

Izolacija biološki aktivnih tvari iz komine grožđa sorte Merlot

Tratnik, Marija

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:159:605641>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Marija Tratnik

6748/N

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE I
SJEMENKI KOMINE GROŽĐA SORTE MERLOT**

ZAVRŠNI RAD

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

IZOLACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI IZ KOMINE GROŽĐA SORTE MERLOT

Marija Tratnik, 6748/N

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj vremena ekstrakcije na izolaciju ukupnih fenolnih spojeva, monomernih antocijana, polimernih proantocijanidina te na antioksidacijski kapacitet u sjemenkama i pokožici grožđa sorte *Merlot* izdvojenih iz komine nakon proizvodnje vina. Ekstrakcija je provedena uz primjenu 80%-tne vodene otopine metanola za sjemenke i 80%-tne vodene otopine metanola sa 1%-tnom mravljom kiselinom za pokožicu, kroz vrijeme ekstrakcije 30, 50 i 70 minuta. Ukupni fenoli određivani su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, monomerni antocijani spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom, polimerni proantocijanidini vanilin metodom te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Porast vremena trajanja ekstrakcije utjecao je na povećanje prinosa ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina, a sukladno tome i na povećanje antioksidacijskog kapaciteta. Sadržaj ukupnih fenola, monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet bili su u gotovo svim uzorcima najveći nakon 70 minuta, a polimernih proantocijanidina nakon 50 minuta ekstrakcije.

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, sjemenke i pokožica grožđa, fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 38 stranica, 17 slika, 1 tablicu, 57 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Ivona Elez Garofulić, viši asistent*

Rad predan: lipanj 2016.

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

ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM WASTE OF GRAPE MERLOT

Marija Tratnik, 6748/N

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of extraction time to the isolation of total phenolic compounds, monomeric anthocyanins, polymeric proanthocyanidins and antioxidant capacity in the grape seeds and skin of grape variety *Merlot*, separated from the pomace after wine production. Extraction was made with the use of 80% aqueous methanol for the seeds and with 80% aqueous methanol containing 1% formic acid for the skin, through the extraction time of 30, 50 and 70 minutes. Total phenolic compounds were determined by spectrophotometric Folin-Ciocalteu method, monomeric anthocyanins by spectrophotometric pH differential method, polymeric proanthocyanidins by vanillin method and antioxidant capacity by FRAP method. Extraction duration time growth influenced yield increase of total phenols, anthocyanins, proanthocyanidins and accordingly, to increase of the antioxidant capacity. The amount of total phenolic compounds, monomeric anthocyanins and antioxidant capacity in almost all samples was the highest after 70 minutes and after 50 minutes for polymeric proanthocyanidins.

Keywords: ultrasonic-assisted extraction, grape seeds and skin, phenolic compounds, antioxidant capacity

Thesis contains: 38 pages, 17 figures, 1 table, 57 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, Kaciceva 23, Zagreb

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

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić, Scientific 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. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Vinova loza	2
2.1.1. Sorta Merlot.....	3
2.1.2. Proces vinifikacije	4
2.1.3. Nusprodukti proizvodnje vina	4
2.2. Fenolni spojevi	5
2.2.1. Flavonoidi.....	6
2.3. Antioksidacijska aktivnost	9
2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva	10
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijal	13
3.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice i sjemenki grožđa sorte Merlot	13
3.1.2. Kemikalije i standardi	14
3.1.3. Aparatura i pribor	17
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema ekstrakata sjemenki i pokožica ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji.....	18
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	19
3.2.3. Određivanje monomernih antocijana spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom.....	21
3.2.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	23
4. REZULTATI.....	26
4.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola	26
4.1.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola iz sjemenki grožđa.....	26
4.1.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola iz pokožice grožđa	27
4.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice grožđa	27
4.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki grožđa	28
4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost.....	28
4.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost sjemenki grožđa.....	29

4.4.2. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost pokožice grožđa.....	29
5. RASPRAVA.....	30
5.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola	30
5.2. Utjecaj vremena trajanja na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice grožđa ..	31
5.3. Utjecaj vremena trajanja na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki grožđa	31
5.4. Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet	32
6. ZAKLJUČAK	33
7. LITERATURA.....	34

1. UVOD

Grožđe je jedna od najvažnijih voćnih vrsta u svijetu, a najvećim dijelom prerađuje se u vino pri čemu nastaju značajne količine nusproizvoda. Industrija vina proizvodi dvije vrste otpada: otpadne vode i čvrsti organski otpad, koji imaju velik utjecaj na okoliš. Vrste organskog otpada su komina grožđa koja čini 62%, vinski talog koji čini 14%, stabljike koje čine 12% otpada te nevođeni talog (Georgiev i sur. 2014; Ali i sur., 2010.; Teixeira i sur., 2014).

Grožđe je bogato fenolnim spojevima, a čak 75% polifenola zaostaje u komini grožđa koja se sastoji od sjemenki i pokožice grožđa, zbog slabe ekstrakcije prilikom fermentacije. Fenolni spojevi prvenstveno flavonoidi značajno doprinose kvaliteti, biološkim svojstvima i senzorskim svojstvima vina, posebno boji i trpkosti. Dokazano je da imaju širok raspon biokemijskih i farmakoloških učinaka, uključujući antikancerogeno, protuupalno, antimikrobno i antioksidativno djelovanje (Mazza i Miniati, 1993).

U današnje vrijeme, postoji veliki interes u iskorištavanju nusproizvoda od vinske industrije. Komina grožđa predstavlja bogat izvor različitih visoko vrijednih produkata kao što su etanol, soli jabučne kiseline, limunska kiselina, ulje sjemenki grožđa, hidrokoloide i dijetalna vlakna. Osim toga, zbog visokog udjela fenolnih spojeva smatra se visoko vrijednim izvorom nutrijenata koji imaju pozitivno djelovanje na zdravlje (Arvanitoyannis i sur., 2006). Fenolni spojevi se međusobno razlikuju prema molekularnoj strukturi i polarnosti, te je važan odabir metode koja se koristi za ekstrakciju. Ekstrakcija fenolnih spojeva može se provoditi primjenom konvencionalnih metoda uz upotrebu organskih otapala (najčešće) ili novih tehnika (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom) koje se sve više istražuju (Casazza i sur., 2010).

Cilj ovog rada bio je ekstrahirati fenolne spojeve iz liofilizirane pokožice i sjemenki komine grožđa sorte *Merlot*, primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. U dobivenim ekstraktima liofilizirane pokožice i sjemenki komine grožđa krajnji cilj bio je odrediti udio ukupnih fenolnih spojeva spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom, udio monomernih antocijana spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom, udio polimernih proantocijanidina primjenom vanilin metode te antioksidacijsku aktivnost FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vinova loza

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) jedna je od najraširenijih i najstarijih voćarskih kultura u svijetu čija je približna godišnja proizvodnja 69 milijuna tona (FAO, 2014). Jedna je od ekonomski najvažnijih vrsta voća zbog brojnih koristi u proizvodnji vina, soka od grožđa i drugih prehrambenih namirnica (This i sur., 2007).

Vinova loza je višegodišnja biljka penjačica iz porodice *Vitaceae*. Porodica *Vitaceae* sastoji se od gotovo tisuću vrsta, svrstanih u sedamnaest rodova. Vinova loza svrstava se u rod *Vitis* koji sadrži više od 70 vrsta koje rastu na različitim zemljopisnim područjima. Najpoznatija vrsta je *Vitis vinifera* koja je udomaćena u Maloj Aziji prije 5000 godina, odakle se proširila i u druge zemlje (Bowers i sur., 1999; Teixeira i sur., 2013).

Vinova loza se lako uzgaja i diljem svijeta rađa do osam milijuna hektara vinograda (Vivier i Pretorius, 2000.). Rasprostranjena je na svim kontinentima, ali se uspješno uzgaja samo u umjerenim klimatskim područjima sa dovoljno kiše, toplim i suhim ljetima te relativno blagim zimama (Bowers i sur., 1999; Teixeira i sur., 2013). Vinova loza cvate od lipnja do srpnja, a cvatnja traje samo 4 do 5 dana. Plod vinove loze (grožđe) je u obliku grozda, a vrijeme dozrijevanja ploda ovisi o sorti i podneblju (Jackson, 2008). Sastav sjemenki grožđa čini 40% vlakana, 16% eteričnog ulja, 11% proteina, 7% složenih fenolnih spojeva kao što su tanini i druge tvari poput šećera i minerala (Rockenbach i sur., 2011).



Slika 1. Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) (Anonymus 1, 2016)

2.1.1. Sorta Merlot

Grožđe sorte *Merlot* porijeklom je iz Francuske provincije Gironde, šireg područja Bordeauxa. Na tom području *Merlot* se najviše uzgaja i neizostavan je sastojak poznatih bordoških vina. *Merlot* je sorta širokog areala tako da se uzgaja u gotovo svim vinogradarskim zemljama umjerene klime. Sedma je po redu najčešće uzgajana vinova loza u svijetu (155000 ha) (Qian i sur., 2009), a mjestimice se uzgaja i u sjevernim područjima Hrvatske, prvenstveno na području sjevernog Jadrana (Zoričić, 1997; Mirošević i sur., 2009).

Sadržaj šećera u moštu *Merlota* kreće se od 18 do 22%. Vino sadrži od 11 do 13 vol.% alkohola s 5,5 do 7,5 g/L ukupnih kiselina, ukupnog ekstrakta: 23-28 g/L, glicerola: 6,7-10 g/L, pepela: 1,8-2,9 g/L. Sortu *Merlot* krasi rodnošć, otpornost od zimskog smrzavanja i prema svim gljivičnim oboljenjima. Vino je rubin crvene boje i arome šumske maline. Dužim čuvanjem (ležanjem u bačvi) poprima tamni ton, a okus mu se zaokruži i smekša. Miris mu tada postaje čisti vinski, u kojem se izdvaja aroma svojstvena sorti. *Merlot* doseže zrelost u drugoj/trećoj godini nakon čega se puni u boce (Zoričić, 1997; Sokolić, 1998).



Slika 2. Izgled grozda sorte grožđa *Merlot* i boja vina (Anonymus 2, 2013)

2.1.2. Proces vinifikacije

Vinifikacija ili prerada grožđa obuhvaća skup radnji od berbe grožđa do proizvodnje vina. Prva u nizu operacija u preradi grožđa je muljanje. To je postupak odvajanja bobica od peteljkovine, a njihovo razdvajanje nazivamo ruljanje. Kod proizvodnje crnih vina, obojene tvari potrebno je ekstrahirati iz grožđa u mošt, odnosno vino. Da bi došlo do ekstrakcije obojenih tvari provodi se vrenje masulja. Masulj je zgnječeno grožđe koje sadrži krutu fazu (pokožica, sjemenke i meso) i tekuću fazu (groždani sok). Prethodno se moraju odstraniti peteljke zato jer bi fermentacijom masulja sa peteljkama došlo do velike ekstrakcije tanina koji bi vinu dali trpak okus. Nakon toga slijedi fermentacija/vrenje. To je jedan od najbitnijih procesa u vinarstvu, a provode ju kvasci koji razlažu šećer na glavne produkte fermentacije: etanol i ugljikov dioksid. Istovremeno se sa alkoholnom fermentacijom odvija i maceracija čime se pospješuje razgradnja stanične stijenke pokožice te dolazi do bolje ekstrakcije tvari boje. Zatim slijedi prešanje, tiho vrenje/doviranje te njega i dorada vina (Zoričić, 1996).

2.1.3. Nusprodukti proizvodnje vina

Nusprodukti koji nastaju tijekom proizvodnje vina, zbog sastava pobuđuju veliki interes istraživača zbog potencijalnih mogućnosti iskorištavanja, komercijalizacije te ujedno smanjivanja štetnih utjecaja na okoliš. Godišnje se od prehrambene industrije, a time i od proizvodnje vina stvaraju velike količine otpada i nusproizvoda koji predstavljaju značajan problem za okoliš (mogu utjecati na tlo, kvalitetu podzemnih voda, floru i faunu) ukoliko se na adekvatan način ne zbrinjavaju (Rajha i sur., 2013).

Komina grožđa je kruti dio (mješavina sjemenki i pokožice grožđa) koji zaostaje kao nusproizvod nakon tiještenja masulja. Kao nusprodukt ona čini 20% od ukupne količine ubranoga grožđa. U današnje vrijeme, u svijetu nastane oko 9 milijuna tona komine grožđa prilikom proizvodnje vina (Teixeira i sur., 2014; Schieber i sur., 2001; Cheng i sur., 2012).

Komina je vrlo bogata fenolnim spojevima korisnima za zdravlje (Rajha i sur., 2014) čija kvantitativna i kvalitativna raspodjela ovisi o nekoliko čimbenika kao što su razlike u sorti grožđa, položaju kultura i postupcima proizvodnje vina. Na temelju sadržaja polifenola, nekoliko studija pokazalo je visoku antioksidacijsku aktivnost ovog nusproizvoda, što ga čini zanimljivim izvorom za dobivanje prirodnih antioksidansa koji se u usporedbi sa sintetskim antioksidansima smatraju potpuno sigurnima (Arvanitoyannis i sur., 2006; Teixeira i sur., 2014). Antocijani, katehini, flavonol glikozidi, fenolne

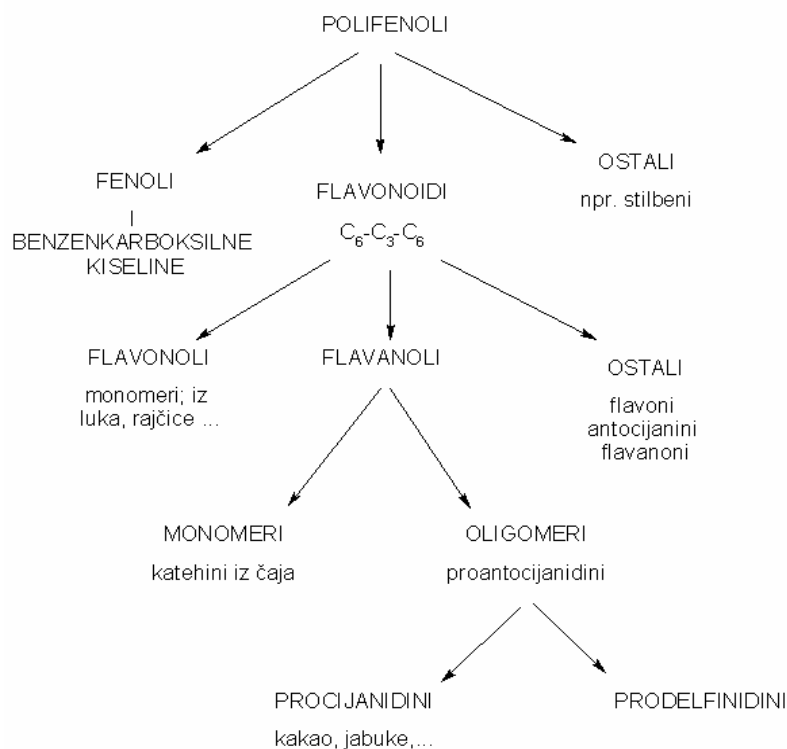
kiseline, alkoholi te stilbeni glavni su fenolni sastojci komine. Antocijani koji se nalaze u pokožici, odavno se koriste kao prirodna prehrambena bojila (Kammerer i sur., 2004).

Velike količine komine grožđa redovito se odbacuju nakon fermentacije. Međutim, neke vinarije kominu upotrebljavaju kao gnojivo, za obogaćivanje tla ili pak istražuju druge mogućnosti kao što je izolacija bioaktivnih spojeva ili prodaja kompanijama za proizvodnju bioplina kao obnovljivog izvora energije. Ponovno korištenje tih materijala predstavlja učinkovitu, jeftinu i ekološki prihvatljivu alternativu za njihovo pretvaranje u dodatne prehrambene sastojke hrane u proizvodnji fitokemikalija, kozmetičkih ili farmaceutskih proizvoda. Na taj način povećava se ekonomska dobit konvencionalnih tehnika obrade i potiče se održiva poljoprivredna proizvodnja (Sá i sur., 2013; Arvanitoyannis i sur., 2006; Kammerer i sur., 2004).

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su velika i kompleksna skupina sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose organoleptičkim svojstvima grožđa i crnih vina (Ali i sur., 2010) kao što su boja, aroma, tekstura, trpkost te antioksidacijska svojstva (Teixeira i sur., 2013). Koncentracija fenolnih spojeva u grožđu ovisi o sorti vinove loze te o vinogradarskim i okolišnim čimbenicima. U vinu se povećava tijekom fermentacije, a nakon toga počinje opadati (Ali i sur., 2010).

Fenolni spojevi imaju aromatski prsten koji sadrži jednu ili više hidroksilnih grupa, a njihova struktura može biti u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do složenih polimera velikih molekulskih masa. Podijeljeni su u dvije grupe: flavonoidi (antocijanini, flavan-3-oli, flavonoli) i neflavonoidi (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina, stilbeni). Svaka skupina polifenola direktno je odgovorna za specifične karakteristike različitih sorti grožđa i iz njih proizvedenih vina. Tri glavne vrste fenolnih spojeva koje se javljaju u grožđu i vinu su jednostavni fenoli, flavonoidi i stilbeni (Ali i sur., 2010).

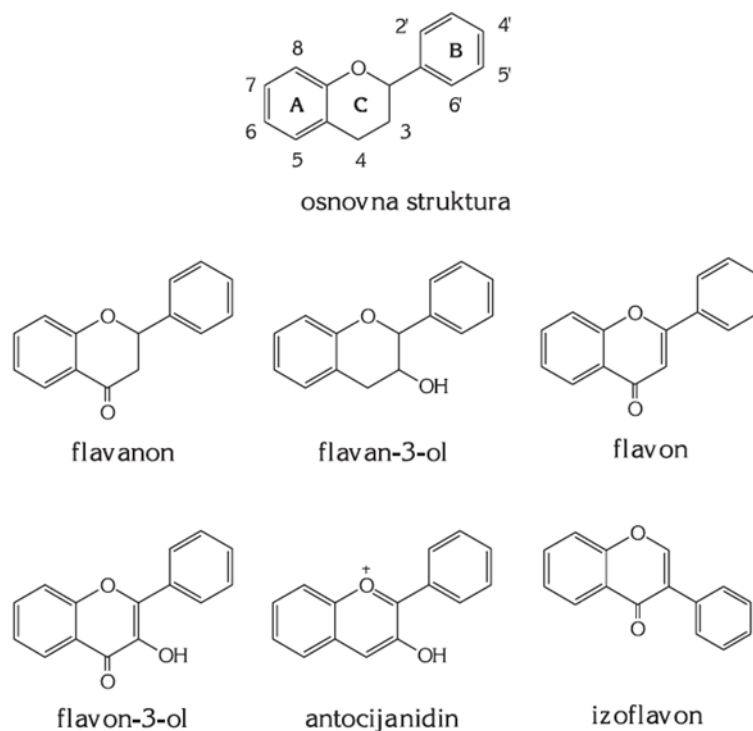


Slika 3. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008)

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina fenolnih spojeva prisutnih u epidermalnom sloju pokožice i u sjemenkama grožđa. Do danas je identificirano više od 6400 struktura flavonoida prisutnih u biljkama (Kazazić, 2004; Ali i sur., 2010; Georgiev i sur., 2014). Flavonoidi su najčešće fitokemikalije koje u samim biljkama štite od parazita, biljojeda, patogena i oksidativnih oštećenja stanica. Djeluju kao fotoreceptori, agensi za privlačenje pozornosti oprašivača te kao zaštita od ultraljubičastog zračenja (Kazazić, 2004; Ignat i sur., 2011).

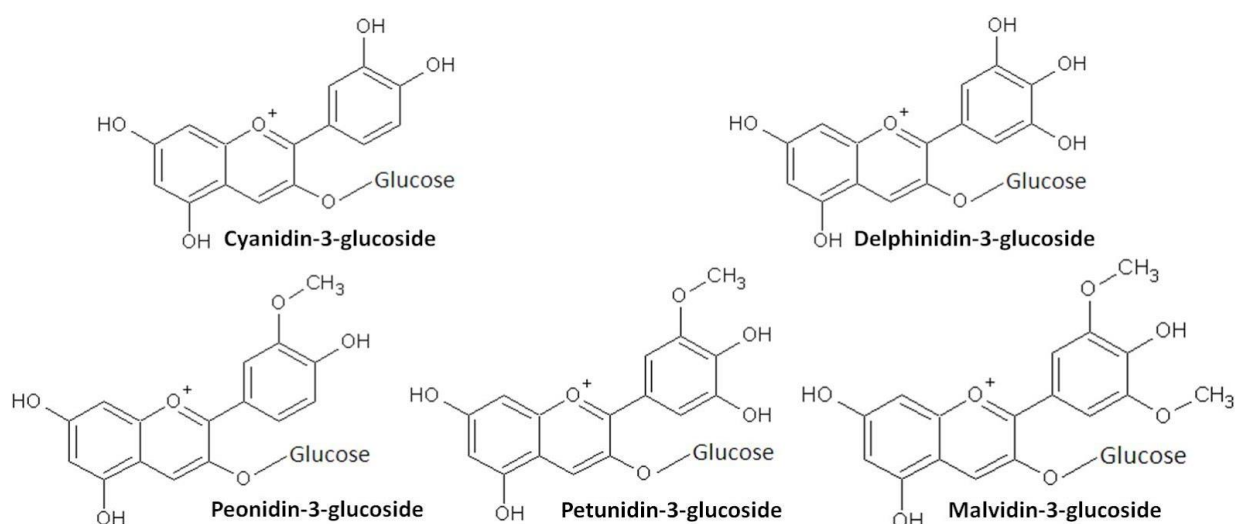
Flavonoidi su spojevi male molekulske mase koji se sastoje od 15 atoma ugljika čiju osnovnu strukturu čini difenilpropan (C₆-C₃-C₆) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol u kojem su dva hidroksilirana benzenova prstena A i B, povezana sa trećim ugljikovodikovim lancem koji je dio heterocikličkog C prstena. Podijeljeni su ovisno o stupnju oksidacije piranskoga C prstena u 4 razreda: flavonoli, flavoni, flavanoli i antocijani (Kazazić, 2004; Teixeira i sur., 2013).



Slika 4. Osnovna kemijska struktura i podjela flavonoida (Kazazić, 2004)

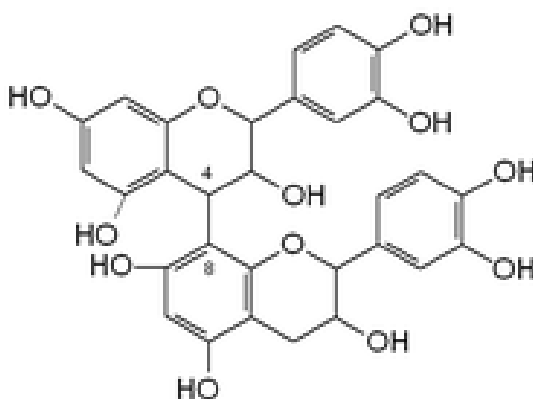
Postoji velik interes za istraživanje flavonoida zbog mogućnosti poboljšanja zdravlja putem prehrane gdje se kao preventivna zdravstvena zaštita promovira konzumiranje grožđa i ostalih proizvoda (Ignat i sur., 2011). Osim toga, u Mediteranskim zemljama postoji tradicija redovitog konzumiranja crnoga vina koje zbog prisutnih flavonoida smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i raka (Georgiev i sur., 2014).

Antocijani predstavljaju najvažnije prirodne pigmente topljive u vodi i staničnom soku. Odgovorni su za crvenu, ljubičastu i plavu boju ovisno o pH, a javljaju se u svim biljnim tkivima, uključujući lišće, stabljike, korijenje, cvijeće i voće (Ignat i sur., 2011). Prema kemijskoj strukturi antocijani su derivati 2-fenilbenzopirilijevih (flavilijevih soli) koje se nalaze u biljkama u obliku glikozida, dok se njihovi aglikoni nazivaju antocijanidini. Antocijani su najčešći flavonoidi u grožđu prirodno prisutni u obliku 3-O-glikozida malvidina, delfinidina, peonidina, petunidina i cijanidina. Malvidin-3-O-glikozid je najzastupljeniji antocijan grožđa (Slika 5). Isključivo se nalaze u staničnoj stijenci i vakuolama pokožice grožđa te su direktno odgovorni za boju grožđa i mladih crvenih vina (Novak i sur., 2008). Glavni nedostatak antocijana je njihova visoka nestabilnost i podložnost degradaciji djelovanjem pH, temperature, svjetla, kisika, otapala, u prisutnosti enzima, proteina i metalnih iona (Tiwari i sur., 2010).



Slika 5. Najvažniji antocijani prisutni u pokožici grožđa (Anonymus 3, 2013)

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su oligomeri ili polimeri flavan-3-ola (Kazazić, 2004; Prior i sur., 2005). Jedna su od najraširenijih skupina topivih polifenola u grožđu, a najviše ih ima u sjemenkama (oko 80%). Mogu se klasificirati na više načina s obzirom na flavonoidne monomere, veličinu (od dimera do polimera sa više od 40 jedinica), vezanje, esterifikaciju drugih komponenata ili funkcionalna svojstva. Tanini karakteristični za grožđe i vino su proantocijanidini B tipa u kojima dolazi do povezivanja C-4 položaja piranskog prstena gornjeg flavonoida s C-8 položajem na A prstenu donjeg flavonoida (Slika 6) (Jackson, 2008). Proantocijanidini su privukli interes znanstvenika zbog toga što su djelomično odgovorni za organoleptička svojstva vina kao što su trpkost i gorčina, ali i zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Sá, i sur., 2013; Prior i sur., 2005).



Slika 6. B tip proantocijanidina koji je najzastupljeniji u grožđu

2.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su tvari koje uklanjaju slobodne radikale i sprječavaju oštećenja biomolekula uzrokovana njihovim djelovanjem. Oni mogu smanjiti oštećenja neutralizacijom reaktivnosti slobodnih radikala prije nego što napadnu stanice te na taj način spriječiti oštećenja lipida, proteina, enzima, ugljikohidrata i DNA (Fang i sur., 2002). Antioksidansi se mogu svrstati u dvije glavne skupine: enzimski i ne-enzimski antioksidansi. Enzimski antioksidansi proizvedeni su endogeno i uključuju superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze. Ne-enzimski antioksidansi uključuju tokoferole, karotenoide, askorbinsku kiselinu, flavonoide i tanine koji su dobiveni iz prirodnih biljnih izvora. Širok raspon antioksidansa prirodnog i sintetskog porijekla preporuča se za upotrebu u liječenju različitih bolesti (Gengaihi i sur., 2014).

Flavonoidi imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost zato im se pripisuju mnoga terapijska djelovanja kao što su antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno djelovanje, a znatno utječu i na boju i okus hrane. Zaštitna uloga flavonoida kao antioksidansa pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja („hvatanja“) elektrona slobodnih radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala (željeza i bakra), aktiviranja antioksidacijskih enzima te inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

Antocijani, kao i drugi fenolni spojevi, mogu djelovati kao antioksidansi donacijom vodika visoko reaktivnim radikalima, čime se sprječava daljnje stvaranje radikala. Njihov antioksidativni potencijal ovisi o broju i rasporedu hidroksilnih skupina i opsegu strukturne konjugacije, kao i o prisustvu elektron-donorskih supstituenata i onih koji privlače elektron u strukturi prstena (Lapornik i sur., 2005).

Proantocijanidini djeluju kao „skupljači“ superoksidnih i hidroksilnih radikala, sprječavaju oštećenja DNA i peroksidaciju lipida. *In vivo* studije vezane uz antioksidativno djelovanje, pokazale su da oligomeri proantocijanidina iz sjemenki grožđa pokazuju veći učinak zaštite (veća antioksidacijska aktivnost) od vitamina C, vitamina E i beta karotena protiv peroksidacije lipida i fragmentacije DNA (Ali i sur., 2010). Međutim, sva ova svojstva, u velikoj mjeri ovise o njihovoj strukturi, koncentraciji, a posebno o stupnju polimerizacije.

Velik broj metoda može se koristiti za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Svaka metoda može se primijeniti kako bi se utvrdio antioksidacijski kapacitet bioloških tvari, za procjenu pojedinih spojeva, određenih komponenti namirnica ili ekstrakta iz hrane (Gonzalez-Paramas i sur., 2004). Do sada su razvijene metode kao što su FRAP metoda (redukcija-2,4,6-tripiridil-s-triazina), određivanje

sposobnosti hvatanja aktivnih vrsta kisika, određivanje sposobnosti hvatanja neprirodnih radikala (DPPH metoda) i sulfonatnih radikalkationa (ABTS metoda) te enzimsko i neenzimsko mjerenje inhibicije lipidne peroksidacije (Kazazić, 2004).

2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva prvi je korak u primjeni fitokemikalija u pripremi dodataka prehrani ili nutraceutika, sastojaka hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Ona predstavlja važan korak u izolaciji i identifikaciji fenolnih spojeva koji se mogu ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili suhih uzoraka biološkog materijala. Obično se prije same ekstrakcije provodi mljevenje, usitnjavanje i homogenizacija biljnoga materijala čemu mogu prethoditi operacije sušenja koje se provode na zraku ili pri niskim temperaturama (liofilizacija) (Dai i Mimper, 2010; Ignat i sur., 2011).

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. U preradi hrane definira se kao prijenos jedne ili više bioloških tvari iz materijala u kojem se nalaze, u tekuću fazu nakon čega slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze. Tijekom procesa ekstrakcije jedna ili više komponenti prelazi iz biološkog materijala u otopinu. Fizikalni proces koji to omogućava je koncentracijski gradijent, gdje 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). Metode ekstrakcije razlikuju se s obzirom na velik broj različitih skupina fenolnih spojeva koji imaju različitu strukturu i svojstva tako da ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih fenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju (Valls i sur., 2009). Konvencionalna ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim fluidima najčešće su metode koje se koriste za izolaciju fenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011).

Učinkovitost ekstrakcije je funkcija procesnih uvjeta. Mnogi čimbenici kao što su sastav i vrsta otapala, omjer uzorak/otapalo, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, tlak prilikom ekstrakcije i veličina čestica mogu značajno utjecati na učinkovitost ekstrakcije (Pinelo i sur., 2005). Vrijeme i temperatura ekstrakcije odražavaju se na procese otapanja i degradacije analita oksidacijom. Porast temperature ekstrakcije može povećati topljivost analita, a istovremeno smanjiti viskoznost i površinsku napetost što pomaže otapalu da lakše dođe do matrice uzorka. Na taj način povećava se brzina ekstrakcije. Međutim, većina fenolnih spojeva podložna je hidrolizi i oksidaciji. Dugo vrijeme ekstrakcije i visoka

temperatura povećavaju šanse za oksidacijom fenolnih spojeva što smanjuje prinos fenola u ekstraktima (Dai i Mimper, 2010).

Vrsta otapala je najviše istraživani čimbenik jer upravo odabir pravog otapala utječe na količinu i brzinu ekstrahiranih polifenola odnosno utječe na iskorištenje ekstrakcije. Najčešće korištena otapala su metanol, etanol, aceton i etil acetat te njihove kombinacije koje se u različitim omjerima miješaju s vodom. Efikasnost otapala ne ovisi samo o fizičkim svojstvima otpada koji zaostaje nakon proizvodnje vina, nego i o ciljanom polifenolu koji se izolira. Etil-acetat jedno je od najboljih otapala za ekstrakciju polifenola iz sjemenki grožđa (sposobnost selektivne ekstrakcije proantocijanidina) koji uz dodatak vode do određene razine (10%) povećava prinos ekstrahiranih proantocijanidina zbog povećane propusnosti sjemenki grožđa. Alkoholna otapala uobičajeno se koriste za izdvajanje fenola iz prirodnih izvora. Ona daju vrlo visok prinos ukupnog ekstrakta, iako nisu visoko selektivna za fenolne spojeve. Za mješavine alkohola i vode dokazano je da su efikasnije u ekstrakciji fenolnih sastojaka od odgovarajućeg jednokomponentnog sustava otapala (Spigno i sur., 2007; Dai i Mimper, 2010). Rezultati ekstrakcije bioaktivnih polifenola prisutnih u sjemenkama grožđa pokazali su da je etanol najbolje otapalo za ekstrakciju flavonola, a metanol za ekstrakciju flavan-3-ola (katehin i epikatehin). Kod ekstrakcije antocijana iz grožđa uz metanol kao otapalo, efikasnost je 20% veća nego uz etanol kao otapalo i 73% veća od ekstrakcije sa vodom. Međutim, toksičnost metanola kao otapala ograničava njegovu upotrebu u analitičkim postupcima. S druge strane, sigurnost etanola kao ekološki prihvatljivog otapala prepoznata je od EFSA-e i FAO/WHO stručnog povjerenstva za prehrambene aditive (Teixeira i sur., 2014; Ignat i sur., 2011).

Konvencionalne metode ekstrakcije kao što su maceracija i Soxhlet ekstrakcija imaju mnoge nedostatke kao što su gubitak polifenola zbog ionizacije, hidrolize i oksidacije tijekom ekstrakcije (loše iskorištenje), dugo vrijeme postupka ekstrakcije i potencijalno onečišćenje okoliša uslijed korištenja velikih količina organskih otapala (Teixeira i sur., 2014; Dai i Mimper, 2010). Zbog toga su u posljednjih nekoliko godina razvijene različite nove tehnike za ekstrakciju funkcionalnih sastojaka iz biljaka kao što su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* ultrasonic-assisted extraction, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*eng.* microwave-assistend extraction, MAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima(*eng.* supercritical fluids extraction, SFE) i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HHP) (Ignat i sur., 2011).

2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jeftina (niski energetske zahtjevi i niska cijena opreme), jednostavna i visoko učinkovita metoda koja se koristi kao alternativa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Prednosti ove tehnike su: smanjenje vremena ekstrakcije, smanjenje potrošnje otapala, povećanje ekstrakcijskog prinosa i povećanje kvalitete ekstrakta. Temelji se na korištenju energije dobivene ultrazvukom (zvučni valovi frekvencije iznad 20 kHz) kako bi se olakšala ekstrakcija analita iz čvrste tvari pomoću otapala, koje se bira ovisno o prirodi otopljene tvari koja se ekstrahira. Koristi se za ekstrakciju tvari malih molekulskih masa i za izolaciju brojnih organskih spojeva iz različitih biljnih materijala, uključujući i fenolne spojeve koji se koriste u kozmetičkim kremama, organske kiseline i polifenole u grožđu, fenolne spojeve jagode, sojine izoflavone i kapsaicinoide paprike (Carrera i sur., 2012). Napredak u primjeni ultrazvuka doveo je do razvoja novih i naprednijih uređaja, ali se za ekstrakciju najčešće primjenjuje ultrazvučna vodena kupelj.

Poboljšanje ekstrakcije ciljanih spojeva iz biljnoga tkiva pomoću ultrazvuka uglavnom se pripisuje učinku akustičkih kavitacija proizvedenih u otapalu prolaskom ultrazvučnog vala. Mehanički učinak ultrazvuka ubrzava oslobađanje organskih spojeva sadržanih u biljkama, intenzivira prijenos mase (masni transport) i omogućava brže prodiranje otapala u stanicu čime se povećava kontaktna površina između krute i tekuće faze, a kao rezultat toga, otopljene tvari brzo se šire iz čvrste faze u otapalo. Asimetrični raspad mikroskopskih mjehurića koji oslobađaju velike količine energije u blizini površine staničnog materijala olakšava otpuštanje ekstraktibilnih spojeva u otapalo čime se povećava učinkovitost ekstrakcije. Osim toga, upotreba UAE može spriječiti moguću kemijsku razgradnju ciljanih spojeva zbog smanjenog kemijskog uključivanja i redukcije vremena za ekstrakciju (Chen i sur., 2007; Ghafoor i Choi, 2009).

Ultrazvučni efekti u staničnom tkivu puno su intenzivniji na niskim frekvencijama 20-40 kHz, a zanemarivi na 400-800 kHz jer visoke frekvencije mogu izazvati mikropukotine u tkivu. Prema nekim autorima, ekstrakcija polifenola povećava se sa porastom vremena izlaganja ultrazvuku, a prinos ekstrakcije najviši je kada je vrijeme ekspozicije ultrazvuku u rasponu od 45-90 min. S druge strane, produljena primjena ultrazvuka može dovesti do denaturacije polifenolnih enzima, tako da vrijeme sonikacije treba pažljivo razmotriti (Novak i sur., 2008).

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o varijablama koje utječu na temperaturu kavitacijskog procesa, viskoznost, prisutnost krutih čestica, visinu vodenog stupca, učestalost te o posuđu koje se koristi za ekstrakciju. Međutim, sve dok su eksperimentalni uvjeti konstantni, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija odličan je način za provođenje ekstrakcije kruto-tekuće (Nascentes i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice i sjemenki grožđa sorte Merlot

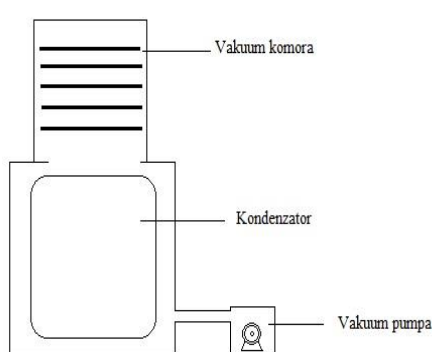
U ovom istraživanju korišten je nusproizvod od proizvodnje vina dobiven od grožđa sorte *Merlot* koji je izdvojen nakon prešanja, u suradnji sa poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska). Uzorak komine sadržavao je pokožicu, sjemenke i zaostale dijelove peteljke. Dijelovi peteljke su uklonjeni, a uzorak je podvrgnut liofilizaciji. Prije početka same analize liofilizirana pokožica i sjemenke mehanički su odvojene te su se svaka posebno koristile za provođenje ekstrakcije fenolnih spojeva. Odvojeni dijelovi posebno su pakirani u manja pakovanja u polipropilenske vrećice, hermetički su zatvoreni i skladišteni na temperaturi -20°C do provođenja analize.



Slika 7. a) Liofilizirana komina (pokožica, sjemenke, peteljka); b) sjemenke grožđa; c) pokožica

Postupak liofilizacije komine

Postupak liofilizacije proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska) (Slika 8), a uzorak je prethodno zamrznut na -60°C . U jednom sloju na šest plitica raspoređena je masa od cca 500 g smrznute komine 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 $0^{\circ}\text{C}/24$ sata, a izotermna desorpcija pri $20^{\circ}\text{C}/12$ sati. Po završetku procesa liofilizacije prosječni udio suhe tvari u liofiliziranoj komini iznosio je 96,85%.



Slika 8. Shematski prikaz laboratorijskog liofilizatora

3.1.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupak ekstrakcije

- Metanol, 100%-tni (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, 80%-tni (otapalo za sjemenke)
 Priprema: Za pripremu 800 mL 80%-tnog metanola, u menzuru od 1000 mL doda se 640 mL 100%-tnog metanola i 160 mL deionizirane vode.
- Mravlja kiselina, 100%-tna
- Otopina mravlje kiseline, 1%-tna (u 80%-tnom metanolu) (otapalo za pokožicu)
 Priprema: Za pripremu 400 mL otapala, u menzuru od 500 ml doda se 4 mL 100%-tne mravlje kiseline i 396 mL 80%-tnog metanola.
- Deionizirana voda

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)
 Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće deionizirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Etanol, 96%-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

- Galna kiselina, $C_7H_6O_5$
- Standard galne kiseline

Priprema: Odvaje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u tom volumenu. Zatim se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Deionizirana voda

Kemikalije i standardi za određivanje monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom

- Klorovodična kiselina, 37%-tna (Carlo Erba Reagents, Italija)
- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaje se 1,86 mg kalijeva klorida (KCl) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom. Doda se 980 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podesi na vrijednost 1,0 ($\pm 0,05$) s klorovodičnom kiselinom (37% HCl), čiji utrošak približno iznosi 6,3 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvaje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ($CH_3CO_2Na \times 3 H_2O$) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom. Doda se 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podesi na vrijednost 4,5 ($\pm 0,05$) s klorovodičnom kiselinom (37% HCl), čiji utrošak približno iznosi 20 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Deionizirana voda

Kemikalije i standardi za određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

- Metanol, 100%-tni (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanolna otopina vanilina, 1%-tna

Priprema: 1 g vanilina se u odmjernoj tikvici od 100 mL nadopuni 100%-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana H₂SO₄, 96%-tna
- Otopina H₂SO₄, 25%-tna

Priprema: 13,02 mL 96%-tne H₂SO₄ 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 koncentrirana H₂SO₄ dodaje se u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100%-tnim metanolom.

- Standard katehina (5g/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 tom volumenu. Zatim se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Deionizirana voda

Kemikalije i standardi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

- Klorovodična kiselina, 37%-tna (Carlo Erba Reagents, Italija)
- Klorovodična kiselina, 40mM

Priprema: Otpipetira se 330 µL 37%-tne klorovodične kiseline i nadopuni deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake sa 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat (FeCl₃ x 6H₂O), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake sa deioniziranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću deionizirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida heksahidrata u omjeru 10:1:1.

- Standard askorbinske kiseline (100 mg/L) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L.

Odvaže se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese sa deioniziranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Zatim se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Liofilizator (CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Centrifuga (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (Transoic 460, Elma, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β, Velika Britanija)
- pH metar (Mettler Toledo Seven easy, Švicarska)

Pribor:

- Erlenmeyerova tikvica (50 mL)
- Plastične bočice (50 mL)
- Plastične lađice za vaganje
- Menzure (50 mL, 100 mL, 500 mL i 1000 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL)

- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Falcon kivete
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Staklene kivete

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ekstrakata sjemenki i pokožice ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji

Ekstrakcija je provedena uz upotrebu vodene otopine 80%-tnog metanola za sjemenke i vodene otopine 1%-tne mravlje kiseline u 80%-tnom metanolu za pokožicu kroz vrijeme ekstrakcije 30, 50 i 70 minuta (tablica 1).

Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji

UZORAK	OTAPALO	TEMPERATURA EKSTRAKCIJE (°C)	VRIJEME TRAJANJA EKSTRAKCIJE (min)
SJEMENKE	80%-tni metanol	50	30
		50	50
		50	70
POKOŽICA	1%-tna mravlja kiseline u 80%-tnom metanolu	50	30
		50	50
		50	70

Postupak određivanja:

U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL izvaže se 1 g uzorka liofiliziranih sjemenki i pokožice grožđa sorte *Merlot* na analitičkoj vagi (± 0.0001 g) te se menzurom doda 40 mL otapala (80%-tni metanol za sjemenke i otopina 1%-tne mravlje kiseline u 80%-tnom metanolu za pokožicu). Tikvica se zatvori šlifom te se provodi ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji na $T = 50$ °C tijekom 30, 50 i 70 minuta. Nakon završene ekstrakcije uzorci se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL pomoću lijevka i filter papira te se nadopunjavaju do oznake odgovarajućim otapalom za ekstrakciju. Uzorci

se zatim prenose u plastične Falcon kivete volumena 50 mL i centrifugiraju na 5500 rpm 10 minuta nakon čega se dekantiraju u nove falkonice volumena 50 mL i skladište na +4 °C do daljnje analize.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode:

Princip metode temelji se na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, nastaje plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Određivanje se provodi u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Pinelo i sur., 2005; Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 20 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta stavlja otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje:

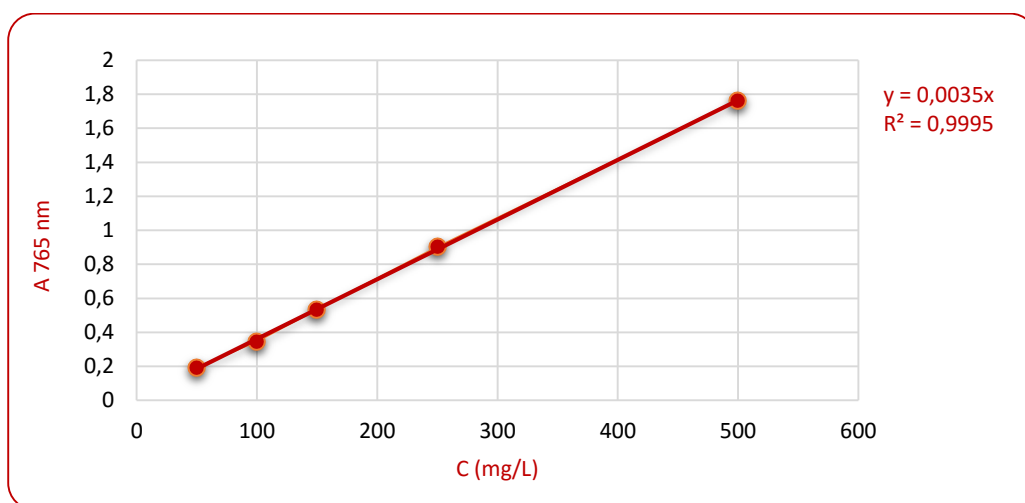
Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Od ove otopine galne kiseline u odmjernim tikvicama od 100 mL rade se razrijeđenja tako da se u svaku tikvicu redom otpipetira 1, 2, 3 i 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline. Zatim se tikvice do oznake nadopune deioniziranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene

epruvete. Zatim se redom dodaje 200 μL F.C. reagensa i 2 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Na isti način pripremi se slijepa proba osim što se umjesto otopine standarda uzima 100 μL deionizirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih fenola.



Slika 9. Baždarni pravac za ekvivalent galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje monomernih antocijana spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom

Princip metode:

Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju strukturu pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, kao posljedica pomicanja ravnoteže između različitih tautomernih oblika antocijana u ovisnosti o pH sredine. Metoda se temelji na mjerenju apsorpcije svjetla otopine antocijana u kojoj je koncentracija vodikovih iona podešena na pH 1,0 i pH 4,5. Monomerni antocijani se pri pH 1,0 nalaze u obliku flavilijum kationa (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u polukelatnom obliku (bezbojni) (Guisti i Wrolstad, 2003). Koncentracija monomernih antocijana proporcionalna je razlici apsorbancija u otopinama kod dva različita pH pri valnim dužinama od 520 nm i 700 nm. Mjerenje apsorbancija pri 700 nm provodi se radi korekcije eventualnih zamućenja (AOAC 2005.02).

Postupak određivanja:

Reakcija se postavlja u staklenim epruvetama na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme dvije epruvete. U svaku epruvetu otpipetira se 1 mL pripremljenog ekstrakta pokožice (ili uzorka), a zatim se u jednu epruvetu stavi 4 mL pufera pH 1,0, a u drugu 4 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu.

Izračunavanje:

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za cijanin-3-glukozid 449,2 g/mol)

DF = faktor razrjeđenja

10^3 = faktor za preračunavanje g u mg

ϵ = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid 26900 L/mol cm)

l = debljina kivete (1 cm)

3.2.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Princip metode:

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

Postupak određivanja:

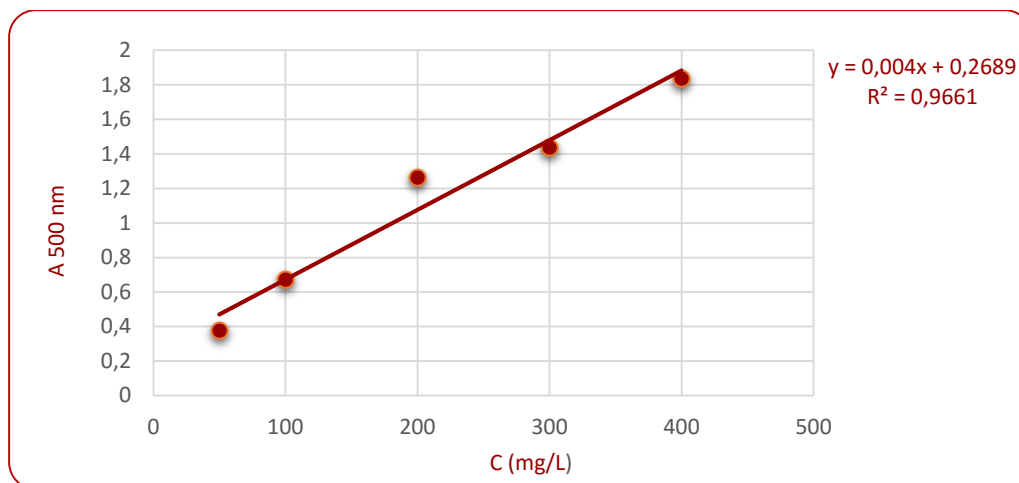
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1%-tnog vanilina, 2,5 mL 25%-tne otopine H_2SO_4 , 40 μ L ekstrakta (samo sjemenke) i 960 μ L otapala (metanol, 80%-tni). Sve zajedno se promiješa, a zatim se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbanacija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način priprema se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina koncentracije 5 g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine pripremaju se sljedeća razrijeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se redom otpipetira: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL. Zatim se tikvice do oznake nadopune 100%-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Zatim se dodaje 2,5 mL 1%-tnog vanilina i 2,5 mL 25%-tne otopine H_2SO_4 . Uzorci se ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbanacija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta doda metanol.



Slika 10. Baždarni pravac za ekvivalent katehina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

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

$$R^2 = 0,9661$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm

X – koncentracija katehina (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip metode:

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6–tripiridil–s-triazina (TPTZ-a) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks ferotripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle et al., 2014). Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona. Istovremeno se povećava i redoks potencijal koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie, 1996; Benzie and Strain, 1996).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 20 µL ekstrakta i 980 µL deionizirane vode (za sjemenke) ili 15 µL ekstrakta i 285 µL deionizirane vode (za pokožicu) te 2250 µL FRAP reagensa. Sve zajedno dobro se promiješa te se 10 minuta termostatira na temperaturi od 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava deioniziranu vodu.

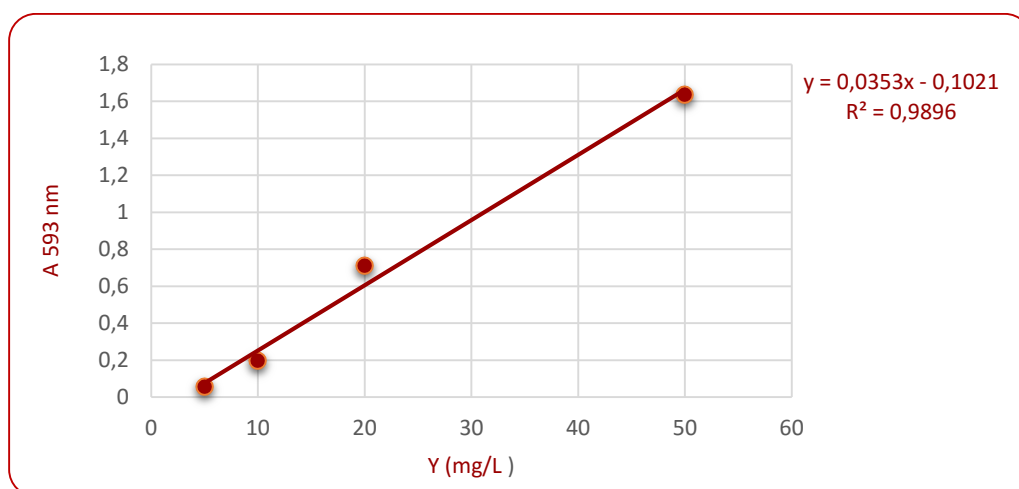
Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina askorbinske kiseline u koncentraciji od 100 mg/L od koje se pripreme razrijeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0,5, 1, 2 i 5 mL alikvota otopine askorbinske kiseline. Zatim se tikvice do oznake nadopune deioniziranom vodom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 µL otopine standarda i 2250 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37°C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje deionizirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.



Slika 11. Baždarni pravac za ekvivalent askorbinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0353 \times X - 0,1021$$

$$R^2 = 0,9896$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

S obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) potrebno je pomnožiti sa 2 (Fegredo i sur., 2009).

FRAP = Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE) $\times$ 2

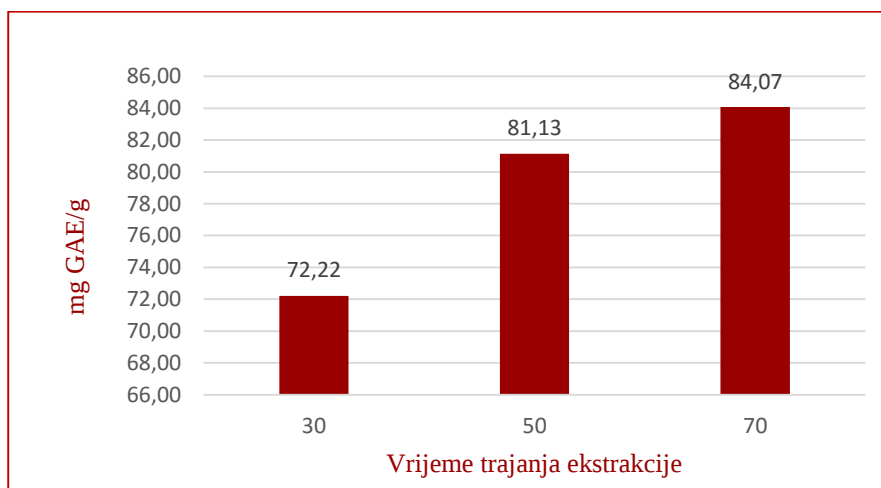
4. REZULTATI

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz organskog otpada od proizvodnje vina primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz upotrebu 80%-tne vodene otopine metanola za sjemenke i vodene otopine 1%-tne mravlje kiseline u 80%-tnom metanolu za pokožicu kroz različito vrijeme trajanja ekstrakcije (30, 50 i 70 minuta). U dobivenim ekstraktima provedeno je određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom, monomernih antocijana spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom, polimernih proantocijanidina vanilin metodom te antioksidacijski kapacitet primjenom FRAP metode.

4.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola

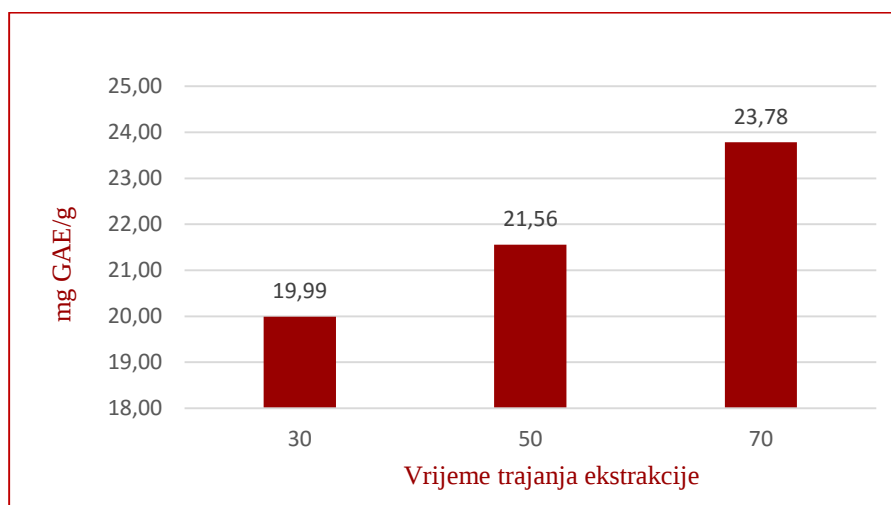
Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju ukupnih fenola prikazani su grafički uzimajući srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja koje su prikazane na slikama 12 i 13. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g).

4.1.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola iz sjemenki grožđa



Slika 12. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz sjemenki grožđa (mg GAE g⁻¹); GAE – ekvivalent galne kiseline

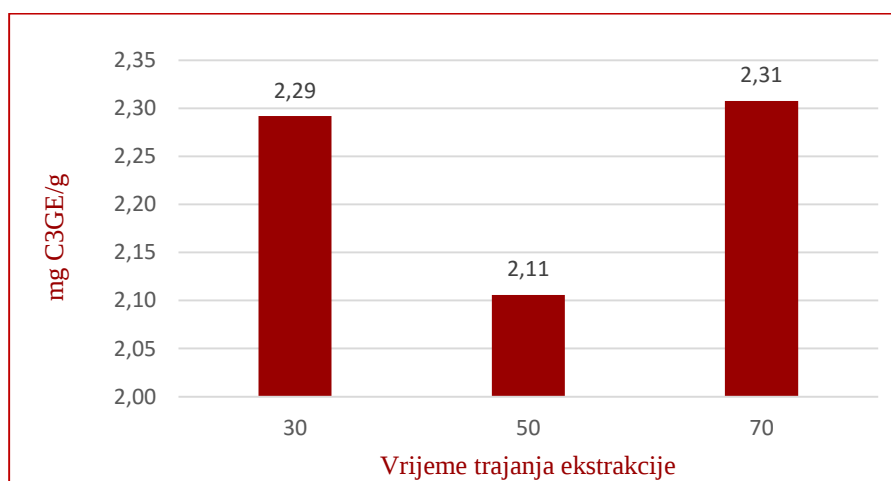
4.1.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola iz pokožice grožđa



Slika 13. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz pokožice grožđa (mg GAE g⁻¹); GAE - ekvivalent galne kiseline

4.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice grožđa

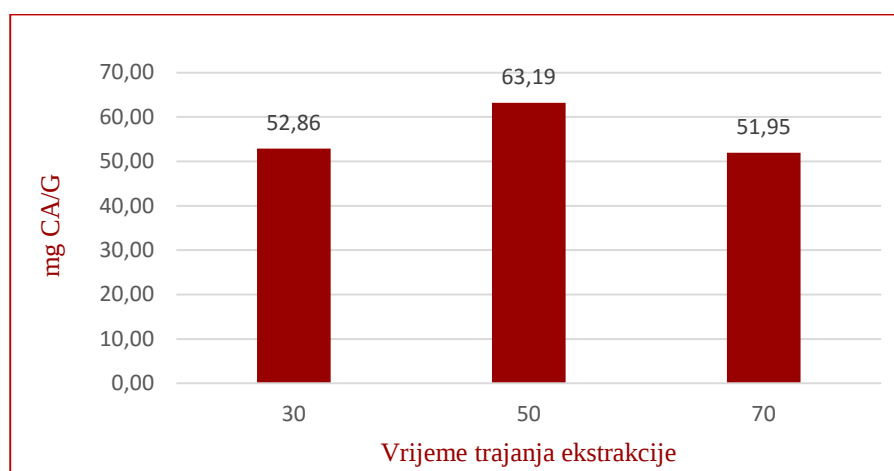
Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju monomernih antocijana prikazani su grafički uzimajući srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja koje su prikazane na slici 14. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po gramu uzorka (mg C3GE/g).



Slika 14. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju antocijana (mg C3GE g⁻¹) ; C3GE – ekvivalent cijanidin-3-glukozida

4.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki grožđa

Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina prikazani su grafički uzimajući srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja koje su prikazane na slici 15. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta katehina po gramu uzorka (mg CA/g).

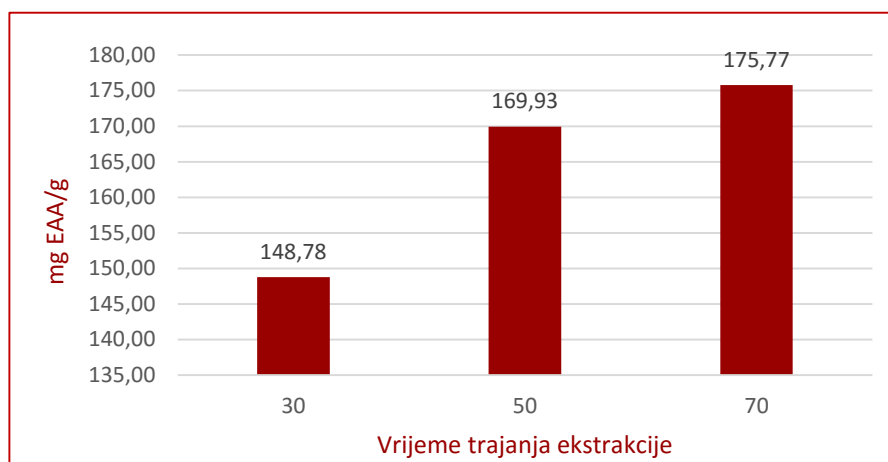


Slika 15. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju proantocijanidina (mg CA g⁻¹); CA - ekvivalent katehina

4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost

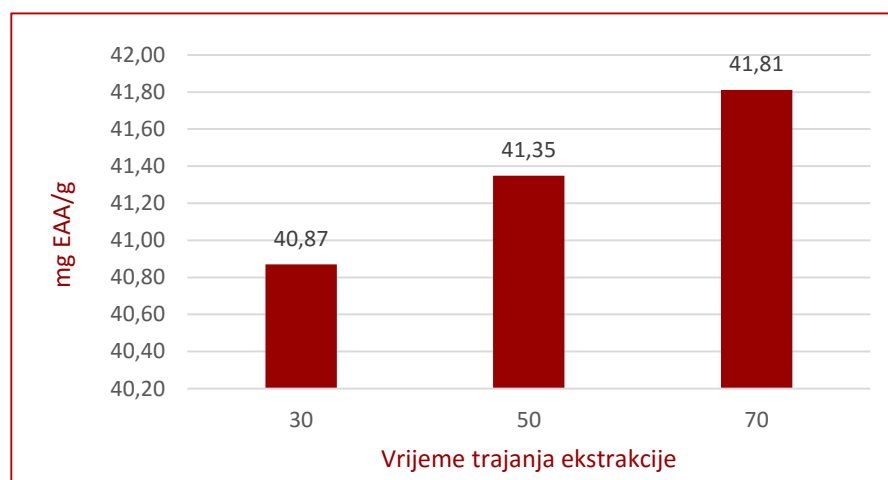
Rezultati utjecaja vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost prikazani su grafički uzimajući srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja koje su prikazane na slikama 16 i 17. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu uzorka (mg EAA /g).

4.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost sjemenki grožđa



Slika 16. Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet (mg EAA g⁻¹); EAA - ekvivalent askorbinske kiseline

4.4.2. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost pokožice grožđa



Slika 17. Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet (mg EAA g⁻¹); EAA - ekvivalent askorbinske kiseline

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola

Na slikama 12 i 13 prikazano je kako vrijeme trajanja ekstrakcije znatno utječe na koncentraciju ukupnih fenola u sjemenkama i pokožici grožđa. Koncentracija ukupnih fenola proporcionalno se povećava sa porastom vremena trajanja ekstrakcije.

Najveća koncentracija ukupnih fenola iz sjemenki komine grožđa dobivena je pri trajanju ekstrakcije 70 min (84,07 mg GAE/g), zatim pri vremenu trajanja ekstrakcije 50 minuta (81,13 mg GAE/g), a najmanja koncentracija dobivena je pri vremenu trajanja ekstrakcije 30 min (72,22 mg GAE/g). Do najvećeg povećanja koncentracije ukupnih fenola došlo je u periodu od 30-e do 50-e minute ekstrakcije, te je spomenuto povećanje u 50-oj minuti ekstrakcije iznosilo 12,34%. Daljnjim produljenjem vremena ekstrakcije od 50-e do 70-e minute zabilježen je porast koncentracije ukupnih fenola za svega 3,62%. Isti trend zabilježen je i pri ekstrakciji ukupnih fenola iz pokožice komine grožđa. Povećanje koncentracije ukupnih fenola između 30-e i 50-e minute vremena ekstrakcije iznosilo je 7,85%, a od 50-e do 70-e minute 10,3%. Najveća koncentracija ukupnih fenola izoliranih iz pokožice komine grožđa dobivena je pri trajanju ekstrakcije 70 min (23,78 mg GAE/g), a najmanja tijekom ekstrakcije 30 min (19,99 mg GAE/g). Kod ekstrakcije u trajanju 50 min, koncentracija ukupnih fenola iznosi 21,56 mg GAE/g.

Usporedbom prinosa ukupnih fenola između sjemenki i pokožice komine grožđa, uočavamo da sjemenke grožđa imaju puno veći sadržaj fenolnih spojeva od pokožice. Sadržaj polifenola pri istom vremenu ekstrakcije je u prosjeku za 265% veći u sjemenkama nego u pokožici.

Lafka i sur. (2007) istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju fenolnih spojeva u otpadu nastalom tijekom proizvodnje vina, te su utvrdili da koncentracija polifenola raste sa povećanjem vremena ekstrakcije do 3 sata. Daljnje povećanje perioda ekstrakcije čini postupak ekstrakcije dugotrajnim i neekonomičnim bez značajnog povećanja ekstrahiranih polifenola. Prema istraživanju Spigno i sur. (2007) nakon 20 sati ekstrakcije dolazi do vidljivog smanjenja ekstrahiranih fenola zbog moguće degradacije ili reakcija polimerizacije koje dovode do nastanka novih spojeva sa različitim odgovorom na analitička mjerenja. S druge strane, Lapornik i sur. (2005) ustanovili su porast količine fenolnih spojeva u ekstraktu produljenjem ekstrakcije s 12 na 24 sata.

5.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice grožđa

Dobiveni rezultati na slici 14 pokazali su da porast vremena trajanja ekstrakcije utječe na prinos antocijana, ali ne u značajnijoj mjeri odnosno nema velike razlike u dobivenim koncentracijama antocijana kod ekstrakcije pri trajanju 30, 50 i 70 minuta. Sadržaj antocijana najveći je u 70-oj minuti i iznosi 2,31 mg C3GE/g uzorka, zatim u 30-oj minuti i iznosi 2,29 mg C3GE/g uzorka, a najmanji je u 50-minuti i iznosi 2,11 mg C3GE/g uzorka. Varijacije koje su nastale u koncentraciji antocijana u ovisnosti o vremenu trajanja ekstrakcije nisu značajne.

Rezultati istraživanja Rajha i sur. (2014) pokazali su da vrijeme ekstrakcije ima pozitivne učinke na ukupnu koncentraciju monomernih antocijana u pokožici grožđa, a optimalno vrijeme za ekstrakciju antocijana u njihovom istraživanju je 119 minuta. Slično tome, Lapornik i sur. (2005) proveli su istraživanje čiji su rezultati pokazali da sadržaj antocijana u ekstraktima grožđa raste sa porastom vremena trajanja ekstrakcije. S druge strane, El Hajj i sur. (2012) dokazali su negativan utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj antocijana koji se znatno smanjio nakon 97 sati što je moglo biti uzrokovano jako produljenim vremenom ekstrakcije.

5.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki grožđa

Važnu skupinu spojeva koji su zastupljeni u sjemenkama grožđa čine proantocijanidini. Rezultati na slici 15 pokazuju trend povećanja koncentracije proantocijanidina do 50. minute, dok se daljnjim produljenjem vremena ekstrakcije do 70. minute koncentracija proantocijanidina smanjuje. U 50-oj minuti prinos je najveći i iznosi 63,19 mg CA/g uzorka, što je za 19,54% više nego u 30-oj minuti. U 70-oj minuti je najmanji i iznosi 51,95 mg CA/g uzorka. Sadržaj proantocijanidina se produljenjem vremena ekstrakcije do 70 minuta smanjio za 17,78% u odnosu na ekstrakciju kroz 50 minuta.

Rajha i sur. (2014) pokazali su da se koncentracija kondenziranih tanina povećava sa porastom vremena ekstrakcije te dostiže optimalnu vrijednost u 77-oj minuti, a zatim počinje opadati. Peyrot Des Gachons i Kennedy (2003) proveli su istraživanje utjecaja vremena na ekstrakciju, a rezultati su pokazali da se sastav i koncentracija proantocijanidina ne mijenjaju tijekom vremena. Trendovi ekstrakcije bili su slični tijekom 4 dana i 10 dana, a na kraju je relativni udio proantocijanidina bio

praktički jednak što je dokaz da vrijeme ima gotovo neznatan utjecaj na sadržaj proantocijanidina iz sjemenki grožđa.

5.4. Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet

Na slikama 16 i 17 prikazan je utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet sjemenki i pokožice, uspoređujući vrijeme ekstrakcije od 30 min, 50 min i 70 min. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se antioksidacijska aktivnost u svim uzorcima povećava s vremenom trajanja ekstrakcije samo što je intenzitet tog porasta kod sjemenki puno veći u odnosu na pokožicu.

Najveći antioksidacijski kapacitet ima ekstrakt sjemenki grožđa dobiven ekstrakcijom u vremenu 70 minuta (175,77 mg EAA/g), zatim u vremenu od 50 minuta (169,93 mg EAA/g), a najmanji antioksidacijski kapacitet ima ekstrakt dobiven ekstrakcijom pri trajanju 30 minuta (148,78 mg EAA/g). Antioksidacijski kapacitet u 50-oj minuti je za 3,44% veći od onog u 30-oj minuti, a u 70-oj minuti za 3,43% u odnosu na antioksidacijski kapacitet u 50-oj minuti.

Najveći antioksidacijski kapacitet ima ekstrakt pokožice dobiven ekstrakcijom u vremenu 70 minuta (41,81 mg EAA/g), zatim u vremenu od 50 minuta (41,35 mg EAA/g), a najmanji antioksidacijski kapacitet ima ekstrakt dobiven ekstrakcijom pri trajanju 30 minuta (40,87 mg EAA/g). U 50-oj minuti, antioksidacijski kapacitet je za 1,17% veći od onog u 30-oj minuti, a u 70-oj minuti za 1,11% u odnosu na antioksidacijski kapacitet u 50-oj minuti.

Usporedbom antioksidacijske aktivnosti sjemenki i pokožice, uočavamo da sjemenke grožđa imaju puno veći antioksidacijski kapacitet od pokožice. Antioksidacijska aktivnost u ekstraktima sjemenki veća je u rasponu od 264% do čak 320 % nego u pokožici pri istim uvjetima ekstrakcije. Antioksidacijska aktivnost u skladu je sa udjelima ukupnih fenola, te tako uzorci koji sadrže veći udio ukupnih fenola imaju i veći antioksidacijski kapacitet.

Istraživanje od Villano i sur. (2004) pokazalo je da pri porastu trajanja tretmana sa 2 na 15 minuta dolazi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta iz različitih uzoraka vina. U slučaju antioksidacijske aktivnosti ekstrakata grožđa, Lapornik i sur. (2005) dokazali su da se ona povećava sa duljim vremenom ekstrakcije, dok Spigno i De Faveri (2007) nisu našli značajnu razliku u antioksidacijskoj aktivnosti u ekstraktu kroz 5 i 24 sata. S druge strane, prema istraživanju Lafka i sur. (2007) povećanje perioda ekstrakcije dovodi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti ekstrahiranih polifenola kao posljedica dugotrajne izloženosti čimbenicima okoliša (temperatura, svjetlo, kisik) što negativno utječe na antioksidacijsku aktivnost.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, prezentiranih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih fenola u sjemenkama i pokožici komine grožđa povećava se sa porastom vremena trajanja ekstrakcije tako da je najveći sadržaj ukupnih fenola određen u ekstraktima dobivenim pri trajanju ekstrakcije 70 minuta.
2. Udio ukupnih fenola značajno je veći u sjemenkama nego u pokožici komine grožđa.
3. Na učinkovitost ekstrakcije monomernih antocijana iz pokožice komine grožđa uz upotrebu 80%-tne vodene otopine metanola sa 1%-tnom mravljom kiselinom kao otapala, vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj. Iako se njihova koncentracija povećava s vremenom, nastalo povećanje nije značajno.
4. Učinkovitost ekstrakcije polimernih proantocijanidina iz sjemenki komine grožđa ovisi o vremenu ekstrakcije, te se najveći prinosi dobivaju pri vremenu ekstrakcije od 50 minuta. Produljenje vremena ekstrakcije negativno utječe na izolaciju ovih spojeva.
5. Antioksidacijski kapacitet sjemenki i pokožice grožđa povećava se sa porastom vremena trajanja ekstrakcije tako da se najveći antioksidacijski kapacitet u ekstraktima postiže pri trajanju ekstrakcije 70 minuta.
6. Antioksidacijski kapacitet u skladu je sa udjelom fenolnih spojeva u ekstraktima sjemenki i pokožice grožđa, te je u ekstraktima sjemenki značajno veći u odnosu na ekstrakte pokožice komine grožđa.

7. LITERATURA

1. Ali, K., Maltese, F., Choi, Y., Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* **9**, 357–378.
2. Anonymus 1 (2016) Vinova loza ili trs, <<http://www.narodnilijek.com/web/vinova-loza-ili-trs>>. Pristupljeno 23. svibnja 2016.
3. Anonymus 2 (2013) Guide to Merlot Wine Taste and Food Pairing, <<http://winefolly.com/tutorial/merlot-wine-taste-and-food-pairing/>>. Pristupljeno 23. svibnja 2016
4. Anonymus 3 (2013) Anthocyanins Give Red Wine Their Color, <<http://enovihanumangirl.blogspot.hr/2013/02/anthocyanins-give-red-wine-their-color.html>>. Pristupljeno 15. svibnja 2016.
5. AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines.
6. Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 475–487.
7. Benzie, I.F.F., (1996). An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry* **29**(2), 111–116.
8. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239**(1), 70–76.
9. Bowers J, Boursiquot JM, This P, Chu K, Johansson H, Meredith C (1999) Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science* **285**:1562–1565
10. Berend S, Grabarić Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, **59**, 205–212.
11. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C.G. (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* **732**, 100–104
12. Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P. (2010) Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *J. Food Eng.* **100**, 50–55.
13. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007) Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 767–778

14. Cheng, V. J., Bekhit, A. El-Din A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012) Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry* **134**, 474–482.
15. Dai, J. i Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules*. **15**, 7313-7352.
16. El Hajj, Y., Louka, N., Nguyen, C., Maroun, R.G., (2012) Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitisvinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology. *Food and Nutrition Sciences*, **3**, 89-103.
17. Fang Y, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**: 872-879.
18. FAO Production Yearbook (2014) Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
19. Fegredo, J.A., Wong, M.C.Y., Wiseman, H., Preedy, V.R., (2009). Chapter 97-Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego, pp. 991-1002.
20. Gengaihi, S.E., Ella, F.M.A., Emad, M.H., Shalaby, E., Doha, H. (2014), Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. *Journal Food Processing & Technology* **5**, 1-5.
21. Georgiev, V., Ananga, A. i Tsoleva, V. (2014) Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391-415.
22. Ghafoor, K., Choi, J.H. (2009) Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape Peel through Response Surface Methodology. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52**, 295-300
23. Gonzalez-Paramas, A., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. (2004) Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **52**, 234–238.
24. Guisti M. M., Wrolstad R.E. (2003) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley and Sons.
25. 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.
26. Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.

27. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 4360–4367
28. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55, 279-290.
29. Lafka, T.I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104, 1206-1214.
30. Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A. G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71, 214–222.
31. 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.
32. Mazza, G.; Miniati, E. (1993) Grapes. In Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press: Boca Raton, 149-199.
33. Mirošević, N., Alpeza, I., Bolić, J., Brkan, B., Hruškar, M., Husnjak, S., Jelaska, V., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Mihaljević, B., Ričković, M., Šestan, I., Zoričić, M. (2009) Atlas hrvatskog vinogradarstva i vinarstva, Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
34. Nascentes, C.C., Kornb, M., Arrudaa, M.A.Z (2001) A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* 69, 37-43
35. Novak, I., Janeiro, P., Serugab, M., Oliveira-Brett, A.M (2008) Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta* 630, 107–115
36. Peyrot Des Gachons, C., Kennedy, J.A. (2003) Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine. *J. Agric. Food Chem* 51, 5877–5881
37. Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C., (2005) Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* 92(1), 109-117.
38. Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290-4302.
39. Qian M.C., Yu Fang, K. Shellie (2009) Volatile Composition of Merlot Wine from Different Vine Water Status. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7459–7463

40. Rajha, H.N., Darra, N.E., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R.G. (2013) An environment friendly, low-cost extraction process of phenolic compounds from grape byproducts. Optimization by multi-response surface methodology. *Food and Nutrition Sciences* **4**, 650-659.
41. Rajha, HN., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G., Louka, N. (2014) Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tanins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*. **5**, 397-409.
42. Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Schmidt Gonçalves, A.E. de S., Genovese, M.I., Fett, R. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Int.* **44**, 897-901.
43. Sá, M., Justino, V., Spranger, M. I., Zhao, Y. Q., Han, L., Sun, B. S. (2013) Extraction yields and anti-oxidant activity of proanthocyanidins from different parts of grape pomace: effect of mechanical treatments. *Phytochemical Analysis* **25**, 134-140.
44. Schieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends Food Sci. Tech.* **12** (11), 401-413.
45. Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* 98(4), 828-834
46. Sokolić, I. (1998) Prvi hrvatski vinogradarsko vinarski leksikon, 3. proš. izd., Novi Vinodolski, str. 222-223.
47. Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**, 793–801.
48. 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. *Journal of Food Engineering* **81**, 200–208.
49. Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10), 4267-4274.
50. Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-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.

51. 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. doi:10.3390/ijms140918711
52. This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., Owens, C. L. (2007) Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 723-730.
53. Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P. (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry* **17**, 598–604
54. Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7143-7172.
55. Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2004) The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. *Talanta* **64**, 501-509.
56. Vivier MA, Pretorius IS (2000) Genetic improvement of grapevine: tailoring grape varieties for the third millennium. *S Afr J Enol Vitic* 21:5–26
57. Zoričić M. (1997) Podrumarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb.