

# Primjena ekstrakcije potpomognute visokim tlakom u izolaciji ukupnih fenola iz komine grožđa sorte Merlot

---

**Kruk, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:040791>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Valentina Kruk**

6685/PT

**PRIMJENA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE VISOKIM  
TLAKOM U IZOLACIJI UKUPNIH FENOLA IZ KOMINE  
GROŽĐA SORTE MERLOT**

**ZAVRŠNI RAD**

Modul: Začinsko i aromatsko bilje

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

Zagreb, 2016.

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

### PRIMJENA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE VISOKIM TLAKOM U IZOLACIJI UKUPNIH FENOLA IZ KOMINE GROŽĐA SORTE MERLOT

Valentina Kruk, 6685/PT

**Sažetak:** Komina grožđa zaostaje kao nusproizvod nakon prerade grožđa, a ima veliki biološki potencijal zbog visokog udjela fenolnih spojeva. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom na izolaciji ukupnih fenola iz komine grožđa sorte Merlot. Ekstrakcija je provedena 70%-tnim etanolom, pri tlakovima 200 MPa, 400 MPa i 600 MPa, temperaturi 60 °C i 80 °C i vremenu trajanja ekstrakcije 5 min i 15 min. Određivanje ukupnih fenola provedeno je spektrofotometrijski i najveći prinos ostvaren je pri temperaturi 60 °C, tlaku 400 MPa i vremenu tretiranja od 5 min. Utvrđeno je da se na temelju NIR spektara može efikasno odrediti sadržaj ukupnih fenola. Između masenih udjela ukupnih fenola dobivenih temeljem predikcijskog modela i ukupnih fenola određenih eksperimentalno potvrđeno je slaganje, a s obzirom na Chadockovu ljestvicu koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,789$ ) pokazuje čvrstu vezu između promatrane zavisne ( $y$ =ukupni fenoli) i skupa nezavisnih varijabli.

**Ključne riječi:** ukupni fenoli, komina grožđa, visoki tlak, NIR spektroskopija, ekstrakcija

**Rad sadrži:** 33 stranicu, 13 slika, 5 tablica, 42 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević, Izv. prof. dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić, dr.sc. Predrag Putnik, stručni suradnik,*

**Rad predan:** lipanj, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**University of Zagreb**

**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 HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ASSISTED EXTRACTION IN THE ISOLATION OF TOTAL PHENOLS FROM MERLOT GRAPE POMACE**

**Valentina Kruk, 6685/PT**

**Abstract:** Grape pomace is a byproduct of grape processing, it has high biological potential due to the fact that it contains high concentration of phenolic compounds. The aim of this work was to investigate the impact of extraction in isolation of total phenols under high hydrostatic pressure in grape pomace (varieties Merlot). Extraction is conducted by 70% solution of ethanol, while the tested parameters were pressure 200 MPa, 400MPa, 600 MPa, temperature 60 °C, 80 °C and treatment time 5 min, 15 min. Assessment of total phenols is conducted spectrofotometric and the highest yield is given at the temperature of 60°C, pressure of 400 MPa and the treating time of 5 min. It has been found that based on NIR specter we can efficiently discover content of total phenols. Total phenols based on predictive models and total phenols measured experimentally showed concurrence in values, expressed as a percentage by mass. Given the Chaddock scale, coefficient of determination ( $R^2=0,789$ ) shows a strong bond between observed dependent variable ( $y$ =total phenols) and a set of independent variables.

**Keywords:** total phenols, grape pomace, high pressure, NIR spectroscopy, extraction

**Thesis contains:** 33 pages, 13 figures, 5 tables, 42 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; PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, Associate professor; PhD Predrag Putnik, Ph.D., Expert Assistant,*

**Thesis delivered:** June, 2016.



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

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Vinova loza .....	2
2.2. Organski otpad iz proizvodnje vina .....	3
2.3. Fenolni spojevi vinske komine .....	4
2.3.1. Neflavonoidi .....	4
2.3.2. Flavonoidi .....	5
2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	9
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom .....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
3.1. Materijali .....	12
3.1.1. Priprema uzorka komine .....	12
3.1.2. Aparatura i pribor .....	12
3.1.3. Kemikalije i standardi .....	13
3.2. Metode rada .....	14
3.2.1. Ekstrakcija ukupnih fenola potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom .....	14
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	16
3.2.3. Snimanje NIR spektra .....	18
3.2.3.1. Primjena metode najmanjeg kvadrata u modelu predikacije ukupnih fenola .....	19
4. REZULTATI .....	21
4.1. Rezultati NIR spektroskopije .....	21
4.2. Rezultati analize glavnih komponenata .....	22
4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola .....	23
4.4. Rezultati predikcijskih modela .....	23
5. RASPRAVA .....	25
6. ZAKLJUČAK .....	29
7. LITERATURA .....	30



## 1. UVOD

U posljednje vrijeme sve se više istražuju sekundarne sirovine biljnog podrijetla koje se prema europskim legislativama klasificiraju kao otpad (nusproizvod) budući da se uklanjaju iz proizvodnog procesa. Sekundarne sirovine biljnog podrijetla ističu se po kemijskom sastavu kao vrijedne sirovine visokog biološkog potencijala s dokazanim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Preradom grožđa nastaje značajna količina organskog otpada koji predstavlja velik ekološki problem ako se nekontrolirano odlaže u okoliš ili neadekvatno zbrinjava. Organski otpad koji nastaje preradom grožđa sadrži značajan udio nutrijenata i bioaktivnih spojeva koji se mogu rabiti za proizvodnju različitih proizvoda za potrebe poljoprivredne proizvodnje, prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Posljednjih godina objavljen je niz znanstvenih istraživanja čiji rezultati dokazuju kako organski otpad od proizvodnje vina sadrži visoke udjele biološki aktivnih komponenata poput fenolnih spojeva. Polifenoli čine skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća, povrća i drugih biljnih vrsta. Ističu se po iznimno značajnom antioksidacijskom, antibakterijskom, antifungalnom i antivirusnom djelovanju.

Stoga, jedna od mogućnosti je da se iz organskog otpada od prerade grožđa izoliraju bioaktivni spojevi pomoću različitih tehnika i metoda ekstrakcije čime se postiže ekonomski profit i veće iskorištenje budući da se izolirani biološki aktivni spojevi između ostalog, mogu vratiti u proizvodni proces.

Prilikom odabira adekvatne metode za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva potrebno je razmotriti prednosti i nedostatke svake metode. Osim klasične konvencionalne ekstrakcije sve više su u primjeni nove tehnologije: ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima, ekstrakcija hladnom plazmom i dr. Prednosti novih tehnologija ogledaju se u samoj brzini ekstrakcije, prinosu ekstrakcije, manjem utrošku energije i ekološkoj prihvatljivosti budući da nema otpadnih produkata.

Stoga, na temelju svega navedenoga, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Provesti proces ekstrakcije ukupnih fenola primjenom visokog hidrostatskog tlaka pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C), tlakovima (200 MPa, 400 MPa ) i vremenima trajanja ekstrakcije (5 min i 15 min) te odrediti optimalne parametre pri kojima se ostvaruje najveći ekstrakcijski kapacitet;
- Odrediti ukupne fenole spektrofotometrijskom metodom;
- Snimiti NIR spektre i na osnovu njih predvidjeti sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Vinova loza

Vinova loza (*Vitis Vinifera*) jedna je od najranije kultiviranih biljnih vrsta. Počeci uzgoja vinove loze sežu u davnu prošlost, zemljopisno između Crnog i Kaspijskog mora i u područje oko Sredozemlja. Plemenita vinova loza (*Vitis vinifera*) nastala je križanjem u prirodi pa otuda mnoštvo kultivara (Zoričić, 1996). Vinova loza se uzgaja u svim područjima gdje uz dovoljno kiše prevladavaju topla i suha ljeta i relativno blage zime (Vivier i sur., 2000).

Prema *Zakonu o vinu* (NN 96/2003), vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem mošta ili masulja, od svježeg za preradu pogodnog grožđa. Pod groždem se podrazumijeva zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno zamrznut plod vinove loze priznatih kultivara namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, a čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64° Oechsle (133g/L šećera).

Proizvodnja crnog vina razlikuje se od proizvodnje bijelog vina. Osnovna svojstva crnim vinima daju polifenoli, crveno obojeni antocijani i tanini, tvari trpkog okusa, koje su ponajviše prisutne u pokožici bobice (Riedel i sur., 2012). Crno vino dobiva se vrenjem masulja, najčešće bez peteljke. Osnovni cilj ove faze proizvodnje je izdvajanje pigmenta boje iz stanica pokožice u groždani sok, koji je većinom neobojen. Ekstrakcija obojenih pigmenta postiže se vrenjem i maceracijom masulja (Zoričić, 1996). Vrlo je bitno vrijeme trajanja same maceracije masulja jer o vremenu trajanja ovisi koliko će se izdvojiti pigmenta antocijana i tanina, a optimalno je ako ono traje od 5-7 dana.

Sorta Merlot je porijeklom iz Francuske, provincije Gironde, šireg područja Bordeauxa. Merlot je sorta širokog areala, tako da se uzgaja u gotovo svim vinogradarskim zemljama. Grozd je srednje krupan ili sitan, konusnog ili cilindrično-konusnog oblika, često sa jednim krilcem. Bobice su sitne ili srednje krupne, okrugle, sa srednje debelom ili debelom pokožicom tamnoplave boje posutom obilnom peteljkom. Sadržaj šećera u moštu Merlota kreće se od 18 do 22 %. Vino sadrži od 11 do 13 vol. % alkohola s 5,5 do 7,5 g/L ukupne kiseline, glicerola 6,7-10 g/L, pepela 1,8-2,9 (Zoričić, 1996.). Vina Merlota se svrstavaju u red najkvalitetnijih crnih vina svijeta i kao takva su veoma cijenjena i tražena na tržištima vina.

## 2.2. Organski otpad iz proizvodnje vina

U posljednjih nekoliko godina puno pažnje se pridaje zbrinjavanju vinske komine, nusproizvodu koji nastane tijekom proizvodnje vina. Prema podacima EUROSTAT-a u 2014. godini u EU bilo je proizvedeno 22,6 milijuna tona grožđa, a od toga 93 % namijenjeno proizvodnji vina. Od ukupne količine prerađenog grožđa 20-30% otpada na kominu grožđa, organskom otpadu iz proizvodnje vina (Yu i sur., 2014).

Zemlja sa razvijenom vinskom kulturom je i Republika Hrvatska pa je tako 2013. godine proizvedeno 90.000 t grožđa odnosno proizvedeno je 565.000 hL vina i 18.000 t organskog otpada. Ulaskom u EU puno je pažnje posvećeno upravo vinskoj komini, budući da direktive EU nalažu da se otpad koji ima više od 5 % organskog ugljika zbrinjava na poseban način (Agroklub).

Vinska komina sastoji se od pulpe grožđa, pokožice, sjemenki i peteljki. U proizvodnji crnih vina dobiva se nakon procesa maceracije sa fermentacijom, a kod bijelih vina nakon prešanja zgnječnog grožđa (Teixeira i sur., 2014).

Otpad iz proizvodnje vina sadrži visoke udjele fenolnih spojeva, polisaharida, masnih kiselina i drugih biološko aktivnih spojeva koji imaju povoljan utjecaj na zdravlje i prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Budući da pozitivni učinci na zdravlje mogu ovisiti o količinama biološki aktivnih spojeva prisutnih u nusproduktima, potrebno je uspostaviti vezu između pozitivnih efekata te sastava vina i nusprodukata. Istraživanja dovode do zaključka da koncentracije nusprodukata variraju u velikom rasponu ovisno o sorti grožđa iz koje se dobivaju (Friedman, 2014).

U dostupnim studijama istraživanja su više usmjerena na komine koje proizlaze iz crnih sorti grožđa, a manje one koje proizlaze iz bijelih sorata (Gonzalez-Centeno i sur., 2013). Sorte grožđa iz kojih se dobivaju crna vina sadrže puno više polifenola od onih iz kojih se dobivaju bijela vina jer se tijekom procesa proizvodnje crno vino tjednima macerira s pokožicom koja je znatno bogatija polifenolima i bojom nego pokožica bijelih sorti (Zoričić, 1996).

## 2.3. Fenolni spojevi vinske komine

Fenolni spojevi čine veliku skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća i povrća i drugih biljnih vrsta. Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, no mogu biti vezani i drugi supstituenti što dovodi do velike raznolikosti spojeva (Ignat i sur., 2011). Njihova važnost je time veća ako se uzme u obzir kako je do sada u biljkama identificirano više od 8000 molekula s fenolnom strukturom (Riedel i sur., 2012).

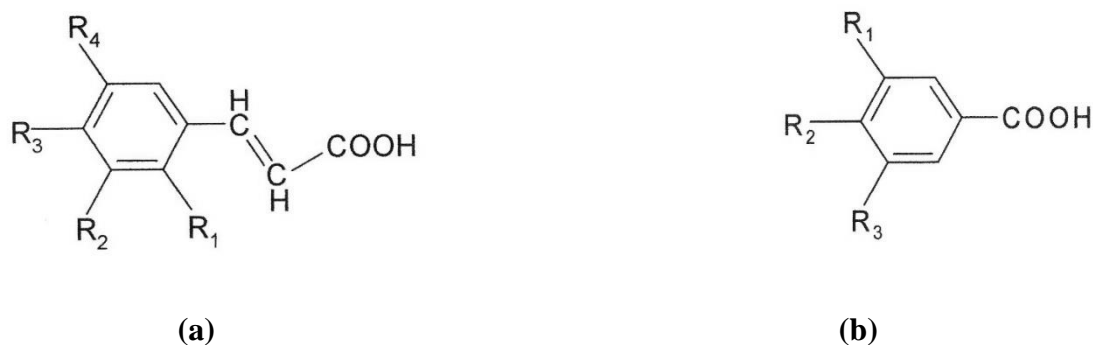
Fenolni spojevi imaju brojne funkcije u biljnom tkivu kao što je zaštita od UV zračenja, zaštita od pigmentacije biljaka, zaštita od patogena i kao obrambeni mehanizam biljke protiv biljojeda i nametnika. Kroz boju i aromu fenolni spojevi daju signal životinjama koje prenose sjeme i štite biljku od slobodnih radikala koji nastaju kao produkt fotosinteze (Holtung, 2014).

Epidemiološka istraživanja pokazala su kako konzumacija voća i povrća ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje poput smanjenja rizika oboljenja od srčanih bolesti i srčanog udara, te smanjenje rizika oboljenja od raka. Ti pozitivni učinci na zdravlje se prije svega pripisuju fenolnim spojevima koji se ističu po antioksidacijskom, antibakterijskom i antifungalnom djelovanju (Schieber i sur., 2001). Fenomen pod nazivom „Francuski paradoks“ povezuje se s dužim životnim vijekom Francuza budući da njihova prehrana obiluje masnoćama. Mnogi nutricionisti vjeruju da je taj fenomen uzrokovan povećanom konzumacijom crnog vina koje sadržava velike količine flavonoida i antioksidansa (Riedel i sur., 2012).

U literaturi postoje različite klasifikacije ovih spojeva, no najjednostavnija podjela je na neflavonoide i flavonoide.

### 2.3.1. Neflavonoidi

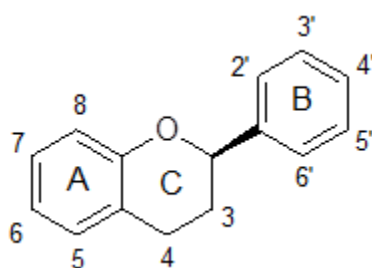
Hidroksicimetna kiselina i hidroksibenzojeva kiselina pripadaju grupi fenolnih kiselina (Slika 1.). Hidroksicimetne kiseline nalaze se u vakuolama pokožice i pulpe u obliku estera. Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u grožđu su *p*-kumarinska, ferulinska i kafeinska kiselina koje dolaze većinom kao *trans* izomeri (Riedel i sur., 2012). Hidroksibenzojeve kiseline se nalaze u peteljka, sjemenkama i pokožici grožđa, a najvažniji derivat je galna kiselina koja ima ulogu prekursora kod nastajanja hidroliziranih tanina (Teixeira i sur., 2014).



**Slika 1.** Strukturne formule hidroksicimetne (a) i hidroksibenzojeve kiseline (b)  
(Annonimus 1)

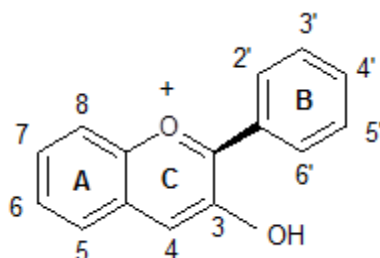
### 2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su velika skupina fenolnih spojeva male molekulske mase sa osnovnom strukturom koja se sastoji od dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koja sadrži kisik (Slika 2.). Do danas je identificirano preko 6400 flavonoida koji se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena. Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozidirani sa šećerima i esterificirani organskim kiselinama (Ignat i sur., 2011). Flavonoidi su najrasprostranjeniji fenolni spojevi prisutni u grožđu koji posjeduju svojstva pogodna za zaštitu srca i mozga i antimikrobna svojstva. Većina flavonoida prisutna je u vanjskom epidermu stanice, u pokožici grožđa (Xia i sur., 2010).



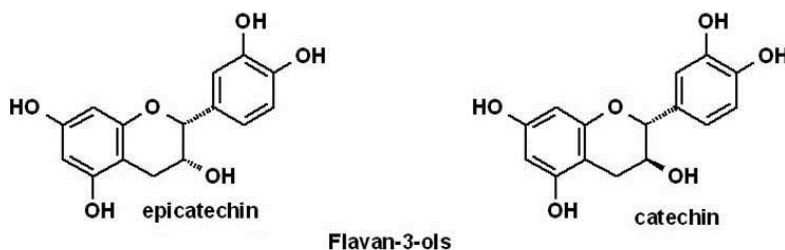
**Slika 2.** Osnovna kemijska struktura flavonoida (Annonimus 2)

Antocijani su pigmenti koji su topljivi u vodi i oni daju crvenu, plavu i ljubičastu boju grožđa (Georgiev i sur., 2014). U grožđu su prisutni većinom u pokožici, a sama količina antocijana ovisi o sorti, klimi, tlu, vremenskim prilikama u vegetacijskoj godini. Nakupljanje antocijana u pokožici bobice događa se istovremeno s nakupljanjem šećera (Zoričić, 1996). Kemijska struktura (Slika 3.) sastoji se od aromatskog prstena (A) koji je vezan na heterociklički prsten (C) koji je povezan na treći aromatski prsten (B). Na trećem aromatskom prstenu (B) vezani su razni šećeri (Teixeira i sur., 2014).



**Slika 3.** Kemijska struktura antocijana (Annonimus 3)

Flavanoli ili flavan-3-oli prisutni su u grožđu većinom u formi (+)-katehina, (-)-epikatehina (Slika 4.) i proantocijanidina. Pohranjeni su u sjemenkama grožđa, ali se također mogu pronaći i u bobicama grožđa. Kod varijeteta bijelog grožđa flavanoli čine 46-56% ukupnih fenola, dok kod crnog grožđa čine između 13% i 30% ukupnih fenola (Georgiev i sur., 2014).

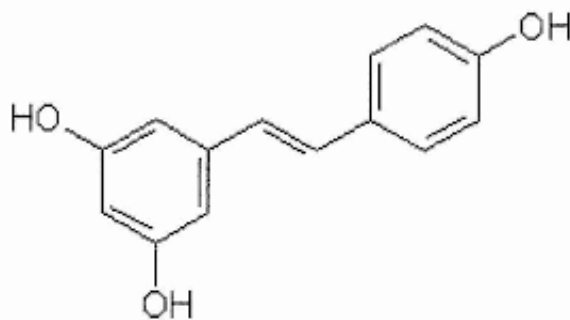


**Slika 4.** Kemijska struktura epikatehina i katehina (Annonimus 4)

Flavonoli su žuto obojeni pigmenti koji se većinom nalaze u pokožici grožđa, ali ih ima i u pulpi (Riedel i sur., 2012). U grožđu su pronađeni kvercetin, miricetin, kampferol, laricitin i drugi koji su u obliku 3-O-glukozida i 3-O-glukuronida (Teixeira i sur., 2013).

Tanini kompleksni su spojevi velike molekularne mase, a mogu se podijeliti u dvije skupine: kondenzirani tanini (proantocijanidini) i hidrolizirani tanini (Ignat i sur., 2011). Opće svojstvo tanina jest da su trpkog i oporog okusa i s metalima tvore obojene reakcije. U crnim vinima su prisutni u većim količinama u odnosu na bijela vina (Zoričić, 1996). Kondenzirani tanini (proantocijanidini) su polimeri flavan-3-ola, a nalaze se u pokožici, sjemenkama i peteljčkama grožđa (Teixeira i sur., 2013). Hidrolizirani tanini su derivati galne kiseline (Ignat i sur., 2011), nema ih u kožici, najveći udio hidroliziranih tanina nalazi se u vanjskom omotaču sjemenki.

Stilbeni grožđa pojavljuju se u oligomernom i polimernom obliku (Rentzsch i sur., 2007). Ističu se po iznimno pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje zbog antioksidacijskih i antikancerogenih svojstava (Nassiri-Asl i Hosseinzadeh, 2009). Najvažniji predstavnik je resveratol (Slika 5.).



**Slika 5.** Strukturna formula resveratola (Anonimus 5)

Kako je već spomenuto u ovom radu, komina predstavlja najveći udio među nusproduktima proizašlim iz procesa proizvodnje vina što predstavlja problem pri skladištenju i eliminaciji, ali istovremeno predstavlja i ekološki i ekonomski problem. No, komina je prirodan i jeftin izvor antioksidansa zbog toga što sadrži velike količine sekundarnih metabolita poput fenolnih kiselina, flavan-3-ola i antocijana (Teixeira i sur., 2013). Najzastupljeniji fenolni spojevi u grožđu su flavanoli, antocijani, proantocijanidini, flavonoli koji pripadaju skupini flavonoida, a iz skupine neflavonoida važno je istaknuti fenolne kiseline i stilbene (Riedel i sur., 2012).

Fenolni sastav komine varira ovisno o vrsti grožđa, klimatskim uvjetima, vrsti tla, trajanju maceracije i tome radi li se o pokožici, sjemenkama ili stabljici (Tablica 1). Tako sjemenke sadrže manje količine fenolnih kiselina i antocijanina nego pokožica, ali veće količine flavan-3-ola (Yu i sur., 2014). Tijekom maceracije grožđa, koja prethodi fermentaciji, sjemenke uglavnom ostanu netaknute, stoga u primarnoj fermentaciji većina fenolnih spojeva koji se prenose u vino, potječu iz pokožice grožđa (Pinelo i sur., 2006).

Komine crnih sorti jedan su od najboljih izvora antioksidansa, pri čemu prisutnost antocijana kod crnih sorti predstavlja glavnu razliku u fenolnom sastavu bijelih i crnih sorti grožđa (Luque Rodriguez i sur., 2007).

**Tablica 1.** Okvirne koncentracije fenolnih spojeva u komini, pokožici, sjemenci i peteljci grožđa (Pinelo i sur., 2006)

<b>mg/g</b>	<b>KOMINA</b>	<b>POKOŽICA</b>	<b>SJEMENKA</b>	<b>PETELJKA</b>
<b>FENOLNE KISELINE</b>	0,03 – 8,31	0,17 – 8,23	0,1 – 0,11	0 – 0,04
<b>TANINI</b>	0,22 – 2,32	1,61	2,32	0,22 – 0,39
<b>FLAVAN-3-OLI</b>	0,34 – 4,25	0,12 – 3,38	3,56 – 6,15	0,22 – 0,89
<b>ANTOCIJANI</b>	11,47 – 29,82	11,47 – 29,82	-	-
<b>FLAVONOLI</b>	0,03 – 0,63	0,48 – 0,63	0,02 – 0,05	0 – 0,22

## 2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija predstavlja glavni korak u izolaciji biološki aktivnih spojeva iz biljnih materijala. Cilj same ekstrakcije jest izolacija maksimalne količine željene tvari, a da pritom izolirana tvar bude što veće kvalitete (Spigno i sur., 2007). Brojni faktori poput kemijskog sastava uzorka, korištene metode ekstrakcije, veličine čestica uzorka, vrste otapala, vremena i temperature ekstrakcije utječe na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva (Teixeira i sur., 2014).

Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija superkričnim plinovima su najčešće korištene tehnike za izolaciju fenolnih spojeva (Ignat i sur., 2010). Ekstrakcija pomoću otapala koristi se za izolaciju određenih spojeva iz različitih materijala kao što su sedimenti, tlo, polimeri, gljive i biljke. Proces se sastoji od toga da se uzorak pomiješa sa raznim otapalima koja izoliraju spojeve koji se žele istražiti. Uzorci se obično centrifugiraju i filtriraju kako bi se uklonili nepotrebni sastojci (Gil-Chavez i sur., 2013). Konvencionalne metode za ekstrakciju fenola iz grožđa koriste organska otapala poput etanola, metanola i acetona u kombinaciji s vodom. Otapala 80 % metanol (v/v), 75 % aceton (v/v) i 70 % etanol (v/v) su se pokazali kao otapala s najboljom efikasnošću ekstrakcije fenola iz biljnog materijala (Sun i sur., 2006).

Klasične ili konvencionalne metode imaju određene nedostatke poput gubitka biološki aktivnih spojeva uslijed hidrolize, oksidacije ili povišene temperature do koje dolazi za vrijeme same ekstrakcije uslijed dužeg trajanja ekstrakcije ili pak dolazi do onečišćenja okoliša zbog korištenja velike količine organskih otapala (Drosou i sur., 2015), stoga se takve metode sve više zamjenjuju novijim metodama ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i kao jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom (Teixeira i sur., 2013).



### 2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Postupci obrade hrane visokim hidrostatskim tlakom podrazumijevaju podvrgavanje tekuće ili čvrste hrane djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa (1200 MPa). Temperatura obrade može se kretati od ispod 0 °C do iznad 100 °C, a vrijeme izloženosti djelovanju tlaka može varirati od nekoliko sekundi do 20 minuta (Krešić i sur., 2011). Ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom nije prisutna samo u prehrambenom inženjerstvu, već ima druga područja primjene, poput ekstrakcije biološki aktivnih sastojaka iz prirodnih materijala (Altuner i sur., 2012), kao što su antocijani iz grožđa i fenolni spojevi iz *Maclura pomifera* voća (Strati i sur., 2014).

Posljednjih godina, usporedno s razvojem društva i gospodarstva, raste briga za okoliš zbog čega su zakoni koji se brinu o zaštiti okoliša sve stroži što dovodi do povećanja napora za pronalaženjem načina na koji bi se riješili problemi u okolišu nastali uporabom konvencionalnih metoda ekstrakcije. Uzevši navedeno u obzir, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom sve više se koristi zbog njezinog manje štetnog utjecaja na okoliš. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom je priznata od strane FDA kao metoda ekstrakcije koja je ekološki prihvatljivija (Wang i sur., 2013).

Djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka dolazi do smanjenja volumena sustava na koji se tlak primjenjuje. Sukladno Le Chatelier-Braunovom zakonu, u uvjetima ravnoteže, zbog djelovanja povišenog tlaka na zatvoreni sustav bit će pospješene one reakcije koje vode smanjenju volumena, dok će nasuprot tome one reakcije koje vode povećanju volumena sustava biti potisnute (Bosiljkov i sur., 2010).

Tijekom procesa ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom povećanjem tlaka povećava se topljivost prema teoriji faza. Stanice podvrgnute tlaku pokazuju veću propusnost prema teoriji prijenosa masa, što znači da što je veći hidrostatski tlak više otapala ulazi u stanicu. Ulaskom otapala u stanicu stanična membrana je u mogućnosti propustiti više spojeva što za posljedicu ima veći prinos ekstrakta (Prasad i sur., 2009). Uočena je veća propusnost stanične membrane pri djelovanju visokog hidrostatskog tlaka zbog velike razlike u tlaku između unutrašnjosti stanice i okruženja izvan staničnih membrana (Zhang i sur., 2005).

Nadalje, ekstrakcija visokim tlakom pruža mogućnost inaktivacije enzima u svježem materijalu što može dovesti do povećanja iskorištenja u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije. Također, ima sposobnost smanjiti pH otapala za vrijeme ekstrakcije što može povećati učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva budući da su oni stabilniji pri nižim pH vrijednostima (Ahmed i Ramaswamy, 2006; Prasad i sur., 2009).

Visoki tlak može izazvati strukturne promjene u hrani kao što su stanične deformacije, oštećenja membrane i denaturacija proteina (Zhang, i sur., 2005). U usporedbi sa konvencionalnim tehnikama, proces ekstrakcije koja je potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom je brži, daje veći prinos ekstrakcije, manje nečistoća, postoji mogućnost izvođenja pri sobnoj temperaturi i može se skratiti vrijeme ekstrakcije (Huang i sur., 2013). U odnosu na ekstrakciju superkritičnim fluidima, oprema koja se koristi za ekstrakciju potpomognutu visokim hidrostatskim tlakom je jednostavnija, jeftinija i mogu se koristiti razna otapala (Lee i sur., 2011). Komponente hrane koje su odgovorne za specifičnu nutritivnu vrijednost i senzorske značajke hrane zahvaljujući malom udjelu sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture, praktički neosjetljive na djelovanje visokog tlaka (Krešić i sur., 2011).

Mnogi znanstveni radovi pokazuju kako je ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom učinkovitija metoda ekstrakcije fenolnih spojeva u usporedbi sa konvencionalnom ekstrakcijom ili nekim drugim netermičkim metodama ekstrakcije. Xi (2006) je koristio ekstrakciju potpomognutu visokim hidrostatskim tlakom na uzorku komine rajčice te ostvario veće prinose likopena u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije pomoću otapala. Corrales i sur. (2008) provodili su ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa potpomognutu visokim tlakom uz koncentracije etanola od 20 do 100 %. Parametri koji su bili varirani su tlak (200, 400 i 600 MPa), vrijeme ekstrakcije (30-90 min) i temperatura (20–70 °C). Želeći usporediti dobivene rezultate sa drugim metodama ekstrakcije, proveli su i konvencionalnu ekstrakciju u vrućoj vodi, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom te ekstrakciju potpomognutu pulsirajućem električnim poljem. Ustanovili su kako je primjena ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom rezultirala najvećim sadržajem antocijana u usporedbi sa preostalim ispitivanim tehnikama. Najveći prinos antocijana dobili su koristeći 100 %-tni etanol, temperaturu ekstrakcije 50 °C te tlak od 500 MPa, bez statistički značajnog utjecaja vremena trajanja ekstrakcije.

Nadalje, Prasad i sur. (2009) izolirali su ukupne fenole iz perikarpa longan voća (*Dimocarpus longan*) primjenom ekstrakcije potpomognute visokim tlakom. Rezultati su pokazali kako je najveći prinos polifenola (20 mg/g) ostvaren pri uvjetima kada je kao otapalo korištena 50%-tna otopina etanola, pri temperaturi 30 °C, tlaku 500 MPa i trajanju ekstrakcije 2.5 min. Istovremeno su proveli i konvencionalnu ekstrakciju gdje je u konačnici prinos iznosio 11,9 mg/g što je značajno manje u usporedbi sa ekstrakcijom koja je potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Priprema uzorka komine**

U istraživanju je korišten nusprodukt nakon prešanja od proizvodnje vina sorte Merlot, koji je nabavljen u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska), koji je odmah nakon izuzimanja podvrgnut postupku liofilizacije. Uzorak komine sadržavao je pokožicu, sjemenke i dijelove peteljke, a neposredno prije liofilizacije, dijelovi peteljke su izdvojeni. Postupak liofilizacije proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska), a uzorak je prethodno zamrznut na -60 °C. U jednom sloju na šest plitica raspoređena je masa od cca 500 g smrznute komine nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedena je pri vakuumu 0,130–0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0°C/24 sata, a izotermna desorpcija pri 20°C/12 sati. Po završetku procesa liofilizacije prosječni udio suhe tvari u liofiliziranoj komini iznosio je 96,85 %. Liofilizirana komina je potom pakirana u polipropilenske vrećice, hermetički zatvorena i skladištena pri temperaturi -20 °C do provođenja analize. Neposredno prije provođenja ekstrakcije fenolnih spojeva liofilizirana pokožica grožđa samljevena je u prah pomoću mlinca za mljevenje (Imetec Dolcevita CG1).

##### **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)
- Uređaj za vakumiranje (Besser Vacuum SRL, Italija)
- Uređaj za visoki tlak (Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija)
- Centrifuga (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β, Velika Britanija)
- NIR instrument i računalo

*Pribor:*

- Plastične bočice (50 mL)
- Vakuum vrećice
- Odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Menzure (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipeta (5 mL) i propipeta
- Falkonice volumena 50 mL i 15 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 µL, 1000 µL, 5000 µL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete

### **3.1.3. Kemikalije i standardi**

- Etanol, 96 %-tni (GRAM-MOL)
- Etanol 70 %-tni
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (GRAM-MOL d.o.o.)
- Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

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

- Galna kiselina,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$
- Standard galne kiseline

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

- Destilirana voda

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Ekstrakcija ukupnih fenola potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija ukupnih fenola iz praha pokožice grožđa sorte Merlot provedena je primjenom visokog hidrostatskog tlaka (Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija, slika 6) prema planu pokusa prikazanom u Tablici 2. Kao otapalo pri ekstrakciji korišten je 70 %-tni etanol. Parametri koji su varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (40 °C, 60 °C i 80 °C), tlak (200 MPa i 400 MPa) te vrijeme ekstrakcije (5 min i 15 min). Svaka ekstrakcija provedena je u paraleli.

**Tablica 2.** Plan pokusa ekstrakcije ukupnih fenola primjenom visokog hidrostatskog tlaka

Vrsta otapala	Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Šifra uzorka
70 %-tni etanol	40	200	5	A
			15	B
		400	5	C
			15	D
	60	200	5	E
			15	F
		400	5	G
			15	H
	80	200	5	I
			15	J
		400	5	K
			15	L

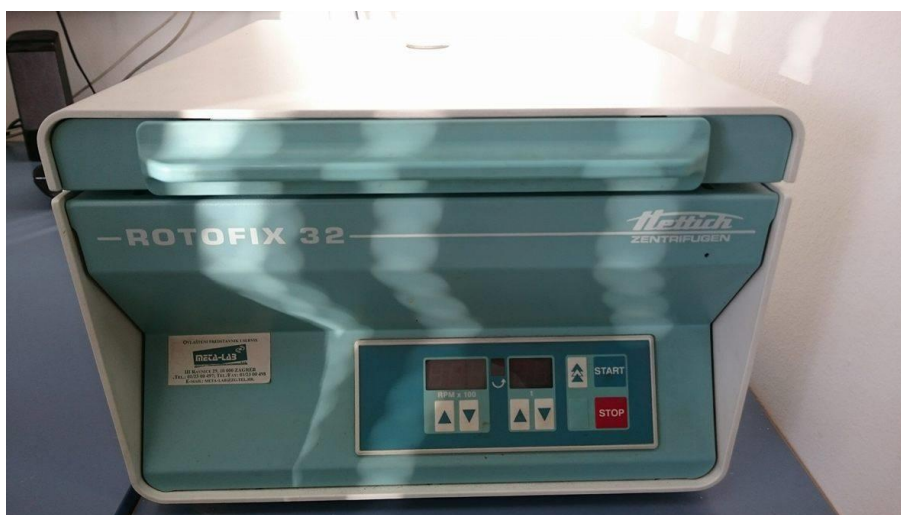


**Slika 6.** Uređaj za visoki tlak: Stansted Fluid Power, Velika Britanija

### *Postupak ekstrakcije:*

U plastičnu bočicu volumena 50 mL odvaži se 1 g ( $\pm 0,001$ ) prethodno izvaganog uzorka praha pokožice grožđa sorte Merlot te se menzurom doda 45 mL 70 %-tnog etanola. Zatim se plastična bočica dobro zatvori, stavi se u plastičnu vrećicu (idealan položaj plastične bočice je vodoravan) i vakuumira u uređaju za vakuumiranje. Bočicu sa uzorkom i otapalom potrebno je staviti u plastičnu vrećicu te zavariti i vakuumirati, kako bi se uslijed tretiranja visokim tlakovima spriječilo eventualno prodiranje otopine glicerola iz cilindra tijekom procesa ekstrakcije. Tako vakuumirani uzorci stavljaju se u uređaj i na računalo se podese željeni parametri ekstrakcije. Slijedi ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom prema planu pokusa (Tablica 2).

Nakon provedene ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom ekstrakti se kvantitativno (pomoću staklenog lijevka) prenesu u omjernu tikvicu volumena 50 mL i do oznake nadopune 70 %-tnim etanolom. Potom se uzorci preliju u falkonice volumena 50 mL, dobro zatvore i centrifugiraju 10 minuta na 5000 rpm (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka, slika 7). Nakon centrifugiranja ekstrakti se dekantiraju u falkonice volumena 15 mL i skladište na  $-18^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize.



**Slika 7.** Uređaj za centrifugiranje – HETTICH (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

#### *Princip određivanja:*

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Za određivanje se koristi Folin-Ciocalteu reagens koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Princip metode se temelji na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom nastaje plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

#### *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 250  $\mu$ L ekstrakta (koji je 10x razrijeđen sa 70%-tnim etanolom), 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (koji je 10x razrijeđen destiliranom vodom), te nakon nekoliko minuta doda se 1 mL 7,5 %- tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 70 %-tni etanol. Uzorci se promiješaju, a zatim termostatiraju u kupelji od rotavapora 15 minuta pri temperaturi 45 °C. Nakon termostatiranja na spektrofotometru (slika 8) mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.



**Slika 8.** Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS  $\beta$ , Velika Britanija) – vlastita fotografija



### *Izrada baždarnog pravca:*

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

Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 500 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 2,5 mL F.C. reagensa ( koji je 10x razrijeđen), nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali umjesto otopine standarda uzima se destilirana voda. Uzorci se potom termostatiraju 15 minuta pri temperaturi 45 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Na temelju dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca glasi:

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

gdje je:

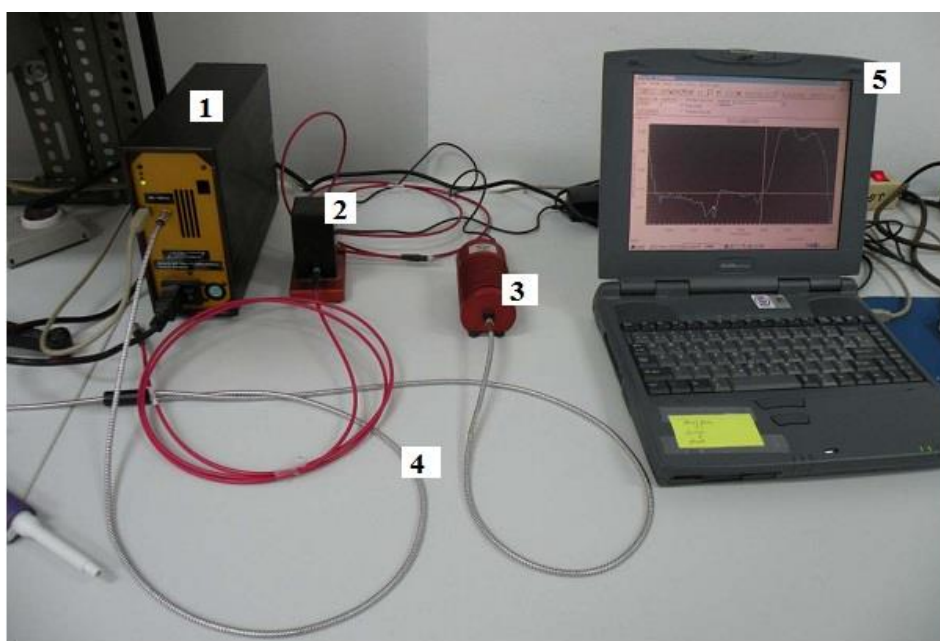
Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

### 3.2.3. Snimanje NIR (engl. Near infrared spectroscopy) spektra

Ovisno o tome da li je uzorak tekući, kruti ili obliku praha, uzorak se snima ili u kiveti ili pomoću sonde. Budući da su u ovom eksperimentu uzorci bili tekući koristila se kiveta. Prvi korak je da se uzorak iz falkonice prelije u kivetu koja se zatim stavlja u kućište te se zatvori poklopcem. Nakon postavljanja uzorka potrebno je upaliti NIR analizator i uključiti izvor svjetla, područje snimanja je od 904 – 1699 nm. Nakon toga, na računalu se pokrene program za snimanje apsorpcijskog spektra – SPEC 32. Tijekom ovog koraka NIR instrument mora biti upaljen. Spektri svakog uzorka snimani su 3 puta za redom i spremeni u datoteku na računalu. Na kraju se iz snimljena tri spektra prikazuje srednja vrijednost kako bi se minimizirale grubosti spektra i smanjile pogreške. Za svaki apsorpcijski spektar snimljena je prva i druga derivacija kako bi se što točnije izdvojili kritični spektri vezani za antioksidacijsku aktivnost uzorka. Za konačnu analizu snimljenih NIR spektra ispitivanih uzoraka korišten je program Statistica ver.10. (StaSoft, 2009), (slika 9)



**Slika 9.** NIR instrument povezan s računalom s označenim dijelovima:

- 1) NIR instrument; 2) mjesto za snimanje uzorka u kiveti; 3) izvor svjetlosti;
- 4) optički kablovi; 5) računalo

### 3.2.3.1. Primjena metode najmanjeg kvadrata u modelu predviđanja ukupnih fenola

NIR spektri su organizirani u matricu  $\mathbf{X}$  s uzorcima postavljene u redovima i NIR spektrima smještenim u stupcima. Svaki vektor varijable je automatski skaliran s pripadnom valnom duljinom uzorka te se prikazuje kao:

$$\mathbf{X}_{i,j} \leftarrow \frac{X_{i,j} - \bar{X}_j}{\sigma_j(X_j)} \quad (1)$$

Značajne valne duljine izdvojene iz apsorpcijskih spektara korištene su dalje u predikcijskim modelima koji predstavljaju linearni regresijski modeli sa sljedećim oblikom:

$$y = b + \sum a_j \cdot AU_{\lambda_j} + e_i$$
$$y = a_1 \cdot AU_{\lambda_1} + a_2 \cdot AU_{\lambda_2} + a_3 \cdot AU_{\lambda_3} + a_4 \cdot AU_{\lambda_4} + a_5 \cdot AU_{\lambda_5} + \dots + e_i \quad (2)$$

te uključenjem ključnih valnih duljina, izraz za vezu NIR spektara i ukupnih fenola poprima sljedeći oblik:

$$y = a_1 \cdot AU_{918} + a_2 \cdot AU_{1407} + a_3 \cdot AU_{1437} + a_4 \cdot AU_{1450} + a_5 \cdot AU_{1506} + a_6 \cdot AU_{1661} + a_7 \cdot AU_{1693} + b \quad (3)$$

gdje je:

$y$  – zavisna varijabla: ukupni fenoli (UF);

AU - promatrane absorbance spektra

$a_1$ - $a_n$ ,  $b$  - parametri modela

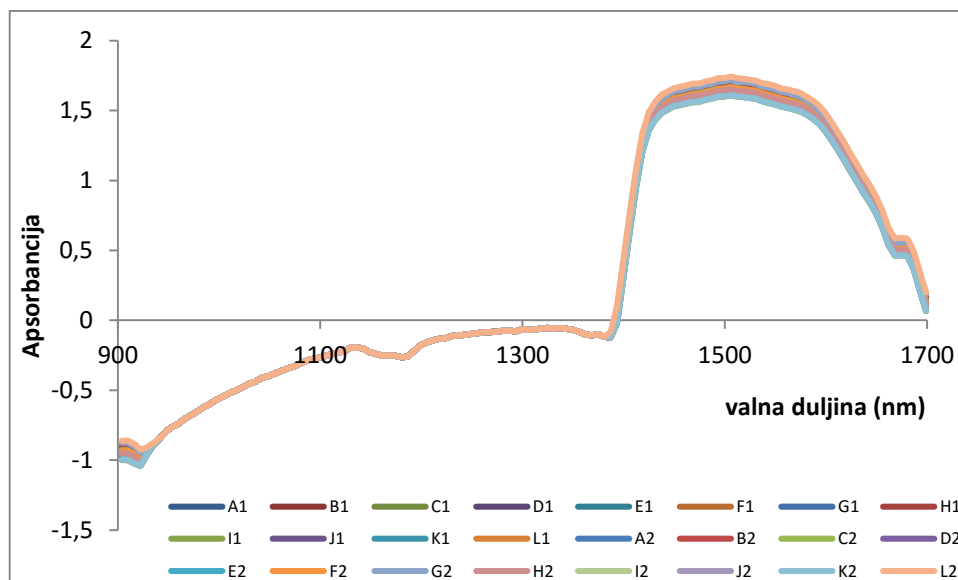
Reprezentativnost regresijskog modela ocjenjena je koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 3). Koeficijentom determinacije se procjenjuje veza između promatrane zavisnih i nezavisnih varijabli modela te što je koeficijent determinacije bliži vrijednosti 1, to je veza među promatranim varijablama reprezentativnija tj. čvršća.

**Tablica 3.** Chadockova ljestvica

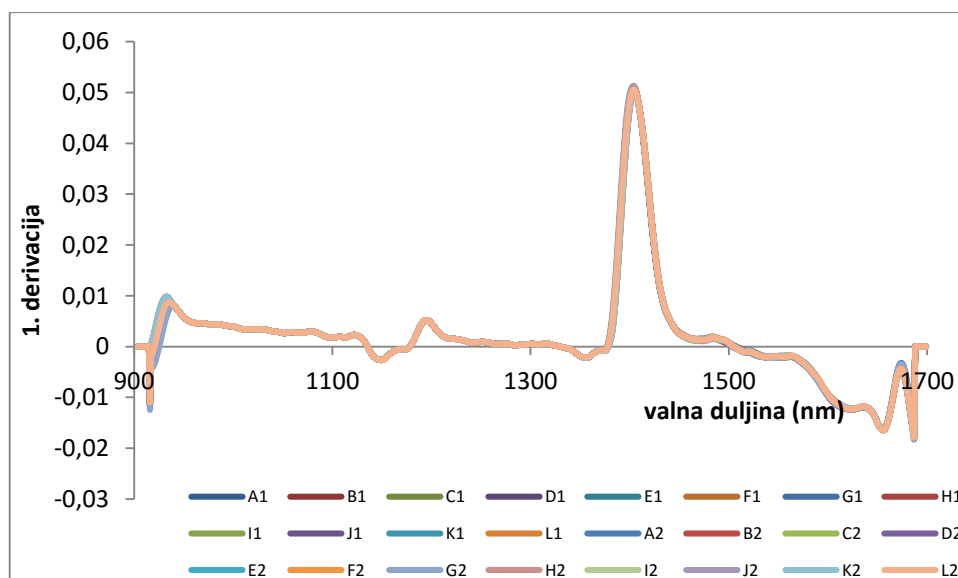
<b><math>R^2</math></b>	<b>Značenje</b>
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

## 4. REZULTATI

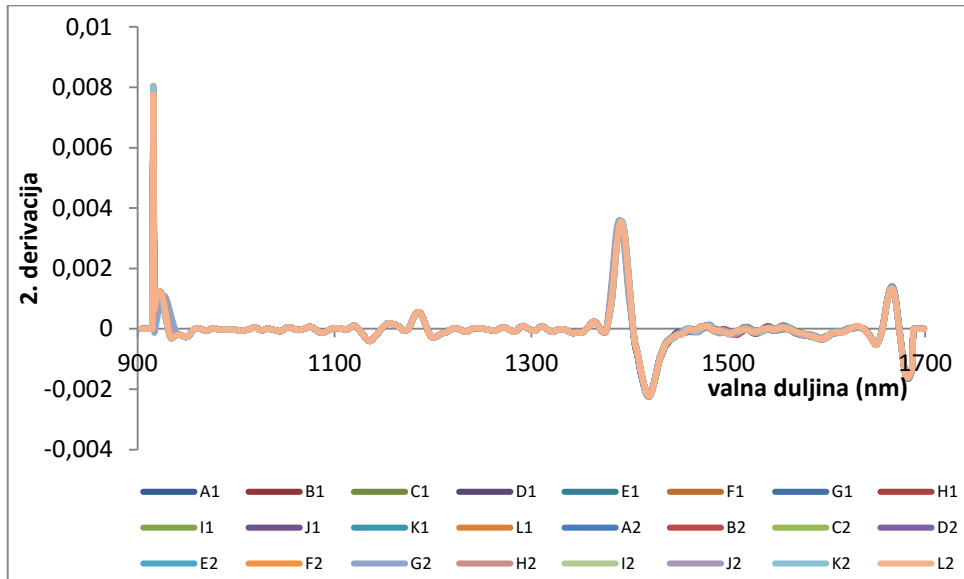
### 4.1. Rezultati NIR spektroskopije



Slika 10. NIR spektar ekstrakata komine grožđa sorte Merlot

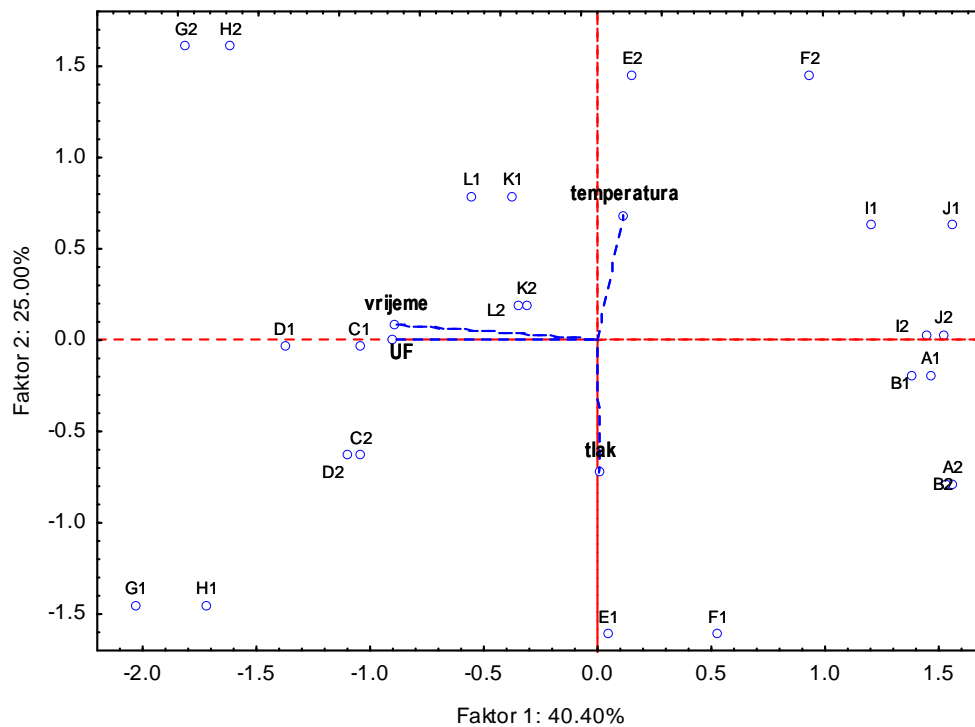


Slika 11. Prva derivacija NIR spektra ekstrakata komine grožđa sorte Merlot



Slika 11. Druga derivacija NIR spektra ekstrakata komine grožđa sorte Merlot

#### 4.2. Rezultati analize glavnih komponenta



Slika 12. PCA analiza spektara ekstrakata komine grožđa sorte Merlot

### 4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola

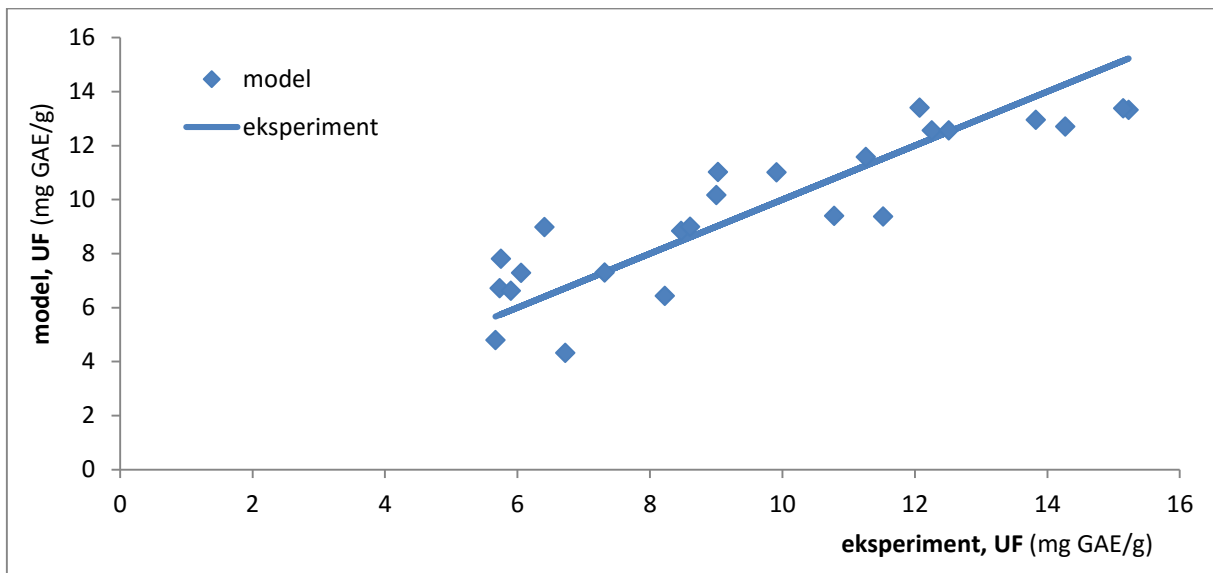
**Tablica 4.** Koncentracija ukupnih fenola dobiveni ekstrakcijom pri različitim temperaturama, tlakovima i vremenima

Šifra uzorka	Temperatura (°C )	Tlak ( MPa )	Vrijeme ekstrakcije ( min )	Ukupni fenoli ( mg GAE/g )
A	40	200	5	5,71±0,06
B			15	5,98±0,11
C		400	5	11,02±0,34
D			15	11,89±0,52
E	60	200	5	12,29±0,31
F			15	9,45±0,64
G		400	5	15,18±0,06
H			15	14,04 ±0,31
I	80	200	5	7,02±0,42
J			15	6,07±0,48
K		400	5	8,34±0,18
L			15	8,81±0,30

### 4.4. Rezultati regresijskog modela

**Tablica 5.** Parametri regresijskog modela za predviđanje sadržaja ukupnih fenola iz ekstrakata komine grožđa sorte Merlot (jednadžba 3)

parametar	vrijednost
<b>a1</b>	-1179,82
<b>a2</b>	-324,811
<b>a3</b>	-407,977
<b>a4</b>	1309,84
<b>a5</b>	804,695
<b>a6</b>	-546,105
<b>a7</b>	336,665
<b>b</b>	-3454,08



**Slika 13.** Regresijski model s prikazom odnosa eksperimentalnih podataka za ukupne fenole vs. vrijednosti za ukupne fenole prema modelu (jednadžba 3)



## 5. RASPRAVA

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola iz komine grožđa sorte Merlot prikazani su tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja (Tablica 4). Kao otapalo pri ekstrakciji korišten je 70 %-tni etanol. Parametri koji su bili varirani tijekom eksperimenta su: temperatura, tlak i vrijeme ekstrakcije.

U ovom radu jedan od ciljeva bio je odrediti utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na ekstrakciju ukupnih fenola iz komine grožđa sorte Merlot, a potom snimiti NIR spektre koji u blisko-infracrvenom području (900-2500 nm) snimaju vibracije molekula. Glavna prednost NIR spektroskopije je da se uzorci bez dodatne pripreme mogu snimiti brzo i jednostavno.

Cilj primjene NIR spektroskopije je odrediti u kojem području su vidljive promjene u spektru koje se povezuju sa kemijskom strukturom snimanog uzorka te se uz primjenu regresijskih modela mogu koristiti u predviđanju određenih fizikalno-kemijskih parametara koji su određeni za promatrani uzorak. U ovom radu je NIR spektar povezan sa masenim udjelima biološki aktivnih spojeva, odnosno ukupnih fenola u ekstraktima komine grožđa sorte Merlot. NIR spektri mogu dati odgovor koliko u uzorku ima ukupnih fenola bez provođenja analitičkog dijela i utroška reagensa.

Na ekstraktima komine grožđa sorte Merlot provedena je blisko infracrvena analiza, tzv. NIR-spektroskopija. Na slikama 10-12 prikazan je NIR spektar i pripadna 1. i 2. derivacija kako bi pikove bolje istaknuli i potvrdili prisutnost vibracija. Blisko-infracrvena spektroskopija snima vibracije molekula C-H, N-H i O-H, te je na osnovu spektra i njegovih promjena u promatranom valnom području - moguće procijeniti o kojim se vibracijama radi (Ozaki i sur., 2007). Prema NIR absorpcijskim spektrima ekstrakata komine grožđa sorte Merlot promjena koje su vidljive u spektru su pri valnim duljinama 904-928 nm te 1421-1683 nm. Dio spektra od 900-1000 nm odgovara trećem gornjem tonu (eng. overtonu) vibracija C-H<sub>3</sub>, C-H<sub>2</sub>, C-H, R-OH veza, dok se u području od 1400-1700 nm isprepliću vibracije drugog i trećeg overtona za C-H<sub>3</sub>, C-H<sub>2</sub>, C-H, R-OH te O-H veza. Sve navedene veze očekujemo u fenolima (Ignat i sur., 2011). Promatranjem prve i druge derivacije spektra, izdvojiti će se specifični dijelovi spektra (koji se obično koriste u predikcijskim modelima). NIR spektri snimani su u području 904-1699 nm i u tom području događale su se vibracije molekula karakteristične za ukupne fenole. Budući da je osnovna struktura fenolnih spojeva benzenski prsten sa hidroksilnim skupinama (Ignat i sur., 2011) događale su se vibracije O-H i C-H veza. Značajni pikovi dogodili su se pri valnim duljinama 918, 1407, 1437, 1450, 1506,

1661, 1693 nm. Budući da sve molekule titraju na svoj način i pritom se događaju različiti overtoni i kombinacije, valna duljina od 918 nm predstavlja 2. overton za O-H skupinu i 3. overton za C-H skupinu. Nadalje, valna duljina od 1407 nm pripisuje se C-H kombinacijama, a valne duljine 1437, 1450, 1506 nm predstavljaju 1. overton za O-H skupinu, dok se zadnje dvije valne duljine od 1661 i 1693 nm pripisuju 1. overtonu C-H skupine. Iz svega se može zaključiti kako prevladavaju O-H veze što je i logično zbog dvostruke veze koja lakše puca.

Analiza glavnih komponenti omogućuje grupiranje i analizu podataka bez da je potrebno postaviti fizički model. Pomoću faktorskih bodova (eng. score plots) se izvodi vizualizacija podataka, a njihove vrijednosti za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućuje njihovo grupiranje (Jednaček i Novak, 2013). Ova analiza, poznata kao PCA (eng. Principal Component Analysis) je vrlo široko korišten postupak za analizu podataka, koji omogućuje jednostavnu, neparametarsku metodu izlučivanja bitne informacije i značajki iz skupova podataka upotrebom rješenja iz linearne algebre (Gajdoš Kljusurić i sur., 2015; Ozaki i sur., 2007).

Na slici 12 prikazana je PCA analiza za ukupne fenole i parametre ekstrakcije koji su se mijenjali. Vrijeme i ukupni fenoli smjestili su se u lijevom dijelu grafa, što upućuje na njihovu pozitivnu korelaciju, odnosno s dužim vremenom ekstrakcije će se u pravilu povećati i koncentracija ukupnih fenola, međutim, vrijeme je u pozitivnoj korelaciji sa temperaturom, a obrnuto proporcionalno sa tlakom, te su to parametri koji će također utjecati na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine grožđa sorte Merlot. Možemo zaključiti da su ukupni fenoli u pozitivnoj korelaciji sa uzorcima koji se nalaze u drugom, a posebno u trećem kvadrantu. Potvrda toj tvrdnji se nalazi u Tablici 4 gdje ekstrakti pod šifrom G ( $15,18 \pm 0,06$  mg GAE/g), H ( $14,04 \pm 0,31$  mgGAE/g), E ( $12,29 \pm 0,31$  mgGAE/g), D ( $11,89 \pm 0,52$  mg GAE/g) imaju najveću koncentraciju ukupnih fenola i upravo ta četiri uzorka su smještena u drugom i trećem kvadrantu.

Sljedeći korak je razvoj regresijskog modela čija se jednadžba i definirani parametri modela koriste u predviđanju masenog udjela ukupnih fenola na osnovu specifičnih valnih duljina, izdvojenih iz NIR spektara. Što je vrijednost koeficijenta determinacije bliža jedinici veza između promatranih varijabli je čvršća (Kurtanjek i Gajdoš Kljusurić, 2014).

Parametri modela navedeni su u Tablici 5, te se slaganje eksperimentalnih vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima komine grožđa sorte Merlot sa podacima ukupnih fenola dobivenih modelom, može promotriti na slici 13. Rezultat predikcijskog modela ukupnih fenola prikazan na slici 13 pokazuje, s obzirom na Chadackovu ljestvicu, koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,789$ ) pokazuje čvrstu vezu između promatrane zavisne ( $y =$  ukupni fenoli) i skupa nezavisnih varijabli (7 valnih duljina;  $\lambda_{1-7}$ : 918; 1407; 1437; 1450; 1506; 1661 i 1693).

Ovaj model omogućava da se za neke nove ekstrakte komine grožđa sorte Merlot može predvidjeti očekivani maseni udjel ukupnih fenola. Na temelju postavljenog modela iz jednadžbe [3] moguće je odrediti maseni udjel ukupnih fenola. U obzir se uzimaju parametri modela ( $a_{1-7}$  te parametar  $b$ , a iz NIR spektra se očitaju vrijednosti pri valnim duljinama ;  $\lambda_{1-7}$ : 918; 1407; 1437; 1450; 1506; 1661 i 1693).

Dobiveni rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola prikazani u Tablici 4. pokazuju da je iskorištenje bilo veće pri temperaturama ekstrakcije od 60 °C u usporedbi sa ekstrakcijskim temperaturama 40 °C i 80 °C. Neovisno o vrijednostima tlaka i vremena ekstrakcije maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima pri 60 °C iznosili su od 9,45 do 15,18 mg GAE/g. Nešto više vrijednosti ukupnih fenola ipak su zabilježene pri vrijednostima tlaka od 400 MPa u usporedbi sa ekstraktima dobivenim pri 200 MPa. Prasad i sur (2009) uočili su kako povećanje temperature dovodi do porasta koncentracije fenolnih spojeva. Kad su temperaturu ekstrakcije povećali sa 30 °C na 50 °C koncentracija ukupnih fenola povećala se sa  $21 \pm 0,6$  na  $23 \pm 0,3$  mg/g DW. Pri višim temperaturama dolazi do povećanja topljivosti ekstrahiranih tvari i povećanja koeficijenta difuzije što za posljedicu ima veće koncentracije fenolnih spojeva. No, s druge strane, fenolni spojevi su osjetljivi na toplinu, pa je temperatura od 60 °C uzeta kao gornja granica (Spigno i sur., 2007). Temperature veće od 60 °C dovode do degradacije fenolnih spojeva što se u konačnici odražava smanjenjem koncentracije ukupnih fenola. U ovom radu se to i potvrdilo budući da su koncentracije ukupnih fenola pri temperaturi od 60 °C bile veće u odnosu na temperaturu od 80 °C.

Nadalje, ako se razmotri utjecaj tlaka, neovisno o temperaturi i vremenu ekstrakcije, dobiveni rezultati pokazuju da su viši prinosi ukupnih fenola ostvareni pri tlaku od 400 MPa. Slično su pokazali i rezultati znanstvenih istraživanja.

Tako, Xi i sur. (2015) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva iz zelenog čaja i zaključuju kako povećanje hidrostatskog tlaka sa 300 MPa na 500 MPa dovodi i do povećanja ukupnih fenola. Također, Corrales i sur., (2008) provodili su ekstrakciju ukupnih antocijana iz pokožice grožđa pri hidrostatskim tlakovima 200 MPa, 400 MPa i 600 MPa i dolaze do zaključka da je veći prinos dobiven sa tlakom od 600 MPa. Razlog tomu jest da povećanjem tlaka dolazi do boljeg oštećenja stanične membrane pa više otapala ulazi u stanicu što za posljedicu ima veći prinos ekstrakta (Briones-Labarca i sur., 2015).

Vežano za vrijeme trajanja ekstrakcije, dobiveni rezultati pokazuju da je utjecaj vremena ekstrakcije istovremeno u funkciji temperature pa su tako pri temperaturi 40 °C, neovisno o primijenjenom tlaku, veća iskorištenja ostvarena pri 15 min u odnosu na 5 min. Nadalje, pri temperaturi ekstrakcije 60 °C i 80 °C, neovisno o primijenjenom tlaku, dobiveni rezultati pokazuju da je duže vrijeme ekstrakcije (15 min vs. 5 min) imalo negativne reperkusije na sadržaj ukupnih fenola, stoga su maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima bili veći pri kraćem ekstrakcijskom vremenu. Izuzetak je ekstrakt dobiven pri 80 °C i 400 MPa gdje je pri dužem vremenu ekstrakcije (15 min) određena neznatno veća koncentracija ukupnih fenola. Prema istraživanju koje su proveli Spigno i sur., (2007) zaključuju kako nema značajne razlike u koncentraciji ukupnih fenola između trajanja ekstrakcije od 5 h i 24 h. Isto tako, Prasad i sur., (2009) su ustanovili kako povećanje vremena ekstrakcije s 2,5 min na 30 min nema utjecaja na koncentraciju ukupnih fenola prilikom ekstrakcije na perikarpu longan voća. Nadalje, dobiveni rezultati Shouqin i sur., (2005) u skladu su s rezultatima dobivenim u ovom radu, u svom istraživanju su povećali vrijeme ekstrakcije sa 1 min na 10 min i povećanje vremena ekstrakcije nije imalo utjecaja na ekstrakciju flavonoida.

## 6. ZAKLJUČAK

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

1. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom pokazala se učinkovitom za ekstrahiranje fenolnih spojeva. Glavne prednosti metode su brzina ekstrakcije, prinos ekstrakcije i ekološka prihvatljivost.
2. Najveći prinos ukupnih fenola dobiven je pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: tlaku od 400 MPa u trajanju tretmana od 5 min i temperaturi 60 °C ( 15,18±0,06 mg GAE/g). Otopalo koje se koristilo je bio 70 %-tni etanol.
3. NIR spektroskopija je široko prihvaćena i korištena metoda, a pomoću snimljenih NIR spektra možemo predvidjeti koliko u uzorku ima ukupnih fenola bez provođenja analitičkog dijela i utroška reagensa.
4. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) pokazuju grupiranje uzoraka ovisno o temperaturi, tlaku i vremenu ekstrakcije na temelju faktorskih bodova. Vrijeme i ukupni fenoli smjestili su se u lijevom dijelu grafa, što upućuje na njihovu pozitivnu korelaciju. Vrijeme je u pozitivnoj korelaciji sa temperaturom, a obrnuto proporcionalno sa tlakom. Ukupni fenoli su u pozitivnoj korelaciji sa uzorcima koji se nalaze u drugom, a posebno u trećem kvadrantu. Stoga, najveću koncentraciju ukupnih fenola imaju četiri uzorka smještena u drugom i trećem kvadrantu.
5. Rezultat predikcijskog modela ukupnih fenola potvrđuje slaganje sa eksperimentalnim vrijednostima, a s obzirom na Chadockovu ljestvicu koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,789$ ) pokazuje čvrstu vezu između promatrane zavisne (  $y$ =ukupni fenoli ) i skupa nezavisnih varijabli ( 7 valnih duljina:  $\lambda_{1-7}$ : 918; 1407; 1437; 1450; 1506; 1661 i 1693 )
6. Razvoj regresijskog modela omogućava da se za neke nove ekstrakte komine grožđa sorte Merlot mogu predvidjeti maseni udjeli ukupnih fenola.

## 7. LITERATURA

- Ahmed, J. i Ramaswamy, H. S. (2006) High pressure processing of fruit and vegetables. *Stewart Postharvest Review* **1**, 1- 10.
- Altuner, E.M., İşlek, C., Çeter, T., Alpas, H. (2012) . High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits, *African J. Biot.* 930-937
- Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M. i Karlović, S. (2010) Princip rada i primjena visokog tlaka u prehrambenoj industriji. *Kem. Ind.* **59**, 539–545.
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuna, C., Jamett, F. (2015) High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 525-534.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D. i Tauscher, B. (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innov. food sci. & emerg. technol.* **9**, 85-91.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M. (2015) - A comparative study on different extraction techniques to recover red grapepomace polyphenols from vinification byproducts, *Ind.Crops.Prod.*  
DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.05.063
- Friedman Mendel (2014) Antibacterial, Antiviral and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6025-6042
- Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M., Bauman, I. (2015) Classification and processing optimization of barley milk production using NIR spectroscopy, particle size, and total dissolved solids analysis. *J. Chem.* **2015**, 1-7.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V. (2014) – Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *Nutrients*, **6**, 391-415
- Gil-Chavez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A. (2013) – Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**, 5-23

- Gonzalez-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rossello, C., and Teissedre, P.L. (2013) – Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts (*Vitis Vinifera*, L.) *J. Agric. Food Chem.* **61**, 11579-11587
- Holtung, L. (2014) Berry press- residue-a valuable source of polyphenols with potential health effects. Series of dissertations submittes to the Faculty of Medicine, University of Oslo. No.1828
- Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B., Wang, C.Y. (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends Food Sci. Technol.***33**, 54 - 62
- 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
- Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.
- Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem. Ind.* **60** (1), 11–19.
- Kurtanjek, Ž., Gajdoš Kljusurić, J. (2014) Statistical modelling of anthropometric characteristics evaluated on nutritional status. U: *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (ur. Granato, D. i Ares, G.) John Wiley and Sons, Oxford, UK. str. 285 – 302.
- Lee, H.S., Lee, H.J., Yu, H.J., Ju, D.W., Kim, Y., Kim, C.T., et al. (2011). A comparison between high hydrostatic pressure extraction and heat extraction of ginsenosides from ginseng (*Panax ginsend* CA Meyer) *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 1466 – 1473
- Luque-Rodríguez, J.M., Luque de Castro, M.D. and Pérez-Juan, P. (2007) – Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Biores. Technol.* **98**, 2705-2713
- Nassiri-Asl, M. & Hosseinzadeh, H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res*, **23**, 1197-204
- Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. (2007) *Near-infrared spectroscopy in Food Science and Technology*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C., (2005) Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* **92**(1), 109-117.

- 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. Technol.* , **17**, 579-590.
- Prasad, N. K., Yang, E., Yi, C., Zhao, M. i Jiang, Y. (2009) Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innov. food sci. & emerg. technol.* **10**, 155- 159.
- Rentsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P. & Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. *J Agric Food Chem*, **55**, 4883-8.
- Riedel, H., Saw, N.M.M.T., Akumo, D.N., Kütük, O., Smetanska, I. (2012) Wine as Food and Medicine. U: *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (Valdez, B., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str. 399–418.
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, **910**, 265-273.
- Shouqin, Z., Jun, X., Changzheng, W. (2005) High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biot.* **80 (11)**, 50–54.
- 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.
- Strati, I.F., Oreopoulou, V. - Enzyme and High Pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.012>
- Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, MC., Belchior, A.P., Spranger, M.I., 2006. Stilbenes: quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* 563 (1–2), 382–390
- Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678. doi:10.3390/ijms150915638.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., Gerós, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18711-18739.



- Vivier, M.A., Pretorius, I.S. (2000) Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millennium—A review. *South African Society for Enology & Viticulture* **21**, 5–26.
- Wang, C.Y., Huang, H.W., Hsu, C.P., & Yang, B.B. (2013). Recent advances on food processing using high hydrostatic pressure technology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 527-40. doi: 10.1080/10408398.2012.745479.
- Xi, J., He, L., Yan, L. (2015) Kinetic modeling of pressure-assisted solvent extraction of polyphenols from green tea in comparison with the conventional extraction. *Food Chem.* **166**, 287–291.
- Xi, J. (2006). Effect of high pressure processing on the extraction of lycopene in tomato paste waste. *Chem. Eng. Technol.*, **29**, 736 – 739
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B. (2010) – Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int.J.Mol.Sci*, **11**, 622-646
- Yu, J., Ahmedna, M., Bansode, R. (2014) – Agricultural By-Products as Important Food Sources of Polyphenols. *Polyphenols: Food Sources, Bioactive Properties and Antioxidant Effects*, Nova Science Publishers, pp. 1-32
- Zhang S, Xi J, Wang C (2005). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biot.* **80**: 50-54.
- Zoričić, M. (1996) *Podrumarstvo*, 2. proš. izd., Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 104-115.

