

Izolacija fenolnih spojeva iz organskog otpada od proizvodnje vina primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima potpomognute visokim tlakom

Mikulić, Ana

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:159:019963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ana Mikulić

6524/PT

**IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ ORGANSKOG
OTPADA OD PROIZVODNJE VINA PRIMJENOM UBRZANE
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA POTPOMOŽNUTE VISOKIM
TLAKOM**
ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Završni rad

IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ ORGANSKOG OTPADA OD PROIZVODNJE VINA PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA POTPOMOGNUTE VISOKIM TLAKOM

Ana Mikulić

6524/PT

Sažetak: Komina grožđa, koja zaostaje kao nusproizvod pri proizvodnji vina, je vrijedna sirovina za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provodi se primjenom različitih metoda, a jedna od novijih je i ubrzana ekstrakcija otapalima potpomognuta visokim tlakom (ASE). Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj polarnosti otapala (10, 30 i 50 %) i utjecaj broja ciklusa ekstrakcije (1 i 2) u trajanju od 5 i 10 min na izolaciju fenolnih spojeva iz pokožice grožđa sorte Merlot. Određivanje fenola provedeno je spektrofotometrijski. Najviši prinosi ukupnih fenola dobiveni su uz primjenu 50 %-tnog etanola pri trajanju ekstrakcije 5 minuta u jednom ciklusu.

Ključne riječi: vinska komina, fenoli, ubrzana ekstrakcija otapalima

Rad sadrži: 27 stranica, 8 slika, 3 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagrebu

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

Pomoć pri izradi: *doc. dr.sc. Danijela Bursać Kovačević*

Rad predan: rujan, 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Final work

Faculty of Food Technology and Biotechnology Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering Laboratory of Technology of Fruits and
Vegetables Preservation and Processing

ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM ORGANIC WASTE OF THE WINE PRODUCTION WITH ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION ASSISTED BY HIGH PRESSURE

Ana Mikulić

6524/PT

Abstract: Grape pomace as a by-product after wine production, is a high value raw material for extraction bioactive compounds. Extraction of bioactive compounds is carried out with several methods and also with a relatively new technique such as Accelerated solvent extraction assisted by high pressure (ASE). The aim of this study was to research the influence of solvent polarity (10, 30 and 50%) and the impact of the number extraction cycles (1 and 2) for 5 and 10 minutes on the isolation of phenolic compounds from of grape skins of Merlot. The total phenols were determined by spectrophotometry. The highest yield of total phenols were obtained with the use of 50 % ethanol for 5 minutes duration of the extraction in a one cycle.

Keywords: grape pomace, phenols, accelerated solvent extraction

Thesis contains: 27 pages, 8 figures, 3 tables, 49 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*

Thesis delivered: September, 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 VINSKA KOMINA	2
2.2 FENOLNI SPOJEVI KOMINE	4
2.2.1. FLAVONOIDI	6
2.2.2. ANTOCIJANI	6
2.2.3. FENOLNE KISELINE	7
2.2.4. TANINI	8
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	9
2.3.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU (ASE)	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Priprema uzorka	12
3.1.2. Aparatura i pribor	14
3.1.3. Kemikalije i standardi	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (Accelerated Solvent Extraction, ASE)	15
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju fenola	20
4.2. Utjecaj vremena trajanja i broja ciklusa na ekstrakciju ukupnih fenola	21
5. ZAKLJUČAK	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Proizvodnja grožđa raširena je diljem svijeta, više od 80 % grožđa prerađuje se u sok i vino, a ostalih 20 % otpada na nusproizvod, kominu koja sadrži pokožicu, sjemenke i peteljke (Monrad i sur., 2014). Procjenjuje se da Europa proizvodi oko 14.5 milijuna tona nusprodukata grožđa godišnje. Tako velike količine nusproizvoda mogu uzrokovati ekološke probleme pa ih je potrebno adekvatno zbrinuti ili preraditi. Štoviše, potreban je razvoj novih metoda zbrinjavanja i vrednovanja nusprodukata uz razvijanje metoda izolacije bioaktivnih spojeva (Teixeira i sur., 2014, Bhise i sur., 2014).

U zadnjih par godina sve se više pažnje posvećuje upravo komini grožđa jer sadrži prirodne antioksidanse i visoki udio fenola koji zaostaju nakon ekstrakcije tijekom proizvodnje vina (El Gengaihi i sur., 2014). Fenolni spojevi sadrže antioksidacijska, antimikrobna, protuupalna i brojna druga pozitivna djelovanja te se smatra da kontinuirani unos antocijana i drugih fenolnih spojeva smanjuje rizik od obolijevanja od kroničnih bolesti (Teixeira i sur., 2014). Izolacijom fenolnih spojeva iz komine smanjuje se loš utjecaj na okoliš, a povećava profitabilnost u segmentu prehrambene industrije (Brahim i sur., 2014).

Jedna od metoda koja se primjenjuje u izolaciji bioaktivnih komponenata je ubrzana ekstrakcija otapalima (ASE). To je relativno nova metoda koja koristi organska otapala pri visokim temperaturama i visokom tlaku za ekstrakciju bioaktivnih komponenata (Solana i sur., 2014). ASE metoda primjenjuje se za izolaciju bioaktivnih i drugih spojeva iz različitih supstrata pri čemu se istražuju učinci parametara ekstrakcije (tip otapala, temperatura, prosječna veličina čestica, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) na učinkovitost ekstrakcije. Prednost ove tehnike je da omogućava istovremenu obradu većeg broja uzoraka što skraćuje vrijeme ekstrakcije (Bozan i Altinay, 2014). Visoki tlak omogućava da otapalo može prodrijeti dublje u matricu uzorka, pospješujući ekstrakciju analita iz pora matrice. Na povišenoj temperaturi, topljivost analita se povećava te prijenos tvari postaje efikasniji (Fontana i sur., 2015).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj polarnosti otapala (10, 30 i 50 %), vrijeme trajanja ekstrakcije (5 i 10 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1 i 2) na izolaciju fenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice grožđa sorte Merlot uz primjenu ubrzane ekstrakcije otapalom potpomognute visokim tlakom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 VINSKA KOMINA

Grožđe je jedna od najraširenijih voćnih vrsta u svijetu sa 77 milijuna proizvedenih tona u 2013. godini (FAOSTAT, 2015). Grožđe i proizvodi dobiveni iz njega, kao što su vino, sok od grožđa, džemovi i groždice, imaju veliki ekonomski značaj. U svijetu se 80% proizvodnje grožđa koristi u proizvodnji vina (Fontana i sur., 2015).

Proizvodnja vina započinje berbom grožđa nakon čega slijedi proces vinifikacije, tj. prerade grožđa u vino. Daljnji procesi prerade grožđa ovise o vrsti grožđa i vina koje se želi proizvesti, a osnovne operacije na početku prerade su prešanje i fermentacija. Prešanjem nastaju dvije frakcije, jedna je groždani sok iz kojega daljnjim procesima nastaje vino, a druga frakcija koja zaostaje je komina (Bhise i sur., 2014).

Nusprodukti proizvodnje vina sastoje se od organskog otpada, otpadnih voda, otpuštanja stakleničkih plinova i anorganskih ostataka. Organski otpad čini komina koja sadrži sjemenke, pulpu i pokožicu te peteljke i lišće (Teixeira i sur., 2014). To predstavlja veliki ekološki i ekonomski problem oko upravljanja otpadom. Vinsku kominu možemo djelomično upotrijebiti za ekstrakciju vinske kiseline ili proizvodnju etanola, a konačni kruti ostatak se ponekad može odbaciti kao gnojivo, iako visoke razine fenola mogu predstavljati problem jer inhibiraju klijavost sjemena (Fontana i sur., 2015).

Posljednjih godina, velika pozornost posvećuje se nutritivno vrijednijoj hrani bogatoj bioaktivnim spojevima te sigurnosti hrane. Na isti način, moderne industrije usmjerene su na smanjivanje utjecaja industrijskih nusproizvoda na okoliš te veliku pozornost posvećuju iskorištenju nusproizvoda nastalih tijekom proizvodnje vina (Fontana i sur., 2015). S obzirom na strogu regulativu EU, nusprodukte proizvodnje vina potrebno je adekvatno zbrinjavati kako ne bi došlo do onečišćenja okoliša te narušavanja kvalitete tla, podzemnih voda te flore i faune (Bonilla i sur., 1999).

Vinska komina je izvor bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi, masne kiseline, pektini i slično) koji se mogu koristiti u proizvodnji prehrambenih proizvoda (Iora i sur., 2014). Fenolni spojevi ili polifenoli su poznati po tome što pospješuju zdravlje te su povezani s antioksidacijskim svojstvima. Kao posljedica toga, vinska komina smatra se vrijedanim

izvorom fitokemikalija koje se mogu odvojiti kao funkcionalni spojevi zapotrebe farmaceutske i kozmetičke industrije (Fontana i sur.,2015).

Kemijski sastav komine ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, stanju biljke te klimatskim uvjetima. Također, značajne razlike u kemijskom sastavu prisutne su između različitih dijela bobice grožđa pa tako i između sjemenke i pokožice grožđa. Komina je bogata fenolonim spojevima i predstavlja visokovrijednu sirovinu za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva (Ignat i sur., 2011; Kammerer i Carle, 2008; Rajha i sur., 2013).

Udio sjemenki u komini čini više od 50% suhe tvari što ovisi o metodi proizvodnje i rukovanju otpadom (Teixeira i sur., 2014). Bogat su izvor fenolnih spojeva, najviše procijanidina koji imaju jako antioksidacijsko djelovanje te imaju pozitivan učinak na zdravlje (Campos i sur., 2008). Polifenoli sjemenki grožđa čine 60 do 70% ukupnih polifenola koji se ekstrahiraju iz komine (Teixeira i sur., 2014).

Pokožica grožđa čini čak 65% ukupne količine komine, a dokazano je kako je pokožica bogat izvor fenolnih tvari poput antocijana, flavonola, fenolnih kiselina, alkohola i stilbena (Georgiev i sur., 2014).

Tablica 1. Sadržaj pokožice (Beurzeix i sur., 1972)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni polifenoli	12 – 61
Procijanidini	17 – 47
Taninski spojevi	14 – 50
Antocijani	100

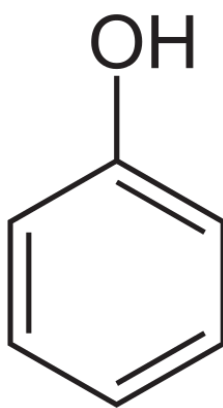
Peteljke se uklanjanju prije procesa vinifikacije zbog visokog udjela proantocijanidina kako bi se izbjegao pretjerano trpki okus vina i negativan utjecaj na senzoriku vina. Sadrže flavan-3-ole, hidroksicimetne kiseline, monomerne i oligomerne flavonole i stilbene. Fenoli peteljki grožđa čine oko 5,8% suhe tvari komine (Teixeira i sur., 2014).

Najzastupljenije fenolne komponente komine su antocijani, flavonoli i njihovi glikozidi, katehin i fenolne kiseline. Od nefenolnih spojeva najzastupljeniji su lupeol, oleinska kiselina i β -sitosterol (Corrales i sur., 2009).

2.2 FENOLNI SPOJEVI KOMINE

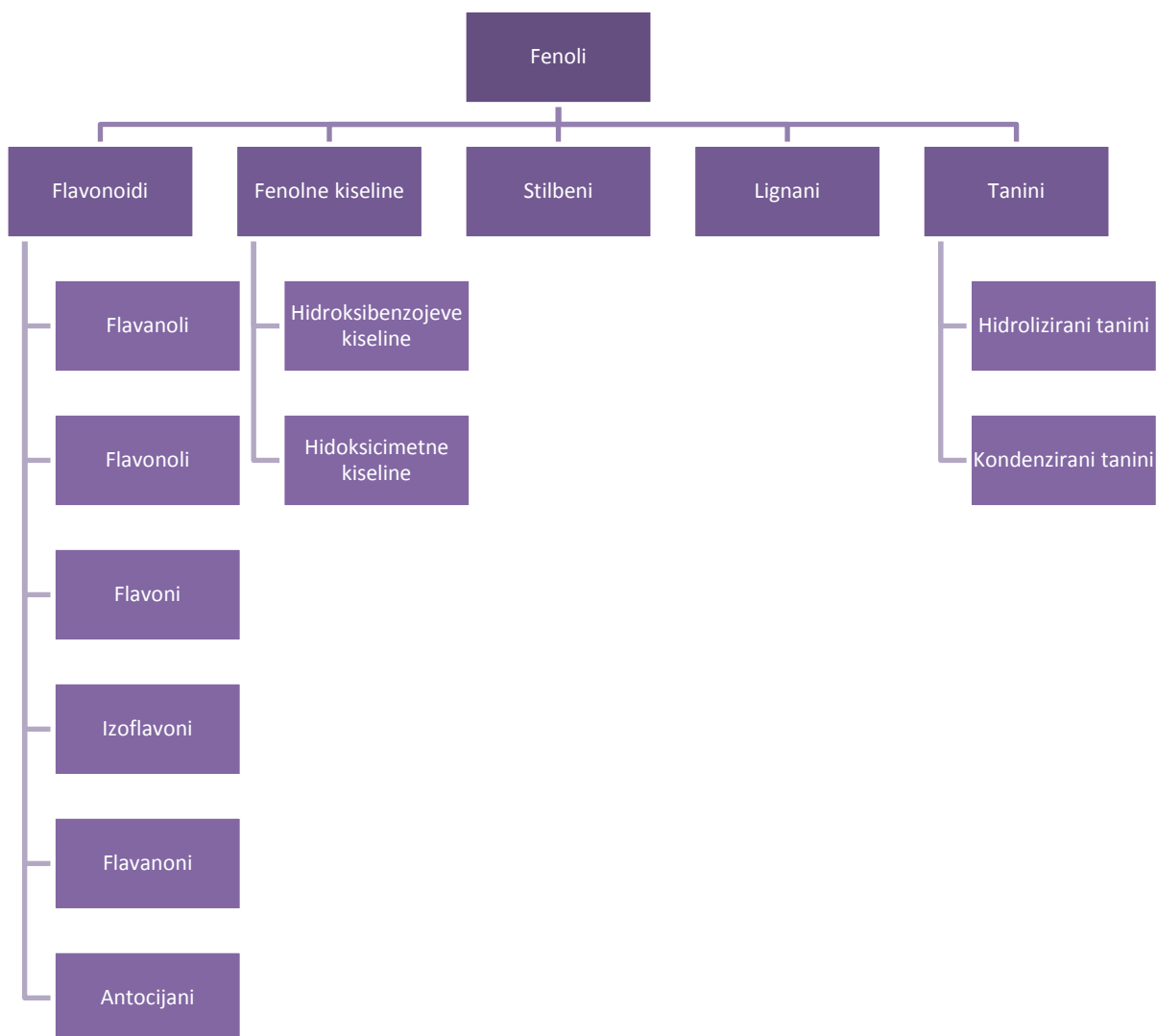
Fenolni spojevi prisutni su u velikim količinama u svijetu biljaka i najzastupljeniji su sekundarni metaboliti biljaka (Dai i Mumper, 2010). Do sad je poznato više od 8 000 strukturno različitih fenolnih spojeva u prirodi (Vastrano i sur., 2000), a nekiod njih zastupljeni su i u komini grožđa. Nalaze se u žitaricama, kori drveća, lišću i cvijeću, gotovo svim vrstama začinskog i aromatskog bilja te u sjemenu, pokožici i mezokarpu voća i povrća (Riedel i sur., 2012). Njihova uloga je raznovrsna. Štite biljke od UV zraka, napada patogena i parazita, a pridonose i karakterističnoj boji pojedine biljke te organoleptičkim svojstvima hrane koja se proizvodi od pojedinih biljnih vrsta. Npr. procijanidini pridonose gorčini voća i voćnih sokova zbog interakcija s glikoproteinima u slini čovjeka, a antocijani su odgovorni za narančastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju voća i povrća (Dai i Mumper, 2010).

Trenutno u svijetu postoje mnogi dokazi o biološkim aktivnostima fenolnih spojeva poput antioksidacijskog, antimikrobnog, protuupalnog, antikancerogenog djelovanja što je dovelo do posebnog naglaska na korištenje fenolnih spojeva u farmaceutskog, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Teixeira i sur., 2014). Fenolni spojevi sadrže jedan ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina (slika 1) (Dai i Mumper, 2010).



Slika 1. Osnovna struktura fenolnih spojeva (Anonymous 1, 2016)

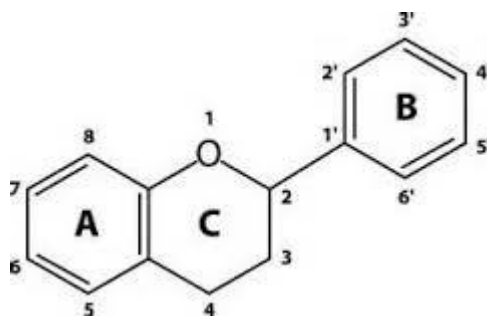
Prema broju i rasporedu ugljikovih atoma klasificiraju se u nekoliko skupina: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, tanine i lignane (Slika 2) (Ignat i sur., 2011).



Slika 2. Podjela polifenola (Erdman i sur., 2007)

2.2.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su najraznovrsnija skupina koja kao osnovnu strukturu ima difenolpropanski kostur (C6-C3-C6) (Balasundram i sur., 2006). Sastoje se od dva fenolna prstena (A i B) koji su povezani preko centralnog piranskog prstena (C) što je prikazano na slici 3 (Jackson, 2008). Oko 5000 trenutno identificiranih flavonoida, s obzirom na oksidacijsko stanje centralnog piranskog prstena, dijeli se na skupine: flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, anocijani i izoflavoni. Strukturne varijacije spojeva unutar grupe ovise o stupnju hidroksilacije, lipidacije, acetilacije, metilacije i glikozilacije osnovne strukture flavonoida (Dai i Mumper, 2010).



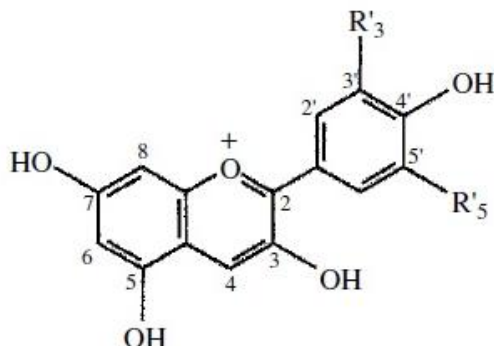
Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Anonymus 2, 2016)

Flavonoidi mogu postojati kao slobodni ili kao polimeri vezani s drugim flavonoidima, šećerima ili njihovom kombinacijom. Prisutni su u obliku glikozida te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i sa ksilozom te galaktozom i arabinozom (Jackson, 2008). Flavonoidi se sintetiziraju unutar fenilpropanoidbiosintetskog puta u reakcijama koje katalizira multienzimski kompleks poznat kao flavonoid metabolon, koji je slabo pričvršćen na membranu endoplazmatskog retikuluma s citoplazmatske strane (Petrussa i sur., 2013). Bogati izvori flavonoida su voće, povrće, zeleni čaj, crno vino i čokolada (Balasundram i sur., 2006).

2.2.2. ANTOCIJANI

Antocijanisu biljni pigmenti koji se nalaze u vakuoli stanica pokožice grožđa. Mogu biti crveni, ljubičasti ili plavi ovisno o pH vrijednosti u kojoj se nalaze (Teixeira i sur., 2014).

Temeljnu strukturu čini 2-benzil-1-benzopirilium kation (flavilium ion) čiji su položaji 3,5,7,4' hidroksilirani. Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikozilaciji s različitim šećerima (Tsao, 2009).



Slika 4. Strukturna formula antocijana (Tsao, 2010)

U biljkama se najčešće nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer (Anderson, 2006). Ako se glikonska jedinica hidrolizira, aglikon (nešećerni produkt hidrolize) se zatim naziva antocijanidin (Balasundram, 2006). Jedan ili više položaja u strukturi antocijana mogu biti zamijenjeni molekulom monosaharida, disaharida ili trisaharida (Clifford, 2000). Najčešće nalazimo glukozu koja se može vezati na C-3 i/ili C-5 položaj molekule antocijanidina i na taj način se povećava kemijska stabilnost i topljivost antocijana (Jackson, 2008). Antocijani su vrlo osjetljivi spojevi i na njihovu stabilnost utječu brojni čimbenici poput temperature, pH, svjetla, prisutnosti drugih fenolnih spojeva, enzima, iona metala, šećera, kisika i sumporova dioksida (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

2.2.3. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline su po strukturi jednostavni fenoli te imaju dvije glavne podskupine: hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline. U hrani su prisutne u slobodnom i vezanom obliku. Hidroksicimetne kiseline imaju C6-C3 strukturu te se rijetko nalaze u slobodnom obliku, najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima i kao esteri (Balasundrum i sur., 2006). U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se:

- kafeinska
- *p*-kumarinska
- sinapinska

- ferulinska kiselina (Ignat i sur., 2011)

Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati značajna su skupina fenolnih spojeva prisutnih u voću i povrću (Bravo, 1998). Hidroksibenzojeve kiseline imaju C6-C1 strukturu te u njih ubrajamo:

- galnu
- p-hidroksibenzojevu
- vanilinsku
- protokatehinsku
- siringinsku kiselinu (Ignat i sur., 2011).

Nastaju izravno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne kao slobodne kiseline (Balasundrum i sur., 2006).

2.2.4. TANINI

Tanini su velika skupina fenolnih spojeva koji se mogu podijeliti u dvije skupine, s obzirom da li mogu biti hidrolizirani ili ne. Osnovna struktura hidroliziranih tanina je galna kiselina i njezini derivati (Whale i sur., 2010). Nehidrolizirani ili kondenzirani tanini su oligomeri ili polimeri flavan-3-ol-a (Dai i Mumper, 2010). Tanini nastaju polimerizacijom flavonola. Tipični flavan-3-ol-i u grožđu su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehingalat i (-)-epigalokatehin (Jackson, 2008). Tanini su značajni u tehnologiji vina jer utječu na organoleptička svojstva tako što pridonose trpkoci i gorčini vina. Molekulska masa je povezana s trpkoci jer tanini veće molekulske mase više pridonose trpkoci (Gawel, 1998). Tanini se u velikim koncentracijama nalaze u nezrelom voću te njihova koncentracija opada zrenjem voća. Nalaze se u crnom vinu, orašastim plodovima i začinskom bilju (Dai i Mumper, 2010).

2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala je prvi korak u izolaciji fitokemikalija koje se koriste u pripremi prehrambenih suplemenata, sastojaka prehrambenih proizvoda, farmaceutskih ili kozmetičkih proizvoda. Fenoli se mogu ekstrahirati iz svježeg, zamrznutog ili osušenog biljnog materijala. Prije ekstrakcije uzorci se suše na zraku ili liofiliziraju te se nakon toga usitnjavaju, melju i homogeniziraju. Liofilizacijom u biljnom materijalu zadržavaju se veće količine fenolnih spojeva nego sušenjem na zraku (Dai i Mumper, 2010).

Organskim otapalima ekstrahiraju se fenolni spojevi iz biljnog materijala, uključujući voće i povrće, vino, kavu, razno bilje, čaj i žitarice. Kao najčešće korištena otapalaza ekstrakciju fenolnih spojeva koriste se: etanol, aceton i metanol. Ekstrakcija se provodi pri unaprijed određenim idealnim uvjetima, temperaturi i pH (Garcia-Salas i sur., 2010).

Prilikom odabira adekvatne metode za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnih sirovina potrebno je razmotriti prednosti i nedostatke svake metode kao i dostupnost tehnike ekstrakcije, selektivnost metode, stabilnost spojeva i uzoraka, prinos ekstrakcije, čistoću ekstrakta, troškove metode kao što su nabava i obrada uzoraka, potrošnja energije, cijena konačnog proizvoda i tržišna potražnja, zatim mogućnost primjene dobivenog ekstrakta te zakonske regulative (Rostagno i Prado, 2013).

U istraživanjima i proizvodnji ekstrakata fenolnih spojeva najviše se koriste standardne konvencionalne metode ekstrakcije, ali se sve više ispituju i nove tehnike ekstrakcije kao što su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija superkritičnim CO₂, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ubrzana ekstrakcija otapalima i ekstrakcija pomoću hladne plazme (Teixeira i sur., 2013).

2.3.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU (ASE)

Ubrzana ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu moderna je metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995. godine. Ovaj tip ekstrakcije zahtjeva više temperature u odnosu na druge ekstrakcijske metode i visoke tlakove

kako bi se otapalo zadržalo u tekućem stanju pri visokim temperaturama. Velika učinkovitost ekstrakcije postiže se upravo uporabom organskih otapala u tekućoj fazi na temperaturama iznad temperature vrelišta otapala. Povišena temperatura povećava brzinu difuzije, topljivost analita i time ubrzava ekstrakciju. Ekstrakcijska ćelija od nehrđajućeg čelika može raditi na temperaturama do 200 °C i tlakovima do 20 MPa.

Prvo se u ekstrakcijsku ćeliju stavlja filter. Koriste se dvije vrste filtera, celulozni, koji se upotrebljava za ekstrakciju sa organskim otapalima te stakleni, koji se upotrebljava ukoliko se ekstrakcija provodi s vodom. Nakon filtera, u ekstrakcijsku ćeliju postavlja se adsorbens koji pospješuje učinkovitost same ekstrakcije. Najčešće se koristi dijatomejska zemlja, kao sredstvo za upijanje vlage iz analita i Ottawa pijesak, koji ima ulogu disperznog sredstva. Potom se u ekstrakcijsku ćeliju dodaje uzorak, pomiješan s malom količinom adsorbensa te na poslijetku se adsorbensom ekstrakcijska ćelija napuni gotovo do vrha. Ekstrakcijska ćelija se potom zatvara i ekstrakcija se provodi prema željenim parametrima (Mottaleb i Sarker, 2012)

Uzorak pomiješan sa sredstvom za sušenje i homogenizaciju smješten je u ekstrakcijskoj ćeliji od nehrđajućeg čelika koja je pod tlakom, zagrijava se u peći i puni otapalom za ekstrakciju. Otapalo se dovodi iz rezervoara tako da ispunjava posudu koja se zagrijava i tlači programirano zadano vrijeme. Posuda se zatim ispire s plinom dušikom, a dobiveni ekstrakt koji se automatski filtrira se sakuplja. Svježe otapalo se koristi za otapanje preostale količine spojeva. Konačno čišćenje s dušikom se provodi do sušenja biljnog materijala. Visoke temperature i tlakovi povećavaju prodiranje otapala u materijal i povećavaju topljivost metabolita, ubrzavajući ekstrakciju proces i prinos. Obzirom da je nakon ekstrakcije materijal osušen, moguće je vršiti ponovljene ekstrakcije s istim otapalom ili sukcesivne ekstrakcije koristeći otapala s rastućom polarnosti (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 5. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima, Dionex ASE ® 350 (Anonymus 3, 2016)

ASE metoda ima mnoge prednosti u odnosu na tradicionalne metode. Npr, kruto / tekuće ekstrakcijske metode koriste veliku količinu toksičnih organskih otapala, zahtjevaju puno više vremena za ekstrakciju, posjeduju nisku selektivnost te mogu izložiti ekstrakte prekomjernoj količini topline, svjetlosti i kisika. Suprotno tome, ASE koristi manje količine otapala u kraćem vremenskom razdoblju te zadržava jednake količine kisika unutar uzoraka (Hossain i sur., 2011).

Abdel i sur. (2014) su istraživali ekstrakciju antocijana iz obojenih zrna, plave pšenice, ljubičastog kukuruza i crne riže uz pomoć ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) i ekstrakcije mikorovalovima (MAE) u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Rezultati su pokazali da je ASE metoda prikladnija za ekstrakciju antocijana iz obojenih zrna te je izazvala manje promijene u strukturi antocijana u odnosu na MAE.

Biljke iz porodice *Lamiaceae* su poznate po svojim zdravstvenim benefitima. Tako su Solana i sur. (2014) proveli izolaciju eteričnih ulja iz selektiranih biljnih vrsta porodice *Lamiaceae*. Najbolja ekstrakcija i najveća količina fenolnih spojeva je postignuta Soxhlet-om i ASE metodom čime je dokazano da su te dvije metode najpogodnije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz aromatičnog bilja.

Chuang i sur. (2015) su istraživali efekte ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) i brze, jednostavane, jeftine, učinkovite, robustne i sigurne metode ("Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe" method - QuEChERS) kako bi odredili 11 različitih skupina spojeva izoliranih iz celera i zelene salate. Rezultati su pokazali da se primjenom navedene metode može izolirati svih 11 spojeva. U odnosu na ASE QuEChERS metoda vrši ekstrakciju u kraćem vremenu, manji su troškovi oko pripreme uzorka i potrebne su manje količine organskih otapala.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Priprema uzorka

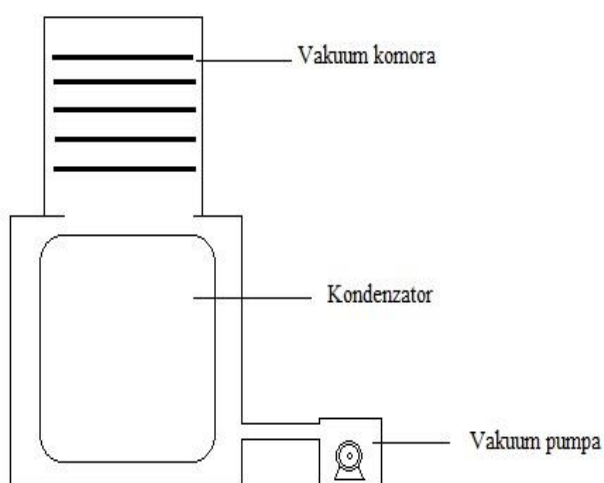
Nusproizvod proizvodnje vina sorte *Merlot* podvrgnut je prešanju. Uzorak komine, koji je sadržavao pokožicu, sjemenke i zaostale dijelove peteljke, podvrgnut je procesu liofilizacije te su potom liofilizirani uzorci mehanički razdijeljeni na pokožicu, sjemenke te dijelove peteljke. Razdvojeni dijelovi odvojeno su pakirani u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni i skladišteni pri -20°C do provođenja analize. Prije provođenja analize liofilizirana pokožica grožđa samljevena je u prah pomoću mlinca za mljevenje (ImetecDolcevit CG1). Veličina čestica određena je granulometrijski pomoću sita $d(0,9)=6\leq 1\text{ mm}$. Pripremljeni uzorci korišteni su za provođenje ekstrakcije fenolnih spojeva.



Slika 6. a) Liofilizirana komina (pokožica, sjemenke, peteljka); b) sjemenke grožđa; c) pokožica; d) samljevena pokožica

Postupak liofilizacije komine

Uzorak komine zamrznut je na -60°C nakon čega je proveden postupak liofilizacije na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska). Oko 500 g smrznute komine raspoređeno je u jednom sloju na šest plitica nakon čega je proveden postupak liofilizacije u trajanju od 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0°C /24 sata, a izotermna desorpcija pri 20°C /12 sati. Po završetku procesa liofilizacije prosječni udio suhe tvari u liofiliziranoj komini iznosio je 96,85%.



Slika 7. Shematski prikaz laboratorijskog liofilizatora.

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β, Velika Britanija)

Pribor:

- Uređaj za mljevenje (ImetecDolceVita CG1, Italija)
- Plastična ladica za vaganje
- Odmjerne tikvice (10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Menzure (100 mL, 1000 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipeta (1 mL, 2mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL) i propipeta
- Falkonice volumena 50 mL
- MikropipeteEppendorf (100 μL, 1000 μL, 5000 μL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Celulozni filteri (ThermoScientific)

3.1.3. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni, 50 %-tni, 30 %-tni, 10 %-tni (GRAM-MOL)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Na_2CO_3) (GRAM-MOL d.o.o.)
- Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

Priprema: odvaži se 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čašici te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Galna kiselina, $C_7H_6O_5$
- Standard galne kiseline

Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 % - tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom vremenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Destilirana voda
- Dijatomejska zemlja (DE, P/N 062819)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku(AcceleratedSolventExtraction, ASE)

Na analitičkoj vagi u plastičnoj ladici odvaži se 1 g ($\pm 0,0001$) uzorka praha pokožice grožđa. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika (volumena 34 mL) najprije se postavi filter papir (XYZ), a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje, na koju se zatim dodaje odvagani uzorak i sve dobro promiješa sa špatulom, vodeći pri tom računa da se ne bi oštetio filter na dnu ćelije. Nakon toga se ponovno dodajediijatomejska zemlja do vrha ćelije (5 mm ispod gornjeg ruba) te se ćelija ručno zatvara. Tako pripremljeni uzorci postavljaju na ekstrakciju na uređaju ASE DIONEX 350. Ekstrakcija je provedena prema planu pokusa pri čemu je variran udio etanola u vodenim otopinama (10, 30 i 50 %, v/v), vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te broj ciklusa ekstrakcije (1 i 2)(Tablica 2). Svi ekstrakti su pripremljeni u paraleli.

Tablica 2. Plan pokusa ekstrakcije na ASE-u

Broj pokusa	Udio etanola u vodenoj otopini (%)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Broj ciklusa ekstrakcije
1	10	5	2
2	10	10	1
3	10	5	1
4	30	10	1
5	30	5	2
6	30	5	1
7	50	10	1
8	50	5	1
9	50	5	2

Nakon završene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se kvantitativno prenesu u tikvice od 50 mL te se nadopune do oznake otapalom koje smo koristili za ekstrakciju (10%, 30% ili 50 %-tna vodena otopina etanola). Naposljetku se uzorci prenesu u plastične falkonice volumena 50 mL te se skladište na -18 °C do provođenja analiza

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 fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, nastaje plavo obojeni kompleks čiji intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 500 μL ekstrakta koji je razrijeđen otapalom (250 μL ekstrakta i 250 μL otapala), 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen), te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5%-tnog natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 15 minuta pri 45 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

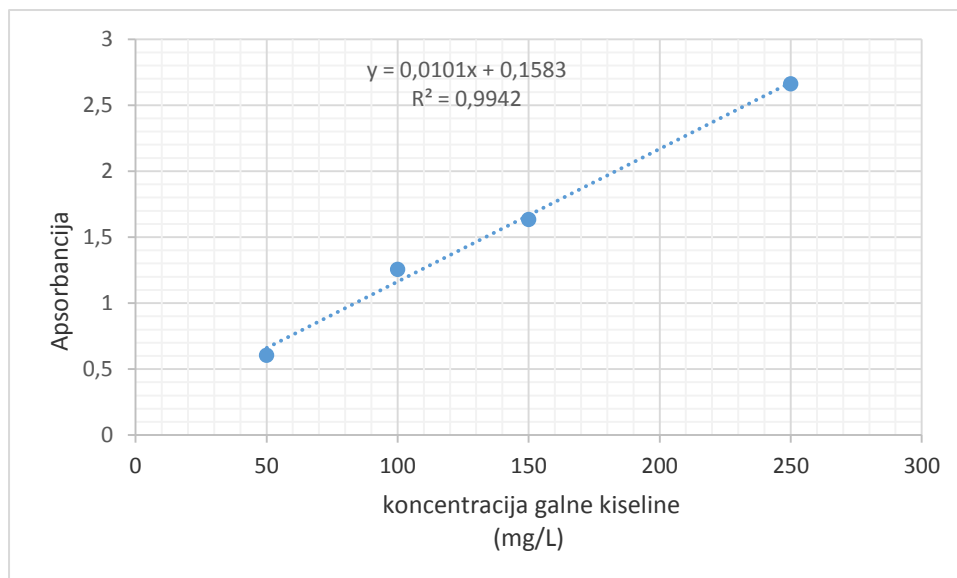
Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

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

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 500 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen) te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5%-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci se potom termostatiraju 15 minuta pri $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 7).



Slika 8. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$Y = 0,0101X + 0,1583$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

R^2 - koeficijent determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija ukupnih fenola iz pokožice vinske komine sorte Merlot primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima potpomognute visokim tlakom. Ispitivan je utjecaj polatnosti otapala (10 %, 30 %, 50 %) i vrijeme trajanja ekstrakcije (5 min ili 10 min u jednom ili dva ciklusa) na učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenola.

Tablica 3. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GA / g) izolirani iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot uz primjenu ubrzane ekstrakcije potpomognute visokim tlakom

Udio alkohola u otapalu za ekstrakciju (%)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa	Maseni udio (mg GA/ g)
10 %	5	1	265,8959
	5	2	264,4614
	10	1	256,82995
30 %	5	1	424,404
	5	2	438,52835
	10	1	432,75685
50 %	5	1	627,0673
	5	2	602,7115
	10	1	591,3596

4.1. Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju fenola

Iz dobivenih rezultata (Tablica 3.) vidljivo je da se učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenola povećava s porastom volumnog udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu. U ekstraktima koji su dobiveni s 10 %-tnim etanolom, otapalo s najvećom polarnosti, određeni su najniži maseni udjeli ukupnih fenola (256,82995 mg GA / g). Uočava se blagi porast ukupnih fenola s porastom udjela alkohola na 30 % u otapalu za ekstrakciju. Najveća količina ukupnih fenola dobivena je ekstrakcijom s 50 %-tnim etanolom u vremenu trajanja od 5 min u jednom ciklusu (627,0673 mg GA/g).

Rezultati našeg istraživanja se podudaraju s istraživanjima koje su proveli Iora i suradnici (2014). Istraživali su utjecaj različitih udjela etanola u otapalima za ekstrakciju, od 0 do 100% te su došli do zaključka kako se optimum ekstrakcije fenolnih spojeva postiže sa 40% vodenom otopinom etanola.

Rajha i sur. (2014) u su istraživali utjecaj polarnosti etanolnih otapala između 30 – 80% na ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine grožđa. Najveća koncentracija fenola je zabilježena kada se kao otapalo koristio 66%-tni etanol.

Iste rezultate su dobili Prasad i suradnici (2009) te prikazali kako povećanje udjela otapala s 25 % na 50 % utječe na bolju ekstrakciju i porast koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva u ekstraktu perikarpalangan voća. Istraživanje su proveli uz primjenu visokog hidrostatskog tlaka te etanola i metanola kao otapala. Rezultati su pokazali da se veći prinos fenolnih spojeva postiže primjenom etanola, a etanol je ujedno manje toksično otapalo od metanola te je stoga prihvatljivije i primjenjivije za upotrebu u prehrambenoj industriji.

Lapornik i sur. (2005) su istraživali utjecaj vode i vodenih otopina alkohola na ekstrakciju fenolnih spojeva iz nusprodukata grožđa te crnog i crvenog ribizla. Bolji prinos fenolnih spojeva kod ekstrakcije alkoholnim otapalima objašnjava se time što etanol i metanol imaju manju polarnost od vode, čime imaju veću efikasnost kod degradacije staničnih stijenki koje su također nepolarne čime omogućavaju prijelaz fenolnih tvari iz stijenke u otapalo.

4.2. Utjecaj vremena trajanja i broja ciklusa na ekstrakciju ukupnih fenola

Iz dobivenih rezultata (Tablica 3.) kod udjela alkohola od 10 % nema značajne razlike u provođenju ekstrakcije tijekom jednog ili dva ciklusa. Također se ne dobivaju veći maseni udjeli ukupnih fenola s povećanjem trajanja ekstrakcije s 5 min na 10 min. Porastom udjela alkohola na 30 % možemo vidjeti promjenu u koncentraciji ukupnih fenola. Provođenjem ekstrakcije u trajanju 5 min u dva ciklusa se dobiva veći prinos fenola u odnosu na ekstrakciju u trajanju 5 min unutar jednog ciklusa. Ipak, najveći prinos fenola dobiven je prilikom trajanja ekstrakcije 5 min u jednom ciklusu kod 50 %-tnog etanola (627,0673 mg GA / g).

Rezultati našeg istraživanja su u skladu s istraživanjem Zaghdoudi i sur. (2015). Ekstrahirali su karotenoide iz brskve i marelice ASE tehnikom, te su najveći prinos dobili ekstrakcijom u trajanju 5 min unutar jednog ciklusa. Štoviše, povećanjem broja ciklusa je došlo do negativnih efekata na ekstrakciju karotenoida.

S druge strane, Bozan i Altinay (2014) su ekstrahirali flavan-3-ole iz sjemenki grožđa. Najviši prinosi su ostvareni ekstrakcijom u trajanju od 20 min, dva ciklusa po deset minuta. Pokušali su i povećati broj ciklusa, ali nije došlo do poboljšanja ekstrakcije

Jentzer i suradnici (2014) su istraživali steviju. Pomoću ASE metode su ekstrahirali glikozidestevije. Najveća koncentracija dobivena je ekstrakcijom pri 85 °C u trajanju od 5 minuta i pri tri ciklusa ekstrakcije.

Do istog zaključka su došli Saha i suradnici (2015). ASE tehniku su primjenili kako bi ekstrahirali karotenoide, lutein i β -karoten, iz mrkve. Rezultati su pokazali kako je najveći prinos bio kod ekstrakcije u trajanju od 15 min unutar 3 ciklusa. Također su pokušali povećati broj ciklusa, ali time nije dobivena veća koncentracija karotenoida.

5. ZAKLJUČAK

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

1. Prilikom ubrzane ekstrakcije otapalom potpomognute visokim tlakom 50 %-tna vodena otopina etanola, najmanje polarno otapalo, pokazalo se kao najbolje i najučinkovitije otapalo za izolaciju fenolnih spojeva iz pokožice komine grožđa sorte Merlot (627,0673 mg GA / g).
2. Vrijeme trajanja postupka ekstrakcije nije utjecalo na masene udjele ukupnih fenola. Trajanjem ekstrakcije 5 i 10 min dobiveni su podjednakirezultati.
3. Broj ciklusa ekstrakcije ima mali utjecaj na prinos ukupnih fenola. Povećanjem broja ciklusa s jednog na dva u trajanju 5 min, maseni udjeli fenolnih spojeva ne mijenjaju se značajno.
4. Optimalni uvjetiekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva iz pokožice komine grožđa sorte Merlot primjenom ASE metode su trajanje ekstrakcije 5 min unutar jednog ciklusa, pri sobnoj temp, uz 50 %-tnu vodenu otopinu etanola (v/v).

6. LITERATURA

Abdel, Akhtar H., Rabalski I., Bryan M. (2014) Accelerated, Microwave-Assisted, and Conventional Solvent Extraction Methods Affect Anthocyanin Composition from Colored Grains, *Journal of Food Science*, **79**,138-146.

Anderson, O. M., Jordheim, M. (2006.) *The anthocyanins: Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications* (Anderson,O. M., Markham, K. R., ured.), CRC Press, Boca Raton, 472-551.

Anonymous 1,

https://www.google.hr/search?q=osnovna+struktura+fenolnih+spojeva&rlz=1C1CHWA_hrHR654HR654&espv=2&biw=1366&bih=599&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjpuLGD5ITOAhXFQBQKHba-DroQ_AUIBigB#imgrc=7yct1zIOnFltpM%3A, pristupljeno 29.lipnja 2016.

Anonymus 2,

https://www.google.hr/search?q=osnovna+struktura+fenolnih+spojeva&rlz=1C2CHWA_hrHR654HR654&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwif0cDn3oTOAhWMchQKHdPbAcAQ_AUIBigB#tbn=isch&q=osnovna+struktura+flavonoida&imgrc=k53ueg7a-iSIGM%3A , pristupljeno 29.lipnja 2016.

Anonymus 3,

https://www.google.hr/search?q=osnovna+struktura+fenolnih+spojeva&rlz=1C2CHWA_hrHR654HR654&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwif0cDn3oTOAhWMchQKHdPbAcAQ_AUIBigB#tbn=isch&q=ASE+Dionex&imgrc=moLHKwyBZ2Q3TM%3A, pristupljeno 02.srpnja 2016.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006.) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

- Bozan, B., Altinay, C. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci Techn Res*, **20** (2), 409-414.
- Bhise, S., Kaur, A., Gandhi, N., Gupta, R. (2014) Antioxidant property and health benefits of grape by products, *Journal of Postharvest Technology*. **2**, 1-11.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grapemarc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem*. **66**, 209-215.
- Brahim, M., Gambier, F., Brosse, N. (2014) Optimization of polyphenols extraction from grape residues in watermedium. *Industrial Crops and Products* **52**, 18– 22.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietarysources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Campos, L.M.A.S.; Leimann, F.V.; Pedrosa, R.C.; Ferreira, S.R.S. (2008) Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitisvinifera*). *Bioresour. Technol.* **99**, 8413–8413.
- Chuang, Yingjie Zhanga, Wei Zhanga, Boyda S.A, HuiLia, (2015) Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables, *Journal of Chromatography A*, 1404 ,1– 9.
- Clifford, M. N. (2000.) Anthocyanins-nature, occurrence and dietaryburden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1063-1072.
- Corrales, M., García, A.F., Butz, P., Tauscher, B. (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins as sisted by high hydrostatic pressure. *J. Food Eng.* **90**, 415–421.
- Dai, J. I Mumper, R. J. (2010) Plantphenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules*. **15**, 7313-7353.
- El Gengaihi, S., Aboul Ella, F.M., Emad, M.H., Emad, S., Doha, H. (2014) Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. *J. Food Process. Technol.* **5**, 296-300. doi:10.4172/2157-7110.1000296.
- Erdman, J.W. Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G.,

Burrowes, J. (2007) Flavonoids and hearthealth: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31- June 1, 2005, Washington, DC. *J. Nutr.* **137**, 718S-737S.

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistic Division, < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Pristupljeno 29. lipnja 2016.

Fontana, Antoniolli A., Bottini R., (2015) Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 8987–9003.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Phenolic-compound-extraction system from fruit and vegetable samples. *Molecules*. **15**, 8813-8826.

Gawel, R. (1998) Red wine astringency: A review. *Aust J. Grape Wine Res.* **4**, 73-95.

Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *Nutrients*, **6**, 391-415.

Hossain, Barry-Ryan C., Martin-Diana A.B, Brunton N.P, (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology, *Food Chem.*, **126**, 339–346.

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.

Iora, S.R.F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., da Silva, M.V., Pontes, P.V. de A., Haminiuk, C.W.I., Granato, D. (2014) Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food. Sci. Technol.* **50**(1), 62–69. doi:10.1111/ijfs.12583.

Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.

Jentzer, Alignan M., Garcia, Luc Rigal, Vilarem G., (2014) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertonileaves, *Food Chem.*, 561-567.

Kammerer, D.R., Carle, R. (2008) Process Strategies for the Recovery and Isolation of Phenolic Compounds from Winery By-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **7** (8), 3226-3230.

Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.*, **71**, 214–222.

Mohammad A. Mottaleb and Satyajit D. Sarker (2012), Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation, *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, **864**, 75-87.

Monrad, J.K., Suárez, M., Motilva, M.J., King, J.W., Srinivas, K., Howard, L.R. (2014) Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with modified expeller. *Food Res. Int.* **65**, 77-87.

Moreno-Arribas, M. V. i Polo, C. M. (2009) Wine chemistry and biochemistry, Springer, New York.

Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. (2013) Plant Flavonoids-Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses, *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 14950-14973.

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.

Prasad, K.M.N., Ismail, A., Shi, J., Jiang, Y.M. (2012) High Pressure-Assisted Extraction: Method, Technique, and Application. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 303-322.

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 By products. Optimization by Multi-Response Surface Methodology. *Food and Nutrition Sciences* **4**, 650-659.

Rajha, H.N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H.G., Maroun, R.G. (2014a) Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 18640-18658.

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

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.

Rostagno, M.A., Prado, J.M. (2013) *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. doi:10.1039/9781849737579-FP001.

Saha, S. Walia, A. Kundu, K. Sharma, Paul, (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Chem.*, 369-375.

Solana, Salgado J.M., J.M., Domínguez, Cortés-Diéguez S., (2014) Comparison of Soxhlet, Accelerated Solvent and Supercritical Fluid Extraction Techniques for Volatile (GC–MS and GC/FID) and Phenolic Compounds (HPLC–ESI/MS/MS) from Lamiaceae Species *Phytochem. Anal.*

Teixeira Barcia , P.B.P., Gómez-Alonso S., H.T.G., Hermosín-Gutiérrez I. (2014) Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena, *Food Chem.*, **159**, 95–105.

Tsao, R., McCallum, J. (2009.) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L.A., AlvarezParrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153.

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

Vastrano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., Zhou, Z., Rosen, R.T. (2000) Isolation and identification of stilbens in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 253-256.

Whale, W.J.K., Brown, I., Rotondo, D., Heys, D.S. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. U: Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors (Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B., ured.), Landes Bioscience, Austin, Texas.

Zaghdoudi, S. P., Framboisier X., M.A., R.K., Trabelsi M.A, Cherif J.K., Vanderesse R. , Frochot C., Guiavarc'h Y. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.), *Food Chem.*, **184**, 131–139.