

Izolacija proantocijanidina iz komine grožđa sorte Merlot primjenom ekstrakcije potpomognutom visokim tlakom

Radonić, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:076694>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Paula Radonić

6648/PT

**IZOLACIJA PROANTOCIJANIDINA IZ KOMINE GROŽĐA
SORTE MERLOT PRIMJENOM EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTOM VISOKIM TLAKOM
ZAVRŠNI RAD**

Modul: Začinsko i aromatsko bilje

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

IZOLACIJA PROANTOCIJANIDINA IZ KOMINE GROŽĐA SORTE MERLOT PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTOM VISOKIM TLAKOM

Paula Radonić, 6648/PT

Sažetak: Prilikom proizvodnje vina veći dio organskog ostatka je vinska komina koja predstavlja jeftin izvor visoko vrijednih biološki aktivnih komponenata. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ekstrakcije potpomognute visokim tlakom na izolaciju proantocijanidina iz pokožice grožđa sorte Merlot. Postupak izolacije proveden je 70%-tnom vodenom otopinom etanola pri tlakovima od 200 i 400 MPa, temperaturi 40, 60 i 80 °C i vremenu trajanja ekstrakcije 5 i 15 min. Izolirane proantocijanidine odredili smo spektrofotometrijski, a najveći prinos ostvaren je pri temperaturi od 40 °C, tlaku od 200 MPa i vremenu trajanja od 15 min. Pomoću snimljenog NIR spektra može se odrediti i predvidjeti sadržaj izoliranih proantocijanidina, a koeficijentom determinacije za proantocijanidine prema Chadockovoj ljestvici ($R^2=0.95038$) dokazalo se da je model reprezentativan, te da je moguća vrlo dobra predikcija, kao i dobra veza između promatranih zavisnih i nezavisnih varijabli modela.

Ključne riječi: proantocijanidini, ekstrakcija, komina grožđa, visoki tlak, NIR spektroskopija

Rad sadrži: 31 stranicu, 13 slika, 4 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević, Izv. prof. dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić, dr.sc. Predrag Putnik, stručni suradnik,*

Rad predan: lipanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Labaratory of Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

ISOLATION OF PROANTHOCYANIDINS GRAPE MERLOT USING HIGH PRESSURE ASSISTED EXTRACTION

Paula Radonić, 6648/PT

Abstract: During the wine production most of the organic residue is the wine grape pomace, which represent a cheap source of high-value bioactive components . The aim of this study was to determine the effect of high pressure assisted extraction on the isolation of proanthocyanidins from grape varieties Merlot skin . The isolation process was carried out 70 % aqueous ethanol at pressures of 200 and 400 MPa , a temperature of 40 , 60 and 80 ° C and the extraction time 5, 15 min. Isolated proanthocyanidins were determined spectrophotometrically, and the highest yield was obtained at 40 ° C , a pressure of 200 MPa and a time duration of 15 min . Using NIR spectra we can determine and predict the content of isolated proanthocyanidins , a coefficient of determination of proanthocyanidins to Chadockovoj scale ($R^2 = 0.95038$) shows that this model is representative , and that is possible very good prediction , as well as the good relationship between the observed dependent and independent variables model .

Keywords: proanthocyanidin, extraction, grape pomace, high pressure, NIR spectroscopy

Thesis contains: 31 pages, 13 figures, 4 table, 45 references

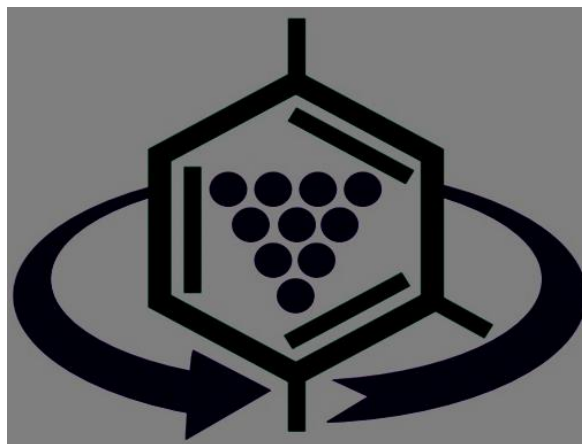
Original in: Croatian

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, Assistant Professor, PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, Assoc. prof. , Predrag Putnik, Ph.D., expert assistant,*

Thesis delivered: June, 2016.



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. TEORETSKI DIO	2
2.1. Organski otpad od proizvodnje vina.....	2
2.2 Fenolni spojevi komine	2
2.3. Flavonoidi.....	3
2.3.1. Proantocijanidini	6
2.4. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. High Hydrostatic Pressure Extraction, HHPE).....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. Priprema uzorka komine grožđa sorte <i>Merlot</i>	9
3.1.2. Aparatura i pribor	11
3.1.3. Kemikalije i standardi.....	12
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. Ekstrakcija proantocijanidina potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom.....	13
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom.....	14
3.2.3. Snimanje NIR (engl. Near infrared spectroscopy) spektra	15
4. RASPRAVA I REZULTATI	18
4.1. Rezultati NIR spektroskopije.....	18
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA:.....	26

1. UVOD

Grožđe (*Vitis vinifera L.*) je uz jabuke i naranče najvažnije jestivo voće koje se uzgaja pretežno u umjerenoj klimi, a gotovo 65 % ukupne svjetske proizvodnje otpada na mediteranski dio Europe. Vinova loza, odnosno njezin plod se u najvećoj mjeri uzgaja radi proizvodnje vina, a manjim dijelom se prerađuje u voćne sokove i druge proizvode.

Godišnje se proizvede oko 77 milijuna tona grožđa (FAOSTAT, 2015), a ukupne količine grožđa prerađenog u vino zaostane od 20-30% nusproizvoda koju najvećim dijelom čini komina grožđa, koja se smatra jeftinim izvorom visokovrijednih biloški aktivnih komponenata (Schieber i sur., 2001; Čanadanović-Brunet i sur., 2009). Obiluje sekundarnim biljnim metabolitima, poput polifenolnih spojeva, što je rezultat njihove slabije ekstrakcije tijekom fermentacije vina. Za fenolne spojeve je poznato da imaju antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje, a značajnu skupinu čine i proantocijanidini, oligomeri ili polimeri flavan-3-ola. Nalaze se u vinskoj komini- sjemenci, peteljkovini i pokožici. Primjenom različitih metoda mogu se ekstrahirati iz različitih supstrata, pa i iz komine grožđa te koristiti kao sastojak različitih proizvoda u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zbog svog antioksidacijskog, antimikrobnog i protuupalnog djelovanja (Bandyopadhyay i sur., 1999) fenolni spojevi iznimno su važni te se pomoću mnogih metoda i tehnologija mogu ekstrahirati i inkapsulirati kao funkcionalni aditivi u različite prehrambene i farmaceutske proizvode.

Uz klasične metode ekstrakcije danas se sve više koriste i tehnologije nove generacije u koje se ubrajaju visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, pulsirajuće svjetlo, oscilirajuće magnetsko polje i dr. Navedene nove tehnike uz minimalan utrošak otapala, kroz kraće vrijeme i pri nižim temperaturama pripadaju ekološki prihvatljivim tehnikama koje se koriste pri izolaciji bioaktivnih spojeva iz različitih prirodnih supstrata.

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom jedna je od značajnijih metoda u izolaciji polifenolnih spojeva iz komine koju u usporedbi sa klasičnom ekstrakcijom karakterizira veće iskorištenje i prinos polifenolnih spojeva.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti utjecaj ekstrakcije potpomognute visokim tlakom na učinkovitost izolacije proantocijanidina iz komine grožđa sorte Merlot. Izolacija proantocijanidina provedena je pri slijedećim uvjetima: tlakovima (200 MPa, 400 MPa) temperaturama ekstrakcije

(40 °C, 60 °C, 80 °C) i vremenima trajanja ekstrakcije (5 min i 15 min). Uz navedeno cilj je bio snimiti NIR spektre i na osnovu njih predvidjeti sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Organski otpad od proizvodnje vina

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je jedna od najrasprostranjenijih biljnih vrsta koja zauzima gotovo 7,8 milijuna hektara svjetske površine (OIV 2002). Tijekom proizvodnje vina od ukupne količine prerađenog grožđa 20 % predstavlja organski otpad ili nusproizvod grožđanu ili vinsku kominu (Mazza i Miniati, 1993), koja se primarno koristi kao gnojivo u vinogradima (Diaz i sur., 2002). Prema ovim podacima proizlazi da vinska komina čini gotovo 9 milijuna tona otpada, pri čemu njezina količina ovisi i o vrsti grožđa kao i o tehnologiji prerade grožđa.

Organski otpad odnosno vinska komina sadrži sjemenke (oko 35 %), pulpu i pokožicu, peteljke te lišće (Teixeira i sur., 2014). Komina grožđa predstavlja dobar izvor različitih vrijednih produkata kao što su etanol, limunska kiselina, ulje koštica grožđa, hidrokoloide i dijetalna vlakna (Hang i sur, 1988). Osim toga, vinsku kominu karakterizira veliki udio polifenolnih spojeva koji zaostanu nakon proizvodnje vina (Kammerer i sur., 2004).

U proteklih nekoliko godina, novija znanstvena istraživanja potvrđuju, da polifenolni spojevi iz crvenog grožđa posjeduju značajnu antioksidacijsku aktivnost te djeluju pozitivno u prevenciji hiperglikemije i upalnih oboljenja (Hogan i sur., 2010), stoga se povećao interes za preradu i iskorištavanje komine kao sekundarnog izvora vrlo vrijednih fenolnih spojeva.

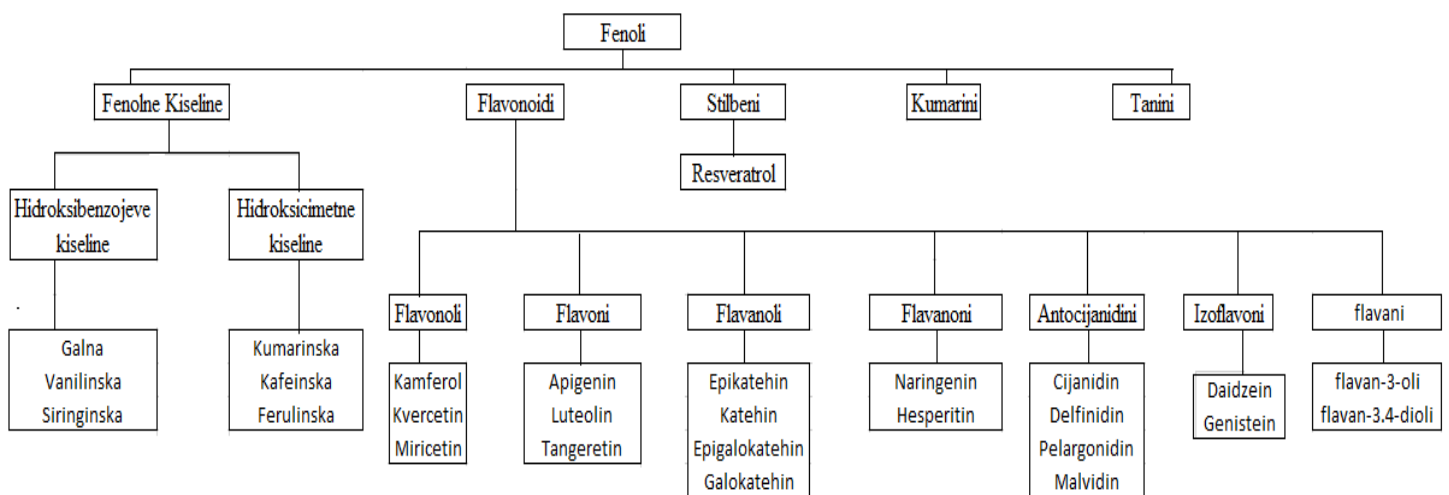
2.2 Fenolni spojevi komine

Fenoli, spojevi pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima koji biljkama daju specifične organoleptičke karakteristike kao što su boja, okus, aroma, trpkoca i gorčina (Lapornik i sur., 2005). Najzastupljeniji su u sjemenkama, pokožici i mezokarpu voća i povrća, žitaricama, kori drveća, lišću i cvijeću te gotovo svim vrstama začinskog i aromatskog bilja. Djeluju kao zaštita od UV zračenja i pigmentacije. Imaju značajnu ulogu u obrani protiv

nametnika i patogenih mikroorganizama. Uz sve navedeno, ovi visokovrijedni spojevi uključeni su u osnovne metaboličke procese rasta i razvoja biljke.

Fenolni spojevi ovisno o kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoidne spojeve te stilbene, kumarine i tanine (Slika 1). U neflavonoidne spojeve ubrajaju se fenolne kiseline i njihovi derivati (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), lignani te stilbeni. U flavonoide ubrajamo flavone, izoflavone, flavonole, flavanone, flavanole te antocijane, a razlikuju se prema stupnju oksidacije piranskog prstena (Riedel i sur., 2012).

Proizvode od grožđa, a naročito crno vino i kominu karakterizira značajan udio polifenola, te su najviše sadržani u pokožici crnog grožđa (Ignat i sur., 2011). Lokalizacija polifenolnih komponenata može varirati ovisno o vrsti i tipu grožđa, klimatskim i okolišnim uvjetima (Pinelo i sur., 2006) te mjestu položaja vinograda i procesima proizvodnje vina. Zbog svoje antioksidacijske aktivnosti te sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i utjecaja na kronične degenerativne bolesti kao što su tumori, Alzheimerova bolest i dijabetes, vrlo su važni u ljudskoj prehrani kao čimbenici očuvanja zdravlja (Corrandini i Nicoletti, 2013).



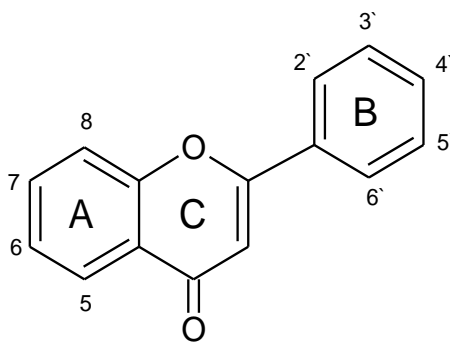
Slika 1. Podjela fenolnih spojeva prema kemijskoj strukturi (Whale i sur., 2010)

2.3. Flavonoidi

Flavonoidi su poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (antocijani) u biljnom tkivu te predstavljaju najbrojniju skupinu fenolnih spojeva koju nalazimo u različitim biljnim vrstama, te ih je identificirano više od 6400 (Harborne i sur., 1999), te kao takvi pripadaju velikoj skupini sekundarnih biljnih metabolita polifenola male molekulske mase. Kemijski gledano, ovi spojevi su građeni od difenilpropanskog kostura C_{15} ($C_6-C_3-C_6$), sastoje se od dva benzenska prstena (A i B) koji su povezani su s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 2). Stoga, mogu biti hidroksilirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, metoksilirani i esterificirani organskim kiselinama. Glikozidacija se događa najčešće na položaju 3-, a rjeđe na položaju 7-. U prirodi je prisutno oko 80 šećera koji sudjeluju u glikozilaciji flavonoida, a najčešće vezani šećeri su glukoza, galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).

Flavonoidi se razlikuju ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, a dijele se na: antocijane, flavone, izoflavone, flavanone, flavan-3-ole, flavonole, procijanidine i dihidrohalkone. Do danas je poznato više od 6400 flavonoida (Ignat i sur., 2011).

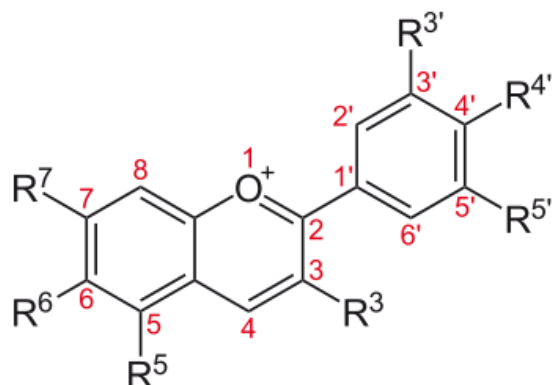
U grožđu, flavanoidi se primarno nalaze u epidermu pokožice grožđa i sjemenki (Waterhouse i sur., 2002.; Bogs i sur., 2007; Dixon i sur., 2005.; Lepiniec i sur., 2006; Conde i sur., 2007). Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu topljivih polifenola u grožđu, što u najvećoj mjeri doprinosi biološkoj aktivnosti proizvoda od grožđa (Conde i sur., 2007). Prema znanstvenim istraživanjima u pokožici grožđa prisutna je značajna količina antocijana, flavanola (kvercetin) i flavan-3-ola (katehin/epikatehin), dok sjemenke sadržavaju značajan udio procijanidina (Braidot i sur., 2008).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Anonimus 3.)

Antocijani su u biljkama, pa tako i u grožđu prepoznatljivi kao plavi, ljubičasti i crveni pigmenti topljivi u vodi i staničnom soku (Georgijev i sur., 2014), a ujedno su zaslužni za karakterističnu obojenost crnog vina. Ovi sekundarni biljni metaboliti najkoncentriraniji su u pokožici crvenog grožđa. Osim toga, prema znantsvenim istraživanjima dokazano je da se antocijani također akumuliraju u mezokarpu i pulpi bobica grožđa (He i sur., 2010; Riedel i sur., 2012), dok u bijelom grožđu nisu uopće zastupljeni. Kemijska struktura antocijana flavonoidna je struktura koja obuhvaća u centralnom piranskom prstenu kisikov atom te pozitivan naboj (Slika 3.) U prirodi najčešće dolaze u formi glikozida, a do danas je pronađeno je preko 30 različitih aglikona antocijana koji se nazivaju antocijanidini (Slika 3). Svaka sorta grožđa ima svoj jedinstven sastav antocijana pa tako europske sorte posjeduju samo antocijane u obliku 3-*O*-monoglukoziida (Ribéreau-Gayon, 1959; Rodriguez-Montealegre i sur., 2005.).

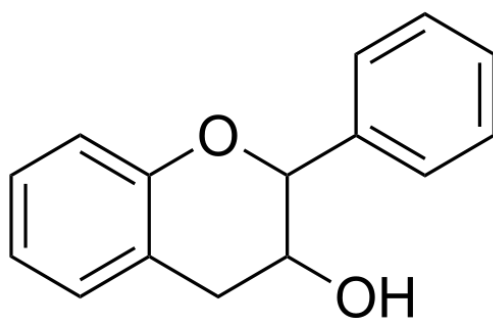
Osim blagotvornog utjecaja na ljudsko zdravlje i nutritivnu vrijednost, antocijani se koriste i kao prehrambena bojila (Francis i Markakis, 1989).



Slika 3. Kemijska struktura antocijana (Anonimus 4)

Flavan-3-oli predstavljaju najrašireniju skupina flavonoida, koji imaju zasićenu vezu između C₂ i C₃ atoma (Slika 4). Imaju dva asimetrična ugljikova atoma (C₂ i C₃) u molekuli te se pojavljuju u četiri različita izomerna oblika. Flavan-3-oli međusobnim povezivanjem tvore procijanidine. Flavanoli poznati još kao flavan-3-oli u grožđu su prisutni uglavnom u formi (+)-katehina (Lin i sur., 2006), (-)-epikatehina (De Groot i sur., 1998) i proantocijanidina (Riedel i sur., 2012.)

Koncentriraju se u sjemenkama grožđa, a mogu se naći i u pokožici grožđa (Cantos i sur., 2002). U bijelim sortama predstavljaju od 46-56 % ukupnih fenola, a u crnim srotama grožđa taj udio se kreće od 13-30 % (Cantos i sur., 2002). Sastav flavanola strogo ovisi o sorti grožđa. Flavanoli, drugo zastupljeni flavonoidi u grožđu su prisutni jedino kao 3-*O*-glikozidi u pokožici grožđa, koji također mogu tvoriti aglikone ((kvercetin, kamferol, miricetin, izorhamnetin (Knekt i sur., 1996; Le Marchand, i sur., 2002; Khan i sur. 2010) koji su pronađeni u vinu i soku kao rezultat kiselinske hidrolize tijekom procesiranja i skladištenja (Castillo-Muñoz i sur., 2007).



Slika 4. Kemijska struktura flavan-3-ola (Anonimus 5)

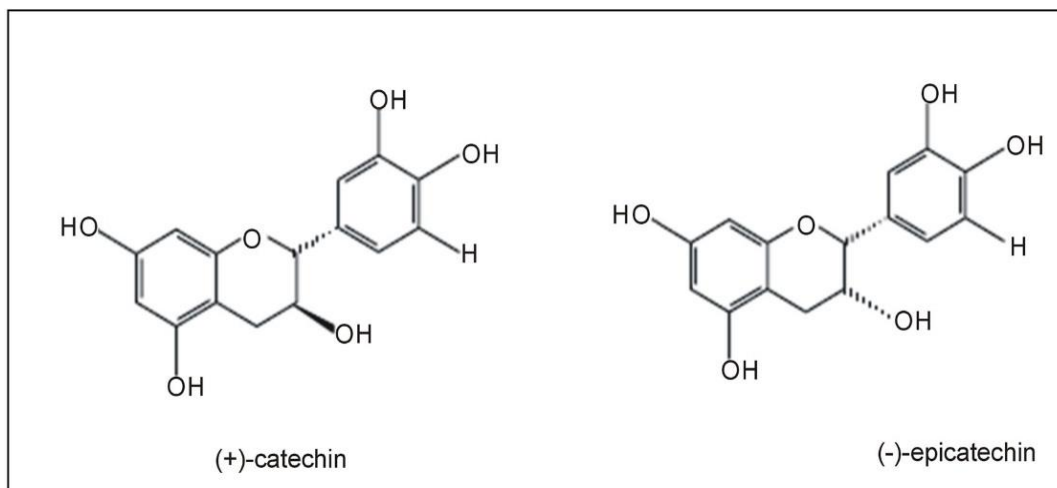
2.3.1. Proantocijanidini

Proantocijanidini predstavljaju skupinu monomera, dimera i polimera katehina i epikatehina zajedno sa antocijanima te su bezbojni sekundarni biljni produkti (Texiera i sur., 2013). Sintetiziraju se u biljkama kao oligomeri ili polimeri flavan-3-ola u biosintetskom putu flavonoida (He i sur., 2008). Derivati su galne kiseline (Ignat i sur., 2011), a glavne strukturne jedinice proantocijanidina su (+)-katehin i (-)-epikatehin (Slika 5). Međusobno se razlikuju prema strukturi odnosno po prirodi svojih konstruktivnih podjedinica, položaju povezivanja istih i stupnju polimerizacije. Primjerice, u sjemenkama grožđa pronađeni su proantocijanidini koji se sastoje

samo od procijanidina čije su osnovne monomerne podjedinice (+)- katehin i (-)-epikatehin, dok se u pokožici grožđa nalaze i procijanidini i prodelfinidini sastavljeni od (-)- epigalokatehina. Proantocijanidini koji se nalaze u pokožici imaju veći stupanj polimerizacije u odnosu na sjemenske.

Proantocijanidini najkoncentriraniji su u vinskoj komini, točnije u sjemenci (80%), peteljkovini (12%) i pokožici (8%), dok u mezokarpu nisu pronađeni. Količina proantocijanidina varira od sorte do sorte, a najbogatije proantocijanidinima su sorte Cabernet Sauvignon, Merlot i Pinot crni. Unatoč tome što ih bijelo i crno grožđe sadrži podjednako, bijelo vino je iznimno siromašno proantocijanidinima (Teixeira i sur., 2013). Koncentracija proantocijanidina u crnom grožđu varira od 1 do 4 g L⁻¹ ovisno o sorti i procesu proizvodnje vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), a u komini grožđa čine 21-52 % suhe tvari komine (Teixeira i sur., 2014).

Ovi sekundarni metaboliti djeluju antivirusno i baktericidno, smanjuju kolesterol i trigliceride, djeluju u prevenciji srčanih bolesti, te inhibiraju enzime koji stvaraju histamin. Osim toga, velika važnost proantocijanidina je u tome što induciraju apoptozu i inhibiraju metastaziranje stanica raka dojke i raka debelog crijeva (Mantena i sur., 2006). Apsorpcija proantocijanidina u ljudskom tijelu ograničena je na monomere i dimere, a viši stupanj polimerizacije rezultira značajnim smanjenjem biološke raspoloživosti (Caballero i sur., 2003).



Slika 5. (+)-katehin i (-)-epikatehin (Anonimus 6)

2.4. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. High Hydrostatic Pressure Extraction, HHPE)

Visoki hidrostatski tlak je netopliniska metoda obrade namirnica u prehrambenoj industriji koja svoju sve veću primjenu nalazi u različitim fazama proizvodnje (Bosiljkov i sur., 2010). Svoj uzlet doživjela je početkom dvadesetog stoljeća, a prvotni cilj bio je postići istu razinu sigurnosti hrane koja se postiže termičkom obradom, pasterizacijom, a da uz to hrana tretirana visokim hidrostatskim tlakom zadovolji senzorske i organoleptičke zahtjeve potrošača (Rastogi i sur., 2007). Metoda obrade visokim hidrostatskim tlakom podrazumijeva podvrgavanje tekuće ili krute hrane, s ambalažom ili bez nje, djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa (1000 MPa). Temperatura ovog procesa može se kretati od 0 do 100 °C, a vrijeme trajanja može trajati od nekoliko sekundi do 30 minuta. Princip rada ove tehnologije bazira se na Le Chatelier- Breauovom zakonu, prema kojemu, kad se na neki sustav koji je u stanju ravnoteže djeluje povećanjem tlaka, sustav reagira tako da nastoji suzbiti primijenjeni tlak. Posljedično se prilikom djelovanja visokog tlaka pospješuju one reakcije koje vode k smanjenju volumena, a nasuprot tome, one reakcije koje su praćene povećanjem volumena bit će inhibirane.

Visoki hidrostatski tlak utječe nepovoljno na nekovalentne - vodikove, ionske i hidrofobne veze, dok na kovalentne povišeni tlak nema utjecaja za vrijeme tretiranja. Stoga, komponente hrane s malom molekulskom težinom, a koje su ujedno odgovorne za specifičnu vrijednost i organoleptičke značajke hrane zbog malog udjela u sekundarnoj, tercijarnoj i kvartarnoj strukturi ostaju gotovo nepromijenjene uslijed djelovanja povišenog tlaka. Nasuprot tome, molekule velike molekulske težine čija je tercijarna struktura vrlo važna za izražavanje funkcionalnih obilježja, osjetljive su na djelovanje visokog tlaka (Krešić, 2011.). Zbog svoje multifukcionalnosti ova tehnologija je sve učestalija u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao i u biotehnološkim istraživanjima.

Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom poprima sve veći značaj u procesu ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala, a glavna prednost ove netermičke metode je brzina i veća učinkovitost u usporedbi sa ostalim konvencionalnim postupcima ekstrakcije, posebice jer otapalo uslijed visokog tlaka prodire u svaku biljnu stanicu

što rezultira uspješnijom ekstrakcijom (Zhang i sur., 2004). Kao posljedica razlike u tlaku na unutarnjoj i vanjskoj staničnoj membrani, dolazi do povećanja brzine prijenosa tvari putem promjene koncentracijskog gradijenta čime se povećava brzina difuzije, uslijed čega se povećava propusnost staničnih membrana. Time se omogućava otapalu da prodire u svaku stanicu, što u konačnici daje veće iskorištenje. Ovaj tip ekstrakcije stoga karakterizira manji utrošak energije i poboljšanje sigurnosti obrade kao i postizanje boljih iskorištenja tijekom ekstrakcije (Shen, i sur., 2011). Osim toga, može se provoditi pri sobnoj temperaturi te ne dolazi do gubitka biološke aktivnosti kao niti do degradacije, transformacije ili razgranje biokativnih komponenata (Corrales i sur., 2008; Zhang i sur., 2004). Prema istraživanjima koje su proveli Dede i sur. (2007) na hrani koja je procesirana visokim tlakom zadržan je svojstven okus, aroma i svježina, dok su promjene boje svedene na minimum. Stoga, senzorska kvaliteta namirnica uslijed tretiranja visokim tlakom ostaje nepromijenjena.

Nadalje, ova tehnologija ima široku primjenu te se uspješno koristi u ekstrakciji flavonoida iz propolisa (Zhang i sur., 2005), antocijana iz pokožice grožđa (Corrales i sur., 2008) i različitih fenolnih spojeva iz nusprodukata od prerade grožđa (Corrales i sur., 2008), polifenola iz zelenog čaja tea (Zhang i sur., 2004), pektina iz narančine kore (Guo i sur., 2012) kao i u mnoge druge svrhe.

Zhang i sur. (2005) pokazali su da su primjenom ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (primjenjeni su tlakovi od 100 do 600 MPa uz etanol kao otapalo) dobiveni veći prinosi flavonoida iz propolisa u usporedbi sa klasičnom ekstrakcijom. Ekstrakcija uz primjenu visokog tlaka je bila učinkovitija za gotovo 88 %, budući da se topljivost polifenola povećava povećanjem tlaka (Richard JS, 1992.). Prema istraživanjima koje su proveli Guo i sur. (2012), pokazalo se da povišeni tlak i vrijeme ekstrakcije imaju pozitivan utjecaj na izolaciju polifenola. Povećanjem tlaka sa 300 na 500 MPa, udio ekstrahiranih polifenola iz zelenog čaja povećao se za 1,63 puta u periodu od 0,6 minuta i 1,46 puta u 4 minute.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Priprema uzorka komine grožđa sorte *Merlot*

Za istraživanje je korišten nusproizvod (komina) od proizvodnje vina grožđa sorte *Merlot* koji je izuzet nakon prešanja, u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska). Uzorak komine se sastojao od pokožice, sjemenke i dijelova peteljke. Dijelovi peteljke su uklonjeni, a preostala komina je podvrgnuta liofilizaciji. Prije početka same analize liofilizirana pokožica je ručno odvojena od sjemenki te je potom samljevena u prah pomoću mlinca za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1). Dobiveni prah pokožice komine koristio se za provođenje ekstrakcije proantocijanidina (Slika 1).

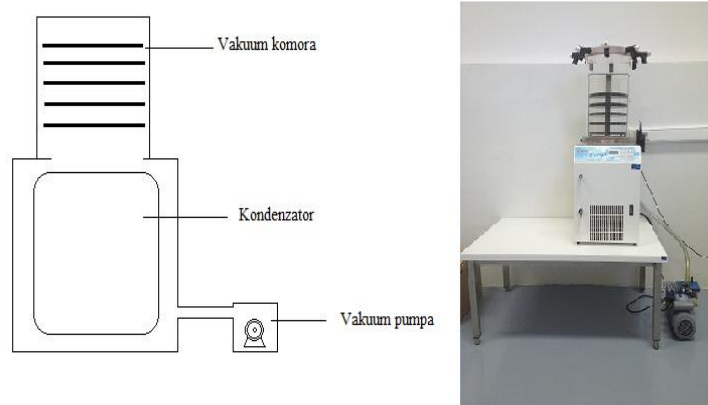


Slika 5. a) Liofilizirana komina (pokožica, sjemenke, peteljka); b) sjemenke grožđa; c) pokožica; d) samljevena pokožica

Postupak liofilizacije komine

Postupak liofilizacije proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska) (Slika 2), a uzorak je prethodno zamrznut na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. U jednom sloju na šest plitica raspoređena je masa smrznute komine od cca 500 g nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedena je pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi od -30 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}/24$ sata, a izotermna desorpcija pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}/12$ sati. Po završetku procesa liofilizacije

prosječni udio suhe tvari u liofiliziranoj komini iznosio je 96,85 %. Liofilizirana komina zapakirana je u polipropilenske vrećice i skladištena na temperaturi od -20 °C do provođenja analize.



Slika 6. Shematski prikaz laboratorijskog liofilizatora (vlastita fotografija)

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- Uređaj za vakumiranje (Besser Vacuum SRL, Italija)
- Uređaj za visoki tlak (Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija)
- Centrifuga (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β , Velika Britanija)
- NIR instrument i računalo (posudica i sonda)

Pribor:

- Plastične bočice (50 mL)
- Vakuum vrećice
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 μ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Tikvica s okruglim dnom
- Lijevak

3.1.3. Kemikalije i standardi

- 100 %-tni metanol
- 96 %-tni etanol
- 70 %-tni etanol

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se 729 mL 96 %-tnog etanola i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

- Deionizirana voda
- 1 %-tna etanolna otopina vanilina

- Priprema: 1 g vanilina se u odmjernej tikvici od 100 ml nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.
- Koncentrirana 96 %-tna H_2SO_4
- 25 %-tna otopina H_2SO_4
- *Priprema:* 13,02 mL 96 %-tne H_2SO_4 prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. H_2SO_4 se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.
- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: Odvaži se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija proantocijanidina potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija proantocijanidina iz liofilizirane pokožice grožđa provedena je prema planu pokusa u Tablici 1. Tijekom ekstrakcije varirani su parametri tlaka, temperature i vremena ekstrakcije

Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije proantocijanidina primjenom visokog tlaka

Vrsta otapala	Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Vrijeme ekstrakcije (min)
70 %-tni etanol	40	200	5
			15
		400	5
			15
	60	200	5
			15
		400	5
			15
	80	200	5
			15
		400	5
			15

Postupak ekstrakcije

1 g ($\pm 0,001$ g) prethodno samljevenog i liofiliziranog uzorka pokožice grožđa sorte Merlot odvaži se na analitičkoj vagi u plastičnu bočicu volumena 50 mL, gdje se potom doda 45 mL otapala za ekstrakciju (70 %-tni etanol). Potom se plastična bočica zatvori, stavi u plastičnu vrećicu i vakumira. Tako vakumirane bočice u vrećicama postavljaju se dvije po dvije u uređaj za ekstrakciju visokim tlakom (Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija) te se na računalo podešavaju zdani parametri ekstrakcije (tlak, temperatura, vrijeme). Svaka ekstrakcija provedena je u paraleli prema planu pokusa (Tablica 1).

Dobiveni ekstrakti ohlade se pod mlazom hladne vode, te se sadržaj kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopuni do oznake otapalom 70 %-tnim etanolom.

Sadržaj tikvice se prebaci u plastične falkonice volumena 50 mL koje se potom stavljaju na centrifugiranje (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka) 10 minuta na 5000 rpm. Po završetku centrifugiranja dekantira se bistri dio ekstrakta u 2 manje plastične falkonice volumena 15 mL te se do provođenja analiza skladište na -18 °C.



Slika 7. Uređaj za visoki tlak: Stansted Fluid Power, Velika Britanija

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Princip određivanja

Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998)

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1%-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄ u metanolu i 1 mL ekstrakta. Zatim se pripremi i slijepa proba na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Sve zajedno se promiješa, te se reakcijska smjesa ostavi stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5g/L. Od priređene otopine naprave se razrijeđenja od 50, 100, 200, 300 i 400 mg u 100 mL, tako da se redom otpipetira 1, 2, 4, 6, i 8 mL alikvotne otopine standarda u odmjerne tikvice od 10 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice redom se otpipetira po 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Nakon toga doda se 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne H₂SO₄ u metanolu. Potom se reakcijska smjesa ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 500 nm. Na navedeni način pripremi se i slijepa proba, osim što se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol.

Pomoću dobivenih vrijednosti nacрта se baždarni pravac u programu Microsoft Excel pri čemu se na apscisi nalaze koncentracije katehina izražene u mg/L, a na ordinati vrijednosti izmjerene apsorbancije pri 500 nm. Koncentracija polimernih proantocijanidina izračunava se pomoću dobivene jednadžbe pravca:

$$Y=0,004X+0,2689$$

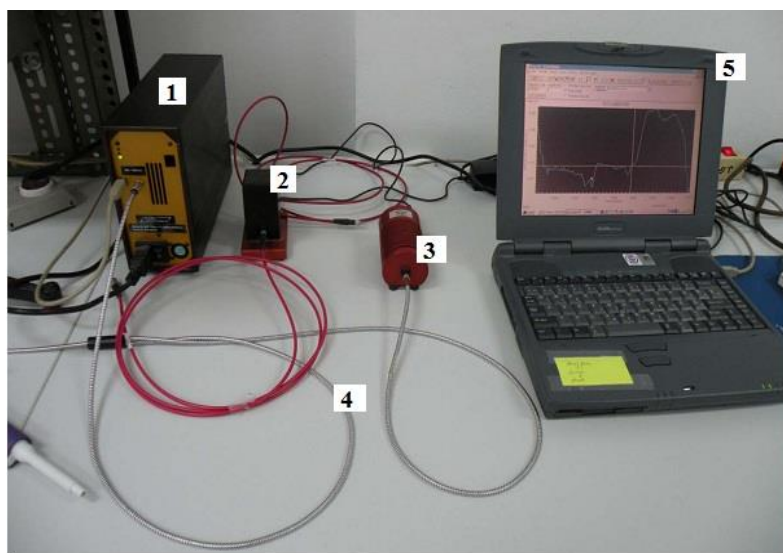
gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm,

X – koncentracija katehina (mg/L).

3.2.3. Snimanje NIR (engl. Near infrared spectroscopy) spektra

Ovisno o tome je li uzorak tekući, kruti ili u obliku praha, uzorak se snima ili u kiveti ili pomoću sonde. U ovom istraživanju svi uzorci su bili tekući, te su prebačeni u kivete koje se stavljaju na mjesto za snimanje uzoraka. Nakon toga, na računalo se pokrene program za snimanje apsorpcijskog spektra- SPEC32,. Spektri analiziranih uzoraka snimaju se tri puta za redom, potom se izmjerene apsorbance prve i druge derivacije spremaju na računalo, kako bi bilo moguće što točnije izdvojiti kritične spektre koji su vezani za antioksidacijsku aktivnost uzoraka. Na kraju se iz snimljena tri spektra, prikazuje srednja vrijednost, kako bi se smanjile različitosti i minimizirale odstupanja spektra, a za konačnu analizu snimljenih NIR spektara ispitivanih uzoraka korišten je program Statistica ver. 10 (StaSoft, 2009).



Slika 8. NIR instrument povezan s računalom s označenim dijelovima: 1) NIR instrument; 2) mjesto za snimanje uzorka u kiveti; 3) izvor svjetlosti; 4) optički kablovi; 5) računalo

3.2.3.1. Primjena metode najmanjeg kvadrata u modelu predikcije proantocijanidina

NIR spektri su organizirani u matricu \mathbf{X} s uzorcima postavljene u redovima i NIR spektrima smještenim u stupcima. Svaki vektor varijable je automatski skaliran s pripadnom valnom duljinom uzorka te se prikazuje kao:

$$\mathbf{X}_{i,j} \leftarrow \frac{X_{i,j} - \bar{X}_j}{\sigma_j(X_j)} \quad [3]$$

Značajne valne duljine izdvojene iz apsorpcijskih spektara korištene su dalje u predikcijskim modelima koji predstavljaju linearni regresijski modeli sa sljedećim oblikom:

$$y = b + \sum a_j \cdot AU_{\lambda_j} + e_i [4]$$

$$y = a_1 \cdot AU_{\lambda_1} + a_2 \cdot AU_{\lambda_2} + a_3 \cdot AU_{\lambda_3} + a_4 \cdot AU_{\lambda_4} + a_5 \cdot AU_{\lambda_5} + \dots + e_i \quad [5]$$

te uključenjem ključnih valnih duljina, izraz za vezu NIR spektara i proantocijanidina poprima sljedeći oblik:

$$y = a_1 \cdot AU_{904} + a_2 \cdot AU_{905} + a_3 \cdot AU_{906} + \dots + a_{24} \cdot AU_{927} + a_{25} \cdot AU_{928} + b [6]$$

gdje je:

y – zavisna varijabla: ukupni proantocijanidini (UPA);

AU promatrane absorbance spektra

a_1 - a_{25} , b - parametri modela

Reprezentativnost regresijskog modela ocjenjena je koeficijentom determinacije (R^2) prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 2). Koeficijentom determinacije se procjenjuje veza između promatrane zavisnih i nezavisnih varijabli modela te što je koeficijent determinacije bliži vrijednosti 1, to je veza među promatranim varijablama reprezentativnija tj. čvršća.

Tablica 2. Chadockova ljestvica

R²	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

4. RASPRAVA I REZULTATI

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na izolaciju polimernih proantocijanidina uz upotrebu 70% vodene otopine etanola te utvrditi utjecaj vremena trajanja ekstrakcije (5 i 15 min), temperature (40, 60 i 80 °C) i različite vrijednosti hidrostatskog tlaka (200 i 400 MPa) na učinkovitost ekstrakcije.

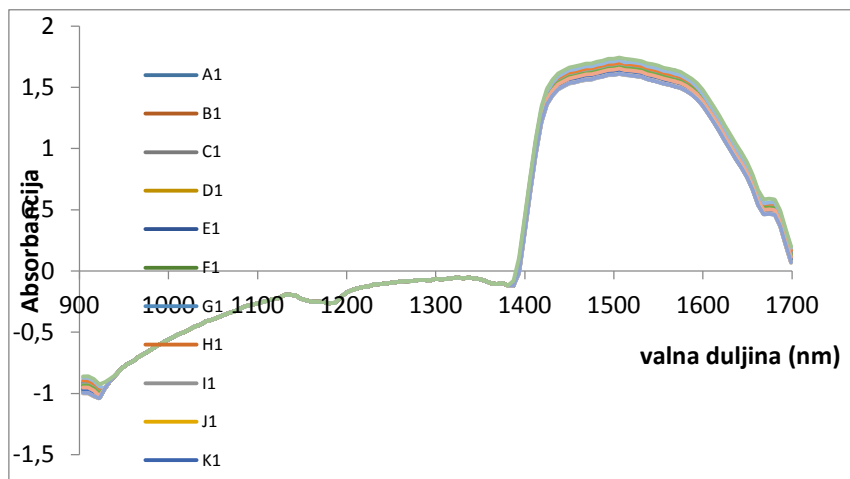
4.1. Rezultati NIR spektroskopije

Cilj primjene NIR spektroskopije je povezati je sa sadržajem određenog parametra te uz pomoć regresijskih modela predvidjeti očekivani sadržaj tog parametra (npr. ukupnih fenola i proantocijanidina) na osnovu snimljenog NIR spektra uzorka.

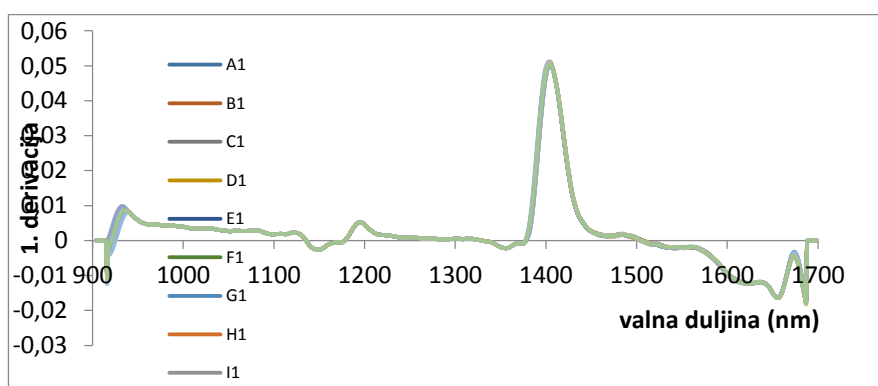
Predikcijskim modelima se želio utvrditi potencijal NIR spektroskopije na osnovu čijih spektara se može predvidjeti sadržaj proantocijanidina u promatranim uzorcima. Ukoliko je koeficijent determinacije za model između 0,64 do 1, model se može koristiti za predikciju, a što je koeficijent determinacije bliži 1 to je model bolji u predikciji određenog parametra.

NIR spektri uzoraka snimljeni su s ciljem praćenja kemijskih veza u blisko infracrvenom dijelu spektra kako bi se utvrdilo mogu li se ovi spektri koristiti u predikciji sadržaja ukupnih fenola i proantocijanidina u 24 uzoraka vinske komine, sorte Merlot koji su prethodno otopljeni u 70 %-tnom etanolu i ekstrahirani uz pomoć visokog tlaka, uslijed promijene temperature, tlaka i vremena ekstrakcije.

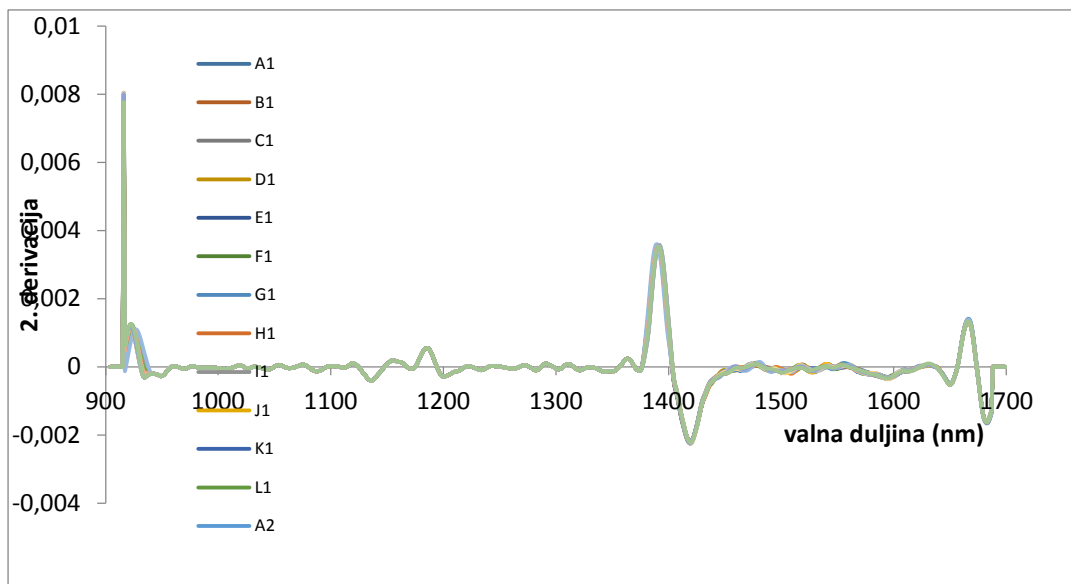
NIR spektri i pripadajuće prve i druge derivacije navedenih uzoraka prikazane su slikama 9 do 11. Najveća razlika vidljiva je u području između 1407 i 1506 nm, što predstavlja prvi overton za O-H skupinu. Točka infleksije vidljiva je u području između 900 i 918 nm, što predstavlja treći overton za C-H veze (slika 10). Navedeno ukazuje na potencijal korištenja NIR spektroskopije jer upravo navedene veze čine strukturu proantocijanidina.



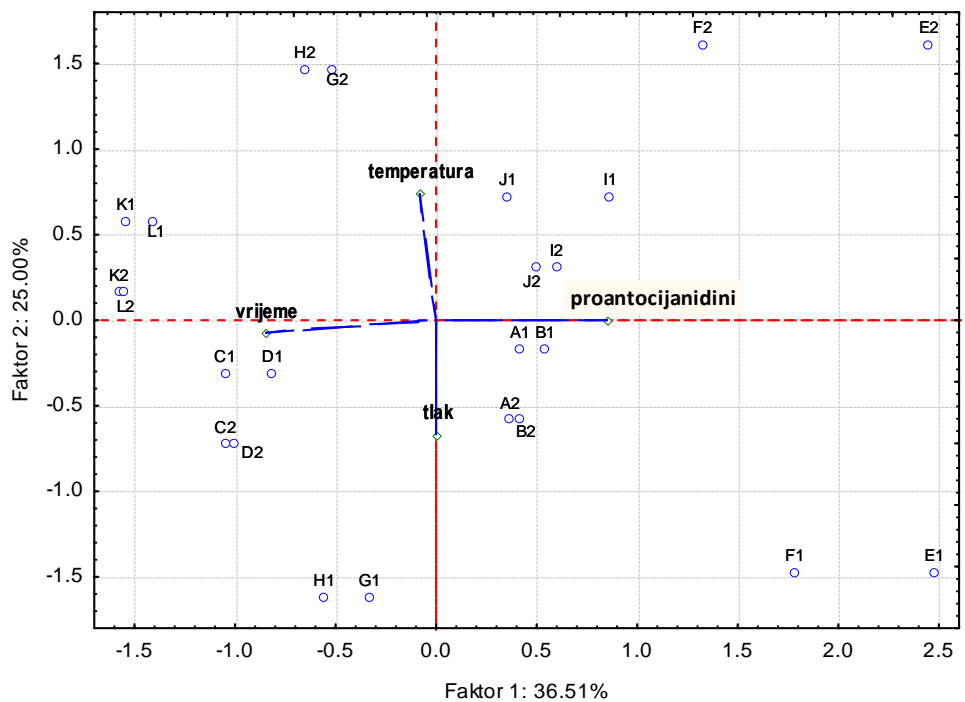
Slika 9. NIR spektar ekstrahiranih uzoraka komine grožđa sorte Merlot



Slika 10. Prva derivacija NIR spektra ekstrahiranih uzoraka komine grožđa sorte Merlot



Slika 11. Druga derivacija NIR spektra ekstrahiranih uzoraka komine grožđa sorte Merlot



Slika 12. PCA analiza NIR spektara laboratorijski pripremljenih uzoraka komine sorte Merlot uz etanol kao otapalo, mjereni nakon ekstrakcije potpomognute visokim tlakom

Analiza podataka pomoću faktorske analize gdje se izvodi vizualizacija podataka, a njihove vrijednosti za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućuje njihovo grupiranje (Jednaček i Novak, 2013).

Ovakav način analize naziva se analizom glavnih komponenata, tzv. PCA analiza (eng. Principal Component Analysis). Ovu metodu vrlo je često korištena radi svoje jednostavnosti, neparаметarskog izlučivanja bitne informacije i značajki iz skupova podataka upotrebom rješenja iz linearne algebre je vrlo često korištena prilikom obrade podataka (Gajdoš Kljusurić i sur., 2015; Ozaki i sur., 2007). Zbog navedenih karakteristika koje posjeduje, ova metoda (PCA) primjenjuje se prilikom raspoznavanja uzoraka (Jednaček i Novak, 2013).

PCA analiza primijenjena je na 24 uzorka vinske komine, sorte Merlot koji su tretirani različito vrijeme, pod određenom temperaturom i određenim tlakom.

Na slici 12 prikazana je raspodjela 24 uzorka prema prve dvije glavne komponente PCA analize. Snimljeni NIR apsorpcijski spektri i podaci o sadržaju proantocijanidina u uzorcima pokazuju jasno vidljivu razliku između uzoraka koji su ekstrakciji bili izloženi različitim uvjetima vremena, vrijednostima temperature i tlakova. Stoga se uzorci koji su prilikom ekstrakcije proantocijanidina izloženi istom iznosu tlaka, temperature te istom vremenu ekstrakcije nalaze u istom kvadrantu. Iz slike 12 vidljivo je da proantocijanidini koji su smješteni na osi pokazuju multieffekt prilikom obrade, te da su u pozitivnoj korelaciji sa uzorcima u prvom i četvrtom kvadrantu. Temperatura pokazuje pozitivnu korelaciju sa uzorcima u drugom kvadrantu (G2, H2, K1, K2, L1, L2), dok je vrijeme u pozitivnoj korelaciji sa onim uzorcima koji se nalaze u trećem kvadrantu (C1, C2, D1, D2, J1, G1).

4.2. Rezultati određivanja proantocijanidina

Tablica 3. Koncentracija proantocijanidina dobiveni ekstrakcijom pri različitim temperaturama, tlakovima i vremenima

Šifra uzorka	Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Proantocijanidini (mg Cat/g)
A	40	200	5	2.41±0.095
B			15	2.77 ±2.77
C		400	5	2.18±0.18
D			15	2.47±0.23
E	60	200	5	1.91±0.09
F			15	1.88±0.13
G		400	5	2.42±0.18
H			15	2.47±0.11
I	80	200	5	1.90±0.18
J			15	2.05±0.17
K		400	5	2.09±0.15
L			15	2.77±0.03

Dobiveni rezultati istraživanja pokazuju da je najviša koncentracija proantocijanidina dobivena u ekstraktu koji je dobiven pri temperaturi od 40 °C , tlaku od 200 MPa u trajanju od 15 min (2.77 ±2.77 mg Cat/g). Sličan prinosi proantocijanidina dobiveni su i pri temperaturi od 60 °C i tlaku od 400 MPa (2.47±0.11 mg Cat/g), odnosno temperaturi od 80°C i 400 MPa (2.77±0.03 mg Cat/g). Prema istraživanjima brojnih autora povećanje temperature pogoduje učinkovitosti ekstrakcije zbog povećanja topljivosti ciljanih skupina spojeva i koeficijenta difuzije (Spigno i sur., 2007; Pinelo i sur., 2005). Dio istraživanja pokazuje da povećanje temperature samo do određenih vrijednosti ima pozitivan utjecaj na postupak ekstrakcije bioaktivnih spojeva, te da temperature iznad 50 °C utječu na smanjenje stabilnosti fenolnih spojeva i do denaturacije proteina staničnih membrana (Pinelo i sur., 2005). Istraživanje koje su proveli Fontana i sur. (2015) su pokazala da je temperatura od 60 °C utjecala na povećanje iskorištenja ekstrakcije polifenolnih spojeva iz vinske komine.

Osim temperature, vrijeme trajanja ekstrakcije jedan je od ključnih i kritičnih parametara, koji utječe na učinkovitost ekstrakcije proantocijanidina (tablica 3). Pri višim temperaturama i duljem vremenu ekstrakcije dobiveni su viši maseni udjeli proantocijanidina. U ekstraktima koji su dobiveni pri vremenu ekstrakcije od 15 minuta maseni udjeli bili su veći od 75.45% do 97.68% u

odnosu na masene udjele dobivene u 5 minuta. No, ekstrakt koji je tretiran pri 60 °C i 200 MPa imao je veći prinos proantocijanidina u vremenu ekstrakcije od 5 min u odnosu na 15 min (98.43%). Dobiveni rezultati prikazuju da je utjecaj vremena u funkciji temperature, zbog čega su vrijednosti iskorištenja veće pri 15 min u odnosu sa 5 min. Prema istraživanjima koja su proveli Lafka i sur. (2007) pokazalo se kako je povećanje vremena ekstrakcije rezultiralo povećanjem ekstrahiranih fenola iz vodenih ekstrakata komine grožđa. Tijekom 3 sata izolirao se maksimalan sadržaj fenola, a daljnje povećanje vremena ekstrakcije pokazalo se kao neekonomično. Pri duljem vremenu ekstrakcije došlo je do smanjenja antioksidativnog djelovanja zbog degradacije fenola uslijed dugotrajne izloženosti višoj temperaturi i koncentraciji kisika te svjetlu (Lafka i sur., 2007). Prema istraživanjima koja su proveli Rajha i sur. (2014.) pokazalo se da je uz povećanje temperature moguće smanjiti vrijeme ekstrakcije, s ciljem ubrzavanja izolacije fenolnih spojeva iz komine grožđa. U drugim radovima navedeno je da produljenje vremena ekstrakcije od 15 do 90 min značajno povećavaju prinos ukupnih fenola, sa 90.4 na 110.4 (mgGAE g_{DW}⁻¹) (Casazza i sur., 2010).

Dobiveni rezultati našeg istraživanja pokazuju da je viši prinos proantocijanidina dobiven pri većem hidrostatskom tlaku, odnosno pri tlaku od 400 MPa. Slično su pokazala istraživanja drugih autora među koji su pokazali kako je prinos fenolnih spojeva iz ekstrakta malkure bio znatno viši pri 500 MPa nego pri 250 MPa (Altuner i sur, 2012). Brojna istraživanja su potvrdila da se porastom visokog tlaka povećava i topljivost fenolnih spojeva (Zhang i sur, 2005; Richard LS, 1992; Le Noble, 1988). Osim većeg prinosa fenolnih komponenata iz ekstrakata malkure, potvrdilo se da se da je njihova topljivost veća pri temperaturama do 100 °C i povešenom tlaku. Stoga su u tom istraživanju došli do zaključka da je HHPE vrlo učinkovita metoda ekstrakcije za biljne materijale koji sadrže visok dio smolastih komponenti. Sukladno s ovim istraživanjima Colarres i sur., 2009. su također proučavali učinak visokog hidrostatskog tlaka (200, 400, 600 MPa), etanola (20-100%), vremena (30-90 min) i temperature (20-70 °C). Naime u tom radu su utvrdili kako je najveći prinos antocijana iz pokožice crvenog grožđa ostvarili kod koncentracija etanola od 50% na 70 °C i 600 MPa što predstavlja trostruko veće iskorištenje uspoređujući sa kontroliranom ekstrakcijom.

Veći prinosi proantocijanidina pri višim HPPE su očekivana s obzirom da povećanjem hidrostatskog tlaka kako je ranije u radu navedeno dolazi do oštećenja stanične membrane i time

olakšava izolacija staničnih sastojaka. Visoki hidrostatski tlak rezultira povećanjem brzine prijenosa tvari putem promjene koncentracijskog gradijenta čime se povećava brzina difuzije, uslijed čega se povećava propusnost staničnih membrana, što u konačnici rezultira boljim iskorištenjem (Xi i sur, 2013).

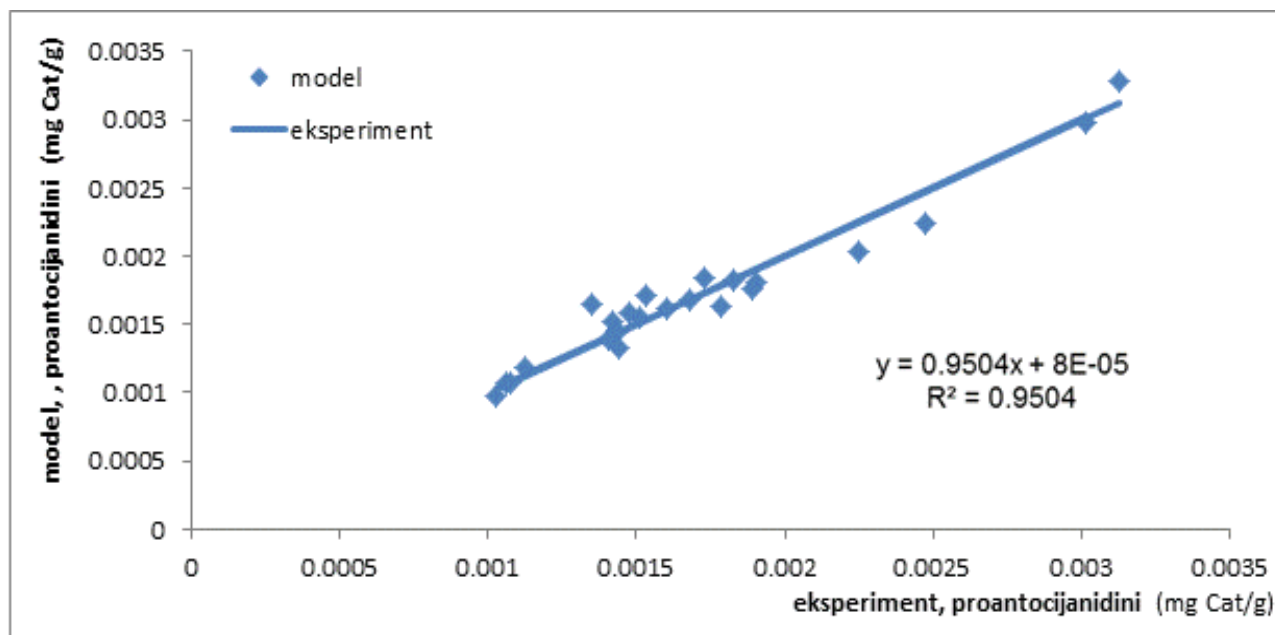
4.3. Rezultati predikcijskog i regresijskog modela

Za utvrđivanje sadržaja proantocijanidina potrebna je priprema uzoraka, mjerenje itd. što predstavlja određeni utrošak vremena, kemikalija i sl. Iz tog razloga se razvijaju predikcijski modeli kojima se na osnovu određenog mjerenja može predvidjeti očekivani sadržaj određenog parametra. U ovom slučaju, cilj je na osnovu NIR spektra predvidjeti očekivani sadržaj proantocijanidina u ekstraktima vinske komine, sorte Merlot. Korišten je regresijski model sa više ulaznih varijabli (x_i , $i=1,2,\dots,25$, i su valne duljine, od 904-928 nm), a izlazna varijabla (y) je sadržaj proantocijanidina.

Reprezentativnost regresijskog modela ocjenjena je koeficijentom determinacije (R^2) prema Chadockovoj ljestvici (tablica 2), te se njime procjenjuje veza između promatrane zavisne i nezavisnih varijabli modela. Što je koeficijent determinacije bliži vrijednosti 1, to je veza među promatranim varijablama reprezentativnija tj. čvršća. Pomoću koeficijenta determinacije za proantocijanidine koji iznosi 0.95038, može se zaključiti da je ovaj model reprezentativan, te da je moguća vrlo dobra predikcija. Ovaj model bi se mogao koristiti na novom ekstraktu uzorka vinske komine, sorte Merlot i procijeniti očekivani sadržaj proantocijana u njemu te pomoći u odluci je li „isplativo“ izolirati navedenu bioaktivnu komponentu ili ne.

Tablica 4. Parametri regresijskog modela za predikciju sadržaja proantocijanidina iz ekstrakata komine grožđa sorte Merlot (jednadžba 3)

parametri modela i pripadne vrijednosti								
a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9
-1030.2	0	0	4378.217	-3428.88	-226.784	1266.273	-312.46	2006.974
a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18
-5105.27	3684.527	-4562.39	5628.205	-1196.43	2230.279	-5396.1	0	0
a19	a20	a21	a22	a23	a24	a25	B	
1382.514	0	1386.041	-524.173	0	0	-180.334	-0.00714	



Slika 13. Regresijski model s prikazom odnosa eksperimentalnih podataka za proantocijanidine vs. vrijednosti za proantocijanidine prema modelu (j-ba 3.)

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom djelotvorna i pogodna za izolaciju proantocijanidina. Ovom metodom ostvaruju se visoki prinosi i bolje iskorištenje procesa uz primjenu visokih tlakova kroz kratko vrijeme obrade.
2. Kao otapalo pri izolaciji proantocijanidina primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom koristila se 70%-tna otopina etanola, a najveći prinos proantocijanidina ostavrio se pri temperaturi od 40 °C , tlaku od 200 MPa u trajanju od 15 min (2.77 ± 2.77 mg Cat/g).
3. NIR spektrometrija je metoda koju karakteriziraju jednostavnost zbog čega ima veliko područje primjene. Pomoću NIR spektara, odnosno regresijskih modela može se predvidjeti masene udjele izoliranih proantocijanidina. Koeficijent determinacije za proantocijanidine prema Chadackovoj ljestvici ($R^2=0.95038$) potvrđuje reprezentativnost regresijskog modela, kao i mogućost dobre predikcije bez provođenja analitičkog određivanja samih spojeva. Osim toga model pokazuje dobru vezu između skupa nezavisnih varijabli (25 valnih duljina $\lambda_{1-25}:904 - 924$) i promatrane zavisne varijable ($y=\text{proantocijanidini}$).
4. Rezultati PCA analize pokazuju grupiranje uzoraka koji su tijekom ekstrakcije proantocijanidina bili izloženi istom iznosu tlaka, temperature i vremenu ekstrakcije u istom kvadrantu. Osim toga proantocijanidini pokazuju pozitivnu korelaciju sa uzorcima u 1. i 4. kvadrantu kao i multieffekt tijekom obrade. Temperatura pokazuje pozitivnu korelaciju sa uzorcima u drugom kvadrantu, a vrijeme sa onima koji se nalaze u trećem kvadrantu.

5. LITERATURA:

1. Caballero B.;Finglas P.;Trugo L.: Encyclopedia of food sciences and nutrition (2003)
2. Altuner, E.M., İşlek, C., Çeter, T., Alpas, H. (2012) . High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits. African Journal of Biotechnology 930-937
3. Bogs, J., Jaffé, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., Robinson, S.P. (2007) The grapevine transcription factor *vmybpa1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.* 143, 1347–1361.
4. Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M. i Karlović, S. (2010) Princip rada i primjena visokog tlaka u prehrambenoj industriji. *Kem. Ind.* 59, 539–545.
5. Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macri F. and Vianello A. (2008) Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal Behav.* 3: 626.
6. Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez I. (2007) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines *J. Agric. Food Chem.* 55, 992–1002.
7. Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1, 1–22.
8. Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D. i Tauscher, B. (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innov. food sci. & emerg. technol.* 9, 85-91.
9. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10, 178- 182
10. De Groot, H.; Rauen, U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 249–255.
11. Dixon, R.A (2005) Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 329–336.

12. FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistic Division, <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Pristupljeno 29. svibnja 2015.
13. Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M., Bauman, I. (2015) Classification and processing optimization of barley milk production using NIR spectroscopy, particle size, and total dissolved solids analysis. *J. Chem.* 1-7.
14. Georgiev, V., Ananga, A., Tsolova, V. (2014) – Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *Nutrients*, 6, 391-415.
15. Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chichester
16. He, F., Mu L., Yan G.-L., Liang, N.- N., Pan, Q.-H., Wang J., Reeves M.J., Duan, C.-Q. (2010) Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15, 9057–9091.
17. Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C. and Zhou, K. (2010) Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alphasglucosidase. *Nutrition & Metabolism* 7, 71
18. Iora, S.R. F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., da Silva, M.V., de A. Pontes, P.V., Haminiuk, C.W. I., Granato, D. (2014) Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food Sci.*, 50, 62-69.
19. Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821-1835
20. Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* 62, 71-80.
21. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. and Schieber, A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. & Food Chem.* 52, 4360–4367.
22. Khan, N., Adhami, V.M.; Mukhtar, H. (2010) Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, R39–R52.

23. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *BMJ*, 312, 478–481.
24. Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem. ind.* 60 (1), 11–19.
25. Kurtanjek, Ž., Gajdoš Kljusurić, J. (2014) Statistical modelling of anthropometric characteristics evaluated on nutritional status. U: *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (ur. Granato, D. i Ares, G.) John Wiley and Sons, Oxford, UK. str. 285 – 302.
26. Lapornik B., Prosek M. and Wondra A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Sci.* 71: 214.
27. Marchand L. (2002) Cancer preventive effects of flavonoids—A review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 296–301.
28. Le Noble WJ (1988). *Organic High Pressure Chemistry*. Elsevier, Amsterdam.
29. Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.M., Baudry A., Pourcel, L., Nesi N., Caboche M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 405–430.
30. Lin, J.K., Weng, M.S. (2006) Flavonoids as Nutraceuticals. In *The Science of Flavonoids*; Grotewold, E., Ed.; Springer: Berlin, Germany; 213–238.
31. Pinelo M., Arnous A. i Meyer A.S. (2006) Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.* 17: 579
32. Rajha N. H., El Darra N., Hobaika Z., Boussetta N., Vorobiev E, Maroun1 R. G., Louka N. (2014) Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process *Food & Nutr. Sci.*, 5, 397-409
33. Ribereau- Gayon, P. i Stonestreet, E. (2006) Determination of anthocyanins in red wine. *B. Soc. Chim. Fr.* 9, 2649- 2652
34. Richard JS (1992). *High Pressure Phase Behaviour of Multicomponent Fluid Mixtures*. Elsevier, Amsterdam.

35. Riedel, H., Saw, N.M.M.T., Akumo D.N., Kütük O., Smetanska I. (2012) Wine as Food and Medicine u: *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (Valdez, B., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str. 399–418.
36. Rodríguez Montealegre R., Romero Peces R., Chacón Vozmediano J.L., Martínez Gascueña J., García Romero E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 687–693
37. Schieber A., Keller P., Carle R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A*, 910, 265-273.
38. Spigno G. i De Faveri D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yields, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* 78, 793–801
39. Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81, 200- 208.
40. 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.
41. Teixeira A., Eiras-Dias J., Castellarin S.D., Gerós H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18711-18739.
42. Vislocky L.M.; Fernandez M.L.(2013) Grapes and grape products: Their role in health. *Nutr. Today*, 48, 47–51.
43. Waterhouse A.L. Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2002, 957, 21–36.
44. Xi J., Shen D., Li Y., Zhang R., (2011) Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control.* 22, 1473-1476
45. Zhang S., Xi J., Wang C. (2005). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biot.* 80: 50-54.
46. Zhang S., Xi J., Wang C. (2005). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biot.* 80: 50-54