

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

KARLA KELŠIN i ENA CEGLEDI

**Primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva
pokožice komine grožđa Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran**

Zagreb, 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.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod vodstvom prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.“

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	4
3. TEORIJSKI DIO	6
3.1. Komina grožđa-nusprodukt u proizvodnji vina	7
3.2. Polifenolni spojevi komine grožđa	8
3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva komine.....	13
3.3.1. Ekstrakcija primjenom mikrovalova	15
4. MATERIJAL I METODE	20
4.1. Materijal	21
4.1.1. Uzorci pokožice komine grožđa	21
4.1.2. Kemikalije.....	22
4.1.3. Aparatura i pribor.....	23
4.2. Metode.....	24
4.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova.....	24
4.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	26
4.2.3. Određivanje ukupnih tanina.....	27
4.2.4. Određivanje ukupnih antocijana	28
4.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....	29
4.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	31
4.2.7. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	33
5. REZULTATI	35
5.1. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih polifenola u pokožici komine grožđa	37
5.2. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih tanina u pokožici komine grožđa	38
5.3. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih antocijana u pokožici komine grožđa.....	39
5.4. Udio ukupnih polifenola, tanina, antocijana, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu pokožice komine grožđa.....	40
5.5. Udio slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice komine grožđa.....	41
6. RASPRAVA	43
6.1. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih polifenola u pokožici komine grožđa	44
6.2. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih tanina u pokožici komine grožđa.....	45
6.3. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih antocijana u pokožici komine grožđa	46

6.4. Udio ukupnih polifenola, tanina, antocijana, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu pokožice komine grožđa.....	47
6.5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta pokožice komine grožđa	49
6.6. Udio slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice komine grožđa	50
7. ZAKLJUČCI.....	52
8. ZAHVALE.....	55
9. POPIS LITERATURE	57
10. SAŽETAK	69
11. SUMMARY	71

1. UVOD

Komina grožđa je nusproizvod koji zaostaje nakon prešanja tijekom proizvodnje vina, a čine ju sjemenka, pokožica te dijelovi peteljki grožđa. Budući da komina čini oko 20 % ukupne mase prerađenog grožđa, smatra se da proizvodnja vina na godišnjoj svjetskoj razini generira prosječno 7-10 milijuna tona komine, što predstavlja znatnu količinu organskog otpada. Zbrinjavanje komine kao otpada, zbog negativnog učinka na okoliš, propisano je direktivama Europskog Vijeća koje propisuju njeno odlaganje na kontroliranim odlagalištima otpada, što proizvođačima stvara dodatne ekonomske izdatke. Istovremeno ovaj nusproizvod iznimno je bogat polifenolnim spojevima, što otvara mogućnost iskorištenja komine i stvaranja proizvoda dodane vrijednosti. Naime, tijekom prerade grožđa i proizvodnje vina čak 60-70 % bioaktivnih spojeva grožđa zaostaje u komini i ne prelazi u vino, što kominu čini bogatim, jeftinim i lako dostupnim izvorom bioaktivnih spojeva s primjenom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Radi toga suvremena znanstvena istraživanja usmjerena su na pronalazak inovativnih i kvalitetnih rješenja zbrinjavanja komine kao otpada, a odnose se na bržu i efikasniju izolaciju i ekstrakciju zaostalih visokovrijednih polifenolnih antioksidansa iz komine grožđa.

U izolaciji i ekstrakciji polifenolnih spojeva najširu primjenu imaju konvencionalne metode primjenom različitih organskih otapala, čiji je glavni nedostatak nedostatna efikasnost, dugotrajnost ekstrakcijskog procesa, kao i neekonomičnost uslijed korištenja velike količine otapala. Posljednjih godina u ekstrakciji polifenolnih spojeva sve širu primjenu imaju nove tehnologije ekstrakcije između kojih je značajna primjena mikrovalova. Preliminarna istraživanja pokazala su kako primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva može značajno pospješiti efikasnost i brzinu ekstrakcije, uz istovremeno manji utrošak otapala, primjenu blagih ekstrakcijskih uvjeta s mogućnošću kontrole temperature, a bez značajnog smanjivanja antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta (Spigno i De Faveri, 2009). Mogućnosti ove tehnologije nisu dovoljno istražene, a u znanstvenoj literaturi postoji malen broj znanstvenih istraživanja o mikrovalovima potpomognutoj ekstrakciji polifenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala, a posebice komine grožđa. Primjenom mikrovalova postoji mogućnost uzastopne ekstrakcije što također do sada nije istraženo.

Obzirom na vrijednost komine kao nusproizvoda bogatog antioksidansima, kao i nedovoljno istražen potencijal primjene mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih antioksidansa, u ovom radu istražiti će se mogućnosti primjene mikrovalovima potpomognute ekstrakcije, posebno u segmentu neistražene uzastopne ekstrakcije u ciklusima s ciljem utvrđivanja

polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je ispitati nedovoljno istražene mogućnosti ekstrakcije polifenolnih spojeva iz pokožice kome grožđa primjenom mikrovalova i po prvi puta definirati optimalan broj uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa kako bi se sama ekstrakcija polifenolnih spojeva provela u potpunosti.

Specifičan cilj ovog rada je primijeniti optimalan broj mikrovalovima potpomognutih uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa te ustvrditi sastav polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta pokožice kome sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran. Ovim istraživanjem po prvi puta dobit će se uvid u potencijal kome native sorte Teran obzirom na dvije najraširenije introducirane sorte Cabernet Sauvignon i Merlot.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. Komina grožđa-nusprodukt u proizvodnji vina

Proizvodnja grožđa na svjetskoj razini, prema podacima iz 2013. godine, iznosila je 77 181 122 tona (FAO, 2016). Statistički podaci pokazuju kako se oko 80 % proizvedenog grožđa koristi u proizvodnji vina i sokova (Mazza i Miniati, 1993), dok 20 % ukupne mase prerađenog grožđa zaostaje kao otpad, odnosno komina od proizvodnje vina, što iznosi oko 10 milijuna tona komine godišnje. Proizvodnja vina jedan je od važnijih poljoprivrednih sektora u Republici Hrvatskoj, a prema podacima Državnog zavoda za statistiku tijekom 2014. godine proizvedeno je približno 134 941 tona grožđa te 842 000 hL vina, što čini značajnu količinu od otprilike 27 000 tona organskog otpada u obliku komine.

Komina dobivena kao nusprodukt tijekom proizvodnje vina, zahtijeva propisno zbrinjavanje budući da kao organski otpad predstavlja velik rizik za okoliš. Naime, komina stajanjem razvija neugodne mirise, predstavlja mikrobiološki rizik, a time i opasnost od pojave i širenja različitih bolesti. Organske tvari koje se tijekom vremena izdvajaju iz komine, odlaze u tlo i uzrokuju smanjenje udjela kisika u tlu, povećavaju kiselost tla i mogućnost stvaranja metana te predstavljaju rizik od površinskog, kao i dubinskog zagađenja tla i podzemnih voda (Licul i Premužić, 1993; Fontana i sur., 2013). Europska komisija zbog ovih je razloga propisala stroge ekološke direktive prema kojima je na području Europske unije zabranjeno nekontrolirano odlaganje otpada koji ima više od 5 % organskog ugljika. Primjena tih propisa te postupci tretiranja i zbrinjavanja komine kao biootpada u Hrvatskoj obuhvaćeni su Zakonom o održivom gospodarenju otpadom Republike Hrvatske (Zakon o održivom gospodarenju otpadom NN 94/13). Takav otpad se mora odlagati na posebnim dijelovima odlagališta otpada, što predstavlja i dodatan trošak (Arvanitoyannis i sur., 2006). Nadalje, ograničenja vezana uz odlaganje biorazgradivog komunalnog otpada predviđaju smanjenje njegove količine na 35 % (od količine proizvedene 1997. godine) do kraja 2020. godine (čl.24, Zakon o održivom gospodarenju otpadom NN 94/13), zbog čega se danas sve više govori o metodama uporabe i iskorištenja otpada pa tako i komine. Posljednjih nekoliko godina stoga je predložen niz različitih metoda sanacije komine. Komina zaostala nakon proizvodnje vina tako se tradicionalno koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića u prvom redu komovice; kao organski otpad može biti korištena kao kruto gorivo za proizvodnju bioplina (Narobe i sur., 2014; Grlic i sur., 2014), a zbog značajnog udjela dušika i fosfora, čak i kao biognojivo (Arvanitoyannis i sur., 2006).

Nadalje, budući da komina predstavlja ekonomski značajnu sirovinu izuzetno bogatu bioaktivnim spojevima, jedan od sveprisutnijih načina iskorištenja ovog nusproizvoda također podrazumijeva ekstrakciju i izolaciju biokativnih spojeva iz krutih dijelova komine koju čine: sjemenke (38-52 %) (Ghafoor i sur., 2009), pokožica (45-65 %) te peteljke (1,4-7 %, ovisno o tehnologiji proizvodnje). Naime, navedeni spojevi nakon same izolacije i ekstrakcije iz krutih dijelova komine mogu se ponovo inkorporirati u hranu i na taj način osnažiti njenu nutritivnu vrijednost, očuvati stabilnost sastojaka i produljiti sveukupnu prihvatljivost proizvoda za potrošače (Garrido i Borges, 2013; Iora i sur., 2014). Među ostalima, jedan od primjera iskorištenja komine je i proizvodnja ulja sjemenke grožđa iz izdvojenih sjemenki komine.

Polifenolni spojevi najznačajniji su i najzastupljeniji bioaktivni spojevi komine grožđa zaostale tijekom proizvodnje vina, budući da se tijekom proizvodnje vina čak 60-70 % polifenolnih spojeva ne ekstrahira u vino, već zaostaje u komini (Negro i sur., 2003; Escarpa i Gonzalez, 1998; Garcia-Marino i sur., 2006; Pinelo i sur., 2006).

3.2. Polifenolni spojevi komine grožđa

U sastavu komine grožđa nalazimo brojne polifenolne spojeve u prvom redu flavonoide (antocijani, flavanoli i flavonoli) te u manjem udjelu neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te stilbene) (Rodriguez i sur., 2006). Njihov udio ovisit će o različitim čimbenicima kao što su: sorta grožđa, klimatski i agro-tehnički uvjeti, sastav tla te tehnologija proizvodnje vina (Mazza i sur., 1999).

Antocijani su polarni pigmenti smješteni u pokožici odgovorni za boju crnog grožđa, vina i komine (Di Lecce i sur., 2014). Struktura antocijana sastoji se od aglikona, odnosno antocijanidina na koje se mogu vezati šećeri ili organske kiseline (Konczak i Zhang, 2004; Mazza i Miniati, 1993; Monagas i sur., 2005). U sastavu grožđa, vina i komine prema broju i vrsti supstituiranih hidroksilnih i metilnih skupina razlikujemo 5 antocijanidina: delfinidin, cijanidin, peonidin, petunidin i malvidin. Relativno su nestabilni i lako oksidiraju. Pri nižim pH vrijednostima nalaze se u formi flavijevog kationa kada su crveno obojeni, dok su pri višim pH vrijednostima u kinoidalnoj formi plavo-ljubičaste boje (Garrido i Borges, 2013; Montealegre i sur., 2006). Osim pH, antocijani su osjetljivi na mnogo faktora koji mogu utjecati na njihovu stabilnost i boju, a to su temperatura, kemijska struktura, svjetlo, kisik, otapalo, prisutnost enzima, flavonoida, proteina te metalnih iona (Castaneda-Ovando i sur.,

2009). Prema istraživanjima, u komini i pokožici grožđa najzastupljeniji antocijani su malvidin-3-*O*-glukozid te peonidin-3-*O*-glukozid, dok su ostali prisutni u manjim koncentracijama (Amico i sur., 2004; Amico i sur., 2008; Ky i sur., 2014).

Tanini su polimeri flavan-3-ola velike molekulske mase. Najznačajnije monomerne jedinice u grožđu, vinu i komini su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin te (-)-epikatehin galat, a od ostalih flavanola najzastupljeniji su procijanidin dimeri B1, B2, B3 i B4 i procijanidin trimeri C1, C2 i C3 (Kennedy i sur., 2006; Conde i sur., 2007; Adams, 2006; Teixeira i sur., 2014). Nalaze su u hipodermalnom sloju pokožice, u većoj količini u vanjskom sloju sjemenke te peteljci grožđa koja se baš iz tog razloga često uklanja prije početka procesa proizvodnje vina (Kennedy i sur., 2006; Conde i sur., 2007; Castellarian i sur., 2012; Adams, 2006). Ovi spojevi nositelji su okusa gorčine i osjeta trpkocé (Santos-Buelga i Scalbert, 2000; Peleg i sur., 1999).

Flavonoli su flavonoidi, najvećim dijelom smješteni u pokožici grožđa, te manjim dijelom u sjemenci. U grožđu i komini nalazimo ih u obliku glukozida, galaktozida, ramnozida i glukuronida (Mattivi i sur., 2006). Glavni predstavnici ove skupine spojeva su mircetin, kvercetin, kampferol, sirigentini, izoramnetin i laricitrin. Flavonoli, posebice kvercetin i rutin glukozid, pokazuju veliki antioksidacijski kapacitet i to na način da štite lipoproteine niske gustoće od oksidacije (Frankel i sur., 1993; Meyer i sur., 1998; Yilmaz i Toledo, 2004). Uz to, kvercetin je jedna od bitnijih komponenti u biljci odgovorna za zaštitu od UV-svjetla (Braidot i sur., 2008). U komini grožđa prevladavaju derivati kvercetina, posebice kvercetin-3-*O*-glukuronid i kvercetin-3-*O*-glukozid (Bonilla i sur., 1999).

Hidroksibenzojeve i zastupljenije hidroksicimetne kiseline nalazimo u pokožici komine grožđa. Najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina u komini je galna kiselina, dok su najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u komini *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina, a najčešće se pojavljuju kao *trans* izomeri. Esterifikacijom ovih kiselina sa vinskom kiselinom dobivamo kutarinsku, kaftarinsku i fertarinsku kiselinu (Castellarin i sur., 2012).

Polifenolni spojevi prisutni u komini grožđa pokazali su se kao jaki antioksidansi, jači od vitamina C i E te karotenoida (Rice-Evans i sur., 1995; Rice-Evans i sur., 1996), te također, kao odlična alternativa biljnog podrijetla koja može zamijeniti popularne, sintetičke antioksidanse kao što su butilirani hidroksitoluen (BHT), butilirani hidroksianisol (BHA) i tercijarni butil hidrokinon, koji se najčešće koriste u proizvodnji hrane iako postoje naznake o njihovom toksičnom učinku na jetru te pospješivanju mutageneze (Wichi, 1988). Primarna

funkcija polifenolnih antioksidansa je neutralizacija i sprječavanje razvoja slobodnih radikala prije nego što oni napadnu stanice ili izazovu oksidativno oštećenje staničnih lipida, proteina, nukleinskih kiselina, enzima i ugljikohidrata (Halliwell, 1989; Evans i Halliwell, 2001; Fang i sur., 2002), na način da doniraju jedan elektron ili vodikov atom slobodnom radikalu, a da pri tome sami ne postanu nestabilni (Kinsella i sur., 1993). Osim antioksidativnog, polifenoli pokazuju antimikrobno, antiinflamatorno, antikancerogeno i druga pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje (Gonzales-Centeno i sur., 2012; Yilmaz i sur., 2011), kao što su modifikacija upalnih procesa (Castilla i sur., 2006), smanjena oksidacija LDL kolesterola (Sano i sur., 2007), inhibicija agregacije trombocita (Arts i Holmann, 2005) i drugo. Takav učinak potvrđuje i fenomen poznat pod nazivom „Francuski paradoks“ koji govori da umjerena konzumacija vina smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Scalbert i sur., 2005).

Pregled dosadašnjih istraživanja polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta komine (pokožica, sjemenka, cjelovita komina) bijelih i crnih sorti grožđa prikazan je u Tablicama 1 i 2. U sastavu bijeli sorti najviši udio polifenola prisutan je upravo u sjemenci komine (52,7 mg GAE/g s.tv.), dok se manji udio polifenola nalazi u pokožici (11,4-20,3 mg GAE/g s.tv.). Nadalje, u sastavu polifenola crnih sorti najviša koncentracija polifenola zabilježena je u cjelovitoj komini (30,1-142,4 mg GAE/g s.tv.), zatim u sjemenci komine (12,6-67,9 mg GAE/g s.tv.), a najmanje u pokožici komine crnog grožđa (5,6-31,6 mg GAE/g s.tv.). Udio tanina približno je podjednak i kod bijelih i kod crnih sorti grožđa. Prema dosadašnjim istraživanjima najveća količina ukupnih tanina pronađena je kod cjelovite komine bijelih sorti i iznosi 92,1 mg/g s.tv., a kod crnih sorti u sjemenci komine gdje doseže 84,9 mg/g s.tv.. Koncentracija antocijana u crnih sorti varira između 0,3-10 mg/g s.tv. u pokožici., te doseže udio od 20,9 mg/g s.tv. u cjelovitoj komini grožđa.

Također, dosadašnja istraživanja pokazala su kako je antioksidacijski kapacitet (mjeren ORAC, FRAP, DPPH i ABTS metodom) komine crnih sorti grožđa nešto veći od bijelih (Tablice 1 i 2). Najveći antioksidacijski kapacitet kod bijelih sorti pokazuje ekstrakt sjemenke koji mjeren ORAC metodom iznosi 637,8 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$, a ABTS metodom 594,2 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ S druge strane, antioksidacijski kapacitet crnih sorti određen ORAC i DPPH metodom, najveću vrijednost pokazuje u ekstraktima cjelovite komine (1054-2337 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$; 328,4-1120 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$), a ABTS i FRAP metodom u sjemenci komine grožđa (603,1 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$; 267,5 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$).

Tablica 1. Polifenolni sastav i antioksidacijski kapacitet komine (pokožica, sjemenka, cjelovita komina) bijelih sorti grožđa.

	Ukupni fenoli (mg GAE/g s. tv.)	Ukupni tanini/ flavan-3-oli** (mg/g s. tv.)	Antioksidacijski kapacitet (μ mol TE/g s. tv.)/ (μ mol AA/g s. tv.)*
Komina bijelog grožđa			
Pokožica komine			
<i>Sorta grožđa</i>			
Muller Thurgau ^a	11,4-15,8	10,5-19,4	11,4-25,6 (ABTS)*
Morio Muscat ^a	11,4-11,6	7,7-8,0	10,9-20,5 (ABTS)*
Chardonnay ^b	20,3		102,8 (ORAC)
Sjemenka komine			
<i>Sorta grožđa</i>			
Chardonnay ^b	52,7		637,8 (ORAC)
Cjelovita komina			
<i>Sorta grožđa</i>			
Chardonnay ^c	38,9	71,9	93,7 (ORAC); 92,4 (ABTS) 76,1 (FRAP)
Macabeu ^c	30,9	50,8	58,1 (ORAC); 71,6 (ABTS) 49,0 (FRAP)
Parellada ^{c,d}	31,1-46,5	7,7** -92,1	122,2 (ORAC) 134,0-594,2 (ABTS) 124,8 (FRAP)
Premisal Blanc ^c	36,4	73,2	62,8 (ORAC); 93,8 (ABTS) 68,3 (FRAP)
Sauvignon Blanc ^d	23,0	6,1**	538,5 (ABTS)
Zalema ^d	25,1	4,1**	567,7 (ABTS)
Pedro Ximénez ^d	7,1	3,3**	266,9 (ABTS)
Moscatel ^d	21,9	8,7**	314,2 (ABTS)
Baladí ^d	4,5	3,3**	286,2 (ABTS)
Montepila ^d	5,4	3,1**	296,6 (ABTS)
Arién ^d	11,5	5,68**	253,0 (ABTS)
Verdejo ^d	12,8	3,6**	225,0 (ABTS)

^a(Deng i sur., 2011); ^b(Yilmaz, Y. i Toledo, R.T., 2006); ^c(Reyes González-Centeno i sur., 2013); ^d(Jose Jara-Palacios M. i sur., 2014)

GAE, ekvivalent galne kiseline; TE, ekvivalent troloksa; AA, ekvivalent askorbinske kiseline; ORAC, antioksidacijski kapacitet određen ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metodom; ABTS, antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom s radikal-kationom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline; FRAP antioksidacijski kapacitet određen FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential) metodom.

Tablica 2. Polifenolni sastav i antioksidacijski kapacitet komine (pokožica, sjemenka, cjelovita komina) crnih sorti grožđa.

	Ukupni fenoli (mg GAE/g s. tv.)	Ukupni tanini (mg/g s. tv.)	Ukupni antocijani (mg/g s. tv.)	Antioksidacijski kapacitet (μ mol TE/g s. tv.)/ (μ mol AA/g s. tv.)*
Komina crnog grožđa				
Pokožica komine				
<i>Sorta grožđa</i>				
Merlot ^{a,b}	15,0-25,0	15,8-24,1	1,1-1,4	69,8 (ORAC) 19,7-40,2 (ABTS)* 17,7-39,7 (ABTS)*
Cabernet Sauvignon ^b	12,7-26,7	7,7-17,2	0,9	
Pinot Noir ^{b,c}	5,6-21,4	8,0-11,9	0,3	21,1-32,2 (ABTS)*
Grenache ^d	11,8-19,5	31,5-53,4	1,6-3,7	200,6-224,8 (ORAC) 263,4-294,2 (ABTS) 134,6-161,2 (DPPH) 105,3-137,2 (FRAP)
Syrah ^d	15,5-24,3	31,8-35,9	4,9-5,1	267,4-355,8 (ORAC) 299,3-338,8 (ABTS) 151,0-190,6 (DPPH) 157,4-190,8 (FRAP)
Carignan Noir ^d	22,8-25,1	46,2-56,1	7,1-7,7	326,2 (ORAC) ; 390,8 (ABTS) 195,3 (DPPH); 225,3 (FRAP)
Mourvedere ^d	12,1-26,3	31,8-47,3	3,4-3,8	269,2 (ORAC); 405,7 (ABTS) 161,3 (DPPH); 202,7 (FRAP)
Counoise ^d	20,5	37,6	2,0	212,3 (ORAC); 255,6 (ABTS) 185,0 (DPPH); 122,4 (FRAP)
Alicante Bouchet ^d	31,6	55,3	10,0	531,9 (ORAC); 464,1 (ABTS) 290,7 (DPPH); 266,8 (FRAP)
Sjemenka komine				
<i>Sorta grožđa</i>				
Merlot ^a	38,5			344,8 (ORAC)
Pinot noir ^c	56,0-67,9			
Grenache ^d	12,6-40,5	39,1-83,1		303,1-322,0 (ORAC) 193,0-212,2 (FRAP) 438,1-445,7 (ABTS) 324,7-450,7 (DPPH)
Syrah ^d	30,2-35,6	54,3-79,2		266,9-267,9 (ORAC) 186,7-232,7 (FRAP) 425,8-486,3 (ABTS) 322,0-324,1 (DPPH)
Carignan Noire ^d	27,5-38,8	59,8-78,7		248,7 (ORAC); 403,5 (ABTS) 318,5 (DPPH); 176,4 (FRAP)
Mourvedere ^d	19,0-34,5	51,5-69,4		201,8 (ORAC); 526,4 (ABTS) 262,7 (DPPH); 188,2 (FRAP)

Tablica 2. (nastavak)

Counoise ^d	40,8	70,9	327,6 (ORAC); 468,6 (ABTS) 536,2 (DPPH); 205,4 (FRAP)
Alicante Bouchet ^d	44,5	84,9	561,2 (ORAC); 603,1 (ABTS) 450,1 (DPPH); 267,5 (FRAP)
Cjelovita komina			
<i>Sorta grožđa</i>			
Merlot ^{e,f}	37,6-46,2	8,3-15,7	318,2 (ABTS); 328,4 (DPPH) 169,2 (FRAP)
Cabernet Sauvignon ^{e,f}	51,0-74,8	16,8-20,9	485,4 (ABTS); 505,5 (DPPH) 249,5 (FRAP)
Tanat ^e	30,1	12,5	
Tinta Roriz ^g	69,3-75,8		1054-1230 (ORAC) 520-590 (DPPH)
Touringa	100,1-106,1		1325-1343 (ORAC)
Franca ^g			870-900 (DPPH)
Touringa	131,7-142,4		1579-2337 (ORAC)
Nacioal ^g			1090-1120 (DPPH)

^a(Yilmaz, Y. i Toledo, R.T., 2006); ^b(Deng i sur., 2011); ^c(Casazza, A.A. i sur., 2010); ^d(Ky I. i sur., 2014); ^e(Iora S.R.F. i sur., 2014); ^f(Rockenbach, I.I. i sur., 2011b); ^g(Tournour i sur., 2015).

GAE, ekvivalent galne kiseline; TE, ekvivalent troloksa; AA, ekvivalent askorbinske kiseline; ORAC, antioksidacijski kapacitet određen ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metodom; ABTS, antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom s radikal-kationom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline; DPPH, antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikalom; FRAP, antioksidacijski kapacitet određen FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential) metodom.

3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva komine

Ekstrakcija je vrlo važan korak u izolaciji i primjeni biološki aktivnih spojeva kao što su polifenolni spojevi iz biljnih materijala. Ova tehnološka operacija sastoji se od potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Nakon provedenog postupka dobivamo tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno otpariti ili kristalizirati ekstrakcijsko otapalo (Lianfu i Zelong, 2008). Budući da svaki supstrat zahtijeva definiranje metodologije i optimalnih uvjeta ekstrakcije, razvijene su brojne tehnike i metode za ekstrakciju spojeva iz različitih biljnih uzoraka, uključujući voće, povrće, vino, kavu, čajeve, žitarice i mahunarke (Balasundram i sur., 2006; Luthria i Pastor-Corrates, 2006; Naczki i Shaidi, 2006). Prilikom odabira prikladne metode u obzir treba uzeti dostupnost tehnike ekstrakcije, oblik u kojem se nalazi željena tvar u supstratu, željenu čistoću ekstrakta, stabilnost spojeva i uzoraka i druge različite zahtjeve (Rostagno i Prado, 2013).

Učinkovitost ekstrakcije funkcija je postavljenih procesnih parametara. Parametri koji izrazito utječu na prinos željene tvari u ekstrakt svakako su vrsta i polarnost otapala, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, odnos količine otapala i uzorka (Spigno i sur., 2007).

Klasična ekstrakcija otapalima najčešće je upotrebljavana tehnika izolacije polifenolnih spojeva bilja i industrijskog otpada (Ignat i sur., 2011), koja uključuje različite postupke pred-pripreme uzorka kao sušenje ili liofilizacija i usitnjavanje te potom dugotrajno potapanje u odgovarajuće otapalo (Merken i Beecher, 2000; Ignat i sur., 2011). Najčešće korištena otapala kod ekstrakcije biološki aktivni tvari su alkoholi, poput zakiseljenog metanola i etanola (Amr i Al-Tamimi, 2007; Awika i sur., 2005; Caridi i sur., 2007; Lapornik i sur., 2005.). Naime, ova otapala iako nisu visoko selektivna za polifenole, daju vrlo visok prinos ekstrakta i neusporedivo su bolji od ekstrakcije vodom (Casteneda-Ovando i sur., 2009), dok niži pH pogoduje reakcijama kiselinske hidrolize polifenolnih spojeva vezanih esterskim i glikozidnim vezama na polimere staničnih stijenki (Ignat i sur., 2011). Istraživanja su pokazala kako je metanol najučinkovitije otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva (Kapasakalidis i sur., 2006). Kod ekstrakcije antocijana iz pulpe grožđa, ekstrakcija metanolom pokazala se 20 % bolja od ekstrakcije etanolom, a 73 % boljom od ekstrakcije vodom (Casteneda-Ovando i sur., 2009). U prehrambenoj industriji metanol se ne preferira zbog svoje toksičnosti. Osim ovih otapala, za ekstrakciju polifenolnih spojeva koriste se etil-acetat, kloroform, dietil-eter, aceton, n-heksan, izooktan i mnogi drugi (Ignat i sur., 2011). Nedostatak ove metodologije osim dugotrajnosti svakako je i neselektivnost koja dovodi do ekstrakcije i nefenolnih spojeva, kao što su šećeri, organske kiseline i proteini. Time se smanjuje čistoća ekstrakta, što zahtijeva provođenje dodatnih postupaka pročišćavanja po završetku ekstrakcije (Casteneda- Ovando i sur., 2009; Ignat i sur., 2011), te može uzrokovati gubitke polifenolnih spojeva uslijed reakcija ionizacije, hidrolize i oksidacije (Hui i sur., 2005).

Sve češću primjenu u ekstrakciji polifenolnih spojeva danas imaju nove tehnologije kao ekstrakcija super kritičnim plinovima i 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, ostvarivanja većeg prinosa od klasične ekstrakcije i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije, što ih svrstava među one pogodne za ekstrakciju termički osjetljivih spojeva kao

što su polifenoli. Međutim, 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).

3.3.1. Ekstrakcija primjenom mikrovalova

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koji nastaju kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič (Chemat i sur., 2004). Valne duljine mikrovalova kreću se od 1 mm pa do 100 cm. Pripadaju dijelu neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja čiji se raspon tradicionalno proteže od 300 MHz do 300 GHz i njihova primjena nije štetna po ljudsko zdravlje. Danas se često kao donja granica raspona frekvencije mikrovalova uzima 1 GHz (Wang i Weller, 2006).

Dvije najčešće korištene frekvencije mikrovalova kod industrijskih, znanstvenih i medicinskih istraživanja su 0,915 i 2,45 GHz. Mikrovalovi imaju ograničeni energetski potencijal, što znači da se apsorpcijom energije koju sadrže ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, već intenzivnije titranje molekula izaziva značajan porast temperature. Taj je efekt iskorišten u mikrovalnim pećnicama za kuhanje, odmrzavanje i sušenje (Blekić i sur., 2011).

Ekstrakcija mikrovalovima relativno je nova i nedovoljno istražena metoda ekstrakcije. Uspjeh metode baziran je na primjeni blagih procesnih uvjeta sa mogućnošću kontrole temperature čime se ostvaruju veći prinosi ekstrakcije, a ne dolazi do značajnog smanjivanja antioksidacijskog kapaciteta (Spigno i De Faveri, 2009). Prijašnja istraživanja ekstrakcije primjenom mikrovalova ukazala su na visoki stupanj učinkovitosti, kvalitetu i veliki prinos dobivenog ekstrakta, smanjeno vrijeme ekstrakcije, malu potrebu za otapalom i dugoročno veliku ekonomičnost (Ignat i sur., 2011).

Energija fotona mikrovalova frekvencije 2,45 GHz, koja se najčešće koristi u uređajima za ekstrakciju mikrovalovima, iznosi 0,0001 eV. Ta energija premala je za razbijanje vodikovih veza između spojeva u tretiranom materijalu. Stoga se učinkovitost mikrovalova zasniva na jednoličnom zagrijavanju materijala, iznutra i izvana, bez postojanja termalnog gradijenta.

Princip ekstrakcije mikrovalovima zasniva se na činjenici da ekstrakcijsko otapalo i voda, prirodno prisutna u stanicama tretiranog materijala, preuzimaju energiju mikrovalova. Uslijed navedenog dolazi do sve intenzivnijeg gibanja molekula, rotacije dipola polarnih komponenti te sve većeg zagrijavanja i povećavanja pritiska na staničnu stijenku koja puca i time olakšava prodor otapala unutar stanice te povećava površinu interakcije između otapala i željene komponente (Wang i Weller, 2006; Mandal i sur., 2007).

Kao i kod konvencionalnih ekstrakcija, na učinkovitost ekstrakcije mikrovalovima značajan utjecaj ima veličina čestica tretiranog materijala, temperatura procesa i najvažnije, odabir otapala.

Smanjenje veličine čestica supstrata važno je zbog toga što neusitnjeni supstrat zahtijeva duže vrijeme ekstrakcije, što može smanjiti antioksidacijski potencijal ekstrakta. Primjerice, ranija istraživanja pokazala su kako mehaničko ili enzimsko usitnjavanje komine poboljšava ekstrakciju polifenola otapalima uglavnom zbog povećane dostupnosti spojeva te enzimske degradacije polisaharida koji okružuju polifenole (Bonilla i sur., 1999; Rajha i sur., 2014). To pokazuje kako je za ekstrakciju polifenola iz nesamljevene komine potrebno utrošiti i više energije u odnosu na samljevenu.

Također, povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom zbog povećanja topljivosti spoja u otapalu i povećanja koeficijenta difuzije. Međutim, kod ekstrakcije termolabilnih spojeva kao što su polifenolni spojevi, visoke temperature (iznad 60 °C) uzrokuju degradaciju ekstrakta (Font i sur., 1998; Spigno i sur., 2007), te znatno smanjuju prinos ekstrahiranih polifenola iz komine i taloga vina. Ukupan sadržaj polifenola se u usporedbi s onim ostvarenim kod 60 °C, pri temperaturi od 80 °C smanjuje za 10,3 %, a pri 100 °C za 15,7 % (Lafka i sur., 2007).

Izbor otapala ovisi o topljivosti željene tvari, interakciji otapala i matriksa te o svojstvima otapala, kao što su, primjerice polarnost otapala te najvažnije dielektrična konstanta. Otapala s višom dielektričnom konstantom bolje upijaju energiju mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Polarna otapala poput etanola, metanola i vode tako imaju najširu primjenu (Brachet i sur., 2002; Wang i Weller, 2006). Iako su prema teoriji slomljene stanične stijenke i nepolarna otapala koja u vrlo maloj mjeri apsorbiraju ili uopće ne apsorbiraju energiju mikrovalova pogodna za mikrovalnu ekstrakciju budući da omogućavaju brzu distribuciju topline kroz matriks tretiranog materijala i brzo zagrijavanje otapala (Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003.)

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija pokazala je uspješnu primjenu u ekstrakciji esencijalnih ulja iz kore naranče (Franco-Vega i sur., 2016), lišća ružmarina i mente (Bousbia i sur., 2009; Dai i Mumper, 2010), terpena iz biomase (Mattina i sur., 1997), masti mikroalgi za proizvodnju biodizela (Dai i sur., 2014), pektina iz kore lubenice i marakuje (Prakash i sur., 2014; Seixas i sur., 2014) te ukupnih polifenola iz otpada od šparoga, karfiola, celera i cikorije, iskorištene espresso kave te nusprodukata kod proizvodnje vina (Casazza i sur., 2010; Baiano i sur., 2014; Pavlović i sur., 2013).

Dosadašnja istraživanja ekstrakcije polifenolnih spojeva iz pokožice i sjemenke te cjelovite komine primjenom mikrovalova prikazani su u Tablici 3. Prema rezultatima istaknutim u tablici, lako je vidljivo kako na učinkovitost ekstrakcije utječe sinergističko djelovanje kombinacije postavljenih procesnih parametara. Faktori kao što su vrsta i polarnost otapala, omjer otapala i krutine, energija mikrovalova, te vrijeme zračenja pokazali su se kao jedni od najvažnijih. S druge strane, utjecaj određenog faktora mijenja se ovisno o vrsti tretiranog materijala te izvornoj strukturi tkiva, obliku i vrsti prisutnih željenih komponenti (Pinelo i sur., 2006), a potencijalno i obliku ekstrakcijske posude i miješanju (Pedroza i sur., 2015).

Predtretman i priprema uzoraka pokožice komine grožđa kod većine istraživanja je podjednaka. Uzorak komine se osuši, potom se iz njega, ukoliko je to potrebno, separirani oni dijelovi koji se koriste u istraživanju, nakon čega je uzorak samljeven kako bi se povećala površina međudjelovanja ekstrakcijskog otapala i samog materijala. Optimalni parametri odabrani su statističkom obradom preliminarno dobivenih rezultata i u manjoj mjeri se razlikuju. Osim Casazze i sur., (2010) koji koriste ekstrakciju metanolom u zatvorenoj posudi, pri temperaturi od 110° C kroz ekstrakcijsko vrijeme 60 minuta te vrlo malu snagu zračenja većina istraživanja primjenila je mješovita otapala, vrlo kratko vrijeme tretiranja te niže temperature kako bi očuvali kvalitetu ekstrakta. Dobivene vrijednosti rezultata ukupnih polifenola u pokožici komine grožđa kreću se od 1,4-55,8 mg GAE/g s.tv., u sjemenci komine od 8,6-96,8 mg GAE/g s.tv., te u komini od 24,1-231,6 mg GAE/g s.tv..

Tablica 3. Procesni uvjeti i rezultati istraživanja provedenih aplikacijom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije na komini grožđa (pokožica, sjemenka ili cjelovita komina) crnih sorti

	Proučavani parametri	Optimalni parametri	Ukupni fenoli (mg GAE/g s. tv.)
Komina crnog grožđa			
Pokožica			
<i>Sorta grožđa</i>			
Pinot Noir ^a (Italija)	(MAE) zatvorena posuda, MeOH, t (15-90 min), P (60 W), T (110°C) (UAE) MeOH, P (60 W), t (60 min) (HPTE) T (110°C), t (15-90 min) (SLE) omjer k:o (0,20 g s.tv./mL), EtOH/MeOH, t (19h), T (25°C)	zatvorena posuda, MeOH, t (60 min), P (60W), T (110°C)	1,4
Ahmar Bou-Amar ^b (Alžir)	(MAE) P (200-600 W), t (60-180 s) (SLE) MeOH, EtOH, aceton, voda (40-70 % v/v), t (60-120), omjer k:o (2.5-5 mg/mL)	aceton 50 %, t (113,74 s), P (384,44 W)	55,8
suha pokožica crne sorte n.n. ^c	(MAE) EtOH (30-70 %), P (180-540 W), t (0,5 –7 min), omjer k:o (1:10 – 1:50)	50 % EtOH, P (540 W), t (3 min), omjer k:o (1:40 g/mL)	16,6
Sjemenka			
<i>Sorta grožđa</i>			
Pinot Noir ^a (Italija)	(MAE) zatvorena posuda, MeOH, t (15-90 min), P (60 W), T (110°C) (UAE) MeOH, P (60 W), t (60 min) (HPTE) T (110°C), t (15-90 min) (SLE) omjer k:o (0,20 g s.tv./mL), EtOH/MeOH, t (19h), T (25 °C)	zatvorena posuda, MeOH, t (30 min), P (60W), T (110°C)	8,6
Ahmar Bon Amar ^b (Alžir)	(MAE) P (200-600 W), t (30-120 s) (SLE) otapalo MeOH, EtOH, aceton, voda (50-80 % v/v), t (30-90 min), omjer k:o (1-2.5 mg/mL)	EtOH 50 %, t (58,6 s), P (373,15 W)	72,9

Bangalore blue ^d (Indija)	(MAE) EtOH (30-60 % v/v), ekstrakcija u otvorenoj posudi, P (100- 200 W), t (2-6 min)	(za TP) 30 % EtOH, t (6 min), P (170 W)	13,5
Cabernet Sauvignon, Shirat, Sauvignon Blanc, Chardonnay ^e (Australija)	(MAE) EtOH (10-90 %), SSR (10:1- 50:1 mL/g), t (2-32 min), T (40-60 °C), P (100- 200W)	(MAE) EtOH (10-90 %), omjer o:k (10:1- 50:1 mL/g), t (2-32 min), T (40-60 °C), P (100- 200W)	96,8

Cjelovita komina

Sorta grožđa

Agiorgitiko ^f (Grčka)	(MAE) omjer k:o (1:50 g/mL), EtOH 50 % ili voda, T (50 °C), t (60 min), P (200W) (UAE) omjer k:o (1:70 g/mL), EtOH 50 % ili voda, frekvencija (25 kHz), P (300 W), T (20 °C), t (60 min) (SE) omjer k:o (1:33 g/mL), 10 ciklusa ekstrakcija	EtOH 50 % ili voda, omjer k:o (1:50 g/mL), T (50 °C), t (60 min), P (200W)	24,1 – 231,6
-------------------------------------	---	--	--------------

^a(Casazza, A. A. i sur., 2010); ^b(Medouni- Adrar, S. i sur., 2015); ^c(Hai-bo, Y. i sur., 2014); ^d(Krishnaswamy, K. i sur., 2013); ^e(Li, Y. i sur., 2011); ^f(Drosou, C. i sur., 2015)
GAE, ekvivalent galne kiseline; MAE, mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija; UAE, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; HPTE, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom; SLE, kruto-tekuća ekstrakcija; SSR, omjer otapalo:krutina; omjer k:o, omjer krutina:otapalo; SE, Soxhlet ekstrakcija

4. MATERIJAL I METODE

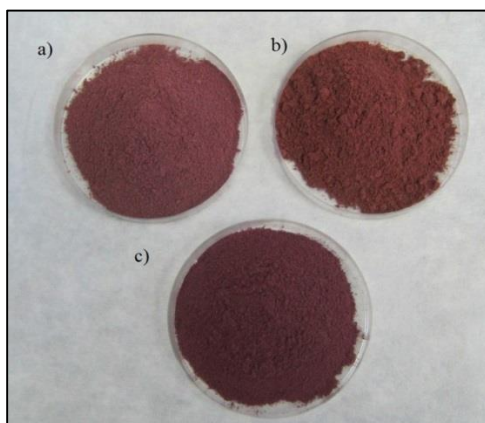
4.1. Materijal

4.1.1. Uzorci pokožice komine grožđa

U ovom istraživanju korišteni su nusproizvodi proizvodnje vina dobiveni od grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran koji su izuzeti nakon prešanja, u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska). Uzorci komine grožđa sadržavali su pokožicu, sjemenku i dijelove peteljke.

Nakon uklanjanja grubih dijelova peteljke uzorci komine su smrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, te potom liofilizirani. Postupak liofilizacije proveden je na liofilizatoru Crist Alpha 1-4 LSC Plus (Osterode am Harz, Njemačka). Smrznuta komina (cca 500 g) postavljena je u jednom sloju na šest plitica nakon čega je proveden postupak liofilizacije tijekom 24 sata. Sublimacija je provedena pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi -30 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}/24$ sata, a izotermna desorpcija pri $20^{\circ}\text{C}/12$ sati.

Nakon liofilizacije pokožica razdvojiti od sjemenke i peteljke te zasebno pakirati u polipropilenske vrećice, koje su hermetički zatvorene i skladištene pri sobnoj temperaturi u eksikatoru do provođenja analiza. Neposredno prije ekstrakcije liofiliziranu pokožicu samljeti u električnom mlincu za mljevenje kave tijekom 2 minute (Imetec DolceVita CG1), uz stanku svakih 30 sekundi kako prilikom mljevenja ne bi došlo do zagrijavanja uzorka. Tako samljevenim uzorcima je granulometrijski izmjerena veličina čestica pomoću sita $d(0,9)=6\leq 1$ mm, a uzorci su dalje korišteni za ekstrakciju polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova.



Slika 1. Liofilizirana i samljevena pokožica grožđa sorte a) Merlot b) Cabernet Sauvignon c) Teran

4.1.2. Kemikalije

- Natrijev karbonat , bezvodni, p.a. Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogen sulfit , p.a. Acros, Geel, Belgija
- Dinatrijev hidrogen fosfat , p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat , p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fluorescein (98,5-100,5 %), Sigma-Aldrich, Dorset, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Trolox (97 %), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH)(98%), Acros, Geel, Belgija
- Folin Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Metanol (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Galna kiselina (97,5-102,5 %), Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina
- Kafeinska kiselina (98 %), HPLC čistoće, Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina
- Kvercetin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Delfinidin-3-*O*-glukozid, Poyphenols, Sanders, Norveška
- Cijanidin-3-*O*-glukozid, Poyphenols, Sanders, Norveška
- Petunidin-3-*O*-glukozid, Poyphenols, Sanders, Norveška
- Peonidin-3-*O*-glukozid, Poyphenols, Sanders, Norveška
- Malvidin-3-*O*-glukozid, Poyphenols, Sanders, Norveška

4.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar, UV-1600PC, UWR, Kina
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Švicarska
- Liofilizator Crist Alpha 1-4 LSC Plus, Osterode am Harz, Njemačka
- Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima, MILESTONE Start S Microwave Labstation for Synthesis, Sorisole, Italija
- Ultrazvučna kupelj Bandelin, Sonorex, Berlin, Njemačka
- Rotacioni uparivač Büchi Rotavapor R-205/ Heating Bath B-490, Švicarska
- Centrifuga, ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Njemačka
- HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
 - *Binarna Pumpa (Bin Pump SL) G1312B*
 - *Degazer G1379B*
 - *Autosampler (HiP-ALS) G1367B*
 - *Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B*
 - *Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B*
 - *Diode Array Detector (DAD SL) G1315C*
 - *Agilent Chemstation Softver*

Pribor:

- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 µL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Tube za hidrolizu
- Plastična ladica za vaganje
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene kivete od 1 cm
- Tikvice s okruglim dnom volumena 50 i 250 mL
- Erlenmeyerove tikvice volumena 100, 250, 500 mL

4.2. Metode

4.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova

Ekstrakcija polifenolnih spojeva pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran uz određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedena je pri ranije definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije prikazanim u Tablici 4.

Optimalni parametri ekstrakcije određeni su preliminarnim istraživanjem pokožice grožđa sorte Cabernet Sauvignon. U navedenom istraživanju prema punom faktorskom planu pokusa, provedeno je 108 različitih ekstrakcijskih varijanti, gdje su ispitana četiri parametra: polarnost otapala (20 %, 60 % i 100 % metanol), temperatura provođenja ekstrakcije (30, 45 i 60 °C), vrijeme trajanja ekstrakcije (2, 9 i 16 min) i kiselost otapala (0 % i 1 % klorovodične kiseline). Analize ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih i slobodnih antocijana, ukupnih flavonola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta provedene su na svih 108 dobivenih ekstrakata, a statističkom obradom dobivenih rezultata definirani su parametri predloženi u Tablici 4.

Tablica 4. Optimalni parametri kod ekstrakcije polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova.

Analitički parametar	Optimalni parametri ekstrakcije mikrovalovima			
	Polarnost (% metanol)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Kiselost (% HCl)
Ukupni fenoli	100	16	60	1
Ukupni tanini	100	16	60	1
Ukupni i slobodni antocijani	92	16	45	0,6
Ukupni flavonoli	100	16	60	1
Ukupne hidroksicimetne kiseline	100	16	60	1
Antioksidacijski kapacitet (ORAC vrijednost)	100	16	60	1

Ekstrakcija polifenolnih spojeva prema iznad navedenim optimalnim parametrima, ponovljena je u uzastopnim ciklusima na istom supstratu, sve do potpune ekstrakcije polifenolnih spojeva. Broj potrebnih uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa (n) na istom supstratu definiran je praćenjem dinamike ekstrakcije, odnosno analizom polifenolnog sastava tekuće frakcije ekstrakta dobivene nakon svake pojedinačne ekstrakcije. Temeljem navedenih analiza izrađen je i grafički prikaz dinamike ekstrakcije primjenom mikrovalova.

U konačnici, ekstrakcija ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz uzoraka pokožice komine grožđa provedena je primjenom 100 % metanola s 1 % HCl, tijekom 16 min na temperaturi od 60 °C u 8 uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa, dok je ekstrakcija ukupnih i slobodnih antocijana iz uzoraka pokožice komine grožđa provedena uz 92 % metanol s dodatkom 0,6 % HCl, tijekom 16 min na temperaturi od 45 °C te uz primjenu 6 uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa.

Postupak ekstrakcije:

Izvagati 0,5 g uzorka liofilizirane pokožice grožđa na analitičkoj vazi ($\pm 0,0050$ g) te prebaciti u tikvicu s okruglim dnom volumena 50 mL. U tikvicu dodati 25 mL otapala i magnet koji omogućava miješanje tijekom same ekstrakcije. Prije početka rada, na uređaj za ekstrakciju mikrovalovima postave se zračno i vodeno hladilo. Zračno hladilo staviti na tikvicu sa uzorkom, otapalom za ekstrakciju i magnetom, a na njega vodeno hladilo kroz kojeg se lagano pušta voda. Proces ekstrakcije se pokreće postavljanjem parametara na kontrolnom uređaju. Nakon završetka ekstrakcije, uzorak se centrifugira 5 minuta kako bi se odvojio tekući dio (supernatant) koji se sakuplja, od krutog dijela na kojem se opetovano provodi ekstrakcija. Kruti dio se kvantitativno prenese u tikvicu sa okruglim dnom volumena 50 mL, doda se 25 mL otapala i magnet te se cijeli ekstrakcijski ciklus ponovi n puta (broj potrebnih uzastopnih ciklusa). Nakon n boja provedenih ekstrakcija, sakupljene tekuće frakcije supernatanta-ekstrakta se zajednički upare pri vakuumu i temperaturi od 30 °C, a tako dobiveni ekstrakt se liofilizira, te čuva na -20 °C do provedbe analize.



Slika 2. Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima.

4.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih polifenola temelji se na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Prilikom stupanja u reakciju sa fenolnim spojevima, hidroksilne skupine fenolnih spojeva oksidiraju, a kiseline reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultat se izražava kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/L.

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt komine pokožice kvantitativno otopiti u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijediti 5 puta. U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL razrijeđenog uzorka, 5 mL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve promiješati i nakon 30 sekundi dodati 15 mL 20 % otopina natrij-karbonata. Tikvica nadopuniti do oznake s destiliranom vodom i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali se umjesto uzorka uzeti 1 mL destilirane vode. Nakon 2 sata mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremiti otopine galne kiseline u 100 % metanolu slijedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600 mg/L. U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL otopine određene koncentracije, te se dalje postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola,. Nakon što je izmjerena apsorbancija, nacrt se baždarni pravac pri čemu se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Pomoću programa Microsoft Excel dobije se jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola.

Izračunata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0010x + 0,0276$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg/L)

R²- koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih fenola u pokožici komine grožđa preračuna se i izrazi u mg GAE/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

4.2.3. Određivanje ukupnih tanina

Princip određivanja:

Ukupni tanini određuju se Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina koja se odvija na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt kvantitativno otopiti u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijedi 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL razrijeđenog uzorka ekstrakta pokožice grožđa, 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline nakon čega se tube hermetički zatvore. Jedna tuba ostaviti na sobnoj temperaturi, dok se drugu staviti u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, tuba se izvadi iz vodene kupelji te tijekom 5 min ohladi ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U svaku od tuba

potom se dodati 0,5 mL etanola. Optičku gustoću izmjeriti pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračuna se prema formuli:

$$\text{Tanini (g/L)} = 19,33 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

Koncentracija ukupnih tanina u pokožici komine grožđa preračuna se i izrazi u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

4.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Princip određivanja:

Ukupna količina antocijana u uzorku ekstrakta pokožice grožđa određuje se pomoću metode bazirane na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak te činjenici da se HSO₃⁻ ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak ekstrakta pokožice grožđa tretira se destiliranom vodom pri čemu ne dolazi do nikakve promjene na strukturi molekula antocijana. Količnu prisutnih antocijana pokazuje razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965)

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt kvantitativno otopiti u 10 mL 100 % metanola, a zatim razrijediti 2 puta. U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL razrijeđenog uzorka, 1 mL 0,1 (v/v) klorovodičnom kiselinom zakiseljenog 96 % etanola i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Po 10 mL napravljene smjese otpipetirati u dvije tikvice nakon čega se

u prvu tikvicu dodati 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbancija oba uzorka na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku ekstrakta pokožice grožđa izračuna se prema formuli:

$$A_c \text{ (mg/L)} = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

A_c (mg/L) – količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 – faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

D_2 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana 15 %-tna otopina natrijevog hidrogensulfita

Koncentracija ukupnih antocijana u pokožici komine grožđa preračuna se i izrazi u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

4.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip određivanja:

Određivanje hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt kvantitativno otopiti u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijediti 2 puta. U staklenu epruvetu otpipetirati redom 250 μ L razrijeđenog ekstrakta, 250 μ L 1g/L klorovodične kiseline u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L klorovodične kiseline. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzeti otapalo za ekstrakciju. Za određivanje

ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbanciju mjeriti na 320 nm, dok se za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija mjeriti na 360 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

a) Kafeinska kiselina

Za izradu baždarnog pravca pripremiti otopine standarda kafeinske kiseline u 100 % metanolu slijedećih koncentracija: 10, 25, 50, 100, 150 i 250 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetirati 250 µL otopine standarda u staklene epruvete, te se dalje postupa po propisu za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanese koncentracije kafeinske kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Izračunata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0047x + 0,023$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 320 nm

x – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina u komini pokožice grožđa preračuna se i izrazi u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

b) Kvercetin

Za izradu baždarnog pravca pripremiti otopine standarda kvercetina u 100 % metanolu slijedećih koncentracija: 10, 30, 60, 110 i 390 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetirati 250 µL otopine standarda u staklene epruvete, te se dalje postupa po propisu za određivanje ukupnih flavonola.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtati baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanese koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 360 nm. Koncentracija ukupnih flavonola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Izračunata jednadžba pravca glasi:

$$y=0,0028x-0,0035$$

$$R^2=0,998$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 360 nm

x – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih flavonola u pokožici komine grožđa preračuna se i izrazi u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

4.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Princip određivanja:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta pokožice grožđa korištena je ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda koja se zasniva na mjerenju aktivnosti interakcije dodanih slobodnih radikala sa ostalim komponentama koje se nalaze u ispitivanom uzorku (Cao i sur., 1993; Prior i Cao, 1999). Odnosno, u ovom slučaju, na mjerenju promjene intenziteta fluorescencije uzorka ekstrakta do koje dolazi zbog vezanja peroksil-radikal

producirajuće komponente kao što je 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid na strukturu prethodno dodane fluorescirajuće komponente, fluoresceina. Moguće prisutni antioksidativni spojevi u uzorku ekstrakta popravljaju oštećenja nastala vezivanjem peroksilradikala na molekulu fluoresceina te posljedično prolongiraju redukciju intenziteta fluorescencije (Yilmaz i Toledo, 2004).

Postupak određivanja:

Mjerenje ORAC vrijednosti provodi se spektrofotometrijski na temperaturi 37 °C pri dvije valne duljine, $\lambda_{eks.}=485\text{ nm}$ i $\lambda_{em.}=520\text{ nm}$.

Kod mjerenja slijepe probe, u kivetu dodati 2,250 mL matične otopine F3 fluoresceina i 0,375 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,075 mol/L. Otopinu termostirati 30 minuta na 37 °C, nakon čega dodati 0,375 mL otopine 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorida (AAPH), te promjenu intenziteta fluorescencije mjeriti svake minute sve dok vrijednost intenziteta zračenja ne padne ispod 95 % od njene početne vrijednosti. Promjene u intenzitetu fluorescencije fluoresceina prisutnog u otopini uzorka tijekom perioda snimanja prikazati grafički na računalu kao ovisnost očitane apsorbancije o vremenu snimanja.

Mjerenje ORAC vrijednosti Troloxa provoditi nakon mjerenja slijepe probe, tako da se u kivetu doda 2,250 mL matične otopine fluoresceina F3 i 0,375 mL otopine Troloxa koncentracije 25 $\mu\text{mol/L}$. Otopina se termostatira 30 minuta na temperaturi 37 °C nakon čega u otopinu dodati 0,375 mL otopine AAPH, a promjena intenziteta fluorescencije mjeriti svakake minute kao i u slučaju mjerenja slijepe probe. Mjerenje ORAC vrijednosti uzorka provoditi na isti način kao i u prva dva slučaja, samo što umjesto 0,375 mL pufera u prvom, odnosno otopine Troloxa u drugom slučaju dodaje 0,375 mL razrijeđenog uzorka ekstrakta pokožice grožđa, te se nakon 30 min termostatiranja kao i prije doda 0,375 mL otopine AAPH, a promjena intenziteta fluorescencije mjeri svake minute.

Dobivene vrijednosti apsorbancija uzorka preračunati zatim u relativne apsorbancije dijeljenjem svake dobivene vrijednosti s onom početnom. Sumu relativnih vrijednosti apsorbancija zbrojiti sa 0,5 te kao rezultat dobivamo vrijednost antioksidacijskog kapaciteta uzorka (AUC vrijednost) koju koristimo prilikom izračuna ORAC vrijednosti.

Razrjeđenja uzoraka ovise o rezultatima spektrofotometrijske analize ukupnih fenola. Za uzorke kod kojih su vrijednosti analize ukupnih fenola do 2000 mg/L koristi se razrjeđenje

1000 x, dok je kod onih uzoraka kod kojih je vrijednost analize ukupnih polifenola između 2000- 2500 mg/L uzorak ekstrakta pokožice grožđa razrijeđen 1200x.

Račun:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost} = \left(\frac{AUCu - AUCsp}{AUC\ trolox - AUC\ sp} \right) * k * a * h$$

gdje je :

$$AUC = 0,5 + \frac{R2}{R1} + \frac{R3}{R1} + \dots + \frac{Rn}{R1},$$

AUCu = antioksidacijski kapacitet uzorka

AUCsp = antioksidacijski kapacitet slijepe probe

AUC trolox = antioksidacijski kapacitet Troloxa

k = faktor razrjeđenja

a = molarna koncentracija Troloxa [$\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1}$ uzorka]

$$h = \frac{V\ ekstrakta\ (L)}{m\ uzorka\ (g)}.$$

Antioksidacijski kapacitet pokožici komine grožđa preračuna se i izrazi u $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari (s. tv.) pokožice.

4.2.7. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav 13 slobodnih antocijana (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-glukozid acetat, peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat, delfinidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, cijanidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, petunidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima pokožice komine grožđa određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kromatografske analize povedene su na Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module binarne pumpe, degazera, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se od otapanja liofiliziranog ekstrakta pokožice komine (kvantitativno) u 20 mL 100 % metanola te filtriranja otopljenog uzorka kroz celuloza acetat filter promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250x4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 40 $^{\circ}\text{C}$ te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici 5. uz protok mobilne faze od 1 mL/min.

Tablica 5. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana.

t (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL/min)
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DA detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm. Kvantifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena (R_t) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Koncentracija pojedinačnih slobodnih antocijana (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid) izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravca pripadajućih standarda. Koncentracije antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata izražene su preko analognih antocijan-3-*O*-glukozida. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg/g s.tv. pokožice komine grožđa.

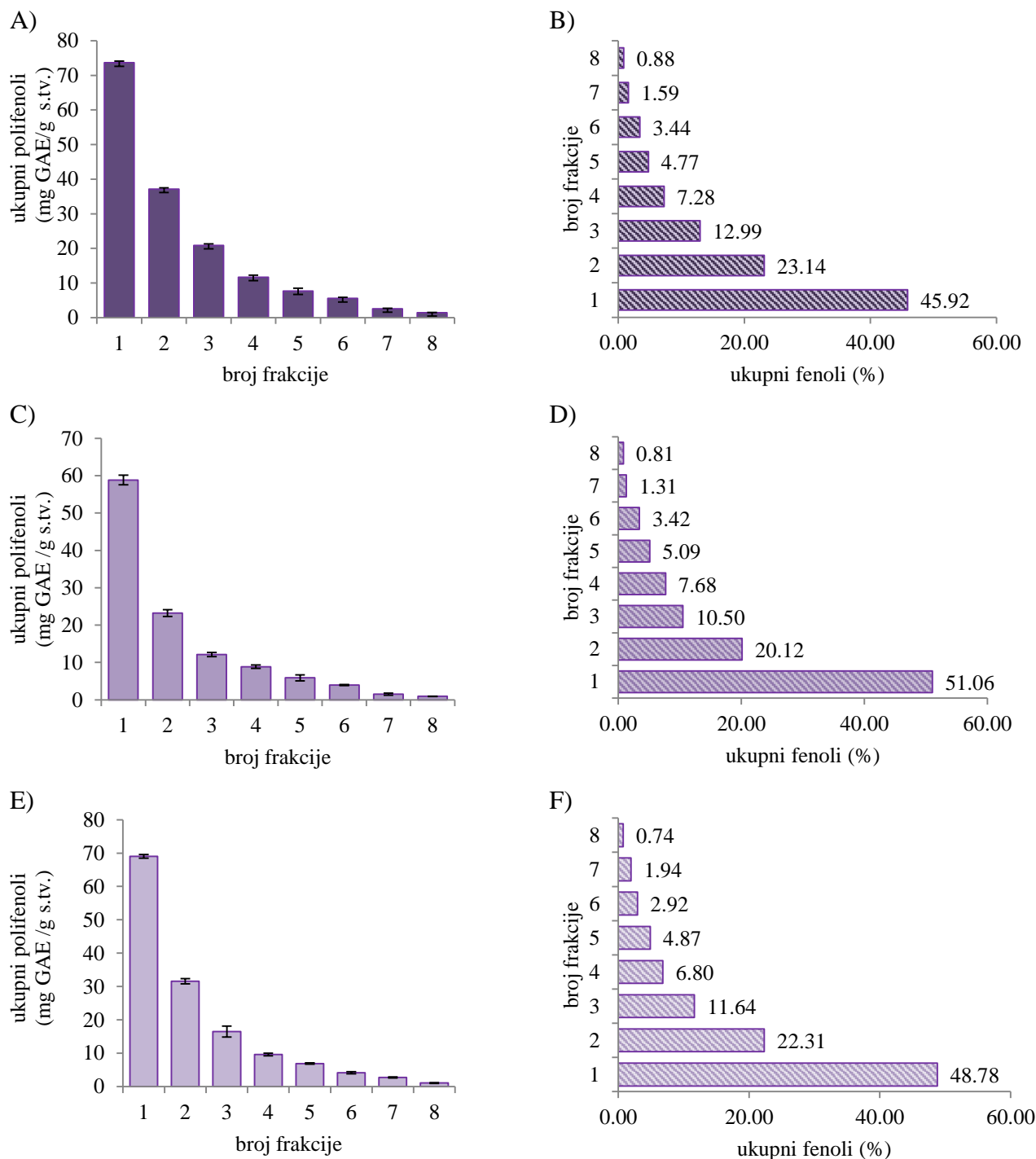
5. REZULTATI

Dinamika ekstrakcije te udio ekstrahiranih ukupnih polifenola, tanina i antocijana iz pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran dobivenih primjenom kontinuirane, cikličke ekstrakcije mikrovalovima uz primjenu optimalnih uvjeta prikazani su na Slikama 3-5. Mikrovalna ekstrakcija ukupnih polifenola i ukupnih tanina provedena je u 8, a ekstrakcija ukupnih antocijana u 6 uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa. Udjeli polifenolnih spojeva ekstrahirani u svakoj pojedinačnoj frakciji prikazani su na navedenim slikama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije.

Spektrofotometrijskom analizom određen sastav ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet ekstrakta određen fluorimetrijski ORAC metodom u komini pokožice grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran prikazani su na Slici 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije.

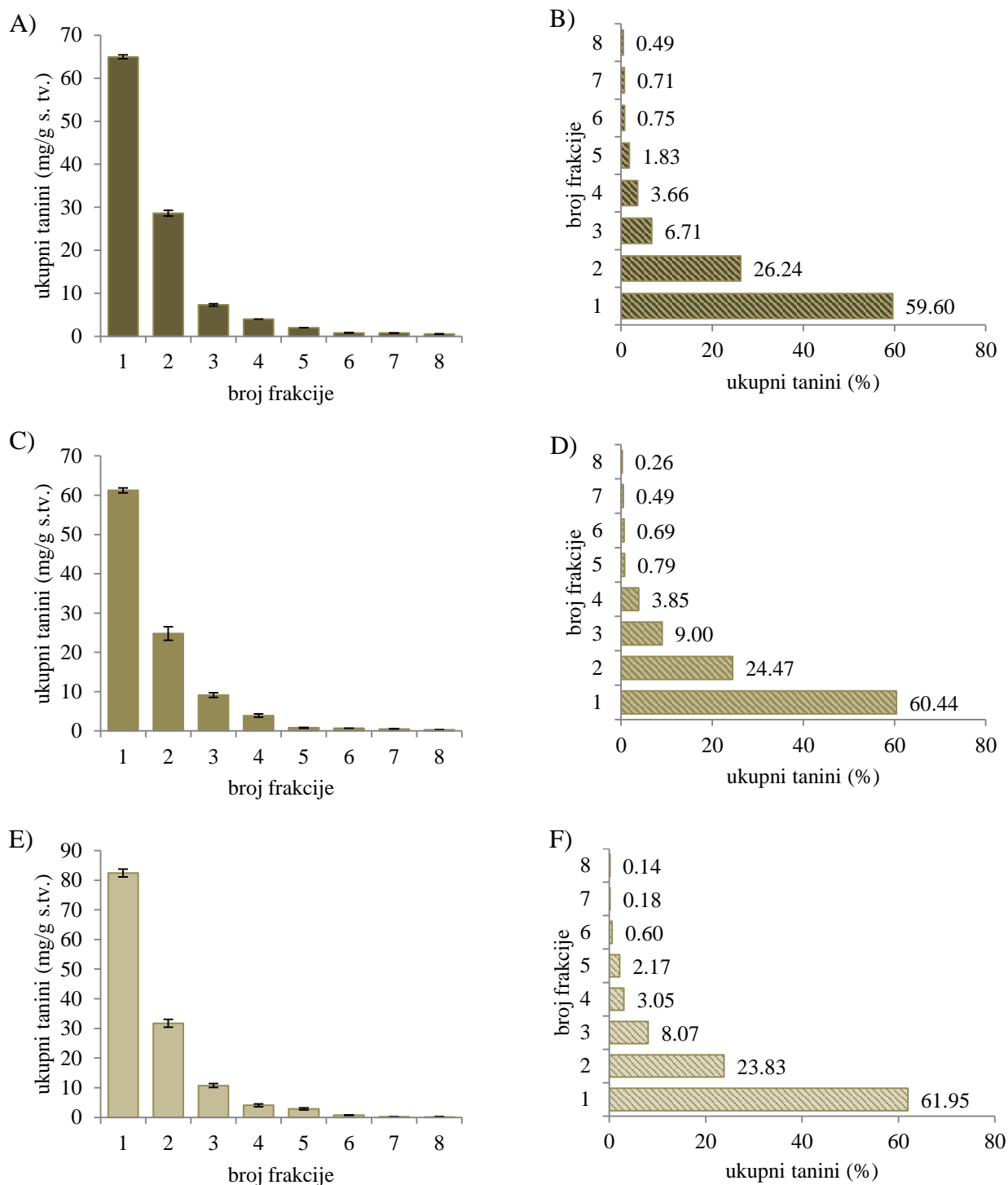
Sastav slobodnih antocijana određen je HPLC analizom i prikazan u Tablici 6, dok je udio ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata te antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata prikazan grafički na Slici 7. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije.

5.1. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih polifenola u pokožici komine grožđa



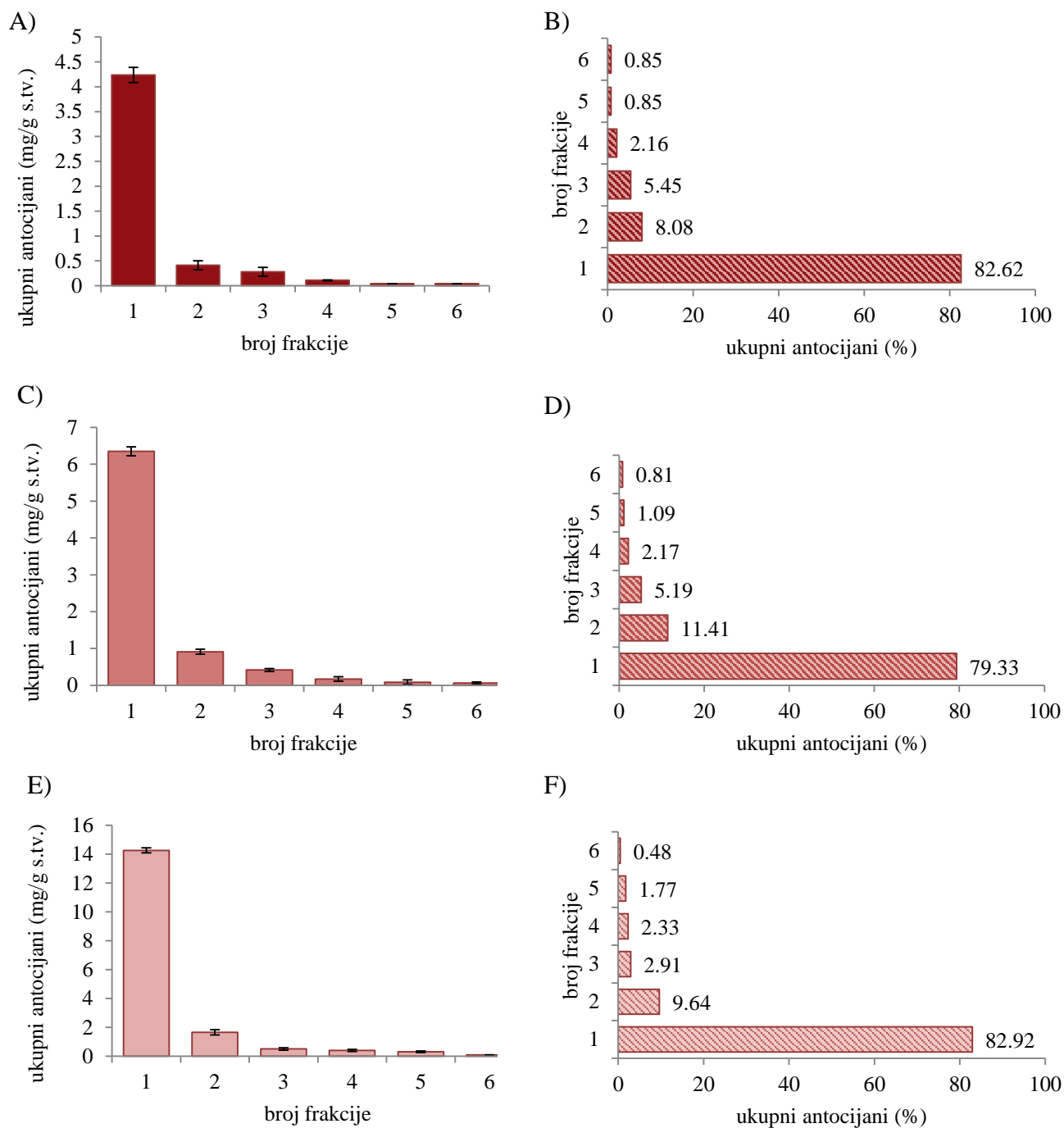
Slika 3. Dinamika ekstrakcije ukupnih polifenola pokožice komine grožđa sorti: Cabernet Sauvignon (A), Merlot (C) i Teran (E) te udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva po pojedinoj frakciji, pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon (B), Merlot (D) i Teran (F) dobivenih primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije mikrovalovima

5.2. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih tanina u pokožici komine grožđa



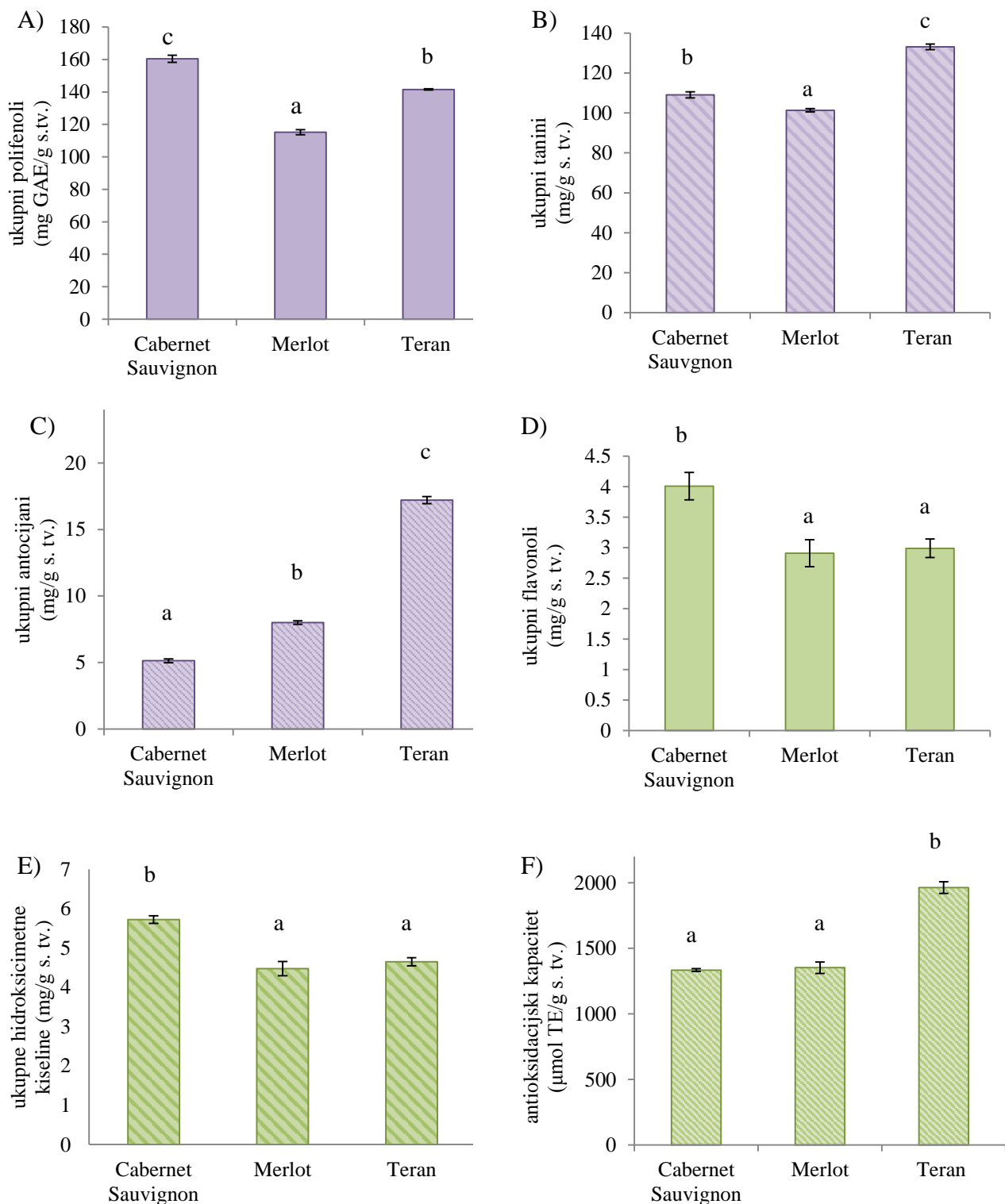
Slika 4. Dinamika ekstrakcije ukupnih tanina pokožice komine grožđa sorti: Cabernet Sauvignon (A), Merlot (C) i Teran (E) te udio ekstrahiranih tanina po pojedinoj frakciji, pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon (B), Merlot (D) i Teran (F) dobivenih primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije mikrovalovima

5.3. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih antocijana u pokožici komine grožđa



Slika 5. Dinamika ekstrakcije ukupnih antocijana pokožice komine grožđa sorti: Cabernet Sauvignon (A), Merlot (C) i Teran (E) te udio ekstrahiranih antocijana po pojedinoj frakciji, pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon (B), Merlot (D) i Teran (F) dobivenih primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije mikrovalovima

5.4. Udio ukupnih polifenola, tanina, antocijana, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu pokožice komine grožđa

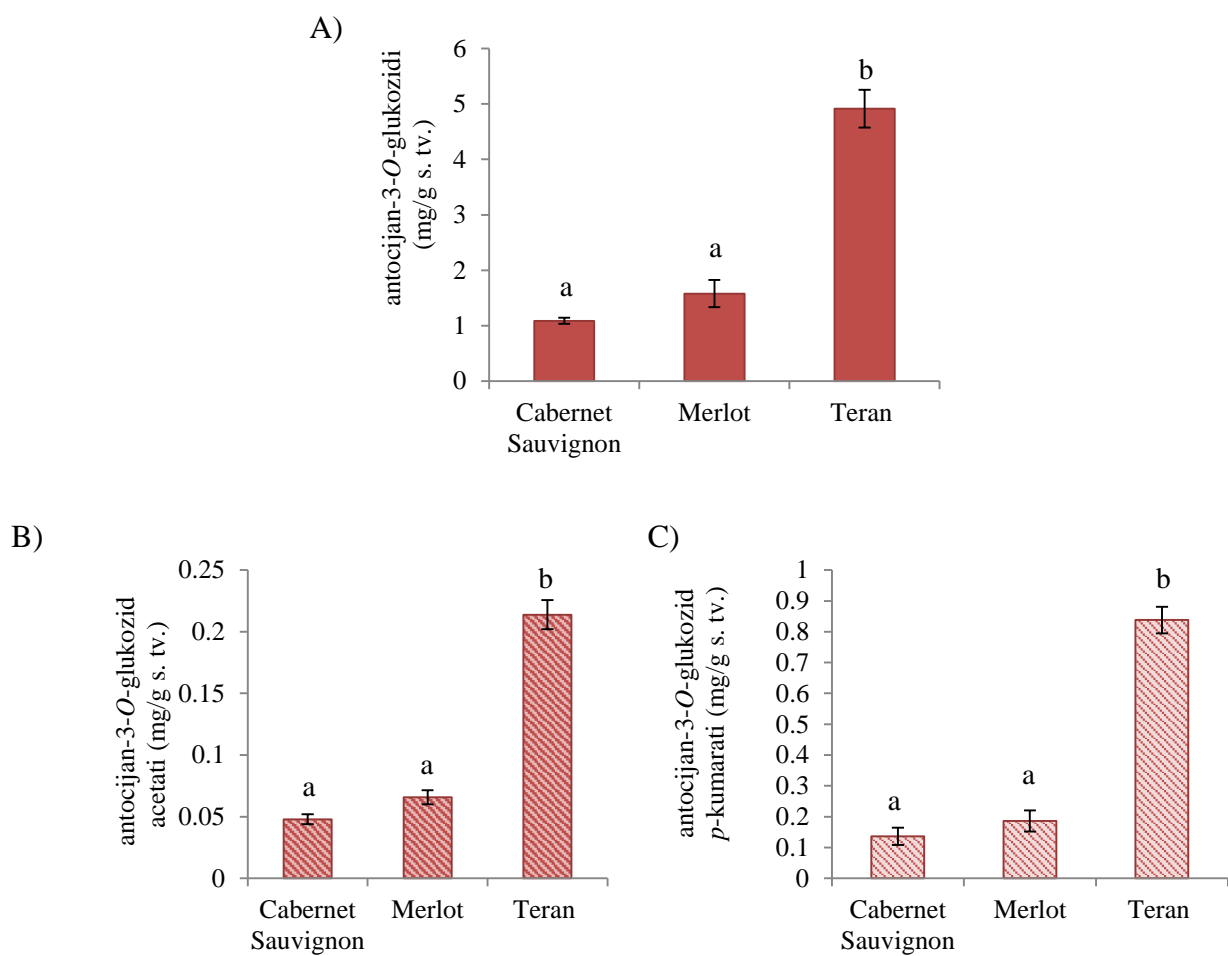


Slika 6. Udio ukupnih polifenola (A), ukupnih tanina (B), ukupnih antocijana (C), ukupnih flavonola (D), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (E) i antioksidacijski kapacitet- ORAC vrijednost (F) u ekstraktu pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran dobivenih primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije mikrovalovima

5.5. Udio slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice komine grožđa

Tablica 6. Sadržaj slobodnih antocijana (mg/g s.tv.) u ekstraktu pokožice grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran.

Slobodni antocijani	Cabernet Sauvignon	Merlot	Teran
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,088±0,006 ^a	0,199±0,035 ^a	0,651±0,080 ^b
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,017±0,001 ^a	0,049±0,010 ^{ab}	0,062±0,010 ^b
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,068±0,004 ^a	0,169±0,027 ^a	0,578±0,072 ^b
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,077±0,003 ^a	0,182±0,033 ^{ab}	0,283±0,042 ^b
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,838±0,042 ^a	0,981±0,139 ^a	3,340±0,437 ^b
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	0 ^a	0,004±0,005 ^a	0,008±0,001 ^a
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	0,028±0,001 ^a	0,023±0,008 ^a	0,083±0,003 ^b
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	0,020±0,005 ^a	0,039±0,004 ^a	0,123±0,030 ^b
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0 ^a	0 ^a	0,013±0,003 ^b
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0 ^a	0,008±0,001 ^b	0 ^a
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0,011±0,002 ^a	0,040±0,006 ^b	0,118±0,007 ^c
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0,016±0,003 ^a	0,031±0,006 ^a	0,070±0,004 ^b
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0,109±0,023 ^a	0,108±0,020 ^a	0,637±0,029 ^b



Sika 7. Udio ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (A), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (B), antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (C) u ekstraktu pokožice grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran

6. RASPRAVA

6.1. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih polifenola u pokožici komine grožđa

Liofilizirane usitnjene pokožice komine grožđa triju sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran, podvrgnute su mikrovalovima potomognutoj ekstrakciji polifenola primjenom 100 % metanola zakiseljenog dodatkom 1 % klorovodične kiseline, pri temperaturi 60°C u ekstrakcijskom vremenu od 16 minuta (ranije definirani optimalni uvjeti jednog ciklusa ekstrakcije). U prethodnim znanstvenim istraživanjima provedena je jednostruka, mikrovalna ekstrakcija prilikom čega su samo djelomično izolirani zaostali bioaktivni spojevi (Casazza i sur., 2010; Medouni-Adrar i sur., 2015; Hay-bo i sur., 2014; Krishnaswamy i sur., 2013; Li i sur., 2011; Drosou i sur., 2015). Stoga je cilj ovog istraživanja bio provesti cjelovitu ekstrakciju polifenolnih spojeva, prilikom čega je praćena dinamika ove ekstrakcije, na način da je određen udio ekstrahiranih ukupnih polifenola nakon svakog uzastopnog ciklusa, odnosno u svakoj pojedinoj frakciji. Na temelju rezultata tih analiza, proces ekstrakcije polifenola zaustavljen je tek nakon osam ekstrakcijskih ciklusa gdje je ostvaren prinos manji od 1 % ukupno prisutnih polifenola.

Dobiveni rezultati dinamike ekstrakcije ukupnih polifenola te njihovog udjela po pojedinoj frakciji pokožice komine ove tri crne sorte prikazani su na grafovima A-F (Slika 3). Dinamika ekstrakcije upućuje na to da je količina ekstrahiranih polifenolnih spojeva u sva tri slučaja, odnosno kod sve tri sorte komine podjednaka, a najveća u prvom ekstrakcijskom ciklusu, značajno manja u drugom i dalje redom pada sve do količine koja predstavlja manje od 1 % ukupno ekstrahiranih polifenola.

Važnost primjene višestrukog cikličkog procesa ekstrakcije vidljiva je na Slici 3, grafovi B, D i F. Udio ekstrahiranih ukupnih polifenolnih spojeva u prvom ciklusu kreće se ovisno o sorti od 45,92- 51,06 %, što nije zadovoljavajuće i stoga bi isplativost primjene takvog postupka u industriji bila upitna. U drugom ciklusu, ekstrahira se dodatnih 20,12-23,14 % polifenola. Primjenom tri uzastopna ciklusa ekstrahira se ukupno 82 % željenih komponenti, u slučaju četiri ciklusa gotovo 90 % željenih komponenti, primjenom 6 uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa ekstrahira se vrlo značajan udio od oko 97 % prisutnih polifenola, dok se u osmom ciklusu svi polifenoli ekstrahiraju u potpunosti.

Također, rezultati pokazuju značajne razlike među mogućnostima i efikasnosti ekstrakcije pokožice komine različitih crnih sorti. Najznačajniji sadržaj polifenolnih komponenti prisutan je kod sorte Cabernet Sauvignon, no u prvom ciklusu ekstrahira se tek

73,65 mg GAE/g s.tv. odnosno 45,92 % od ukupno ekstrahiranih polifenola, što u 6 ciklusa dovodi do 97,54 %. S druge strane, sorta Teran pokazuje nešto manje vrijednosti ukupno ekstrahiranih polifenola, no količina ekstrahirana u prvom ciklusu je za oko 3 % veća nego kod sorte Cabernet Sauvignon. Na to bi mogli utjecati razlike među sortama, klimatskim uvjetima, veličini čestica supstrata te prikladnost odabranog otapala i ostalih uvjeta ekstrakcije (Casazza i sur., 2010; Medouni-Adrar i sur., 2015; Hay-bo i sur., 2014; Krishnaswamy i sur., 2013; Li i sur., 2011; Drosou i sur., 2015). Daljnja dinamika ekstrakcije ne razlikuje se značajno od dinamike ekstrakcije pokožice sorte Cabernet Sauvignon, čime se samo potvrđuje važnost ekstrakcije u više uzastopnih ciklusa. Iz pokožice sorte Merlot ekstrahirana je najmanja količina polifenola, no graf F (Slika 3) pokazuje da se u prvom ciklusu ekstrahira čak 2-5 % više ukupnih polifenola uspoređujući sa ostale dvije sorte. Kroz ostale cikluse dobiveni udio pomalo se smanjuje sve dok se u osmom ciklusu ekstrahira vrlo mala količina koja gotovo da i nema važnost za efikasnost procesa.

6.2. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih tanina u pokožici komine grožđa

Ekstrakcija tanina iz pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran provedena je pod istim uvjetima kao i postupak ekstrakcije polifenola (opisano u poglavlju 6.1.). Praćenjem dinamike procesa zaključeno je kako se ukupna količina ekstrahira unutar osam uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa prilikom čega se bitno uvećava efikasnost procesa s obzirom na one ekstrakcije koje primjenjuju samo jedan ciklus.

Dinamika ekstrakcije ukupnih tanina te udio ekstrahiranih tanina po pojedinoj frakciji za sve tri sorte prikazani su na Slici 4. Očito je kako primjenjeni optimalni uvjeti izrazito pogoduju ekstrakciji tanina. Količine ekstrahirane u prvom ciklusu procesa, kreću se, ovisno o sorti od 61,2-82,4 mg/g s.tv., što je značajno više u usporedbi sa prvim ciklusom ekstrakcije polifenola. U drugom ciklusu, ekstrahirana količina tanina smanjuje se 2-3 puta i iznosi od 24,8-31,7 mg/ g s.tv. što predstavlja udio od 23,8-26,2 % ukupno ekstrahiranih tanina. U daljnim ciklusima ekstrahira se redom od 6,71-9 % u trećem ciklusu pa 0,1-0,5 % u osmom ciklusu. Može se zaključiti kako je prilikom ekstrakcije pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon i Teran, glavna količina tanina ekstrahirana već unutar prvih pet ciklusa (98,0-99,1 %) i kako ostala tri ciklusa nemaju onoliko važnost kao kod ekstrakcije ukupnih polifenola. Najveći sadržaj tanina zabilježen je kod pokožice native sorte Teran, gdje se u prvom ciklusu

ekstrahira najveći udio u usporedbi sa ostalim sortama (61,95 %), odnosno količina od 82,44 mg/g s.tv.. Kao što je rečeno, čak 99,07 % tanina ekstrahira se već u prvih 5 ciklusa, dok u ostala 3 ciklusa samo 0,93 %. Signifikantno manji udio tanina nalazi se u pokožici komine sorte Cabernet Sauvignon gdje dinamika slična kao i kod sorte Teran. Pokožica komine grožđa Merlot pokazala je najmanji udio tanina. Ekstrakcija pokožice komine sorte Merlot nešto je brža i pokazuje kako se 98,55 % od ukupno ekstrahiranih tanina ekstrahira već u prva četiri ciklusa.

6.3. Dinamika ekstrakcije i udio ekstrahiranih antocijana u pokožici komine grožđa

Ekstrakcija ukupnih antocijana iz pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran provedena je primjenom prethodno definiranih optimalnih uvjeta. Ti uvjeti se djelomično razlikuju od onih primjenjenih kod ekstrakcije polifenola i tanina, a prilagođeni su za ostvarivanje što veće efikasnosti procesa. Spomenuti uvjeti odnose se na primjenu 92 % metanola zakiseljenog dodatkom 0,6 % klorovodične kiseline, pri temperaturi 45°C kroz 16 minuta. Tijekom cijelog procesa ekstrakcije praćeni su dinamika ekstrakcije te udio ekstrahiranih antocijana po pojedinoj frakciji na temelju čijih rezultata je odabran ukupan broj ciklusa potrebnih za potpunu ekstrakciju prisutnih antocijana.

Kontinuirana ciklička ekstrakcija antocijana provedena je u 6 ciklusa. Razlog manjem broju primjenjenih ciklusa spram onog broja u prijašnjim ekstrakcijama (poglavlje 6.1. te 6.2.) je u tome što se već u prvom ciklusu ekstrahira od 79,33 % kod sorte Merlot pa do 82,92 % kod sorte Teran, dok se u drugom ciklusu ekstrahirana količina smanjuje čak 7-10 puta od one ekstrahirane u prvom (8,08-11,41 mg/g s.tv.). Nadalje, u svakom sljedećem ciklusu, ekstrahirane količine antocijana padaju, a proces ekstrakcije zaustavljen je kao i u slučaju polifenola i tanina, kada udio ekstrahiranih antocijana u tom ciklusu čini manje od 1% ukupno ekstrahiranih antocijana.

Unatoč manjem količinskom prinosu željene komponente, primjenom ove šesterostruke, cikličke ekstrakcije ekstrahira se oko 17 % više antocijana prisutnih u pokožici sorti Teran i Cabernet Sauvignon te nešto više od 20,5 % antocijana sorte Merlot, nego primjenom samo jednostrukog tipa ekstrakcije.

Dinamika ekstrakcije antocijana kod svih je sorti približno podjednaka pri čemu se vide male razlike u količini, odnosno udjelu antocijana ekstrahiranih prilikom određenih ciklusa. No, smatra se kako su ovoliko dobri rezultati ekstrakcije upravo rezultat odlično postavljenih uvjeta koji pogoduju stabilnosti i kvaliteti dobivenog ekstrakta.

6.4. Udio ukupnih polifenola, tanina, antocijana, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu pokožice komine grožđa

Ekstrakcija ukupnih polifenola (A), ukupnih tanina (B), ukupnih antocijana (C), ukupnih flavonola (D), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (E) i određivanje antioksidacijskog kapaciteta-ORAC vrijednosti (F) pokožice komine sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran provedeno je primjenom optimalnog broja ciklusa ekstrakcije mikrovalovima prema ranije navedenim uvjetima ekstrakcije (Slika 6).

Sastav ukupnih polifenola u tri sorte prikazan je na Slici 6 (A). Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako je signifikantno viša količina polifenola, spram preostale dvije sorte, ekstrahirana iz pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon (160,4 mg GAE/g s.tv.). Značajno manja količina određena je u uzorku sorte Teran (141,5 mg GAE/g s.tv.), a još manja u sorti Merlot (115,2 mg GAE/g s.tv.). Yilmaz i Toledo (2006) i Deng i sur. (2011) su u svojim istraživanjima također analizirali sorte Cabernet Sauvignon i Merlot. Količina ukupnih polifenola u pokožici komine sorte Merlot u radovima varira između 15-25 mg GAE/g s.tv. što je značajno manje spram rezultata dobivenih u ovom radu. Isti trend je zabilježen i prilikom analize ukupnih polifenola pokožice sorte Cabernet Sauvignon (12,7-26,7 mg GAE/g s.tv.). Bliske vrijednosti spomenutima u svojim su istraživanjima za *Vitis vinifera* L. sorte odredili Ky i sur., (2014), a one se kreću od 11,8 mg GAE/ g s.tv. kod sorte Grenache pa do 31,6 mg GAE/g s.tv. kod sorte Alicante Bouchet. Nešto veći udio polifenola, zabilježili su Iora i sur., (2014) te Rockenbach i sur., (2011b) za sorte Merlot i Cabernet Sauvignon, ali analizirajući cjelovitu kominu grožđa, gdje udio polifenola za sortu Merlot iznosi 37,6-46,2 mg GAE/g s.tv., a za sortu Cabernet Sauvignon 51,0-74,8 mg GAE/g .stv. Također, provedena istraživanja crnih sorti pokazala su kako je sjemenka komine nešto bogatija polifenolima i taninima nego pokožica, zbog čega takav ekstrakt ima i veći antioksidacijski kapacitet (Yilmaz i Toledo, 2006; Casazza i sur., 2010; Ky i sur., 2014).

Najveći sadržaj polifenola i svakako najviši antioksidacijski kapacitet detektirali su Tournour i sur., (2015) u portugalskim sortama Touringa Franca i Touringa Nacional.

Usporedbom naših sa dosadašnjim istraživanjima mikrovalima potpomognute ekstrakcije na pokožici komine grožđa (Tablica 3) vidljive su razlike u dobivenim rezultatima, primarno zbog drugačijih specifičnih ciljeva rada, različitosti sorti na kojima je istraživanje vršeno te nadalje različitosti postavljenih procesnih parametara. Istraživanje koje su na pokožici komine grožđa proveli Casazza i sur., (2010) pokazalo je relativno niske vrijednosti ekstrahiranih polifenola (5,6-7,3 mg GAE/g s.tv.) u usporedbi sa onima dobivenim u ovom istraživanju. Mali prinosi ekstrakta mogu se opravdati primjenom vrlo oštih uvjeta koji podrazumijevaju dvostruku veću temperaturu, gotovo 4 puta dulje vrijeme ekstrakcije nego što je to slučaj u ovom radu, a s druge strane značajno manju snagu mikrovalova. Pedroza i sur., (2015), Hai-bo i sur., (2014) i Medouni-Adrar i sur., (2015) prilikom istraživanja na pokožici komine grožđa koriste vrlo visoke snage mikrovalova, mješovita otapala te relativno kratko vrijeme tretiranja prilikom čega postižu vrijednosti ukupno ekstrahiranih polifenola od 5,5-55,8 mg GAE/g s.tv..

Slika 6 (B) prikazuje kako je značajno veći sadržaj tanina ekstrahiran iz uzorka pokožice komine sorte Teran (133,1 mg/g s.tv.), nešto manji udio iz sorte Cabernet Sauvignon (109,0 mg/g s.tv.), dok je statistički najmanje značajan udio prisutan u pokožici komine sorte Merlot (101,3 mg/g s.tv.). Usporedbom sa vrijednostima prikazanim u Tablici 2, vidljivo je kako su vrijednosti dobivene ovim istraživanjem puno veće i značajnije. Razlog tome, vjerovatno je korištenje drukčijih procesnih uvjeta te primarno, različitost metoda ekstrakcije. Yilmaz i Toledo, (2006) i Deng i sur., (2011), u svojim radovima koriste vrlo blage temperature te mješovita otapala, uslijed čega dobivene količine tanina variraju između 7,7-24,1 mg/g s.tv., a izmjereni antioksidacijski kapacitet takvog ekstrakta vrlo je nizak. To upućuje na to, da primjena nešto agresivnijih uvjeta, poput onih korištenih u ovom radu daje bolje rezultate.

Rezultati ukupno ekstrahiranih antocijana pokazuju signifikantno višu količinu ekstrahiranih komponenti za pokožicu sorte Teran (17,2 mg/g s.tv.), nešto niži udio antocijana ekstrahiran je kod sorte Merlot (8,0 mg/g s.tv) te najniži kod sorte Cabernet Sauvignon (5,1 mg/g s.tv.). Nadalje, usporedbom grafova primjećena je značajnija razlika u sastavu ukupno ekstrahiranih antocijana sorti Cabernet Sauvignon i Merlot nego što je to u slučaju slobodnih antocijana po skupinama, gdje se određene količine samo blago razlikuju. Deng i sur., (2011)

su u svom istraživanju dobili značajno manji udio ukupnih antocijana i ukupnih tanina za sorte Cabernet Sauvignon i Merlot. S druge strane, više vrijednosti antocijana, u istraživanju Ky i sur., (2014), pokazale su pokožice komine sorti Carignan Noir te Alicante Bouchet, a dobivene količine kreću se od 7,1 mg/g s. tv. pa do 10 mg/g s. tv.. Nešto manje vrijednosti antocijana dobivene su provođenjem mikrovalovima potpomognute ekstrakcije na pokožici komine sorte Shanani primjenom 50 % etanola, uz snagu mikrovalova 540 W, pri 50°C te vrlo kratkom vremenu ekstrakcije (Ghassempour i sur., 2008).

Značajno veći udio analiziranih ukupnih flavonola (Slika 6, D) i hidroksicimetnih kiselina (Slika 6, E) zamjećen je kod sorte Cabernet Sauvignon (4,0 mg/g s.tv. i 5,7mg/g s.tv.), dok s druge strane sorte Merlot (2,9 mg/g s.tv. i 4,5mg/g s.tv.) i Teran (3,0 mg/g s.tv. i 4,7 mg/g s.tv.) pokazuju manji udio tih komponenti, iako je njihov udio, u oba slučaja, blago viši kod pokožice sorte Teran.

6.5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta pokožice komine grožđa

Antioksidacijski kapacitet u ovom radu određen je ORAC metodom. Najveći antioksidacijski kapacitet (ORAC broj) utvrđen je u ekstraktu pokožice komine grožđa sorte Teran i iznosi 1963,4 $\mu\text{mol TE/g s. tv.}$, dok između sorti Cabernet Sauvignon (1334,4 $\mu\text{mol TE/g s. tv.}$) i Merlot (1352,4 $\mu\text{mol TE/g s. tv.}$) nisu utvrđene značajne razlike. Iako je već prije u radovima zaključeno kako je za očekivati da će antioksidacijski kapacitet ekstrakata cjelovite komine ili sjemenki komine imati nešto veće vrijednosti nego onaj pokožice (Ky i sur., 2014), u našem slučaju dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (ORAC) puno su veće od onih dobivenih prijašnjim istaživanjima pokožice crnih sorti koje se kreću od 69,8 do 531,9 $\mu\text{mol TE/g s. tv.}$ (Yilmaz i Toledo, 2006; Deng i sur., 2011; Casazza i sur., 2010; Ky i sur., 2014). Dobiveni rezultati najbliži su istraživanju provedenom na cjelovitoj komini autohtonih portugalskih sorti (Touringa Franca, Touringa Nacional) čiji se antioksidacijski kapacitet kreće od 1325 do 2337 $\mu\text{mol TE/g s. tv.}$ (Tournour i sur, 2015).

Kod istraživanja bijelih sorti najveći antioksidacijski kapacitet je zabilježen kod sjemenki (Yilmaz i Toledo, 2006). S obzirom na rezultate ovog rada i zaključke koje su u svojim radovima iznijeli Ky i sur., (2014) može se potvrditi povezanost prisutnosti velike

količine antocijana i tanina u ekstraktu sa nešto višim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta.

Općenito, uspoređujući dobivene rezultate sa rezultatima navedenim u Tablici 2., vidljivo je kako je iz pokožice grožđa crnih sorti ekstrahirano značajno manje ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana te je zamjećena signifikantno manja vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u pokožici komine. Razlog tomu su različite metode ekstrakcije. U radovima navedenim u Tablici 2. istraživanja su provedena uglavnom primjenom konvencionalnih metoda ekstrakcije sa različitim mješovitim otapalima, što ukazuje na to kako je ekstrakcija mikrovalovima vrlo učinkovita metoda, a prinos, uz dobro postavljene procesne uvjete, značajno veći spram konvencionalnih metoda.

6.6. Udio slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice komine grožđa

Sastav 13 slobodnih antocijana (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-glukozid acetat, peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat, delfinidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, cijanidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, petunidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima ekstrakata pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a dobiveni rezultati sastava prikazani u Tablici 6. Sastavu ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata te antocijan-3-*O*-glukozid kumarata prikazan je na Slici 7.

Malvidin-3-*O*-glukozid najdominantniji je slobodni antocijan u sve tri sorte (Tablica 6). Sastav slobodnih antocijana, u kojem 38-49 % slobodnih antocijana zauzima upravo malvidin-3-*O*-glikozid, karakterističan za sve *Vitis vinifera* L. sorte (Ky i sur., 2014). Također, dobiveni rezultati i zaključci podudaraju se sa onima dobivenim istraživanjem sastava slobodnih antocijana pokožice crne sorte koje su proveli Liazid i sur., (2011) te Hermosin Gutierrez i sur., (2004). Nativna sorta Teran najdominantnija je u sadržaju slobodnih antocijana, te sadrži signifikantno veće koncentracije svih određenih slobodnih pojedinačnih antocijana osim delfinidin-3-*O*-glukozid acetata. Usporedbom sastava slobodnih antocijana sorti Cabernet Sauvignon i Merlot vidljivo je kako Merlot sadrži blago više koncentracije cijanidin-3-*O*-glukozida i peonidin-3-*O*-glukozida u skupini slobodnih

antocijan-3-*O*-glukozida, kao i cijanidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata te petunidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata

Sumirano, pokožica komine sorte Teran pokazala je značajno veći udio ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata te antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u svom ekstraktu nego ostale dvije sorte, gdje su udjeli kod sorte Merlot nešto veći. Vidljivo je kako u sve tri istraživane sorte prevladava udio slobodnih antocijan-3-*O*-glukozidi (Slika 7). Njihov sadržaj kreće se od 1,09 mg/g s.tv. kod sorte Cabernet Sauvignon pa do visokih 4,91 mg/g s.tv kod native sorte Teran. Antocijan-3-*O*-glukozid acetati najmanje su zastupljeni, a njihov udio varira od 0,05 mg/g s.tv. kod sorte Cabernet Sauvignon, 0,07 mg/g s.tv. kod sorte Merlot te 0,21 mg/g s.tv. kod sorte Teran. Sadržaj antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata kreće se od 0,14 mg/g s.tv, također kod sorte Cabernet Sauvignon do 0,83 mg/g s.tv. kod sorte Teran.

7. ZAKLJUČCI

1. Primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spjeva pokožice komine grožđa pokazala se izrazito efikasnom obzirom na smanjeno vrijeme ekstrakcije i visoki prinos.
2. Praćenjem dinamike ekstrakcije po prvi puta utvrđen je broj uzastopnih ekstrakcijskih ciklusa kod mikrovalovima potpomognute ekstrakcije koji je potrebno primijeniti za potpunu ekstrakciju pojedinih polifenolnih spojeva, što je izrazito važno zbog potencijala primjene ove metodologije ekstrakcije u analitičke svrhe.
3. Optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina pokožice komine grožđa jesu: primjena 8 ekstrakcijskih ciklusa sa 100 % metanolom uz dodatak 1 % klorovodične kiseline pri temperaturi 60 °C u vremenu od 16 minuta.
4. Optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih i slobodnih antocijana pokožice komine grožđa jesu: primjena 6 ekstrakcijskih ciklusa sa 92 % metanolom uz dodatak 0,6 % klorovodične kiseline pri temperaturi od 45 °C u vremenu od 16 minuta.
5. Pokožica komine grožđa Cabernet Sauvignon pokazala je signifikantno veći udio ukupnih polifenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina od pokožice komine grožđa Merlot i Teran.
6. Pokožica komine grožđa Teran pokazala je signifikantno veći udio ukupnih polifenola od sorte Merlot, dok u sastavu flavonola i hidroksicimetnih kiselina između dvije sorte nisu utvrđene značajne razlike.
7. Pokožica komine grožđa Teran pokazala je signifikantno veći udio ukupnih tanina i ukupnih i slobodnih antocijana od pokožice komine grožđa Cabernet Sauvignon i Merlot.
8. Udio tanina u pokožici komine grožđa Cabernet Sauvignon bio je značajno veći od onog u pokožici komine grožđa Merlot, dok je u sastavu ukupnih antocijana utvrđen obratan trend, ali bez značajnih razlika u udjelu slobodnih antocijana između dvije sorte.

9. Najviši antioksidacijski kapacitet (ORAC) utvrđen je u ekstraktu pokožice komine grožđa sorte Teran, dok između sorti Merlot i Cabernet Sauvignon nisu utvrđene značajne razlike.

10. Pokožica komine grožđa native sorte Teran pokazala je superiornost u udjelu antocijana, tanina te antioksidacijskom kapacitetu u odnosu na introducirane sorte Cabernet Sauvignon i Merlot.

8. ZAHVALE

Od srca zahvaljujemo našoj dragoj mentorici prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić na povjerenju i ukazanoj prilici za izradu ovog istraživanja te pomoći tijekom pisanja i izrade rada.

Iskreno se zahvaljujemo i dr.sc. Natki Ćurko na iznimnom trudu, usmjeravanju, pruženoj pomoći i uloženom vremenu.

9. POPIS LITERATURE

- Adams, D. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **3**, 249–256.
- Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., Tringali, C. (2008) Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* **99**, 5960–5966.
- Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., Tringali, C. (2004) Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar “Nerello Mascalese”. *Food Chem.* **88**, 599–607.
- Amr, A. i Al-Tamimi, E. (2007) Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *J. Food Sci. Tech.* **42**, 985–991.
- Arts, I. C., Hollman, P. C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 317–325.
- Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006) Wine waste treatment methodology. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 1117–1151.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. (2005) Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem.* **90**, 293–301.
- Baiano, A., Bevilacqua, L., Terracone, C., Conto, F., Del Nobile, M. A. (2014) Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *J. Food Eng.* **120**, 135-145.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203.
- Bhattacharya, S. (2015) *Conventional and Advanced Food Processing Technologies*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, str. 131.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.
- 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.

- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355–362.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J. L. (2002) Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal* **13**, 162–169.
- Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macrì F. (2008) Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal. Behav.* **3**, 626–632.
- Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303-311.
- Caridi, D., Trenerry, V. C., Rochfort, S., Duong, S., Laughher, D., Jones, R. (2007) Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **105**, 691–699.
- 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.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859–871.
- Castellarin, S. D., Bavaresco L., Falginella L., Gonçalves M. I. V. Z., Di Gaspero G. (2012) Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. U: The Biochemistry of the grape berry. Bentham Science (Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., ured.) Bentham Science, Bussum, 89–110.
- Castilla, P., Echarri, R., Davalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., Lucas, M. F., Gomez-Coronado, D., Ortuno, J., Lasuncion, M. A. (2006) Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 252–262.
- Chemat, S., Lagha, A., Amar, H. A., Chemat F. (2004) Ultrasound assisted microwave digestion, *Ultrason. Sonochem.* **11**, 5-8.

Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A. C. P., Tavares R. M., Sousa M. J., Agasse A., Delrot S., Gerós H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*. **1**, 1–22.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules*. **15**, 7313-7352.

Dai, Y. M., Chen, K. T., Chen, C. C. (2014) Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. *Chem. Eng. J.* **250**, 267–273.

Deng, Q., Penner, M. H., Zhao, Y. (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int.* **44**, 2712-2720.

Di Lecce, G., Arranz, S., Jáuregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventós, R. M. (2014) Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **145**, 874–882.

Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M. (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind. Crops Prod.* (article in press)

Escarpa, A., González, M. C. (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J. Chromatogr. A.* **823**, 31–37.

Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C. (2003) Polyphenol extraction from foods. U: Methods in polyphenol analysis (Santos-Buelga, C. i Williamson G., ured.), The Royal Society of Chemistry, Ujedinjeno kraljevstvo, 1-16.

Evans, P., Halliwell, B. (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* **85**, 67–74.

Fang, Y, Yang S, Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-879.

FAOSTAT-FAO Statistical Database (2016), Food and Agriculture Organization of the United Nations , <<http://www.fao.org>>.

- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chrom. A.* **798**, 179–186.
- Fontana, A. R., Antonilli, A., Bottini, R. (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8989–9003.
- Franco-Vega, A., Ramirez-Corona, N., Palou, E., Lopez-Malo, A. (2016) Estimation of mass transfer coefficients of the extraction process of essential oil from orange peel using microwave assisted extraction. *J. Food Eng.* **170**, 136-143.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454-457.
- Garcia-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibanez, E., Garcia-Moreno, C. (2006) Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery byproducts using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 44–50.
- Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844–1858.
- Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Choi, Y. H. (2011) Effects of grape (*Vitis Labrusca B.*) peel and seed extracts on Phenolics, Antioxidants and Anthocyanins in Grape juice. *Pakistan J. Botany* **43**, 1581-1586.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., Jo, I. H. (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4988–4994.
- Ghassempour, A., Heydari, R., Talebpour, Z., Fakhari, A. R., Davies, N., Aboul-Enein, H. Y. (2008) Study of New Extraction Methods for Separation of Anthocyanins from Red Grape Skins: Analysis by HPLC and LC-MS/MS. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **31**, 2686-2703.
- González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Fermentia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P. L. (2012) Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking

byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11850–11858.

Grlic, M., Likozar, B., Levec, J. (2014) Kinetic model of homogeneous lignocellulosic biomass solvolysis in glycerol and imidazolium-based ionic liquids with subsequent heterogeneous hydrodeoxygenation over NiMo/Al₂O₃ catalyst. *Biomass Bioenerg.* **63**, 300-312.

Hai-bo, Y., Li-feng, D., Zheng, W., Li-xin, S. (2014) Study on Extraction of Polyphenol from Grape Peel Microwave assisted Activity. *Adv.Mat. Res.* **864-867**, 520-525.

Halliwell, B. (1989) Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: What is its mechanism of action. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 645–651.

Hermosin Gutierrez, I., Garcia-Romero, E. (2004) Anthocyanins of red wine grape cultivars grown in the Spanish region of La Mancha: Characteristic cultivar patterns of grapes and single cultivar wines and evolution during the ripening of the berry. *Alimentaria* **41**, 127–139.

Howard, L. R., Clark, J. R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247.

Hui, L., Bo, C., Shouzhuo, Y. (2005) Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). *Ultrasonics Sonochem.* **12**, 295–300.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.

Iora, S. F. R., 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. Tech.* **50**, 62-69.

Jose Jara-Palacios, M., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J. (2014) Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Res. Inter.* **66**, 150-157.

Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4016–4021.

- Kennedy J. A., Saucier C., Glories Y. (2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* **3**, 20–21.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Techn.* **47**, 85–89.
- Konczak, I., Zhang, W. (2004) Anthocyanins-more than nature colours. *J. Biomed. Biotech.* **5**, 239–240.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., Thangavel., K. (2013) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess. Technol.* **6**, 441-455.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P. L. (2014) Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different french grape varieties. *Molecules* **19**, 482–506.
- 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., Golc, Wondra. A. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214–222.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., Taylor, D. K. (2011) Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.* **129**, 570-576.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731–737.
- Licul, R., Premužić, D. (1993) *Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo*, Nakladni zavod Znanje, Zagreb.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P. L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.

- Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A. (2006) Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 205–211.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7–18.
- Mattina, M. J. I., Berger, W. A. I., Denson, C. L. (1997) Microwave assisted extraction of taxanes from *Taxus* biomass. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4691–4696.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692–7702.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999) Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4009–4017.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993) Grapes. U: Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains, 6.izd., CRC Press, Boca Raton, 149-199.
- Medouni-Adrar, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Cadot, Y., Medouni-Haroune, L., Dahmoune, F., Makhoukhe, A., Madani, K. (2015) Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind. Crops Prod.* **77**, 123-132.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. (2000) Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *J. Agri. Food Chem.* **48**, 577–599.
- Meyer, A. S., Heinonen, M., Frankel, E. N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* **61**, 71-75.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordove's, C. (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 85-118.
- Montealegre, P. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascueña, J. M., Romero, G. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687–693.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **41**, 1523–1542.

- Narobe, M., Golob, J., Klinar, D., Francetič, V., Likozar, B. (2014) Co-gasification of biomass and plastics: pyrolysis kinetics studies, experiments on 100 kW dual fluidized bed pilot plant and development of thermodynamic equilibrium model and balances. *Bioresour. Technol.* **162**, 21–29.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A. (2003) Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* **87**, 41–44.
- Pavlović, M. D., Buntić, A. V., Šiler-Marinković, S. S., Dimitrijević-Branković, S. I. (2013) Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separ. Purif. Technol.* **118**, 503-510.
- Pedroza, M. A., Amendola, D., Maggi, L., Zalacain, A., De Faveri, D. M., Spigno, G. (2015) Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Dried Waste Grape Skins. *Int. J. Food Eng.* **11**, 359-370.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., Noble, A. C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1123-1128.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S. (2006) Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 579–590.
- Prakash, M. J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar, R. (2014) Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydr. Polym.* **101**, 786-791.
- Prior, R. L., Cao, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1173–1181.
- Rajha, H. N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H. G., Maroun, R. G. (2014) 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.
- Reyes González-Centeno, M., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedr, P-L. (2013) Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts (*Vitis vinifera* L.) *J. Agric. Food Chem.* **61**, 11579–1158.

- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal. Paris.* **48**, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* **22**, 375–383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933–956.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. S. S., Fett, R. (2011b) Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem.* **127**, 174–179.
- Rodriguez, M. R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687-693.
- Rostagno, M. A., Prado, J. M. (2013) Natural product extraction: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Sano, A., Uchida, R., Saito, M., Shioya, N., Komori, Y., Tho, Y., Hashizume, N. (2007) Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53**, 174–182.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1094-1117.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Réme'sy, C., Jime'nez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287-306.
- Seixas, F. L., Fukud, D. L., Turbiani, F. R. B., Garcia, P. S., Petkowicz C. L. O., Jagadevan, S., Gimenes, M. L. (2014) Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food hydrocolloids.* **38**, 186-192.

- Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158
- Spigno, G., De Faveri, D. M. (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210–217.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grapemarc 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. Emerg. Tech.* **21**, 114–122.
- 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. of Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. of Mol. Sci.* **14**, 18711-18739.
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhaes, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., Cunha, L. M. (2015) Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind. Crops Prod* **74**, 397-406.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2007) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**, 161-169.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300–312.
- Wichi, H. P. (1988) Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 717-723.
- Yilmaz, E. E., Ozvural, E. B., Vural, H. (2011) Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* **55**, 924–928.

Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 255-260.

Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2006) Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 41–48.

Zakon o održivom gospodarenju otpadom (2013) Narodne novine 94, Zagreb

10. SAŽETAK

Primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva pokožice komine grožđa Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran

SAŽETAK:

Komina grožđa je visokovrijedan i bioaktivnim spojevima bogat nusproizvod dobiven tijekom proizvodnje vina. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost primjene mikrovalovima potpomognute ekstrakcije, posebno u segmentu neistražene uzastopne ekstrakcije u ciklusima, radi utvrđivanja polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta pokožice komine grožđa sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Teran (*Vitis vinifera* L.). U dobivenim ekstraktima triju sorti određen je sastav ukupnih polifenola, ukupnih antocijana, ukupnih tanina, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina (spektrofotometrijski), slobodnih antocijana (HPLC) te antioksidacijski kapacitet-ORAC (fluorimetrijski).

Primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva pokazala se brzom i efikasnom metodom ekstrakcije. Utvrđeni optimalni uvjeti kod ekstrakcije ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina pokožice komine grožđa su primjena 8 ekstrakcijskih ciklusa sa 100 % metanolom uz dodatak 1 % klorovodične kiseline pri temperaturi 60 °C u vremenu od 16 minuta. Utvrđeni optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih i slobodnih antocijana pokožice komine grožđa su primjena 6 ekstrakcijskih ciklusa sa 92 % metanolom uz dodatak 0,6 % klorovodične kiseline pri temperaturi od 45 °C u vremenu od 16 minuta.

Sastav polifenolnih spojeva pokožice komine grožđa i antioksidacijski kapacitet pokazali su da postoje značajne razlike među sortama. U pokožici komine grožđa Cabernet Sauvignon određen je signifikantno veći udio ukupnih polifenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u odnosu na pokožicu komine grožđa Merlot i Teran. U pokožici native sorte Teran određen je 22-27 % veći udio ukupnih tanina, 54-70 % veći udio ukupnih antocijana te oko 30 % veća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na preostale dvije sorte.

Ključne riječi: polifenolni spojevi, mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija, pokožica komine grožđa, antioksidansi

11. SUMMARY

Microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from grape skin pomace of Cabernet Sauvignon, Merlot and Teran

SUMMARY:

Grape pomace is the valuable byproduct obtained during wine production, highly rich in bioactive compounds. The aim of this research was to study the potential of microwave assistance in the extraction of polyphenolic compounds from grape skin pomace of Cabernet Sauvignon, Merlot and Teran (*Vitis vinifera* L.). Content of total polyphenols, tannins, anthocyanins, flavonols and total hydroxycinnamic acids was determined by spectrophotometry. Content of free anthocyanins was determined by HPLC, while antioxidant capacity of extract was determined by fluorimetry (ORAC).

Microwave-assisted extraction showed to be very fast and efficient technique in the extraction of grape pomace polyphenolic compounds. Optimal conditions in microwave-assisted extraction of total polyphenols, total tannins, total flavonols and total hydroxycinnamic acids showed to be 100 % methanol with the addition of 1 % hydrochloric acid and temperature of 60 °C during 16 min; repeated in 8 consecutive extraction cycles. Optimal conditions in microwave-assisted extraction of anthocyanins showed to be 92 % methanol with the addition of 0.6 % hydrochloric acid and temperature of 45 °C during 16 min; repeated in 5 consecutive extraction cycles.

Content of phenolic compounds in obtained grape skin pomace extracts, and their antioxidant capacity showed to be cultivar dependent. Among 3 studied cultivars grape skin pomace of Cabernet Sauvignon showed significantly higher content of total polyphenols, flavonols and total hydroxycinnamic acids compared to grape skin pomace of Merlot and Teran. Grape skin pomace of native cultivar Teran showed superiority as regard the 22-27 % higher content of tannins, 54-70 % higher content of anthocyanins and 30 % higher antioxidant capacity compared to Cabernet Sauvignon and Merlot.

Key words: phenolic compounds, microwave-assisted extraction, grape pomace skin, antioxidants