# Primjena hladne plazme u izolaciji polifenola iz pokožice komine grožđa

**Živković, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:163724

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Marija Živković**

6603/N

# PRIMJENA HLADNE PLAZME U IZOLACIJI POLIFENOLA IZ POKOŽICE KOMINE GROŽĐA

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:**

**Mentor: prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac***

**Zagreb, 2015.**

**DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**
**Preddiplomski studij Nutricionizam**
**Zavod za prehrambeno-tehnološko inžženjerstvo**
**Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća**

# PRIMJENA HLADNE PLAZME U IZOLACIJI POLIFENOLA IZ POKOŽICE KOMINE GROŽĐA

***Marija Živković, 6603/N***

**Sažetak:** Komina grožđa koja zaostaje kao nusproizvod pri proizvodnji vina, značajan je izvor polifenola. Razvijene su brojne metode za ekstrakciju polifenola, ali se ispituju i nove metode ekstrakcije koje omogućuju bolje prinose i veću stabilnost tijekom ekstrakcije. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj hladne plazme (proizvedena je pomoću metode visoko-voltažnog elektičnog pražnjenja) na izolaciju polifenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice komine grožđa. Ekstrakcija je provedena primjenom vodenih otopina etanola (10%-tni, 30%-tni i 50%-tni etanol) pri sobnoj temperaturi, a ispitivan je i utjecaj frekvencije i vremena tretiranja. Najveći prinos polifenola (18,59 mg/g) ostvaren je uz upotrebu 50%-tne vodene otopine etanola pri frekvenciji od 120 Hz i vremenu tretiranja od 10 min.

**Ključne riječi:** komina grožđa**,** polifenoli, ekstrakcija, hladna plazma

**Rad sadrži:** 25 stranica, 9 slika, 1 tablica, 25 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u**: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor**: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Danijela Bursać Kovačević, viši asistent

**Rad predan:** srpanj, 2015.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**
**University of Zagreb**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Undergraduate studies Nutrition**
**Department of Food Engineering**
**Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing**

# APPLICATION OF COLD PLASMA IN ISOLATION OF POLYPHENOLS FROM GRAPE SKIN OF GRAPE POMACE

***Marija Živković, 6603/N***

**Abstract:** Grape pomace, which remains as by-product after wine production, is important source of polyphenols. A numerous methods for polyphenolic extraction are developed but also, there are new extraction methods that are examined and give better yields and higher stability during extraction. The aim of this work was to research the effect of cold plasma (it is produced by high voltage electrical discharge method) on isolation of polyphenolic compounds from lyophilised grape pomace. Extraction is conducted by using aqueous solution of ethanol (10%, 30% and 50%) and the influence of frequency and treating time were tested, too. The highest yield of polyphenols (18,59 mg/g) is achieved using 50% aqueous solution of ethanol at frequency 120 Hz, and treating time, 10 min.

**Keywords:** grape pomace, polyphenols, extraction, cold plasma

**Thesis contains:** 25 pages, 9 figures, 1 tables, 25 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD Verica Dragović-Uzelac, Full Professor

**Technical support and assistance:** PhD Danijela Bursać Kovačević, Senior Assistant

**Thesis delivered:** July, 2015.



**Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta "Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina". Projekt je sufinancirala Europska unija u okviru poziva RC.2.2.08 „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Regionalna konkurentnost 2007. -2013.**

# Sadržaj:


1. UVOD ..... 1
2. TEORIJSKI DIO ..... 2
   2.1. Nusprodukti proizvodnje vina ..... 2
   2.2. Fenolni spojevi komine ..... 4
      2.2.1. Neflavonoidi ..... 5
      2.2.2. Flavonoidi ..... 6
   2.3. EKSTRAKCIJA FENOLA ..... 8
   2.3.1. Ekstrakcija hladnom atmosferskom plazmom ..... 9
3. MATERIJAL I METODE ..... 12
   3.1. Materijal ..... 12
      3.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice grožđa sorte Merlot ..... 12
      3.1.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta hladnom plazmom ..... 12
   3.2. Metode ..... 14
      3.2.1. Određivanje ukupnih fenola ..... 14
      3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom ..... 16
4. REZULTATI ..... 18
5. RASPRAVA ..... 19
6. ZAKLJUČAK ..... 22
7. LITERATURA ..... 23

# 1. UVOD

Vinova loza jedna je od najzastupljenijih voćarskih kultura. Godišnja proizvodnja grožđa 2013. godine iznosila je oko 77 180 000 tona**.** (FAOSTAT, 2015.) Oko 80% svjetski proizvedene količine grožđa koristi se za preradu u vino, a oko 20% mase je nusproizvod (El Gengaihi et al., 2013.) Tako velike količine nusproizvoda mogu uzrokovati ekološke probleme pa ih je potrebno zbrinuti ili preraditi. Komina grožđa iako nusproizvod, značajan je izvor fenolnih spojeva, organskih kiselina, ulja, vlakana i drugih bioaktivnih spojeva, te predstavlja vrijednu sirovinu za dobivanje različitih proizvoda.

Fenolni spojevi pokazuju snažna antioksidacijska, antimikrobna, antiviralna, protuupalna i antikancerogena svojstva te na taj način sudjeluju u prevenciji razvoja raznih bolesti. Strukturno su vrlo različiti, od najjednostavnijih fenolnih spojeva poput hidroksibenzojevih kiselina, preko kompleksnijih flavonoida te polimernih molekula poput kondenziranih tanina i sl. Stoga je važno poznavati sastav spojeva koje želimo izolirati te izabrati učinkovite metode ekstrakcije i optimirati parametre ekstrakcije. Stoga se razvijaju brojne metode izolacije ciljanih skupina fenolnih spojeva koji se dodaju pri proizvodnji funkcionalne hrane i nutraceutika. (Nerantzis and Tataridis, 2006.).

Jedna od novijih metoda ekstrakcije fenolnih spojeva je primjena hladne atmosferske plazme koja se dobiva pomoću metode visoko-voltažnog elektičnog pražnjenja, pri čemu se odvija niz fizikalnih i kemijskih reakcija koje u konačnici dovode do razaranja stanične strukture i ekstrakcije ciljanih spojeva. Primjena hladne atmosferske plazme spada u zelene tehnike ekstrakcije koja nema štetan utjecaj na okoliš, budući da koristi male volumene organskih otapala za izolaciju bioaktivnih spojeva (Boussetta, 2014).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj hladne atmosferske plazme na izolaciju polifenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice komine grožđa primjenom vodenih otopina etanola (10%-tni, 30%-tni i 50%-tni etanol). Ekstrakcija je provedena pri sobnoj temperaturi, a ispitivan je i utjecaj frekvencije i vremena tretiranja.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. Nusprodukti proizvodnje vina

Vinova loza je višegodišnja biljka penjačica koja pripada velikoj porodici *Vitaceae*. Rod *Vitis* sa zemljopisnog stajališta može se podijeliti na tri skupine, a to su američka skupina roda V*itis*, istočnoazijska skupina roda *Vitis* i europsko-azijska skupina roda *Vitis* kojoj pripada vrsta *Vitis vinifera* L. (Mirošević, 1996.) Smatra se da je kultivacija započela u drugoj polovici 4. tisućljeća prije Krista na području Bliskog Istoka odakle se proširila na jugoistočni Mediteran, Palestinu, Libanon i Jordan, a zatim u prvoj polovici 3. tisućljeća po Aziji i Grčkoj te na Cipar, Kretu i Egipat. (Imazio, S. et al., 2006.) Ovisno o sortama grožđe može biti namijenjeno za konzumaciju u svježem obliku, za preradu u vino, za dobivanje destilata, proizvodnju koncentrata i sokova, za sušenje (grožđice), kompote, marmelade, džemove, za lozne podloge i dekorativne svrhe. (Mirošević, 1996.)

Vinova loza je jedna od najzastupljenijih voćarskih kultura što pokazuju statistički podaci FAO-a. Proizvodnja grožđa 2013. godine iznosila je oko 77 180 000 tona, a 5 vodećih zemalja proizvođača grožđa u 2013. godini bili su Kina, Italija, SAD, Španjolska i Francuska. U Hrvatskoj je proizvodnja grožđa 2013. godine iznosila 181 096 tona te je u posljednjih 10 godina u stalnom padu, a osobito ako pogledamo statističke podatke u zadnjih 20 godina, proizvodnja grožđa pala je za više od 50% za razliku od svjetske proizvodnje koja je u stalnom porastu (FAOSTAT, 2015.). Oko 80% proizvedenog grožđa preradi se u vino (El Gengaihi et al., 2013.) pri čemu zaostane značajna količina nusproizvoda (otpada), odnosno organskog otpada, otpadnih voda, dolazi do otpuštanja stakleničkih plinova i stvaranja anorganskih ostataka. Organski otpad čini komina koja sadrži sjemenke, pulpu, pokožicu, peteljke i lišće (Teixeira i sur., 2014). Nusproizvod čini 20% ukupne mase grožđa prerađenog u vino (El Gengaihi i sur., 2013.)

Komina grožđa čini 62% organskog otpada, vinski talog čini 14%, stabljike 12% otpada , a ostatak je nevodeni talog. Samo se manje količine ovih ostataka recikliraju (Cotoras i sur., 2014). Komina grožđa vrijedna je sirovina bogata fenolnim spojevima, etanolom, vinskom kiselinom, limunskom kiselinom, uljem sjemenki grožđa, dijetalnim vlaknima i dr. te se može koristiti kao sirovina za izolaciju navedenih skupina spojeva s potencijalnom primjenom u proizvodnji funkcionalne hrane. Može se također kompostirati, poslužiti kao

stočna hrana te kao biogorivo. Važna skupina spojeva u komini grožđa su antocijani, pigmenti koji se koriste za dobivanje boja, dok se npr. ulje sjemenki grožđa koristi kao sastojak brojnih kozmetičkih proizvoda djelujući na obnavljanje oštećenih tkiva i njegu kože (Nerantzis and Tataridis, 2006.)

Fenolni spojevi koji su zastupljeni u dijelovima komine (pokožici, sjemenkama) mogu imati potencijalno pozitivno djelovanje na zdravlje, a to se očituje kroz antioksidacijsku aktivnost, prevenciju kardiovaskularnih bolesti, upalnih procesa i sl. Na koncentraciju fenolnih spojeva komine i njihovu biološku aktivnost utječu brojni faktori kao što su postupci proizvodnje vina, vrijeme između nastanka i obrade otpada te metode recikliranja i ponovnog korištenja nusprodukata. Zbog svega navedenog upotreba nusprodukata kao izvora bioaktivnih spojeva u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji može biti alternativa za zbrinjavanje nusprodukata proizvodnje vina (Teixeira i sur., 2014). U prehrambene proizvode se bioaktivni spojevi komine ili obrađena komina dodaju kako bi se povećao udio vlakana i poboljšala probavljivost proizvoda, udio proteina, količina fenolnih spojeva, poboljšalo vezanje vode u proizvodima te smanjio stupanj oksidacije (Yu i sur., 2014).

Ovisno o metodi proizvodnje i rukovanju otpadom, udio sjemenki u komini prosječno iznosi 38 do 52% suhe tvari komine. Sjemenke sadrže do 40% vlakana, 16% eteričnih ulja, 11% proteina, 7% fenolnih spojeva poput tanina te šećere i minerale. Polifenoli sjemenki grožđa čine 60 do 70% ukupnih polifenola koji se ekstrahiraju iz komine (Teixeira i sur., 2014). Pokožica čini oko 65% komine grožđa te je bogat izvor polifenola, najvećim udjelom antocijana i fenolnih kiselina koji se akumuliraju tijekom procesa zrenja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006; Teixeira i sur., 2014).

Iz komine grožđa može se provesti ekstrakcija ulja iz sjemenki, polifenola, proizvodnja limunske kiseline, metanola i etanola. Također se može koristiti i pri proizvodnji alkoholnih pića dodatnim procesom fermentacije i destilacije (Teixeira i sur., 2014). Kao što je prethodno navedeno komina grožđa je značajan izvor fenolnih spojeva koji djeluju kao jaki antioksidansi, imaju antikancerogeno, protuupalno djelovanje, te izražena antibakterijska, antiviralna svojstva i štite od raznih bolesti. Stoga je velik interes za fenolima kao sastojcima funkcionalne hrane i nutraceutika (Nerantzis and Tataridis, 2006.).

## 2.2. Fenolni spojevi komine

Fenolni spojevi jedna su od najraširenijih skupina spojeva u biljnom svijetu. Do danas je poznato više od 8000 različitih struktura, a među njima je otkriveno preko 6400 flavonoida. (Tsao, 2010.) Sekundarni su metaboliti koji nastaju u biosintetskom putu šikiminske kiseline stanicama biljke. Osnovu strukture fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina ili pak neki drugi supstituenti. Često su konjugirani s mono- i polisaharidima, a pojavljuju se i u obliku estera i metilestera. Prema tome, velika je raznolikost ovih spojeva, a s obzirom na strukturu, dijele se u dvije glavne skupine: flavonoide i neflavonoide.

Sastav fenola varira ovisno o količini svjetlosti, UV zračenja, vlazi i sorti grožđa, a kako su zaštitne tvari biljke, povećava se njihova sinteza u određenim uvjetima poput oštećenja tkiva, nedostatka kisika i dr. (Teixeira, 2013.)

Fenolni spojevi u biljaka imaju veliku ulogu u zaštiti od štetnih mikroorganizama i predatora te bolesti. Važni su za oprašivanje i rasprostranjivanje budući da daju boju i miris koji privlače kukce i ostale životinje. Odgovorni su i za senzorska svojstva poput okusa, teksture, gorčine i sl. Od velike su važnosti u ljudskoj prehrani jer smanjuju rizik od razvoja mnogih kroničnih bolesti poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti. Neutraliziraju slobodne radikale donirajući im elektron ili vodikov atom pri čemu sami postaju manje reaktivni radikali, ali se stabilizaraju zahvaljujući prisutnosti aromatskog sustava. Na ovaj način usporavaju i starenje stanica. Potiču djelovanje antioksidativnih enzima poput glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze (Tsao, 2010.). Inhibiraju oksidaciju LDL kolesterola i agregaciju trombocita (Kashif, 2010.) sprečavajući razvoj ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Pokazalo se i da podižu razinu HDL kolesterola. (Xia, 2010.) Posjeduju antikancerogena svojstva. Neka istraživanja su pokazala da je moguća uloga u antiproliferaciji i apoptozi stanica tumora prostate (Xia, 2010., Kashif, 2010.). Resveratrol inhibira rast stanica raka dojke kao i raka kolona. Inhibiraju mnoge enzime koji kataliziraju otpuštanje tvari odgovorne za upalne procese poput histamina, serin proteaze, prostaglandina i lekuotriena na taj način djelujući protuupalno. (Kashif, 2010.) Također posjeduju antibakterijska, antifungalna i antiviralna svojstva. Štite od bakterija poput Escherichie coli, Staphylococcusa aureusa i Candide albicans (Xia, 2010.), a pokazalo se da

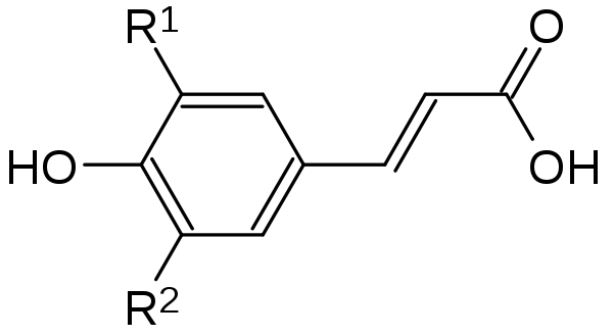
imaju protektivni učinak na crijevnu mikrofloru (Kashif, 2010.).

Od fenola u grožđu bitno je spomenuti proantocijanidine, antocijane, flavonole i flavanole od flavonoidnih spojeva te resveratrol i fenolne kiseline od neflavonoida. Tri najzastupljenije skupine uključuju proantocijanidine, antocijane i hidroksicimetne kiseline.

### 2.2.1. Neflavonoidi

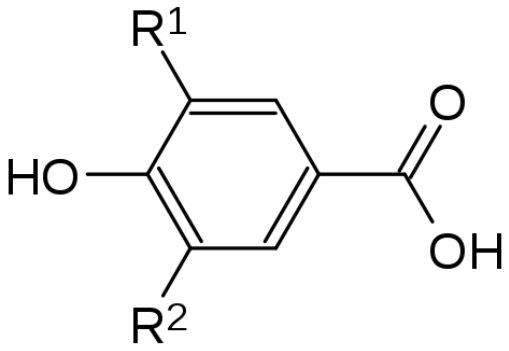
Od neflavonoida, u grožđu su prisutne fenolne kiseline koje se dijele u dvije osnovne grupe, a to su hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te stilbeni. Samo su hidroksicimetne kiseline prisutne u većim količinama u grožđu dok hidroksibenzojevih kiselina i stilbena ima malo.

Hidroksicimetne kiseline imaju C3-C6 kostur. Treća su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u bobicama grožđa. U bijelom vinu doprinose posmeđivanju pri oksidaciji s nefenolskim spojevima (Teixeira, 2013. Adams, 2006., Kennedy, 2006.) Najviše ih ima u mesu i pokožici grožđa. Najzastupljenije su *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina primarno prisutne kao *trans* izomeri, a obično su esterificirane s vinskom kiselinom, dok su vrlo malo prisutne u slobodnom obliku.



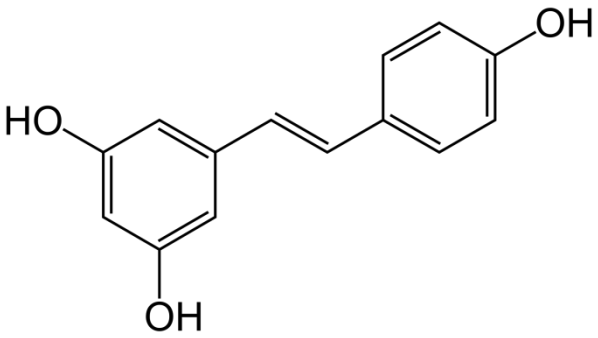

Slika 1. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (Annonimus 1)

Hidroksibenzojeve kiseline imaju C1-C6 kostur u svojoj strukturi, a za razliku od hidroksicimetnih kiselina, ima ih vrlo malo u grožđu. Uobičajene su galna, gentizinska, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina uglavnom nađene u slobodnom obliku. Najzastupljenija je galna kiselina (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.)




Slika 2. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (Anonnimus 2)

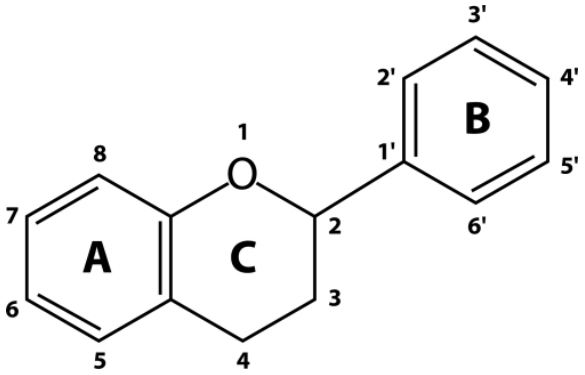
Stilbeni, iako prisutni u malim količinama, zaokupljaju interes mnogih znanstvenika zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka. Grožđe i vino su dva glavna izvora ovih spojeva (Kashif, 2010.) Najviše ih ima u pokožici, ali bitna količina se može naći i u peteljci. U biljci je povećana sinteza u slučaju infekcije i visokoj izloženosti UV svjetlosti (Adams, 2006.). Resveratrol je glavni stilben grožđa, a postoji u dva izomerna oblika. *Trans*-resveratrol služi kao prekusror za oligo- i polimerne stilbene poput viniferina. (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.)




Slika 3. Struktura resveratrola (Annonimus 3)

### 2.2.2. Flavonoidi

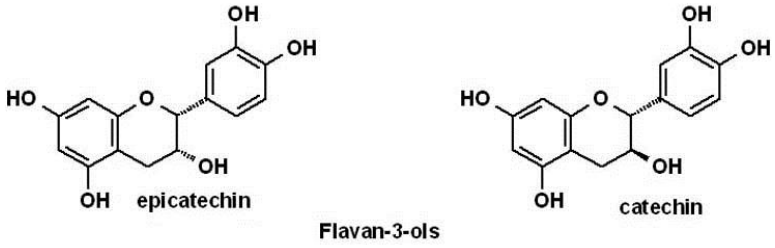
Flavonoidi su građeni od dva aromatska prstena (A i B) povezana centralnim piranskim prstenom C kako je prikazano na slici. Ovisno o vezanim hidroksilnim skupinama i stupnju zasićenosti C prstena, flavonoidi se dijele na više skupina. Za grožđe su najznačajniji antocijani, flavanoli i flavonoli. Najviše su prisutni u pokožici i sjemenkama.



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida (Annonimus 4)

Od flavonola, u grožđu su pronađeni kvercetin, miricetin, kampferol, izorhamnetin, laricitrin i siringetin uglavnom u obliku 3-O-glukozida i 3-O-glukuronida te galaktozida. Kvercetin ima ulogu zaštite od UV zračenja u biljkama te uz antocijane doprinosi pigmentaciji (Adams, 2006., Kashif, 2010., Teixeira, 2013.)

Flavanoli ili flavan-3-oli se obično nazivaju katehinima. Imaju dva kiralna centra pa prema tome, četiri moguća dijastereoizomera. Katehin je izomer s *trans* konfiguracijom, a epikatehin s *cis* konfiguracijom (Tsao, 2010) Najzastupljenija su skupina fenola u grožđu. Primarno su smješteni u sjemenci, zatim u pokožici, a vrlo malo u mesu. Daju gorčinu i trpkost vinu. 5 ih je prisutno u grožđu, a to su (+)katehin, (-)epikatehin, (+galokatehin), (-)epigalokatehin i katehin-3-O-galat.

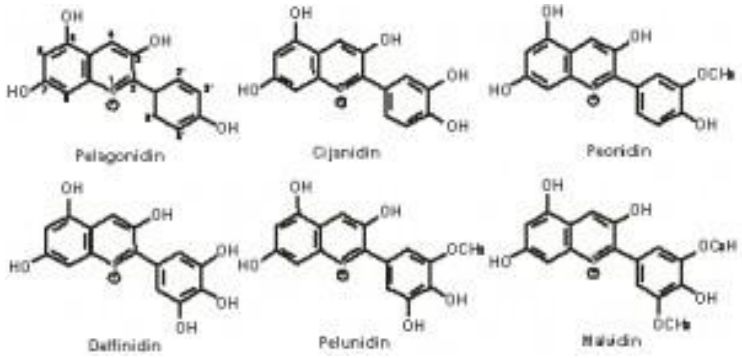


Slika 5. Struktura katehina i epikatehina (Annonimus 5)

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su polimeri monomernih flavan-3-ola i najzastupljenija su skupina fenola u grožđu. Nalaze se u pokožici, sjemenkama i peteljkama grožđa. Mogu imati od dvije do preko 40 monomernih jedinica (Teixeira, 2013.) pa se proantocijanidini u pokožici i sjemenkama razlikuju prema molekulskoj masi. U pokožici su zastupljeni proantocijanidini većih molekulskih masa nego u sjemenci, a također se razlikuju i u sastavu monomera (Adams, 2006.) Procijanidine sjemenke većinom sačinjavaju katehini, epikatehini i epikatehin galat jedinice, dok se ovi u pokožici uglavnom sastoje od epikatehina

i epigalokatehina. Vrlo su jaki antioksidansi, a prema jednom od brojnih istraživanja pokazano je kako procijanidini iz sjemenki imaju 20 do 50 puta jači antioksidacijski učinak od vitamina C i E (Kashif, 2010.)

Antocijani su glikozidi antocijanidina i daju crvenu, plavu do ljubičastu boju bobicama grožđa, a smješteni su u pokožici (Kenedy, 2006., Adams, 2006.) Antocijani pronađeni u grožđu su delfinifin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin gdje postoje kao glikozidi. Glukoza može biti acetilirana octenom, *p*-kumarinskom ili kafeinskom kiselinom (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.) Određivanje antocijana može se koristiti za kemotaksonomsku klasifikaciju, obzirom da se količine razlikuju za određene vrste vinove loze (Kashif, 2010.)




Slika 6. Struktura antocijana (Annonimus 6)

## 2.3. EKSTRAKCIJA FENOLA

Općenito, ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, a definira se kao prijenos jednog ili više ciljanih spojeva iz materijala u kojem se nalaze, u tekuću fazu, nakon čega slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze (Lloyd i van Wyk, 2012). Fizikalni proces koji omogućava prijelaz jedne ili više komponenti iz biološkog materijala u otopinu naziva se koncentracijski gradijent, pri čemu je koncentracija komponenti u otapalu manja od njihove koncentracije u biološkom materijalu tako da te komponente procesom difuzije prelaze iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012).

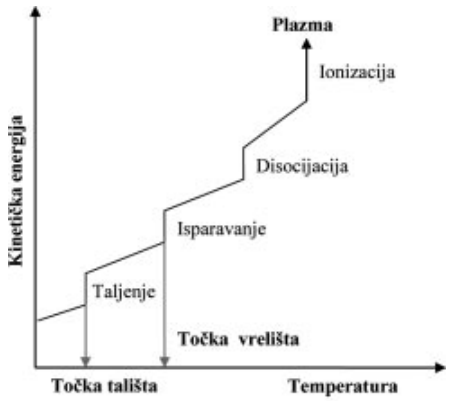
Uobičajeni postupci koji prethode ekstrakciji fenolnih spojeva obuhvaćaju usitnjavanje, sušenje ili liofilizaciju uzorka, a često se cijeli uzorak u svježem stanju potapa u odgovarajuće otapalo. Tijekom ekstrakcije fenolnih spojeva dolazi i do ekstrakcije ne-

fenolnih spojeva kao što su šećeri, organske kiseline i proteini, što smanjuje čistoću ekstrakta i zahtijeva dodatne postupke pročišćavanja (Ignat i sur., 2011). Na učinkovitost ekstrakcije utječu brojni faktori: veličina čestica, vrste fenola, vrste i polarnosti otapala, odnos otapala i uzorka, vrijeme i temperatura ekstrakcije (Teixeira i sur., 2014).

Uz klasične metode ekstrakcije koje se provode uz veću količinu organskih otapala, a ujedno su štetna za okoliš, sve više se ispituje mogućnost primjene novih tehnika ekstrakcije koje ne zagađuju okoliš i štede energiju uz upotrebu manjih volumena otapala. (Lloyd i van Wyk, 2012). Alternativne metode ekstrakcije su ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ubrzana ekstrakcija otapalima, te jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija pomoću hladne atmosferske plazme (Teixeira i sur., 2013).

### 2.3.1. Ekstrakcija hladnom atmosferskom plazmom

Riječ plazma dolazi od grčke riječi plásma, što u slobodnom prijevodu znači samooblikovanje materijala (Ražić, 2009.) Plazma je plin koji se sastoji od slobodnih elektrona, iona i neutralnih čestica (Schlüter, 2013.) Kada dovodimo toplinu krutoj tvari, povećava se kinetička energija čestica, a u trenutku kad kinetička energija prevlada energiju veze, dolazi do razaranja strukture i krutina pri temperaturi tališta prelazi u tekuće agregatno stanje. Daljnim dovođenjem topline, pri temperaturi vrelišta, tekućina prelazi u plin. Pri primjeni jako visoke energije poput električnog pražnjenja, elektroni ioniziraju plin pri čemu nastaje plazma. Zato se ona smatra četvrtim agregatnim stanjem.




Slika 7. Shematski prikaz prijelaza stanja materije (Ražić, 2009.)

Plazma se može opisati s obzirom na stupanj ionizacije, gustoću, termodinamiku ravnotežu itd. pa postoji više podjela (Chu, 2014.) S obzirom na tlak neutralnog plina u kojem se kreću ionizirane čestice u odnosu na atmosferski tlak razlikujemo slijedeće vrste plazme:

- niskotlačne
- visokotlačne i
- plazme atmosferskog tlaka.

Prema temperaturi pri kojoj se primjenjuju, plazme se dijele na hladne i vruće (Ražić, 2009.) Postoji i podjela na termalne i netermalne plazme. Kod termalnih plazmi, temperatura elektrona vrlo je slična temperaturi iona i neutralnih čestica i kreću se iznad 6000 K. Netermalnu plazmu karakterizira ogromna razlika u temperaturi elektrona i težih čestica. Temperatura elektrona je reda veličine $10^4$ do $10^5$ K, dok je temperatura teških čestica, iona, molekula, atoma i slobodnih radikala približna sobnoj temperaturi.

Plazma se danas sve više primjenjuje u industriji, a o njenoj mogućnosti primjene provode se brojna istraživanja. S obzirom da se ne može koristiti plazma iz prirode, mora se proizvesti. Koristi se u rasvjeti kod fluorescentnih lampi i lučnih lampi visokog intenziteta koje se često koriste u javnim prostorima. Učinkovita je u pročišćavanju voda zagađenih organskim tvarima, ispituje se za potrebe tekstilne industrije gdje se radi modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme u svrhu dobivanja višefunkcionalnih tekstilnih proizvoda te poboljšanja kvalitete tekstilnog materijala. U medicinskom inženjerstvu se primjenjuje za sterilizaciju površina objekata osjetljivih na visoku temperaturu.

Rezultati raznih istraživanja pokazuju visok potencijal primjene plazme u inhibiciji ili inaktivaciji mikroorganizama (Schlüter, 2013). Također uništava nepoželjne mikroorganizme u hrani koja inače nije prikladna s obzirom na svoja svojstva za tretmane na visokim temperaturama, a djeluje na makromolekule u stanicama mikroorganizama poput DNA, proteina i lipopolisaharida. Ono što je od posebnog interesa za ovaj rad je primjena hladne plazme na ekstrakciju spojeva iz različitih sirovih materijala. Tehnologija visokovoltažnog električnog pražnjenja (eng. High Voltage Electrical Discharge, HVED) je zelena ekstrakcijska tehnika koja povećava stopu ekstrahiranih spojeva primjenom niske energije. (Boussetta, 2014.). Usporedno s drugim metodama, koje su također prihvatljive za okoliš, a to su pulsirajuće električno polje (eng. Pulsed Electric Field, PEF) i ultrazvuk (eng. ultrasound, US), visokovoltažno električno pražnjenje pokazalo se učinkovitijim u pogledu veće

ekstrakcije spojeva, razaranja stanične strukture te niže primjene energije, a time je i posljedično bilo manje zagrijavanje materijala.

Hladna plazma se za potrebe istraživanja i primjene proizvodi pomoću električnog pražnjenja. Prema jednoj od teorija, lavina elektrona i nastanak plinovite faze su odgovorni za razaranje strukture materijala. U vodenom mediju, dvije su faze procesa razaranja: faza prije samog razaranja gdje nastaje tzv. 'streamer' i faza razaranja strukture (Boussetta, 2014.) Primjenom vrlo visokog napona između dviju elektroda, ubrzavaju se elektroni koji imaju dovoljnu količinu energije da bi potaknuli fizikalne i kemijske procese u vodi. Ta nastala lavina elektrona na engleskom se naziva streamer koja putuje prema suprotno nabijenoj elektrodi. U trenutku kad dosegne elektrodu, nastaju šok valovi, kavitacijski mjehurići (glavni mjehurić i brojni mali mjehurići) i turbulencija u tekućini. Turbulencija povećava prijenos mase, a šok valovi i eksplozija kavitacijskih mjehurića su odgovorni za fragmentaciju materijala.

Sve se više istražuje primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji kako bi se istodobno očuvala mikrobiološka sigurnost hrane i produljio vijek trajanja te minimizirao gubitak bioaktivnih komponenti hrane. Od velikog su interesa polifenolni spojevi koji imaju mnogobrojne povoljne učinke na zdravlje čovjeka. U razno-raznim prehrambenim proizvodima, želi se omogućiti što veći prinos polifenolnih spojeva. U istraživanju, Herceg i sur. (2015.) uspoređivali su udio polifenola u soku od šipka koji je bio tretiran klasičnom termalnom pasterizacijom te hladnom plazmom. Pokazali su da je udio ukupnih fenola pasteriziranom soku od šipka porastao za 29.55%, a u uzorku koji je bio tretiran hladnom plazmom, ukupni fenoli su porasli za 14,95% do 48.99%. Ovo pokazuje kako je hladna plazma potencijalna nova metoda u prehrambenoj industriji koja moze omogućiti veću kvalitetu konačnog proizvoda.

# 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. Materijal

### 3.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice grožđa sorte Merlot

Nakon prešanja, dobiven je nusproizvod (komina) od proizvodnje vina, grožđa sorte Merlot u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. iz Poreča. Uzorak komine koji se sastojao od pokožice, sjemenki i peteljki podvrgnut je liofilizaciji nakon čega su mehanički razdijeljene pokožica, sjemenke i peteljke. Razdijeljeni dijelovi su pakirani odvojeno u polipropilenske vrećice koje su hermetički zatvorene i skladištene na temperaturi od -20$^{o}$ C do provođenja analiza. Neposredno prije provedbe analiza, liofilizirana pokožica grožđa samljevena je u prah pomoću mlinca za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1). Veličina čestica se odredila granulometrijiski pomoću sita d(0,9)=6≤1 mm.

Postupak liofilizacije komine:

Prije provedbe liofilizacije, uzorak je zamrznut na -60$^{o}$ C te je potom podvrgnut postupku liofilizacije pomoću uređaja CoolSafe, Model 55-9 PRO (Labogene, Danska). Približno 500 g smrznute komine rasporedilo se u jednom sloju na šest plitica te je provedena liofilizacija u vremenskom periodu od 24 h. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0°C/24 sata, a izotermna desorpcija pri 20°C/12 sati. Prosječni udio suhe tvari u liofiliziranoj komini iznosio je 96,85%.

### 3.1.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta hladnom plazmom

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice komine grožđa provedena je primjenom hladne plazme na uređaju za hladnu plazmu. Kao otapalo pri ekstrakciji korištene su vodene otopine etanola s različitim udjelom alkohola (10 %, 30 %, 50 %, v/v), uz frekvencije 60 i 120 Hz te vremena ekstrakcije 5 i 10 min (Tablica 1.).

| Udio etanola u ekstrakcijskom otapalu (%) | Vrijeme trajanja ekstrakcije (min) | Frekvencija plazme (Hz) |
|---|---|---|
| 10 | 5 | 60 |
| | | 120 |
| | 10 | 60 |
| | | 120 |
| 30 | 5 | 60 |
| | | 120 |
| | 10 | 60 |
| | | 120 |
| 50 | 5 | 60 |
| | | 120 |
| | 10 | 60 |
| | | 120 |

**Tablica 1**. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom hladne plazme

*Postupak ekstrakcije:*

U plastičnu lađicu izvagano je 1 g (± 0,001 g) samljevenog uzorka liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot te su izvagani uzorci preneseni u staklenu čašu, volumena 100 mL, u koju je menzurom dodano 80 mL otapala (vodene otopine etanola u koncentracijama 10%, 30% i 50% (v/v)) te je u čaši provedena ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom.

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Tijekom eksperimenta je varirana frekvencija (60, 120 Hz) dok je izlazni napon bio 20 kV s kondenzatorom kapaciteta 0,75nF. Napon je mjeren naponskom sondom Tektronix P6015A spojenim na osciloskop Hantek DS05202BM.

Reaktor je bio volumena 300 mL, s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Eksperimenti su provedeni u šaržno pri različitim vremenima tretmana. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom (igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3, 81 cm), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm. Kroz igličnu elektrodu upuhivan je zrak koji je omogućio miješanje uzorka, te samo pražnjenje u mjehurićima upuhivanog zraka.

Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se kvantitativno prebaci u odmjerne tikvice volumena 100 mL te se do oznake nadopuni odgovarajućim otapalom. Tako pripremljeni ekstrakti se preliju u dvije plastične falkon-epruvete volumena 50 mL i centrifugiraju 10 minuta pri 5500 na centrifugi (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka). Nakon centrifugiranja, bistri dio ekstrakta se dekantira u nove falkon-epruvete volumena 50 mL i skladišti na +4 °C do daljnje analize. Svako mjerenje provedeno je u paraleli, a prosječna temperatura ekstrakcije iznosila je 27,92 $^{o}$C.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Princip metode:

Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima pri čemu se fosfowolframova i fosfomolibdenska kiselina iz Folin-Ciocalteu reagensa reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

$Na_2WO_4/Na_2MoO_4$ + Fenol → $(\text{fenol-}MoW_{11}O_{40})^{4-}$

Mo(VI) (žuto obojen) + e- → Mo(V) (plavo obojen)

Tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm.

Aparatura i pribor:

1. Uređaj za hladnu plazmu

    a) pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK)
    b) kondenzator kapaciteta 0,75nF
    c) naponska sonda Tektronix P6015A
    d) osciloskop Hantek DS05202BM
    e) reaktor volumena 300 mL, s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja
    f) iglična visokonaponska elektroda (igla od nehrđajućeg čelika Microlance $^{TM}$ 3, 81 cm)

g) pločasta elektroda uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm

2. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
3. Staklene kivete
4. Tehnička vaga Mettler (točnosti ±0,01g)
5. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
6. Pipete volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
7. Odmjerne tikvice volumena 25 mL i 1 L
8. Menzura volumena 100 mL i 1 L
9. Staklene epruvete
10. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Otopina natrijeva karbonata (7,5%-tna otopina)
   Priprema: potrebno je odvagati 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenu čašicu iz koje se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koristeći destiliranu vodu te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

*Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu se otpipetira 500 μL ekstrakta, koji je prethodno 2x razrijeđen otapalom koje je korišteno za ekstrakciju, zatim 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen) i zatim 2 mL 7,5%-tnog natrijeva karbonata. Reakcijska smjesa se termostatira 15 minuta na temperaturi od $45^{o}$ C nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Jednako se pripremi i slijepa proba, osim što se umjesto ekstrakta doda otapalo za ekstrakciju.

*Izračunavanje:*

Ukupni fenoli računaju se kao ekvivalent galne kiseline prema jednadžbi baždarnog pravca koja je izračunata kao dio prethodno provedenog istraživanja:

$Y=0,0101X + 0,1583$, $R^2=0,9942$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/mL)

$R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

*Princip metode*:

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilan dušikov radikal tamno ljubičastog obojenja koji sadrži nespareni elektron. Metoda se temelji na sposobnosti redukcije DPPH radikala pri čemu dolazi do sparivanja nesparenog elektrona. Boja se pri tome mijenja iz ljubičaste u žutu što se spektorfotometrijski prati kao pad apsorbancije pri 517 nm.

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti ±0,01g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
6. Epruvete
7. Stalak za epruvete
8. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. 100%-tni metanol
2. 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: potrebno je odvagati 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se otopi i nadopuni do oznake 100%-tnim metanolom. Čuva se na tamnome u zatvorenoj tikvici.

*Postupak određivanja:*

Postupak određivanja provodi se prema metodi za određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima gloga. U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100% metanola. Uzorci se ostave stajati 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti tako da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

*Izračunavanje:*

Rezultati su izraženi kao ekvivalent troloxa prema jednadžbi baždarnog pravca koja je izračunata kao dio prethodno provedenog istraživanja:

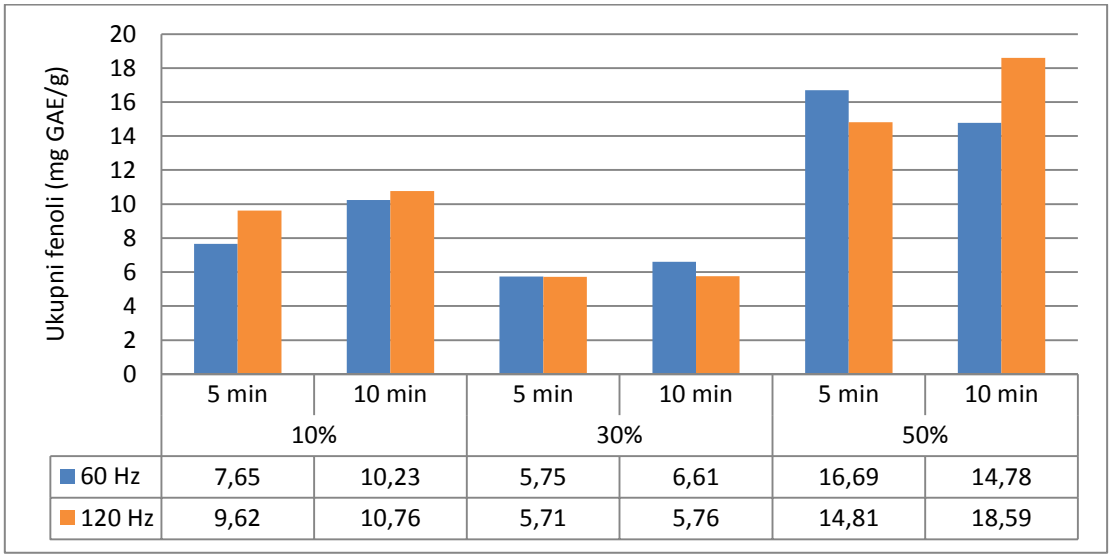
$y = -0,008\ x + 1,3476,\ R^2=0,9948$

gdje je:

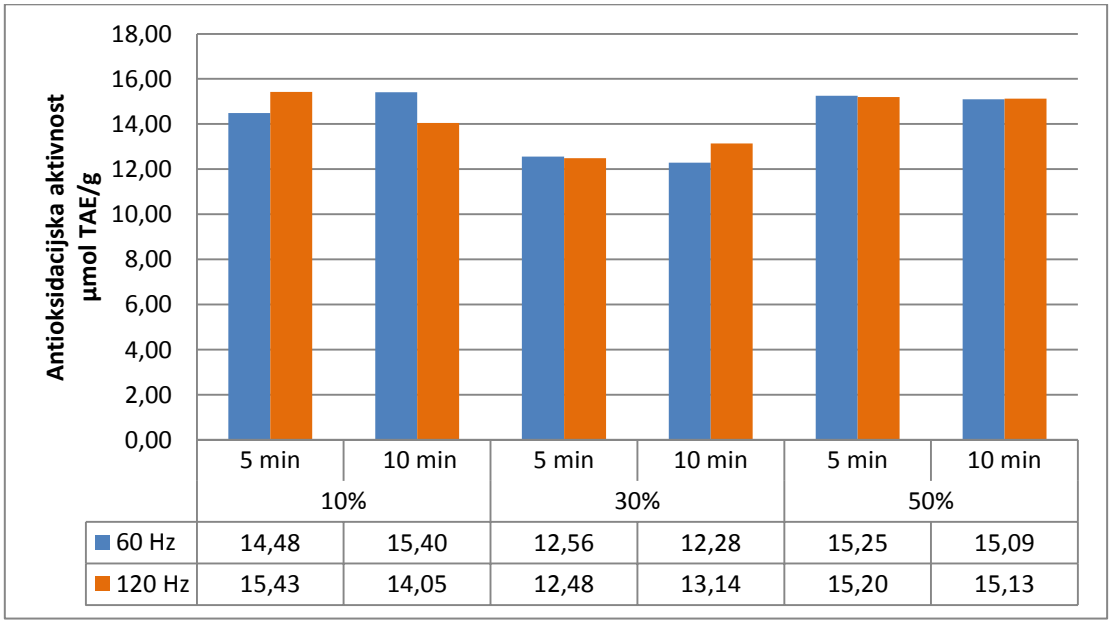
Y = apsorbancija uzorka pri 517 nm
X = ekvivalent troloxa (TAE) (μM)
$R^2$ - koeficijent determinacije

## 4. REZULTATI

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima liofilizirane pokožice grožđa prikazani su grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja. Na učinkovitost ekstrakcije u obzir su uzeti utjecaji slijedećih parametara: udio etanola u otapalu za ekstrakciju, vrijeme tretiranja hladnom plazmom i primijenjena frekvencija.




**Slika 8.** Maseni udjeli ukupnih fenola (mgGAE/g) u liofiliziranoj pokožici komine grožđa sorte Merlot




**Slika 9.** Antioksidacijska aktivnost (µmolTAE/g) u liofiliziranoj pokožici komine grožđa sorte Merlot

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju cilj je bio ispitati mogućnost primjene hladne atmosferske plazme na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot pri sobnoj temperaturi. Ekstrakcijski parametri čiji utjecaji su ispitivani su: različiti udjeli etanola u otapalu za ekstrakciju (10%-tni, 30%-tni i 50%-tni etanol), frekvencija (60 i 120 Hz) i vrijeme tretiranja hladnom plazmom (5 i 10 min).

Vodene otopine etanola s udjelima 10, 30 i 50 % korištene su za ekstrakciju ukupnih fenola iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot pri sobnoj temperaturi. Pri nižim udjelima etanola (10 i 30 %) u otapalu za ekstrakciju ostvareni su niži prinosi ukupnih fenola, a vrijednosti su bile podjednake pri obje frekvencije (60 i 120 Hz). Vrijeme tretiranja nije značajno utjecalo na učinkovitost postupka ekstrakcije.

Najveći prinosi ukupnih fenola ostvareni su uz 50%-tnu vodenu otopinu etanola, pri obadvije frekvencije. Najveći prinos ukupnih fenola (18,59 mg GAE/g) ostvaren je uz upotrebu 50%-tne vodene otopine etanola pri frekvenciji 120 Hz i vremenu tretiranja hladnom plazmom 10 minuta. S obzirom na molekulsku strukturu i slabiju polarnost fenolnih spojeva koji su dominantni u pokožici komine grožđa, može se pretpostaviti da je najbolja ekstrakcija ostvarena s 50%-tnom vodenom otopinom etanola koja je manje polarnosti u usporedbi s 10 i 30%-tnom vodenom otopinom etanola.

U dosadašnjim istraživanjima potvrđeno je da je etanol učinkovito otapalo za ekstrakciju fenola te je manje štetan od ostalih otapala (Boussetta et al., 2011.) Neki fenoli poput antocijana i proantocijanidina topljiviji su u vodi, dok su drugi topljiviji u etanolu kao na primjer katehin i epikatehin. Do istog zaključka došli su Rajha i sur. (2014.) prema čijem istraživanju je najveći učinak ekstrakcije postignut s 50%-tnim etanolom, a povećanjem udjela etanola na 75% učinkovitost ekstrakcije se smanjila. Oni su provodili istrazivanje na mladicama vinove loze. Varirali su udio etanola od 0, 25, 50 i 70% sa ili bez natrijevog hidroksida jer se pokazalo da alkalna hidroliza pospješuje ekstrakciju. To pokazuje kako su rezultati dobiveni u našem istraživanju u skladu s rezultatima iz znanstvenih radova jer je u ovom pokusu najveća koncentracija ukupnih fenola ostvarena uz 50%-tni etanol.

Neovisno o udjelu etanola u otapalu za ekstrakciju te frekvenciji, vrijeme tretiranja hladnom plazmom primjenjeno u ovom istraživanju (5 i 10 minuta) nije značajnije utjecalo na masene udjele ukupnih fenola. To može upućivati na zaključak da je za izolaciju fenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot pri zadanim uvjetima ekstrakcije, vrijeme od 5 minuta bilo dovoljno da prouzroči fenomen fragmentacije i razaranje strukture stanice, što dovodi do dobre izolacije fenola.

Primjenom visokog napona između dviju elektroda nastaje lavina elektrona koja se usmjerava prema suprotno nabijenoj elektrodi. U trenutku kad dosegne elektrodu, nastaju šok valovi, kavitacijski mjehurići, turbulencija i dr. što uzrokuje fragmentaciju i razaranje strukture stanice, što može utjecati na ubrzavanje ekstrakcije biomolekula iz citoplazme (Boussetta i sur.., 2012.). Boussetta i sur. (2011) proveli su istrazivanje na ostatku nefermentiranog, prešanog, crvenog grožđa koji se sastojao od pokožice, sjemenki i stapki. Oko 50 g uzorka ekstrahirano je HVED metodom pri sobnoj temperaturi, a kao otapalo je korištena destilirana voda, 10, 20 i 30%-tni etanol. Vrijeme tretiranja trajalo je do jedan sat. Pokazali su da je ekstrakcija najveća tijekom prvih 30 minuta ako se primjenjuje etanol kao otapalo, za razliku od korištenja destilirane vode, kad se maksimalna koncentracija ukupnih fenola postiže nakon 60 min, a daljnji tretman hladnom plazmom ne utječe značajno na ekstrakciju (Boussetta et al., 2009.) Dakle, u početku je ekstrakcija najbrža, a zatim opada. U provedenom istraživanju, već je vrijeme tretiranja od 5 minuta bilo dovoljno za ekstrakciju fenola.

Ako promotrimo utjecaj primijenjene frekvencije, razvidno je da je maseni udio ukupnih fenola kod većine uzoraka bio podjednak pri obje frekvencije. Izuzetak su ekstrakti dobiveni s 50%-tnom vodenom otopinom etanola gdje je veći prinos ukupnih fenola dobiven pri većoj frekvenciji od 120 Hz. Boussetta i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem su primijenili različite količine energije, od 0-800 kJ/kg koje odgovara broju od 0-1000 izboja, s ciljem utvrđivanja utjecaja na ekstrakciju ukupnih fenola. Zaključili su da se primjenom veće energije koja je proporcionalna frekvenciji povećava koncentracija ukupnih fenola.

Nešto niža antioksidacijska aktivnost je primijećena kod 30%-tne vodene otopine etanola u usporedbi s 10 i 50%-tnom vodenom otopinom etanola, dok frekvencija i vrijeme tretiranja nisu značajno utjecali na učinkovitost postupka ekstrakcije. Najveća

antioksidacijska aktivnost (15,43 μmol TAE/g) ostvarena je ipak uz 10%-tnu otopinu etanola te frekvenciju od 120 Hz i vrijeme tretiranja od 5 minuta.

U svim uzorcima određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta te je antioksidacijska aktivnost u blagoj pozitivnoj korelaciji s koncentracijom ukupnih fenola. Unatoč nižoj vrijednosti ukupnih fenola, u uzorcima koji su ekstrahirani s 10 i 30 %-tnim vodenim otopinama etanola određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Sagdic i suradnici (2011.) objasnili su da između antioksidacijske aktivnosti i ukupnih fenola ne mora uvijek postojati značajna korelacija zbog različitih mehanizama djelovanja DPPH radikala te Folin-Ciocalteau reagensa sa različitim supstratima koji pridonose antioksidacijskoj aktivnosti. Različiti fenolni spojevi zbog razlike u molekulskoj strukturi različito pridonose antioksidacijskoj aktivnosti, što se odražava i na kinetiku mehanizama djelovanja antioksidanata.

# 6. ZAKLJUČAK

1. Metoda visoko-voltažnog električkog pražnjenja pokazala se učinkovitom za ekstrakciju fenolnih spojeva. Električnim izbojima proizvodi se hladna plazma te nastali fizikalno-kemijski procesi uzrokuju razaranje strukture stanice i izdvajanje molekula iz citoplazme. Prednost je ove metode što ne uzrokuje veliko povišenje temperature nakon tretiranja te se na taj način osigurava da željeni spojevi ostanu u svom izvornom obliku, tj. ne dolazi do njihove degradacije.
2. Najveći maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim uz primjenu hladne plazme dobiveni su upotrebom 50%-tne vodene otopine etanola te duljim vremenom ekstrakcije od 10 minuta. Frekvencija nije značajnije utjecala na učinkovitost postupka ekstrakcije.
3. Fenolni spojevi vrijedni su bioaktivni spojevi koji pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost koja je određena u rasponu od 12,28 μmol TAE/g do 15,43 μmol TAE/g. Vrijednost antioksidacijskog kapaciteta bila je podjednaka u svim uzorcima neovisno o primjenjenim uvjetima ekstrakcije.

## 7. LITERATURA


Adams, D.O. (2006.) Phenolics and Ripening in Grape Berries, *Am. J. Enol. Vitic*., 57, 249-256

Boussetta, N, Lebovka, N., Vorobiev, E., Adenier, H., Bedel-Cloutour, C, Lanoiselle, J. (2009) Electically Assisted Extraction of Soluble Matter from Chardonnay Grape Skins for Polyphenol Recovery, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1491-1497

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review, *Comptes Rendus Chimie*, 17, 197-203

Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., Lanoisellé, J.-L. (2011) Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electical discharges, *Food Chemistry*, 128, 364-370

Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L.H., Cordin-Falcimaigne, A., Lanoisellé, J.-L. (2012) Application of electical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds, *LWT - Food Science and Technology*, 46, 127-134

Chu, P.K., Lu, X. (2014) Low Temperature Plasma Technology, Taylor and Francis Group, London

Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, E. (2014) In Vitro and in Vivo Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained from Grape (Vitis vinifera) Pomace. *Molecules* **19**, 21154-21167.

El Gengaihi, S., Aboul Ella, F.M., Hassan, E.M., Shalaby, E.A., Abou Baker, D.H., (2013) Phytochemical Investigation and Radical Scavenging Activity of Wastes of Some Grape Varieties Grown in Egypt, *Global Journal of Pharmacology*, 7, 465-473

Ercegović Ražić, S., Čunko, R., (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme, *Tekstil*, 58, 55-74

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistic Division, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Pristupljeno 6, srpnja 2015.

Herceg, Z., Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Režek Jambrak, A., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2015.) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice, *Food Chemistry*, 190, 665-672

Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Scienza, A., Failla, O., (2006) Chloroplast mischrosatellites to investigate the origin of grapevine, *Genetic resources and Crop Evolution*, 53, 1003-1011

Kashif, A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape- derived products, *Phytochem Rev.*, 9, 357-378

Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and Wine Phenolics: History and Perspective, *Am. J. Enol. Vitic*, 57, 239-242

Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 1-24

Mirošević, N. (1996) Vinogradarstvo, 2. prošireno izdanje, Nakladni zavod Globus, Zagreb

Nerantzis, E.T., Tataridis, P. (2006) Integrated Enology - Utilization of winery by-products into high added value products, *Journal of Science and Technology*

Rajha, H.N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R.G., Vorobiev, E. (2014) A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots, *Food Research International*

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006) Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, 2. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, str. 241-263.

Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Tahsin Yilmaz, M. (2011) RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices, Food Chemistry, 126, 1749-1758

Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K., Holzhauser, T., Knorr, D., Eisenbrand, G. (2013.) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods, *Mol. Nutr. Food Res*., 57, 920-927

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., Gerós, H. (2013.), Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Enviroments, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 18711-18739

Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678. doi:10.3390/ijms150915638.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2, 1231-1246

Xia, E., Deng, G., Guo, Y., Li, H. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646

Internet stranice:

**Slika 1**:
https://upload..org/wikwikimediaipedia/commons/thumb/0/07/Hydroxycinnamic_acids.svg/602px-Hydroxycinnamic_acids.svg.png

**Slika 2**:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1d/Hydroxybenzoic_acids.svg/475px-Hydroxybenzoic_acids.svg.png

**Slika 3**: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/17/Resveratrol.svg/2000px-Resveratrol.svg.png

**Slika 4**: http://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/268/3131677/3131677_ITX-4-069-g001.png

**Slika 5**: http://chemistry.muohio.edu/hagerman/images/stories/slideshow/flavan3ols.jpg

**Slika 6**: http://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2009/05/najcesci-antocijani-aglikoni-300x143.jpg