

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Karla Kelšin
686/USH

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ
POKOŽICE KOMINE GROŽĐA
CABERNET SAUVIGNON
PRIMJENOM MIKROVALOVA**

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.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić te uz pomoć doc. dr. sc. Natke Ćurko.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina na pruženoj pomoći i danim savjetima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE KOMINE GROŽĐA CABERNET SAUVIGNON PRIMJENOM MIKROVALOVA

Karla Kelšin 686/USH

Sažetak: Komina grožđa je visokovrijedan i bioaktivnim spojevima bogat nusproizvod dobiven tijekom proizvodnje vina. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj polarnosti otapala (60 % i 100 % metanol), kiselosti otapala (0 % i 1 % HCl) te temperature (45 i 60 °C) na mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju polifenolnih spojeva iz pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) te odrediti antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata. Polifenolni sastav ekstrakata analiziran je spektrofotometrijskim metodama te metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a antioksidacijski kapacitet utvrđen je fluorimetrijski (ORAC). Utvrđeni optimalni uvjeti mikrovalne ekstrakcije pojedinačnih grupa polifenolnih spojeva prisutnih u pokožici komine grožđa uz održavanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti odnose se na primjenu 100 % metanola uz dodatak 1 % HCl pri temperaturi 60 °C u ekstrakcijskom vremenu od 16 minuta.

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

Rad sadrži: 55 stranica, 7 slika, 2 tablice, 136 literaturnih navoda.

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Natka Ćurko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (Predsjednik)
2. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (Mentor)
3. Doc. dr. sc. Leo Gracin (Član)
4. Prof. dr. sc. Draženka Komes (Zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM CABERNET SAUVIGNON GRAPE SKIN POMACE

Karla Kelšin 686/USH

Abstract: Grape pomace is the valuable byproduct obtained during wine production, highly rich in bioactive compounds. The aim of this research was to examine the effect of solvent polarity (60 % and 100 % methanol), solvent acidity (0 % and 1 % HCl) and the process temperature (45 and 60 °C), on the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape skin pomace, and the antioxidant activity of the obtained extracts. Polyphenolic content of extracts was determined by spectrophotometry. Content of free anthocyanins was determined by HPLC, while antioxidant capacity of extract was determined by fluorimetry (ORAC). Optimal conditions in microwave-assisted extraction of total polyphenols, total tannins, total flavonols and total hydroxycinnamic acids as well for maintaining antioxidant activity showed to be 100 % methanol with the addition of 1 % HCl and temperature of 60 °C during 16 min.

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

Thesis contain: 55 pages, 7 figures, 2 tables, 136 references.

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Karin Kovačević-Ganić*, Full Professor

Technical support and assistance: *PhD. Natka Ćurko*, Senior Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Associate Professor (Chairman)
2. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full Professor (Mentor)
3. PhD. Leo Gracin, Assistant Professor (Member)
4. PhD. Draženka Komes, Full Professor (Substitute)

Thesis defended: 26th September 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KOMINA GROŽĐA-NUSPRODUKT U PROIZVODNJI VINA.....	4
2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET KOMINE	5
2.2. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	8
2.3. EKSTRAKCIJA PRIMJENOM MIKROVALOVA	9
2.3.1. Utjecaj odabranog otapala pri ekstrakciji mikrovalovima	10
2.3.2. Utjecaj vremena pri ekstrakciji mikrovalovima.....	12
2.3.3. Utjecaj temperature i snage mikrovalova pri ekstrakciji mikrovalovima	13
2.3.4. Utjecaj ostalih faktora na efikasnost ekstrakcije mikrovalovima	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL	16
3.1.1. Uzorci pokožice komine grožđa Cabernet Sauvignon	16
3.1.2. Kemikalije.....	17
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova	19
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	20
3.2.3. Određivanje ukupnih tanina	21
3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana	22
3.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	23
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	25
3.2.7. Određivanje ukupnih slobodnih antocijan-3- <i>O</i> -glukozida, antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetata, antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	
27	
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH POLIFENOLA	31
4.2. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH TANINA.....	33
4.3. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH ANTOCIJANA TE SLOBODNIH ANTOCIJAN-3- <i>O</i> -GLUKOZIDA, ANTOCIJAN-3- <i>O</i> -GLUKOZID ACETATA, ANTOCIJAN-3- <i>O</i> -GLUKOZID <i>p</i> -KUMARATA	34
4.4. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOLA	
38	
4.5. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET EKSTRAKTA	40
5. ZAKLJUČCI	42

6. LITERATURA	44
----------------------------	-----------

1. UVOD

Komina je visokovrijedan nusproizvod koji zaostaje nakon prešanja u procesu proizvodnje vina. Sastoji se od pokožice, sjemenki te zaostalih dijelova peteljki grožđa, a predstavlja 20 % od ukupne količine prerađenog grožđa, odnosno količinu od čak 7-10 milijuna tona godišnje na svjetskoj razini. Zbog nepravilnog tretiranja i nepropisnog odlaganja u okoliš komina može biti uzrok površinskog i dubinskog zagađenja tla i podzemnih voda, zbog čega je Europska komisija putem ekoloških direktiva propisala niz zahtjeva kojima bi se trebao smanjiti negativan učinak takvog organskog otpada na okoliš. Rješenje ovog problema stoga se vidi u kvalitetnom korištenju otpada koje bi s jedne strane smanjilo količinu postojećeg otpada, a s druge strane rasteretilo ekonomsku bilancu vinarske proizvodnje kroz stvaranje sirovine dodane vrijednosti.

Osim što sadrži velike količine lignina, kalija, vitamina, šećera, vinske kiseline te ulja, kroz čiju se konverziju u čiste sirovine ostvaruje određen ekonomski profit, vinska komina odlikuje se visokim sadržajem polifenolnih spojeva koji zaostaju u komini nakon proizvodnje. Biološka vrijednost polifenolnih spojeva povezuje se s njihovim antioksidacijskim, antimikrobnim, protuupalnim i drugim djelovanjima. (Bandyopadhyay i sur., 1999) Ukoliko se isti ekstrahiraju primjenom učinkovitih metoda koje mogu sačuvati njihov antioksidacijski kapacitet mogu se koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Gonzalez-Paramas i sur., 2004).

Stoga je izrazito važan odabir metode koja omogućuje njihovu brzu i efikasnu izolaciju i ekstrakciju uz uporabu što manje količine otapala, primjenu blagih ekstrakcijskih uvjeta sa mogućnošću kontrole temperature, pri čemu se kao krajnji produkt dobivaju ekstrakti visokog sadržaja polifenola i visoke antioksidacijske aktivnosti. Nove tehnologije ekstrakcije među kojima je značajna primjena mikrovalova zadovoljavaju navadne kriterije.

Cilj ovog istraživanja je postupkom mikrovalne ekstrakcije izolirati polifenolne spojeve iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon te ispitati utjecaj polarnosti otapala, kiselosti otapala i temperature procesa na efikasnost ekstrakcije te antioksidacijsku aktivnost dobivenog ekstrakta. Konačni cilj je odrediti optimalne uvjete mikrovalne ekstrakcije pri kojima se dobiva najveći prinos željenih komponenti i najbolja antioksidacijska aktivnost ekstrakta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMINA GROŽĐA-NUSPRODUKT U PROIZVODNJI VINA

Vinova loza je najrasprostranjenija voćna vrsta u svijetu, uzgaja se u svim regijama, gdje prevladavaju topla ljeta i relativno blage zime zbog čega ima vrlo važan gospodarski značaj. Njen se plod, grožđe, koristi u proizvodnji vina, soka od grožđa te različitih prehrambenih proizvoda (Ali i sur., 2010). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, u Hrvatskoj je tijekom 2014. godine proizvedeno približno 134 941 tona grožđa te 842 000 hL vina. Podaci Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom gospodarstvu pokazuju kako je sorta Cabernet Sauvignon, porijeklom iz Francuske, jedna je od najznačajnijih crnih sorti u Hrvatskoj i svijetu, a svoj leaderski status duguje dobroj otpornosti na oštrije klimatske uvjete i bolesti. U Hrvatskoj se najviše uzgaja u najistočnijoj regiji, Srijemu, sjevernim regijama, Zagorju i Međimurju, zatim u Istri, a prisutna je i na dalmatinskim otocima.

Industrija vina proizvodi dvije vrste otpada i to otpadne vode te čvrsti organski otpad ili kominu koja predstavlja čak 20 % od ukupne mase prerađenog grožđa, što godišnje čini količinu od otprilike 27 000 tona na Hrvatskoj (DZS, 2016) te 7-10 milijuna tona na svjetskoj razini (Teixeira i sur., 2014). Takav otpad stajanjem razvija neugodne mirise i lako se mikrobiološki kvare i stvara opasnost od pojave i širenja različitih bolesti. Organske tvari koje se tijekom vremena izdvajaju iz komine, odlaze u tlo gdje uzrokuju smanjenje udjela kisika, povećavaju kiselost i mogućnost produkcije metana te rizik od površinskog i dubinskog zagađenja tla i podzemnih voda (Licul i Premužić, 1993; Fontana i sur., 2013). Zbog ovih razloga, Europska komisija je propisala stroge ekološke direktive prema kojima je na području Europske unije zabranjeno nekontrolirano odlaganje otpada koji ima više od 5 % organskog ugljika. Primjena tih propisa te postupci tretiranja i zbrinjavanja komine u Hrvatskoj regulirani su Zakonom o održivom gospodarenju otpadom Republike Hrvatske (Zakon o održivom gospodarenju otpadom NN 94/13).

Komina grožđa sastoji se od 38-52 % sjemenke (Ghafoor i sur., 2009), 45-65 % pokožice te ovisno o tehnologiji proizvodnje vina od 1,4-7 % peteljke (Iora i sur., 2014). Tradicionalno, komina grožđa koristi se u proizvodnji jakog alkoholnog pića, komovice. Zbog značajnog udjela dušika i fosfora upotrebljava se kao biognojivo (Arvanitoyannis i sur., 2006) ili kao kruto gorivo za proizvodnju bioplina (Narobe i sur., 2014; Grlic i sur., 2014), proizvodnju limunske kiseline, metanola i etanola (Teixeira i sur., 2014) ili ekstrakciju ulja iz sjemenki. S druge strane, tijekom proizvodnje vina, čak 60-70 % polifenolnih spojeva

zaostaje u komini i ne prelazi u vino, što ju čini jeftinim alternativnim i lako dostupnim izvorom prirodnih, za zdravlje potrošača sigurnih antioksidansa (Arvanitoyannis i sur., 2006). Navedeni spojevi nakon ekstrakcije i izolacije mogu se ponovno inkorporirati u hranu te osnažiti njenu nutritivnu vrijednost, očuvati stabilnost sastojaka i produljiti sveukupnu prihvatljivost proizvoda za potrošače (Garrido i Borges, 2013; Iora i sur., 2014). Osim toga takvi ekstrakti mogu se koristiti u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Negro i sur., 2003; Escarpa i Gonzalez, 1998; Garcia-Marino i sur., 2006; Pinelo i sur., 2006).

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET KOMINE

Senzorske karakteristike vina kao što su boja, trpkoca, gorčina i aroma dobrim dijelom proizlaze iz polifenolnih spojeva, sekundarnih biljnih metabolita, prisutnih u grožđu (Gülçin, 2006). Danas je identificirano više od 8 000 polifenolnih spojeva različitih struktura i funkcija (Bravo, 1998), a zbog izrazito velikog broja poznatih spojeva svrstavaju se u nekoliko podgrupa. Dije se na flavonoide i ne-flavonoidne spojeve. Ne-flavonoidi čine većinu polifenolnih spojeva u bijelim vinima (85 %), dok se flavonoidi oslobađaju tek uslijed produžene maceracije te čine glavninu polifenolnih spojeva u crnim vinima.

Flavonoidi su najbrojnija skupina polifenola, a ime su dobili prema latinskoj riječi flavus što znači žuto, iako su u biljnom tkivu poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (Winkel-Shirley, 2001). U skupinu flavonoida svrstavaju se flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli te antocijani, a razlikuju se prema stupnju oksidacije piranskog prstena. Ne-flavonoidni spojevi su fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), lignani te stilbeni (Riedel i sur., 2012).

Polifenolni spojevi prisutni su u svim dijelovima grožđa odakle se ekstrahiraju u mošt, ovisno o tehnologiji proizvodnje i željenom stilu vina, međutim ovi spojevi velikim dijelom zaostaju u komini. Polifenolni sastav grožđa uvelike ovisi o genotipu sorte i agroklimatskim uvjetima uzgoja. Biosinteza polifenola najčešće se odvija preko acikličkih međuprodukata koji nastaju u biosintetskom putu šikiminske kiseline (Harborne, 1980), a mehanizme nastajanja fenolnih spojeva opisali su brojni autori (Harborne, 1988; Macheix i sur., 1990; Dixon i Paiva, 1995; Strack, 1997).

U sastavu komine grožđa u prvom redu nalazimo flavonoide (antocijani, flavanoli i flavonoli) te u manjem udjelu neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te stilbene) (Rodriguez i sur., 2006). Pokožica komine crnog grožđa bogata je flavonoidima i to antocijanima (slobodni antocijani i polimerni pigmenti), flavan-3-ol monomerima, oligomerima i polimerima (tanini), flavanolima te manjim udjelom stilbenima i fenolnim kiselinama (u prvom redu hidroksicimetne kiseline). U sastavu sjemenke komine također dominiraju flavonoidi i to primarno flavan-3-ol monomeri i oligomeri, koji se strukturom razlikuju od flavan-3-ola pokožice obzirom na manju veličinu molekula i veći udio esterski vezane galne kiseline (Mazza i sur., 1999).

Antocijani su polarni pigmenti smješteni u pokožici odgovorni za boju crnog grožđa, vina i komine (Di Lecce i sur., 2013). Struktura antocijana sastoji se od aglikona, odnosno antocijanidina na koje se mogu vezati šećeri ili organske kiseline (Konczak i Zhang, 2004; Mazza i Miniati, 1993; Monagas i sur., 2005). U sastavu grožđa, vina i komine prema broju i vrsti supstituiranih hidroksilnih i metilnih skupina razlikujemo 5 antocijanidina: delfinidin, cijanidin, peonidin, petunidin i malvidin. Izolirani iz biljnog tkiva, relativno su nestabilni i lako oksidiraju (Mazza i Miniati, 1993). Pri nižim pH vrijednostima nalaze se u formi flavijevog kationa kada su crveno obojeni, dok su pri višim pH vrijednostima u kinoidalnoj formi plavo-ljubičaste boje (Garrido i Borges, 2013; Montealegre i sur., 2006). Osim pH, antocijani su osjetljivi na mnogo faktora koji mogu utjecati na njihovu stabilnost i boju, a to su temperatura, svjetlo, kisik, otapalo, prisutnost enzima, flavonoida, proteina te metalnih iona (Castaneda-Ovando i sur., 2009). Prema istraživanjima, u komini i pokožici grožđa najzastupljeniji antocijani su malvidin-3-*O*-glukozid te peonidin-3-*O*-glukozid (15-45 %), dok su ostali prisutni u manjim koncentracijama (Amico i sur., 2004; Amico i sur., 2008; Ky i sur., 2014).

Tanini su polimeri flavan-3-ola velike molekulske mase. Većina flavan-3-ola se sintetizira upravo u vanjskim dijelovima sjemenki grožđa i stabljici vinove loze, dok se u hipodermalnom sloju pokožice sintetizira samo 15-20 % (Downey i sur, 2003; Kennedy i sur., 2006; Castellarian i sur., 2012). Postoje strukturne razlike između tanina iz različitih dijelova bobice. Tanini sjemenke su manje polimerizirani od proantocijanidina pokožice. Također postoje razlike u strukturi i koncentraciji tanina između različitih sorti grožđa (Kovač i sur, 1990). Najznačajnije monomerne jedinice u grožđu, vinu i komini su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin te (-)-epikatehin galat, a od ostalih flavanola najzastupljeniji su procijanidin dimeri B1, B2, B3 i B4 i procijanidin trimeri C1 i T1

(Kennedy i sur., 2006; Teixeira i sur., 2014). Ovi spojevi nositelji su okusa gorčine te inicijatori osjeta trpkooće. Tanini veće molekulske mase više pridonose trpkooći. Mehanizmi povezanosti veličine molekula i gorčine još uvijek nisu u potpunosti istraženi (Gawel, 1998).

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

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

Polifenolni spojevi su izrazito korisni biljkama u zaštiti od UV zračenja, pigmentaciji, obrana od nametnika, privlačenju oprašivača i raspršivanju sjemena (Riedel i sur., 2012). No, s druge strane, imaju izrazitu antioksidacijsku aktivnost te su stoga predmet brojnih istraživanja. Njihovo je djelovanje usmjereno na „hvatanje“ tj. neutralizaciju slobodnih radikala, spriječavanje stvaranja novih slobodnih radikala u organizmu, popravljavanje oštećenja nastalih njihovim djelovanjem kao što su oštećenja lipida, proteina, enzima, ugljikohidrata i DNA (Fang i sur., 2002; Rice-Evans i sur., 1996; Valls i sur., 2009). Polifenolni spojevi prisutni u komini grožđa pokazali su se kao jaki antioksidansi, jači od vitamina C i E te karotenoida (Rice-Evans i sur., 1995; Rice-Evans i sur., 1996) te također, kao odlična alternativa biljnog podrijetla koja može zamijeniti popularne, sintetičke antioksidanse kao što su butilirani hidroksitoluen (BHT), butilirani hidroksianisol (BHA) i tercijarni butil hidrokinon, koji se najčešće koriste u proizvodnji hrane iako postoje naznake o njihovom toksičnom učinku na jetru te pospješivanju mutageneze (Wichi, 1988). Osim antioksidativnih, imaju protuupalna, antikancerogena i antimikrobna svojstva i jedna su od najmoćnijih komponenti u funkcionalnoj hrani te u proizvodnji farmaceutskih proizvoda

(Kinsella i sur., 1993; Gonzalez-Paramas i sur. 2004), sudjeluju u modifikaciji upalnih procesa (Castilla i sur., 2006) i smanjenju oksidacije LDL kolesterola (Sano i sur, 2007). Njihov učinak potvrđuje i fenomen poznat pod nazivom „Francuski paradoks“ koji govori da umjerena konzumacija vina smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Scalbert i sur., 2005).

2.2. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA

U istraživanju i proizvodnji različitih biljnih ekstrakata iz voća, povrća, grožđa, kave, čajeva, začinskog bilja, žitarica i leguminoza još uvijek se dosta koriste konvencionalne metode ekstrakcije (Balasundrum i sur., 2006; Luthria i sur., 2006; Naczk i Shahidi, 2006; Baydar i sur., 2004; Bucić-Kojić i sur., 2007) koje podrazumijevaju sušenje ili jednostavno potapanje svježeg materijala u odgovarajuća ekstrakcijska otapala (Ignat i sur., 2011; Merken i Beecher, 2000). Takav proces temeljen je isključivo na slobodnoj difuziji otapala u stanice biljnog materijala te po otapanju metabolita difuziju otapala sa otopljenom tvari van stanica. Stoga je vidljivo kako je temelj efikasnosti takvog procesa upravo pravilan odabir otapala, temperature te ostalih uvjeta procesa (pH vrijednost, kiselost, vrijeme ekstrakcije). Na njihovu efikasnost također utječe i veličina čestica materijala i način miješanja, omjer materijala i otapala i drugo (Rostango i Prado, 2013). Konvencionalni tipovi ekstrakcija su dugotrajni i dovode do gubitka fenolnih tvari uslijed reakcija ionizacije, hidrolize i oksidacije (Hai-bo i Shouzhuo, 2005). Takve metode više nisu dovoljno selektivne jer dovode do ekstrakcije i nefenolnih spojeva, kao što su šećeri, organske kiseline i proteini. Time se smanjuje čistoća ekstrakata i zahtijeva provođenje dodatnih postupaka pročišćavanja (Castaneda-Ovando i sur., 2009; Ignat i sur., 2011).

S obzirom da je glavni cilj provedba ekstrakcije željenih tvari u što kraćem vremenu i pri tom ostvaranje što većeg prinosa sa što manjim udjelom nečistoća i stranih primjesa uz očuvanje visokog antioksidativnog kapaciteta prisutnih bioaktivnih spojeva odnosno očuvanje kvalitete ekstrakta te štednju ostalih resursa kao što su otapalo i energija (Mottaleb i Sarker, 2012) u istraživanjima se uz najčešće korištene standardne konvencionalne metode ekstrakcije i njihove modifikacije (ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)) sve više ispituju i optimiziraju nove tzv. netermičke tehnike ekstrakcije u koje spadaju ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (HPAE),

ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE), ekstrakcija hladnom plazmom (HVED) te ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SCO₂) (Teixeira i sur., 2013; Barba i sur., 2016; Bursać Kovačević i sur., 2016). Brojne su prednosti ovih metoda poput brzine, selektivnosti, ekološke prihvatljivosti, upotrebe manjih količina otapala, većeg prinosa od klasične ekstrakcije i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature tijekom procesa, što ih svrstava među one pogodne za ekstrakciju termički osjetljivih spojeva kao što su polifenoli. Međutim, vrlo često zahtijevaju veće financijske izdatke (Bhattacharya, 2015; Ghafoor i sur., 2011; Ignat i sur., 2011; Rajha i sur., 2014; Tappi i sur., 2014; Vilku i sur., 2007).

2.3. EKSTRAKCIJA PRIMJENOM MIKROVALOVA

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi valnih duljina od 1 mm pa do 30 cm i frekvencije od 300 MHz do 300 GHz (Wang i Weller, 2006; Li i sur., 2011), a nastaju kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič (Chemat i sur., 2004, Blekić i sur., 2011). Spadaju u neionizirajuće zračenje, čija energija od 0,0001 eV, nije dovoljna za razbijanje vodikovih veza i ne mijenja strukturu tvari (Pedroza i sur., 2015), već izaziva intenzivnije titranje molekula i značajan porast temperature, a njihovo korištenje, za razliku od ionizirajućeg zračenja, nije opasno za ljudsko zdravlje. Najčešće korištene frekvencije mikrovalova kod industrijskih, znanstvenih i medicinskih istraživanja su 0,915 i 2,45 GHz (Blekić i sur., 2011).

Princip ekstrakcije mikrovalovima zasniva se na činjenici da prirodno prisutna voda u stanicama tretiranog materijala te otapalo za ekstrakciju preuzimaju energiju mikrovalova uslijed čega dolazi do sve intenzivnijeg gibanja molekula, rotacije dipola polarnih komponenti, sve većeg zagrijavanja i povećavanja pritiska na staničnu stijenu stanica. Stanična stijena pod takvim pritiskom puca što olakšava prodor otapala unutar stanice i povećava površinu interakcije između otapala i željene komponente (Wang i Weller, 2006; Mandal i sur., 2007).

Metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu, a polifenolni spojevi se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti svjež, osušen ili zamrznut, usitnjeni ili cijeli.

Vidljivo je kako je učinkovitost ekstrakcije isključivo funkcija postavljenih procesnih parametara, a nekoliko njih izrazito utječe na prinos željene tvari u ekstrakt. Ti parametri uključuju predtretmane koji se provode prije ekstrakcije, odnos otapala i uzorka, vrstu i polarnost otapala te vrijeme i temperaturu ekstrakcije (Spigno i sur., 2007).

2.3.1. Utjecaj odabranog otapala pri ekstrakciji mikrovalovima

Gotovo najvažniji parametar za efikasnost mikrovalne ekstrakcije su karakteristike odabranog otapala. Poželjno je da otapalo koje se koristi u ekstrakciji ima visoku dielektričnu konstantu tj. mogućnost dobre apsorpcije energije mikrovalova (Chen i sur., 2008), ali i visok faktor disipacije energije što predstavlja sposobnost otapala da apsorbiranu energiju mikrovalova preda okolnom mediju (Spigno i De Faveri, 2009; Bousbia i sur., 2009). Osim navedenog, važni faktori su topljivost željenih komponenti u otapalu te stupanj interakcije otapala i matriksa, selektivnost otapala za spojeve koji se žele ekstrahirati, njegov ekstrakcijski kapacitet, nereaktivnost sa biljnim materijalom, niska viskoznost otapala odnosno mogućnost prodiranja u stanice materijala, kinetika prijenosa mase u samom procesu te neškodljivost za ljude i opremu isto kao i prihvatljiva cijena (Spigno i De Faveri, 2009).

Istraživajući utjecaj otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz vinske komine, pokožice i sjemenki grožđa Cheng i sur. (2006) su dokazali da se primjenom metanola kao otapala može ekstrahirati oko 20 % više polifenolnih spojeva nego etanolom, dok su Lapornik i sur. (2005) dokazali da se primjenom alkoholnog otapala (etanola i metanola) iz ekstrakta dobivenog od komine grožđa, dobije pet puta više polifenolnih spojeva nego korištenjem vode kao otapala. Pri usporedbi utjecaja otapala na izolaciju polifenolnih spojeva iz voća metanol je bio učinkovitiji za ekstrakciju polifenolnih spojeva nižih molekularnih masa, a aceton za ekstrakciju flavanola viših molekularnih masa (Prior i sur., 2001). Važno je napomenuti da na ekstrakcijski kapacitet osim odabira ekstrakcijskog otapala utječe i kemijski sastav uzorka te da li je biljni materijal u svježem ili suhom stanju.

U industrijskim uvjetima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, uglavnom zbog manje toksičnosti (Ignat i sur., 2011).

Prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala također ima značajnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz materijala što posljedično dovodi do boljeg i bržeg zagrijavanja te pospješivanja transporta željene komponente u otapalo odnosno povećanja brzine prijenosa mase. Primjena čistog etanola ili acetona nije se pokazala učinkovitom u ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnog materijala. Provedenim istraživanjem (Revilla i sur., 1998) potvrdila se navedena teza i to na način da se provedla konvencionalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa crne sorte Cabernet Sauvignon primjenom 100 % etanola i acetona, ekstrakcijom kroz 12 sati. Postupkom ekstrakcije polifenolnih spojeva iz pokožice, primjenom vodenih otopina 80 % etanola i 75% acetona postignut je veći ekstrakcijski kapacitet nego primjenom 100 % otapala. Primjenom otapala različite polarnosti je utvrđeno da se polarnije molekule flavonoida lakše ekstrahiraju iz biljnog tkiva primjenom polarnijih otapala kao što je 80 % etanol. Dodatak vode (20 %) u etanol je povećao polarnost otapala te je ekstrahirano više flavonoidnih spojeva nego primjenom čistog etanola. No, isto tako vrijedi da puno veće koncentracije vode u mješovitim otapalima reduciraju prinos ekstrakcije jer se povećava polarnost mješovitog otapala i njegova dielektrična konstanta do onog stupnja kada više ne djeluje povoljno na prinos (Talebi i sur., 2004; Song i sur., 2011). S druge strane, dodatak otapala sa vrlo malom dielektričnom konstantom kao što je heksan koji gotovo da ne apsorbira energiju mikrovalova, omogućuje kontrolu temperature samog otapala ili smjese otapala i u njemu otopljene tvari (Routray i Orsat, 2011).

Za ekstrakciju fenolnih kiselina prisutnih u netopljivom obliku (vezane, esteri ili glikozidni kompleksi) osim primjene organskih otapala često se koristi i kiselinska/ bazna hidroliza. Dodatkom baze, kiseline ili obojeg dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina (Rostango i Prado, 2013).

Važno je naglasiti da se mikrovalne ekstrakcije mogu koristiti i nepolarna i polarna otapala. U većini slučajeva ipak je uobičajeno korištenje polarnih otapala poput etanola, metanola i vode ili zakiseljenih alkohola (Amr i Al-Tamimi, 2007; Awika i sur., 2005; Caridi i sur., 2007; Lapornik i sur., 2005.) čime se podešava željena selektivnost za određene komponente (Brachet i sur., 2002). Takva otapala nisu visoko selektivna za polifenole, ali daju vrlo visok prinos ekstrakta i neusporedivo su bolja od ekstrakcije vodom (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Kao što je i prije spomenuto, nepolarna otapala mogu se kombinirati sa

vodom, etanolom ili nekim drugim polarnim otapalom kako bi poboljšala sposobnost apsorpcije energije mikrovalova (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Općenito vrijedi da kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povećati površinu međudjelovanja među fazama što se postiže usitnjavanjem i homogenizacijom tretiranog materijala, također, treba povećati brzinu gibanja faza miješanjem, a prilikom povećanja količine tvari potrebno je produljiti ukupno vrijeme trajanja ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

2.3.2. Utjecaj vremena pri ekstrakciji mikrovalovima

Drugi važan faktor za uspješnost mikrovalne ekstrakcije je duljina tretiranja uzorka mikrovalovima. U usporedbi sa konvencionalnim, vrijeme potrebno za mikrovalnu ekstrakciju proteže se od nekoliko minuta do maksimalno pola sata uslijed čega se izbjegava mogućnost termalne degradacije bioaktivnih spojeva te početak oksidacijskih promjena u ekstraktu (Al-Harahshed i Kingman, 2004, Datta, 2007). Uobičajeno je da se dužim ili produljenim ekstrakcijskim vremenom pokušava ostvariti veći prinos ekstrahirane tvari u ekstrakt što je u slučaju tehnike mikrovalne ekstrakcije neznačajno (Wang i sur., 2008).

Također je važno znati kako je vrijeme zračenja potrebno za zagrijavanje otapala povezano s njegovom dielektričnom konstantom zbog čega se mora paziti da se otapala poput vode, etanola i metanola ne koriste za ekstrakciju izrazito termolabilnih komponenti. Preduga izloženost uzorka mikrovalnom zračenju pa čak i kod nižih temperatura izaziva promjenu kemijske strukture bioaktivnih komponenti što ne utječe toliko na prinos koliko na antioksidacijsku aktivnost dobivenog ekstrakta (Veggi i sur., 2013).

Predugo vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura intenziviraju isparavanje tj. gubitak otapala, ekstrakciju drugih spojeva te povećavaju mogućnost oksidacije polifenolnih spojeva zbog čega se smanjuje njihov konačan udio u ekstraktu.

2.3.3. Utjecaj temperature i snage mikrovalova pri ekstrakciji mikrovalovima

Temperatura procesa mikrovalne ekstrakcije zapravo je funkcija primjenjene snage mikrovalova tj. količine energije koja se prenese na tretirani materijal, pretvori u kinetičku, a zatim toplinsku energiju (Hu i sur., 2008; Xiao i sur., 2008; Chemat i sur., 2005) što izaziva lokalizirano zagrijavanje tretiranog uzorka i destrukciju staničnih stijenki i omogućuje bolji kontakt otapala sa željenom tvari (Hu i sur., 2008; Chan i sur., 2011).

Važno je napomenuti kako ekstrakti dobiveni brzo i intenzivnom destrukcijom staničnog materijala uz primjenu visoke snage mikrovalova mogu sadržavati i značajan udio nečistoća zbog otapanja i drugih neželjenih tvari (Mandal i sur., 2007). Taj efekt naziva se „bumping“ efektom i nastoji ga se izbjegavati (Eskilsson i Björklund, 2000).

Pri višim temperaturama, povećava se efikasnost ekstrakcijskog otapala zbog pada njegove viskoznosti i površinske napetosti čime se pospješuje prodiranje otapala u unutrašnjost materijala te posljedično povećava topljivost željenih komponenti u njemu (Mandal i sur., 2007; Li i sur., 2010; Khajeh i sur., 2009).

Iako povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije jer dolazi do povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta brzine difuzije, polifenolni spojevi podložni su hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60 °C (Spigno i De Faveri, 2007). Routray i Orsat (2011) su primjetili kako se takav efekt porasta efikasnosti ekstrakcije proporcionalan sa porastom temperature događa sve do postizanja optimalne temperature koja je uvjetovana fizikalno-kemijskom stabilnošću ciljanih komponenti, nakon čega daljni porast temperature ima samo negativan utjecaj na prinos ekstrakcije zbog intenzivne degradacije termolabilnih spojeva (Font i sur., 1998). Lafka i suradnici (2007) proveli su istraživanje koje je potvrdilo da povišenje temperature ekstrakcije iznad 60 °C znatno smanjuje prinos ekstrahiranih polifenola iz kome i taloga vina. Prema navedenom istraživanju ukupan sadržaj polifenola se pri temperaturi od 80 °C smanjuje za 10,3 %, a pri 100 °C za 15,7 %. Slične rezultate pokazali su rezultati istraživanja Xiao i sur. (2008) gdje je osim toga, zabilježen negativan utjecaj snage mikrovalova veće od 350 W na termičku destrukciju bioaktivnih komponenti.

2.3.4. Utjecaj ostalih faktora na efikasnost ekstrakcije mikrovalovima

Osim utjecaja odabranog otapala, temperature odnosno snage mikrovalnog zračenja te vremena tretiranja, vrlo su bitne i karakteristike i način pripreme uzorka.

Huie (2002) te Eskilsson i Bjorklund (2000) su zaključili kako se povećanjem površine kontakta otapala i uzorka omogućuje i puno bolje prodiranje otapala u uzorak te kako je za mikrovalnu ekstrakciju zapravo najpogodnije veličina čestica od 100 μm do 2 mm, ali i prethodno potapanje biljnog materijala u odabrano otapalo (Mandal i sur., 2007). S druge strane, vrlo sitne čestice, one veličina manjih od 100 μm nisu poželjne jer izazivaju tehničke probleme tokom ekstrakcije i procesa centrifugiranja ili filtracije dobivenog ekstrakta (Mandal i sur., 2007, Tatke i Jaiswal, 2011).

Određeni utjecaj na učinkovitost ekstrakcije odnosno na prinos i smanjenje vremena potrebnog za ekstrakciju ima miješanje koje je direktno povezano sa brzinom prijenosa mase u otapalo. Miješanjem se ubrzava proces ekstrakcije kroz desorpciju i otpuštanje biokativnih spojeva vezanih na određene komponente tretiranog materijala (Ruan i Li, 2007; Chan i sur., 2011).

Omjer količine otapala i uzorka također je vrlo bitan parametar optimizacije. Volumen otapala mora biti dovoljan da u potpunosti prekrije uzorak tijekom cijelog procesa. Osobitu pažnju treba obratiti na slučajeve korištenja hlapljivih otapala koje je potrebno dodati u malo većem omjeru. Ipak, važno je znati da velike količine otapala podrazumijevaju i veći utrošak energije za zagrijavanje i otparavanje ili pročišćavanje dobivenog ekstrakta (Eskilsson i Bjorklund, 2000; Mandal i sur., 2007; Tatke i Jaiswal, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci pokožice komine grožđa Cabernet Sauvignon

Ovo istraživanje provedeno je na komini grožđa sorte Cabernet Sauvignon koja je, u suradnji s poduzećem Agrolaguna d.d. (Poreč, Hrvatska), izuzeta nakon prešanja u procesu proizvodnje vina. Uzorci komine grožđa sadržavali su pokožicu, sjemenke i dijelove peteljke.

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

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

3.1.2. Kemikalije

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

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

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

Pribor:

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

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva primjenom mikrovalova

Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz liofilizirane pokožice grožđa sorte Cabernet Sauvignon odrađena je prema planu pokusa prikazanom u Tablici 1, gdje je testirano 8 različitih ekstrakcijskih varijanti dobivenih kombinacijom tri ispitna parametra: polarnost otapala (60 % i 100 % metanol), kiselost otapala (0 % i 1 % klorovodične kiseline) i temperatura provođenja ekstrakcije (45 i 60 °C); uz fiksno vrijeme ekstrakcije postavljeno na 16 minuta. Analize ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih i slobodnih antocijana, ukupnih flavonola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta provedene su na svih 8 dobivenih ekstrakata.

Tablica 1. Plan i eksperimentalni dizajn za optimizaciju ekstrakcije mikrovalovima obzirom na polarnost otapala, kiselost otapala i temperaturu ekstrakcije (uz fiksno vrijeme ekstrakcije)

Broj pokusa	Polarnost (% metanol)	Temperatura (°C)	Kiselost (% HCl)	Vrijeme (min)
1	60	45	0	16
2	60	45	1	16
3	60	60	0	16
4	60	60	1	16
5	100	45	0	16
6	100	45	1	16
7	100	60	0	16
8	100	60	1	16

Postupak ekstrakcije:

Izvagano je 0,5 g uzorka liofilizirane pokožice grožđa na analitičkoj vagi ($\pm 0,0050$ g) te prebačeno u tikvicu s okruglim dnom volumena 50 mL. U tikvicu je dodano 25 mL otapala i magnet kojim je omogućeno miješanje tijekom same ekstrakcije. Prije početka rada, na uređaj za ekstrakciju mikrovalovima postavljeni su zračno i vodeno hladilo. Zračno hladilo postavljeno je na tikvicu sa uzorkom, otapalom za ekstrakciju i magnetom, a na njega vodeno hladilo kroz koje je lagano puštena voda.

Proces ekstrakcije pokrenut je postavljanjem parametara na kontrolnom uređaju. Nakon završetka ekstrakcije, uzorak je centrifugiran 5 minuta kako bi se odvojio tekući (supernatant) od krutog dijela, koji je potom skladišten na -18°C do daljnjih analiza.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih polifenola temeljeno je na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Intenzitet nastalog plavog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/L.

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt komine pokožice kvantitativno je otopljen u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijeđen 5 puta. U tikvicu od 100 mL otpipetirano je 1 mL razrijeđenog uzorka, 5 mL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve je promiješano i nakon 30 sekundi dodano je 15 mL 20 % otopine natrij-karbonata. Tikvica je zatim nadopunjena do oznake s destiliranom vodom i ostavljena 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka uzeto 1 mL destilirane vode. Nakon 2 sata izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Otopine galne kiseline pripremljene su 100 % metanolu sljedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600 mg/L. U tikvicu od 100 mL otpipetiran je 1 mL otopine određene koncentracije te je dalje primijenjen propis za određivanje ukupnih fenola. Nakon što je izmjerena apsorbancija, nacrtan je baždarni pravac pri čemu se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Pomoću programa Microsoft Excel dobivena je jednadžba pravca prema kojoj je izračunata koncentracija ukupnih fenola.

Izračunata jednadžba pravca:

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

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg/L)

R²- koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih fenola u pokožici komine grožđa preračunata je i izražena u mg GAE/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

3.2.3. Određivanje ukupnih tanina

Princip određivanja:

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

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

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt kvantitativno je otopljen u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijeđen 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetirano je po 2 mL razrijeđenog uzorka ekstrakta pokožice grožđa, 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline nakon čega su tube hermetički zatvorene. Jedna tuba ostavljena je na sobnoj temperaturi, dok je druga stavljena u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, tuba je izvađena iz vodene kupelji te tijekom 5 min ohlađena ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija

kiselinske hidrolize. U svaku od tuba potom je dodano 0,5 mL etanola. Optička gustoća izmjerena je pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunata je prema formuli:

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

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

Koncentracija ukupnih tanina u pokožici komine grožđa preračunata je i izražena u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Princip određivanja:

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

Postupak određivanja:

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

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

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku ekstrakta pokožice grožđa izračunat je prema formuli:

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

gdje je:

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

875 – faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

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

Koncentracija ukupnih antocijana u pokožici komine grožđa preračunata je i izražena u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

3.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip određivanja:

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

Postupak određivanja:

Liofilizirani ekstrakt kvantitativno je otopljen u 25 mL 100 % metanola, a zatim razrijeđen 2 puta. U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 250 μ L razrijeđenog ekstrakta, 250 μ L 1g/L klorovodične kiseline u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L klorovodične kiseline. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto ekstrakta uzeto otapalo za

ekstrakciju. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija je izmjerena na 320 nm, dok je za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija izmjerena na 360 nm.

Izrada baždarnog pravca:

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

a) Kafeinska kiselina

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

Iz svake tikvice otpipetirano je 250 μ L otopine standarda u staklene epruvete, te je dalje postupano po propisu za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

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

Izračunata jednadžba pravca:

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

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 320 nm

x – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina u komini pokožice grožđa preračunata je i izražena u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

b) Kvercetin

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

Iz svake tikvice otpipetirano je 250 µL otopine standarda u staklene epruvete, te je dalje postupano po propisu za određivanje ukupnih flavonola.

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

Izračunata jednadžba pravca:

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

$$R^2=0,998$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 360 nm

x – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracija ukupnih flavonola u pokožici komine grožđa preračunata je i izražena u mg/g suhe tvari (s. tv.) pokožice.

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Princip određivanja:

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

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

Postupak određivanja:

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

Kod mjerenja slijepe probe, u kivetu je dodano 2,250 mL matične otopine F3 fluoresceina i 0,375 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,075 mol/L. Otopina je termostatirana 30 minuta na 37 °C, nakon čega je dodano 0,375 mL otopine 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorida (AAPH), a promjena intenziteta fluorescencije izmjerena je svake minute, sve dok vrijednost intenziteta zračenja nije pala ispod 95 % od njene početne vrijednosti. Promjene u intenzitetu fluorescencije fluoresceina prisutnog u otopini uzorka tijekom perioda snimanja prikazane su grafički na računalu kao ovisnost očitane apsorbancije o vremenu snimanja.

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

Dobivene vrijednosti apsorbancije uzorka zatim su preračunate u relativne apsorbancije dijeljenjem svake dobivene vrijednosti s onom početnom. Suma relativnih vrijednosti apsorbancija zbrojena je sa 0,5 te je kao rezultat dobivena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta uzorka (AUC vrijednost) koja je korištena prilikom izračuna ORAC vrijednosti.

Razrjeđenja uzoraka ovisila su o rezultatima spektrofotometrijske analize ukupnih fenola. Za uzorke kod kojih su vrijednosti analize ukupnih fenola do 190 mg/L korišteno je razrjeđenje 100 x, dok je kod onih uzoraka kod kojih je vrijednost analize ukupnih polifenola između 200-400 mg/L uzorak ekstrakta pokožice grožđa razrijeđen 200 x. Nadalje uzorci u intervalu sadržaja ukupnih polifenola od 400-1000 mg/L razrijeđeni su 300 x te oni iznad 1000 mg/L čak 500 x.

Račun:

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

gdje je :

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

AUCu = antioksidacijski kapacitet uzorka

AUCsp = antioksidacijski kapacitet slijepa probe

AUC trolox = antioksidacijski kapacitet Troloxa

k = faktor razrjeđenja

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

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

Antioksidacijski kapacitet pokožice komine grožđa preračunat je i izražen u $\mu\text{mol TE/g suhe tvari (s. tv.) pokožice}$.

3.2.7. Određivanje ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata, antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata, antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u uzorcima pokožice komine grožđa određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kromatografske analize provedene su na Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC

uređaju uz module binarne pumpe, degazera, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se od otapanja liofiliziranog ekstrakta pokožice komine (kvantitativno) u 20 mL 100 % metanola te filtriranja otopljenog uzorka kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 40 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici 2. uz protok mobilne faze od 1 mL/min.

Tablica 2. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana.

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

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm. Kvantifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena (R_t) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg/g s.tv. pokožice komine grožđa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

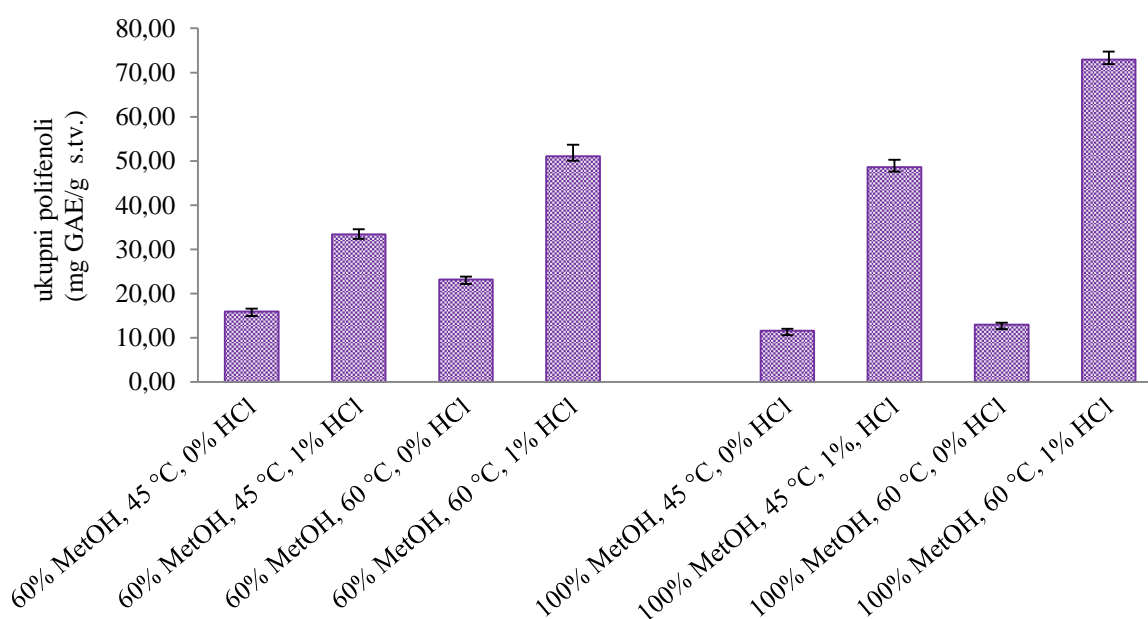
U ovom radu je provedena mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon, dobivene u procesu proizvodnje vina. Postupak je proveden u 8 različitih ekstrakcijskih varijanti unutar kojih je ispitan utjecaj polarnosti otapala (60 % i 100 % metanol), kiselosti otapala (0 % i 1 % klorovodične kiseline) te temperature procesa (45 i 60 °C) na ekstrakciju ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva. Vrijeme ekstrakcije je fiksno, postavljeno na 16 minuta. Cilj eksperimenta je određivanje optimalnih uvjeta i parametara samog procesa.

Analiza ukupnih polifenolnih spojeva obuhvatila je spektrofotometrijske analize ukupnog udjela polifenola Folin-Ciocalteu metodom, ukupnih tanina Bate-Smith metodom, ukupnih antocijana, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Osim toga tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) određen je sastav slobodnih antocijana, dok je fluorimetrijskom ORAC metodom antioksidacijski kapaciteti ekstrakata.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički na Slikama 1-7, a prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost dvije repeticije uz standardnu devijaciju (n=2).

4.1. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH POLIFENOLA

Utjecaj polarnosti i kiselosti otapala te temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih polifenola iz pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Utjecaj polarnosti i kiselosti otapala te temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na udio ekstrahiranih polifenola pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

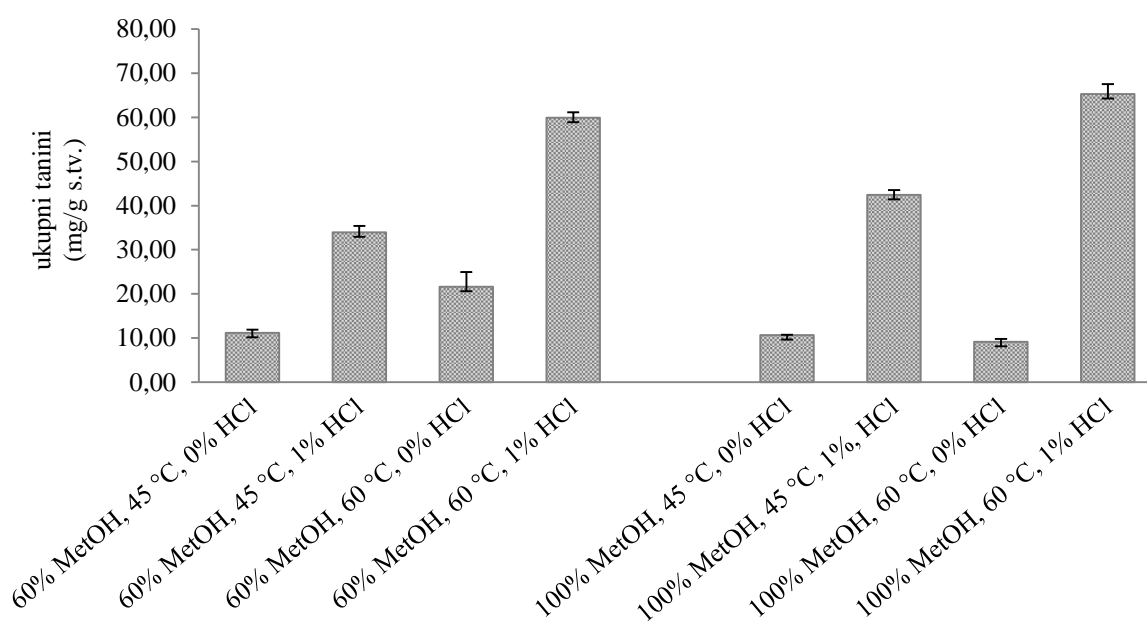
Najmanja količina polifenola ekstrahirana je upotrebom 100 % metanola pri 45 °C u koji nije dodana kiselina, a slijedi ekstrakt dobiven ekstrakcijom s istim otapalom pri 15 °C višoj temperaturi. Isti trend, uz nešto veće vrijednosti ekstrahiranih količina polifenola zamijećen je kod ekstrakata ekstrahiranih nezakiseljenom 60 % vodenom otopinom metanola pri istim temperaturama. Dobiveni rezultati potvrđuju kako otapala manje polarnosti bez dodatka kiseline nemaju tako dobar utjecaj na ekstrakciju polifenola. Mješovita otapala u koje je dodana voda lakše se zagrijavaju i prije dolazi do pucanja staničnih stijenki stanica, prodora otapala u njihovu unutrašnjost te povećanja dodirne površine i posljedično bolje ekstrakcije (Wang i Weller, 2006; Mandal i sur., 2007). U tim slučajevima povišenje temperature procesa sa 45 °C na 60 °C djeluje pozitivno na povećanje prinosa ekstrakcije polifenola za 11-31 %. S druge strane, dodatak klorovodične kiseline u ekstrakcijska otapala bez obzira na njihovu

polarnost imao je veći učinak na porast efikasnosti ekstrakcije ovih bioaktivnih spojeva. Tako je ekstrakcijom sa 60 % vodenom otopinom metanola zakiseljenom sa 1 % klorovodične kiseline pri 45 °C ekstrahirana količina od 33,42 mg GAE/g s.tv., a povišenjem temperature procesa, čak 35 % više polifenola tj. količina od 51,06 mg GAE/g s.tv.. Kao najbolje ekstrakcijsko otapalo i najpogodnija temperatura za provođenje ekstrakcije polifenola pokazao se upravo 100 % metanol zakiseljen dodatkom 1 % klorovodične kiseline pri temperaturi 60 °C pri čemu je ekstrahirano 72,92 mg GAE/g s.tv. Povećani prinos polifenola uslijed dodatka kiseline u ekstrakcijsko otapalo potvrdila su i prije provedena istraživanja (Maisuthisakul i Gordon, 2009; Vatai i sur., 2009; Deng i sur., 2011). Krygier i Sosulski (1982) i Maisuthisakul i Gordon (2009) smatraju kako je veći sadržaj ukupnih polifenola dobiven korištenjem zakiseljenog otapala rezultat intenzivne kiselinske hidrolize koja nastupa tokom ekstrakcije, a uslijed koje dolazi do otpuštanja polifenola vezanih na stijenke biljnog materijala.

Nakon određivanja optimalnih uvjeta, vidljivo je kako na udio ekstrahirani polifenola iz pokožice komine grožđa izrazito veliki utjecaj imaju primarno kiselost otapala i temperatura procesa, dok je utjecaj polarnosti otapala nešto manje izražen. Deng i sur. (2011) u svojem istraživanju analizirali su pet sorti, među kojima i sortu Cabernet Sauvignon. Količina ukupnih polifenola detektirana u ekstraktu pokožice komine sorte Cabernet Sauvignon uz pomoć 70 % aceton zakiseljenog sa 0,1 % klorovodične kiseline u radu iznosila je 26,7 mg GAE/g s.tv. što je značajno manje spram rezultata dobivenih u ovom radu. Istraživanje koje su na pokožici komine grožđa uz ekstrakciju čistim metanolom proveli Casazza i sur. (2010) pokazalo je relativno niske vrijednosti ekstrahiranih polifenola (5,6-7,3 mg GAE/g s.tv.) u usporedbi sa onima dobivenim u ovom istraživanju. Mali prinosi ekstrakta mogu se opravdati primjenom vrlo oštih uvjeta koji podrazumijevaju dvostruku veću temperaturu, gotovo 4 puta dulje vrijeme ekstrakcije nego što je to slučaj u ovom radu, a s druge strane značajno manju snagu mikrovalova što upućuje na slabu ekstrakciju i moguću termičku degradaciju prisutnih polifenola. Pedroza i sur. (2015), Hai-bo i sur. (2014) i Medouni-Adrar i sur. (2015) prilikom istraživanja na pokožici komine grožđa su koristili vrlo visoke snage mikrovalova, mješovita nezakiseljena otapala te relativno kratko vrijeme tretiranja prilikom čega je količina ekstrahiranih ukupnih polifenola iznosila 5,5-55,8 mg GAE/g s.tv..

4.2. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH TANINA

Rezultati spektrofotometrijske analize ukupnih tanina ekstrahiranih pri dvije različite temperature, otapalima dviju različitih polarnosti i stupnjeva kiselosti prikazani su na Slici 2, a trend ekstrakcije prati ekstrakciju ukupnih polifenola.



Slika 2. Utjecaj polarnosti i kiselosti otapala te temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na udio ekstrahiranih tanina pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

Sadržaj ekstrahiranih ukupnih tanina sa varijantama zakiseljenih i nezakiseljenih 60 % vodenih otopina metanola pri različitim temperaturama iznosio je od 11,16 – 59,89 mg/g s.tv.. Značajno viši udio tanina ekstrahiran je uz dodatak 1% klorovodične kiseline u otapalo, pa je kod 45 °C zakiseljavanje otapala pospješilo ekstrakciju tanina za čak 68 %, a pri 60 °C za 64 %. Uslijed povišenja temperature za 15 °C efikasnost ekstrakcije tanina sa 60 % metanolom bolja je gotovo 50 % bez obzira na stupanj kiselosti otapala.

Količine ekstrahirane sa 100 % metanolom pri nižoj ispitnoj temperaturi iznosile su od 10,65– 42,42 mg/g s.tv., pa se može zaključiti kako manja temperatura procesa (45 °C) ne pogoduje ekstrakciji tanina uz ostale postavljene parametre. Dodatak kiseline u čisto otapalo, kao i kod ekstrakcije polifenola, djelovao je izarzito pozitivno i kod 45 °C poboljšao

ekstrakciju tanina za 75 %, a kod više temperature procesa (60 °C) za čak 86 %. Tako je najveća količina tanina od 65,24 mg/g s.tv. ekstrahirana zakiseljenim 100 % metanolom pri temperaturi od 60 °C.

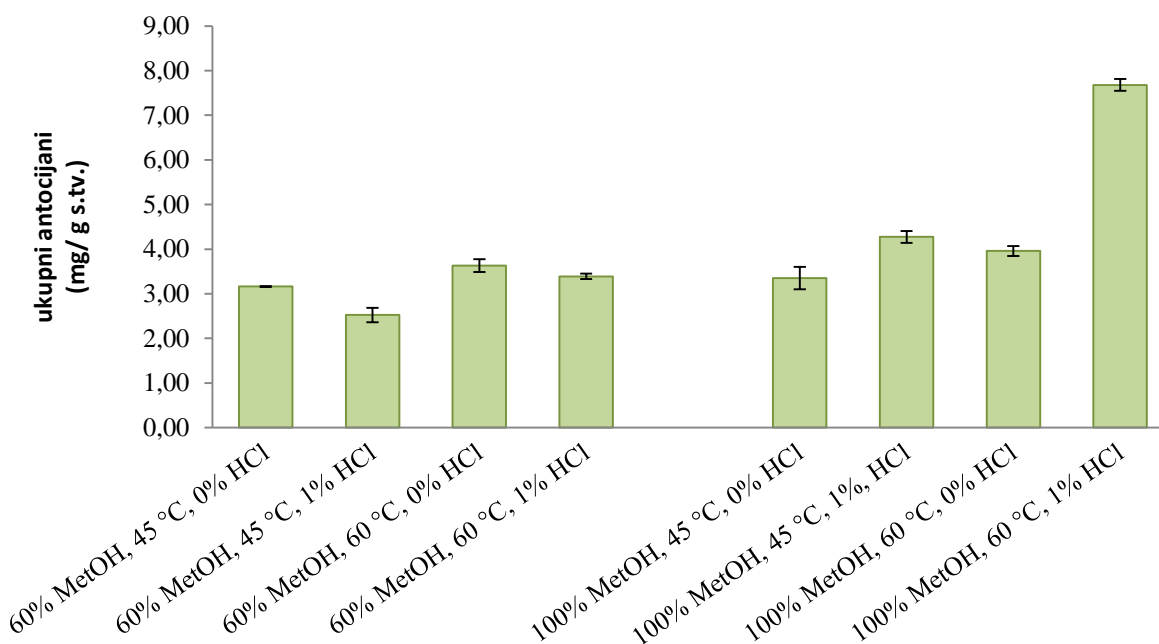
Yilmaz i Toledo (2006) i Deng i suradnici (2011) u svojim radovima koristili su vrlo blage temperature te mješovita otapala, uslijed čega su dobivene količine tanina između 7,7-24,1 mg/g s.tv., a izmjereni antioksidacijski kapacitet takvog ekstrakta bio je vrlo nizak. To upućuje na činjenicu, da primjena nešto agresivnijih uvjeta, poput onih korištenih u ovom radu daje bolje rezultate.

4.3. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH ANTOCIJANA TE SLOBODNIH ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZIDA, ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID ACETATA, ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID *p*-KUMARATA

Stabilnost antocijana tijekom mikrovalne ekstrakcije povezana je sa nekoliko faktora od kojih su najvažniji pH vrijednost otapala, temperatura procesa ekstrakcije, prisutnost metalnih iona, ostalih polifenolnih komponenti, ugljikohidrata, askorbinske kiseline i kisika (Bueno i sur., 2012; Cavalcanti i sur., 2011; Castañeda-Ovando i sur., 2009). Prijašnji radovi pokazali su kako efikasnost ekstrakcije ovih pigmenata raste sa porastom temperature do 100 °C, ali i uputili na mogućnost termičke degradacije antocijana iznad 100 °C, a pojedinih slobodnih antocijana već i iznad 60 °C (Ribereau- Gayon i sur., 2004). Isto tako, smatra se kako kiselost matriksa ima velik utjecaj na efikasnost mikrovalne ekstrakcije i kod ekstrakcije ostalih polifenolnih spojeva (Cabrita i sur., 2000).

Slika 3 prikazuje udio ukupno ekstrahiranih antocijana ovisno o postavljenim parametrima ekstrakcije. Usporedbom s podacima ranije provedenih istraživanja, vidljivo je kako se dinamika i efikasnost mikrovalne ekstrakcije antocijana, s obzirom na postavljene parametre, uvelike razlikuju od stupnja efikasnosti ekstrakcije prije opisanih polifenola i tanina. Prva četiri stupca na grafu prikazuju različite varijante ekstrakcije provedene sa 60 % vodenim otopinama metanola različite kiselosti i temperatura procesa, dok su druga četiri stupca rezultati ekstrakcije ukupnih antocijana sa 100 % metanolom različite kiselosti pri dvije različite temperature. Na prvi pogled vidljivo je kako su vrijednosti prvih sedam stupca približno istih vrijednosti ekstrahiranih količina i kako postavljeni parametri ne odgovaraju u potpunosti ekstrakciji ovih spojeva. Ekstrahirane količine kreću se od 2,52-4,27 mg/g s.tv..

Značajniji udio, odnosno gotovo dvostruko veća količina ukupnih antocijana (7,68 mg/g s.tv.) ekstrahirana je tek pri temperaturi 60 °C uz pomoć zakiseljenog 100 % metanola.



Slika 3. Utjecaj polarnosti i kiselosti otapala te temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na udio ekstrahiranih ukupnih antocijana pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

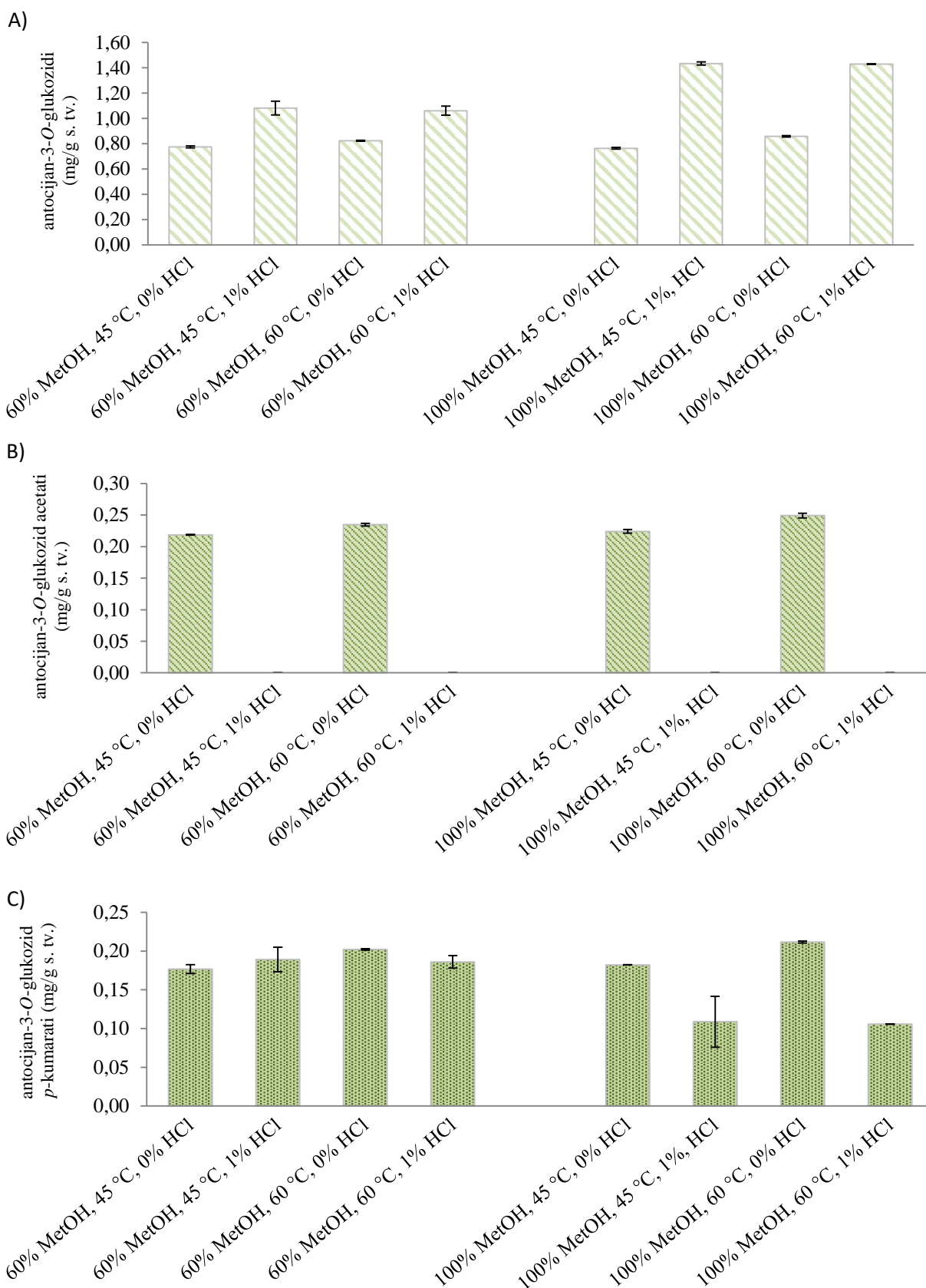
Zakiseljeni 100 % metanol i ranije se pokazao kao prikladno otapalo za ekstrakciju antocijana iz drugih biljnih materijala (Kammerer i sur., 2005; Murthy i sur., 2002), te kao 20 % efikasnije otapalo od etanola i čak 73 % efikasnije nego voda kod ekstrakcije antocijana iz grožđa (Kapasakalidis i sur., 2006; Castañeda-Ovando i sur., 2009). Ista teza potvrđena je i u istraživanju Revilla i sur. (1998) u kojemu su za ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa korištene razne vrste otapala (80 % metanol, 75 % aceton, metanol s 1% udjelom klorovodične kiseline), a najviši udio antocijana ekstrahiran je upravo metanolom sa 1% udjelom klorovodične kiseline. Također Bakker i Timberlake (1985) su u svom istraživanju o ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa dokazali da se, uspoređujući s drugim otapalima, značajno više antocijana ekstrahira koristeći metanol sa 2% mravlje kiseline kao otapalo za ekstrakciju. Kiselina u otapalu izaziva oštećenje stijenki stanica i lakšu ekstrakciju antocijana. Pozitivan utjecaj dodatka kiseline u otapalo za ekstrakciju antocijana potvrđen je i prilikom izolacije ovih pigmenta iz drugih biljnih tkiva (Bidgers i sur., 2010; Awika i sur., 2005).

Analiza dobivenih ekstrakata pokazala je kako se prilikom ekstrakcije antocijan-3-O-glukozida iz pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon (Slika 4 A), pri nižoj

temperaturi od 45 °C te uz primjenu 60 % vodene otopine metanola ekstrahiralo 0,77 mg/g s.tv., a dodatkom kiseline u otapalo kod iste temperature 1,08 mg/g s.tv.. Isti efekt uočen je i pri 15 °C višoj temperaturi. Ekstrakcija antocijan-3-*O*-glukozida 100 % metanolom se u usporedbi sa 60 % vodenom otopinom, u svim se varijantama, pokazala efikasnijom za čak 10-25 %. Povišenje temperature nije uzrokovalo značajan porast količine ekstrahiranih antocijan-3-*O*-glukozida.

Rezultati analize antocijan-3-*O*-glukozid acetata u ekstraktima pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon prikazani su na Slici 4 B. Dodatak klorovodične kiseline u ekstrakcijsko otapalo pokazao je izrazito negativan utjecaj na njihovu ekstrakciju i stabilnost, pa u slučajevima kada je kao otapalo korištena zakiseljena 60 % vodena otopina metanola ili 100 % metanol, nisu ekstrahirani navedeni spojevi. Razlog tome vjerovatno je vrlo brza i efektivna hidroliza aciliranih oblika antocijana pri nižim pH vrijednostima otapala (Monagas i sur., 2006). S druge strane, ekstrakcijom sa nezakiseljenim otapalima, bez obzira na njihovu polarnost i postavljenu temperaturu, ekstrahirane su značajno veće količine antocijan-3-*O*-glukozid acetata. Tako je sa 60 % metanolom ekstrahirano 0,22 mg/g s.tv. te 0,23 mg/g s.tv. sa 100 % metanolom. Povišenjem temperature procesa na 60 °C količine ekstrahiranih antocijan-3-*O*-glukozid acetata povećale su se za 15 %.

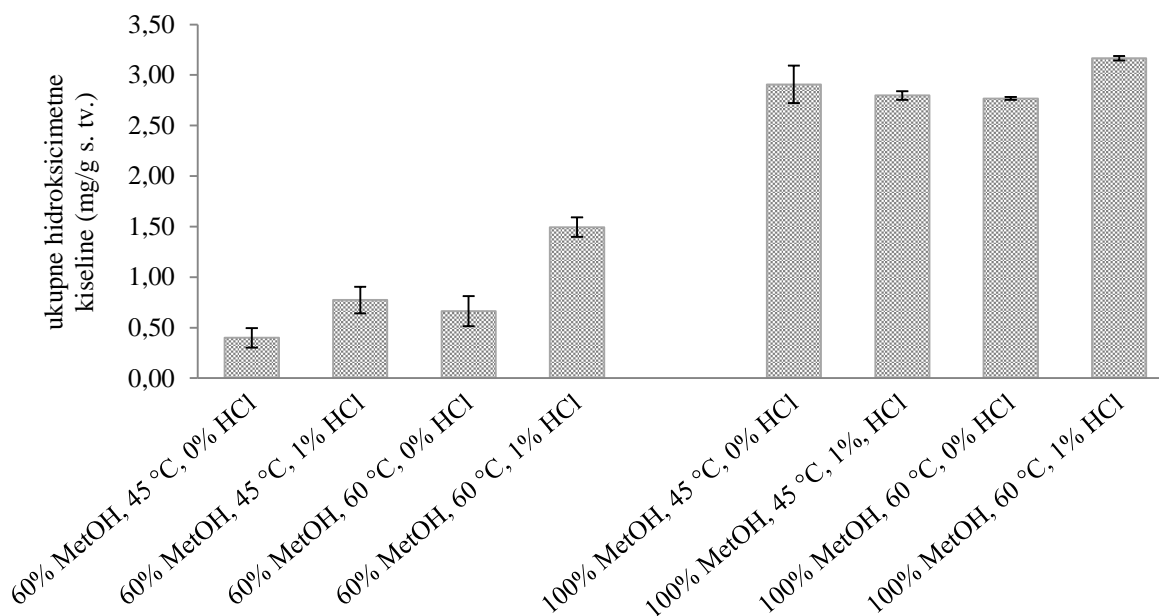
Rezultati analize antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata prikazani su na Slici 4 C. Vidljivo je kako je i u ovom slučaju, kao i u prijašnjem, veliki utjecaj na ekstrakciju imala pH vrijednost ekstrakcijskog otapala. Najmanje količine antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata ekstrahirane su zakiseljenim 100 % metanolom pri 45 °C. Još lošiju ekstrakciju uzrokovalo je povišenje temperature procesa za 15 °C uslijed čega je detektirana 3 % manja količina željenih spojeva. Puno značajnije količine antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata ekstrahirane su uporabom nezakiseljenih varijanti čistog metanola gdje je pri temperaturi 45 °C ostvaren prinos od 0,18 mg/g s.tv. te 0,21 mg/g s.tv. pri 60 °C. Prva četiri stupca prikazuju rezultate ekstrakcije polarnijim otapalom. Iz slike je vidljivo kako je upotreba polarnijeg otapala smanjila utjecaj ostalih parametara na ekstrakciju antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.



Slika 4. Utjecaj polarnosti i kiselosti otopala te temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na udio ekstrahiranih antocijana-3-O-glikozida (A), antocijan-3-O-glukozid acetata (B), antocijan-3-O-glukozid *p*-kumarata (C) pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

4.4. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA SASTAV UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOLA

Vrijednosti udjela prisutnih hidroksicimetnih kiselina utvrđene su spektrofotometrijskom analizom ekstrakata pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon, a rezultati 8 različitih ekstrakcijskih varijanti prikazani su na Slici 5. Količina hidroksicimetnih kiselina ekstrahirana 60 % vodenom otopinom metanola, bez obzira na ostale postavljene uvjete bila je za 53-86 % manja nego kada je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 100 % metanol iz čega se može zaključiti kako je manje polarno otapalo pogodovalo ekstrakciji ovih spojeva.

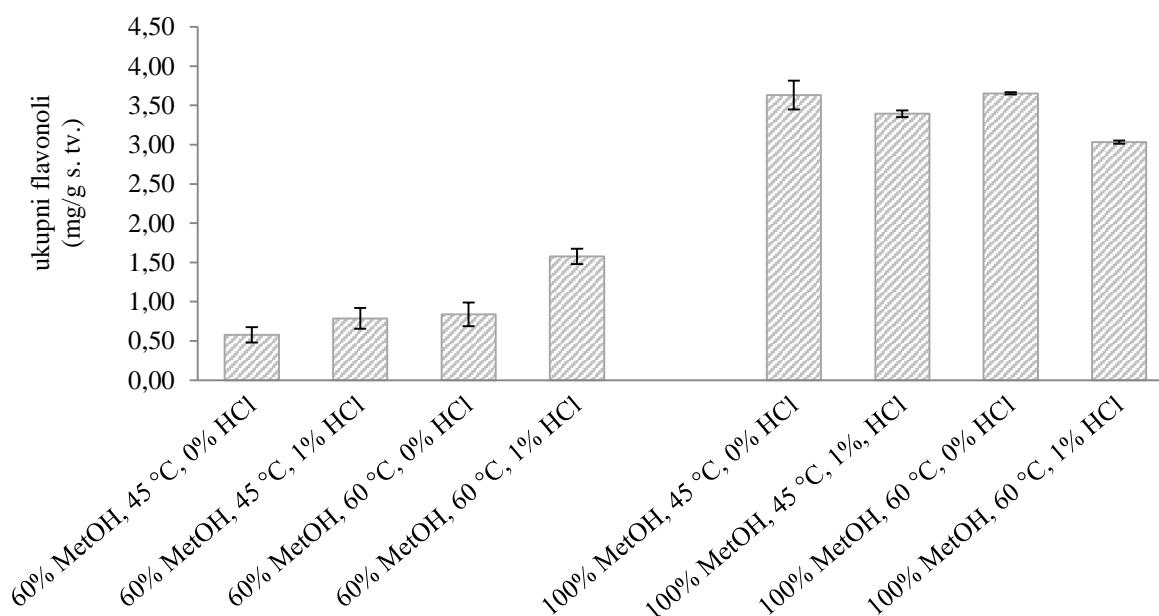


Slika 5. Utjecaj postavljenih parametara mikrovalovima potpomognute ekstrakcije na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

Povišenje temperature procesa utjecalo je pozitivno na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina kod polarnijih otapala, a nešto značajniji utjecaj zabilježen je kod zakiseljenih ekstrakcijskih varijanti. Kod 60 % metanola pri 45 °C ekstrahirana je količina od samo 0,40 mg/ g s.tv. dok je pri 60 °C ta količina bila veća za 40 % i iznosila je 0,66 mg/g s.tv.. Isti, pa i intenzivniji trend povećanja sadržaja hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu, uočen je prilikom

ekstrakcije 60 % zakiseljenim otapalom i povišenjem temperature. Povišenje temperature za 15 °C u tom slučaju ekstrakcija željenih spojeva pospješena je za čak 48 %, odnosno, količina ekstrahiranih hidroksicimetnih kiselina povećana je sa 0,77 mg/ g s.tv. na 1,49 mg/g s.tv.. S druge strane, kod korištenja 100 % metanola pri 45 °C ekstrahirane su količine od 2,91 mg/g s.tv., a nešto manje, 2,77 mg/g s.tv. kod 60 °C, što bi značilo da je povišenjem temperature procesa, kod ekstrakcije čistim otapalima bez dodatka kiseline smanjena sposobnost ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina za oko 5 %. Dodatkom klorovodične kiseline u 100 % metanol, pri temperaturi od 45 °C ekstrahirano je 2,80 mg/g s.tv.. Najbolja ekstrakcija postignuta je korištenjem istog otapala, ali pri 60 °C, a ekstrahirana količina iznosi 3,17 mg/g s.tv..

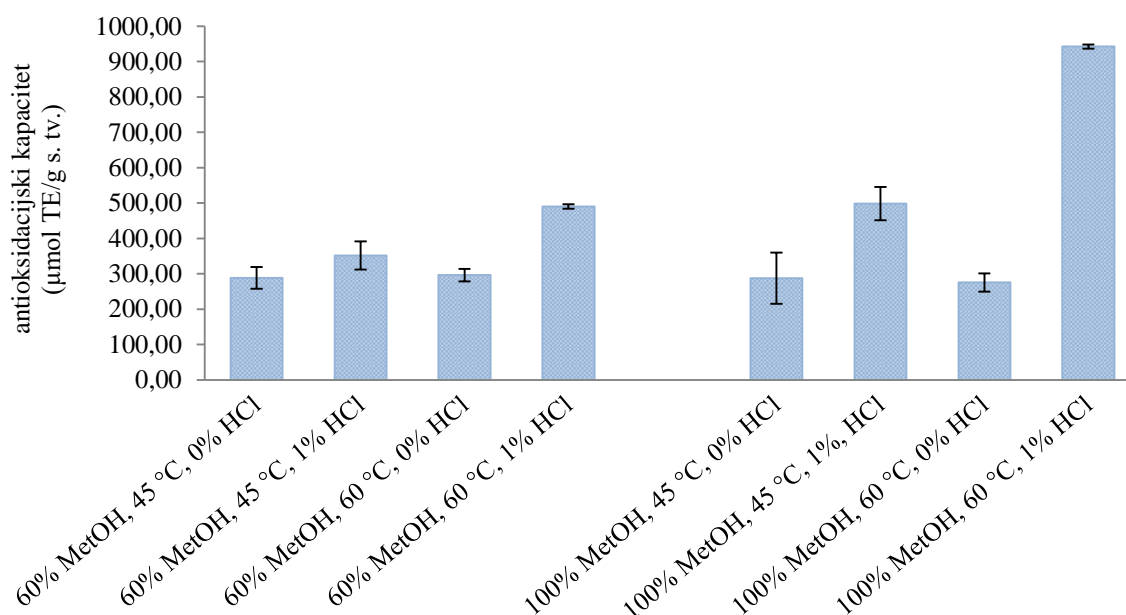
Vrlo sličan trend kao i kod ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina primjećen je kod prinosa flavonola u ekstrakt (Slika 6), gdje se 100 % metanol pokazao kao puno bolje i efikasnije otapalo nego vodena, 60 % otopina metanola. Najmanje efikasna je bila ekstrakcija 60 % metanolom u koji nije dodana kiselina, a gdje se ekstrakcija odvijala kod 45 °C. Kod ekstrakcije 100 % metanolom su se sve varijante, pa i one u koje je dodana kiselina, pokazale vrlo dobrima, a u njima je ekstrahirana 57-83 % veća količina u usporedbi sa 60 % metanolom.



Slika 6. Utjecaj postavljenih parametara mikrovalovima potpomognute ekstrakcije na udio ukupnih flavonola u ekstraktima pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon

Ipak, pokazalo se kako dodatak klorovodične kiseline u udjelu od 1 % kod korištenja 100 % metanola za mikrovanu ekstrakciju, nije pogodan za očuvanje stabilnosti flavonola zbog čega je značajno najbolji rezultat dobiven uporabom nezakiseljenog otapala pri 60 °C i iznosi 3,65 mg/g s.tv..

4.5. UTJECAJ POLARNOSTI I KISELOSTI OTAPALA TE TEMPERATURE PROCESA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET EKSTRAKTA



Slika 7. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata pokožice komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon dobiveni primjenom ekstrakcije mikrovalovima pod uvjetima različite polarnosti i kiselosti otapala te temperature procesa

Antioksidacijski kapacitet u ovom radu određen je ORAC metodom. Najviši antioksidacijski kapacitet određen je ekstrakcijom sa 100 % metanolom zakiseljenim dodatkom 1 % klorovodične kiseline pri 60 °C i iznosio je 942,57 µmol TE/ g s.tv.. Ovom ekstrakcijom ostvarena je 52-71 % viša ORAC vrijednost u komparaciji s ostalim ispitanim varijantama. To je vjerojatno povezano sa činjenicom da su pod ovim uvjetima ekstrahirane najznačajnije količine ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana te

hidroksicimetnih kiselina. Najveća antioksidacijska aktivnost i najveći udio ukupnih polifenola određeni su u metanolnim ekstraktima u istraživanjima koje su proveli Casazza i suradnici (2010). S druge strane, najmanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivene su primjenom nezakiseljenog otapala iste polarnosti pri istoj temperaturi.

Nadalje, kod ekstrakcije sa 60 % metanolom, antioksidacijski kapacitet ekstrakta povećan je za 18-40 % dodatkom klorovodične kiseline pri istoj temperaturi te za 3-28 % povećanjem temperature za 15 °C pri istom stupnju kiselosti otapala. Isti trend bolje očuvanosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta uz veće razlike između otapala različitih stupnjeva kiselosti ili utjecaja temperature procesa primjećen je kod ekstrakcije 100 % metanolom. Tako je dodatkom 1 % klorovodične kiseline kod 45 °C vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta gotovo dvostruka, a pri 60 °C gotovo 4 puta viša.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je dodatak klorovodične kiseline povećao antioksidacijski kapacitet ekstrakta, a slično je potvrđeno u istraživanju Gengaihi i sur. (2014) gdje je ekstrakcija etanolom sa 1 % udjelom klorovodične kiseline značajno utjecala na povećanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta pokožice i sjemenki grožđa.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Primjena mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva pokožice komine grožđa pokazala se izrazito efikasnom obzirom na smanjeno vrijeme ekstrakcije i visoki prinos.
2. Povišenje temperature procesa mikrovalne ekstrakcije na 60 °C, neovisno o stupnju kiselosti ili polarnosti otapala, utjecalo je na povećanje udjela ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima.
3. Dodatak 1 % klorovodične kiseline u ekstrakcijsko otapalo utjecao je pozitivno na ekstrakciju ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola.
4. Najveći udio ukupnih polifenola, ukupnih tanina, ukupnih antocijana te ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiran je primjenom 100 % metanola, s dodatkom 1% klorovodične kiseline, pri temperaturi od 60 °C.
5. Primjena 100 % metanola pri temperaturi 45 °C uz dodatak 1 % klorovodične kiseline pokazala se najpogodnijom za ekstrakcije antocijan-3-*O*-glukozida. S druge strane dodatak kiseline nije imao pozitivan utjecaj na ekstrakciju antocijan-3-*O*-glukozid acetata i *p*-kumarata, a signifikantno veće količine ovih spojeva ekstrahirane su 100 % nezakiseljenim metanolom pri 60 °C.
6. Veća antioksidacijska aktivnost utvrđena je u ekstraktima s većim udjelom ukupnih polifenola, tanina i antocijana.
7. Najviši antioksidacijski kapacitet od 942,57 μmol TE/g s.tv. određen je u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom sa 100 % metanolom, s dodatkom 1 % klorovodične kiseline pri 60 °C.

6. LITERATURA

- Al-Harahshed, M. i Kingman, S. W. (2004) Microwave-assisted leaching: a review. *Hydrometallurgy* **73**, 189–203.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y., Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem. Rev.* **9**, 357–378.
- Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., Tringali, C. (2008) Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* **99**, 5960–5966.
- Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., Tringali, C. (2004) Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar “Nerello Mascalese”. *Food Chem.* **88**, 599–607.
- Amr, A. i Al-Tamimi, E. (2007) Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *J. Food Sci. Tech.* **42**, 985–991.
- Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006) Wine waste treatment methodology. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 1117–1151.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. (2005) Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem.* **90**, 293–301.
- Bakker, J., Timberlake, C. F. (1985) The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of Port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agr.* **36**, 1315–1324.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203.
- Bandyopadhyay, U., Das, A., Bannerjee, R.K. (1999) Reactive oxygen species: Oxygen damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* **77**, 658–666.
- 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 Food Sci. Tech.* **49**, 96–109. doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006
- Baydar, N. G., Ozkan, G., Sagdic, O. (2004) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Chem.* **15**, 335–339.
- Bhattacharya, S. (2015) Conventional and advanced food processing technologies. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32–47.

- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* **66**, 209–215.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355–362.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J. L. (2002) Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**, 162–169.
- Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macrì F. (2008) Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal. Behav.* **3**, 626–632.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333.
- Bridgers, E. N., Chinn, M. S., Truong, V.-D. (2010) Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Ind. Crop. Prod.* **32**, 613–620.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velic, D. (2007) Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* **81**, 236–242.
- Bueno, J. M., Saez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jimenez, A. M., Fett, R., Asuero, A.G. (2012) Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, colour, and intake of anthocyanins. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 126–151.
- Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović- Uzelac, V., Pedisić, S., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice, *Food Chem.* **190**, 317-323.
- Caridi, D., Trenerry, V. C., Rochfort, S., Duong, S., Laughher, D., Jones, R. (2007) Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **105**, 691–699.
- Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P. (2010) Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *J. Food Eng.* **100**, 50-55.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859–871.

- Castellarin, S. D., Bavaresco L., Falginella L., Gonçalves M. I. V. Z., Di Gaspero G. (2012) Phenolics in grape berry and key antioxidants. U: The biochemistry of the grape berry, (Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., ured.) Bentham Science, Bussum, str. 89–110.
- Castilla, P., Echarri, R., Davalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., Lucas, M. F., Gomez-Coronado, D., Ortuno, J., Lasuncion, M. A. (2006) Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 252–262.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. A. (2011) Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview. *Food Res. Int.* **2**, 409–509.
- Chan C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F. W.-L. (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A.* **1218**, 6213–6225
- Chemat, S., Ait-Amar, H., Lagha, A., Esveld, D. C. (2005) Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chem. Eng. Process.* **44**, 1320–1326.
- Chemat, S., Lagha, A., Amar, H. A., Chemat F. (2004) Ultrasound assisted microwave digestion, *Ultrason. Sonochem.* **11**, 5-8.
- Chen, L., Song, D., Tian, Y., Ding, L., Yu, A., Zhang, H. (2008) Application of on-line microwave sample-preparation techniques. *Trends Anal. Chem.* **27**, 151–159.
- Datta, A. K. (2007) Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. *J. Food Eng.* **80**, 80–95.
- Deng, Q., Penner, M. H., Zhao, Y. (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int.* **44**, 2712-2720.
- Di Lecce, G., Boselli, E., D'Ignazi, G., Frega, N. (2013) Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. *Food Sci. Techn.* **53**, 54-60.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *P. Cell.* **7**, 1085-1097.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P. (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**, 15–27.
- DZS (2016) Baza podataka; Poljoprivreda, lov, šumarstvo i ribarstvo. DZS – Državni zavod za statistiku, <<http://www.dzs.hr/>>. Pristupljeno 10. svibnja 2016.

- Escarpa, A., González, M. C. (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J. Chromatogr. A.* **823**, 31–37.
- Eskilsson, C. S., Björklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **902**, 227–250.
- Fang, Y., Yang S., Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**, 872–879.
- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chrom. A.* **798**, 179–186.
- Fontana, A. R., Antonilli, A., Bottini, R. (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8989–9003.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454–457.
- Garcia-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibanez, E., Garcia-Moreno, C. (2006) Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery byproducts using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 44–50.
- Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols-A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844–1858.
- Gawel, R. (1998) Red wine astringency: A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **4**, 73–95.
- Gengaihi, S. E., Ella, F. M. A., Emad, M. H., Shalaby, E., Doha, H. (2014) Antioxidant activity of phenolic compounds from different grape wastes. *J. Food Process. Technol.* **5**, 1–5.
- Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Choi, Y. H. (2011) Effects of grape (*Vitis Labrusca B.*) peel and seed extracts on phenolics, antioxidants and anthocynins in grape juice. *Pak. J. Bot.* **43**, 1581–1586.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., Jo, I. H. (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4988–4994.
- 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.

- Grlic, M., Likozar, B., Levec, J. (2014) Kinetic model of homogeneous lignocellulosic biomass solvolysis in glycerol and imidazolium-based ionic liquids with subsequent heterogeneous hydrodeoxygenation over NiMo/Al₂O₃ catalyst. *Biomass Bioenerg.* **63**, 300-312.
- Gülçin, İ. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxic.* **217**, 213-220.
- Hai-bo, Y., Li-feng, D., Zheng, W., Li-xin, S. (2014) Study on extraction of polyphenol from grape peel microwave assisted activity. *Adv.Mat. Res.* **864-867**, 520-525.
- Harborne, J. B. (1988) The flavonoids: recent advances. U: Plant Pigments, (Goodwin, T. W., ured.), Academic Press, London, str. 426-439.
- Harborne, J. B. (1980) Plant phenolics. U: Encyclopedia of plant physiology, (Bell, E. A., Charlhood, B. V., ured.), New Series Springer, Berlin, str. 329-402.
- Howard, L., Clark, J. R., Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing seasons, *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247.
- Hu, Z., Cai, M., Liang, H. H. (2008) Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. *Sep. Purif. Technol.* **61**, 266–275.
- Hui, L., Bo, C., Shouzhuo, Y. (2005) Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). *Ultrason. Sonochem.* **12**, 295–300.
- Huie, C. W. (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 23–30.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
- Iora, S. F. R., Maciel, G. M., Zielinski A. A. F., da Silva, M. V., Pontes, P. V. de A., Haminiuk, C. W. I., Granato, D. (2014) Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food Sci. Tech.* **50**, 62-69.
- Kammerer, D., Gajdos Kljusuric, J., Carle, R., Schieber, A. (2005) Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *Eur. Food Res. Technol.* **220**, 431-437.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4016–4021.

- Kennedy, J.A.; Saucier, C.; Glories, Y.(2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* **3**, 20–21.
- Khajeh, M., Akbari Moghaddam, A. R., Sanchooli, E. (2009) Application of Doehlert design in the optimization of microwave assisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS. *Food Anal. Methods.* **3**, 133–137.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J, (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Techn.* **47**, 85–89.
- Konczak, I., Zhang, W. (2004) Anthocyanins-more than nature colours. *J. Biomed. Biotech.* **5**, 239–240.
- Kovač, V., Bourzeix, M., Heredia, N., Ramos, T. (1990) Étude des catéchines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs. *Rev. F. Oenol.* **125**, 7–15.
- Krygier, K., Sosulski, F. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic purification procedure. *J. Agricult. Food Chem.* **30**, 330–334.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P. L. (2014) Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different french grape varieties. *Molecules* **19**, 482–506.
- Lafka, T. I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **104**, 1206–1214.
- Lapornik, B., Prosek, M., Golc, Wondra. A. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214–222.
- Li, J., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Yang, Y.-C., Li, S.-M., Li, Z.-N., Wink, M. (2010) Optimization of microwave assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**, 637–664.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., Taylor, D. K. (2011) Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.* **129**, 570-576.
- Licul, R., Premužić, D. (1993) Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo, Nakladni zavod Znanje, Zagreb.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P. L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.

- Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A. (2006) Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 205–211.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics. CRC, Boca Raton
- Maisuthisakul, P., Gordon, M. H. (2009) Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chem.* **117**, 332–341.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7–18.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692-7702.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999) Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4009–4017.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993) Grapes. U: Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, 6.izd., CRC Press, Boca Raton, str. 149-199.
- Medouni-Adrar, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Cadot, Y., Medouni-Haroune, L., Dahmoune, F., Makhoukhe, A., Madani, K. (2015) Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind. Crops Prod.* **77**, 123-132.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. (2000) Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *J. Agri. Food Chem.* **48**, 577–599.
- Meyer, A. S., Heinonen, M., Frankel, E. N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* **61**, 71-75.
- Monagas, M., Bartolome', B., Go'mez-Cordove's, C. (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 85-118.
- Monagas, M., Hernandez-Ledesma, B., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B. (2006) Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 319-327.
- Montealegre, P. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascueña, J. M., Romero, G. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687–693.
- Mottaleb, M. A., Sarker, S. D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: Natural products isolation - Methods in Molecular Biology, (Sarker, S. D., Nahar, L., ured.), Humana Press, Springer Science, str. 75-87.

- Murthy, K. N. C., Singh, R. P., Jayaprakasha, G. K. (2002) Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5909-5914.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523–1542.
- Narobe, M., Golob, J., Klinar, D., Francetič, V., Likozar, B. (2014) Co-gasification of biomass and plastics: pyrolysis kinetics studies, experiments on 100 kW dual fluidized bed pilot plant and development of thermodynamic equilibrium model and balances. *Bioresour. Technol.* **162**, 21–29.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A. (2003) Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* **87**, 41–44.
- Pedroza, M. A., Amendola, D., Maggi, L., Zalacain, A., De Faveri, D. M., Spigno, G. (2015) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from dried waste grape skins. *Int. J. Food Eng.* **11**, 359-370.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S. (2006) Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 579–590.
- Prior, R. L., Cao, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* **27**, 1173-1181.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J. F. (2001) Identification of procyanidins and antocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1270-1276.
- Rajha, H. N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H. G., Maroun, R. G. (2014) Effect of the drying process on the intensification of phenolic compounds recovery from grape pomace using accelerated solvent extraction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18640-18658.
- Revilla, E., Ryan, J. M., Martin-Ortega, G. (1998) Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4592-4597.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2004) Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **68**, 101–107.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of anthocyanins in red wine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2642–2659.

- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188–192.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* **22**, 375–383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933–956.
- 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, str. 399–418.
- Rodriguez, M. R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687-693.
- Rostagno, M. A., Prado, J. M. (2013) Natural product extraction - principles and applications. RSC Publishing, Cambridge
- Routray, W., Orsat, V. (2011) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess. Technol.* **5**, 1–16.
- Ruan G. H., Li, G. K. J. (2007) The study on the chromatographic fingerprint of *Fructus xanthii* by microwave assisted extraction coupled with GC-MS. *J. Chromatogr. B.* **850**, 241–248.
- Sano, A., Uchida, R., Saito, M., Shioya, N., Komori, Y., Tho, Y., Hashizume, N. (2007) Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53**, 174–182.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Re´me´sy, C., Jime´nez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287-306.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-147.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011) Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **12**, 282–287.
- Spigno, G., De Faveri, D. M. (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210–217.

- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grapemarc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200–208.
- Strack, D. (1997) Phenolic metabolism. U: Plant Biochemistry, (Dey, P. M., Harborne, J. B., ured.), Academic Press, London, str. 387-146.
- Talebi, M., Ghassempour, A., Talebpour, Z., Rassouli, A., Dolatyari, L. (2004) Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy. *J. Sep. Sci.* **27**, 1130–1136.
- Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., Rocculi, P. (2014) Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **21**, 114–122.
- Tatke, P., Jaiswal, Y. (2011) An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Res. J. Med. Plants.* **5**, 21–31.
- Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural bioactive compounds from winery byproducts as health promoters: A review. *Int. J. of Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013) Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Int. J. of Mol. Sci.* **14**, 18711-18739.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7143-7172.
- Vatai, T., Škerget, M., Kenz, Ž. (2009) Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* **90**, 246–254.
- Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A. A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, (Chemat, F., Cravotto, G., ured.), Springer Science, New York, str. 15-52.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2007) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**, 161-169.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300–312.
- Wang, Y., You, J., Yu, Y., Qu, C., Zhang, H., Ding, L. (2008) Analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chem.* **110**, 161–167.

- Wichi, H. P. (1988) Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 717-723.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.
- Xiao, W., Han, L., Shi, B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. *Sep. Purif. Technol.* **62**, 614–618.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 255-260.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2006) Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 41–48.
- Zakon o održivom gospodarenju otpadom (2013) Narodne novine 94, Zagreb.