

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Martina Dadić

6566/PT

**PRIMJENA UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI
POVIŠENOM TLAKU U IZOLACIJI FLAVONOIDA IZ
ORGANSKOG OTAPADA OD PROIZVODNJE VINA
ZAVRŠNI RAD**

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambenatehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Labaratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

PRIMJENA UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU U IZOLACIJI FLAVONOIDA IZ ORGANSKOG OTAPADA OD PROIZVODNJE VINA

Martina Dadić

6566/PT

Sažetak: Vinska komina kao nusprodukt, koji zaostaje nakon proizvodnje vina, je bogat izvor različitih spojeva kao što su etanol, tartarati, limunska kiselina, prehrambena vlakna te sadrži visok udio fenolnih spojeva. Ubrzana ekstrakcija otapalima uz visoki tlak (ASE) je relativno nova tehnika ekstrakcije, koja se koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj polarnosti otapala (10, 30 i 50 %) i utjecaj broja ciklusa ekstrakcije (1 i 2) u trajanju od 5 i 10 min na izolaciju fenolnih spojeva iz pokožice grožđa sorte Merlot. Ukupni flavonoidi određivani su spektrofotometrijski. Najviši prinosi ukupnih flavonoida dobiveni su uz primjenu 50 %-tnog etanola pri trajanju ekstrakcije 5 minuta u jednom ciklusu.

Ključne riječi: vinska komina, flavonoidi, ubrzana ekstrakcija otapalima

Rad sadrži: 27 stranica, 5 slika, 4 tablica, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagrebu

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

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

Rad predan: srpanj, 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Final work

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Labaratory of Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

APPLICATION OF ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION WITH HIGH PRESSURE IN ISOLATION OF FLAVONOIDS FROM ORGANIC WASTE OF THE WINE PRODUCTION

Martina Dadić

6566/PT

Abstract: Grape pomace as a by-product after wine production, is a rich source of various compounds such as ethanol, tartrate, citric acid, dietary fiber and contains a high proportion of phenolic compounds. Accelerated solvent extraction with high pressure (ASE) is a relatively new technique of extraction, which is used for the isolation of bioactive compounds. The aim of this study was to research the influence of solvent polarity (10,30 and 50%) and the impact of the number extraction cycles (1:2) for 5 and 10 minutes on the isolation of phenolic compounds from of grape skins of Merlot. The total flavonoids were determined by spectrophotometry. The highest yield of total flavonoids were obtained with the use of 50% ethanol for 5 minutes duration of the extraction in a one cycle.

Keywords: grape pomace, flavonoids, accelerated solvent extraction

Thesis contains: 27 pages, 5 figures, 4 tables, 43 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

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

Technical support and assistance: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant Professor*

Thesis delivered: July, 2016

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

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Vinska komina..... | 2 |
| 2.2. Kemijski sastav komine..... | 3 |
| 2.2.1. Fenolni spojevi komine | 5 |
| 2.2.2. Flavonoidi..... | 6 |
| 2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva | 7 |
| 2.3.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)..... | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.1.1. Priprema uzorka | 13 |
| 3.1.2. Aparatura i pribor..... | 15 |
| 3.1.3. Kemikalije i standardi | 15 |
| 3.2. Metode rada | 16 |
| 3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)..... | 16 |
| 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju ukupnih flavonoida..... | 21 |
| 4.2. Utjecaj vremena trajanja na ekstrakciju ukupnih flavonoida..... | 22 |
| 5. ZAKLJUČAK | 23 |
| 6. LITERATURA | 24 |

1. UVOD

Industrija proizvodnje vina stvara velike količine ostataka i nusproizvoda, kao što je komina grožđa, a koja svakodnevno predstavlja potencijalni ekološki problem i ekonomski izazov modernom društvu. Grožđe je najveći svjetski usjev voća sa proizvodnjom više od 60 milijuna tona godišnje. Oko 80 % ukupnog usjeva koristi se za proizvodnju vina, a vinska komina predstavlja približno 20 % ukupne količine prerađenog grožđa (Schieber i sur., 2002)

Vinska komina je bogat izvor fenolnih spojeva koji su zanimljivi zbog prirodnih antioksidativnih, protuupalnih i antimikrobnih svojstva koja se povezuju sa prevencijom mnogih važnih kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i karcinomi (Jara-Palacios i sur., 2014). Pokožica grožđa koja čini više od polovice vinske komine, sadrži antocijane, hidrokiscimetne kiseline, flavanole i flavonol glikozide, iako se flavonoli pretežito nalaze u sjemenkama grožđa (Yu i sur., 2014)

Fenolni spojevi međusobno se razlikuju po molekularnoj strukturi, od najjednostavnijih do složenih, a još uvijek se najčešće ekstrahiraju primjenom konvencionalnih metoda. Klasične metode ekstrakcije se najčešće provode uz upotrebu većih količina organskih otapala, dugotrajne su, imaju nižu selektivnost i niži prinos ekstrakcije (Kanmaz, 2013). Stoga se sve više ispituju mogućnosti primjene novih tehnika u izolaciji fenolnih spojeva iz različitih supstrata, te također iz nusproizvoda proizvodnje vina (Cheng i sur., 2012). Jedna od metoda koja se primjenjuje u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala je i ubrzana ekstrakcija otapalom. To je relativno nova automatizirana metoda koja koristi konvencionalna otapala pri temperaturama do 200 °C i tlaku do 20,3 MPa za ekstrakciju organskih spojeva. Visoke temperature i tlak povećavaju prodiranje otapala u uzorak te poboljšavaju topljivost, brzinu ekstrakcije (do 15 min) i prinos. Također prednost ove tehnike je da omogućava istovremenu obradu većeg broja uzoraka što skraćuje vrijeme ekstrakcije (Bozan i sur., 2014, Jentzer i sur., 2015)

Stoga je cilj ovog rada bio izolirati fenolne spojeve iz liofilizirane pokožice grožđa sorte Merlot, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima, dobivene nakon proizvodnje vina. Cilj ovog rada bio je također ispitati utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima na izolaciju flavonoida iz pokožice komine grožđa sorte Merlot, koja zaostaje kao nusproizvod nakon proizvodnje vina. Pri tome je ispitan utjecaj polarosti otapala (10, 30 i 50 %), vremena trajanja ekstrakcije (5 i 10 minuta) i broja ciklusa (1 i 2) na ekstrakciju flavonoida.

1. TEORIJSKI DIO

2.1. VINSKA KOMINA

Postupak proizvodnje vina odnosno postupak vinifikacije ili prerade grožđa u vino, obuhvaća procese prešanja i fermentacije nakon čega zaostaje velika količina nusproizvoda kao što je vinska komina. Prešanjem masulja nastaje groždani sok koji predstavlja tekući dio, iz kojeg daljnom preradom nastaje vino, a komina grožđa zaostaje kao kruti dio te ju čine pokožica, peteljkovina i sjemenke (Bhise i sur., 2014).

Vinska komina čini 20 % ukupne mase prerađenog grožđa te je bogat izvor različitih spojeva kao što su etanol, tartarati, limunska kiselina te prehrambena vlakna. Također ju karakterizira i visok sadržaj fenolnih spojeva, čak više od 70% ih zaostaje u komini zbog nepotpune ekstrakcije tijekom procesa proizvodnje vina (Arvanitoyannis i sur., 2006). Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti s nizom potencijalnih pozitivnih učinaka nazdravlje ljudi zbog svog antioksidacijskog, antimikrobnog, antivirusnog i antiupalnog djelovanja (Georgiev i sur., 2014). Nusproizvodi proizvodnje vina su stoga prirodan i jeftin izvor brojnih fitokemikalija koje se mogu primjenjivati u različitim industrijama, poput farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije (Teixeira i sur., 2014).

Vinska industrija proizvodi milijune tona organskog otpada koji predstavlja ekološki i ekonomski problem gospodarenja otpadom (FAOSTAT, 2014). Trenutno se manje količine tog visoko vrijednog nusproizvoda recikliraju, te se još uvijek većim dijelom koristi kao kompost ili se odbacuje u okoliš uzrokujući velike probleme kao što su površinska i dubinska zagađenja, neugodni mirisi tijekom stajanja, nakupine komine privlače štetočine i muhe koje šire zaraze. Mogu se koristiti za ekstrakciju vinske kiseline ili proizvodnju etanola, dok se kruti ostatak ponekad koristi kao gnojivo iako visoke koncentracije fenola stvaraju probleme jer inhibiraju rast sjemena (Fontana i sur., 2015). Također se dodaje kao aditiv u prehrani životinja, ali prisutost polifenola smanjuje probavljivost jer inhibiraju celulozne i proteolitičke enzime (Fontana i sur., 2015). U Europskoj Uniji zabranjeno je odlaganje otpada koji sadrži više od 5 % ugljika, što predstavlja problem pa se takav otpad odlaže na odlagalištima otpada što čini cijeli postupak neekonomičnim (Voća i sur., 2009).

2.2.KEMIJSKI SASTAV KOMINE

Sastav vinske komine varira ovisno o sorti grožđa, klimatskim uvjetima,tlu na kojem se uzgaja vinova loza,zrelosti grožđa prilikom berbe i tehnologiji vinifikacije (Friedman, 2014). Komina sadrži 55-60 % vode, a ostatak čini suha tvar u kojoj se nalaze šećeri, vinska kiselina i ulje koje dolazi iz sjemenki.Upravo zbog visokog udjela vode,ovaj organski otpad ima ograničeno vrijeme skladištenja(Voća i sur.,2009).

Pokožica grožđa koja zaostaje kao nusprodukt može činiti čak do 65% ukupne količine komine (Abdrabba i Hussein,2015).Sadrži malo šećera, ali je bogata celulozom,netopljivim pektinima i proteinima.Dokazano je kako je pokožica bogat izvor fenolnih tvari,posebice kod crnih sorti grožđa, poput antocijana, katehina, flavonola, alkohola,stilbena i fenolnih kiselina (Tablica 1).

Tablica 1.Kemijski sastav pokožice grožđa (Radovanović, Tehnologija vina, 1986) te njezin sadržaj polifenola(Beurzeix i sur. 1972).

| Sastojak | % |
|----------------------------------|-----------|
| Voda | 53-82 |
| Pentozе i pentozani | 1-1,2 |
| Heksoze,saharoze i škrob | / |
| Celuloza | 3,5 |
| Pektin,smolaste i sluzaste tvari | 0,9 |
| Kiseline | 0,13-0,67 |
| Tanini | 0,01-2,3 |
| Tvari boje | 1-15,4 |
| Mineralni sastojci | 2-3,7 |
| Vitamini | / |
| Enzimi | / |
| Spojevi s dušikom | 0,8-1,9 |
| Masti | 1,5 |
| Ukupni polifenoli | 12-61 |
| Procijanidini | 17-47 |
| Taninski spojevi | 14-50 |
| Antocijani | 100 |

Udio sjemenki u komini čini od 38 do 52 % suhe tvari, ovisno o procesu proizvodnje. Sjemenka grožđa sadrži do 40 % vlakana, 16 % eteričnih ulja, 11 % proteina, 7 % kompleksnih fenolnih komponenata kao što su tanini te ostale tvari poput šećera i minerala (Abdrabba i sur., 2015). Polifenoli sjemenke čine 60-70 % od ukupno prisutnih polifenola. Osim polifenola u sjemenkama grožđa pronađeni su i drugi antioksidansi, posebno vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamin E (tokoferol). U ulju sjemenki grožđa pronađeno je vitamina E u rasponu od 80 do 120 mg/100 g te β -karotena u udjelu od 0.8 do 1.5 % (Arvanitoyannis i sur., 2006).

Tablica 2. Kemijski sastav sjemenke i sadržaj polifenola u sjemenci (Ribéreau – Gayon i Peynaud, 1986).

| Sastojak | % |
|-----------------------|-------|
| Voda | 24-45 |
| Ugljikohidrati | 34-36 |
| Ulja | 13-20 |
| Tanini | 4-6 |
| Dušični spojevi | 4-6,5 |
| Minerali | 2-4 |
| Masne kiseline | 1 |
| Ukupni polifenoli | 22-56 |
| Procijanidini | 28-56 |
| Katehini | 67-86 |
| Galna i kava kiselina | / |

Peteljke čine oko 1.4 do 7 % sirovog materijala koji se obrađuje. Sadrži oko 70 % vode, siromašna je šećerom te ne sadrži više od 10 g šećera na kg peteljke dok mineralni dio čini 5 do 6 % suhe tvari od čega skoro 50 % otpada na kalij. Peteljke grožđa su bogate fenolnim spojevima te one čine 5.8 % suhe tvari komine. Sadrže flavan-3-ole, hidroksicimetne kiseline, monomerne i oligomerne flavonole te stilbene (Teixeira i sur., 2014). Zbog visokog udjela proantocijanidina koji daju izrazito trpki okus vinu, najčešće se uklanjaju tijekom proizvodnje vina.

2.2.1 Fenolni spojevi vinske komine

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti i predstavljaju jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih spojeva u biljnom carstvu (Fontana i sur., 2015). Biljke ih koriste kao zaštitu od napada insekata i mikroorganizama te im daju njihove specifične organoleptičke karakteristike kao što su boja, okus i aroma (Yu i sur., 2014). Koncentrirani su u sjemnkama, pokožici, mezokarpu voća i povrća, žitaricama, kori drveća i lišću. Sadržaj polifenola ubiljkama ovisi o vrsti, uzgoju, stupnju zrelosti, mikro i makroklimi, uvjetima prerade i skladištenja (Friedman, 2014.)

Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksilna skupina direktno povezana na benzenski ili aromatski prsten te je poznato oko 8 000 različitih struktura. Fenolni spojevi imaju zaštitnu ulogu u biološkim sustavima zato što posjeduju sposobnost sparivanja elektrona slobodnog radikala, kovalentnog vezanja iona prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Ky i sur., 2015).

Polifenoli se odlikuju visokom strukturalnom raznolikošću, a obzirom na kemijsku strukturu možemo ih podijeliti u dvije velike skupine: flavonoide i neflavonoide. U skupinu flavonoida svrstavaju se: flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, te antocijani, a razlikuju se prema stupnju oksidacije piranskog prstena. Neflavonoide predstavljaju derivati fenolnih kiselina (hidroksicimentne i hidroksibenzojeve kiseline) kao što su ferulinska, kava, p-kumarinska, galna kiselina te lignani i stilbeni (Kammerer i sur., 2014).

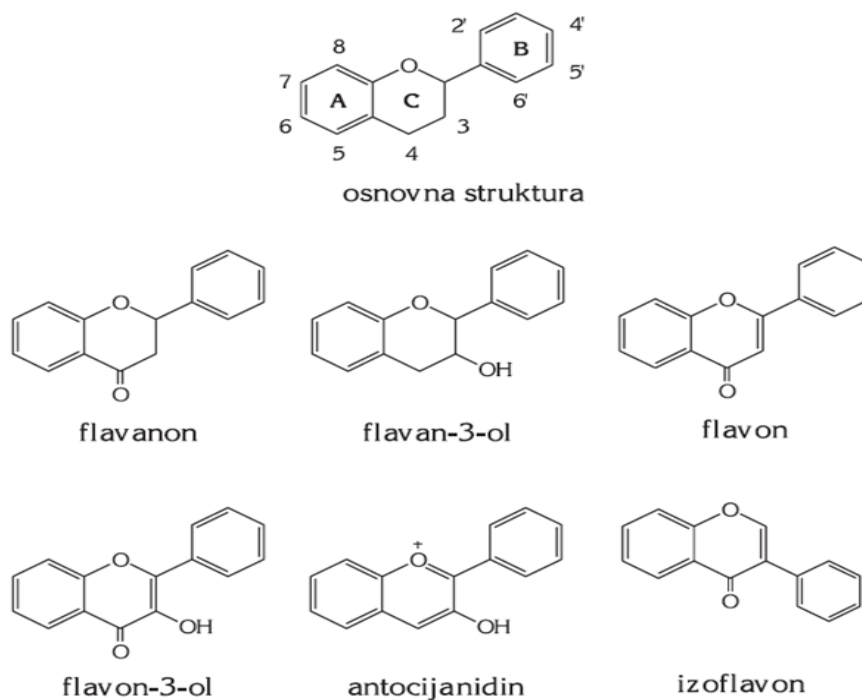
Počevši s fenomenom takozvanim „Francuski paradoks“ interes za polifenole jako je porastao zbog njihovih pozitivnih zdravstvenih učinaka. Posljednja dva desetljeća, polifenoli se povezuju sa mnoštvo zdravstvenih dobrobiti posebno prevencija bolesti uzrokovane oksidacijskim stresom. Polifenoli imaju jaka antioksidacijska svojstva pa stoga štite stanice od oštećenja uzrokovanog oksidacijskim stresom, čime se smanjuje rizik od bolesti poput kardiovaskularnih oboljenja, osteoporoze, dijabetesa, raka i neurodegenerativnih bolesti (Kammerer i sur., 2014).

2.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju veliku skupinu sekundarnih biljnih metabolita je identificirano više od 6000 različitih struktura. Raznolikost njihove kemijske strukture doprinosi i širokoj fiziološkoj i biološkoj aktivnosti. Posjeduju antioksidacijska, protuupalna, antikancerogena, antivirusna, kardioprotektivna, neuroprotektivna i hepatoprotektivna djelovanja (Georgiev i sur., 2014). Većina flavonoida se nalazi u vanjskoj epidermi pokožice grožđa, a 60-70 % ukupnih flavonoida je pohranjeno u sjemenci grožđa.

Osnovnu strukturu čini difenilpropanski kostur C6-C3-C6 odnosno dva benzenska prstena povezana sa šesteročlanim (piranskim) ili peteročlanim (furanskim) prstenom. Flavonoidi se ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije dijelena: flavane (flavan, flavan-3-ol, flavanon), flavone (flavon, flavonol, izoflavon), antocijanidine i čalkone. Osnovne skupine flavonoida prikazane su na slici 1.

Flavonoidi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s mono- i oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama (Yu i sur., 2014). Najčešće se pojavljuju kao glikozidi povezani sa šećerima (D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza i D-glukouronska kiselina) na C3 položaju.



Slika 1. Osnovne skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Flavan-3-oli ili kateholi su najraširenija skupina flavonoida, koji imaju zasićenu vezu C2-C3 . Odgovorni su za okus vina te njegovu gorčinu.(Catalano,2011.). U ovu skupinu spojeva ubrajamo monomere kao što su (+)-katehin,(-)-epikatehin i (-)-epigalokatehin te oligomere i polimere hidrolizirajuće odnosno kondenzirajuće tanine.Pojam tanini se odnosi na njihovu sposobnost da stupaju u inetrakcije s proteinima i talože ih.Prilikom zagrijavanja u kiselim uvjetima,ove molekule otpuštaju crvene antocijanidne pigmente stoga se nazivaju proantocijanidi. Prisutni su u raznim biljnim tkivima grožđa,uključujući drvo,lišće, stabiljke i meso bobice a najviše su rasprostanjeni u sjemenkama i pokožici grožđa((Ribéreau-Gayon i sur., 2006)

Antocijanide nalazimo samo u crvenim i/ili crnim sortama grožđa.To su pigmenti koji daju biljkama boju od ružičaste preko grimizno crvene do ljubičaste i plave. Nalazimo ih u hipodermalnom sloju pokožice crnog grožđa uglavnom glikozidno vezane s octenom, kumarinskom i kafeinskom kiselinom.Aglikonski dio molekule antocijana naziva se antocijanidin, a u grožđu se javlja pet antocijanidina:cijanin, delfinidin, malvidin, peonin i petundin(Ignat i sur.,2011)

Flavonoli su žuto obojeni pigmentu koji su odgovorni za zaštitu od UV zračenja,pretežito su akumulirani u pokožici grožđa iako ih nalazimo i u mesu bobice grožđa (Riedel i sur.,2012).Crvena pokožica grožđa sadrži različite derivate flavonolnih aglikona kao što su kvercetin ,kamferol, miricetin i sirigetin (J. Yang i Y.Y. Xiao,2013).U sortama bijelog grožđa flavanoli predstavljaju 46-56% ukupnih fenola,dok u crvenim sortama čine 13-30% od ukupnog sadržaja fenola. Utvrđeno je da biološka aktivnost flavonoida ovisi o nekoliko faktora kao što su stupanj glikozilacije, vrsti šećernog ostatka (Georgiev i sur.,2014).

2.3 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Smjesa koja se odjeljuje obrađuje se otapalom da bi se iz nje izdvojila lakše topiva komponenta kao otopina. Ekstrakcija je važan korak pri izolaciji fitokemikalija iz biljnog materijala ,prije kemijske analize(Stalikas,2007).

Prinos, sastav i čistoća fenolnih spojeva koji su ekstrahirani iz biljnog materijala ovisi o kemijskoj strukturi (jednostavnih i složenih fenola), veličini uzorka, postupku ekstrakcije, vremenu i uvjetima čuvanja, kao i prisustvu nepoželjnih tvari(Cheng i sur.,2012.).

Ne postoji standardna metoda ekstrakcije, tradicionalne tehnike kao što su kruto-tekuće ili Soxhlet ekstrakcija korištene su desetljećima, ali one zahtijevaju puno vremena i relativno velike količine otapala. Također, tijekom provođenja ovih tehnika, uključujući zagrijavanje, vrenje ili refluksiranje, dolazi do gubitka fenolnih spojeva zbog ionizacije, hidrolize i oksidacije. Osim toga, faktori kao što su izbor otapala, omjer uzorka-otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije bitni su za postizanje dobrih iskorištenja. Stoga su predložene nove tehnike ekstrakcije polifenolnih spojeva iz vinske komine kao što su: ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. High pressure assisted extraction, HPAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. Accelerated solvent extraction, MAE), ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. Supercritical Fluid Extraction, SFE) i ekstrakcija potpomognuta visoko naponskim električnim pražnjenjem (eng. High Voltage Electrical Discharge, HVED) (Acierno i sur., 2004; Lopes i sur., 2010; Barba i sur., 2016).

Cilj ovih tehnika je povećati iskorištenje ekstrakcije, skratiti vrijeme ekstrakcije, smanjiti utrošak otapala i zagađenje okoliša (Fontana i sur., 2015.).

Ekstrakcija otapalima je često korištena metoda jer je otapalo fizički nosač molekula između faza (krute, tekuće i plinovite). Polifenoli se lako otapaju u polarnim otapalima, a najčešće se koriste metanol, etanol, aceton i voda. Autori tvrde da ova tehnika ima prednost što voda kao jedinstveno otapalo za ekstrakciju fenola, postiže slične rezultate kao konvencionalna organska otapala, uz dodatnu prednost da je vrijeme obrade je puno kraće (Fontana i sur., 2015).

2.3.1 Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak je novija metoda za provođenje ekstrakcije fitokemikalija pri visokoj temperaturi i kratkom vremenu. Omogućava brzu ekstrakciju (3-20 min) komponenata u zatvorenom i inertnom sustavu, pod visokim tlakom (3,3-20,3 MPa) i temperaturi (40-200 °C).

Najveća prednost ove metode nad konvencionalnom ekstrakcijom otapalom pri atmosferskom tlaku je da otapalo ostaje u tekućem stanju iznad svoje temperature vrelišta (Yong Yu i Howard, 2003). Povišen tlak i temperatura koji se koriste u ASE-u utječu na otapalo, uzorak i interakciju među njima. Visoki tlak omogućava da otapalo može prodrijeti dublje u matricu uzorka, pospješujući ekstrakciju analita iz pora matrice. Na povišenoj temperaturi, topljivost

analita se povećava te prijenos tvari postaje brži. Također pri visokoj temperaturi slabe međumolekulske interakcije kao što su Van der Waalove sile, vodikove veze i dipol-dipol veze. Osim toga, viskoznost otapala i površinska napetost se smanjuju pri visokoj temperaturi te povećavajući prodiranje otapala u matricu(Fontana i sur.,2015).

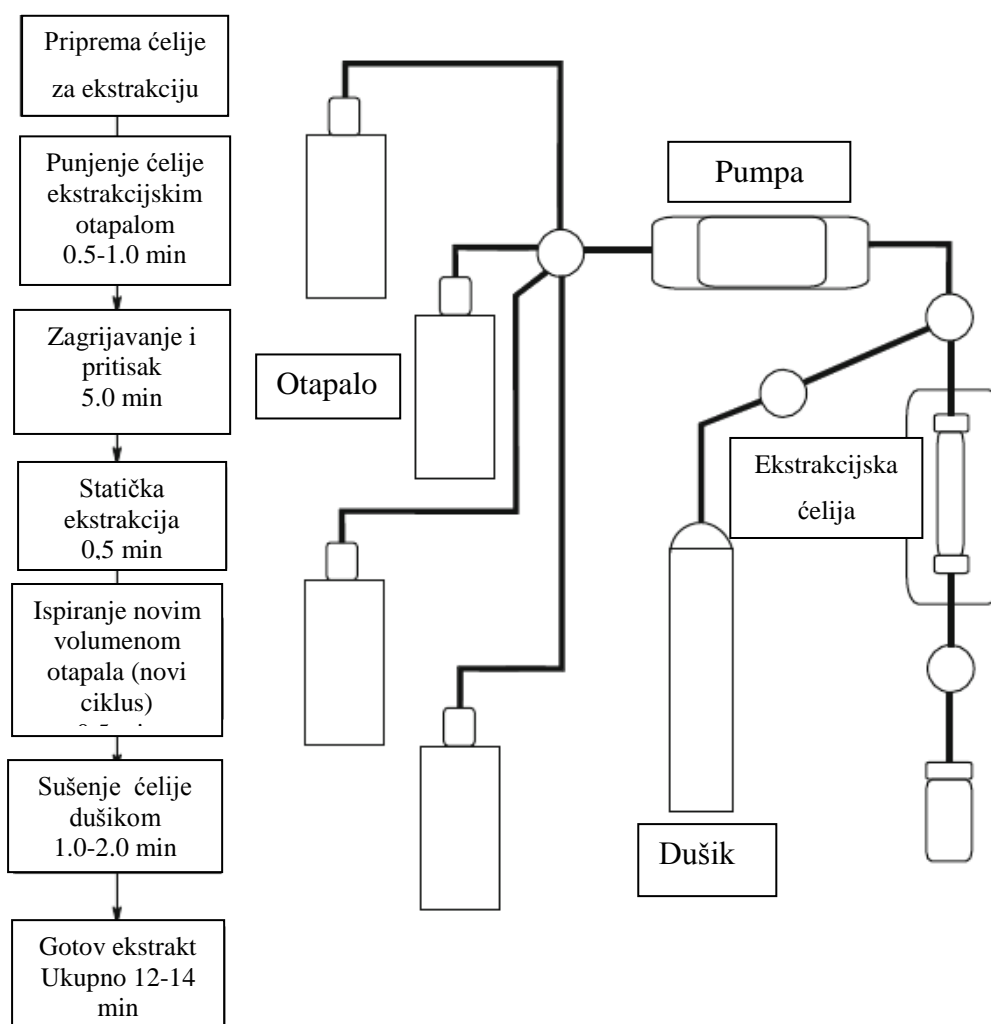


Slika 2. Uređaj za ubranu ekstrakciju otapalima,Dionex ASE ® 350(Anonymous,2016)

Uređaj za ubranu ekstrakciju otapalom uveden je 1995. od strane američke korporacije Dionex. Dionex ASE ® 350 je sekvencijski sustav koji omogućava istodobnu ekstrakciju 24 uzorka, a veličine ekstrakcijskih ćelija od nehrđajućeg čelika mogu biti 1, 5, 10, 22, 34, 66 i 100 mL. Za ovu tehniku mogu se koristiti otapala različitih polarnosti od n-heksana do metanola. Izbor otapala ovisi naravno o vrsti analit ako jise želi ekstrahirati. Otapalo se ponekad stavlja u ekstrakcijsku ćeliju sa uzorkom zbog postizanja većeg stupnja selektivnosti procesa (Mottaleb i Sarker,2012)

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

Uređaj omogućava analizu krutih ili polukrutih uzoraka uz korištenje različitih otapala ili smjesa otapala te doziranje količine otapala. U ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika, koje podnose visoke temperature, se stavlja uzorak pomiješan sa sredstvom za sušenje i homogenizaciju. Ekstrakcijska ćelija se nalazi pod tlakom zadano vrijeme ekstrakcije i zagrijava se te se puni otapalom za ekstrakciju iz rezervoara tako da ispunjava posudu. Ona se potom ispiri plinovitim dušikom, a dobiveni ekstrakt koji se filtrira i sakuplja. Preostali spojevi se otapaju svježim otapalom a konačno čišćenje s dušikom se provodi do sušenja biljnog materijala.



Slika 3. Prikaz sistema ubrzane ekstrakcije otapalima (Anonymous,2016)

ASE funkcionira na način da vrši transport otapala za ekstrakciju kroz ekstrakcijsku ćeliju sa uzorkom koji se analizira.Ćelija sa uzorkom se direktnom zagrijava pri kontaktu sa pećnicom. Ekstrakcija se provodi izravnim kontaktom uzorka s vrućim otapalom na dva načina statički i dinamički. Po završetku ekstrakcije, komprimirani dušik pomiče sva otapala iz stanice u bočice za analizu. Filtrirani ekstrakt koji se na taj način prikuplja izvan matrice sa uzorkom je spreman za analizu(Mottaleb i Sarker,2012).

Provedene su brojne studije koje su istraživale učinkovitost ubrzane ekstrakcije otapalima na biljnim materijalima te je ova metoda uspoređivana sa tradicionalnim tehnikama ekstrakcije. Abdela i sur. (2014)istraživali su efekte ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) i ekstrakcije mikrovalovima (MAE) na sastav antocijana i učinkovitost ekstrakcije na plavoj pšenici,ljubičastom kukuruзу i crnoj riži u odnosu na klasičnu ekstrakciju.Rezultati su pokazali da je ASE metoda prikladnija za ekstrakciju antocijana iz obojenih zrna od klasične ekstrakcije otapalima.Također metoda je izazvala manje promijene u strukturi antocijana u odnosu na MAE.

Jentzer i sur. (2015) proveli su ekstrakciju glikozida iz lišća stevije (*S. rebaudiana Bertoni*),koristeći pritom također DionexASE 350 sustav.Temperatura,statičko vrijeme i broj ciklusa značajno su utjecali na prinos ekstrakcije,a rezultati su pokazali da je ASE vrlo brza metoda (13 min 30 s),učinkovita,ponovljiva, ekološki prihvatljiva i zahtijeva manje energije. Usporedili su je sa konvencionalnim i nekonvencionalnim ekstrakcijama te zaključili da je praktičnija, brža od ostalih metoda osim MAE koja je trajala 1 min ali koristi metanol kao otapalo što nije ekološki prihvatljivo.Nadalje ASE omogućava filtrirane ekstrakte i štedi vrijeme s velikim brojem uzoraka .

U istraživanju Solane i sur. (2014) koji su ekstrahirali eterično ulje iz aromatične biljke komorač(*Foeniculum vulgare Miller*) primjenom dvije tehnike, Soxhlet i ubrzane ekstrakcije otapalima.Kod Soxhlet tehnike optimizirane su dvije varijable vrijeme (4 i 8 h) i otapala prema njihovoj polarnosti.Najbolje rezultate kvalitativno i kvantitativno je pokazao metanol u trajanju ekstrakcije 4 sata.Soxhlet tehnika je pružila veću učinkovitost ekstrakcije i veće količine spojeva ekstrahiranih u odnosu na ASE, ali slične koncentracije estragol,glavnog sastojka komorača.S druge strane kraće vrijeme ekstrakcije i manja količina otapala opravdali su ASE tehniku za izolaciju esencijalnih ulja komorača.Zaključak istraživača je stoga bio da u svrhu industrijske proizvodnje komorača upotrebom ASE tehnike pod optimalnim uvjetima, znatno bi se smanjili troškovi proizvodnje i povećao prinos ove komponente.

Isti autori također provode i istraživanje na biljkama iz porodice *Lamiaceae* pri čemu uspoređuju učinkovitost triju tehnika; ubrzane ekstrakcije otapalom (ASE), Soxhlet tehnike i ekstrakcije superkritičnim fluidom (SFE) pri izolaciji eteričnih ulja iz ovih biljaka. Najviši prinosi ekstrakcije postignuti su Soxhlet i ASE tehnikama, te su dobivene najveće količine fenolnih spojeva, čime su pokazale da su pogodne za karakterizaciju kemijskog profila aromatičnog bilja.

Učinkovitost ubrzane ekstrakcije otapalom (ASE) za izolaciju zanimljivih spojeva iz hrane kao što su karotenoidi iz triju različitih plodova (meso i kora): kaki (*D. kaki* L.), breskve (*P. persica* L.), marelica (*P. armeniaca* L.), pokazala je i studija Zaghdoudi i sur. (2015). U eksperimentu su utvrđeni optimalni uvjeti 5 min statičke ekstrakcije na 40 ° C, s potrošnjom od samo 30 ml organskog otapala (MeOH: THF) (20:80); (V: v), sa tlakom 103 bara, te su uspješno ekstrahirani ksantofili kao što su lutein, β zeaksantin i karoteni kao beta-karoten.

Suprotne rezultate dobili su Chuang i sur. (2015) prilikom izolacije 11 lijekova koji su akumulirani u povrću, celeru i salati. QuEChERS ("Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe") metoda se pokazala bolja od ubrzane ekstrakcije otapalom zbog jeftinije i brže pripreme uzoraka te manje količine potrebnog organskog otapala.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Priprema uzorka

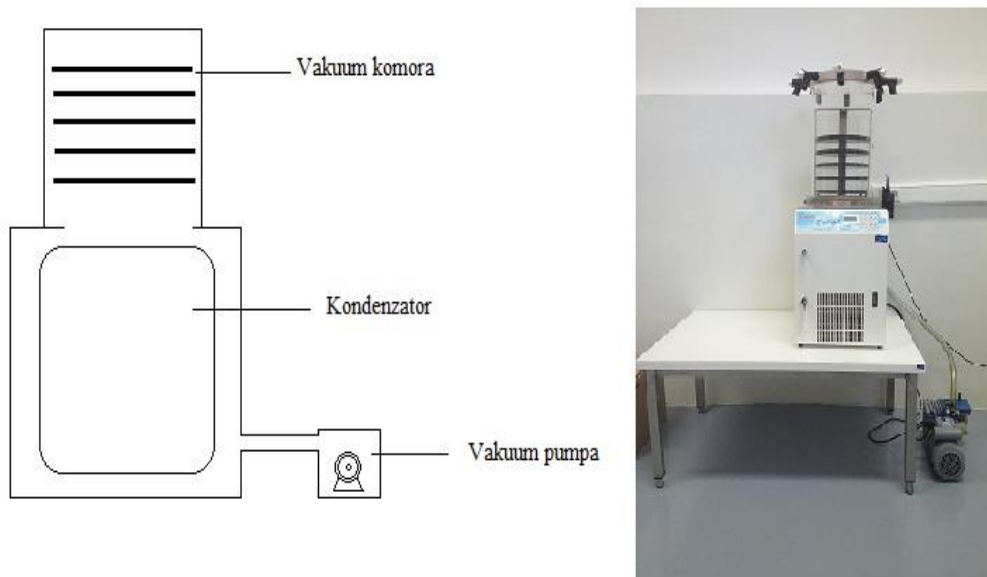
Nusproizvod proizvodnje vina ili vinska komina sorte *Mertlot* nabavljena je u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska). Vinska komina koja je sadržavala pokožicu, sjemenke i zaostale dijelove peteljki, podvrgnuta je postupku liofilizacije. Uzorak je mehanički razdijeljen na pokožicu, sjemenke i dijelove peteljke koji su potom pakirani u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni i skladišteni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja analize. Prije provođenja analize liofilizirana pokožica grožđa samljevena je u prah pomoću mlinca za mljevenje (Imetec Dolce Vita CG1) (Slika 6). Veličina čestica određena je granulometrijski pomoću sita $d(0,9)=6\leq 1\text{ mm}$. Ovako pripremljeni uzorci korišteni su za provođenje ekstrakcije fenolnih spojeva.



Slika 4. a) Liofilizirana komina (pokožica, sjemenke, peteljka); b) sjemenke grožđa; c) pokožica; d) samljevena pokožica

Postupak liofilizacije komine

Uzorak vinske komine prvotno je zamrznut na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je potom proveden postupak liofilizacije na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska). Na šest platica u jednom sloju je raspoređena masa od oko 500 g smrznute komine nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu $0,130 - 0,155\text{ hPa}$ i temperaturi od -30 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}/24$ sata, a izotermna desorpcija pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}/12$ sati. Prosječan udio suhe tvari u liofiliziranoj komini po završetku postupka liofilizacije iznosio je 96,85 %.



Slika 5. Shematski prikaz laboratorijskog liofilizatora

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

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

Pribor:

- Uređaj za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1, Italija)
- Plastična ladica za vaganje
- Odmjerne tikvice (10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Menzure (100 mL, 1000 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipeta (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL) i propipeta
- Falkonice volumena 50 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Celulozni filteri (Thermo Scientific)

3.1.3. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni, 50 %-tni, 30 %-tni, 10 %-tni (GRAM-MOL)
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminijev klorid, 10%-tni

Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminj-klorid–heksahidrat, p.a.) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom

- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetin (100 mg/L)
Priprema: Odvage se 10 mg standarda kvercetin u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.
- Dijatomejska zemlja (DE, P/N 062819)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

U ekstrakcijske ćelije najprije se stavi jedna mjerica dijatomejske zemlje te se potom odvage 1 g ($\pm 0,001$) uzorka praha liofilizirane pokožice grožđa sorte Merlot u plastičnu ladu. Uzorak se prebaci u ekstrakcijsku ćeliju, doda se pola mjerice dijatomejske zemlje i dobro promiješa sa špatulom te ćeliju nadopuni do vrha dijatomejskom zemljom.

Pripremljeni uzorcise stavljaju u uređaj ASE DIONEX 350 (eng. Accelerated Solvent Extractor) (Sunnyvale, CA, SAD) te se provodi ekstrakcija. Ekstrakcija je provedena prema planu pokusa prikazanom u Tablici 1, pri čemu su varirani slijedeći ekstrakcijski parametri:

- Udio etanola u vodenoj otopini (10, 30 i 50 %, v/v);
- Statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min);
- Broj ciklusa ekstrakcije (1 i 2).

Dobiveni ekstrakti kvantitativno se prenese u odmjerne tikvice volumena 50 mL pomoću staklenog lijevka te nadopune do oznake otapalom za ekstrakciju (10%, 30% i 50% etanolom, v/v). Uzorci se zatim prenose u falkonice volumena 50 mL i stavljaju u zamrzivač na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

Tablica 4. Plan provođenja ekstrakcije na ASE-u

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

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Princip određivanja:

Ukupni flavonoidi određuju se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog inteziteta obojenja pri valnoj duljini 415 nm.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

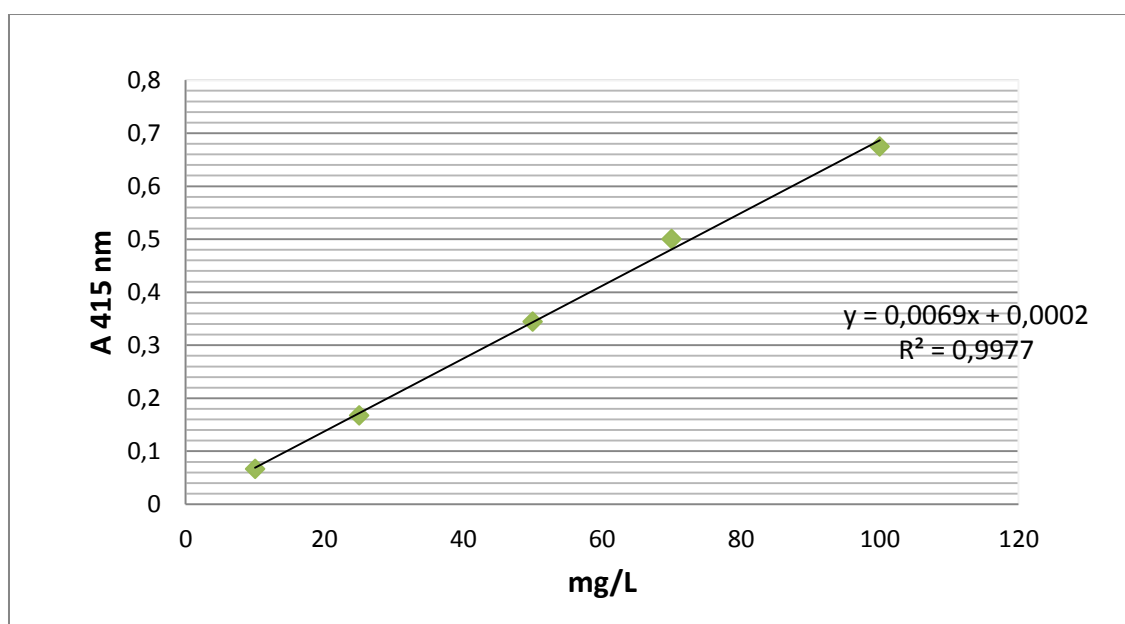
Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0069 \times X + 0,0002$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

R²-koeficijent determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija flavonoida iz pokožice vinske komine sorte Merlot koja zaostaje kao nusproizvod nakon proizvodnje vina. Ispitivan je utjecaj polarnosti otapala (10 %, 30 %, 50 %), vremena trajanja ekstrakcije (5 min ili 10 min) u jednom ili dva ciklusa naučinkovitost ekstrakcije ukupnih flavonoida. Utjecaj udjela alkohola u otapalu za ekstrakciju (polarnost otapala), vremena ekstrakcije i broja ciklusa na ekstrakciju ukupnih flavonoida iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (mg QE/g) izoliranih iz pokožice komine grožđa sorte Merlot primjenom ubrzane ekstrakcije pri povišenom tlaku

| Udio alkohola u otapalu za ekstrakciju (%) | Vrijeme (min) | Broj ciklusa | Masena koncentracija (mg QE/g) |
|---|------------------------|---------------------|---|
| 10 % | 5 | 1 | 31,03841 |
| | 5 | 2 | 26,37669 |
| | 10 | 1 | 32,34424 |
| 30 % | 5 | 1 | 33,93116 |
| | 5 | 2 | 41,05134 |
| | 10 | 1 | 61,36936 |
| 50 % | 5 | 1 | 80,35599 |
| | 5 | 2 | 71,91991 |
| | 10 | 1 | 76,81894 |

4.1 Utjecaj polarnosti otapala na ekstrakciju flavonoida

Iz dobivenih rezultata (tablica 5.) vidljivo je da se učinkovitost ekstrakcije flavonoida povećava s porastom volumnog udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu. Veći prinos ukupnih flavonoida, a najveća vrijednost (80,35599 mg QE/g) određena je u 50 %-tnom etanolnom ekstraktu i vremenu ekstrakcije od 5 minuta u jednom ciklusu. Otapalo najveće polarnosti koje je sadržavalo najmanji udio alkohola od 10 %, pokazalo se kao najslabije prilikom provođenja ubrzane ekstrakcije otapalima i rezultiralo je najmanjim prinosom ukupnih flavonoida (26,37669 mg QE/g). Porastom udjela alkohola na 30 % uočava se blagi porast ukupnih flavonoida. Rezultati našeg istraživanja u skladu su sa istraživanjem Cacace i Mazza (2003) koji su utvrdili da se kod ekstrakcije antocijanina iz crnog ribizla korištenjem vodene otopine etanola, prinos povećava kako raste koncentracija etanola. Također utvrđeno je da se maksimalni prinos postiže kod 60 %-tnog etanola a daljnim povećanjem koncentracije otapala prinos se smanjuje (Spingo i sur., 2007).

Nekoliko istraživanja proučavalo je korištenje različitih otapala za izolaciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala. Aceton, etanol i metanol su najčešće korištena otapalakoja daju visoke prinose fenolnih spojeva iz nusproizvoda od proizvodnje vina (Cheng i sur., 2012).

Prema istraživanju Lapornik i sur., (2015) pokazalo se da su ekstrakcije provedene etanolom i metanolom dale dva puta veće vrijednosti polifenola u odnosu na ekstrakcije vodom. Metanol je pokazao malo bolje karakteristike kao otapalo za polifenole ali razlike nisu bile velike pa je se za ekstrakciju spojeva prehrambene industrije ipak pogodniji etanol kao otapalo, zbog niske toksičnosti (Zhao i sur., 2013)

Etanol kao polarno otapalo učinkovitije ekstrahira flavonoide i njihove glikozide, katehole i tanine iz sirovog biljnog materijala, a topljivost ovih komponenti može biti povećana primjenom binarnih otapala, najčešće vodenih otopina alkohola (Spingo i sur., 2007). Nekoliko studija je koristilo vodene otopine alkohola za ekstrakciju nusprodukta proizvode vina jer prisutnost vode povećava permabilnost (propusnost) biljnog tkiva, te omogućava bolji prijenos mase difuzijom i oporavak komponenti topljivih u vodi. Također etanol je jeftiniji i ima GRAS (Generally recognized as safe according to U.S. Food and Drug Administration definition) status odnosno općenito je priznat kao siguran, stoga ima prednost u slučaju kasnijeg korištenja hrane (Fontana i sur., 2015)

4.2 Utjecaj broja ciklusa i vremena trajanja na ekstrakciju ukupnih flavonoida

U ovom istraživanju ispitivan je i broj ciklusa ekstrakcije (1 ili 2 ciklusa u trajanju 5 ili 10 min) na ekstrakciju flavonoida. Poznavanje utjecaja vremena i broja ciklusa ekstrakcije je izuzetno važno kako bi smanjili energiju i trošak procesa ekstrakcije. Kod ubrzane ekstrakcije otapalom, vrijeme ekstrakcije se definira kao vrijeme u kojem uzorak djeluje zajedno s otapalom za ekstrakciju po ciklusu u ekstrakcijskoj ćeliji (Bozan I Altinay, 2014). Regulacijom broja ciklusa se omogućava obnavljanje otapala, koji ometanjem difuzijske ravnoteže obogaćuje ekstrakt, također povećanjem broja ciklusa analit ima više vremena da difundira iz matriksa do otapala za ekstrakciju (Jentzer i sur., 2015).

Dobiveni rezultati (tablica 5.) pokazuju da se porastom broj ciklusa kod udjela alkohola od 10 % ne dobiva veći prinos flavonoida, odnosno nema značajne razlike u provođenju ciklusa 5 ili 10 minuta. Porastom polarnosti otapala na 30 % možemo vidjeti da se povećanjem broja ciklusa sa jednog na dva ciklusa u trajanju 5 minuta, javlja i blagi porast flavonoida (33,93116 mg QE/g do 61,36936 mg QE/g). Najviše koncentracije ukupnih flavonoida postignute su u trajanju ekstrakcije 5 minuta u jednom ciklusu kod 50 %-tnog etanola (80,35599 mg QE/g). Do istih zaključaka su došli Zaghdoudi i sur. (2015) korištenjem ASE tehnike prilikom ekstrakcije karotenoida iz breskve i marelice. Povećanje broja ciklusa nije imalo učinka na ekstrakciju luteina, čak je došlo do negativnih efekata na ekstrakciju karotenoida. Istu tezu potvrdili su Saha i sur. (2015) primjenom ASE metode za ekstrakciju karotenoida iz naranče i mrkve. Zaključili su da su da vrijeme i temperatura imaju značajan učinak na prinos karotenoida. Optimalni uvjeti za ekstrakciju su bili 60 ° C, 15 min u tri ciklusa. Povećanje količine otapala i broja ciklusa više od tri nije dovelo do bolje ekstrakcije karotenoida

U istraživanju koje su provodili Bozan i Altinay (2014) priodređivanju flavan-3-ola ubrzanom ekstrakcijom otapalima u sjemenkama grožđa, dobiveni rezultati pokazuju da se prinos flavan-3-ola povećava povećanjem vremena ekstrakcije sve do 20 minuta. Također veća količina flavan-3-ola je postignuta u ekstrakciji koja se provodila kroz dva ciklusa. Povećanjem broja ciklusa koncentracija flavan-3-ola se nije značajno mijenjala. Uspoređivanjem rezultata dobivenih klasičnim postupkom i ASE metodom sastav i količina flavan-3-ola u ekstraktu je bila slična.

5. ZAKLJUČAK

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

1. Polarnost otapala znatno utječe na ekstrakciju ukupnih flavonoida, te se veći prinosi dobivaju uz upotrebu vodenih otopina etanola s većim udjelom alkohola. Najveći prinosi flavonoida dobiveni su uz primjenu 50 %-tne vodene otopine etanola, dok između ekstrakata dobivenih 10 i 30 % vodenim otopinama etanola nije bilo bitnih razlika.
2. Vrijeme trajanja postupka ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj na masene udjele ukupnih flavonoida, te su pri 5 i 10 minuta dobiveni podjednaki maseni udjeli.
3. Porast broja ciklusa sa jednog na dva u trajanju 5 minuta, rezultira blagim porastom flavonoida ekstrahiranih iz pokožice komine grožđa sorte Merlot.

6. LITERATURA

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

S. Abdrabba I S. Hussein (2015), Chemical composition of pulp, seed and peel of red grape from Libya, *Glob. J. Sci. Res.*, **3**, 6-11

Acierno D, Barba AA, d'Amore M (2004) Heat transfer phenomena during processing materials with microwave energy. *Heat Mass Transfer*, **40**, 413–420.

Anonymous 1, Thermo Fisher scientific

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/083114>, pristupljeno 30.6.2016

Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 475–487.

Barba, J.F., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, S.S.A., Orlina, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006

Bhise, S., Kaur, A., Gandhi, N., Gupta, R. (2014) Antioxidant property and health benefits of grape byproducts, *Journal of Postharvest Technology*. **2**, 1-11.

Cheng, V. J., Bekhit, A. El-Din A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012) Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate, *Food Chemistry*, **34**, 474–482.

Chuang, Yingjie Zhanga, Wei Zhanga, Boyda S.A, Hui Lia, (2015) Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables, *Journal of Chromatography A*, **1404**, 1–9

Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, E. (2014) In Vitro and in Vivo Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained from Grape (*Vitis vinifera*) Pomace, *Molecules* **19**, 21154-21167

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistic Division, < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Pristupljeno 28. lipnja 2016.

- Fontana, Antonioli A., Bottini R., (2015) Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 8987–9003
- Friedman (2014) Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to their flavonoid content, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 6025–6042
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *Nutrients*, **6**, 391-415.
- Gil-Chávez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., B. H, J., Sepulveda, D., Yahia. E.M, González-Aguilar, G.A. (2013) Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Compr. Rev. Food Sci. F*, **12**, 5-23
- Gonzalez-Paramas, A., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. (2004) Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 234–238.
- Hossain, Barry-Ryan C., Martin-Diana A.B, Brunton N.P, (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology, *Food Chem.*, **126**, 339–346
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, **126**, 1821-1835.
- Jara-Palacios J., Hernanz D., Manzano S.G., Buelga C., S, Gilete M.L.E, Heredia F.J., Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity, *Talanta*, **125**, 51–57
- Jentzer, Alignan M., Garcia, Luc Rigal, Vilarem G., (2015) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *Food Chem.*, 561-567
- Kanmaz (2013) Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE), *Eur Food Res Technol*, **238**, 85–91
- Kazazić, P.S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **55**, 279-290.

Ky; P.-Louis Teissedre (2015) Characterisation of Mediterranean Grape Pomace Seed and Skin Extracts: Polyphenolic Content and Antioxidant Activity, *Molecules* , 20, 2190-2207

Kammerer, Kammerer J. ,Valet R., Carle R. (2014) Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients, *Food Research International*, **65**, 2–12

Lopes, M.L.M., Mesquita, V.L.V., Chiaradia, A.C.N., Fernandes, A.A.R., Fernandes, P.M.B. (2010) High hydrostatic pressure processing of tropical fruits. Importance for maintenance of the natural food properties, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1189**, 6–15.

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

Radovanović, V. (1986) Tehnologija vina, IRO Građevinska knjiga, Beograd

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

Ramirez-Lopez, L.M. (2011) Characterization of phenolic compounds in cynthiana (*Vitis aestivalis*). Department of Animal Science Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University

Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Ribereau-Gayon P. and Sudraud P. (1976) Sciences et Techniques du Vin, Vol. 3: Vinifications - Transformations du vin, Dunod, Paris., 19

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

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

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends. Food. Sci. Technol.* **12**, 401-413

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

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

Stalikas, C. D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Separ. Sci.*, **30**, 3268 – 3295.

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

Voća, N., Krička, T., Jurišić, V., Brlek Savić, T., Matin, A. (2009) Potencijal iskorištenja ostataka nakon proizvodnje vina za dobivanje toplinske energije. *44. Hrvatski i 4. Međunarodni simpozij agronoma, Zbornik radova, Opatija*, 880-884.

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

Z.Yong ,Howard L. (2003) Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5207-5213

Yu, Ahmedna M., Bansode R. (2014) Agricultural by-products as important food source of polyphenols, *Polyphenols: Food Sources ,Bioactive Properties and Antioxidant Effects*, 1-32

Xia, Deng G.F., Ya-Jun Guo , Hua-Bin Li (2010) ,Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 622-646

Yang, Yang-Yu Xiao (2013) Grape Phytochemicals and Associated Health Benefits, *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, **53**, 1202–1225

