

# Izolacija flavonoida metodom hladne plazme iz organskog otpada vina

---

**Horvatić, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:577363>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Kristina Horvatić**

6268/N

**IZOLACIJA FLAVONOIDA METODOM HLADNE PLAZME IZ**  
**ORGANSKOG OTPADA VINA**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Modul : Začinsko i aromatsko bilje**

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

**Zagreb, 2015**

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

## IZOLACIJA FAVONOIDA METODOM HLADNE PLAZME IZ ORGANSKOG OTPADNA VINA

Kristina Horvatić , 6268/N

**Sažetak:** *Zbog visokog sadržaja fenolnih spojeva grožđe kao i komina koja zaostaje nakon proizvodnje vina je visoko vrijedna sirovina. Danas se sve više istražuju nove tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine kako se ne bi tretirala kao otpad već kao nusprodukt koji možemo iskoristiti za izolaciju biološki aktivnih spojeva. Jedna od najnovijih tehnika ekstrakcije je tretman s hladnom plazmom. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj polarnosti otapala (10, 30 i 50 %), frekvencija (60 i 120 Hz) i vremena ekstrakcije (5 i 10 minuta) na izolaciju flavonoida iz liofilizirane pokožice komine grožđa. Najbolja ekstrakcija ostvarena je uz primjenu 50 % vodene otopine etanola, dok vrijeme i frkvencija nisu značajnije utjecali na izolaciju ovih spojeva.*

**Ključne riječi:** *komina, liofizirana pokožica grožđa, hladna plazma, flavonoidi*

**Rad sadrži:** 21 stranica, 8 slika, 6 tablica, 32 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** *hrvatski*

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

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

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

**Rad predan:** rujana, 2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Nutrition  
Department of Food Engineering  
Laboratory for processes of preservation and processing of fruit and vegetables

### ISOLATION OF FLAVONOIDS WITH METHOD COLD PLASMA FROM ORGANIC WINE WASTE

*Kristina Horvatić* , 6268/N

**Abstract:** *Vine culture is widespread around the world with the longest tradition and history, the great social, economic and environmental importance. Due to its high content of phenolic compounds is highly valuable raw material also grape stalks and marc that is remaining after wine production. Today, increasingly exploring new techniques of extraction of phenolic compounds from the grape skins that were not treated as waste but as a by-product that can be used for isolation of biologically active compounds. One of the latest techniques of extraction is the treatment with cold plasma whose parameters extraction (duration, frequency and polarity solvents) monitored in this study on a sample of freeze-dried the skins of grapes. The results of this work confirmed that the more polar solvent ethanol extracted a higher amount of flavonoids, as far as the parameters of the duration and frequency of the extraction is needed further research to determine which of these parameters affect to extraction of flavonoids.*

**Keywords:** *grape vine, grape skins, cold plasma, flavonoids*

**Thesis contains:** 21 pages, 8 figures, 6 tables, 32 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*, Scientific Assistant, *PhD Predrag Putnik*

**Thesis delivered:** September, 2015



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

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1 VINOVA LOZA .....	2
2.2 MERLOT CRNI .....	2
2.3 KOMINA .....	3
2.3.1 <i>Pokožica grožđa</i> .....	3
2.4 KEMIJSKI SASTAV KOMINE .....	4
2.5 FENOLNI SASTAV KOMINE .....	5
2.5.1. <i>Flavonoidi komine</i> .....	7
2.6. PLAZMA .....	8
2.6.1 <i>Hladna plazma</i> .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIJAL .....	11
3.1.1. <i>Priprema uzorka</i> .....	11
3.1.2. <i>Otapala i reagensi</i> .....	12
3.1.3. <i>Aparatura</i> .....	12
3.1.4. <i>Pribor</i> .....	12
3.2 METODE .....	13
3.2.1 <i>Postupak ekstrakcije</i> .....	13
3.2.2 <i>Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida</i> .....	15
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>18</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>19</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>20</b>

## 1. UVOD

Osim bogate povijesti vinova loza danas ima velik gospodarski i ekonomski značaj. Znanstvena istraživanja pokazuju da vino, naročito crno, sadrži sastojke koji mogu pozitivno djelovati na naše zdravlje. Najodgovorniji sastojci za takvo djelovanje su fenolni spojevi i smatra se da štite srce, krvne žile i imunološki sustav te imaju mogući pozitivan učinak na prevenciju nekih kroničnih bolesti i to na način da štite stanice od oksidacijskog oštećenja i omogućuju popravak oštećenih struktura. Široka proizvodnja vina diljem svijeta daje nusprodukt kominu koja se često tretira kao otpad i štetno utječe na ekosustav, no u novije vrijeme otkrivene su različite metode primjene komine kao dio stočne hrane, komposta, biogoriva ili hrane. Također se ispituju različite metode izolacije fenolnih spojeva iz komine te pronalazjenje optimalnih uvjeta izolacije.

S obzirom na visoku osjetljivost fenolnih spojeva na povišene temperature, metode ekstrakcije koje izbjegavaju primjenu visokih temperatura, a istovremeno omogućuju jednak ili viši prinos u odnosu na klasičnu metodu primjenom drugih tehnologija, postaju sve češćom temom brojnih istraživanja. Uz konvencionalne metode sve više se za izolaciju fenolnih spojeva primjenjuju i nove metode ekstrakcije kao što su: ekstrakcija superkričnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, mikrovalovima, ubrzana ekstrakcija otapalima i kao jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija pomoću hladne plazme (Teixeira i sur., 2013).

Brojne su prednosti ovih metoda poput brzine, selektivnosti, ekološke prihvatljivosti, upotrebe manjih količina otapala, većeg prinosa od klasične ekstrakcije, i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije, što ih svrstava među metode pogodne za ekstrakciju termički osjetljivih spojeva kao što su polifenoli.

Međutim, navedene metode vrlo često zahtijevaju veće financijske izdatke (Bhattacharya, 2015; Ghafoor i sur., 2011; Ignat i sur., 2011; Rajha i sur., 2014; Tappi i sur., 2014; Vilku i sur., 2007).

Stoga je cilj ovog rada bio odrediti utjecaj hladne plazme na ekstrakciju flavonoida iz liofilizirane pokožice komine grožđa ovisno o uvjetima ekstrakcije: polarnosti otapala (10, 30 i 50 %), frekvencije (60 i 120 Hz) i vrijeme trajanja ekstrakcije (5 i 10 minuta).

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1 Vinova loza**

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) je biljka iz porodice *Vitaceae* koja je najraširenija voćna vrsta u svijetu čija proizvodnja nadmašuje sve ostale i ima važan gospodarski značaj. Godišnja proizvodnja grožđa u 2012. godini u svijetu je dosegla 77 milijuna tona (Schieber i sur.2001) od kojih 181 096 tona proizvodi Hrvatska. U svijetu postoji oko 8000 vrsta grožđa (botanički identificiranih), od toga je nešto više od 1000 namijenjeno proizvodnji vina. U Hrvatskoj postoji oko 130 autohtonih sorti vinove loze.

Plod grožđe dozrijeva od srpnja do listopada ovisno o sorti i podneblju gdje raste a može se koristiti svjež, sušen te prerađen u voćne sokove ili vino. Za proizvodnju vina koristi se 80 % usjeva vinove loze, 13 % otpada na konzumaciju u svježem obliku, dok se preostalih 7 % grožđa se prerađuje u voćne sokove ili suhe groždice (El Gengaihi i sur.,2013; Shahidi i Naczk, 2004).

### **2.2 Merlot crni**

Merlot je sorta crnog grožđa podrijetlom iz Francuske nastala spontanom križanjem sorti Savignona Bijelog i Cabernet Franc-a. Značajke koje su pridonijele da se ova sorta proširi po cijelom vinogradarskom svijetu su te da se podjednako uspješno uzgaja u sjevernim i južnim vinorodnim područjima, otporna je na zimsko smrzavanje i gljivične infekcije ,jakog je vegetativnog potencijala i vrlo je rodna.

Kod nas se kultivira u cijeloj Primorskoj Hrvatskoj i u četiri podregije Kontinentalne Hrvatske (Podunavlje, Slavonija, Pokuplje, Prigorje – Bilogora) a najviše u Istri. Vina sorte Merlot bogata su alkoholom (obično oko 12,5% vol.) i ukupnim kiselinama (oko 6,5 g/l), rubincrvene su boje, ugodne arome i bouquetta voćne note. Svrstavaju se u red najkvalitetnijih crnih vina svijeta i kao takva su veoma cijenjena i tražena na tržištima vina.





Slika 1. Grožđe sorte Merlot (izvor : Annonimus 1 )

## **2.3 Komina**

Nakon berbe grožđa za proizvodnju vina ono se procesom ruljanja i muljanja prerađuje da bi se dobio groždani masulj. Groždani masulj odnosno zgnječeno grožđe sadrži krutu fazu 20 % (pokožicu, peteljke, sjemenke) i tekuću 80 % (groždani sok). Kod proizvodnje crnog vina prešanjem masulja dobiva se komina koja zajedno sa grožđanim sokom prolazi proces fermentacije i maceracije. Komina je jeftin izvor ekstrahibilnih i antiradikalnih fenola koji se mogu koristiti za konzerviranje hrane ili kao dodaci prehrani u svrhu prevencije bolesti (Pinelo i sur.,2004). Tretiranje komine kao otpada je najčešće to potvrđuje podatak gdje se godišnje u svijetu proizvede 3,4 milijuna tona komine otpada. Ta činjenica predstavlja globalni problem koji se reflektira istodobno na ekološke nedostatke i ekonomske gubitke. Zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva njezino odlaganje unutar tla uzrokovati će veliku potrošnju kisika i podzemnih voda što se loše odražava na okolni biološki svijet a s druge strane zbog tih svojstava predstavlja visoko vrijednu sirovinu za ekstrakciju istih široke primjene u različitim granama industrije.

### **2.3.1 Pokožica grožđa**

Pokožica predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji od 6 – 10 slojeva stanica koje su na vanjskom dijelu manje a prema unutrašnjosti veće s vrlo tankim pregradama.

Zahvaljujući elastičnosti staničnih stijenki u toku porasta i sazrijevanja bobice kožica povećava svoj volumen isto tako vrlo lako puca.

Tablica 2. Kemijski sastav pokožice (Radovanović, Tehnologija vina, 1986)

<b>SASTOJAK</b>	<b>%</b>
Voda	53 - 82
Pentozе i pentozani	1 – 1,2
Heksoze	malo
Saharoza	/
Škrob	/
Celuloza	3,5
Pektin, smole i sluzi	0,9
Kiseline	0,13 – 0,67
Tanini	0,01 – 2,3
Tvari boje	1,0 – 15,4
Fermenti	malo
Vitamini	malo
Dušični spojevi	0,8 – 1,9
Masti	1,5
Pepeo	1,7 – 2,0

## 2.4 Kemijski sastav komine

Kemijski sastav komine je vrlo složen i ovisan o sorti, ekološkim faktorima, agrotehničkim mjerama, stupnju zrelosti, itd.. Značajne razlike u kemijskom sastavu prisutne su između različitih dijelova komine.

Tablica 1. Dijelovi grožđa u masenim postocima (Yair Margalit , 1997)

<b>MASENI UDJELI DIJELOVA GROŽĐA U %</b>		
	<b>RASPON %</b>	<b>PROSJEK %</b>
<b>SOK</b>	70 – 80	75
<b>POKOŽICA</b>	10 – 20	16
<b>PETELJKA</b>	2 – 6	5
<b>SJEMENKA</b>	0 – 5	4

## 2.5 Fenolni sastav komine

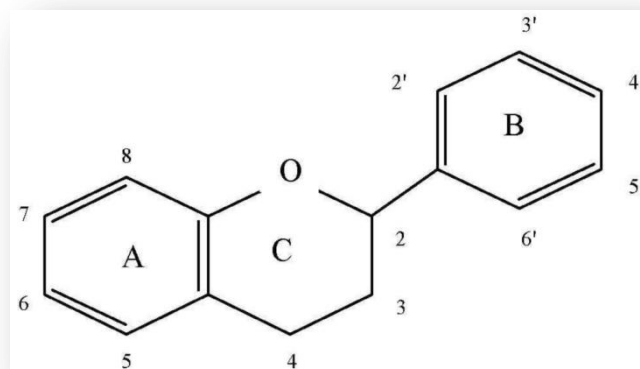
Do danas je poznato više od 8 000 polifenolnih spojeva u različitim biljnim izvorima, voću, povrću, svim vrstama začinskog i aromatskog bilja itd.. Fenolni spojevi su nosioci senzorskih karakteristika (boja, okus, gorčina, trpkost ) vina i brojnih drugih funkcija u biljnom tkivu: zaštita od UV zračenja, pigmentacija, obrana od nametnika, privlačenje oprašivača, raspršivanje sjemena i dr.

Proces maceracije omogućuje prijelaz fenolnih spojeva iz komine u mošt međutim dio ipak ostaje vezan za staničnu stijenku i zaostaje u komini koji čini 4 % ukupne suhe tvari komine .

Tablica 4. Raspodjela ekstratibilnih polifenola u svježem grožđu (Chedea i sur., 2011; Sagdic i sur., 2011)

<b>DIO BOBICE GROŽĐA</b>	<b>% EKSTRATIBILNIH POLIFENOLA U SVJEŽEM GROŽĐU</b>
<b>PULPA</b>	10
<b>POKOŽICA</b>	28 - 35
<b>SJEMENKA</b>	60 - 70

Glavne fenolne komponente komine su antocijani, flavonoli i njihovi glikozidi (kvercetin, kampferol, miricetin i rutin), katehin i epikatehin te njihovi esteri, oligomerni procijanidini, stilbeni (resveratrol) i fenolne kiseline (galna, elaginska, kafeinska, ferulinska, i kumarinska kiselina te ester klorogenske kiseline) (Lacopini i sur., 2008; Lafka i sur., 2007; Lu i Foo, 1999; Rajha i sur., 2013, Rajha i sur., 2014a).



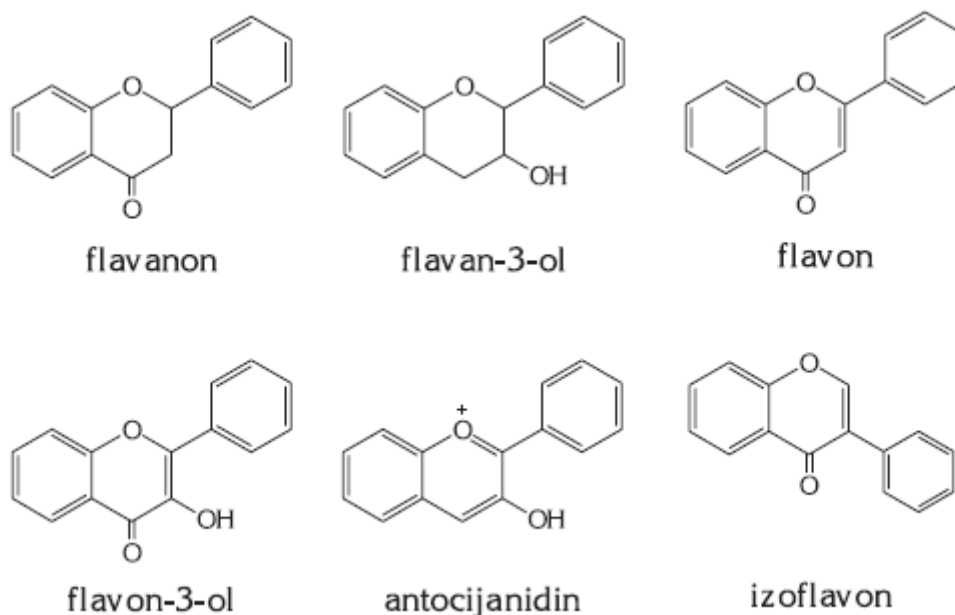
Slika 2. Opća struktura polifenolnih spojeva (izvor : Annonimus 2)

Osnovnu kemijsku strukturu fenolnih spojeva (Slika 2) čine 2 aromatska prstena povezanih pomoću 3 atoma ugljika, tako tvoreći treći prsten C na koje može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina koje mogu biti metoksilirane i glikozidirane s monosaharidima, oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine, te imaju veliku sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004; Ignat i sur., 2011). Fenolni spojevi se prije svega odlikuju svojim antioksidacijskim djelovanjem koje ima omogućuje njihova aromatska struktura omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona, a time inaktivaciju slobodnih radikala. Slobodni radikali su molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona, što ih čini vrlo reaktivnim vrstama. Oni nastaju prilikom uobičajenih biokemijskih procesa u tijelu, kao što je dobivanje energije, ali i kao rezultat povećanoga izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobioticima (Kazazić, 2004). Slobodni radikali dovode do oštećenja tkiva, a uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti kao što su astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakta, dijabetes, gastrointestinalne upalne bolesti, bolesti jetre, makularna degeneracija, periodontalne bolesti i drugi upalni procesi (Iacopini i sur., 2008; Kazazić,

2004; Lafka i sur., 2007). Također, pridonose starenju stanica, mutagenezi, karcinogenezi i koronarnim bolestima srca putem destabilizacije membrana, oštećenja DNA i oksidacije lipoproteina (Bonilla i sur., 1999; El Gengaihi i sur., 2013; Ghafoor i sur., 2011; Lu i Foo, 1999, Yilmaz i Toledo, 2006). Osim antioksidacijske aktivnosti, fenolni spojevi imaju antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje (Kazazić, 2004; Rajha i sur., 2013)

### 2.5.1. Flavonoidi komine

Flavonoidi su fenolni spojevi koji se međusobno razlikuju prema oksidaciji piranskog prstena u tu skupinu spadaju flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, te antocijani (Slika 3). Flavonoidi se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Naravno da i velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a došavši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića.



Slika 3. Osnovna struktura i skupine flavonoida ( izvor : Kazazić,2009)

Flavonoli koji se sintetiziraju u biljci su najčešće kampferol, kvercetin, mircetin i metilirani oblici te oni čine jednu trećinu fenolnih spojeva pokožice grožđa (Shahidi i Naczk 2004). Formiranje glikozida flavona i flavonola ovisi o prisutnosti svjetla. Oni su odgovorni za zaštitu biljke od UV svjetla zbog čega se uglavnom nalaze u lišću i pokožici biljaka, a značajne koncentracije pronađene su i u pulpi, dok se u podzemnim dijelovima biljke nalaze samo u tragovima (Riedel i sur., 2012; Shahidi i Naczk 2004). Izoflavone nalazimo u biljkama prisutne kao glikozide a najzastupljeniji su genistein, daidzin te glicitin (Ignat i sur., 2011). Flavanoni su u većim koncentracijama prisutni jedino u citrusima kao na primjer naringenin u grejpu, hesperetin u naranči te eriodictiol u limunu. flavan-3-oli, se u pokožici grožđa javljaju u monomernoj (katehini), oligomernoj i polimernoj (procijanidini) strukturi odnosno kao kondenzirani tanini koji mogu biti sastavljeni od čak 17 jedinica flavan-3-ola u jednoj molekuli. Pet najznačajnijih flavan-3-ola u grožđu su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin i katehin-3-O-galat. Procijanidini su glavni nosioni gorčine i astrigentnosti crnih vina (He i sur., 2008). Antocijanidini su osnovne strukture antocijana bez vezanih šećera (aglikoni), a u prirodi se najčešće javljaju pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. Razlike među njima su u broju i poziciji CH<sub>3</sub>O- i OH-skupina u prstenu B. Antocijani su glikozidi antocijanidina te se u takvoj formi uglavnom nalaze u biljkama i najbolje apsorbiraju, međutim aglikoni su snažniji antioksidansi od odgovarajućih glikozida (Kazazić, 2004). U uzorcima komine antocijani predstavljaju najzastupljeniju skupinu fenolnih spojeva (Kammerer i Carle, 2008).

Količine antocijana u komini crnih sorta grožđa kreću se od 287 do 4527 mg u 100 g metanolnog ekstrakta, dok su vrijednosti za flavonole od 104 do 464 mg u 100 g istog ekstrakta. Katehin se u sjemenkama različitih sorti grožđa nalazi u udjelima od 24,12 do 117 mg na 100 g suhog ekstrakta, dok najviša zabilježena vrijednost za epikatehin iznosi 47,50 mg (Rockenbach i sur., 2011; Ruberto i sur., 2007).

## **2.6. Plazma**

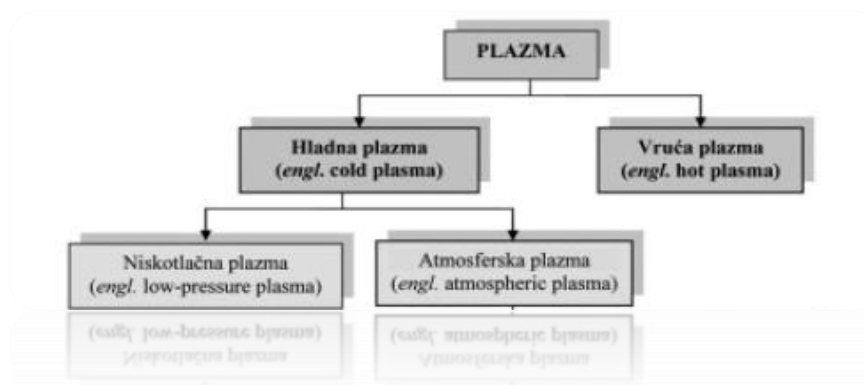
Plazma je ionizirani ili djelomično ionizirani plin najvećim dijelom sastavljena od električki nabijenih i neutralnih čestica. Smatra se četvrtim agregatnim stanjem zbog različitih svojstava u odnosu na krutine, tekućine i plinove i u suštini je neutralna, nema određeni oblik, niti volumen baš kao plin, dobar je vodič električne struje i snažno reagira na električno i

magnetsko polje. Na Zemlji je ima vrlo malo dok je u Svemiru najrasprostranjeniji oblik vidljive materije, odnosno 99% tvari u svemiru plazma (Sunce, zvijezde, Zemljin omotač itd.). Prirodnu plazmu nije moguće iskoristiti pa se za potrebe istraživanja, primjene ili industrije mora proizvesti. Da bi došlo do nastajanja plazme potrebno je raditi električno izbijanje pri čemu se osnovno sudaranje među elektronima može opisati reakcijama prikazanim u tablici 5.

Tablica 5 : Reakcije nastajanja plazme

<b>Ekscitacija:</b>	$A + e \rightarrow A^* + e$
<b>Ionizacija:</b>	$A + e \rightarrow A^+ + 2e$
<b>Disocijacija:</b>	$M + e \rightarrow M \cdot + \cdot M' + e$
<b>Disocijativna ionizacija:</b>	$M + e \rightarrow M \cdot + \cdot M'^+ + 2e$ $M + e \rightarrow M \cdot + \cdot M'$
<b>Rekombinacija:</b>	$M^+ + e + S \rightarrow M + S$
<b>Disocijativna rekombinacija:</b>	$M^+ + e \rightarrow M \cdot + \cdot M'$
<b>Rekombinacija kao posljedica zračenja fotona:</b>	$A^+ + e \rightarrow A + h\nu$

Oblici i vrste plazme su brojni te se mogu klasificirati prema više kriterija (Slika 5), najčešće temperaturi i tlaku neutralnog plina u kojem se kreću ionizirane čestice.



Slika 5. Temeljna klasifikacija plazme (Ražić i Čunko , 2009)

Nedvojbeno je da je plazma aktualna tema istraživačkih radova i da sve više radi na njenoj primjeni u različitim područjima kao medicina, metalurgija, elektronika, industrija plastike i tekstila, prehrambenoj industriji i drugo.

### **2.6.1 Hladna plazma**

Umjetno stvorene plazme ili „tehnološke plazme,, su uglavnom hladne plazme. Tople plazme su potpuno ionizirane dok kod hladne plazme samo je 1 % ioniziran čiji elektroni imaju temperaturu od nekoliko tisuća °C, neionizirani dio je sobne temperature.

Hladna plazma nastaje na načina da se uvodi koncentrirana električna energija u plin čiji se atomi rastave na ione i elektrone. Zadnjih nekoliko godina istražuje se primjena hladne plazme na organske tekućine zbog njihove praktične aplikacije u biologiji, kemiji i elektrokemiji. Posebna pozornost je usmjerena prema njenoj primjeni u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz različitih biljnih materijala, zbog toga što uzrokuje fragmentaciju biljnog materijala u otapalu i olakšava sam proces ekstrakcije.

Fernández i sur. (2012) su pokazali da CAP (Cold atmospheric gas plasma treatment) ima potencijal u primjeni dekontaminacije hrane i zamjeni nekih tradicionalnih metoda, ali potrebna su još mnoga istraživanja poput mogućnosti nastajanja štetnih nusproizvoda, te senzorskih svojstava tako tretirane hrane.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJAL

##### 3.1.1. Priprema uzorka

U suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska) nakon prešanja grožđa sorte Merlot izuzet je uzorak komine korišten za istraživanje. Kompletna masa komine podvrgnuta je procesu liofilizacije te je zatim pakirana u polipropilenske vrećice po cca. 500 g, hermetički zatvorene i skladištene na -18 °C do provođenja analize. Netom prije izvođenja analize liofilizirana komina (Slika 6) je odmrznuta te ručno razdijeljena na pokožicu, sjemenke i dijelove peteljke. Za potrebe istraživanja koristi se samo pokožica koja je prethodno samljevena u prah pomoću mlinca za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1). U plastičnim lađicama izvaže se 12 uzoraka po približno 1 g na analitičkoj vazi (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) te se prebace u prethodno pripremljene listiće aluminijske folije, zapakiraju i označe brojevima od 1 do 12. Uzorci priređeni na opisani način korišteni su za provođenje ekstrakcije flavonoida.



Slika 6. Liofilizirana komina

### 3.1.2. Otapala i reagensi

- Etanol, 96 % (T.T.T d.o.o, Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol 10, 30, 50 % (v/v)
- Aluminijski klorid 10% -tni
- Kalijev acetat 1 M
- Standard kvercetin (100 mg/L)

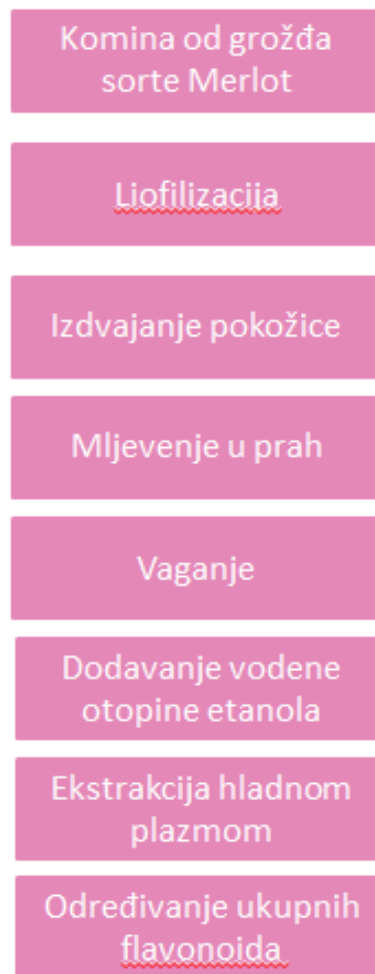
### 3.1.3. Aparatura

- Pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Analitička vaga (Kern ABT 220-4M)
- Tehnička vaga Mettler (točnost  $\pm 0,01$  g)
- Liofilizator (CoolSafe, Model :55-9 PRO)
- Uređaj za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1, Italija)
- Centrifuga (Hettich, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka)

### 3.1.4. Pribor

- Odmjerne tikvice volumena 10 mL, 50 mL i 100 ml
- Stakleni lijevak
- Menzure 50 i 100 ml
- Pipeta 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml
- Plastična ladica za vaganje
- Staklene epruvete , stalak za epruvete
- Falkonice volumena 50 ml
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100  $\mu$ L, 250  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L)

## 3.2 METODE



Slika 7. Shematski prikaz provedbe istraživanja

### 3.2.1 Postupak ekstrakcije

Ekstrakcija flavonoida provodi se primjenom hladne plazme uz upotrebu 10%, 30% ili 50 % vodene otopine etanola, pri različitim vremenima 5 ili 10 minuta i različitoj frekvenciji 60 ili 120 MHz, prema planu eksperimenta prikazanom na Tablici 5. Tijekom eksperimenta izlazni napon je bio 20 kV s kondenzatorom kapaciteta 0,75nF. Napon je mjeran naponskom sondom Tektronix P6015A spojenim na osciloskop Hantek DS05202BM.

Reaktor je bio volumena 300 mL, s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Eksperimenti su provedeni u šaržno pri različitim vremenima tretmana. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s

igličnom visokonaponskom elektrodom (igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3, 81 cm), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm. Kroz igličnu elektrodu upuhivan je zrak koji je omogućio miješanje uzorka, te samo pražnjenje u mjehurićima upuhivanog zraka. Postupak ekstrakcije se provodi na način da se u reaktor stavi odvagani uzorak i 40mL otapala, reaktor se namjesti i provede ekstrakcija pri određenom vremeni i frekvenciji. Nakon toga se pažljivo sav sadržaj reaktora kvantitativno prenese preko lijevka u odmjerne tikvice od 50 ml i nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju. Potom se uzorci prebace u falkonice volumena 50 mL i centrifugiraju 10 min pri 5500 rmp (Hettich, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka). Nakon centrifugiranja, uzorci se dekantiraju u nove falkonice istog volumena i skladište na -18 °C do daljnje analize.



Slika 8. Reaktor ekstraktora tijekom postupka ekstrakcije hladnom plazmom

Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije flavonoida primjenom hladne plazme

Paralela uzorka	Polarnost otapala	Vrijeme	Frekvencija plazme
	%	min	Hz
1	30	5	60
1	30	5	120
1	30	10	60
1	30	10	120
1	50	5	60
1	50	5	120
1	50	10	60
1	50	10	120
1	70	5	60
1	70	5	120
1	70	10	60
1	70	10	120

### 3.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

#### *Princip metode*

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanololnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode (Chang i sur., 2002). Flavonoidi u uzorku dodatkom aluminijevog klorida i kalijeveg acetata stvaraju obojeni kompleks čiji nastali intenzitet obojenja mjerimo pri 415 nm. Dobivene apsorbancije su proporcionalne koncentraciji flavonoida.

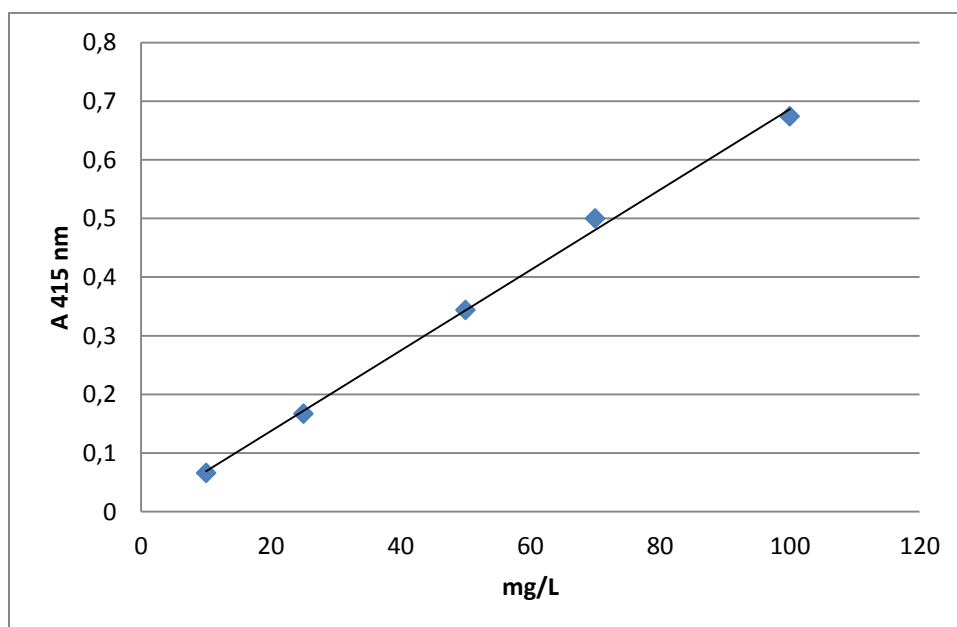
#### *Postupak određivanja*

U svaku epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 % -tnog etanola, 0,1 mL 10 % -tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1M kalijeveg acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi u slijepa proba samo se umjesto uzorka doda isti volumen destilirane

vode. Reakcijska smjesa ostavi se 30 minuta na sobnoj temperaturi da odstoji, nakon čega joj se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm.

### *Izrada baždarnog pravca*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od ove otopine pripreme se sljedeća razrijeđenja: 10, 25, 50, 75 mg po 100 mL na način da se otpipetira redom : 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvotne otopine standarda u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopune 96 % -tnim etanolom do oznake. Za analizu uzima se i standardna otopina kvercetina 100 mg/mL. U svaku epruvetu otpipetiramo 0,5 mL otopine standarda , 1,5 mL 96 % -tnog etanola, 0,1 mL 10% -tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijeveg acetat i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi slijepa proba samo što se umjesto otopine standarda dodaje 0,5 mL 96 % -tni etanol a umjesto 10 % aluminijevog klorida dodaje 0,1 mL destilirane vode. Takva smjesa odstoji 30 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega se se mjeri apsorbancija pri 415 nm. Iz izmjerenih apsorbancija standarda nacrtat se baždarni pravac (Slika 7) i prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna koncentracija ukupnih flavonoida.



Slika 7. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih podataka jednadžba pravca glasi  $Y=0,0069 \times X + 0,0002$  gdje je :

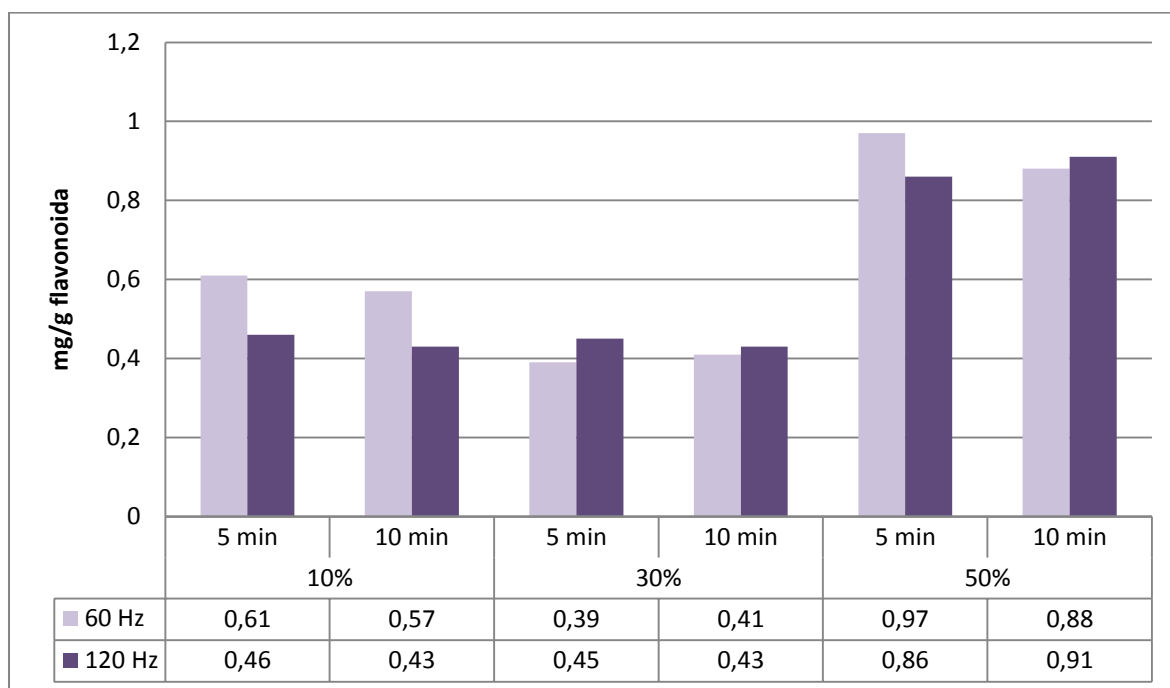
Y- apsorbancija pri 415 nm

X-masena koncentracija kvercetina mg/L

0,0002 odsječak na osi ordinata (Y)

#### 4. REZULTATI

Rezultati utjecaja odabranih parametara poput polarnosti otapala ekstrakcije, vremena trajanja ekstrakcije i frekvencije korištene pri ekstrakciji hladne plazme na koncentraciju ukupnih flavonoida prikazani su grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja (Slika 8).



Slika 8. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (mg/g) u liofiliziranoj pokožici komine grožđa sorte Merlot

## 5. RASPRAVA

Ekstrakcija visokim-voltažnim električnim pražnjenjem može povećati prinos i kvalitetu biljnih ekstrakata, a istovremeno smanjiti vrijeme i temperaturu postupka ekstrakcije (Boussetta & Vorobiev, 2014;. Cholet i sur,2014; Donsi, Ferrari, i Pataro 2010; Knorr i sur, 2011.; Luengo,Alvarez & Raso, 2013; Martin-Belloso & Soliva-Fortuny, 2011; Vorobiev& Lebovka, 2006).

### *Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju flavonoida*

Prema grafu prikazom na slici 8. uočljivo je da povećanjem udjela etanola u otapalu s 10%(v/v) na 30% (v/v) pa na 50% (v/v) povećava se količina flavonoida, te su najveći maseni udjeli određeni u ekstraktima dobivenim s 50% etanolom. Ovaj trend su potvrdili i Prasad i sur. (2009) prema čijem istraživanju porast udjela etanola s 25% (v/v) na 50% (v/v) utječe na bolju ekstrakciju i povećanje koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva. Rezultati El Gengaihi i sur. (2014) pokazuju kako pri klasičnoj ekstrakciji iz pokožice grožđa 80%-tni etanol (v/v) daje bolji prinos ukupnih fenola u odnosu na 50%-tni (v/v), kao i najvišu antioksidacijsku aktivnost. Veći udio etanola u otapalu doveo je do većeg prinosa antocijana i u istraživanju Lapornik i sur. (2005).

### *Utjecaj vremena tretiranja na ukupnu koncentraciju flavonoida*

Vrijeme tretiranja hladnom plazmom u trajanju 5 i 10 minuta nije značajno utjecalo na masene udjele flavonoida. Pri oba vremena određene su podjednake vrijednosti. Prilikom klasične metode ekstrakcije, rezultati vezani za utjecaj vremena na prinos ekstrakcije su kontradiktorni. Dok Spigno i De Faveri (2007) ne nalaze značajnu razliku između koncentracije antioksidanata u ekstraktu dobivenom tijekom ekstrakcije kroz 5 i 24 sata, Lapornik i sur. (2005) su ustanovili porast količine fenolnih spojeva u ekstraktu produljenjem ekstrakcije s 12 na 24 sata. Kod ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom došlo se do



zaključka da vrijeme trajanja ne utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva ( Resman i Šustić, 2015).

### *Utjecaj frekvencije na koncentraciju ukupnih flavonoida*

Prema slici 8. možemo vidjeti je jedina razlika u koncentraciji flavonoida pri 10% EtOH otapalu koja je nešto viša pri 60 Hz , na ostala otapala koncentracija je gotovo ista pri obje frekvencije.

## **6. ZAKLJUČAK**

Najveći maseni udjeli ukupnih flavonoida u ekstraktima dobivenim uz primjenu hladne plazme dobiveni su upotrebom 50%-tne vodene otopine etanola, dok vrijeme ekstrakcije i frekvencija nisu značajnije utjecali na učinkovitost postupka ekstrakcije.

## 7. LITERATURA

- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.***66**, 209-215.
- Cardona, J.A., Wysocki, A.F., Talcott, S.T. (2010) Economic Analysis of an Isolated Product Obtained from Muscadine Grape Pomace. *HortTechn.***20(1)**, 160-168.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. food drug anal.***10(3)**, 178-182.
- Chedea, V.S., Echim, C., Braicu, C., Andjelkovic, M., Verhe, R., Socaciu, C. (2011) Composition in Polyphenols and Stability of the Aqueous Grape Seed Extract from the Romanian Variety „Merlot Recas“. *J. Food Biochem.***35**, 92-108.
- 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 Proc. & Techn.* **5**, 296-300.
- El Gengaihi, S., Ella, F.M.A., Hassan, E.M., Shalaby, E.A., Baker, D.H.A. (2013) Phytochemical Investigation and Radical Scavenging Activity of Wastes of Some Grape Varieties Grown in Egypt. *Glob. J. Pharm.***7**, 465-473.
- Ercegović Ražić, S., Čunko, R., (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme, *Tekstil*, **58**,55-74.
- Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Choi, Y.H. (2011) Effects of grape (*Vitis Labrusca* B.) peel and seed extracts on Phenolics, Antioxidants and Anthocynins in Grape juice. *Pakistan J. Bot.* **43(3)**, 1581-1586.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. (2008) Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.* **21**, 589-598.
- Jackson, R. S. (2008) *Wine science*, 3. izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam / Boston, str. 353-399.
- Kammerer, D.R., Carle, R. (2008) Process Strategies for the Recovery and Isolation of Phenolic Compounds from Winery By-products. *Electron. J. of Env., Agric. Food Chem.* **7(8)**, 3226-3230.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290.

Lafka, T.I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **104**, 1206-1214.

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.

Lu, Y., Foo, Y. (1999) The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.***65**, 1-8.

M. Medić-Šarić, M. Bojić, V. Rastija, J. Cvek (2012) Polyphenolic Profiling of Croatian Propolis and Wine. *Food Technol. Biotechnol.***51(2)**, 159–170

M.ZORIČIĆ, (2009) *Kultura vina ,Bratovština hrvatskih vinskih vitezova*, Zagreb.

Mitić, M.N., Souquet, J.M., Obradović, M.V., Mitić, S.S. (2012) Phytochemical Profiles and Antioxidant Activities of Serbian Table and Wine Grapes. *Food Sci. Biotechn.* **21 (6)**.  
doi:10.1007/s10068-012

N. Boussetta, E. Vorobiev, L.H. Le , A. Cordin-Falcimaigne , J.-L. Lanoisellé (2011) Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Sci. Techn.***46**, 127-134

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

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

P. Iacopini, M. Baldi , P. Storchi , L. Sebastiani (2008) Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.* **21**, 589– 598

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**, 109-117.

Rajha, H.N., Louka, N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G. (2014a) Multiple Response Optimization of High Temperature, Low Time Aqueous

Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. *Food Nutrit. Sci.***5**, 351-360.

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

Resman B., Šuštić I., (2015) Rektorov rad, Ekstrakcija fenolnih spojeva iz organskog otpada pokožice grožđa sorte teran potpomognuta viskokim hidrostatskim tlakom, Zagreb.

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.

Shahidi, F., Naczki, M. (2004) Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press, London/New York/Washington D.C., str. 1-9; 146-152; 270-281.

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.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200–208.

Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., Rocculi, P. (2014) Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innov. Food Sci. Emer. Tech.***21**, 114–122

Vinogradarski atlas Hrvatske (2009), Zagreb.