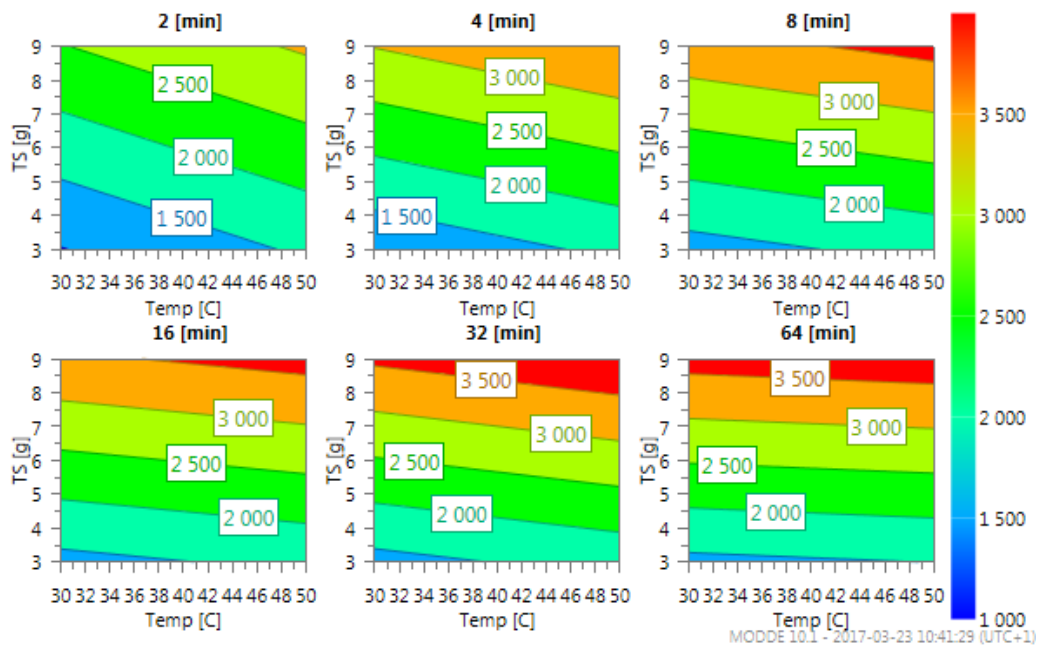
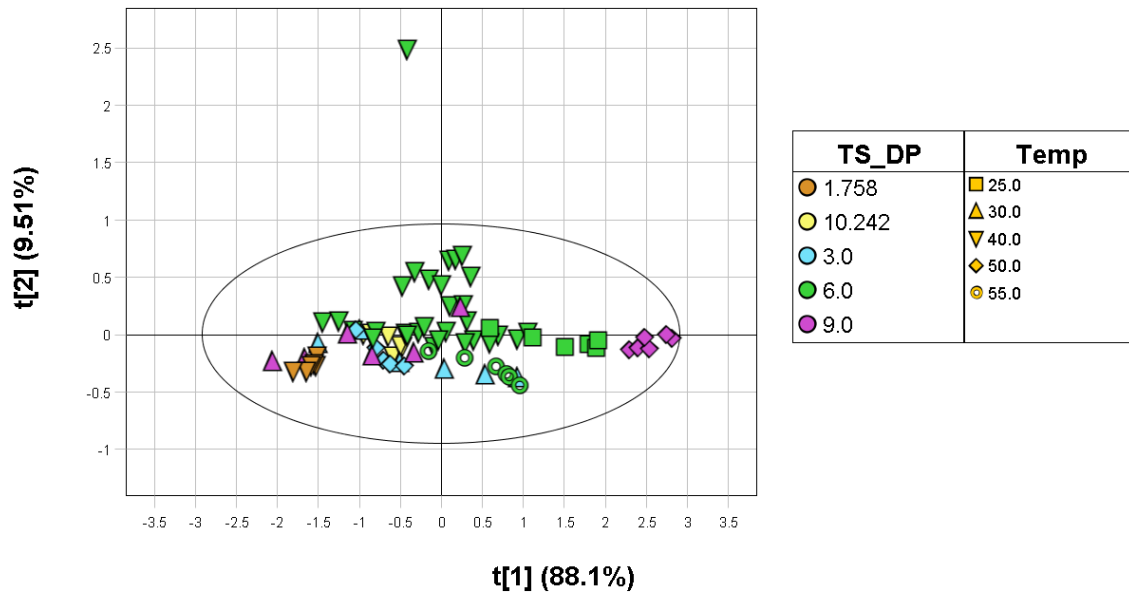


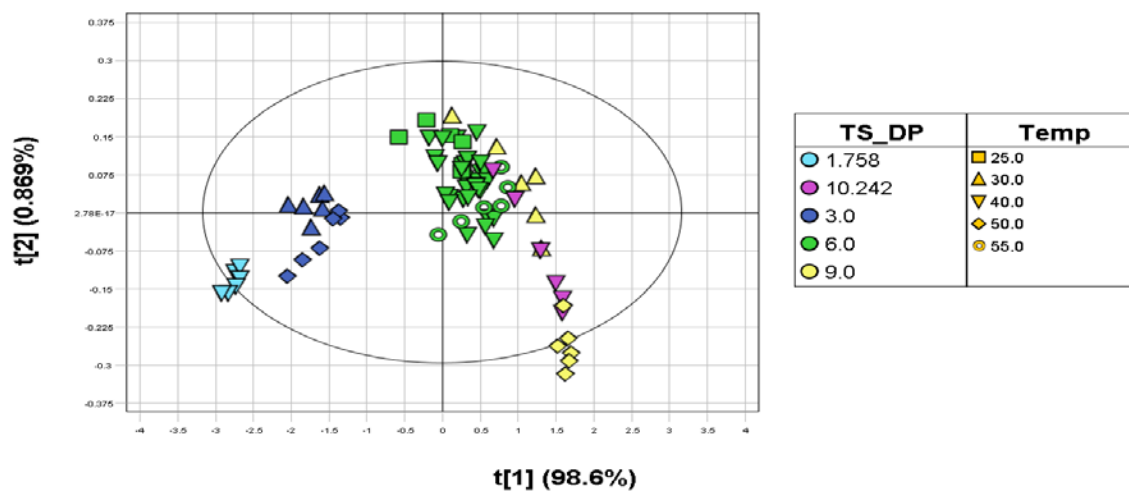
Figure 17. Konturdiagram för Salt B vid varje provtagningstid. Diagrammen visar när utbytet av polyfenoler är som högst och var optimum ligger.
Figure 17. Contour plot of Salt B at each sampling time. The plot show where the yield of polyphenols is highest and where optimum is.

Figurerna 18 och 19 visar en PCA scoreplot där t1/t2 är plottade mot varandra. I diagrammet är det möjligt att identifiera klasser av observationer som har liknande egenskaper och är separerade till olika områden av diagrammet. Diagrammet ger även en möjlighet att identifiera extremvärden samt oregelbundna observationer som ligger långt från de andra. Figur 18 visar på vissa oregelbundna observationer och resultatet visar inga tydliga grupperingar i någon av komponenterna för TS och temperatur. Det finns även en tydlig outlier för ett av replikaten. Vid borttagandet av denna outlier kan det fortfarande inte gå att urskilja någon trend eller grupper. Resultatet för Salt B (figur 19) visar på en tydlig separering i T1 för TS däremot går det inte att urskilja någon tydlig separering för temperatur.



Figur 18. Scoreplot för Salt A där två vektorer är plottade mot varandra.

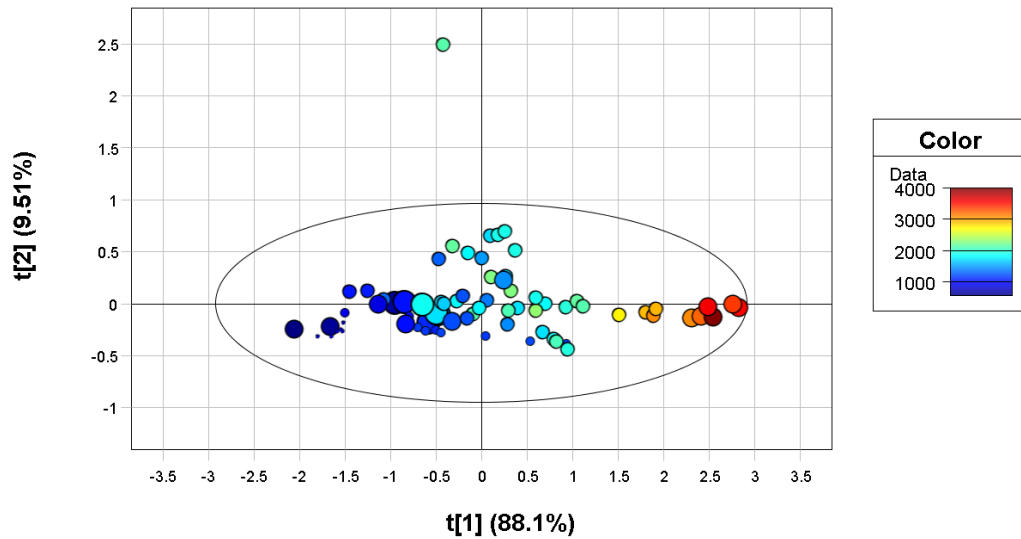
Figure 18. Scatter plot of Salt A where two vectors are plotted against each other.



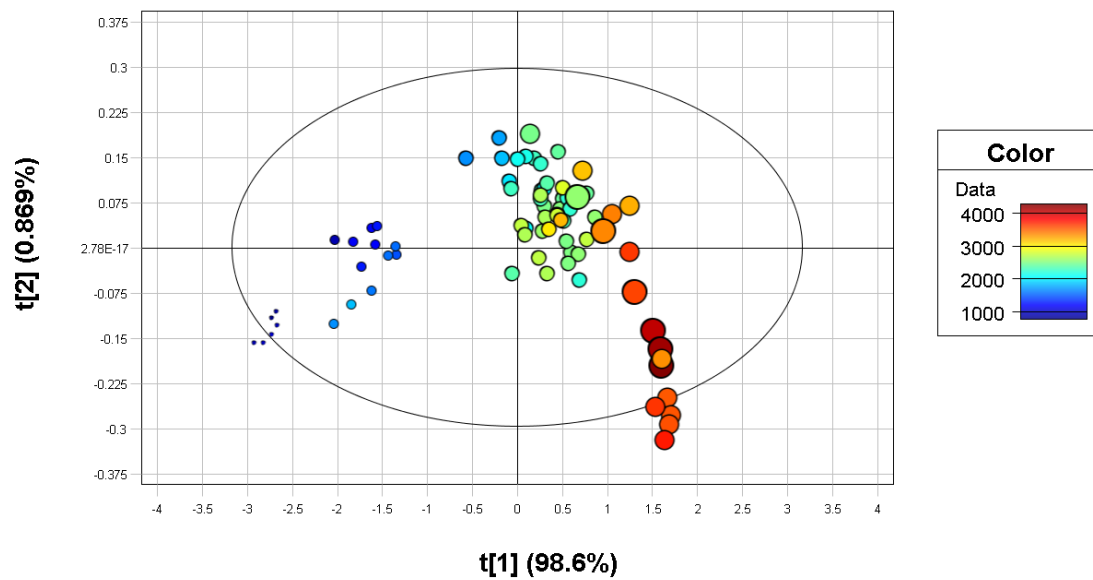
Figur 19. Scoreplot för Salt B där två vektorer är plottade mot varandra.

Figure 19. Scatter plot of Salt B where two vectors are plotted against each other.

Figurerna 20 och 21 visar fenol-koncentrationen i förhållande till TS-halten. För Salt A (figur 20) ökar fenolhalten med ett ökat värde i t1, dock ses inget tydligt samband mellan TS-halten och fenol-koncentrationen. I figur 21 är finns tydliga samband mellan fenol-koncentrationen och TS-halt då fenolhalten ökar med ökat värde i t1 samt att fenol-koncentrationen ökar med en ökad TS-halt.

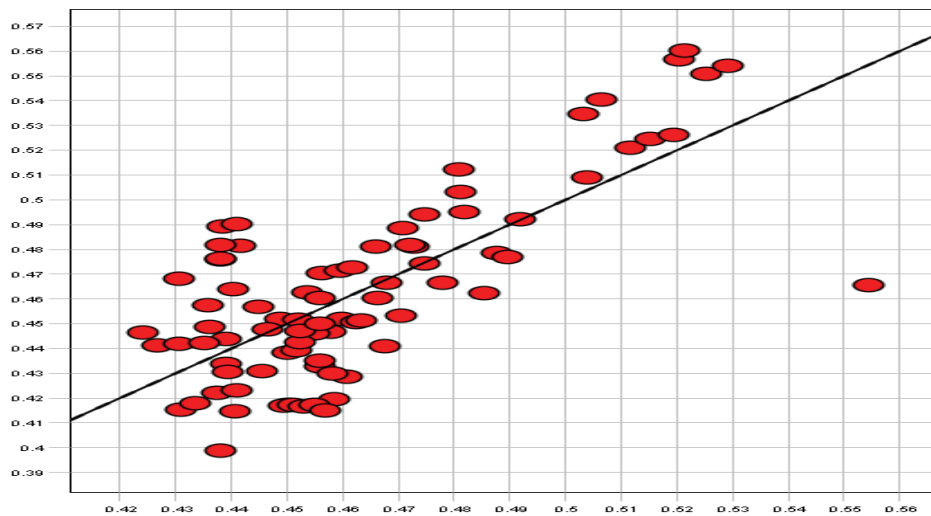


Figur 20. Scoreplot för Salt A där färgskalan symboliserar fenol-koncentrationen och storleken på punkterna TS-halten, ju större punkter ju högre TS-halt.
Figure 20. Scatter plot of Salt A where the color symbolizes the phenol-concentration and the size of the points symbolizes dry solid content, higher content provides bigger points.

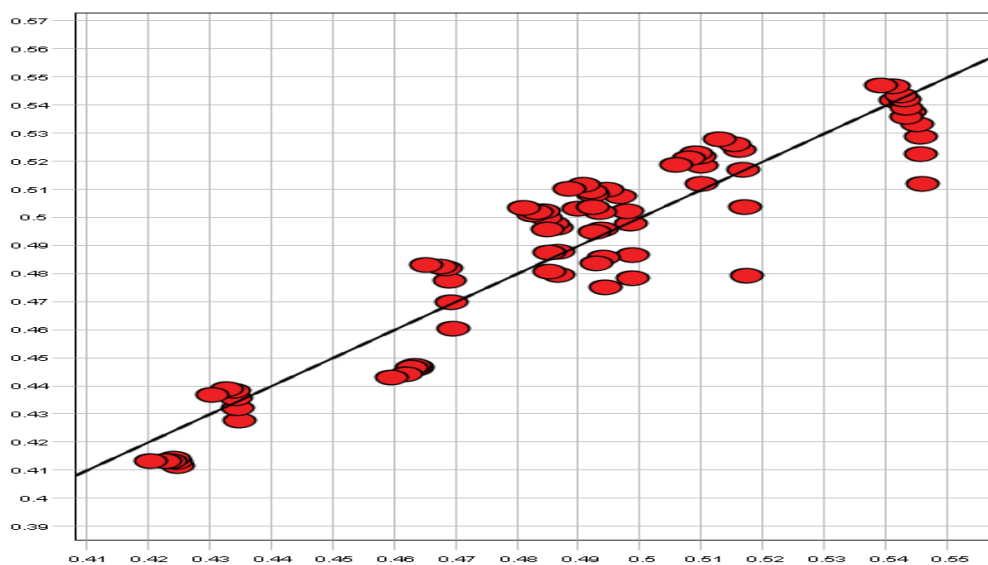


Figur 21. Scoreplot för Salt B där färgskalan symboliserar fenol-koncentrationen och storleken på punkterna TS-halten, ju större punkter ju högre TS-halt.
Figure 21. Scatter plot of Salt B where the color symbolizes the phenol-concentration and the size of the points symbolizes dry solid content, higher content provides bigger points.

Figureerna 22 och 23 illustrerar på förhållandet mellan observerade värden och beräknade värden. Figur 22 visar att resultatet för Salt A är utspridda längs regressionslinjen. För Salt B (23) är resultatet inte lika utspritt. Det går även att urskilja tydliga grupper längs regressionslinjen som innehar samma parametrar.

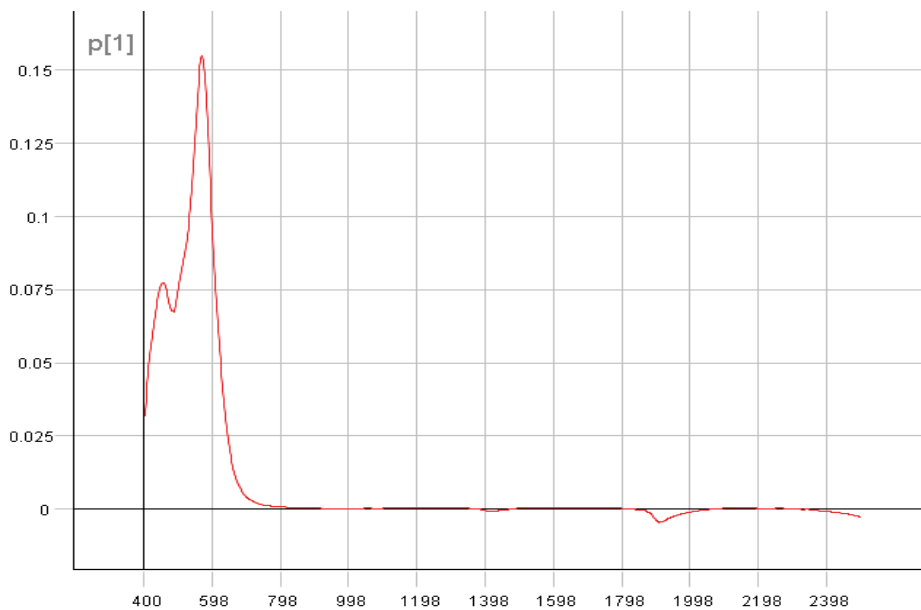


Figur 22. Figuren illustrerar förhållandet mellan observerade värden och beräknade värden för Salt A.
Figure 22. The figure illustrates the relationship between observed and estimated values for Salt A.

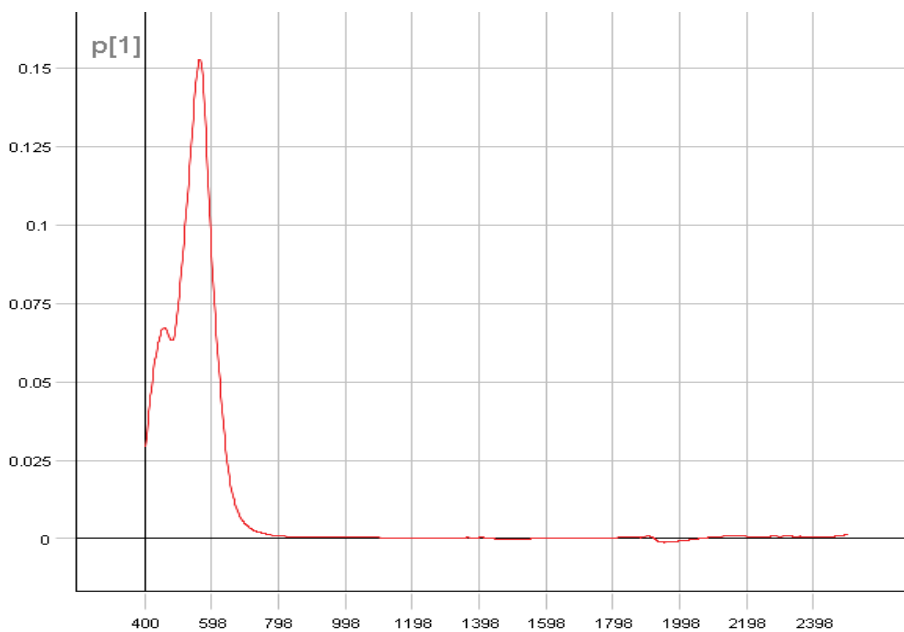


Figur 23. Figuren illustrerar förhållandet mellan observerade värden och beräknade värden för Salt B.
Figure 23. The figure illustrates the relationship between observed and estimated values for Salt B.

Figurerna 24 och 25 illustrerar inom vilket spektra informationen finns för vardera salt. För båda salterna verkar vara en topp av polyfenoler vid ca 590 nm och det mesta av informationen verkar ligga mellan våglängderna 400-800 nm.



Figur 24. Figuren visar en Loading line för Salt A för den första komponenten.
Figure 24. The figure shows a Loading line of Salt A at the first component.



Figur 25. Figuren visar en Loading line för Salt B för den första komponenten.
Figure 25. The figure shows a Loading line of Salt B at the first component.

Diskussion

Ett av huvudsyftena med detta arbete var att analysera skillnaderna mellan de två olika salterna som användes i försöket. Med hjälp av UV-analysen kan det urskiljas en tydlig skillnad i utbytet av polyfenoler mellan salterna. Salt B ger ett större utbyte än vad Salt A gör. Vid en jämförelse av medelutbytet av polyfenoler vid varje provtagningstidpunkt av de fem replikaten är det i snitt 720 mg/l mer utbyte för Salt B än Salt A. Störst skillnad i utbytet mellan salterna är det på de lägre provtagningstiderna för att vid 64 minuter vara minst skillnad. Detta tyder på att Salt B (ammoniumsulfat) är det salt som är mest effektivast av dessa två. Resultaten för Salt B är också mer stabila än för Salt A, där resultaten följer mer tydliga trender för Salt B. Salt A verkar mer ostabil och resultaten är mer svårtolkade. Vid försöket verkade det vara Salt B som var mest ostabil då saltet löstes ut vid ett par tillfällen under saltlösningstillredningen. Detta var troligtvis för att koncentrationen av lösningen låg nära den gräns där saltet kristalliseras. Det kan också vara en av anledningarna att Salt B var det mest effektiva saltet

För båda salterna är det TS-halten som är den viktigaste faktorn som styr polyfenol-koncentrationen. För Salt A får TS-halten signifikant betydelse efter 16 minuter medan för Salt B är det mycket tydligare att det är TS-halten som styr där signifikansen är hög redan efter två minuter och ökar sedan med tiden. Enligt figur 4 och 5 syns det tydligt att TS-halten är den viktigaste faktorn då utbytet av polyfenol-koncentrationen blir högre ju högre TS. Polyfenol-koncentrationen är mer svåranalyserad för Salt A då det finns körningar som avviker från det förväntade. T.ex. är extremen för Salt A svårtolkat då den ger mindre utbyte än replikaten. En förklaring kan vara en så kallad packningseffekt d.v.s. att det blir för mycket pulver i RBR-reaktorn vid dem höga TS-halterna vilket gör att pulvret måste packas ordentligt för att få plats. Detta kan försvåra lösningen att få kontakt med allt pulver och kanske behöver längre extraktionstid. Detta kan avläsas i figurerna 4 och 5 där tiden har störst betydelse för dessa extremer med en TS-halt på 10,2 g ökar mest mellan 2 minuter till 64 minuter i jämförelse med de andra körningarna.

Extraktionstidens inverkan på resultatet hade mindre påverkan på utbytet än vad jag förväntade mig. Överlag ökar utbytet med tiden för alla försök men inte i den utsträckning som förväntades. Orsaken till att tiden hade en mindre inverkan för detta försök var nog att extraktionen skedde på ett finmalt pulver. En liten mindre partikelstorlek gör att den reagerar snabbare med lösningen än den skulle gjort om försöket hade gjorts på t.ex. hela bär. Detta gör att denna metod med pulver ger en kortare extraktionstid.

Temperaturen hade mindre påverkan än förväntat. För Salt A har den ingen signifikant betydelse alls för försöket. För Salt B har temperaturen en signifikant påverkan i början av extraktionstiden för att sedan avta. En anledning till att temperaturen har en mindre påverkan i försöket kan vara det låga spannet mellan temperaturerna som användes vid försöket (25°C-55°C). Det kan tänkas att temperaturen blir mer signifikant ju högre extraktionstemperatur som används.

Vidare hade det varit intressant att testa en högre extraktionstemperatur. Tidigare studier där endast vatten används som lösningsmedel har visat att den högsta koncentrationen av fenolföreningar nåddes vid så höga temperaturer som 80-100°C (Aaby, et al., 2013). Om extraktionstemperaturerna som testades vid detta försök var högre hade nog temperaturen som parameter fått en större signifikant betydelse. Men med en alltför hög temperatur vid extraktionen finns risken att antocyaniner förloras då den bryts ned och omvandlas till andra polyfenoler. Dessutom är dessa höga temperaturer väldigt energikrävande och kostsamma. Vid en storskalig produktion av antocyanin-extraktion tillkommer det parametrar som det ska tas hänsyn till. Då handlar det inte bara om att faktorerna skall optimeras utan

det tillkommer en ekonomisk parameter. Det gäller att sänka kostnaderna för att den ekonomiska vinsten ska bli så stor som möjligt. I figur 17 kan det urskiljas att temperaturen får mindre påverkan ju längre extraktionstid. I det fallet skulle det vara ekonomiskt att använda sig av en längre extraktionstid och lägre temperatur för det är kostsamt och energikrävande att extrahera vid högre temperaturer. I sådana fall får faktorerna vägas mot den ekonomiska faktorn för att hitta optimum.

Dessutom kan höga extraktionstemperaturer vara känsligt för antocyaninutbytet. Studier har visat att lägre extraktionstemperaturer är mer lämpliga för utvinning av antocyanin medan höga extraktionstemperaturer ger högre fenolutbyte (Garofulić, et al., 2013). I och med att denna studie endast bestämmer koncentrationen av polyfenoler behövs det vidare analyser för att bestämma den exakta halten av antocyanin eftersom antocyaninerna kan omvandlas till andra polyfenoler i större utsträckning vid högre temperaturer.

I figurerna 6 och 7 illustrerar kolumnerna hur bra data passar modellen. R2 beskrivs hur god passformen är och indikerar hur väl modellen kan passa data. Q2 beskrivs hur bra förutsägelse modellen har och indikerar den prediktiva kraften i modellen. För att modellen ska vara bra är målet att ha en så hög Q2 som möjligt. Q2 anses bra om den är $\geq 0,5$ och skillnaden mellan Q2 och R2 är $\leq 0,2-0,3$ (Eriksson, 2008). Enligt figurerna 6 och 7 kan det med en snabb överblick se att för Salt A passar inte alla data modellen då Q2 ligger väldigt lågt. Vid ett försök att få modellen för Salt A att se bättre ut togs några av försöksexperimenten bort. De som uteslöts var de resultat som avvek från det förväntade resultatet. Det gjorde modellen bättre med framförallt högre Q2. Detta tyder på att vissa av resultaten är tvetydiga och det gör att resultaten från detta salt svårtolkat. Modellen för Salt B är bra då både Q2 och R2 ligger högt och differensen mellan de båda är låg, aldrig mer $\leq 0,2-0,3$.

Kolumnen "Reproducibility" är hög för bägge salterna vilket indikerar på att om försöken skulle göras om skulle det ge samma resultat. Detta tyder på att inga större fel har gjorts i försöket.

Parallellt med denna studie har en liknande studie pågått, en traditionell extraktion med etanol som lösningsmedel, där testades både traditionell lösningsmedel extraktion i E-kolv och med RBR (Klum, 2017). Detta försök har använt samma utgångsmaterial som i mitt försök, pulveriserat blåbär från presskaka. I tabell 2 kan det konstateras att utbytet blir betydligt högre med två-fas extraktion än med traditionell extraktion. Vid 16 minuter ger Salt B 110 % högre utbyte än den traditionella lösningsmedel extraktionen och 60 % mer än den traditionella RBR extraktionen.

Tabell 2. Jämförelse av polyfenol-koncentration mellan två-fas extraktionen för Salt B och den traditionell lösningsmedel extraktion. Ett medel från försökens replikat har räknats ut för varje provtagningstidpunkt

Table 2. Comparison of polyphenol-concentration of the two-phase extraction and the traditional solvent extraction. An average from the replicate of the experiments have been calculated for each sampling time

Extraktionstid (min)	2	4	8	16	32	64
Salt B(mg/L)	2095	2368	2589	2608	2669	2661
Traditionell(mg/L)	Ingen mätning	Ingen mätning	1219	1242	1378	1453
Traditionell, RBR(mg/L)	987	1226	1195	1633	1561	1698

Referenser

- Aaby, K., Grimmer, S. & Holtung, L., 2013. Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT - Food Science and Technology*, pp. 257-264.
- Andersson, T., 2010. *Östersunds-posten*. [Online]
Available at: <http://www.op.se/jamtland/bracke/tord-andersson-om-den-bla-guldgruvan-i-skogen>
- Anon., u.d. *Nist Seamatech*. [Online]
Available at: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>
- Berglöf, E., 2008. Nordiska bär och dess hälsoeffekter. *Bioteknik -bär, SIK*.
- Eriksson, L., 2008. *Design of Experiments: Principles and Applications*, u.o.: Umetrics Academy.
- Garofulić, I. E., Dragović-Uzelac, V., Jambrak, A. R. & Jukić, M., 2013. *The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (Prunus cerasus var. Marasca)*, u.o.: Journal of Food Engineering.
- Hellström, J. M. P. & K. R., 2010. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 12-19.
- Hua, Z. o.a., 2013. Extraction and purification of anthocyanins from the fruit Residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. *J Chromat Separation Techniq 4*, p. 167.
- Klum, J., 2017. *Traditionell lösningsmedel extraktion av blåbärspulver. Opublicerat manuskript*, Umeå: SLU.
- Lillhonga, T., Dahlbacka, J., Lillhonga, O. & Jåfs, Å., 2015. *Analys av antocyaninhalter, BRIX-värde och halten torrsbstans i österbottniska blåbär med hjälp av NIR-spektroskopi*, u.o.: Novia Publikation och produktion.
- Määttä-Riihinen, K. R. o.a., 2004. *Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species*, u.o.: J. Agric. Food Chem..
- Nordic, N., u.d. *New Nordic*. [Online]
Available at: <http://www.newnordic.se/all-products/blue-berry/blue-berry-121>
- Patras, A. B. N. O. C. & T. B. T. i. F. S. a. T. 2., 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, pp. 3-10.
- Prior, R. o.a., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 2686-2693.
- Riihinen, K., 2005. *Phenolic compounds in berries*, Koupio: Koupio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 187.
- Räsänen, E. & Sandler, N., 2007. *Near infrared spectroscopy in the development of solid dosage forms*, u.o.: Journal of Pharmacy and Pharmacology.

- Su, Z., 2012. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. *Pharmaceutical Crops*, pp. 7-37.
- Upton, R., 2001. *Bilberry Fruit Vaccinium myrtillus* L. *Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics*, Santa Cruz: American Herbal Pharmacopoeia.
- Westerbergh, J., u.d. *En jämförelse mellan några multivariata data-analysmetoder*, Umeå: Matematisk-statistiska institutionen, Umeå universitet.
- Wu, X. o.a., 2011. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, pp. 443-453.
- Wu, Y. o.a., 2014. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology* 124, pp. 170-178.
- Öberg, C., 2013. *Effekter av olika ljuskvalitet på antocyaninkoncentration hos Vaccinium corymbosum*, Alnarp: SLU.