

Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenta iz pokožice komine grožđa sorte graševina

Peternel, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:164515>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Lea Peternel

**OPTIMIRANJE UVJETA
EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI
AKTIVNIH KOMPONENATA IZ
POKOŽICE KOMINE GROŽĐA
SORTE GRAŠEVINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Valingera.



Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj

Rad je izrađen u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina (0-VinOtpad)“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj u Operativnom programu Konkurentnost i kohezija 2014. - 2020., Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije KK.01.1.1.07.0007. Voditeljica projekta je prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković.

ZAHVALA

Posebna zahvala mentoru izv. prof. dr. sc. Davoru Valingeru na stručnoj pomoći, izdvojenom vremenu i znanju te uvijek prijateljskoj atmosferi tijekom izrade ovog rada.

Posebna zahvala svim dragim prijateljima, a najviše mojoj obitelji koja mi je sve ovo omogućila i koja me uvijek podržavala. Također, i onima koji su bili tu tijekom ovog puta, a nisu dočekali kraj.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i
automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENATA IZ POKOŽICE KOMINE GROŽĐA SORTE GRAŠEVINA

Lea Peternel, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213623

Sažetak: Pokožica komine grožđa potencijalni je izvor biološki aktivnih spojeva, a posebice polifenolnih spojeva. U ovom radu provedena je klasična ekstrakcija kruto – tekuće na dva različita uzorka pokožice komine grožđa. Za eksperiment 1 korištena je samljevena, a za eksperiment 2 prethodno osušena i samljevena pokožica komine grožđa. Pomoću dizajna eksperimenta provedena je analiza utjecaja temperature, vremena ekstrakcije, omjera krute i tekuće faze te brzina miješanja na učinkovitost ekstrakcija. Ekstraktima su određena fizikalna svojstva (vodljivost, TDS, pH) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH i FRAP metode). Procijenjeni optimalni uvjeti kako bi se dobila najviša koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost za eksperiment 1 iznosili su: $t = 34$ minuta i 15 sekundi, $T = 80$ °C, $S/L = 10$ g/L i $rpm = 625$ 1/min dok su za drugi eksperiment iznosili: $t = 40$ minuta, $T = 80$ °C, $S/L = 15$ g/L i $rpm = 250$ 1/min.

Ključne riječi: polifenoli, ekstrakcija, antioksidacijska aktivnost, komina grožđa, optimiranje

Rad sadrži: 47 stranica, 16 slika, 9 tablica, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Davor Valinger

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (predsjednica)
2. Izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (mentor)
3. Izv. prof. dr. sc. Filip Dujmić (član)
4. Izv. prof. dr. sc. Maja Benković (zamjenski član)

Datum obrane: 02. studenoga 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM THE GRAPE SKIN POMACE OF THE GRAŠEVINA VARIETY

Lea Peternel, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058213623

Abstract: The grape skin pomace is a potential source of biologically active compounds, especially polyphenolic compounds. In this study, a classical solid-liquid extraction was conducted on two different samples of grape pomace skin. For experiment 1, ground grape pomace skin was used, while for experiment 2, previously dried and ground grape pomace skin was used. Using experimental design, the analysis of the influence of temperature, extraction time, solid-liquid ratio, and mixing speed on the extraction efficiency was carried out. The extracts were analyzed for their physical properties (conductivity, TDS, pH) and chemical properties (total polyphenols and antioxidant activity using DPPH and FRAP methods). The estimated optimal conditions to obtain the highest concentration of total polyphenols and antioxidant activity for experiment 1 were: $t = 34$ minutes and 15 seconds, $T = 80$ °C, $S/L = 10$ g/L, and $rpm = 625$ 1/min, while for the second experiment, they were: $t = 40$ minutes, $T = 80$ °C, $S/L = 15$ g/L, and $rpm = 250$ 1/min.

Keywords: polyphenols, extraction, antioxidative activity, grape skin pomace, optimization

Thesis contains: 47 pages, 16 figures, 9 tables, 39 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Davor Valinger, PhD, Associate Professor

Reviewers:

1. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate Professor (president)
2. Davor Valinger, PhD, Associate Professor (mentor)
3. Filip Dujmić, PhD, Associate Professor (member)
4. Maja Benković, PhD, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: November 2nd, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KOMINA GROŽĐA KAO NUSPRODUKT U INDUSTRIJI VINA.....	2
2.1.1. Sastav komine grožđa	3
2.1.2. Pokožica komine grožđa	3
2.1.3. Kemijski sastav komine grožđa	4
2.1.3.1. Polifenoli	5
2.1.3.2. Dijetalna vlakna.....	7
2.1.3.3. Oligosaharidi.....	8
2.1.3.4. Proteini.....	8
2.1.3.5. Minerali.....	8
2.2. KLASIČNA EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	9
2.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	10
2.3.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	10
2.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	11
2.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	12
2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA	13
2.4.1. Metoda odzivnih površina	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. Otapala i reagensi.....	14
3.1.2. Aparatura i pribor.....	14
3.2. METODE.....	16
3.2.1. Ručno odvajanje komponenti komine grožđa i usitnjavanje.....	16
3.2.2. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenti	16
3.2.3. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata pokožice grožđa	18
3.2.3.1. <i>pH</i> vrijednost	18
3.2.3.2. <i>Električna vodljivost (EC) i ukupna otopljena suha tvar (TDS)</i>	18
3.2.3.3. <i>Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja</i>	18
3.2.3.4. <i>Određivanje udjela ukupnih polifenola</i>	19
3.2.3.5. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i>	20
3.2.3.6. <i>FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti</i>	21
3.2.4. Statistička analiza i optimiranje.....	23

3.2.4.1. <i>Analiza glavnih komponenata (PCA)</i>	23
3.2.4.2. <i>Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenat</i>	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA IZ POKOŽICE GROŽĐA	25
4.1.1. <i>Određivanje fizikalnih svojstava vodenih ekstrakata kome grožđa</i>	25
4.1.2. <i>Određivanje kemijskih svojstava vodenih ekstrakata kome grožđa</i>	28
4.1.3. <i>Korelacijske matrice i PCA analiza</i>	32
4.1.4. <i>Analiza metode odzivnih površina ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata pokožice kome dobivenih konvencionalnim postupkom ekstrakcije</i>	37
4.1.5. <i>Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz pokožice kome grožđa postupkom klasične ekstrakcije</i>	40
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Komina grožđa je nusproizvod niske vrijednosti koji sadrži značajnu količinu spojeva visoke dodane vrijednosti. Velika količina nejestivih dijelova komine grožđa (sjemenke, pokožica, listovi i peteljke) koja se proizvodi u vinarskoj industriji uzrokuje onečišćenje okoliša, probleme u upravljanju, kao i ekonomske gubitke. Istraživanja provedena u posljednjih 15-20 godina otkrila su da komina grožđa može služiti kao potencijalni izvor vrijednih bioaktivnih spojeva poput polifenola, antioksidansa, bioaktivnih tvari, nutraceutika, proteina jednostaničnih organizama te hlapljivih organskih spojeva, što izaziva sve veći znanstveni interes zbog njihovih povoljnih učinaka na ljudsko i životinjsko zdravlje (Chowdhary i sur., 2021).

Navedene bioaktivne komponente pokazuju širok raspon fizioloških svojstava kao što su antialergijsko, protuupalno, antimikrobno, antioksidativno svojstvo. Istraživanjima se došlo do spoznaje da konzumacija dijetalnih vlakana ima pozitivan utjecaja na zdravlje poput smanjenje rizika povezanog s bolestima srca, smanjenje rizika od raka, prevencija dijabetesa, smanjene kolesterola te prevencija zatvora i pretilosti (Chowdhary i sur., 2021).

Ti pozitivni učinci povezuju se najviše s polifenolima spojevima, koji se iz pokožice komine grožđa izdvajaju postupcima ekstrakcije. U današnje vrijeme postoji velik broj ekstrakcijskih metoda za izolaciju bioaktivnih komponenti.

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj uvjeta klasične ekstrakcije na koncentraciju ukupnih polifenola. Proveden je plan eksperimenta na dva različita uzorka. U eksperimentu 1 korišten je uzorak izdvojene i samljevene pokožice komine grožđa, dok je u eksperimentu 2 korišten uzorak koji je prije mljevenja bio i osušen. Provedena je i analiza utjecaja, pri različitim uvjetima, temperature ekstrakcije ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $80\text{ }^{\circ}\text{C}$), vremena ekstrakcije ($t = 15, 27,5$ i 40 min), omjera krute i tekuće faze ($S/L = 10, 20$ i 30 g/L) te brzine miješanja ($rpm = 250, 500$ i 750 1/min) na učinkovitost ekstrakcija.

Cilj ovog rada bio je odrediti fizikalna svojstva (električna vodljivost, TDS, pH vrijednost) vodenih ekstrakata pokožice komine grožđa te optimalne uvjete za ekstrakciju ukupnih polifenola (UF) i antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom i FRAP metodom. Primjenom dizajna eksperimenta određeni su optimalni uvjeti za provedbu obje ekstrakcije te je provedena analiza korelacijskih matrica i analiza glavnih komponenata na prikupljenom skupu podataka. Razvijeni su također modeli lokalne kvadratne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata na temelju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

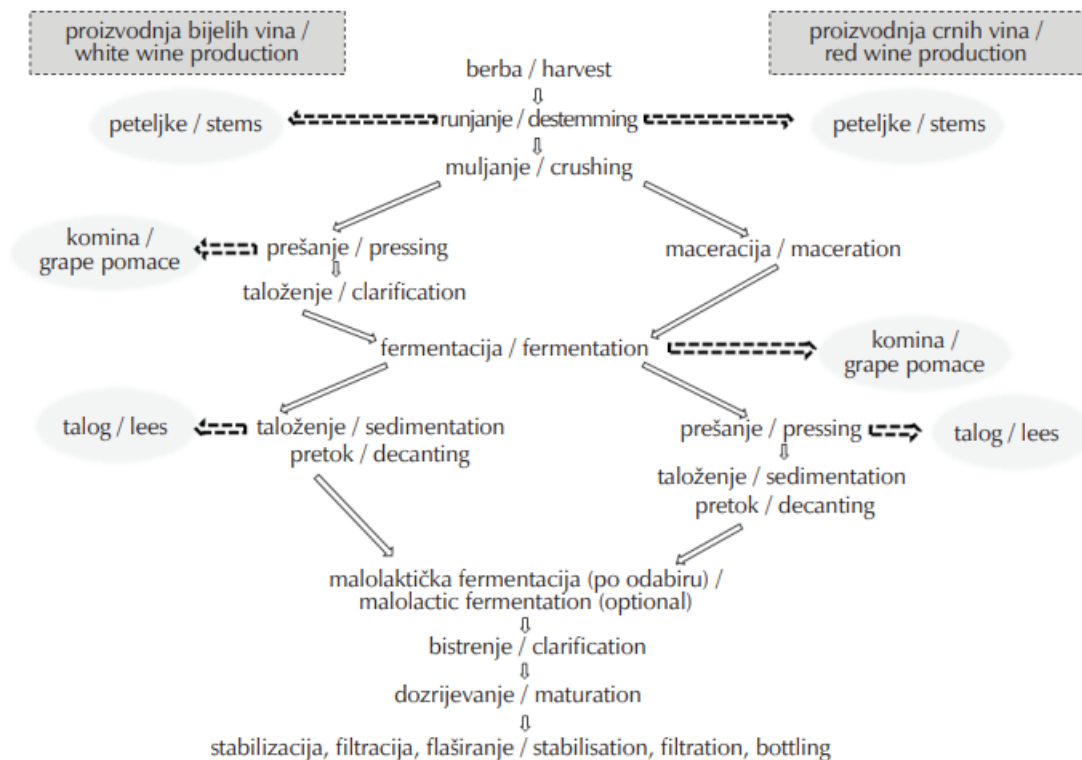
2.1. KOMINA GROŽĐA KAO NUSPRODUKT U INDUSTRIJI VINA

Glavni kruti organski otpad u vinarskoj industriji je komina grožđa koja nastaje tijekom proizvodnje vina. Na slici 1 je prikazan nastanak nusproizvoda tijekom proizvodnje vina. Procjenjeno je da se na svakih 6 litara proizvedenog vina generira otprilike 1 kilogram komine. Na globalnoj razini, procjenjuje se godišnja proizvodnja oko 9 milijuna tona komine, dok je u Hrvatskoj ta količina oko 40.600 tona (Skračić i sur., 2023). Većinu mase komine grožđa čine pokožica, sjemenke i peteljka grožđa, a njihov udio i međusobni omjer ovise o sorti grožđa, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima područja i primijenjenoj tehnologiji. Komina crnog grožđa odvaja se iz procesa prerade nakon djelomične fermentacije, dok se komina bijelog grožđa odvaja od mošta prije samog početka fermentacije. Shodno tome nije iznenađujuće da komina bijelog grožđa, ovisno o primijenjenoj tehnologiji, sadrži oko 38 % glukoze i fruktoze, dok u komini crnog grožđa nakon završene fermentacije ostaje samo oko 1 % ovih monosaharida (Morano i sur., 2021). Komina se najčešće iskorištava tako što se podvrgava destilaciji i kompostiranju, dok je kod nas najpoznatiji način iskorištenja prevrele komine za proizvodnju rakije tzv. komovice.

Komina se može efikasno kompostirati miješanjem s drugim organskim materijalom biljnog porijekla, poput otpalih lišća, slame ili ostalog biljnog otpada. Cilj je podići i uravnotežiti razinu hranjiva dušika, fosfora i kalija (NPK) te poboljšati strukturu tla. Također, može se pomiješati sa stajskim gnojem kako bi mikroorganizmi u gnoju ubrzali njen proces razgradnje. Često se koristi i za kondicioniranje tla radi poboljšanja njegove strukture. Međutim, treba biti oprezan kod korištenja ne dekomponiranih ostataka i destabiliziranog komposta jer to može rezultirati imobilizacijom hranjiva i fitotoksičnošću. Stoga mnogi autori preporučuju prethodnu enzimatsku hidrolizu komine prije uporabe (Portilla-Rivera i sur., 2007, Cambardella i sur., 2003).

Kako bi se riješila problematika kvarenja hrane uzrokovana oksidacijom i aktivnošću mikroorganizama, prehrambena industrija neprestano istražuje nove prirodne izvore bioaktivnih komponenata s sposobnošću usporavanja ili inhibicije ovih promjena. Cilj je postupno smanjiti ili eliminirati upotrebu postojećih kemijskih sredstava koja su pokazala negativan i potencijalno štetan utjecaj na ljudsko zdravlje. U skladu s tim, posljednjih godina teži se primjeni ekološki prihvatljivih, sigurnih i prirodnih pripravaka, uključujući i preparate ekstrahirane iz vinske komine. Komina crnog grožđa predstavlja bogat izvor pigmenta topljivih u vodi (antocijana) koji se često koriste za bojenje različitih prehrambenih proizvoda

poput bezalkoholnih pića, vina, likera, jogurta, deserta, sladoleda, džemova i ostalih voćnih prerađevina (Peixoto i sur., 2018, Kalli i sur., 2018).



Slika 1. Nastanak nusproizvoda tijekom proizvodnje vina (Skračić i sur., 2023)

2.1.1. Sastav komine grožđa

Komina grožđa se prije svega sastoji od dvije frakcije: komina bez sjemenki (karakterizirana pokožicom te preostalom pulpom i peteljka) i samih sjemenki. Na slici 2 nalazi se vizualni prikaz od kojih se komponenti sastoji komina grožđa (Bordiga i sur., 2019).

2.1.2. Pokožica komine grožđa

Pokožica grožđa čini glavnu komponentu groždane komine, često čineći i do 65 % ukupne mase. Također, može činiti do 25 % ukupne mase grozda, pri čemu konkretni postotak ovisi o sorti grožđa. Glavne kemijske komponente u pokožici grožđa uključuju prehrambena vlakna (do 60 %), pri čemu preko 98 % tih vlakana čine netopljiva vlakna. Stanične stijenke u pokožici grožđa uglavnom su sačinjene od neutralnih polisaharida (oko 30 %), gdje prevladavaju celuloza i hemiceluloza, kao i pektinski spojevi (oko 20 %). Osim toga, u pokožici se nalaze netopljivi proantocijanidini (oko 15 %), lignin, strukturalni proteini (manje od 5 %), proteini (između 5 % i 12 %), pepeo (između 2 % i 8 %), i topljivi ugljikohidrati.

Unatoč prisutnosti raznih komponenti, fenolni spojevi igraju najvažniju ulogu u proizvodnji

vina. Ovi spojevi su vezani za strukturalne komponente stanične stijenke ili su prisutni u vakuolama unutar stanica te se lako izvlače u mošt ili vino.

Najvažniji među njima su antocijani koji se nalaze u pokožici crnog grožđa, a među njima je najznačajniji i najzastupljeniji malvidin-3-glukozid. Također, važni su i tanini, koji se, osim u pokožici, nalaze i u sjemenkama grožđa. Međutim, tanine u pokožici karakterizira visoki stupanj polimerizacije (između 28 % i 80 %). Pokožica grožđa također sadrži različite derivate procijanidina (uglavnom dimere) i prodelfidina (polimeri galokatehina i epigalokatehina) s visokom razinom kondenzacije. Osim toga, u pokožici grožđa nalazimo strukturalno jednostavnije spojeve kao što su epikatehin, katehin, galna kiselina, rutin, kvercetin, epikatehin galat i epigalokatehin (Skračić i sur., 2023).

2.1.3. Kemijski sastav komine grožđa

Kemijski sastav komine pod utjecajem je raznih čimbenika: metode vinifikacije, sorte grožđa, godina berbe, klimatski uvjeti, geografsko porijeklo, primijenjene metode uzgoja, način čuvanja komine, metode izolacije i detekcije pojedinih sastojaka. Sve ove varijable znatno otežavaju usporedbu rezultata različitih studija (Skračić i sur., 2023). Sadržaj vlage komine varira između 50 % i 72 % te ovisi o sorti i stupnju zrelosti grožđa. Lignin čini od 16,8 % do 24,2 % sastojaka komine, dok udio proteina iznosi manje od 4 % ukupnih sastojaka komine. Pektinske tvari općenito čine glavne polimerne komponente staničnih stijenki grožđa i čine od 37 do 54 % ukupnih polisaharida staničnih stijenki. Celuloza je druga vrsta polisaharida staničnih stijenki s udjelom od 27 do 37 %. Iz komine grožđa mogu se izolirati različiti proizvodi poput etanola, tartarata, limunske kiseline, ulja, hidrokoloida i dijetalnih vlakana. Komina grožđa je bogata polifenolima poput rezveratrola, antocijanina, flavona i tanina, a također se može smatrati nekonvencionalnim izvorom pektina (Spinei i Oroian, 2021).



Slika 2. Komponente komine grožđa – sjemenke i pokožica (Bordiga i sur., 2019)

2.1.3.1. Polifenoli

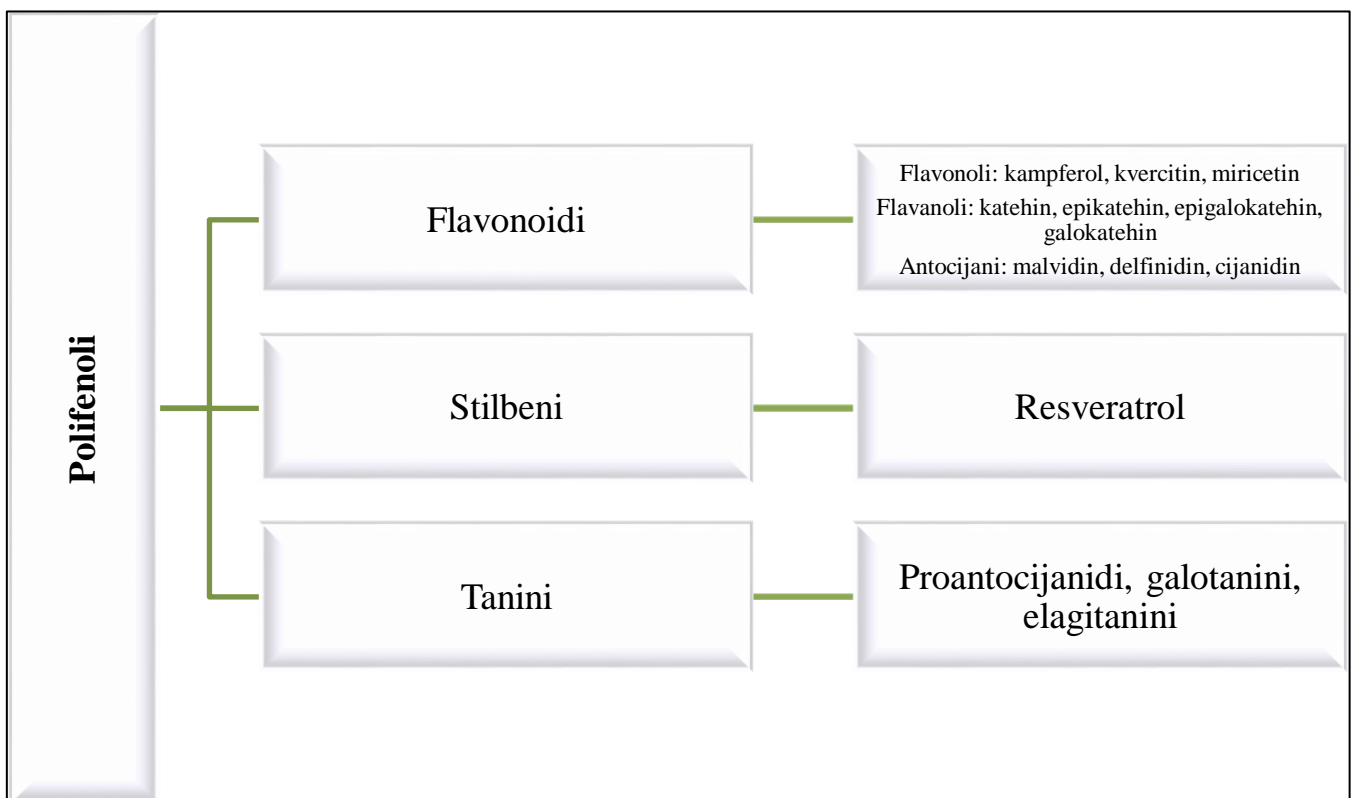
Fenolni spojevi predstavljaju jednu od najbrojnijih, najvažnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih proizvoda u biljnom kraljevstvu. Oni pokazuju širok raspon fizioloških svojstava kao što su antialergijsko, protuupalno, antimikrobno, antioksidativno, kardioprotektivno i vazodilatacijsko djelovanje. Obično se povezuju s blagodatima za zdravlje koje proizlaze iz konzumiranja visokih količina voća i povrća (Haminiuk i sur., 2012). Strukturno, fenolni spojevi sadrže aromatski prsten s jednim ili više hidroksilnih supstituenata te se kreću od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva.

Polifenoli koji se nalaze u grožđu i vinu općenito se mogu svrstati u tri glavne skupine, kao fenolne kiseline, flavonoidi i tanini, kako je prikazano na slici 3 (Beres i sur., 2017). U komini grožđa identificirano je mnogo fenolnih spojeva, pri čemu su najzastupljeniji antocijani, hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina, flavan-3-oli, flavonoli i stilbeni (Soto i sur., 2015).

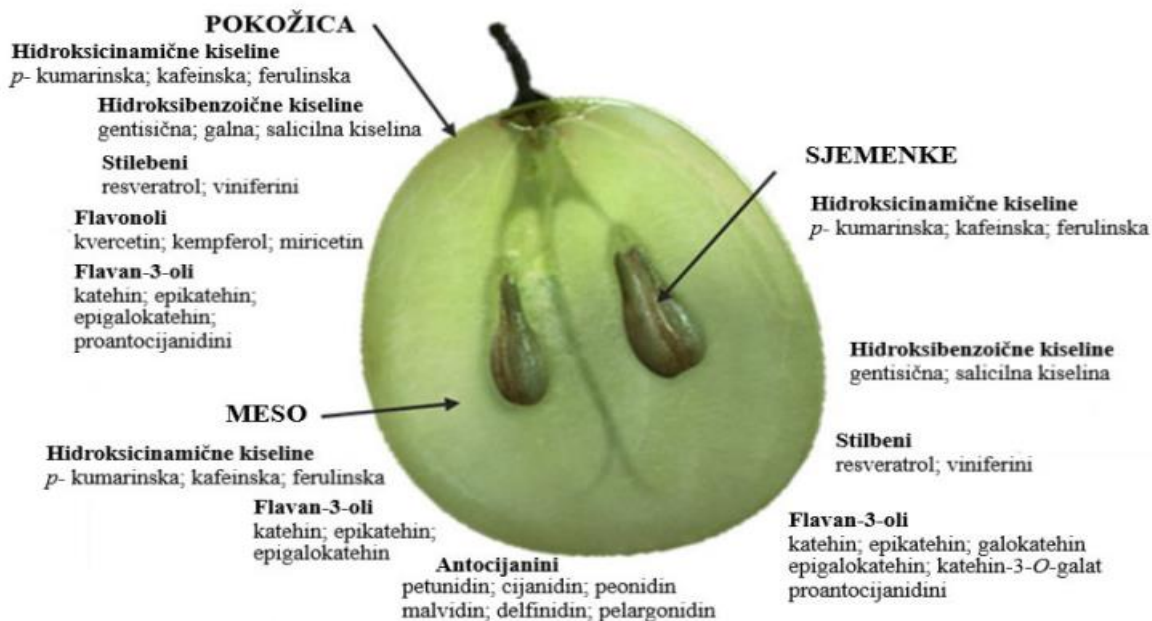
Antocijani su pigmenti karakteristični za crvenu boju i proizvode se tijekom sazrijevanja. Oni su izuzetno osjetljivi na kemijske transformacije koje su rezultat djelovanja čimbenika poput svjetlosti, temperature, kisika, pH-vrijednosti, otapala i metalnih iona. Zbog ove karakteristike, jedan od glavnih fokusa istraživanja ovog spoja je stabilizacija radi njegove primjene kao prirodnog bojila u prehrambenoj industriji. Glavni antocijani koji se nalaze u pokožici grožđa su: 3-O-glikozidi malvidina, petunidina, cijanidina, peonidina i delfinidina. Međutim, faktori kao što su sorta, zrelost i klima mogu utjecati na prisutnost ovih spojeva (Beres i sur., 2017).

Flavan-3-oli, kao što su proantocijanidini i katehini, su najrasprostranjenija skupina flavonoida

u ljudskoj prehrani te se lako mogu pronaći u voću i povrću. Oni su izuzetno važni za senzorske karakteristike vina, budući da se ekstrahiraju iz grožđa tijekom procesa vinifikacije, iako ne u potpunosti, već ostaju u velikim količinama u nusproizvodu koji se dobiva pri proizvodnji vina. Najveća koncentracija tih spojeva nalazi se u sjemenu, dok su također prisutni i u kožici grožđa. Međutim, sjeme i pokožice imaju različite sastave flavan-3-ola, pri čemu se u kožici nalaze katehini, galokatehini i proantocijanidini, dok sjemenke sadrže samo katehine i proantocijanidine (González-Manzano i sur., 2004). Stilbeni su fitoaleksini koji se pojavljuju u jestivim biljkama, posebno u grožđu. Glavni stilben koji se nalazi u grožđu, vinu i ostacima dobivenim pri proizvodnji vina je resveratrol, a njegova količina varira prema stupnju zrelosti i sorti grožđa. Najvažniji stilbeni u grožđu su rezervatrol-3-O-b-d-glukopiranozid, cis- i trans-resveratrol, piceatanol i dimeri resveratrola a, pri čemu su također pronađene neke glikozilirane i izomerne forme (Flamini i sur., 2013). Na slici 4 prikazan je shematski prikaz zrelog grozda i raspodjela biosinteze fenolnih sastojaka između različitih organa i tkiva i zorno možemo vidjeti koje fenolne spojeve očekujemo u pojedinim dijelovima grožđa (Cosme i sur., 2018).



Slika 3. Podjela polifenola koji se nalaze u komini grožđa (prema Beres i sur., 2017)



Slika 4. Shematski prikaz zrelog grozda i raspodjela biosinteze fenolnih sastojaka između različitih organa i tkiva (označeno strelicama) (prema Cosme i sur., 2018)

2.1.3.2. Dijetalna vlakna

Dijetalna vlakna su najvažnije komponente sušene komine grožđa, s koncentracijama koje se kreću između 43 % i 75 %. Polisaharidi stanične stijenke i lignin glavne su komponente dijetalnih vlakana. Općenito, sjemenke su bogatije vlaknima u usporedbi s pokožicom, slično kao što je komina crnog grožđa bogatija u usporedbi s kominom bijelog grožđa (Gul i sur., 2013). Istraživanjem konzumacije dijetalnih vlakana došlo se do ključnih spoznaja i pozitivnog utjecaja na zdravlje poput smanjenje rizika povezanog s bolestima srca, smanjenje rizika od raka, prevencija dijabetesa, smanjene kolesterola te prevencija zatvora i pretilosti. Međutim, preporučeni unos dijetalnih vlakana prema smjernicama iznosi 25–30 g dnevno. Budući da ovakav unos nije lako ostvariv, potreba za pronalaženjem alternativnih izvora potaknula je istraživanje, razvoj i komercijalizaciju nekoliko proizvoda bogatih vlaknima. Nusproizvodi proizvedeni u vinskoj industriji pokazuju odgovarajuće karakteristike (Deng i sur., 2011), budući da pokožica grožđa (kao složen lignocelulozni materijal) sadrži veliku količinu hemiceluloznih šećera koji su sposobni generirati ksilozne i glukozne monomere nakon hidrolize. Nedavna istraživanja su dokazala da je ovaj nusproizvod zanimljiv izvor bioaktivnih spojeva s primjenama u farmakološkoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, zahvaljujući njihovoj biološkoj aktivnosti i tehnološkim karakteristikama (Gil-Sanchez i sur., 2017, Pineda-Vadillo i sur., 2016).

2.1.3.3. Oligosaharidi

Makromolekule grožđa/vina uključuju polifenole, proteine i polisaharide. Polisaharidi su sveobuhvatno proučavani zbog njihove važnosti (tehnološka i senzorska svojstva u vinima). Za razliku od vinskih polisaharida, oligosaharidi (OS) su tek nedavno karakterizirani. Ove molekule predstavljaju prirodne nusproizvode degradacije polisaharida staničnih stijenki bobica. OS (kiselinski i neutralni), detektirani u vinima, pokazali su stupanj polimerizacije između 2 i 50, karakteriziran iznimnom strukturnom raznolikošću (Bordiga i sur., 2019). Oligosaharidi su skupina ugljikohidrata koja sadrži između 3 i 10 ostataka monosaharida. Oni ispunjavaju uvjete za definiciju prebiotika jer se ne razgrađuju niti apsorbiraju u gornjem dijelu crijeva kod ljudi. Ovi spojevi ostaju nepromijenjeni dok dopijaju u debelo crijevo, gdje djeluju kao izvor hranjivih tvari za mikrofloru debelog crijeva. Sjemenke grožđa, osim što sadrže značajan udio fenolnih spojeva, također obiluju oligosaharidima (Bordiga i sur., 2018), slično kao i vino. To potvrđuje da sjemenke grožđa predstavljaju inovativan i interesantan izvor ove skupine bioaktivnih molekula.

2.1.3.4. Proteini

Sadržaj proteina može varirati između 6 % i 15 % (suha tvar) u komini grožđa, ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Uspoređujući pokožicu i sjemenke, udio proteina se čini sličan. Profil aminokiselina u komini grožđa pokazuje sličnosti s profilom žitarica, pri čemu su visoke vrijednosti glutaminske i asparaginske kiseline te niske vrijednosti triptofana i aminokiselina koje sadrže sumpor (Bordiga i sur., 2019).

2.1.3.5. Minerali

Sadržaj minerala u komini grožđa obilježava značajna varijabilnost. Neki aspekti kao što su klimatski uvjeti, prakse u vinogradarstvu, zajedno s procesom proizvodnje vina, odgovorni su za ovaj učinak (Lachman i sur., 2013).

Zbog visoke pokretljivosti kroz floem, minerali poput kalija, fosfora, sumpora i magnezija imaju tendenciju da se nakupljaju i lokaliziraju uglavnom u pokožici bobice tijekom sazrijevanja. Tartarat predstavlja najzastupljenije soli kalija, uglavnom kalijev bitartarat. Tartarati, s vrijednostima koje se kreću između 4 % i 14 % (suha tvar), predstavljaju značajnu količinu komine (Bordiga i sur., 2019).

2.2. KLASIČNA EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Klasična ekstrakcija čvrsto - tekuće čini osnovu mnogih analitičkih postupaka za pripremu uzoraka i opisane su u službenim metodama analize (AOAC, 1990). Varijable koje utječu na postupak ekstrakcije treba istražiti kako bi se maksimizirao prinos bioaktivnih molekula ekstrahiranih iz biljnih materijala. U slučaju ekstrakcije bioaktivnih molekula, ekstrakcija otapalom povoljan je postupak jer se termički osjetljivi materijali mogu oporaviti pri niskim temperaturama (Valinger i sur., 2022), također osim temperature na ekstrakciju utječu i vrsta otapala, vrijeme ekstrakcije, omjer uzorka i otapala te kemijski sastav i fizikalna obilježja uzorka. Izbor otapala je vrlo važan za ekstrakciju, a najčešće korištena otapala za su voda, metanol, etanol, aceton, etil acetat, vodene otopine alkohola, a odabir otapala utječe na količinu i brzinu izlučivanja polifenola (Xu i Chang, 2007).

Izbor organskog otapala koje se može koristiti u ekstrakciji biljaka i njihovih komponenti obično je prilično ograničen, uobičajeno se koriste otapala s temperaturama vrenja koje ne prelaze 80 °C. Za trenutna istraživanja odabir otapala za ekstrakciju obavljen je uzimajući u obzir sljedeće čimbenike:

- polarnost;
- temperatura vrenja - trebala bi biti niska kako bi se olakšalo uklanjanje otapala iz proizvoda;
- latentna toplina isparavanja;
- reaktivnost - otapalo ne smije kemijski reagirati s ekstraktom niti se lako razgraditi;
- viskoznost - mora biti niska;
- stabilnost na toplinu, kisik i svjetlo;
- sigurnost u uporabi - otapalo bi, ako je moguće, trebalo biti nezapaljivo i ne bi smjelo predstavljati toksičnu opasnost za tehničare ili potrošače; njegovo odlaganje ne bi smjelo ugrožavati okoliš;
- otapalo bi trebalo biti dostupno u znatnim količinama;
- trošak;
- prikladnost za ponovnu uporabu (Albu i sur., 2004).

2.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Brojna istraživanja pokazuju da antioksidansi igraju ključnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja, prevenciji i liječenju bolesti, zbog njihove sposobnosti smanjenja oksidativnog stresa. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti/kapaciteta hrane i bioloških uzoraka stoga je bitno ne samo za osiguranje kvalitete funkcionalnih namirnica, već i, što je još važnije, za proučavanje učinkovitosti antioksidanata u hrani u prevenciji i liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Munteanu i Apetrei, 2021). Antioksidansi su spojevi koji, kada su prisutni u vrlo niskim koncentracijama u hrani ili ljudskom tijelu, odgađaju, kontroliraju ili sprečavaju oksidacijske procese koji dovode do propadanja kvalitete hrane ili pojave i širenja degenerativnih bolesti u organizmu. U procesu inhibicije oksidacije ovim antioksidacijskim spojevima sudjeluje niz metoda i aktivnosti (Shahidi i Zhong, 2015). Metode i instrumenti koji se koriste za mjerenje aktivnosti antioksidansa ostvarili su značajan napredak u proteklom desetljećima. Ranije metode mjere učinkovitost antioksidansa u sprečavanju nastanka određenih vrsta oksidacijskih produkata i temelje se na mjerenju oksidacije lipida. Standardizirana metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti komponente hrane trebala bi udovoljavati sljedećim idealnim zahtjevima (Prior i sur., 2005):

- Izvor slobodnih radikala koji se koristi treba biti biološki relevantan;
- Poželjno je da bude jednostavna;
- Korištena metoda mora imati definiran krajnji rezultat i kemijski mehanizam;
- Instrumenti i kemijski spojevi koji se koriste moraju biti lako dostupni;
- Reproducibilnost unutar ciklusa i između dana je primjerena;
- Omogućava analizu kako za hidrofilne tako i za lipofilne antioksidante, koristeći različite izvore slobodnih radikala;
- Metoda mora biti primjenjiva za analize kontrole kvalitete.

Postoji mnogo različitih metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti hrane. Budući da su oksidacijski procesi kompleksni, često je potrebno koristiti više različitih metoda kako bi se osigurali pouzdani rezultati, kao što su metode poput Briggs-Rauscher, DPPH, FRAP, ABTS, ORAC i TEAC metoda.

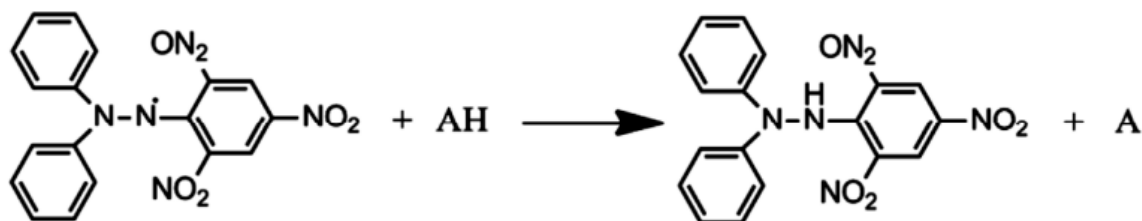
2.3.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Metoda Folin-Ciocalteu (F-C) najčešće se koristi kao kolorimetrijska metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u ekstraktima hrane. Gustoća boje u reakcijskom mediju linearno je povezana s razinom reducirajućih tvari, kao što su polifenoli. Metoda F-C nije specifična za određene skupine fenolnih spojeva, već služi za kvantifikaciju ukupnih

koncentracija fenolnih hidroksilnih skupina (Gao i sur., 2019). Analiza se bazira na redoks reakciji u kojoj se fenolna skupina oksidira, a metalni ion reducira. Reakcija će se sporije provoditi pri nižim vrijednostima pH dok će pri višim vrijednostima ona biti brža. U reakciji sa reduktantom dolazi do plavog obojenja otopine čija se apsorbancija potom očitava na spektrofotometru te se tako dobija pouzdana analiza ukupnog polifenolog sastava (Agbor i sur., 2014).

2.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

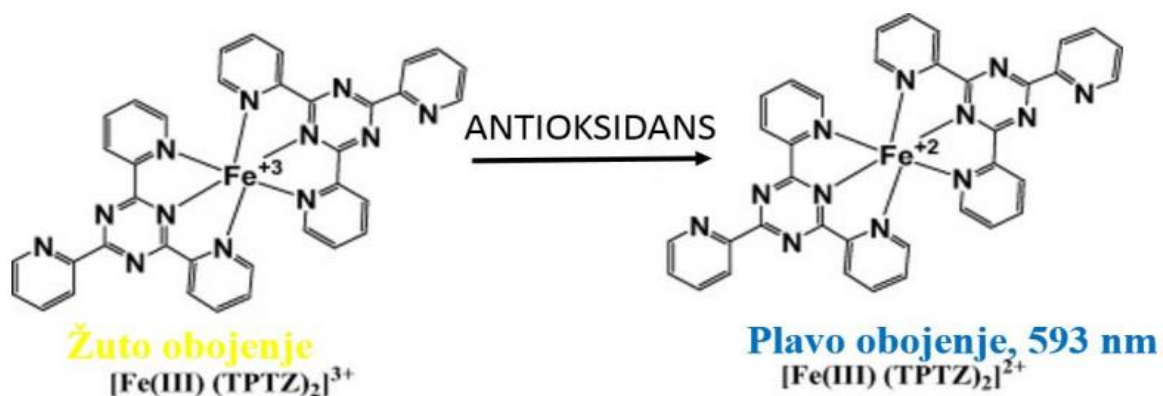
DPPH metoda je jednostavna i jedna od najčešće korištenih metoda. Temelji se na redukciji ljubičastog DPPH radikala antioksidansom putem mehanizma prijenosa vodikovog atoma, što uzrokuje promjenu boje u stabilni blijedožuti oblik DPPH molekule (hidrazin). Preostali ljubičasti DPPH radikal mjeri se UV-Vis spektrofotometrom na približno 515 - 520 nm kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost, kako je prikazano na slici 5. Ovaj test pruža korisne informacije o antioksidacijskoj sposobnosti za doniranje vodikovih atoma, o redukcijском kapacitetu reakcije i o mehanizmu između slobodnog radikala i antioksidansa. Test je također jednostavan, jer koristi samo DPPH radikalni reagens i antioksidans. Test također zahtijeva blage eksperimentalne uvjete u usporedbi s drugim tradicionalnim metodama za procjenu antioksidacijske aktivnosti koje zahtijevaju dodatne tretmane uzorka i reagensa, kao što su visoke temperature i/ili opskrba kisikom. Međutim, tradicionalni DPPH test ima svoje ograničenje u zahtjevu za velikom količinom svježe pripremljene DPPH otopine, obično 2-4 ml po uzorku. Preporučeno je čuvanje DPPH zalihe na niskim temperaturama, ali kasnije je utvrđeno da je nestabilna. Kako bi se prevladale ove ograničenosti, koristi se DPPH senzorski film za brzo i jeftino ispitivanje antioksidacijske aktivnosti, ali samo za kvalitativna mjerenja (Sirivibulkovit i sur., 2018). Uspoređuje se mjerenje promjene apsorbancije pri istoj valnoj duljini nakon 30-minutne inkubacije s istim učinkom standardnog antioksidansa-reducensa Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline), koji je analog vodotopivog vitamina E. Mjerenje apsorbancije provodi se u odnosu na slijepu probu - otopinu 0,094 mM DPPH u metanolu bez dodatka uzorka. Vrijednost apsorbancije uzoraka dobiva se oduzimanjem izmjerene apsorbancije od apsorbancije slijepa probe, koja pokazuje najvišu vrijednost apsorbancije jer u njoj nije bilo antioksidacijske reakcije. Ova vrijednost se izražava kao promjena apsorbancije DPPH radikala (ΔA). Nakon mjerenja uzorka, konstruira se kalibracijska krivulja na temelju mjerenja s različitim standardnim koncentracijama Trolox-a.



Slika 5. Reakcija antioksidansa i DPPH slobodnog radikala. AH je antioksidans donor-molekula, A je proizvedeni slobodni radikal (*prema* Sirivibulkovit i sur., 2018)

2.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Metoda FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power - antioksidativna moć redukcije željeza) temelji se na redukciji žuto obojenog kompleksa željeza-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) od strane reducensa-antioksidansa, što rezultira promjenom boje u plavu (slika 6). Plava boja pokazuje maksimalnu apsorpciju na valnoj duljini od 593 nm (Benzie i Strain, 1996). Rezultati se dobiju mjerenjem porasta apsorpcije pri 593 nm i mogu se izraziti u mikromolarnim Fe^{2+} ekvivalentima ili u odnosu na antioksidans koji se koristi kao standard, primjerice Trolox (Pisoschi i Negulescu, 2011). Metoda je jednostavna, brza i ekonomična, ne zahtjeva sofisticiranu opremu, a opisani su i ručni i automatizirani postupci. Postoje, međutim, tvrdnje kako rezultat ne predstavlja nužno antioksidacijsku aktivnost. Umjesto toga pruža vrlo korisne podatke o ukupnoj koncentraciji antioksidanasa, bez potrebe za mjerenjem i zbrajanjem koncentracija svih prisutnih antioksidanasa. Metoda se izvorno primjenjivala na plazmi (Benzie i Strain, 1999), ali je proširena i na druge biološke tekućine, hranu, biljne ekstrakte, sokove itd (Antolovich i sur., 2002).



Slika 6. Ovisnost apsorpcije TPTZ pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom (*prema* Pérez-Cruz i sur., 2018)

2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA

Jedan od načina za procjenu utjecaja više parametara (značaj interakcija između varijabli) i istodobno optimiranje procesa je korištenje statističkih alata poput dizajna eksperimenta. Upotreba eksperimentalnog dizajna čini istraživanja praktičnijima, pouzdanijima i ekonomičnijima (manji broj eksperimenata) u potrazi za najboljim uvjetima sinteze. Među opcijama za izradu eksperimentalnog dizajna su oni koji omogućuju izvođenje optimizacijske analize putem metode odzivnih površina (RSM), kao što su na primjer Box-Behnken dizajn, centralni kompozitni dizajn i ortogonalni dizajn (Pinheiro i sur., 2021).

2.4.1. Metoda odzivnih površina

Metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) je statistički alat koji pruža pouzdane i adekvatne analize odgovora i generira matematički model koji se uklapa u eksperimentalne podatke i može se koristiti za optimizaciju procesa.

Metodu odzivnih površina prvi put su predstavili Box i Wilson u 20. stoljeću. Glavna svrha ove metode je razumjeti vezu između nezavisnih varijabli i zavisne varijable (odziva) putem odzivne funkcije kako bismo bolje razumjeli kako ulazni (procesni) parametri utječu na promatrani odziv. Osnovni cilj ove metode je razvijati, poboljšavati i optimirati procese (Bezerra i sur., 2008).

Neke faze primjene metode odzivnih površina kao tehnike optimiranja su sljedeće: (1) odabir nezavisnih varijabli koje imaju značajan utjecaj na sustav putem ispitivanja i ograničavanje eksperimentalnog područja prema cilju istraživanja i iskustvu istraživača; (2) odabir eksperimentalnog dizajna i provođenje eksperimenata prema odabranoj eksperimentalnoj matrici; (3) matematičko-statistička obrada dobivenih eksperimentalnih podataka putem prilagodbe polinomske funkcije; (4) procjena prikladnosti modela; (5) provjera potrebe i mogućnosti provođenja pomaka prema optimalnom području; i (6) dobivanje optimalnih vrijednosti za svaku proučavanu varijablu (Bezerra i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U radu je korištena pokožice komine bijele sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina, ubranoga 2021. godine (Kutjevo, Hrvatska). Komina grožđa je prije provedbe eksperimenata čuvana u zamrzivaču na temperaturi -18 °C. Prije provedbe eksperimenata sjemenke su odvojene od pokožice sijanjem te su potom samljevene za potrebe eksperimenta 1, a za potrebe eksperimenta 2 osušene i samljevene.

3.1.1. Otapala i reagensi

Otapala i reagensi korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- Natrijev acetat-trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (HCl), 0,01 mol/L (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Paris, Francuska)
- Koncentrirana octena kiselina (CH_3COOH), T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- Željezo (II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)

3.1.2. Aparatura i pribor

Sljedeće aparature i pribor korišteni su u eksperimentalnom radu:

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Göttingen, Njemačka)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Zagreb, Hrvatska)

- Magnetska mješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development inc., Philadelphia, SAD)
- pH metar (Jenco 601A, Dallas, SAD)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, London, Engleska)
- Računalni program Statistica 10 (StatSoft, Round Rock, United States)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimeter, Łódź, Poljska)
- Uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Düsseldorf, Njemačka)
- Vibracioni volumetar (laboratorijska izrada)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Riga, Latvija)

Pribor:

- Aluminijske posudice s poklopcem
- Eppendorf kivete
- Falkon kivete 15 ml
- Filter papir od celuloze (veličina pora 20 μm)
- Kiveta od kvarcnog stakla
- Menzura volumena 250 mL
- Metalna špatulica
- Mikropipete volumena 100 μL i 500 μL
- Mikrofilteri CA 0,20 μm (LLG Labware, Njemačka)
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Pasteur pipeta
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Staklene epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Stakleni ljevak
- Stalak za epruvete

3.2. METODE

3.2.1. Ručno odvajanje komponenti komine grožđa i usitnjavanje

Ručno odvajanje pokožice grožđa od sjemenki i ostalih dijelova komine koje se nisu koristili u eksperimentu. Kako bi se dobile različite frakcije veličina pokožice komine grožđa, provodi se mljevenje upotrebom mlina IKA Tube Mill (IKA, Njemačka) pri brzini okretaja oštrice od $rpm = 15000$ 1/min.

3.2.2. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenti

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenta bazira se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću. U ovom radu ekstrakcija biološki aktivnih komponenti izvodila se na slijedeći način: u staklenu čašu volumena $V = 200$ mL odvagana je određena masa pokožice grožđa, prvi tjedan je korišten uzorak koji je samljeven, a drugi tjedan uzorak koji je osušen i samljeven. Uzorak je zatim preliven s 50 mL destilirane vode zagrijane na unaprijed definiranu temperaturu. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatirana je na definiranoj temperaturu u uljnoj kupelji pri određenoj brzini miješanja i zadanom vremenu. Eksperimenti ekstrakcije provedeni su prema uvjetima definiranim planom pokusa (tablica 1). Ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije ($t = 15, 27,5$ i 40 min), temperature ekstrakcije ($T = 40, 60$ i 80 °C), omjera krute i tekuće faze ($S/L = 10, 20$ i 30 g/L) te brzine miješanja ($rpm = 250, 500$ i 750 1/min). Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Nakon provedene ekstrakcije ekstraktima su određena fizikalna i kemijska svojstva.

Tablica 1. Plan eksperimenata (klasična ekstrakcija) za oba eksperimenta

Eksperiment	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S/L</i> (g/L)	<i>rpm</i> (1/min)
1	15	40	20	500
2	40	40	20	500
3	15	80	20	500
4	40	80	20	500
5	27,5	60	10	250
6	27,5	60	30	250
7	27,5	60	10	750
8	27,5	60	30	750
9	27,5	60	20	500
10	15	60	20	250
11	40	60	20	250
12	15	60	20	750
13	40	60	20	750
14	27,5	40	10	500
15	27,5	80	10	500
16	27,5	40	30	500
17	27,5	80	30	500
18	27,5	60	20	500
19	15	60	10	500
20	40	60	10	500
21	15	60	30	500
22	40	60	30	500
23	27,5	40	20	250
24	27,5	80	20	250
25	27,5	40	20	750
26	27,5	80	20	750
27	27,5	60	20	500
28	27,5	60	20	500
29	27,5	60	20	500
30	27,5	60	20	500

3.2.3. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata pokožice grožđa

3.2.3.1. pH vrijednost

pH vrijednosti pripremljenih vodnih ekstrakata izmjerene su pH metrom (Jenco 601A, SAD) u dvije paralele.

3.2.3.2. Električna vodljivost (EC) i ukupna otopljena suha tvar (TDS)

Električna vodljivosti i ukupne otopljene suhe tvari pripremljenih vodenih ekstrakata izmjerene su konduktometrom (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) u dvije paralele.

3.2.3.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase (AOAC, 1995). U suhu i označenu posudicu stavi se kvarcni pijesak (u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice). Posudica se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na temperaturi $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon sušenja od $t = 1\text{ h}$ poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću $\pm 0,0002\text{ g}$. U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom otpipetira se volumen od $V = 3\text{ mL}$ ekstrakta (dvije paralele za svaki uzorak). Sušenje uzoraka traje $t = 4\text{ sata}$ pri temperaturi $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli (jednadžbe 1-2):

$$\%vode = \frac{(A-B)}{m} \cdot 100\% \quad [1]$$

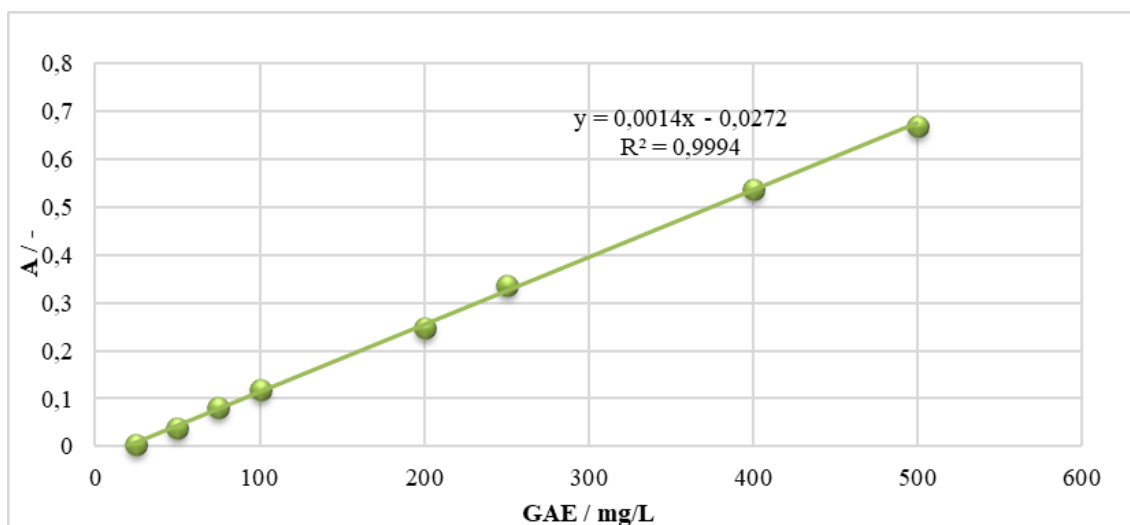
$$\%suhe\ tvari = 100\% - \%vode \quad [2]$$

gdje je A masa posudice s uzorkom prije sušenja (g), B masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g), a m masa uzorka (g). Na istom ispitnom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2 % obzirom na udio vode odnosno udio suhe tvari.

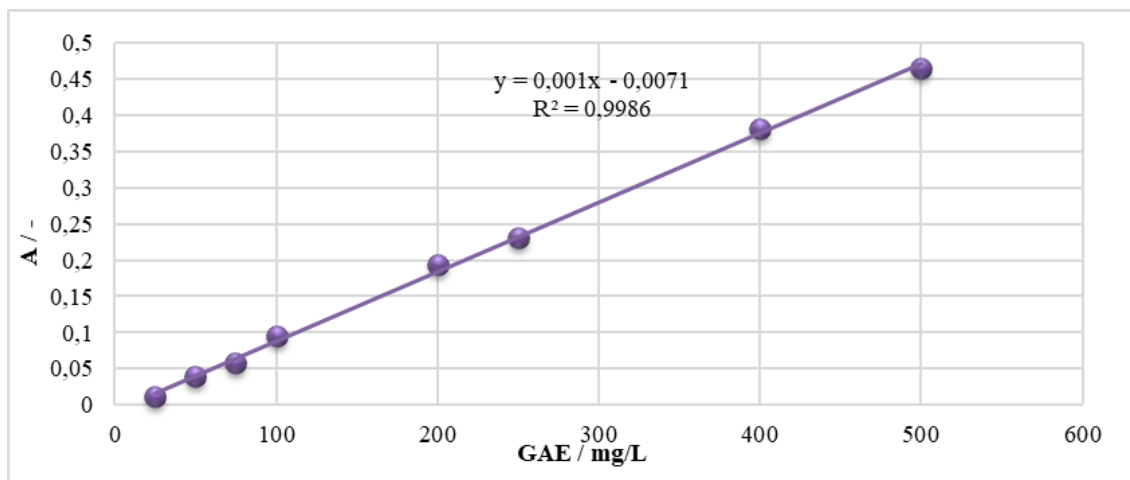
3.2.3.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin - Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri $\lambda = 765$ nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu se otpipetira $V = 7,9$ mL destilirane vode, $V = 100$ μ L uzorka, $V = 500$ μ L Folin-Ciocalteu reagensa i $V = 1,5$ mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na $\lambda = 765$ nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži $V = 100$ μ L destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Sadržaj ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima određen je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500$ mg/L) (slika 7 i 8), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 7. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih polifenola eksperiment 1

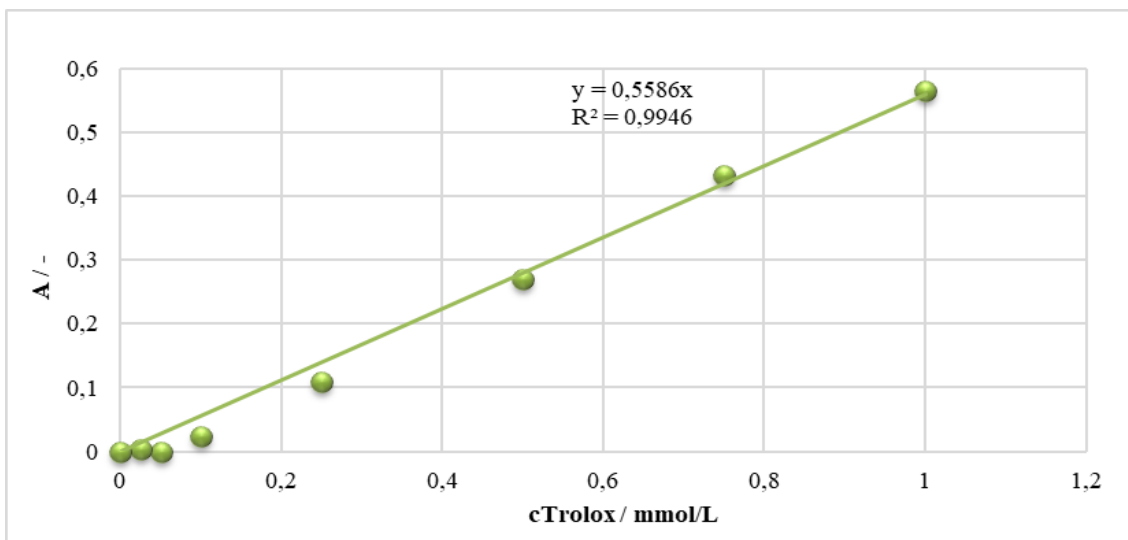


Slika 8. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih polifenola za eksperiment 2

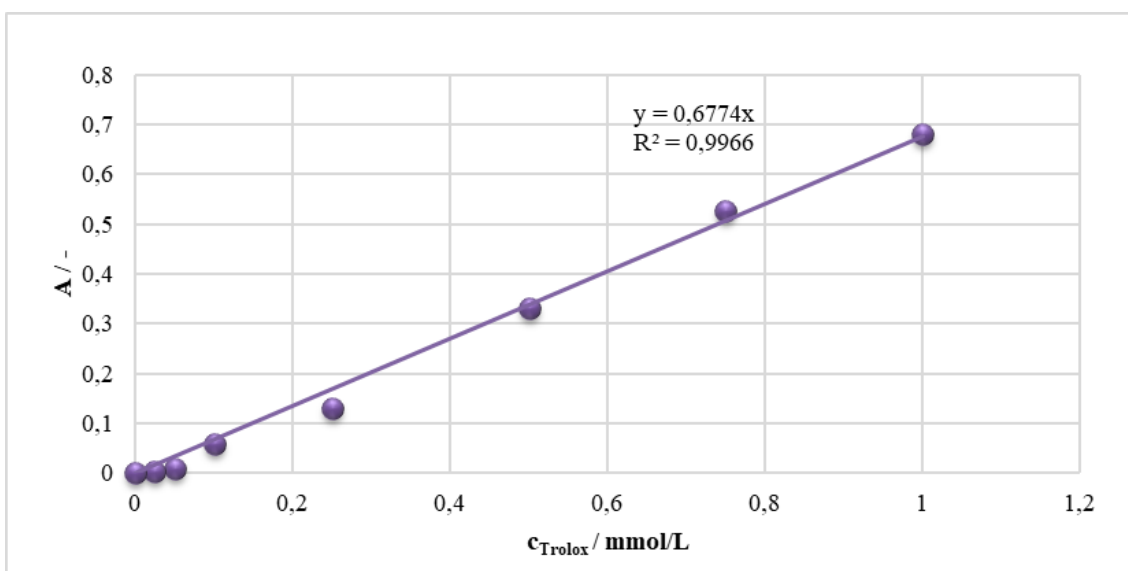
3.2.3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

Pripremi se otopina DPPH radikala u metanolu koncentracije $c = 0,094$ mmol/L. U epruvetu se otpipetira $V = 100$ μ L ispitivanog uzorka te se zatim doda $V = 3,9$ mL pripremljene otopine DPPH radikala u metanolu. Sve zajedno se dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri $\lambda = 515$ nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija Trolox-a ($c_{\text{Trolox}} = 0 - 1$ mmol/L) (slike 9 i 10), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode za eksperiment 1



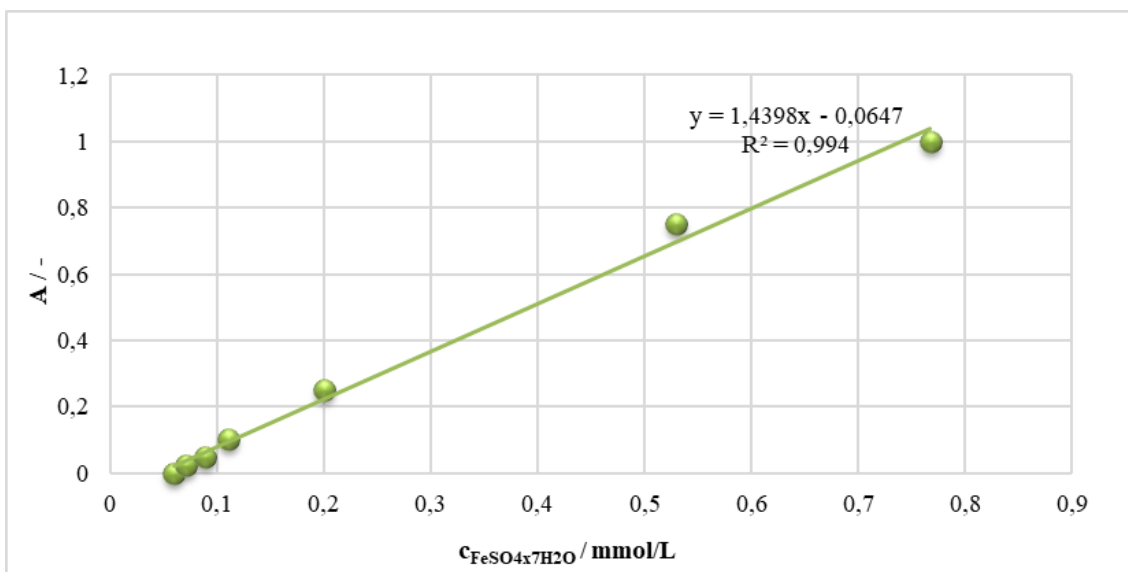
Slika 10. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnost primjenom DPPH metode za eksperiment 2

3.2.3.6. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

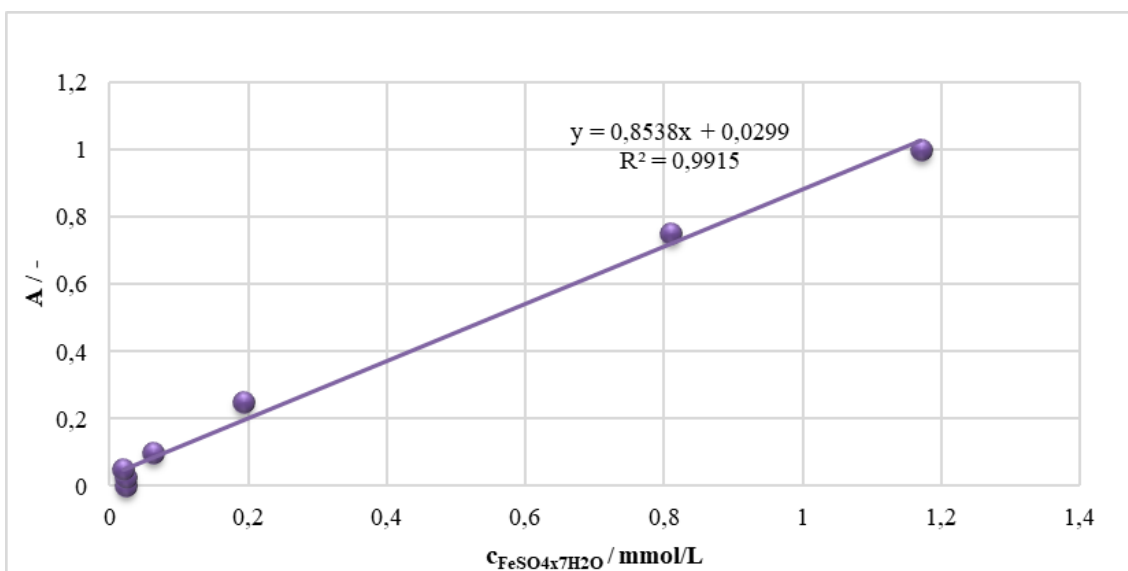
Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri $\lambda = 593$ nm.

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije $c = 300$ mmol/L, otopinu TPTZ-a koncentracije $c = 10$ mmol/L te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata koncentracije $c = 20$ mmol/L. FRAP reagens priprema se miješanjem $V = 25$ mL

acetatnog pufera, $V = 2,5$ mL TPTZ-a i $V = 2,5$ mL željezo(III)-klorida-heksahidrata. U epruvetu se doda $V = 50$ μL ispitivanog uzorka i $V = 950$ μL FRAP reagensa te se izmjeri apsorbancija reakcijske smijese nakon $t = 4$ minute. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaku količinu FRAP reagensa. Iz konstruiranih baždarnih pravaca (slike 11 i 12) ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($C_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0 - 1$ mmol/L), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode za eksperiment 1



Slika 12. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode za eksperiment 2

3.2.4. Statistička analiza i optimiranje

Sva mjerenja u ovome radu provedena su u dvije paralele te je za njih provedena osnovna statistička analiza (srednja vrijednost, standardna devijacija, standardna pogreška) u programskom paketu Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., SAD). Međusobni odnosi ili povezanosti između fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih vodenih ekstrakata izabranih analizirani su na temelju korelacijske matrice u programskom paketu Statistica 13.0.

3.2.4.1. Analiza glavnih komponenata (PCA)

Fizikalna i kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata pokožice komine grožđa analizirana su primjenom metode glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) u programskom paketu XLSTAT privremena licenca (Addinsoft Inc., SAD). Metoda glavnih komponenta je najjednostavnija metoda multivarijatne statistike koju možemo definirati kao alat za pronalaženje sličnosti i različitosti između podataka. Cilj PCA je konstrukcija novog koordinatnog sustava s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glavne uzroke varijacija podataka

3.2.4.2. Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenat

Metoda odzivnih površina (RSM) analizira veze između nekoliko ulaznih varijabli i jedne ili više varijabli odziva. Glavni cilj upotrebe metode RSM je pronalaženje optimalnih uvjeta za postizanje najboljeg mogućeg odziva. Prije primjene RSM metodologije potrebno je odabrati eksperimentalni dizajn koji će definirati koje eksperimente treba izvesti u eksperimentalnom području koje se proučava. Plan eksperimenata za optimizaciju uvjeta ekstrakcije bioaktivnih molekula iz komine grožđa izrađen je pomoću Box-Behnken eksperimentalnog dizajna u programskom paketu Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., SAD). Box-Behnken eksperimentalni dizajn zahtijeva minimalno tri parametra, a u ovome istraživanju ispitan je utjecaj omjera tekuće i krute faze, temperature, vremena ekstrakcije te brzine miješanja na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih komponenti pokožice komine grožđa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su dobiveni rezultati klasične ekstrakcije bioaktivnih komponenti, gdje su se određivala fizikalna svojstva (električna vodljivost, TDS i pH vrijednost) i kemijska svojstva (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnosti izmjerena DPPH i FRAP metodama).

Za određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije korištena je metoda odzivnih površina.

Cilj ovog rada bio je pronaći optimalne uvjete klasične ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz pokožice komine grožđa.

4.1. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA IZ POKOŽICE GROŽĐA

Provedena je ekstrakcija biološki aktivnih molekula iz pokožice komine grožđa.

U tablicama 2 i 3 prikazani su rezultati fizikalnih svojstava vodenih ekstrakta pokožice grožđa za eksperiment 1 i eksperiment 2.

4.1.1. Određivanje fizikalnih svojstava vodenih ekstrakata komine grožđa

Tablica 2. Fizikalna svojstva ekstrakta pokožice grožđa za eksperiment 1. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija

Uzorak	t (min)	T (°C)	S/L (g/L)	rpm (l/min)	pH	TDS (mg/L)	EC (µS/cm)
1.	15	40	20	500	4,16±0,06	188,20±1,90	380,50±0,71
2.	40	40	20	500	4,02±0,03	167,70±0,14	319,50±17,68
3.	15	80	20	500	4,03±0,03	156,8±0,14	311,00±1,41
4.	40	80	20	500	3,95±0,02	257,00±0,00	488,50±21,92
5.	27,5	60	10	250	4,12±0,01	102,70±0,63	214,50±4,95
6.	27,5	60	30	250	3,94±0,00	211,50±0,70	418,50±4,95
7.	27,5	60	10	750	4,13±0,04	97,75±0,49	198,70±0,71
8.	27,5	60	30	750	3,99±0,01	216,00±2,83	442,00±1,41
9.	27,5	60	20	500	4,01±0,01	148,15±1,06	286,50±4,95
10.	15	60	20	250	3,97±0,01	164,45±0,35	330,00±0,00
11.	40	60	20	250	4,04±0,01	152,20±0,28	305,50±0,71
12.	15	60	20	750	4,07±0,04	155,00±0,85	293,50±4,95
13.	40	60	20	750	4,07±0,04	165,75±0,77	304,00±8,49
14.	27,5	40	10	500	4,14±0,01	118,90±0,85	216,20±39,32
15.	27,5	80	10	500	4,00±0,04	194,55±0,91	392,50±0,71
16.	27,5	40	30	500	4,02±0,00	232,50±7,77	485,00±0,00
17.	27,5	80	30	500	4,00±0,01	295,50±0,70	585,50±2,12
18.	27,5	60	20	500	4,02±0,03	140,30±0,42	282,50±0,71
19.	15	60	10	500	4,11±0,01	106,75±0,91	202,50±3,54
20.	40	60	10	500	4,15±0,07	122,95±2,47	204,00±5,66
21.	15	60	30	500	4,05±0,00	173,50±1,41	351,50±0,71
22.	40	60	30	500	3,99±0,01	208,00±0,00	414,00±1,41
23.	27,5	40	20	250	4,00±0,02	202,00±2,82	410,00±0,00
24.	27,5	80	20	250	4,06±0,01	191,85±0,92	391,00±5,66
25.	27,5	40	20	750	4,12±0,03	147,75±4,31	295,50±9,19
26.	27,5	80	20	750	4,08±0,02	250,50±0,71	509,50±4,95
27.	27,5	60	20	500	4,04±0,03	158,75±0,49	319,50±0,71
28.	27,5	60	20	500	3,98±0,02	153,85±0,92	311,00±0,00
29.	27,5	60	20	500	3,98±0,02	151,15±0,92	261,00±9,89
30.	27,5	60	20	500	4,00±0,01	144,75±0,78	292,50±0,71

Tablica 3. Fizikalna svojstva ekstrakta pokožice grožđa za eksperiment 2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

Uzorak	t (min)	T (°C)	S/L(g/L)	rpm(l/min)	pH	TDS (mg/L)	EC (µS/cm)
1.	15	40	20	500	4,04±0,01	370,50±7,78	704,00±8,49
2.	40	40	20	500	4,00±0,01	431,50±0,71	868,00±1,41
3.	15	80	20	500	3,97±0,01	368,50±0,71	756,00±8,49
4.	40	80	20	500	3,98±0,01	397,00±0,00	811,00±2,83
5.	27,5	60	10	250	4,13±0,03	229,00±0,00	456,50±0,71
6.	27,5	60	30	250	3,91±0,01	416,00±15,56	861,50±6,36
7.	27,5	60	10	750	4,02±0,04	238,5±0,71	488,00±9,89
8.	27,5	60	30	750	3,98±0,02	380,5±6,36	7850±2,82
9.	27,5	60	20	500	3,93±0,04	337,50±0,71	664,50±6,36
10.	15	60	20	250	3,99±0,01	350,50±10,61	724,00±2,83
11.	40	60	20	250	3,98±0,04	350,00±0,00	659,50±23,33
12.	15	60	20	750	4,02±0,04	373,50±0,71	757,00±11,31
13.	40	60	20	750	4,03±0,03	289,50±7,78	615,00±14,14
14.	27,5	40	10	500	4,07±0,01	266,00±1,41	538,50±4,95
15.	27,5	80	10	500	4,11±0,02	231,00±0,00	465,50±4,95
16.	27,5	40	30	500	3,97±0,01	429,00±1,41	896,50±2,12
17.	27,5	80	30	500	3,96±0,02	484,00±1,41	971,50±0,71
18.	27,5	60	20	500	4,08±0,02	273,50±6,37	572,50±4,95
19.	15	60	10	500	4,14±0,01	200,00±0,00	365,50±6,36
20.	40	60	10	500	4,11±0,02	195,80±0,35	391,50±0,71
21.	15	60	30	500	4,03±0,01	376,50±0,71	741,00±11,31
22.	40	60	30	500	4,05±0,01	446,00±7,07	504,00±2,83
23.	27,5	40	20	250	3,99±0,01	405,00±5,66	784,50±4,95
24.	27,5	80	20	250	4,00±0,01	386,00±1,41	765,00±5,65
25.	27,5	40	20	750	4,02±0,00	374,50±0,71	755,00±1,41
26.	27,5	80	20	750	4,05±0,01	389,00±1,41	766,00±7,07
27.	27,5	60	20	500	4,06±0,00	398,50±2,12	812,50±7,78
28.	27,5	60	20	500	4,09±0,01	355,50±4,95	734,00±5,66
29.	27,5	60	20	500	3,90±0,01	394,50±0,71	783,00±2,83
30.	27,5	60	20	500	3,98±0,01	374,50±0,71	741,50±12,02

U ovom radu provedene su dvije klasične ekstrakcije kruto – tekuće gdje su se u prvom eksperimentu ekstrahirale biološki aktivne komponente iz samljevene pokožice komine grožđa, dok se u drugom eksperimentu ekstrahiralo iz prethodno osušene i samljevene pokožice komine grožđa. Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za provedbu procesa ekstrakcije, provedeno je 30 eksperimenata pri različitim uvjetima. Provedene su analize fizikalnih svojstava pripremljenih ekstrakata, a rezultati su prikazani u tablicama 2 i 3.

Analizom rezultata koji su prikazani u tablici 2 uočava se da najniža pH vrijednost iznosi 3,94 u uzorku broj 6 ($t = 27,5$ min, $T = 60$ °C, $S/L = 30$ g/L, $rpm = 250$ 1/min), a najviša u uzorku broj 20 ($t = 40$ min, $T = 60$ °C, $S/L = 10$ mg/L, $rpm = 500$ 1/min) i iznosi 4,15. S obzirom na ostale rezultate dobivenih pH vrijednosti možemo zaključiti da se pH vrijednost ekstrakata ne razlikuje previše ovisno o uvjetima provedbe ekstrakcije.

U tablici 3 dobiveni rezultati pokazuju da prethodnim sušenjem pokožice komine grožđa nema značajnog utjecaja na pH vrijednost jer je raspon pH vrijednosti između 3,93 i 4,14 dok je u prethodno dobivenim rezultatima neosušene kože komine grožđa između 3,94 i 4,15. Također, ove vrijednosti odgovaraju rasponu pH komine grožđa koja se često spominje u literaturi (pH 3,4 - 5,8) za ovakvu vrstu ostataka (Bordiga, 2016).

Prema dobivenim rezultatima u tablici 2 najniža vrijednost za TDS (engl. Total dissolved solids) = ukupne otopljene tvari i EC (engl. Electrical conductivity) = električna vodljivost je izmjerena u uzorku broj 7 ($t = 27,5$ min, $T = 60$ °C, $S/L = 10$ g/L, $rpm = 750$ 1/min), a najviša vrijednost u uzorku broj 17 ($t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 30$ g/L, $rpm = 500$ 1/min) što ukazuje na to da povišenjem temperature i ekstrakcijom veće količine uzorka povećava se i ukupna otopljena tvar te električna vodljivost. U tablici 3 najvišu vrijednost pokazuje, također uzorak broj 17 ($t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 30$ g/L, $rpm = 500$ 1/min), a najnižu vrijednost broj 20 ($t = 40$ min, $T = 60$ °C, $S/L = 10$ g/L, $rpm = 500$ 1/min) što ponovno ukazuje na to da pri višim temperaturama i većim količinama uzorka dolazi do povećanja ukupne otopljene tvari te električne vodljivosti. Prema radu Pinela i suradnika (2005) povećanje temperature poticalo je ekstrakciju poboljšavajući topljivost tvari.

U oba slučaja je potvrđena korelacija između TDS-a i električne vodljivosti jer su značajan dio otopljenih tvari ustvari ioni, koji provode električnu struju (Walton, 1989).

Usporedbom eksperimenata 1 i 2, možemo zaključiti da eksperiment 2 u kojem se koristio uzorak osušene i samljevene pokožice pokazuje veće vrijednosti TDS-a i električne vodljivosti jer je takav uzorak komine grožđa izložen većoj dodirnoj površini sa otapalom nego samo samljevena pokožica komine grožđa što upravo vidimo u dobivenim rezultatima.

4.1.2. Određivanje kemijskih svojstava vodenih ekstrakata komine grožđa

U tablicama 4 i 5 prikazani su rezultati kemijskih svojstava vodenih ekstrakta pokožice grožđa za eksperiment 1 i eksperiment 2.

Tablica 4. Kemijska svojstva ekstrakta pokožice komine grožđa za eksperiment 1

Br.	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S/L</i> (g/L)	<i>rpm</i> (l/min)	UF (mg_{GAE}/g_{s.tv.})	<i>DPPH</i> (mmol_{Trolox}/g_{s.tv.})	<i>FRAP</i> (mmol_{FeSO4·7H2O}/g_{s.tv.})
1.	15	40	20	500	4,82±0,0001	0,0002±0,0017	0,0168±0,0018
2.	40	40	20	500	5,23±0,0002	0,0119±0,0007	0,0186±0,0081
3.	15	80	20	500	9,11±0,0005	0,0401±0,0015	0,0412±0,0075
4.	40	80	20	500	9,90±0,0007	0,0447±0,0005	0,0399±0,0199
5.	27,5	60	10	250	7,87±0,0004	0,0210±0,0007	0,0244±0,0241
6.	27,5	60	30	250	3,96±0,0001	0,0125±0,0002	0,0186±0,0059
7.	27,5	60	10	750	8,43±0,0011	0,0182±0,0026	0,0295±0,0018
8.	27,5	60	30	750	5,67±0,0006	0,0114±0,0011	0,0236±0,0004
9.	27,5	60	20	500	5,61±0,0004	0,0162±0,0015	0,0265±0,0018
10.	15	60	20	250	5,29±0,0005	0,0146±0,0005	0,0239±0,0038
11.	40	60	20	250	5,38±0,0006	0,0041±0,0002	0,0262±0,0001
12.	15	60	20	750	4,87±0,0009	0,0030±0,0012	0,0231±0,0002
13.	40	60	20	750	5,75±0,0012	0,0055±0,0008	0,0293±0,0011
14.	27,5	40	10	500	6,84±0,0017	0,0062±0,0013	0,0265±0,0101
15.	27,5	80	10	500	15,33±0,0018	0,0447±0,0007	0,0779±0,0237
16.	27,5	40	30	500	3,55±0,0004	0,0019±0,0006	0,0135±0,0103
17.	27,5	80	30	500	8,68±0,0015	0,0407±0,0183	0,0419±0,0053
18.	27,5	60	20	500	4,54±0,0006	0,0098±0,0000	0,0232±0,0215
19.	15	60	10	500	7,50±0,0018	0,0069±0,0013	0,0319±0,0055
20.	40	60	10	500	9,92±0,0015	0,0152±0,0017	0,0459±0,0068
21.	15	60	30	500	5,05±0,0005	0,0064±0,0006	0,0173±0,0021
22.	40	60	30	500	5,57±0,0007	0,0133±0,0043	0,0245±0,0074
23.	27,5	40	20	250	4,63±0,0001	0,0037±0,0003	0,0174±0,0006
24.	27,5	80	20	250	8,27±0,0018	0,0229±0,0023	0,0420±0,0056
25.	27,5	40	20	750	5,52±0,0002	0,0067±0,0056	0,0167±0,0003
26.	27,5	80	20	750	11,07±0,0012	0,0427±0,0025	0,0534±0,0076
27.	27,5	60	20	500	6,92±0,0002	0,0124±0,0008	0,0291±0,0026
28.	27,5	60	20	500	5,71±0,0004	0,0138±0,0005	0,0310±0,0003
29.	27,5	60	20	500	5,85±0,0005	0,0151±0,0051	0,0300±0,0006
30.	27,5	60	20	500	6,17±0,0009	0,0002±0,0017	0,0245±0,0004

Tablica 5. Kemijska svojstva ekstrakta pokožice komine grožđa za eksperiment 2

Uzorak	t (min)	T (°C)	S/L (g/L)	rpm (l/min)	UF (mg_{GAE}/g_{s.tv.})	DPPH (mmol_{Trolox}/g_{s.tv.})	FRAP (mmol_{FeSO4·7H2O}/g_{s.tv.})
1.	15	40	20	500	7,27±0,1754	0,0158±0,0006	0,0349±0,0022
2.	40	40	20	500	5,84±0,0877	0,0124±0,0001	0,0276±0,0025
3.	15	80	20	500	14,71±0,2631	0,0548±0,0006	0,0985±0,0021
4.	40	80	20	500	15,70±0,5262	0,0497±0,0014	0,1032±0,0022
5.	27,5	60	10	250	10,57±0,7600	0,0326±0,0016	0,0442±0,0193
6.	27,5	60	30	250	7,41±0,3508	0,0236±0,0004	0,0470±0,0029
7.	27,5	60	10	750	13,17±0,0000	0,0395±0,0016	0,0739±0,0082
8.	27,5	60	30	750	7,28±0,2631	0,0212±0,0001	0,0398±0,0041
9.	27,5	60	20	500	8,51±0,0877	0,0229±0,0025	0,0421±0,0030
10.	15	60	20	250	10,49±0,0000	0,0330±0,0025	0,0629±0,0023
11.	40	60	20	250	11,17±0,0000	0,0363±0,0003	0,0624±0,0077
12.	15	60	20	750	7,95±0,0000	0,0178±0,0008	0,0360±0,0015
13.	40	60	20	750	9,62±0,0000	0,0269±0,0005	0,0415±0,0157
14.	27,5	40	10	500	8,09±0,0000	0,0185±0,0013	0,0015±0,0355
15.	27,5	80	10	500	16,27±0,0000	0,0556±0,0000	0,0647±0,0392
16.	27,5	40	30	500	5,30±0,0000	0,0124±0,0007	0,0167±0,0105
17.	27,5	80	30	500	14,23±0,0000	0,0431±0,0003	0,0744±0,0083
18.	27,5	60	20	500	8,38±0,0000	0,0227±0,0003	0,0308±0,0281
19.	15	60	10	500	11,56±0,0000	0,0298±0,0039	0,0453±0,0029
20.	40	60	10	500	8,71±0,0000	0,0289±0,0016	0,0589±0,0310
21.	15	60	30	500	6,79±0,4092	0,0201±0,0008	0,0392±0,0017
22.	40	60	30	500	7,49±0,0000	0,0198±0,0004	0,0401±0,0073
23.	27,5	40	20	250	5,84±0,3508	0,0172±0,0010	0,0294±0,0050
24.	27,5	80	20	250	17,13±0,0877	0,0611±0,0110	0,1256±0,0028
25.	27,5	40	20	750	5,04±0,5262	0,0140±0,0001	0,0266±0,0068
26.	27,5	80	20	750	14,15±0,5262	0,0399±0,0003	0,0828±0,0029
27.	27,5	60	20	500	8,32±0,0000	0,0233±0,0005	0,0421±0,0000
28.	27,5	60	20	500	7,45±0,0877	0,0180±0,0009	0,0387±0,0052
29.	27,5	60	20	500	8,51±0,6139	0,0274±0,0012	0,0496±0,0020
30.	27,5	60	20	500	9,62±0,0000	0,0248±0,0009	0,0546±0,0029

Također pri različitim uvjetima temperature, brzine miješanja, vremena ekstrakcije te omjerima kruto/tekuće ispitivani su i kemijski parametri: ukupna količina polifenola te antioksidacijska aktivnost prema DPPH metodi i FRAP metodi ekstrakata pokožice komine grožđa.

U tablici 4 možemo uočiti najveći količinu polifenola u uzorku broj 15 ($t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 10$ g/L, $rpm = 500$ l/min) i iznosi $15,33$ mg_{GAE}/g_{s.tv.}, a najnižu vrijednost uzorak broj 16 ($t = 27,5$ min, $T = 40$ °C, $S/L = 30$ g/L, $rpm = 500$ l/min) i iznosi $3,55$ mg_{GAE}/g_{s.tv.} gotovo 5 puta manja vrijednost nego u uzorku broj 15. Mnogi autori se slažu da povećanje radne temperature povoljno utječe na učinkovitost ekstrakcije, poboljšavajući i topljivost tvari. Zanimljivo je primijetiti iako je u uzorku broj 16 omjer kruto – tekuće iznosio 30 g/L količina polifenola je viša u uzorku broj 15 gdje je $S/L = 10$ g/L što možemo pripisati mogućoj pogrešci tijekom izvođenja eksperimenta gdje se uzorak zadržavao na stjenkama čaše u kojoj se provodila ekstrakcija. Također, važno je istaknuti temperaturu koja je značajno utjecala na dobivene rezultate, dok su parametri brzina miješanja i duljina trajanja ekstrakcije potpuno jednaki.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakta biljke ovisi o vrsti i polaritetu otapala, postupcima izolacije, čistoći aktivnih spojeva, kao i o testnom sustavu koji se koristi za procjenu aktivnosti (Meyer i sur., 1998).

Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti najveće vrijednosti za DPPH i FRAP su izmjereno upravo kod uzorka broj 15 DPPH = $0,0447$ mmol_{Trolox}/g_{s.tv.} i FRAP = $0,0779$ mmol_{FeSO₄·7H₂O}/g_{s.tv.}, dok najniže vrijednosti za DPPH vidimo u uzorku broj 1 te iznose DPPH = $0,0002$ mmol_{Trolox}/g_{s.tv.}, a za FRAP u uzorku broj 16 FRAP = $0,0135$ mmol_{FeSO₄·7H₂O}/g_{s.tv.} Vidljiva su mala odstupanja kod DPPH, međutim ako pogledamo eksperiment broj 1 i broj 16 vidimo da su parametri temperatura i omjer kruto - tekuće u oba slučaja jednaki što potvrđuje da se efikasnost ekstrakcije povećava povišenjem temperature, dok drugi parametri nisu toliko značajni.

U tablici 5 primjećujemo sličan trend gdje je najveća vrijednost ukupnih polifenola izmjerena u uzorku 24 ($t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 20$ g/L, $rpm = 250$ l/min) te iznosi $17,13$ mg_{GAE}/g_{s.tv.}, a najniža vrijednost u eksperimentu 25 ($t = 27,5$ min, $T = 40$ °C, $S/L = 20$ g/L, $rpm = 750$ l/min) i iznosi $5,04$ mg_{GAE}/g_{s.tv.} Najveće vrijednosti DPPH i FRAP su izmjerene u uzorku 24 te iznose DPPH = $0,0611$ mmol_{Trolox}/g_{s.tv.} i FRAP = $0,1256$ mmol_{FeSO₄·7H₂O}/g_{s.tv.}, a najniže vrijednosti su zabilježene kod uzorka 1 ($t = 15$ min, $T = 40$ °C, $S/L = 20$ g/L, $rpm = 500$ l/min) za DPPH i uzorka 25 ($t = 27,5$ min, $T = 40$ °C, $S/L = 20$ g/L, $rpm = 750$ l/min) za FRAP. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je povećanje temperature pogodovalo ekstrakciji,

dok je brzina miješanja negativno utjecala na efikasnost ekstrakcije ponovno zbog mogućeg zadržavanja uzorka na stjenkama čaše, ali i postoji mogućnost da pri brzini vrtnje od 750 l/min dolazi do izbacivanja uzorka iz otopine te posljedično i smanjenom količinom uzorka koja se ekstrahira.

Esmaeili i suradnici (2021) proveli su istraživanje o utjecaju različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz ekstrakta korijena čička. Najveća količina fenolnih spojeva izmjerena je u ekstraktu otapala voda-etanola (50 : 50, v/v), što je iznosilo 17,22 mg_{GAE}/g_{s.tv.}. Količina fenolnih spojeva izmjerena je u vodenom ekstraktu s razinom od 16,38 mg_{GAE}/g_{s.tv.}, iako niža od otapala vode-etanola, no ta razlika statistički nije značajna ($p < 0,05$). Slične vrijednosti su dobivene i u ovom eksperimentu te možemo zaključiti da priroda fenolnih spojeva u biljci određuje učinkovitost otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva. Upotreba vode kao otapala za ekstrakciju stvara izrazito polarno okruženje koje je prikladno za ekstrakciju visoko polarizirajućih biološki aktivnih spojeva. Dok je otapalo vode-etanola prikladno za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva s raznovrsnom polarizacijom, to je zbog relativno polarnog okoliša koji se stvara dodatkom organskih otapala u vodu (Ghasemzadeh i sur., 2015).

Prema istraživanju Valinger i suradnici (2022) koji su proveli ekstrakciju polifenola iz lista masline, dobili su najviše koncentracije polifenola u uzorku ekstrahiranom pri 80 °C, a najniža vrijednost pri 40 °C, dok su ostali parametri brzina miješanja i vrijeme ekstrakcije ostali jednaki. Također, dobili su i najvišu antioksidacijsku aktivnost metodama DPPH i FRAP u jednakim uzorcima kao i kod polifenola. Navedeni rezultati studije odgovaraju dobivenim rezultatima ovog rada.

Usporedbom kemijskih svojstava eksperimenta 1 i eksperimenta 2 primjećuje se da su nešto više vrijednosti dobivene u eksperimentu 2 gdje se koristio osušeni i samljeveni uzorak što je doprinijelo većoj kontaktnoj površini sa samim otapalom, nego kod samo samljevenog uzorka u eksperimentu 1 te je rezultiralo boljoj ekstrakciji.

Vrijeme i temperatura ekstrakcije su važni parametri koji se trebaju optimizirati kako bi se smanjili energetske troškovi procesa i postigli visoki postoci povrata spojeva. Mnogi autori se slažu da povećanje radne temperature povoljno utječe na učinkovitost ekstrakcije, poboljšavajući i topljivost tvari. Bez obzira na pozitivne učinke visokih temperatura na povrate ekstrakcije, ovaj faktor se ne može neograničeno povećavati jer pri temperaturama >50 °C stabilnost fenola opada i može doći do denaturacije membrana. Neka istraživanja su izvijestila da temperature od 60 °C povećavaju ekstrakciju fenola iz grožđa (Fontana i sur., 2013). Također, prema Pinelo i suradnicima (2006) vrijeme kontakta nije toliko značajno kada se voda koristi kao otapalo.

4.1.3. Korelacijske matrice i PCA analiza

Radi lakšeg razmatranja povezanosti fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata pokožice komine izračunata je korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika. U tablicama 6 i 7 prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije između temperature, omjera kruto - tekuće, duljine ekstrakcije, brzini miješanja, pH, TDS, električne vodljivosti, koncentracije ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom te antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom.

U tablici 6 prikazane su korelacijske matrice fizikalno-kemijske karakteristike ekstrakta pokožice komine za eksperiment 1 i možemo uočiti da su ukupni polifenoli pozitivno korelirani sa svim karakteristikama osim sa omjerom kruto – tekuće, a istu situaciju vidimo i kod antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama gdje su svi parametri pozitivno korelirani izuzev omjera kruto – tekuće i pH vrijednosti. Također, zanimljivo je primijetiti da pH vrijednost jedino pozitivno korelira sa ukupnim polifenolima, a sa ostalim parametrima negativno korelira, dok je TDS pozitivno korelirao sa svim parametrima osim s pH vrijednosti. Bitno je istaknuti kako temperatura i duljina ekstrakcije pozitivno koreliraju sa svim kemijskim karakteristikama i fizikalnim karakteristikama osim s pH vrijednosti, a omjer kruto – tekuće negativno korelira sa svim parametrima osim s TDS i električnom vodljivošću. U tablici svi statistički signifikantni koeficijenti korelacije su podebljani.

Tablica 6. Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata pokožice komine grožđa pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 1

Varijable	t (min)	T (°C)	S/L (g/L)	rpm (1/min)	pH	TDS (mg/L)	G (μS/cm)	UF	FRAP	DPPH
t (min)	1	0,000	0,000	0,000	-0,138	0,147	0,091	0,110	0,122	0,095
T (°C)	0,000	1	0,000	0,000	-0,166	0,331	0,313	0,681	0,754	0,824
S/L (g/L)	0,000	0,000	1	0,000	-0,391	0,678	0,694	-0,502	-0,391	-0,105
rpm (1/min)	0,000	0,000	0,000	1	0,163	0,009	-0,014	0,127	0,094	0,035
pH	-0,138	-0,166	-0,390	0,163	1	-0,384	-0,367	0,103	-0,005	-0,199
TDS (mg/L)	0,147	0,331	0,678	0,009	-0,384	1	0,989	0,116	0,196	0,439
G (μS/cm)	0,091	0,313	0,694	-0,014	-0,367	0,989	1	0,094	0,166	0,417
UF	0,110	0,681	-0,502	0,127	0,103	0,116	0,094	1	0,946	0,820
FRAP	0,122	0,754	-0,391	0,094	-0,005	0,196	0,166	0,946	1	0,799
DPPH	0,095	0,824	-0,105	0,035	-0,199	0,439	0,417	0,820	0,799	1

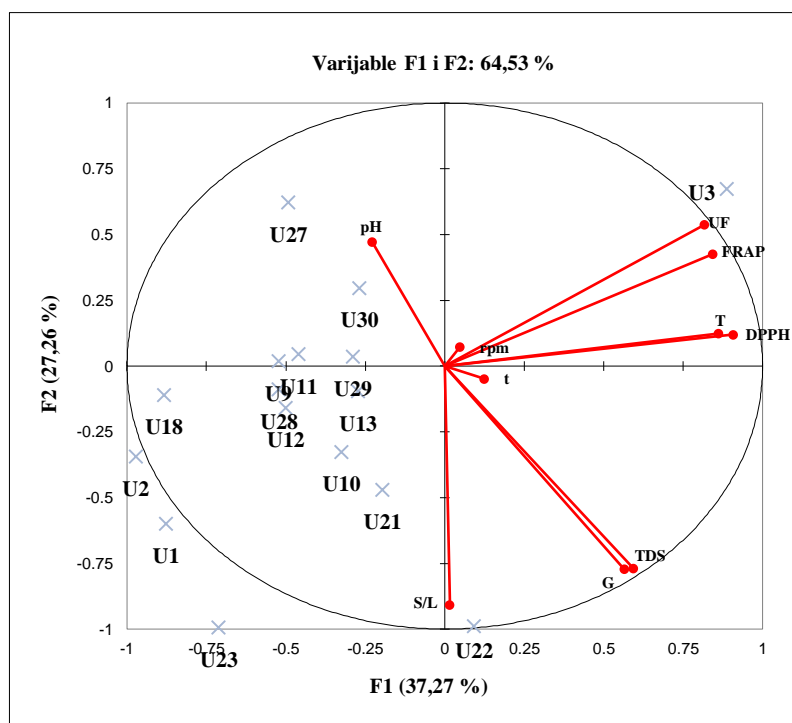
U tablici 7 prikazana je korelacijska matrica fizikalno – kemijskih karakteristika ekstrakta osušene pokožice komine grožđa eksperimenta 2 i uočavamo da duljina ekstrakcije pozitivno korelira sa antioksidacijskom aktivnosti izmjerenom metodom DPPH i FRAP, te sa TDS i pH vrijednosti dok sa električnom vodljivošću i ukupnim polifenolima negativno korelira. Pozitivna korelacija se primjećuje kod temperature i kemijskih karakteristika (UF, DPPH i FRAP), dok su negativne korelacije vidljive kod fizikalnih karakteristika. Brzina miješanja (rpm) negativno je korelirana sa svim parametrima osim s pH vrijednosti. Kemijske karakteristike (ukupno polifenoli i antioksidacijska aktivnost mjerena metodama FRAP i DPPH) su međusobno pozitivno korelirane i pozitivno su korelirane s temperaturom.

Tablica 7. Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata pokožice komine grožđa pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 2

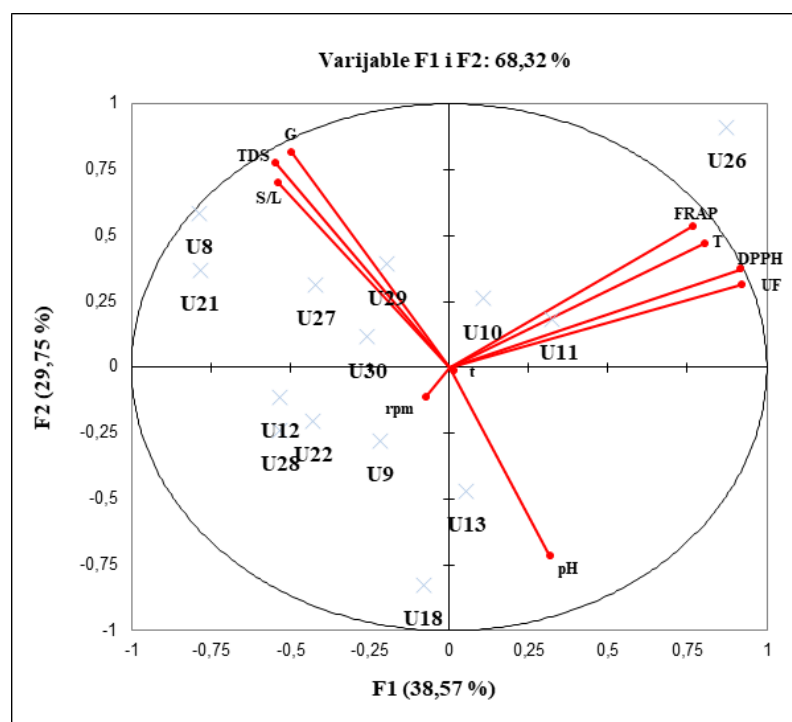
Varijable	t (min)	T (°C)	S/L (g/L)	rpm (1/min)	pH	TDS (mg/L)	G (μS/cm)	UF	FRAP	DPPH
t (min)	1	0,000	0,000	0,000	0,056	0,049	-0,069	-0,004	0,034	0,010
T (°C)	0,000	1	0,000	0,000	-0,012	-0,093	-0,056	0,861	0,839	0,858
S/L (g/L)	0,000	0,000	1	0,000	-0,641	0,832	0,713	-0,312	-0,063	-0,259
rpm (1/min)	0,000	0,000	0,000	1	0,100	-0,065	-0,029	-0,085	-0,145	-0,178
pH	0,056	-0,012	-0,641	0,100	1	-0,709	-0,750	0,051	-0,138	0,002
TDS (mg/L)	0,049	-0,093	0,832	-0,065	-0,709	1	0,882	-0,259	0,007	-0,223
G (μS/cm)	-0,069	-0,056	0,713	-0,029	-0,750	0,882	1	-0,188	0,051	-0,149
UF	-0,004	0,861	-0,312	-0,085	0,051	-0,259	-0,188	1	0,873	0,970
FRAP	0,034	0,839	-0,063	-0,145	-0,138	0,007	0,051	0,873	1	0,905
DPPH	0,010	0,858	-0,259	-0,178	0,002	-0,223	-0,149	0,970	0,905	1

Da bismo dobili uvid u grupiranje i identificirali potencijalne podatke koji odstupaju primijenjena je analiza glavnih komponentata (PCA). Analiza glavnih komponentata primjenjuje mali broj nezavisnih linearnih kombinacija promatranog seta varijabli kako bi ostalo sačuvano čim više informacija (Bursać Kovačević i sur., 2016).

Uzorci vodenih ekstrakata pokožice komine grožđa (iz eksperimenta 1 i 2) su grupirani korištenjem PCA analize, pri čemu svaka komponenta modela sadrži dvije karakteristike: opterećenja, koja opisuju strukturu podataka u kontekstu korelacija između varijabli, te rezultate, koji prikazuju razlike ili sličnosti među podacima. Rezultati analize osnovnih komponentata uzoraka ekstrakata pokožice komine grožđa, pripremljenih klasičnim ekstrakcijskim postupkom koji uključuje temperaturu ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer krute i tekuće faze, brzinu miješanja, ukupnu ekstrahiranu količinu polifenola te antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH i FRAP metodom, također su obuhvaćeni analizom, prikazani su na slikama 13 i 14. Na slici 13 iz rezultata je vidljivo da prva dva faktora objašnjavaju 64,53 % varijance, a na slici 14 vidimo da prva dva faktora objašnjavaju 68,32 %. Varijable F1 i F2 predstavljaju dobivene faktore analizom glavnih komponentata koji objašnjavaju korelaciju između varijabli, a U1 – U30 su uzorci dobiveni klasičnom ekstrakcijom. Također, može se primijetiti da su uzorci vodenih ekstrakata raspoređeni u sva četiri kvadranta prema fizikalnim i kemijskim svojstvima, bez značajnog oblikovanja profila. PCA analiza daje uvid u korelacije između fizikalnih i kemijskih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata na jasan način.



Slika 13. Analiza osnovnih komponenata i promatranih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 1



Slika 14. Analiza osnovnih komponenata i promatranih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 2

4.1.4. Analiza metode odzivnih površina ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata pokožice komine dobivenih konvencionalnim postupkom ekstrakcije.

U slučaju klasičnog postupka ekstrakcije analiziran je utjecaj četiri procesne varijable (temperatura, vrijeme, brzina miješanja i omjer krute i tekuće faze) na tri razine. Eksperimentalno izmjerene podatke (ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodama) za 30 eksperimenata nalaze se u tablicama 2, 3, 4 i 5. Na eksperiment su primijenjene polinomne jednadžbe drugog reda kako bi se prilagodili modelnim podacima, osim kod pH vrijednosti gdje je jednadžba prvog reda.

Tablica 8. RSM modeli za opis ekstrakcije ukupnog fenolnog sadržaja (UF) i antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) te izmjerenih pH vrijednosti, ukupnih otopljenih tvar (TDS) i električne vodljivosti (EC) iz pokožice komine grožđa pomoću postupaka klasične ekstrakcije (CE) za eksperiment 1. Statistički značajni koeficijenti označeni su podebljanim slovima.

Varijabla	Jednadžba modela	R ²	F-vrijednost	p-vrijednost
Eksperiment 1				
pH	$Y = 4,062 - \mathbf{0,069107143} \cdot X_3$	0,1736	5,4624	0,0274
TDS	$Y = 153,597 + 10,740143 \cdot X_1 + \mathbf{30,1325} \cdot X_2 + \mathbf{52,07031851} \cdot X_3 + 1,583747941 \cdot X_4 - 4,293302471 \cdot X_1^2 - \mathbf{46,78432249} \cdot X_2^2 - 3,901344728 \cdot X_3^2 - 4,46401771 \cdot X_4^2 + \mathbf{36,195} \cdot X_1X_2 + 5,49 \cdot X_1X_3 + 9,071268534 \cdot X_1X_4 - 3,1625 \cdot X_2X_3 + \mathbf{28,225} \cdot X_2X_4 + 2,35 \cdot X_3X_4$	0,9555	19,9534	<0,0001
EC	$Y = 297,7518524 + 8,730450082 \cdot X_1 + \mathbf{59,53333333} \cdot X_2 + \mathbf{111,4157414} \cdot X_3 - 0,805730368 \cdot X_4 - 20,48207644 \cdot X_1^2 - \mathbf{98,47220895} \cdot X_2^2 - 11,96109692 \cdot X_3^2 - 15,83744783 \cdot X_4^2 + \mathbf{71,55} \cdot X_1X_2 + 18,3 \cdot X_1X_3 + 13,77657331 \cdot X_1X_4 - 18,95 \cdot X_2X_3 + \mathbf{58,25} \cdot X_2X_4 + 9,825 \cdot X_3X_4$	0,9609	22,8023	<0,0001
UF	$Y = 5.682589974 + 0.58990382 \cdot X_1 + \mathbf{2.663843709} \cdot X_2 - \mathbf{2.171969743} \cdot X_3 + 0.540717003 \cdot X_4 + 0.145083977 \cdot X_1^2 + \mathbf{1.764863024} \cdot X_2^2 + 1.382075865 \cdot X_3^2 - 0.302639674 \cdot X_4^2 + 0.111867452 \cdot X_1X_2 - 0.568659549 \cdot X_1X_3 + 0.155929468 \cdot X_1X_4 - 0.839005893 \cdot X_2X_3 + 0.477767244 \cdot X_2X_4 + 0.287437204 \cdot X_3X_4$	0,8976	8,1422	0,0003
DPPH	$Y = 0.027255001 + 0.00203959 \cdot X_1 + \mathbf{0.015408048} \cdot X_2 - 0.008230263 \cdot X_3 + 0.001973121 \cdot X_4 - 0.001484707 \cdot X_1^2 + \mathbf{0.007020824} \cdot X_2^2 + 0.002974033 \cdot X_3^2 - 0.002114816 \cdot X_4^2 - 0.000924589 \cdot X_1X_2 - 0.002030469 \cdot X_1X_3 + 0.002603256 \cdot X_1X_4 - 0.005763571 \cdot X_2X_3 + 0.003002647 \cdot X_2X_4 + 0 \cdot X_3X_4$	0,9469	16,5684	< 0.0001
FRAP	$Y = 0.013643041 + 0.001831388 \cdot X_1 + \mathbf{0.016744929} \cdot X_2 - \mathbf{0.002678002} \cdot X_3 + 0.001617904 \cdot X_4 - 0.003834969 \cdot X_1^2 + \mathbf{0.010176619} \cdot X_2^2 + \mathbf{0.002330391} \cdot X_3^2 - 0.003271254 \cdot X_4^2 - 0.002120996 \cdot X_1X_2 - 0.000404599 \cdot X_1X_3 + 0.001664541 \cdot X_1X_4 + 4.81665E-05 \cdot X_2X_3 + 0.004166405 \cdot X_2X_4 + 0.000428342 \cdot X_3X_4$	0,8937	7,8000	0,0003

Tablica 9. RSM modeli za opis ekstrakcije ukupnog fenolnog sadržaja (UF) i antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) te izmjerenih pH vrijednosti, ukupnih otopljenih tvar (TDS) i električne vodljivosti (EC) iz pokožice komine grožđa pomoću postupaka klasične ekstrakcije za eksperiment 2.

Statistički značajni koeficijenti označeni su podebljanim slovima.

Varijabla	Jednadžba modela	R ²	F - vrijednost	p - vrijednost
Eksperiment 2				
pH	$Y = 4,02769601 + 0,002176063 \cdot X_1 - 0,00125 \cdot X_2 - \mathbf{0,065593038} \cdot X_3 + 0,006396719 \cdot X_4$	0,4417	4,5495	0,0075
TDS	$Y = 349,6257262 + 9,269546952 \cdot X_1 - 12,54166667 \cdot X_2 + \mathbf{95,40173668} \cdot X_3 - 10,90797639 \cdot X_4 - 0,919571664 \cdot X_1^2 + \mathbf{41,49660214} \cdot X_2^2 - \mathbf{29,57475288} \cdot X_3^2 - 5,442236409 \cdot X_4^2 - 9,75 \cdot X_1X_2 + 22,125 \cdot X_1X_3 - 32,70321252 \cdot X_1X_4 - 5 \cdot X_2X_3 + 8,375 \cdot X_2X_4 - 11,25 \cdot X_3X_4$	0,8241	8,5362	0,0002
EC	$Y = 725,0762968 - 49,92414168 \cdot X_1 - 18,90833333 \cdot X_2 + \mathbf{161,7332098} \cdot X_3 - 9,918767161 \cdot X_4 - 99,57852059 \cdot X_1^2 + \mathbf{88,4464374} \cdot X_2^2 - \mathbf{119,1908773} \cdot X_3^2 + 1,48556425 \cdot X_4^2 - 32,7 \cdot X_1X_2 - 78,9 \cdot X_1 \cdot X_3 - 32,60609555 \cdot X_1X_4 - 0,5 \cdot X_2X_3 + 7,625 \cdot X_2X_4 - 27 \cdot X_3X_4$	0,9469	16,5601	< 0,0001
UF	$Y = 8.640210533 + 0.071061262 \cdot X_1 + \mathbf{4.688911901} \cdot X_2 - 1.396128129 \cdot X_3 - 0.398478882 \cdot X_4 + 0.268082671 \cdot X_1^2 + \mathbf{1.845448297} \cdot X_2^2 + 0.136423431 \cdot X_3^2 + 0.622975942 \cdot X_4^2 + 0.725504993 \cdot X_1 X_2 + 1.066554349 \cdot X_1 X_3 + 0.284332087 \cdot X_1 X_4 + 0.186026921 \cdot X_2 X_3 - 0.542578521 \cdot X_2 X_4 - 0.682098712 \cdot X_3 X_4$	0,9043	8,7757	0,0002
DPPH	$Y = 0.041974256 + 0.0070225 \cdot X_1 + \mathbf{0.034975572} \cdot X_2 - \mathbf{0.005199578} \cdot X_3 - \mathbf{0.005203387} \cdot X_4 + 0.012185775 \cdot X_1^2 + \mathbf{0.011492041} \cdot X_2^2 - 0.003053514 \cdot X_3^2 + 0.008172614 \cdot X_4^2 + 0.003616827 \cdot X_1X_2 - 0.003762081 \cdot X_1 X_3 - 0.002011207 \cdot X_1 X_4 - 0.001355705 \cdot X_2 X_3 - 0.009986219 \cdot X_2 X_4 - 0.00923574 \cdot X_3 X_4$	0,9455	16,1230	< 0,0001
FRAP	$Y = 0.0236528 + 0.000865536 \cdot X_1 + \mathbf{0.017747508} \cdot X_2 - \mathbf{0.005270896} \cdot X_3 - 0.003371802 \cdot X_4 + 0.001498945 \cdot X_1^2 + 0.00747089 \cdot X_2^2 + \mathbf{0.001170276} \cdot X_3^2 + 0.003390085 \cdot X_4^2 - 0.000494314 \cdot X_1 X_2 + 0.000201387 \cdot X_1 X_3 + 0.001465449 \cdot X_1 X_4 - \mathbf{0.001617201} \cdot X_2 X_3 - 0.004485444 \cdot X_2 X_4 - 0.002349518 \cdot X_3 X_4$	0,9584	21,3800	< 0,0001

Modeli dobiveni metodom odzivnih površina (RSM) za pH vrijednost su linearni, a za sve ostale parametre dobiveni su kvadratni modeli jer je za pH vrijednost bitna samo X_3 varijabla. Koeficijente regresije (R^2) je u rasponu od 0,837 do 0,9609 (tablica 8), a za pH vrijednost taj model nije adekvatan i iznosi 0,1736.

U tablici 8 R^2 za ukupne otopljene tvari i električnu vodljivost iznosio je 0,9555 i 0,9609, što znači da model odlično opisuje eksperimentalne podatke. Što se tiče ukupnih polifenola, dobivena je vrijednost od 0,8976, a što se tiče antioksidacijske aktivnosti, RSM temeljeni modeli omogućili su osiguranje visoke korelacije modela i eksperimentalnih podataka antioksidacijske aktivnosti za DPPH te koeficijent iznosi 0,9469, kao i sposobnost redukcije na temelju FRAP-a, prikazujući koeficijent $R^2 = 0,8937$.

Također, i prema F - vrijednosti i prema p - vrijednosti ($p < 0,05$) svi modeli su signifikantni.

U tablici 9 možemo primijetiti slične rezultate kao i u tablici 8. Ponovno je pH vrijednost opisana linearnim modelom dok su svi ostali parametri opisani kvadratnim modelom.

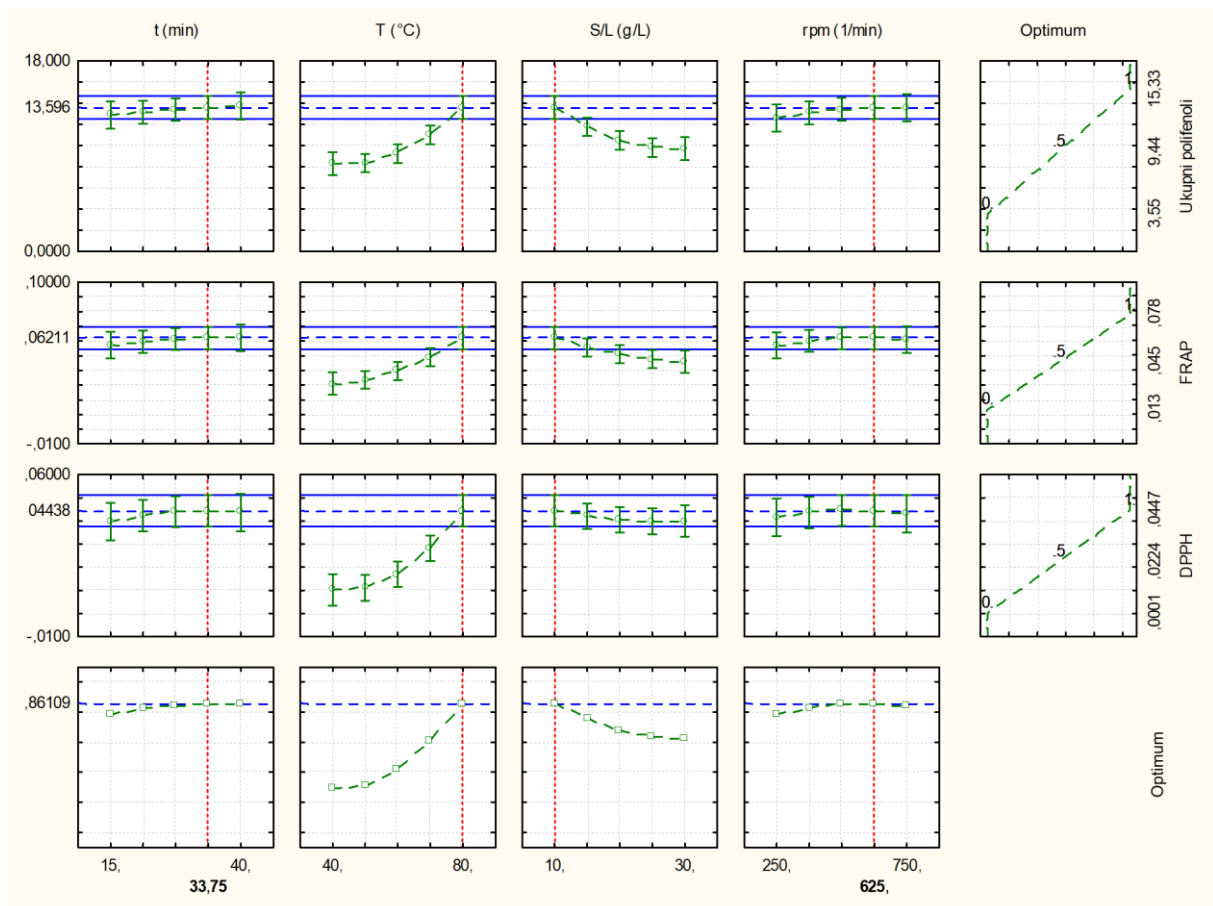
Koeficijent determinacije (R^2) se nalazi u intervalu 0,8241 - 0,9584.

Usporedbom rezultata koji su prikazani u tablicama 8 i 9 uočava se da isti parametri pokazuju da se model može primijeniti i da oba eksperimenta podržavaju pouzdanost postupka optimizacije. Nešto viši koeficijenti determinacije su zapaženi u tablici 9 gdje su opisani rezultati za eksperiment 2 F - vrijednosti i p - vrijednost pokazuju da su svi modeli signifikantni. Prema Le Man i suradnicima (2010) model se može smatrati primjenjivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između eksperimentalnih vrijednosti i modelom previđenih vrijednosti prelazi 0,75.

Kao što je navedeno u radu Teng i suradnici (2011), veći koeficijenti regresije i manje p - vrijednosti za svaku komponentu u modelu impliciraju značajniji utjecaj proučavane varijable. Dobivene vrijednosti pokazuju da su predloženi modeli pouzdani unutar raspona analiziranih varijabli.

4.1.5. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije

Da bismo definirali najbolje procesne uvjete za izvođenje ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa putem klasične ekstrakcije, primijenjena je metoda odzivnih površina. Ispitan je utjecaj četiri varijable (temperatura, vrijeme, omjer čvrste - tekuće faze i brzina miješanja) na tri razine (temperatura ekstrakcije $T = 40, 60$ i 80 °C, vrijeme ekstrakcije $t = 15, 27,5$ i 40 minuta, omjer čvrste - tekuće faze $S/L = 10, 20, 30$ g/L i brzina miješanja $rpm = 250, 500$ i 750 1/min) u pogledu koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti, koja je određena istovremeno DPPH i FRAP metodom. Metoda se temelji na određivanju minimuma odzivne površine koji predstavlja optimalne procesne uvjete. Slike 15 i 16 prikazuju optimalne uvjete za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 1 i za eksperiment 2.



Slika 15. Optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 1

Na slici 15 prikazani su dvodimenzionalni prikazi zavisnosti izlaznih varijabli i procesnim uvjetima te procijenjeni optimalni procesni uvjeti za eksperiment 1.

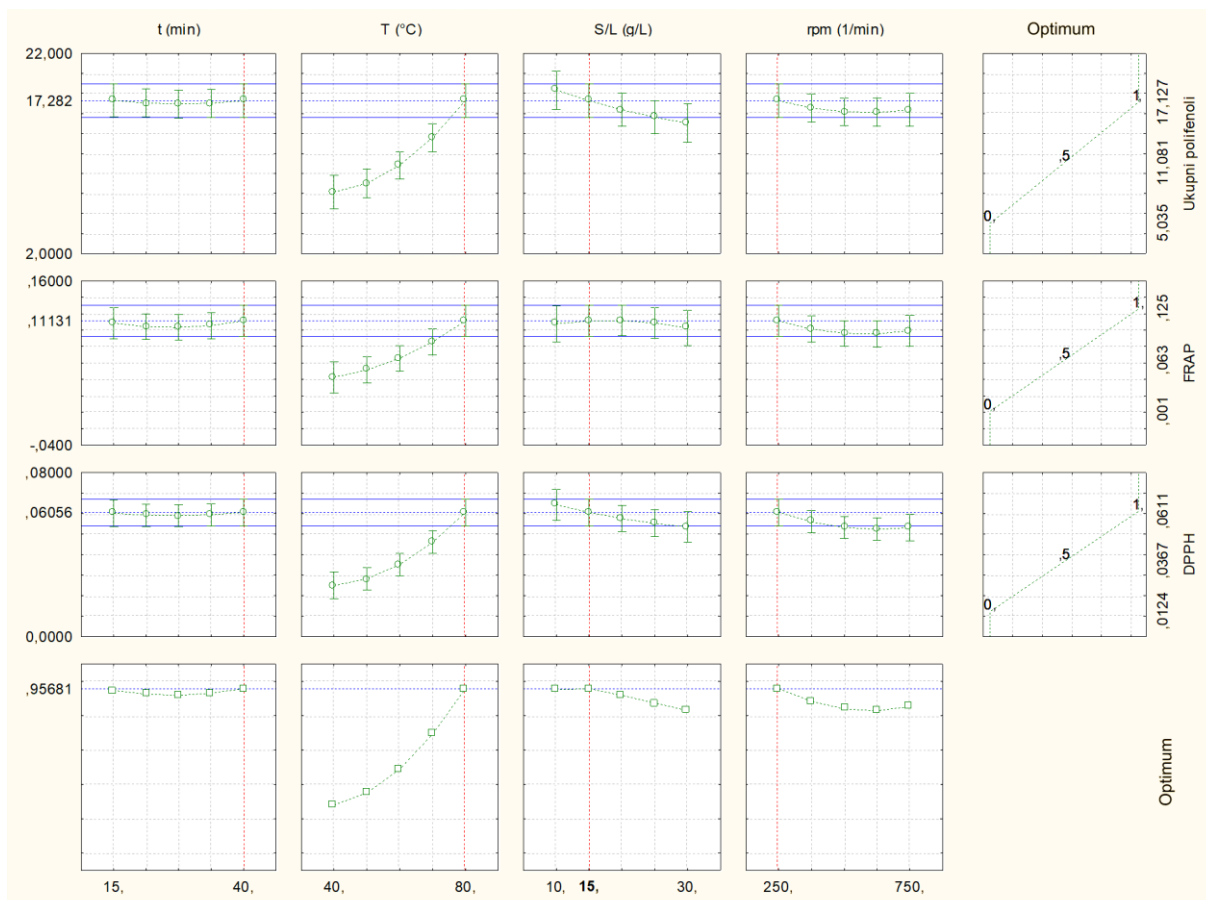
Iz priloženih rezultata možemo vidjeti da interval za ukupne polifenole iznosi $UF = 3,55 - 15,33$ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$, a prema modelu optimalni udio polifenola iznosi $13,59$ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Iz slike 12. možemo vidjeti da povećanje temperature utječe na povećanje ukupnih polifenola, a smanjenje omjera krute i tekuće faze utječe na smanjenje ukupnih polifenola. Vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja ne utječu na udio ukupnih polifenola.

Antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom nalazi se u intervalu $0,0013 - 0,0078$ $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$, a dobivena optimalna vrijednost iznosi $0,062$ $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Povećanje temperature također utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti, dok vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja ne utječu znatno na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom. Smanjenjem omjera krute i tekuće faze smanjuje i antioksidacijska aktivnost.

Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom prema eksperimentu 1 nalazi se u intervalu $\text{DPPH} = 0,0001 - 0,0447$ $\text{mmol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Optimalna vrijednost prema modelu iznosi $0,044$ $\text{mmol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Povećanje temperature značajno utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja utječu na povećanje, ali ne značajno na antioksidacijsku aktivnost. Omjer krute i tekuće faze ne utječu na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom.

Iz slike 15 vidimo da su izračunati optimalni uvjeti klasične ekstrakcije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH i FRAP metodama pri uvjetima temperature 80 °C, vremenu ekstrakcije 34 minute i 15 sekundi, omjeru krute i tekuće faze 10 g/L te brzini miješanja 625 1/min.

Usporedbom dobivenih rezultata ovog rada i dobivenim optimalnim rezultatima, najviše vrijednosti ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti izmjerenim DPPH i FRAP metodama su pri uvjetima temperature 80 °C, vremenu ekstrakcije $27,5$ minuta, omjeru krute i tekuće faze 10 g/L te brzini miješanja 500 1/min, možemo zaključiti da su rezultati vrlo slični.



Slika 16. Optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 2

Na slici 16 prikazani su optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz pokožice komine grožđa postupkom klasične ekstrakcije za eksperiment 2.

Iz priloženih rezultata možemo vidjeti da interval za ukupne polifenole iznosi $UF = 5,035 - 17,13 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{s.tv.}$, a prema modelu optimalni udio polifenola iznosi $17,282 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{s.tv.}$. Iz slike 15 možemo vidjeti da povećanje temperature utječe na povećanje ukupnih polifenola, a smanjenje omjera krute i tekuće faze utječe na smanjenje ukupnih polifenola. Vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja ne utječu na udio ukupnih polifenola.

Antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom nalazi se u intervalu $0,001 - 0,125 \text{ mmol}_{FeSO_4 \cdot 7H_2O}/\text{g}_{s.t.}$, a dobivena optimalna vrijednost iznosi $0,111 \text{ mmol}_{FeSO_4 \cdot 7H_2O}/\text{g}_{s.t.}$. Povećanje temperature također utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti, dok vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja ne utječu znatno na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom. Smanjenjem omjera krute i tekuće faze smanjuje i antioksidacijska aktivnost.

Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom prema eksperimentu 1 nalazi se u intervalu $DPPH = 0,0124 - 0,0611 \text{ mmol}_{Trolox}/\text{g}_{s.tv.}$. Optimalna vrijednost prema modelu iznosi $0,0606 \text{ mmol}_{Trolox}/\text{g}_{s.tv.}$. Povećanje temperature značajno utječe na povećanje antioksidacijske

aktivnosti. Vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja utječu na povećanje, ali ne značajno na antioksidacijsku aktivnost. Omjer krute i tekuće faze ne utječu na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom.

Iz slike 16 vidimo da su izračunati optimalni uvjeti klasične ekstrakcije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH i FRAP metodama pri uvjetima temperature 80 °C, vremenu ekstrakcije 40 minuta, omjeru krute i tekuće faze 15 g/L te brzini miješanja 250 1/min. Usporedbom dobivenih rezultata ovog rada i dobivenim optimalnim rezultatima, najviše vrijednosti ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti izmjerenim DPPH i FRAP metodama su pri uvjetima temperature 80 °C, vremenu ekstrakcije 27,5 minuta, omjeru krute i tekuće faze 20 g/L te brzini miješanja 250 1/min te možemo zaključiti da se rezultati vrlo slični. Zanimljivo je primijetiti da su optimalni uvjeti za oba eksperimenta pri temperaturi od 80 °C, i sličnoj duljini ekstrakcije i omjeru krute i tekuće faze, dok je brzina miješanja potpuno različita. Utjecaj brzine miješanja moguć je zbog različite teksture uzorka korištenih kod ekstrakcija, gdje je sporija brzina miješanja bolje pogodovala u eksperimentu 2 zbog teksture uzorka koji je bio nalik prahu i pri nižim brzinama nije zaostajao na stjenkama čaše.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja mogu se postaviti slijedeći zaključci:

1. Izmjerena pH vrijednost vodenih ekstrakata u oba eksperimenta se ne razlikuje previše o uvjetima provedbe ekstrakcije te dobivene vrijednosti odgovaraju rasponu pH komine grožđa koja se često spominje u literaturi (3,4 - 5,8).
2. Povišenjem temperature i ekstrakcijom veće količine uzorka povećavaju se TDS i električna vodljivost u oba eksperimenta te je potvrđena korelacija između njih jer su značajan dio otopljenih tvari ioni koji provode električnu struju. Veće vrijednosti su dobivene u eksperimentu 2 jer je takav uzorak bio izložen većoj dodirnoj površini sa otapalom i samim uklanjanjem vode iz uzorka poboljšava se efikanost ekstrakcije.
3. U eksperimentu 1 najviša koncentracija ukupnih polifenola (UF) i antioksidacijska aktivnost izmjerena metodama DPPH i FRAP izmjerena je u uzorku broj 15, pri uvjetima: $t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 10$ g/L i $rpm = 500$ 1/min. $UF = 15,33$ mg_{GAE}/g_{s.tv}, $DPPH = 0,0447$ mmol_{Trolox}/g_{s.tv} i $FRAP = 0,0779$ mmol_{FeSO4·7H2O}/g_{s.t.}.
U eksperimentu 2 najviša koncentracija ukupnih polifenola (UF) i antioksidacijska aktivnost izmjerena metodama DPPH i FRAP izmjerena je u uzorku broj 24, pri uvjetima: $t = 27,5$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 20$ g/L i $rpm = 250$ 1/min. Izmjerene vrijednosti iznose: $UF = 17,13$ mg_{GAE}/g_{s.tv}, $DPPH = 0,0611$ mmol_{Trolox}/g_{s.tv}. i $FRAP = 0,1256$ mmol_{FeSO4·7H2O}/g_{s.t.}.
4. Procijenjeni optimalni uvjeti, za eksperiment 1, kako bi se dobila najviša koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnosti iznose $t = 34$ min i 15 sek, $T = 80$ °C, $S/L = 10$ g/L i $rpm = 625$ 1/min.
5. Procijenjeni optimalni uvjeti, za eksperiment 2, kako bi se dobila najviša koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnosti iznose $t = 40$ min, $T = 80$ °C, $S/L = 15$ g/L i $rpm = 250$ 1/min.
6. Modeli koji opisuju eksperimentalne podatke u slučaju pH vrijednost su linearni, a za sve ostale parametre kvadratni modeli pokazali su najbolje slaganje s eksperimentalnim podacima u oba eksperimenta.

6. LITERATURA

“Električna vodljivost.” [Online]. Dostupno: <http://hannainst.hr/elektricnavodljivost/>.

Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci* **147**, 147–156.

Albu S (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem* **11**, 261–265. <https://doi:10.1016/j.ultsonch.2004.01.01>

AOAC Method (1990) 43.290. Official Methods of Analysis of the AOAC, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS & Escaleira, LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965–977. <https://doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019>

Bordiga M (2016) Valorization of Winemaking by-Products; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA

Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M (2019) Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity - a review. *Int J Food Sci Technol*. <https://doi:10.1111/ijfs.14118>

Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Putnik P, Vukušić T, Herceg Z, Dragović - Uzelac V (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase Plasma. *Food Chem* **212**, 323-331

Cambardella CA, Richard TL & Rusell A (2003) Compost mineralization in soil as a function of composting process conditions. *Eur J Soil Biol* **39**, 117–127. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(03\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(03)00027-X)

Cen H, He Y (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci* **18**, 72–83. <https://doi:10.1016/j.tifs.2006.09.003>

Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. (2021) Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environmental Pollution* **278**, 116796. <https://doi:10.1016/j.envpol.2021.116796>

Dong J, Liu Y, Liang Z, Wang W (2010) Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrason Sonochem* **17** . <https://doi:10.1016/j.ultsonch.2009.05.006>

Fontana AR, Antonioli 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**, 8987–9003. <https://doi:10.1021/jf402586f>

Ghasemzadeh A, Jaafar H, Juraimi A, Tayebi-Meigooni A (2015) Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of Hashemi rice bran. *Molecules* **20**, 10822–10838.

González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal Chim Acta* **513**, 283–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.019>

Haminiuk CW, Maciel GM, Plata-Oviedo MS, Peralta RM (2012) Phenolic compounds in fruits-an overview. *Int J Food Sci Tech* **47**, 2023–2044. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>

Islam MR, Sarkar MKI, Afrin T, Khaleque A (2016) A Study on the Total Dissolved Solids and Hardness Level of Drinking Mineral Water in Bangladesh. *Am J Appl Chem* **4**, 164-169. <http://dx.doi.10.11648/j.ajac.20160405.11>

Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E (2018) Novel application and industrial exploitation of winery by-products, *Bioresour Bioprocess* **5**, 46. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>

Lachman J, Hejtmánková A, Hejtmánková K, Horníčková Š, Pivec V, Skala O i sur. (2013) Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Ind Crops Prod* **49**, 445–453. <https://doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.022>

Le Man H, Behera SK, Park HS (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int J Environ Sci Technol* **7**, 157–164

Majeed M, Hussain AI, Chatha SA, Khosa MK, Kamal GM, Kamal MA i sur. (2016) Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi J Biol Sci* **23**, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.010>

Meyer AS, Jepsen SM & Sorensen NS (1998) Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J Agric Food Chem* **46**, 2439–2446.

Moreno AD, Ballesteros M, Negro MJ (2021). Biorefineries for the valorization of food processing waste. *The Interaction of Food Industry and Environment* 155–190. <https://doi:10.1016/b978-0-12-816449-5.00005-9>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3380. <https://doi:10.3390/ijms22073380>

Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhella RC, Barros L, Pinho SP i sur. (2018) Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties, *Food Chem* **25**, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>

Pérez-Cruz K, Moncada-Basualto M, Morales-Valenzuela J, Barriga-González G, Navarrete-Encina P, Núñez-Vergara L i sur. (2018) Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins *AraB J Chem* **11**, 525-537.

Pinelo M, Arnous A & Meyer AS (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci* **17**, 579–590. <https://doi:10.1016/j.tifs.2006.05.003>

Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J & Núñez MJ (2005) Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J Agric Food Chem* **53**, 2111–2117. <https://doi:10.1021/jf0488110>

Pinheiro DR, Neves R de F, Paz SPA (2021) A sequential Box-Behnken Design (BBD) and Response Surface Methodology (RSM) to optimize SAPO-34 synthesis from kaolin waste. *Microporous Mesoporous Mater* **323**, 111250. <https://doi:10.1016/j.micromeso.2021.1112>

Portilla-Rivera OM, Moldes AB, Torrado AM & Dominguez JM (2007) Lactic acid and biosurfactant production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochem* **42**, 1010–1020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.011>

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290–4302.

Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757–781.

Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y (2018) Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal Sci* **34**, 795–800. <https://doi:10.2116/analsci.18p014>

Skračić Z, Ljubenković I, Mimicac N, Generalić Mekinić I (2023) Valorizacija nusproizvoda proizvodnje vina. *Kem Ind* **72**, 247–255.

Soto M, Falqué E & Domínguez H (2015). Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics* **2**, 259–276. <https://doi:10.3390/cosmetics2030259>

Spinei M, Oroian M (2021) The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. *Foods* **10**, 867. <https://doi:10.3390/foods10040867>

Teng D, Fang Y, Song X, Gao Y (2011) Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta. *Food Bioprod Process* **89**, 202–208.

Valinger D, Kušen M, Benković M, Jurina T, Panić M, Radojičić Redovniković I, Kljusurić JG, Tušek AJ (2022) Enhancement of the Green Extraction of Bioactive Molecules from *Olea europaea* Leaves. *Separations* **9**, 33. <https://doi.org/10.3390/separations9020033>

Xu BJ, Chang SK (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* **72**, 159–166.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LEA PETERNEL izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis