



# **Traditionell lösningsmedelsextraktion av blåbärspulver - Extraktion och optimering**

*Traditional solvent extraction of blueberry powder  
-Extraction and optimization*

**Jimmie Klum**

**Arbetsrapport 9 2017  
Examensarbete 30hp A2E  
Jägmästarprogrammet**

**Handledare:  
Josefina Nyström**

---

Sveriges lantbruksuniversitet  
Institutionen för skogens biomaterial och teknologi  
S-901 83 UMEÅ  
[www.slu.se/sbt](http://www.slu.se/sbt)

Tfn: 090-786 81 00

Rapport från Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi



# **Traditionell lösningsmedelsextraktion av blåbärspulver - Extraktion och optimering**

*Traditional solvent extraction of blueberry powder  
-Extraction and optimization*

**Jimmie Klum**

Nyckelord: traditionell lösningsmedelsextraktion, rotating bed reactor, Box-behnen design, nära infraröd spektroskopi, partial least squares

Arbetsrapport 9 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 Arshadi, 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**

Detta arbete har varit en lång process som inte hade varit möjlig utan hjälp utifrån därför skulle jag vilja tacka de personer som har gjort denna studie möjlig. Jag vill först och främst tacka min handledare Josefina Nyström för den hjälp jag fått med att utforma detta arbete och all övrig hjälp som hon bistått med under denna studie. Jag vill också tacka Torgny Mossing och Paul Geladi för den kunskap dessa har förmedlat för att underlätta detta arbete. Ett stort tack går också till Ubbie och Carina för den hjälp och assistans jag fått i labbet. Sist men inte minst så vill jag tacka Simon Wikström och som under detta examensarbete gjort en parallell studie och fungerat som ett bollplank.

Examinator: Mehrdad Arshadi

## Sammanfattning

De Nordiska skogsbären är idag väldigt attraktiva på världsmarknaden, idag används blåbäret bland annat som ett råmaterial för produktion av näringstillskott, kosmetik och hälsoprodukter. Men av de blåbär som växer i de svenska skogarna plockas bara uppskattningsvis fem procent. Det finns därmed i Sverige en outnyttjad resurs som år efter år ruttnar bort i de svenska skogarna.

Syftet med denna studie var att undersöka effekten av olika extraktionsbetingelse och kunna bestämma de optimala förhållandet mellan olika processparametrar. Detta för att maximera extraktionen av fenoler ur presskaka av blåbär. Studien syftade till att jämföra traditionell lösningsmedelsextraktion och extraktion med hjälp av Rotating Bed Reactor (RBR) och hur dessa två extraktionsmetoder skiljer sig åt rent tekniskt för extraktion av antocyanin. I Studien valdes det att fokuseras på tre stycken parametrar dessa var torrsubstans (TS), temperatur (T) och etanolkoncentration (EtOH).

Resultatet av studien visade på att den körparameter som hade störst påverkan på extraktionen av fenoler var torrsubstans. Detta var gemensamt för de båda extraktionsmetoderna. EtOH hade ingen signifikant påverkan för extraktionen av fenoler för den traditionella lösningsmedelsextraktionen men det fanns en liten signifikant påverkan för RBR extraktionen. Temperaturen skiljde sig så att, signifikansnivån var högre i början för RBR extraktionen jämfört med traditionella lösningsmedelsextraktionen där signifikansnivån var som störst vid 16 minuter.

Nyckelord: traditionell lösningsmedelsextraktion, rotating bed reactor, Box-behnen design, nära infraröd spektroskopi, partial least squares

## Summary

The Nordic berries are very attractive on the international market. The bilberry is for instance used as a raw material for the production of nutrition supplements, cosmetics and other health products. Of the bilberries that grows in the Swedish forests today only five percent is collected. There is thus an untapped resource that year after year are wasted away in the Swedish forests.

The objective of this study was to investigate the effect of various extraction conditions and determine the optimal ratio between the various parameters and to find the best conditions to maximize the extraction of phenols from the press residue of bilberry. The study aimed at comparing traditional solvent extraction and extraction using Rotating Bed Reactor (RBR) and how these two extraction methods differs technically for extraction of anthocyanins. The study focuses on three extraction parameters. The parameters that was selected was dry matter extracted (TS), temperature and ethanol concentration (EtOH).

The results of the study showed that the parameter with the greatest impact of extraction of phenols was TS. This was valid for the two extraction methods. EtOH had no significant impact for the extraction of phenols for the traditional solvent extraction, but there was a small significant effect of EtOH for the RBR extraction. The temperature differed in the way that the significance level was higher in the beginning for the RBR extraction method, compared to the traditional solvent extraction where the significance level was not significant until 16 minutes.

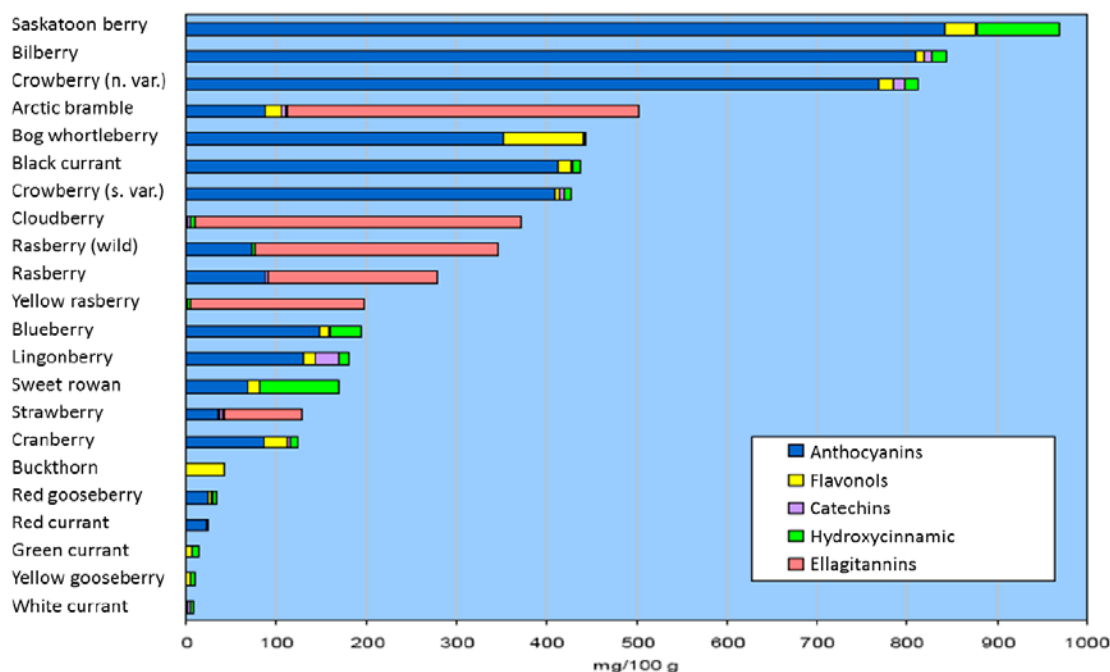
# Innehållsförteckning

Introduktion.....	5
Mål och syfte.....	7
Avgränsningar.....	8
Material och metoder .....	9
Traditionell lösningsmedelsextraktion.....	9
Rotating bed reactor.....	10
UV-spektroskopi.....	11
Box-Behnken design.....	11
Analysverktyg.....	12
Resultat .....	13
Traditionell lösningsmedelsextraktion.....	13
RBR-Extraktion .....	18
.....	19
Diskussion.....	23
Referenser .....	25

## Introduktion

De Nordiska skogsbären är väldigt attraktiva på världsmarknaden, inte bara som bär utan även som ett råmaterial för produktion av näringstillskott, kosmetik och hälsoprodukter. Men av de blåbär (*Vaccinium myrtillus*) som växer i de svenska skogarna plockas uppskattningsvis bara fem procent, resten av bären blir kvar i skogen (Cederblad, 2016). Av de blåbär som plockas kommersiellt i Sverige idag går nittio procent på export (Lillhonga, et al., 2015). Den främsta exporten går via grossister till fabriker i Europa eller Kina. Där extraheras bären och säljs vidare i pulverformat till främst Japan där de används inom kosmetik och hälsoprodukter. Detta på grund av blåbärets rikedom på antioxidanter, där den viktigaste antioxidanten i blåbär är antocyanin (Lillhonga, et al., 2015).

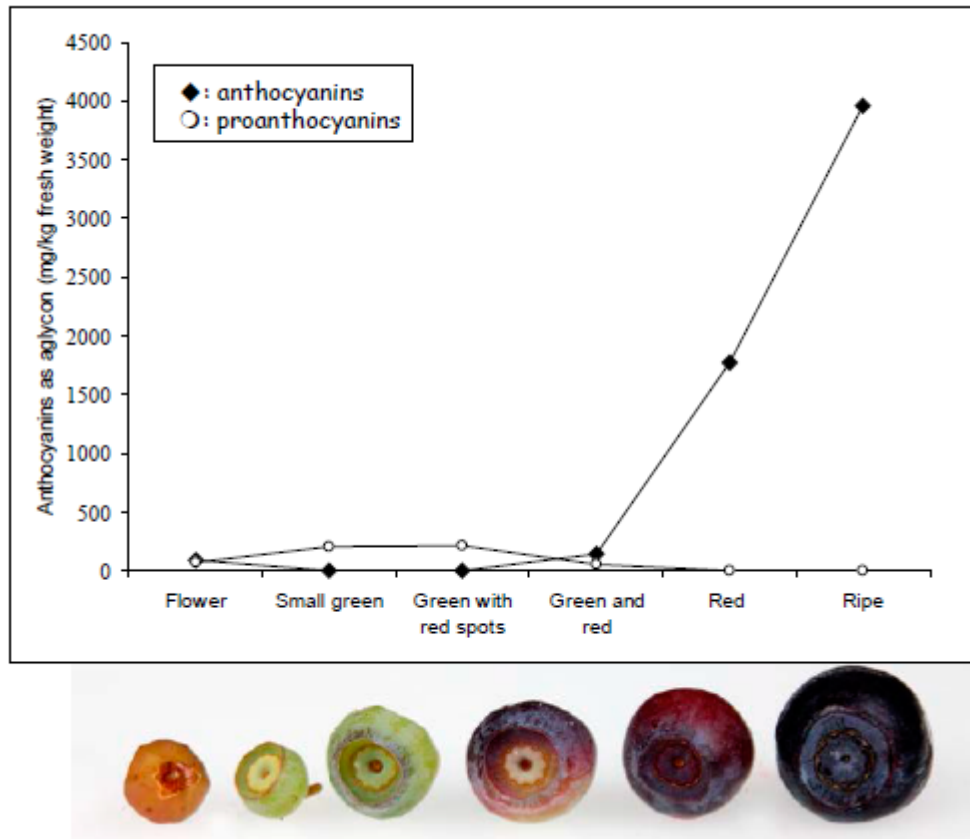
Det ekonomiska värdet i de Nordiska skogsbären är alltså betydligt större än bara produktion av sylt, saft mm. Särskilt med en ökad kunskap om bärens eventuella positiva hälsoeffekter (Basu, et al., 2010). Det finns bland annat studier som visar på att extrakt från blåbär kan förebygga cancer. En studie gjord i Kanada har visat att tranbärsjuice har en hämmande effekt på bröstcancer (Neto, 2007). Anledningen till att blåbär hade en större cancer hämmande effekt än andra typer av bär har i studier visat sig bero av de höga halterna av antocyanin (Katsube, et al., 2003). Den totala halten antocyaniner i blåbär ligger mellan 550 och 850 mg/100g bär (Määttä-Riihinen, et al., 2004). Med dessa halter är blåbär ett av de antocyanin rikaste bären figur 1.



**Figur 1.** Mängden polyfenoler i olika bär (Riihinen, 2005).

*Figur 1. The concentrations of chemical components in different berries*

Halten antocyanin varierar dock under växstsäsongen, där särskilt tillgången på vatten under blåbärets tillväxtfas är av betydelse för produktion av fenoler (Åkerström, et al., 2009). Andra faktorer som påverkar halten antioxidanter är växtplats, tillgång till solljus och tidpunkt för plockning av blåbären (Lillhonga, et al., 2015). Skillnaden i antocyaninhalten i bären under de olika tillväxtfaserna är stor och tidpunkten för plockningen av bären är av stor betydelse figur 2.



**Figur 2.** Variation av mängden antocyanin (mg/kg färskvikt) under olika tillväxtstadierna för blåbäret (Jaakola, et al., 2002).

**Figure 2.** The amount of anthocyanin (mg/kg) of fresh weight in different growth stages of bilberry

Förutom sina positiva hälsoeffekter har blåbär en uppskattad smak och används därför ofta i olika mat produktertillexempel sylt och juice. Vid juiceproduktion uppkommer det en restprodukt i form av presskaka, som består av blåbärets skal och frön. Dessa delar i blåbäret har en hög halt av fenolerv vilket leder till att juice har betydligt lägre innehåll av polyfenoler än själva blåbäret (Dinkova, et al., 2014). Detta visar att det svenska blåbäret inte till fullo utnyttjas. Om man hade kunnat öka den kommersiella plockningen av blåbär och dessutom öka användandet av de restprodukter som uppstår vid produktion av matprodukter hade ett mervärde uppstått.



## Mål och syfte

Detta examensarbete syftar till att med hjälp av en extended Box Behnken design (BBD) optimera extraktion av antocyanin ur blåbärspresskaka. I detta arbete jämfördes två extraktionsmetoder. De extraktionsmetoder som jämfördes var traditionell lösningsmedelsextraktion och extraktion med hjälp av Rotating Bed Reactor (RBR). I studien varieras tre parametrar enligt en design dessa tre parametrar är temperatur ( $\text{temp}(\text{C}^\circ)$ ), torrsubstans ( $\text{TS}(\text{g})$ ) och etanolkoncentration ( $\text{EtOH}(\text{g})$ ). Målet med studien är att finna den bästa extraktionsmetoden och att hitta optimala extraktionsförhållanden samt undersöka hur och i vilken utsträckning de olika körparametrarna påverkar extraktionen av antocyanin.

## Avgränsningar

Avgränsningar för detta examensarbete grundar sig i optimering av extraktion av ett bärsortiment i detta fall presskaka av blåbär (*Vaccinium myrtillus*). Studien hade också kunna tillämpas på andra bär till exempel kråkbär (*Empetrum nigrum*) eller aronia (*Aronia prunifolia*). Ett alternativ hade också kunnat vara att göra en studie på extraktion av hela bär.

I denna studie kommer två extraktionsmetoder att användas dels en traditionell lösningsmedels-extraktion samt en extraktion med hjälp av Rotating Bed Reactor (RBR). För dessa extraktionsmetoder kommer tre olika parametrar att varieras på två nivåer, dessa tre faktorer är temperatur (temp(C°)), torrsubstans (TS(g)) och etanol koncentration (EtOH(g)). Ytterligare en möjlighet hade varit att varit att variera omrörningshastigheten för extraktionslösningen. För att detta arbete ska ha ett rimligt antal körningar varieras endast de tre ovannämnda parametrarna. Dessa parametrar kommer att varieras på två nivåer med centrumpunkter (CP) se tabell 1. För temperatur kommer försöken att göras vid 20/40/60 °C, TS kommer att köras på 6,66g/10g/20g och EtOH kommer att testas med 80g/160g/240g (20 %, 40 %, 60 %). För extraktion med RBR kommer temperaturen att ha samma värden som för den traditionella-lösningsmedelsextraktionen, men för de andra två körparametrarna kommer begränsning i volym att göra att TS och EtOH blir hälften så stor i detta fall blir det 3,33g/5g/10g för TS och EtOH kommer att testas med 40g/80g/120g (20 %, 40 %, 60 %).

**Tabell 1** Värdena för de tre olika körparametrarna, där värdet för RBR är inom parentes

**Table 1** The values for the three different runparameters, where the unique value of the RBR is within parentheses

Parameter	Nivå		
EtOH-vikt(%)	20	40	60
Temp (C°)	20	40	60
Vikt (g)	6,66 (3,33)	10 (5)	20 (10)

I denna studie jämfördes traditionell lösningsmedelsextraktion och RBR extraktion med målet att se hur extraktion med de två olika teknikerna skiljer sig åt. Det hade också varit möjligt att göra en jämförelse mellan dessa två extraktionsmetoder och en två-fasextraktion men för att detta arbete skulle vara av lagom storlek gjordes en parallell studie av extraktion enligt två-fasextraktion av en annan student (Simon Wikström). De två extraktionsmetoderna utfördes med etanol och vatten som extraktionsmedel. Det mest använda extraktionslösningsmedlet vid extraktion av växt material är acidifierad metanol eller aceton blandning men för extraktion till livsmedel är en lösning av etanol och vatten att föredra (Aaby, et al., 2013). Efter som extrakt från blåbär i de flesta fall används som kosttillskott eller liknande produkt, var etanolblandning det mest relevanta lösningsmedlet.

Den design som användes i detta arbete är Box-Behnken design (BBD), den ansågs vara lämplig efter som den gör det möjligt att analysera flera faktorer. Andra designer som hade kunnat vara applicerbara är Doehlert matrix, central composite design eller three-level full fractional design. Box-Behnken design och Doehlert matrix har visat sig varit något mer effektiv än, central composite design men mycket mer effektiv än three-level full fractional design (Ferreira, et al., 2007). Av denna anledning utslöts dessa och valet föll på BBD. I en BBD har man också fördelen att extremvärdena inte får samma vikt som de centrala delarna, alltså kommer de extraktionsparametrar som ligger centralt att testas fler gånger än de yttersta.

## Material och metoder

Studien utfördes på blåbärspresskaka av (*Vaccinium myrtillus*) som anskaffades via *Kamrose Scandinavian berries ab* Nordmaling. Presskakan förvaras sedan i frys för att bevara antocyaninerna och underlätta frystorkningen. Det första steget i denna del blir att räkna ut torrsubstansen (TS) för presskakan. Det görs genom att väga den frysta presskakan två stycken prover kommer att tas. De två proverna placeras i en skål och får sedan ligga i ett dygn i ett torkskåp (105 °C) så att allt vatten försvinner. Efter ett dygn tas proverna ut och placeras i en exsickator där de får kylas av i drygt en timme. En exsickator är torr miljö och eftersom provet är tort kommer ingen fukt att tillföras till miljön. Om proverna istället hade fått svalna i ett vanligt rum hade den torkade presskakan kunnat absorbera fukt och torrsubstansen (TS) hade blivit felaktig. När proverna svalnat vägs de och torrsubstans (TS) beräknades.

I studien användes fragment på presskaka av blåbär som bearbetats till ett pulver. Vid framställningen av detta pulver täcktes sex metallfat med fryst presskaka. Det är viktigt att faten inte blir överfulla eftersom detta leder till en långsammare torkning. En lämplig mängd presskaka per fat bedömdes vara ungefär 350g. När alla sex faten fyllts upp med presskaka av blåbär, placerades de i en frystork (Edwards E2M5). Frystorken startades ca 15 minuter innan körningen för att temperaturen skulle hinna sjunka till ungefär -45 °C. För att frystorkningen ska fungera är det viktigt att det bildas ett vakuum i torken så att ingen luft kommer in i systemet. Presskakan fick sedan torka i frystorken i knappt tre dygn torkningen är klar när trycket är 0,075 mbar (temp ≈ -50 °C).

Efter torkningen vägdes den torkade presskakan och den frystorkade vikten noterades. Varefter de är färdiga att bearbetas till ett pulver. Det gjordes i en kulkvarn av märket Retsch Mixer Mill MM 400, i denna placeras den frystorkade presskakan av blåbären i två stycken behållare med en stålkula, dessa två behållare roteras sedan i 1 minut på hastighet nitton. Efter detta steg är blåbären färdig bearbetade och klara för att extraheras. Fram tills extraktionen förvaras pulvret i en frysbox.

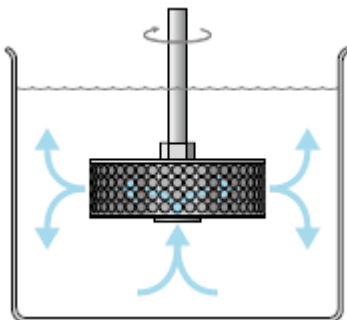
### *Traditionell lösningsmedelsextraktion*

Första steget blir att väga upp etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) och vatten (H<sub>2</sub>O), de tre olika mängderna etanol som testades är 80g/160g/240g (20 %, 40 %, 60 %), och den totala volymen ska totalt uppgå till 400 g i varje försök. Tillexempel 320 g vatten vid 80 g etanol. Vatten och etanol vägs och blandas i en E-kolv. Därefter vägs blåbärspulvret. Pulvret tillsätts till etanol och vatten lösningen, dessa steg kommer att ske inför varje extraktion, inför de extraktioner som ska göras vid 40 °C respektive 60 °C måste etanol och vatten lösningen placeras i den klimatkammare där extraktionerna kommer att utföras för att lösningen ska värmas upp till rätt temperatur. Klimatkammare finns att tillgå på institutionen för ekologi miljö och geovetenskap (EMG). Blå bärspulvret placeras dock inte i klimatkammaren i förväg då dessa inte behöver komma upp i 40 °C respektive 60 °C för att resultatet ska bli tillförlitligt. E-kolven placeras sedan på en magnetomrörare och i E-kolven placeras en magnetloppa för att lösningen ska få en jämn och konstant omrörning. Samtliga prover kommer att köras med en omrörningshastighet på 300 för resultatet inte ska påverkas av olika omrörning.

Ett noll prov tas ut direkt vid extraktionsstart med hjälp av fin-pipett där provet består av drygt 10ml av extraktionslösningen, provet sugfiltreras omedelbart och placeras sedan i provrör med lock. Samma procedur upprepas efter 8, 16, 32 och 64 minuter vid varje tidpunkt tas ca 10 ml av extraktionslösningen. Viktigt är att E-kolven under extraktionen täcks med ett lock eller parafilm så att etanolen inte dunstar (detta görs för samtliga provlösningar). Utöver dessa fem prover kommer ett noll prov samt ett prov vid 64 minuter att tas, för att sedan skickas till Finland (Centria) för analys. Dessa två prover motsvarar ca femton ml av extraktionsvätska.

### *Rotating bed reactor*

Den andra extraktionsmetoden som användes i denna studie var en RBR extraktion. Utgångspunkten för denna extraktions metod var att blåbärspulvret vägdes upp och placerades i en reaktor figur 3. Sedan vägdes vatten och etanol upp. Vatten och etanol lösningen placerades sedan i en behållare. Eftersom att denna behållare är av begränsad storlek halveras vatten och etanol mängden jämfört med den traditionella-lösningssmedelsextraktionen på grund av detta var också TS tvungen att halveras. Efter att detta var gjort sänktes reaktorn med blåbärspulvret ner i lösningen och ett lock placerades på reaktorn för att inte etanolen skulle avdunsta. Sedan startades RBR:en och reaktorn med blåbärspulver börjar att rotera i lösningssmedlet. En slang pump används för att pumpa runt extraktionslösningen, från denna slang togs prover efter 2, 4, 8, 16, 32 och 64 minuter. Proverna analyserades direkt med NIR (Tec5) och sparades sedan i ependorfrör två stycken för varje tidpunkt. Samtliga prover frystes sedan ner och analyserades vid senare tillfälle i en UV-spektrometer (UV-1800 Shimadzu).



**Figur 3** Reaktor för RBR och hur vattnet flödar genom den.

*Figure 3* Reactor of the RBR and how the water flows through it.

### *NIR-spektroskopi*

För mätning av total fenolhalten används när-infraröd (NIR) spektroskopi. Extraktionsvätska från samtliga tider inom en körning pipeteras upp och placeras i en flödeskyvett och transmittansen mäts. För att få korrekta NIR-mätningar är det viktigt att kyvetten fylls så att det inte finns några luftbubblor i kyvetten, för detta krävdes cirka 5 ml av extraktionsvätska. När flödeskyvetten fyllts med prov mäts NIR med TEC 5 som styrs via en dator med mjukvaran (agrospec). I mjukvaran visas resultaten från NIR körningarna i form av diagram. TEC 5 mäter transmittansen i våglängdsområdet 205-2200 nm med en resolution på 10. Våglängderna över 1805 nm uteslöts senare på grund av brus. Denna bortselektering gjordes i analysprogrammet Evince.

## UV-spektroskopi

Utöver NIR-spektroskopi genomfördes även UV mätningar på extraktions vätska. En standardkurva för gallsyra mättes, i det första momentet löstes 0,005g torkad gallsyra i 10 ml EtOH i en 100 ml mätkolv. Efter att gallsyran lösts späds lösningen upp till 100 ml med H<sub>2</sub>O. Utifrån denna spädning gjordes sedan en standard kurva från 1 ml upp till 20 ml av gallsyra-lösningen samt ett nollprov se tabell 2. Från dessa fem standard lösningar tas 20µl med hjälp av fin-pipett, därefter tillfördes 1,58 ml H<sub>2</sub>O och 100 µl Folin-Ciocaltru reagens. Efter att dessa steg utförts blandas lösningarna med hjälp av skakplatta. Sedan tillsätts 300 µl sodium carbonat och lösningen skakas åter igen väl. Standard proverna får sedan stå i värmeskåp i 30 minuter i 40 °C. För samtliga standard prover gjordes ett dubbelprov medelvärde av dessa två används för fastställning av standardkurvan. Parallellt med standardkurvan förbereds även 2-4st körningar av extraktionslösning. Även här förbereds dubbelprov för samtliga lösningar. Förberedelserna för dessa lösningar är densamma som för standarden men istället för gallsyra-lösningen tillsätts 20 µl av extraktionslösningen. Efter att proverna står i värmeskåpet i 30 minuter avläses proverna i en UV-spektrometer (UV-1800 Shimadzu) med 765nm våglängd. Först kalibrerades nollproverna mott varandra, detta kan behöva göras några gånger för att nollan ska stabiliseras. Efter att nollan stabiliserats läses standarden in. När samtliga prover från standarden är mätta, mäts proverna med extraktions lösning in för den traditionella lösningsextraktionen totalt blev detta tio stycken prover 2\*5 och för RBR extraktionen tolv stycken 6\*2 efter som att dubbel prov mätts. Värdena för extraktionslösningen bör inte ligga över standarden. Om så var fallet späddes lösningen, detta gjordes genom att 1 ml av extraktionslösningen tas upp med hjälp av fin-pipett, till detta tillfördes sedan H<sub>2</sub>O för att extraktionslösningens koncentration ska ligga inom standardkurvan. Spädnings moment var inte nödvändigt för samtliga körningar och inte heller samtliga prover inom en körning.

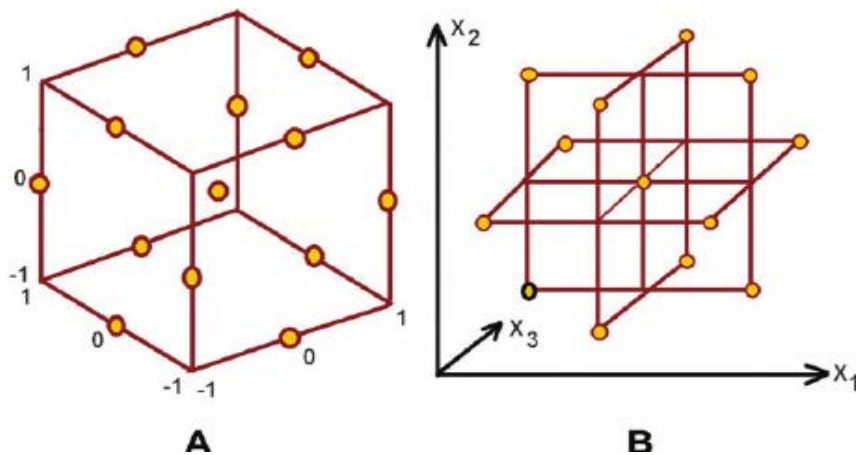
**Tabell 2** Mängden gallsyra-lösning samt vilken koncentration detta motsvarar

*Table 2* The amount of bile acid solvent and the concentration this corresponds to

Mängd	1ml	3ml	10ml	15ml	20ml
Koncentration	50mg/l	150mg/l	500mg/l	750mg/l	1000mg/l

## Box-Behnken design

Experimentet har utförts enligt en Box-Behnken design (BBD) figur 4. Box-Behnken design (BBD) är en roterbar eller nästan roterbar andra ordningens design baserad på tre eller flera nivåer av ofullständiga faktorer (Ferreira, et al., 2007). Detta gör att det med Box-Behnken design (BBD) är möjligt att analysera de tre tidigare valda faktorerna. Totalt genomfördes femton stycken körningar per extraktionsmetod, till dessa femton tillkommer sex stycken körningar för att få med extremvärden. För EtOH och TS kommer dessa värden att lita utanför själva boxen däremot kommer temperatur att lita inom yttervärlden eftersom att etanol har en kokpunkt på drygt 78 °C och att det inte på rimligt vis går att få en temperatur under 20 °C. Eftersom att designen kommer att innehålla extremvärden är Box-behnken designen inte längre roterbar. Detta kan förklaras med en kub. En kub som bara har ytvärden är roterbar eftersom att punkterna hamnar på samma ställe även om du roterar kubben. Om du som i detta fall har värden som ligger utanför kubben är den inte längre roterbar eftersom att dessa värden inte hamnar på samma ställe om kubben roteras figur 4.



**Figur 4.** Förenklad bild av en Box-behnken design (Pant & Chauhan, 2013).

*Figure 4.* A simplifeyd image of Box-behnken design (Pant & Chauhan, 2013).

## Analysverktyg

De analys verktyg som har använts för att analysera data i denna studie är Modde version 10.1 (Umetrics) och Evince (Prediktera, Umeå). Modde fungerar som ett analys verktyg för själva designen och hur bra den är. I Modde analyseras de olika responsytorna för att se hur stor påverkan de olika körparametrarna har för resultatet av extraktion av antocyanin. I Modde analyserades också samspelet mellan olika körparametrar. Som grund för analysen i Moode användes värdena från UV-spektroskopin.

Det andra analysverktyget Evince grundar sig i värdena från NIR mätningarna, i Evince plottas data från samtliga körningar och samtliga tider inom körningarna. I Evince delades sedan dessa plottar in i grupper för att se olika samband mellan de olika körparametrarna.

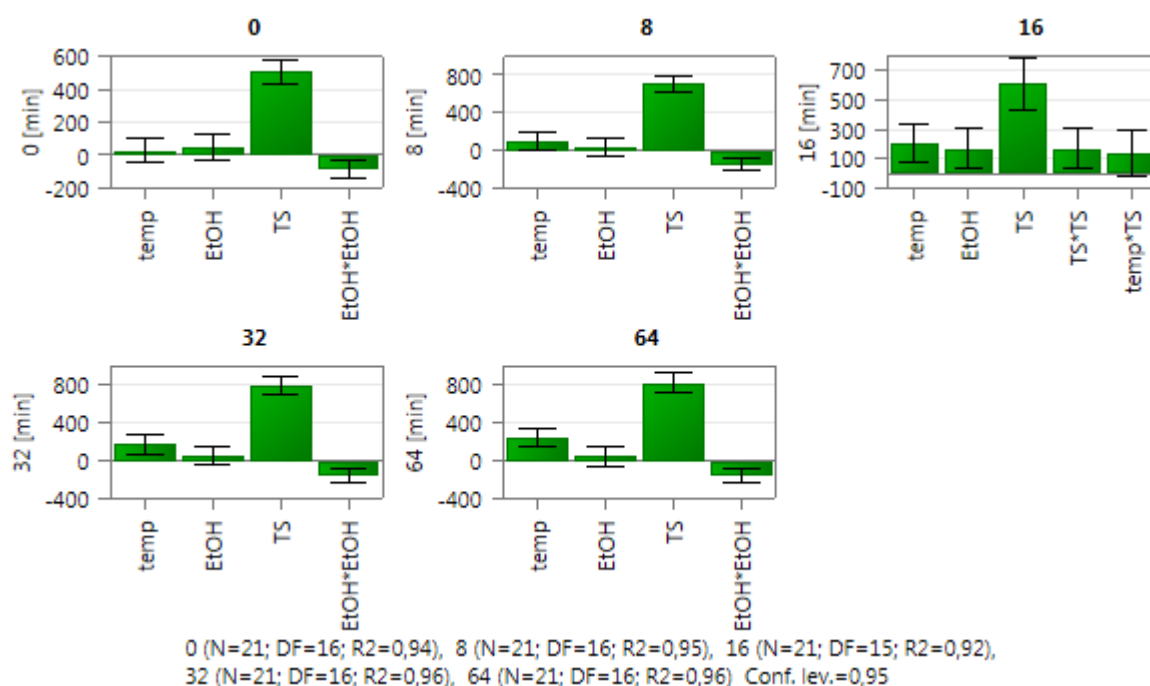
Som statistiskt analysverktyg användes Principal Components Analys (PCA). PCA är inom statistik ett av de mest använda statistiska verktygen. I detta statistiska analysverktyg används datareducering, den ursprungliga datamatriken omvandlas sedan till en uppsättning av huvudkomponenter. Denna data reducering gör att data blir mer hanterbar och lättare att överskåda. På detta vis kan mönster av variation observeras inom variablerna (Hamilton, 1992). PCA är ett multivariat analysverktyg som analyserar datatabellen, målet är att extrahera den viktiga informationen från tabellen, för att representera det som ett set av nya orthogonala variabler som kallas principal components (Abdi & Williams, 2010). Visualiseringar av huvudkomponenter är ett bra sätt att upptäcka klasser, grupper och extremvärden inom datasetet.

Partial Least Squares (PLS) är det andra statistiska analysverktyget i Evince. Detta statistiska analysverktyg använder två data matriser för regression, X och Y. Med hjälp av PLS algoritmer hittas komponenter i X som kan förklara så mycket som möjligt av variationen i Y. För varje PLS komponent beräknas en vektor (W), vilket ger den maximala kovariansen mellan X och Y (Westerberg, u.d.).

## Resultat

### Traditionell lösningsmedelsextraktion

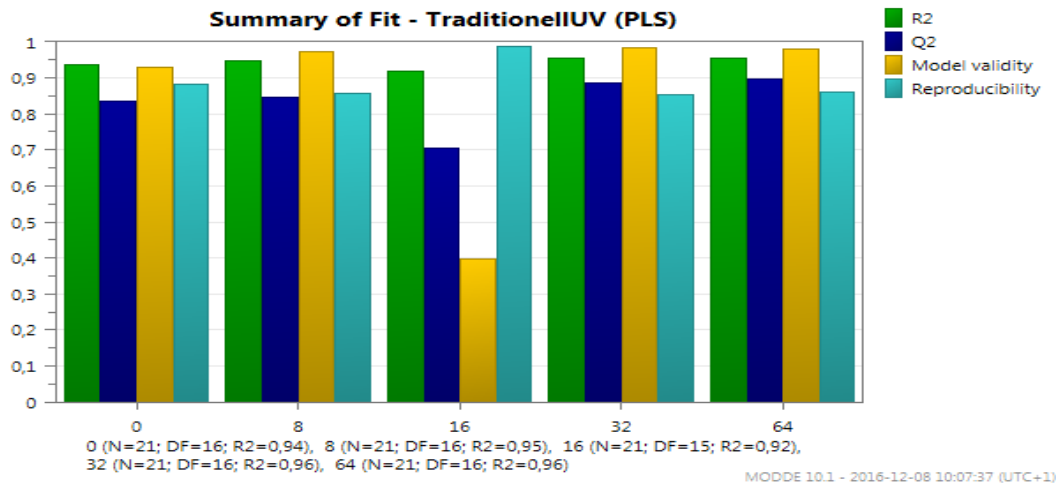
Resultaten från den traditionella lösningsmedelsextraktionen visar att torrsubstansen är signifikant för extraktionen av antocyanin. Denna körparameter är signifikant för samtliga extraktionstider (5st) figur 5. Vidare visa resultaten att temperatur för 0 och 8 minuter inte är signifikant för extraktionen av antocyanin, denna körparameter blir först signifikant vid 16 minuter och förblir signifikant även för 32 och 64 minuter figur 5. Etanol har ingen signifikant påverkan förutom för 16 minuter men EtOH\*EtOH har en signifikant negativ effekt på extraktionen av antocyanin för resterande tider. Övriga samspel har inte någon signifikant påverkan.



**Figur 5.** Körparametrarna för samtliga provtagningstider och dess signifikansnivå.

*Figure 5.* The runparameters for each sampling time and the significance level

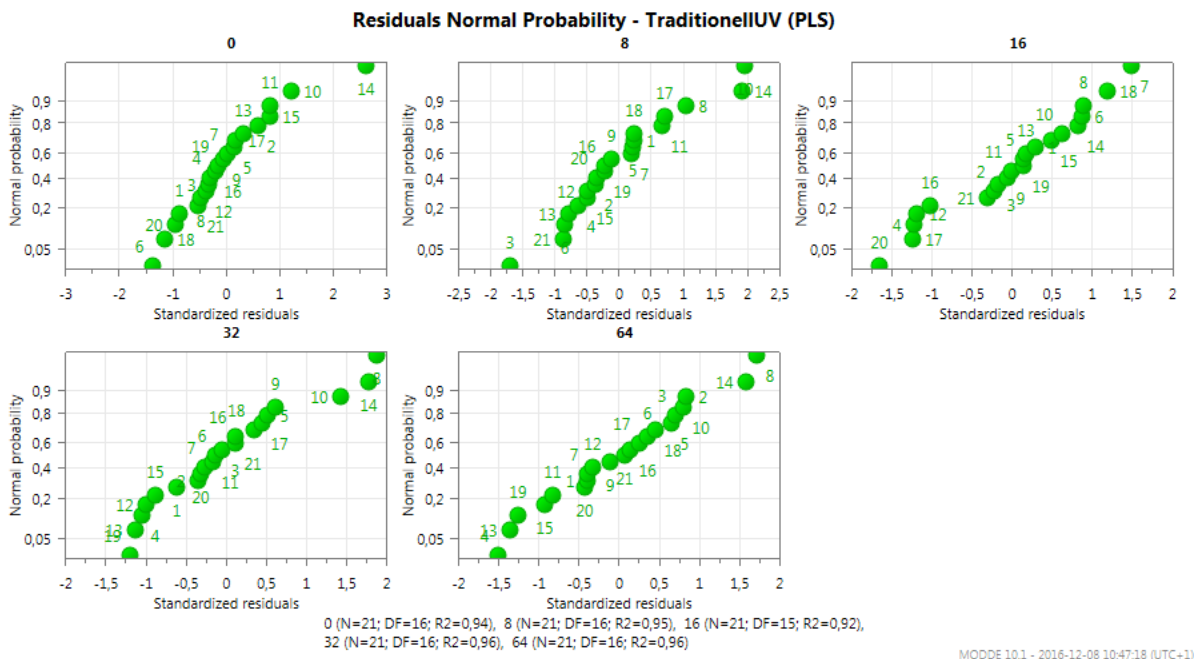
Analysen med hjälp av PLS ger ett högt R2 vid samtliga tider, R2 ligger som lägst vid 16 minuter med ett värde på 0,92 och som högst vid 32 minuter med ett värde på 0,96. Det höga R2 visar på att modellen är väl anpassad utifrån data figur 6. Q2 värdet ligger högt för samtliga tider lägst ligger den vid 16 minuter, det höga Q2 värdet visar att modellen gör bra skattningar av nytt data. Dessa två resultat visar på att modellen kan förklara datasetet bra. Model validity ligger för samtliga tider över 0,25 vilket är det kritiska värdet om värdet ligger under 0,25 är felet i modellen signifikant större än det verkliga felet. Reproducibility är högt och visar där med att under liknande förutsättningar är sannolikheten stor för att resultaten blir det samma.



**Figur 6.** Summary of fit för fyra olika kolumner, dessa kolumner beskriver hur väl datat är anpassat till modellen. (R2, Q2, Model validity, Reproducibility)

*Figure 6. Summary of fit for four different columns, these columns all describes how good data is customed for the model. (R2, Q2, Model validity, Reproducibility)*

Residualerna för den traditionella lösningsmedelsextraktionen visar att datat är normalfördelat för samtliga tidpunkter. Samtliga residualer ligger inom -4 och +4 standardavvikelser. Residualerna är slumpmässiga och normalfördelade vilket leder till ett linjärt samband figur 7.

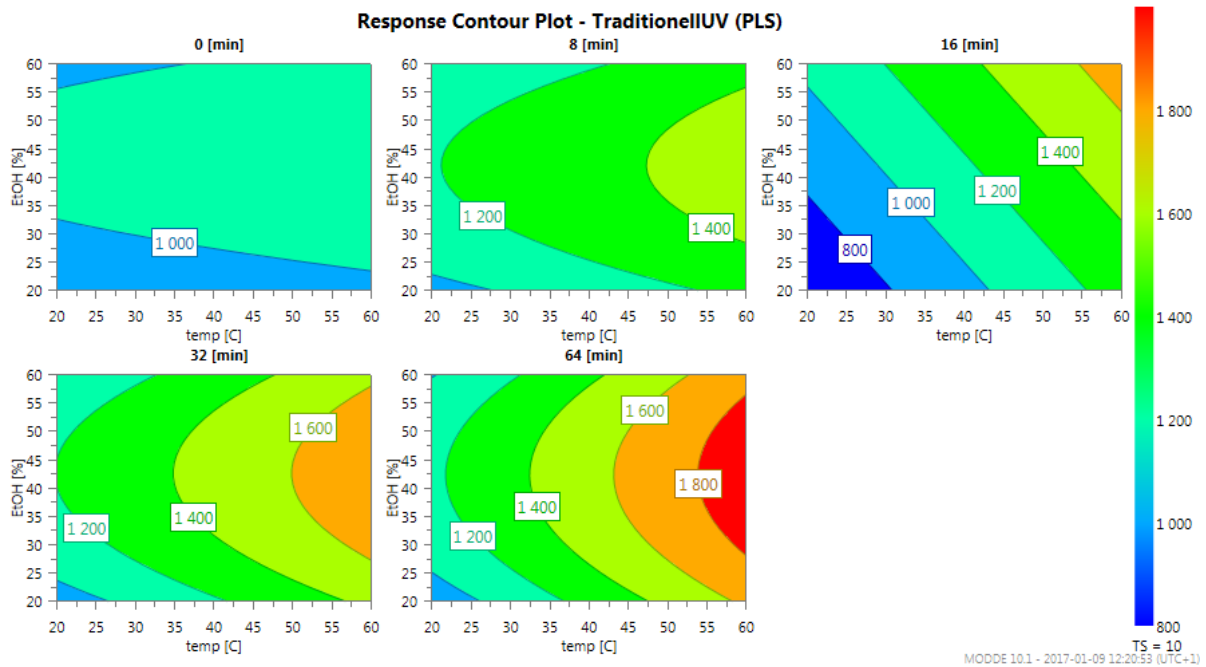


**Figur 7.** Normalfördelningen för samtliga provtagningstider

*Figure 7. The normal distribution for each samplingtime*



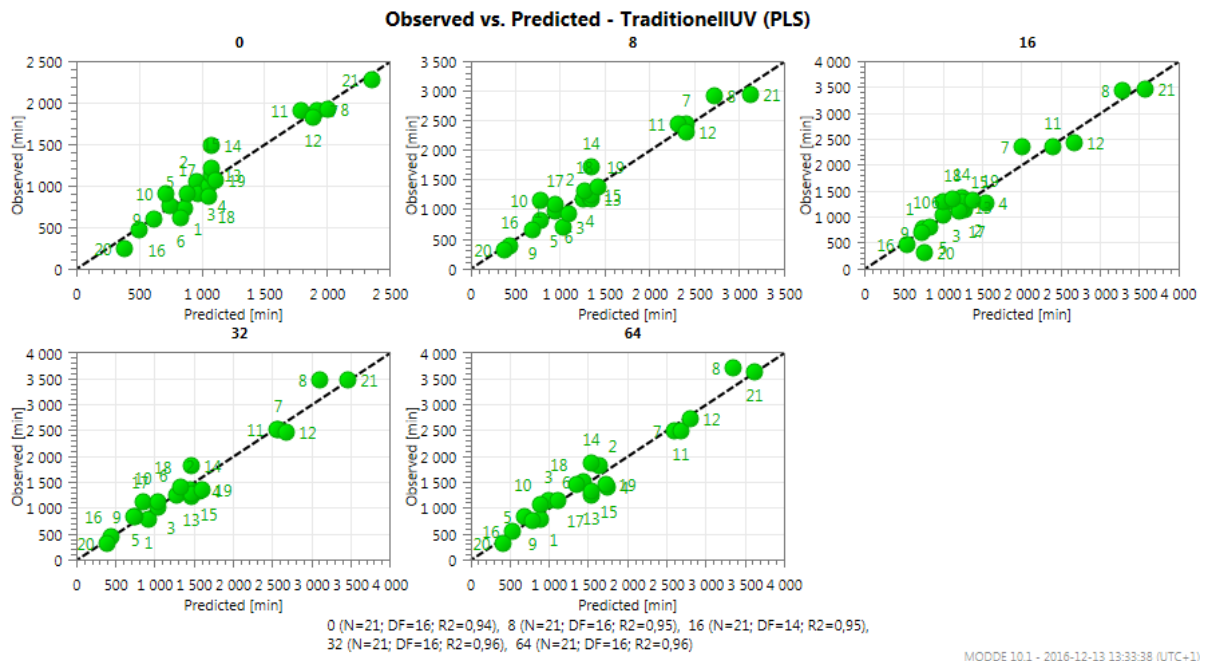
Resultaten visar att polyfenolhalten ökar med temperatur och TS. Fenolhalten ökar även med ökad extraktionstid. Fenolhalten blir inte högre med en ökad etanolkoncentration, för denna parameter ligger optimum istället stabilt vid ca 42 % detta gäller inte vid 16 minuter då polyfenolhalten även ökar med ökad etanolhalt figur 8.



**Figur 8.** Polyfenolhalten påverkan av temperatur och etanolhalt vid (TS=10) för samtliga provtagningsstider

**Figure 8.** Polyphenolcontent related to temperature and ethanol concentration at (TS=10) for each samplingtime.

De predikterade värdena stämmer för samtliga tider bra med det observerade värdena. Detta indikerar att modellen är bra. Det finns inga tydliga outliers för någon av tidpunkterna figur 9.



**Figur 9.** Hur väl de observerade värdena stämmer med de predikterade värdena för samtliga provtagningstider.

**Figure 9.** How the observed values matches with the predicted values for each samplingtime.

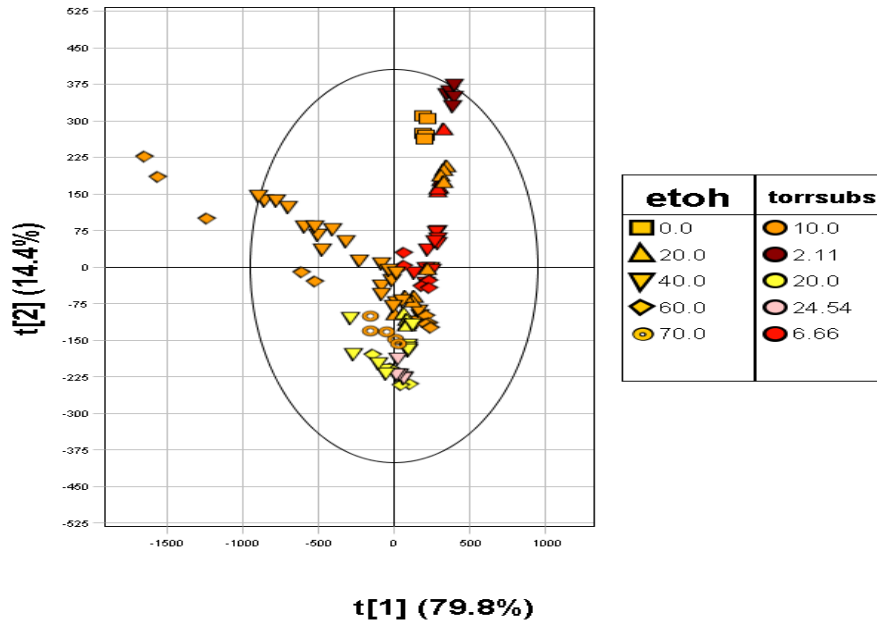
Analys av UV mätningarna visar att koncentrationen polyfenoler ökar med tiden. Koncentrationen av antocyanin blir högre med ökad extraktionstid tabell 3. Medelkoncentrationen av fenoler för replikaten ligger för 0 minuter på 1202 mg/l motsvarande värde vid 64 minuter var 1453 mg/l. Störst skillnad i koncentrationen var mellan 16 och 32 minuter där skillnaden i koncentration var 136 mg/l. Skillnaden mellan övriga tider var alla mindre än 100 mg/l.

**Tabell 3.** Koncentrationen fenoler vid de olika extraktionstiderna och skillnaden från föregående tid

**Table 3.** The concentration of phenols in the various extraction times and the difference from the previous time

tid	koncentration (mg/l)	Skillnad i koncentration
0	1202	0
8	1219	17
16	1242	23
32	1378	136
64	1453	75

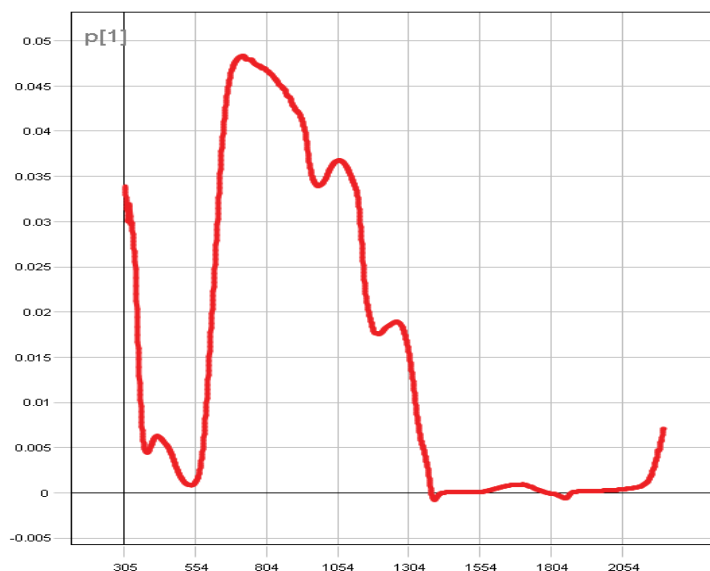
PCA analysen visade för den traditionella lösningsmedelsextraktionen att en vis separation för TS i T2. Det fanns ingen tydlig separation för EtOH eller temperatur. Den tydligaste separationen för TS kan ses för 2,1 g. Skillnaden mellan de högre torrsubstanserna är inte lika tydlig då 24,5 g och 20 g ligger samlade relativt tätt figur 10.



**Figur 10.** Separation i t1 och t2 för parametrarna EtOH och TS.

*Figure 10.* Separation in t1 and t2 for the parameters EtOH and dry matter.

Vidare analys med PCA visar på en topp av polyfenoler vid ungefär 800 nm. Den mesta av informationen ligger mellan 550 nm och 1300 nm figur 11.

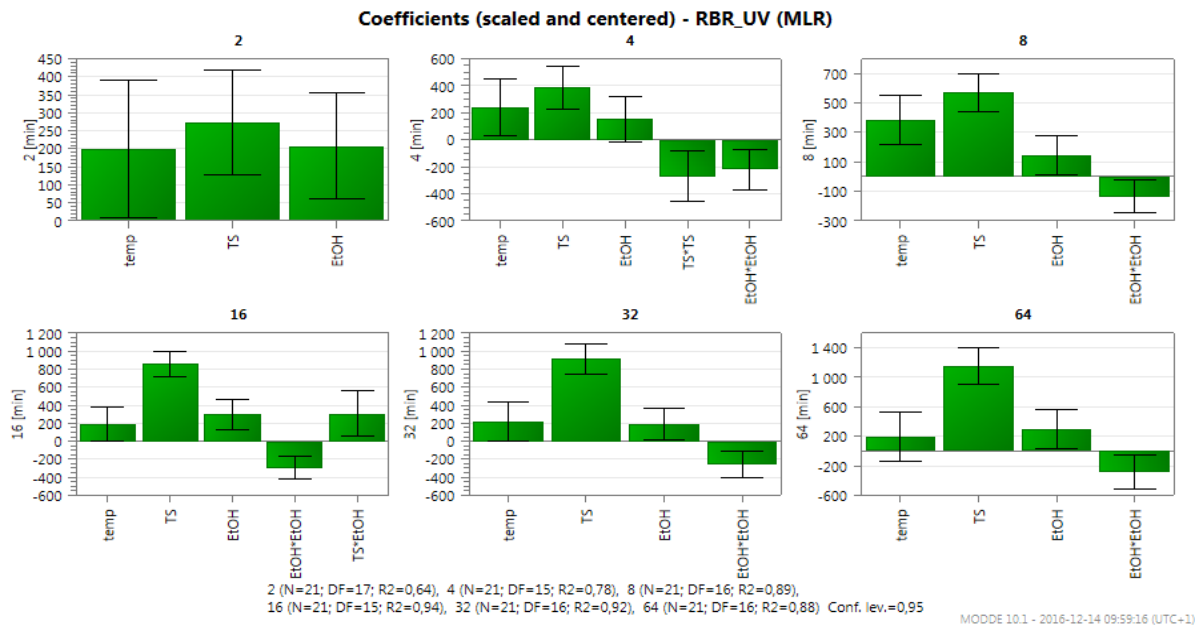


**Figur 11.** Spektra över halten polyfenoler.

*Figure 11.* Spectra of the content of polyphenols.

## RBR-Extraktion

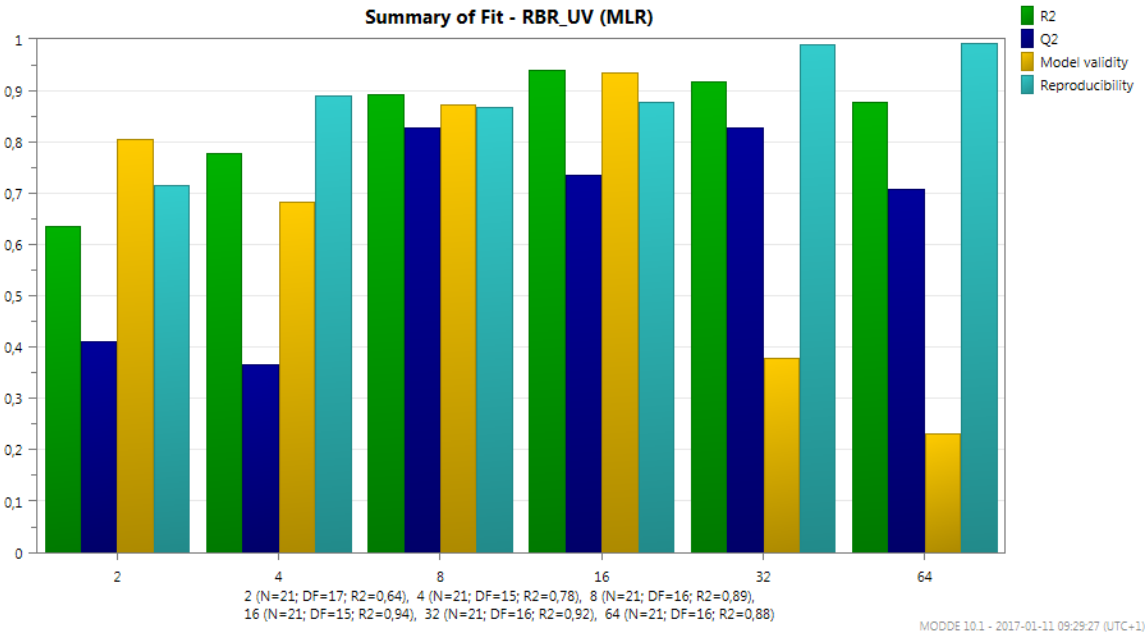
Resultaten för extraktionen med RBR visar att TS har en tydlig signifikant påverkan på extraktionen av polyfenoler vid samtliga provtagningar. Temperaturen är signifikant för samtliga tider förutom 64 minuter denna faktor ökar i signifikans från 2 till 8 minuter och minskar sedan efter 8 minuter. Etanol är främst signifikant efter 2 minuter men även vid 16 minuter. Det enda samspelet som är av positiv signifikans är TS\*EtOH denna är endast signifikant för 16 minuter. EtOH\*EtOH är också signifikant vid 4 av 6 provtider men är negativt signifikant Figur 12.



**Figure 12.** Körparametrarna för samtliga provtagningstider och dess signifikansnivå.

*Figure 12.* The runparameters for each samplingtime and the significance levels

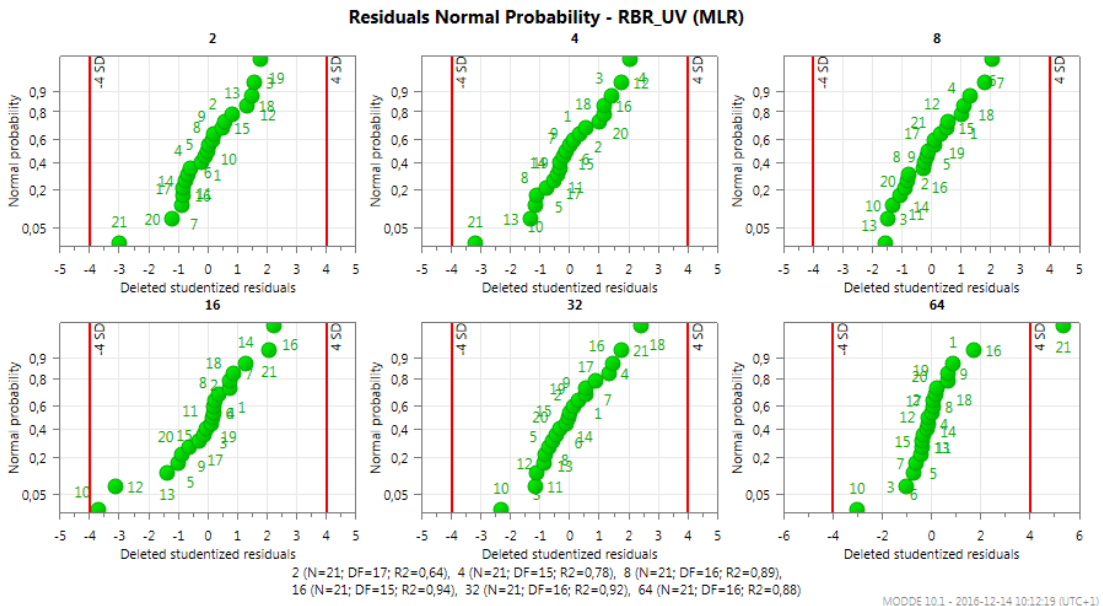
Analys i Modde visar på ett relativt högt R2 vid samtliga tider, R2 ligger något lägre vid 2 och 4 minuter. Övriga tider ligger relativt jämnt mellan dessa varierar R2 mellan 0,88 och 0,94. Det höga R2 värdet visar på att modellen är väl anpassad utifrån datasetet figur 12. Q2 värdet indikerar att modellen har svårare att göra skattningar för de två tidigaste tidpunkterna och stabiliserar sig sedan på en hög jämn nivå. Model validity ligger för samtliga tider utom 64 minuter över 0,25 vilket är det kritiska värdet om värdet ligger under 0,25 är felet i modellen signifikant större än det verkliga felet. Reproducibility är högt och visar där med att under liknande förutsättningar är sannolikheten stor för att resultaten blir det samma figur 13.



**Figure 13.** Summary of fit för fyra olika kolumner, dessa kolumner beskriver hur datat är anpassat till modellen. (R2, Q2, Model validity, Reproducibility)

*Figure 13.* Summary of fit for four different columns, these columns all describes how good data is customized for the model. (R2, Q2, Model validity, Reproducibility)

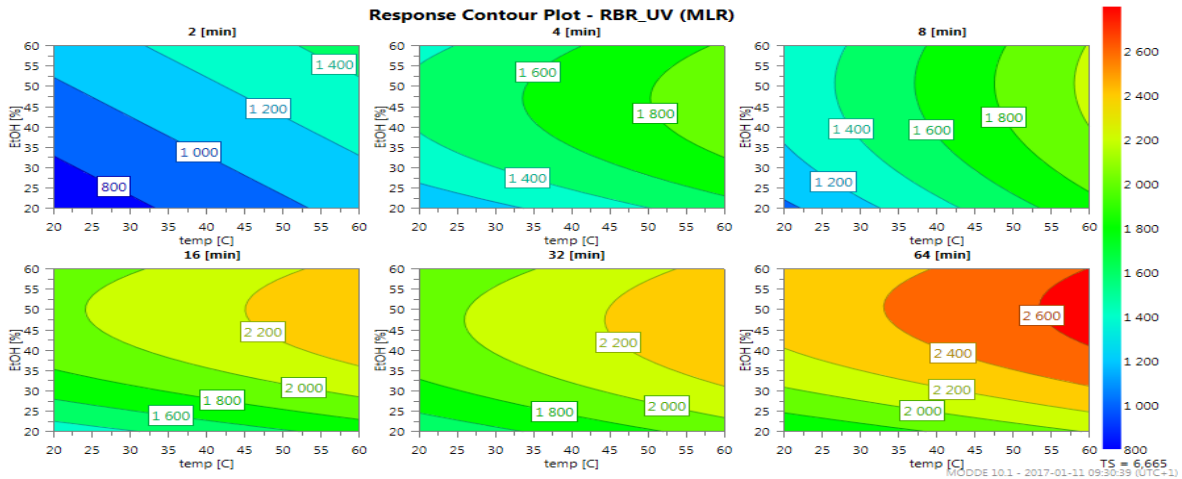
Residualerna för extraktionerna med RBR visar att datat på ett linjärt samband och alla punkter förutom körning 21 vid 64 minuter ligger inom -4 och +4 standardavvikelser. I övrigt är datat randomiserat och normalfördelat Figur 14.



**Figure 14.** Normalfördelningen för samtliga provtagningstider

*Figure 14.* The normal distribution for each samplingtime

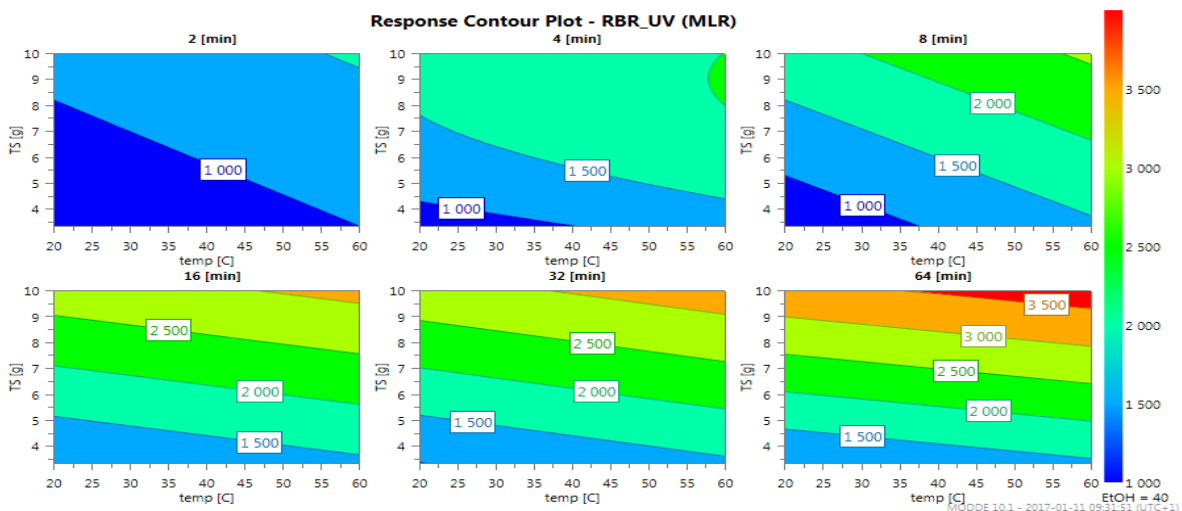
Response contour ploten visar att extraktionen av polyfenoler ökar med en ökande temperatur figur 14. Etanolhalten har en liten positiv effekt men eftersom att den bara är signifikant positiv vid 2 minuter figur 15. För de övriga tiderna är etanol inte signifikant positiv och resultatet av detta blir att polyfenolhalten inte är maximal med ökad etanolhalt. Optimum för etanolhalt ligger mellan 47,5 och 55 % för tiderna 4 till 64 minuter.



**Figur15.** Polyfenolhalten påverkan av temperatur och etanolhalt vid (TS=6,665) för samtliga provtagningsstider

*Figure 15. The polyphenolcontent is affected by temperature and ethanol concentration at (TS=6,665) for each samplingtime.*

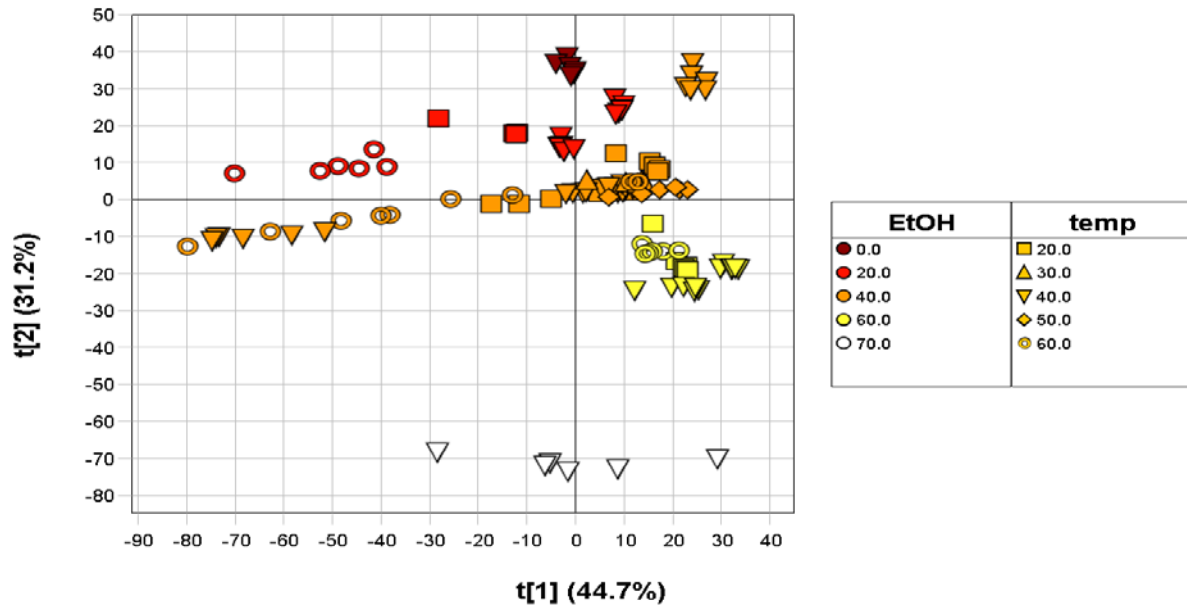
På den andra response contour ploten visar resultaten att polyfenolhalten även ökar med TS figur 15. Alltså har temperatur och TS en positiv effekt på extraktionen av antocyanin och halten polyfenoler ökar med dessa två parametrar. Etanolhalten har jämfört med dessa ett optimum som ligger under den högsta nivån för denna parameter figur 16.



**Figur 16.** Polyfenolhalten påverkan av temperatur och TS vid (EtOH=40) för samtliga provtagningsstider

*Figure 16. The polyphenolcontent is effected by temperature and TS at (EtOH=40) for each samplingtime.*

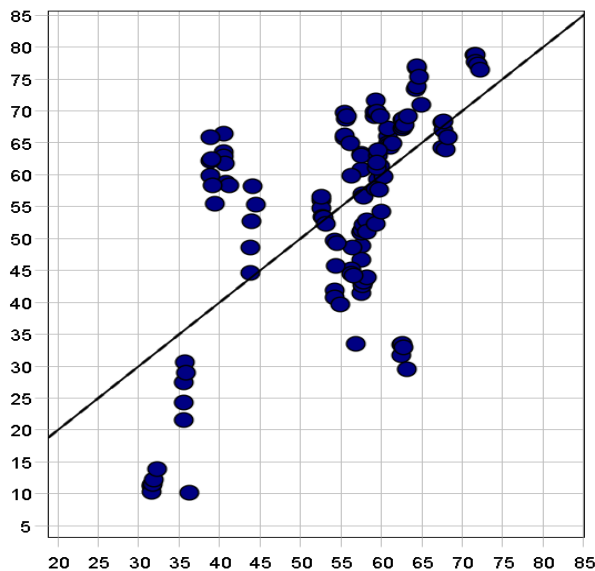
I PCA analysen visade resultaten att EtOH har en tydlig separering i t2, temperatur har ingen tydlig separering. Vidare analyser visar inte på någon tydlig separering för övriga parametrar för RBR extraktionen. För EtOH är den etanolhalt som separerar mest från de övriga den med 70 % EtOH figur 17.



**Figur 17.** Separation i t1 och t2 för parametrarna EtOH och temperatur

**Figure 17.** Separation in t1 and t2 for the parameters EtOH and temperature.

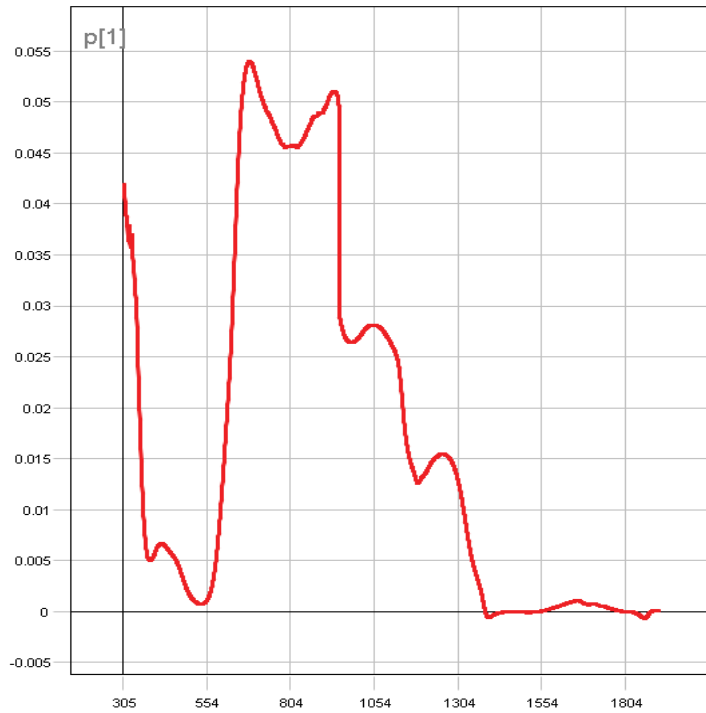
I PLS analysen i evince framkommer de observerade värdena, dessa ligger för RBR extraktionen inte tydligt efter regressionslinjen figur 18.



**Figur 18.** Hur väl de observerade värdena stämmer med de predikterade värdena.

**Figure 18.** How the observed values matches with the predicted values.

Vidare analys med PCA visar på en topp av polyfenoler vid ungefär 800 nm. Den mesta av informationen ligger mellan 550 nm och 1300 nm figur 19.



**Figur 19.** Spektra över halten polyfenoler.

*Figure 19. Spectra of the content of polyphenols.*

Analysen av UV mätningarna för RBR extraktionen visar på att koncentrationen fenoler ökar med tiden. Koncentrationen antocyanin kommer alltså vara högre vid ökad extraktionstid tabell 4. Koncentrationen av fenoler är lägst vid 2 minuter och högst vid 64 minuter. Sambandet är dock inte linjärt då polyfenolhalten är lägre vid 8 minuter jämfört med 4 minuter samt lägre vid 32 jämfört med 16 minuter.

**Tabell 4.** Koncentrationen fenoler vid de olika extraktionstiderna och skillnaden från föregående tid  
*Table 4. The concentration of phenols in the various extraction times and the difference from the previous time*

tid	koncentration (mg/l)	Skillnad i koncentration
2	987	
4	1226	238
8	1194	-31
16	1633	438
32	1561	-72
64	1698	137



## Diskussion

Resultaten från de två olika extraktionsmetoderna visar främst att mängden material som extraheras (TS) har en signifikant påverkan på extraktionen av antocyaniner. De två olika extraktionsmetoderna visar också att temperaturen är signifikant för vissa av tiderna. En skillnad här är att temperaturen för RBR extraktionen är mer signifikant för de tidigaste provtagningarna främst 2 till 8 minuter, för den traditionella lösningsmedelsextraktionen är temperatur istället endast signifikant från 16 minuter och framåt. En anledning till detta kan vara att det tar längre tid för den traditionella lösningsmedelsextraktionen att komma igång. Eftersom resultaten från den traditionella lösningsmedelsextraktionen visar att temperatur är mest signifikant vid 16 minuter och sedan avtar skulle detta kunna visa på att temperaturens signifikans är avtagande med tiden men att den för den traditionella lösningsmedelsextraktionen avtar senare än för RBR extraktionen på grund av en långsammare process. Anledningar till att denna process är långsammare kan bland annat bero på omröringsfaktorn. RBR:en har en jämnare omrörning även om den traditionella lösningsmedelsextraktionens omrörningshastighet var konstant är omrörningen med en magnetloppa inte optimal. Särskilt vid de högre temperaturerna fick jag uppfattning att omrörningen var något ojämn.

Intressant hade varit att kolla hur signifikans nivån och när den avtar hade sett ut vid högre temperaturer, tidigare studier har visat att de optimala värdena för extraktion av polyfenoler fås vid 80-100 °C och vid dessa temperaturer är en kort extraktionstid på 4-15 minuter optimal (Aaby, et al., 2013). Men eftersom att extraktionerna i detta arbete använd sig av etanol var inte detta möjligt. En annan faktor som gör att temperaturen är av intresse är dess påverkan på halveringstiden för antocyanin. Studier har visat på att halveringstiden vid 125 °C är så kort som 8 minuter, vid 100 °C och vid 80 °C mellan 62 och 128 minuter (Yue & Xu, 2008). Med denna studie som bakgrund hade också skillnaden i halveringstid mellan 20 °C och 60 °C kunna vara av betydelse, vilket skulle kunna leda till att mängden antocyaniner minskar på grund av nedbrytning trots att det utvinns mer polyfenoler.

En annan faktor som då blev intressant var lagringen och ifall halten antocyaniner kunde ha minskat så pass mycket från första körning till det sista att detta påverkar resultatet. Studier har dock visat att antocyaniner bibehålls väl i upp till 5 månader vid frysförvaring (Pehluvan, et al., 2015). Detta borde betyda att lagringen inte påverkat resultatet i denna studie.

Eftersom att omrörningshastigheten troligen har en påverkan på resultatet skulle det vara möjligt att lägga in det som ytterligare en faktor och testa olika omrörning hastigheter. Man skulle också kunna använda sig av samma omrörningsmetod för de två olika extraktionsmetoderna så att inte detta är av betydelse vid analysen de två extraktionsmetoderna mellan.

I figur 12 ligger de olika staplarna överlag inte lika jämnt som för motsvarande figur för den traditionella lösningsmedelsextraktionen (figur 6). Detta beror främst på körning nr 21, (körning nr 21 är en extrem som har 12,27 g jämfört med den näst högsta som ligger på 10 g). Att denna påverkar resultatet kan eventuellt förklaras med RBR: ens storlek, eftersom att behållaren som blåbärspullvret placeras i är av begränsad storlek var jag tvungen att fylla behållaren med mer blåbärspulver än vad som egentligen är optimalt detta gjorde att blåbärspullvret blev väldigt kompakt. Detta skulle kunna påverka själva försöket eftersom att det tar längre tid för att allt pulver ska blötläggas.

En annan förklaring skulle också kunna vara att TS är den faktor som är mest signifikant och att modellen utifrån de andra TS värdena underskattar denna körparameters signifikans och därför skattar dessa värden dåligt.

Om man jämför de två olika extraktionsmetoderna så har den traditionella lösningsmedelsextraktionen en högre koncentration vid 0 minuter jämfört med 2 minuter för RBR extraktionen, För 8 minuter är koncentrationen jämn där efter ligger RBR extraktionen högre vid resterande tider tabell 3 tabell 4. Om man då återkopplar detta resultat från hur signifikansen för de tre körparametrarna såg ut så är temperaturen främst signifikant vid 8 minuter för RBR extraktionen det är också mellan 8 och 16 minuter som den stora skillnaden i koncentration (mg/l) inträffat efter det är skillnaden mellan väldigt liten. Ur ett ekonomiskt perspektiv hade alltså en optimal extraktion varit en RBR extraktion som upphör efter 16 minuter. Anledningen till att koncentrationen är högre vid 0 minuter för den traditionella lösningsmedelsextraktionen jämfört med 2 minuter för RBR extraktionen kan eventuellt bero på att vattnet måste flöda genom själva reaktorn. Detta kan göra att det tar längre tid innan extraktionen kommer igång.

Något som var förvånande för båda extraktionsmetoderna var att etanolhalten inte var signifikant positiv. I tidigare studier gällande extraktion av antocyanin ur svartvinbär visade sig nämligen den optimala etanolhalten ligga på 60 % (Cacase & Mazza, 2003)

## 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. *Elsevier*, pp. 257-264.
- Basu, A., Rhone, M. & Lyons, T., 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews* 68(3), pp. 168-177.
- Cacace, J. & Mazza, G., 2003. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 68(1), pp. 240-248.
- Dinkova, R. et al., 2014. Effect of enzyme-assisted extraction on the chilled storage stability of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins in skin extracts and freshly pressed juices. *Elsevier*, pp. 35-41.
- Ferreira, S. et al., 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597, p. 179–186.
- Jaakola, L. et al., 2002. *Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development*, s.l.: American Society of Plant Physiologists.
- Katsube, N. et al., 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 68-75.
- Lillhonga, T., Dahlbacka, J., Lillhonga, O. & Jåfs, Å., 2015. *Analys av antocyaninhalter, Brix-värde och halten torrs substans blåbär med hjälp av NIR-spektroskopi*, Vasa: Yrkeshögskolan Novia.
- Määttä-Riihinen, K. et al., 2004. Distribution and Contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, pp. 4477-4486.
- Neto, C., 2007. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(6), pp. 652-664.
- Pant, K. & Chauhan, G., 2013. *Development of green technology for extraction of nickel from spent catalyst and its optimization using response surface methodology*, s.l.: Green Processing and Synthesis.
- Pehlivan, M., Kaya, T., Doğru, B. & Lara, I., 2015. The effect of frozen storage on the phenolic compounds of *Morus*. *Fruits journal*, 70(2), pp. 117-122.
- Riihinen, K., 2005. *Phenolic compounds in berries*, Kuopio: Univ. Kuopio.
- Yue, X. & Xu, Z., 2008. Changes of Anthocyanins, Anthocyanidins, and Antioxidant Activity in Bilberry Extract during Dry Heating. *Journal of food science*, 73(6), p. C494–C499.
- Åkerström, A. et al., 2009. Effects of sampling time and nitrogen fertilization on anthocyanidin levels in *Vaccinium myrtillus* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 3340-3345.