

Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Bucić-Kojić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:551901>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ana Bucić-Kojić

**UTJECAJ PROCESNIH UVJETA I NAČINA KRUTO-TEKUĆE
EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI IZ
SJEMENKI GROŽĐA**

Doktorski rad

Osijek, prosinac 2008.

UDK:	66.061.34 : 634.8.076 (043)
Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Institucija u kojoj je rad izrađen:	Prehrambena-tehnološki fakultet Osijek Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku Fakulteta za kemiju in kemijsko tehnologiju Univerza v Mariboru, Slovenija
Voditelj rada:	dr.sc. Srećko Tomas, red.prof.
Broj stranica:	151
Broj slika:	69
Broj tablica:	47
Broj priloga:	5
Broj literaturnih referenci:	139
Datum obrane:	11. prosinca 2008.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. Marijan Šeruga, red.prof., Prehrambena-tehnološki fakultet, Osijek - predsjednik
2. dr.sc. Srećko Tomas, red.prof., Prehrambena-tehnološki fakultet, Osijek – član-voditelj
3. dr.sc. Višnja Katalinić, izv.prof., Kemijsko-tehnološki fakultet, Split - član

Rad je pohranjen u:

Knjižnici Prehrambena-tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku, Kuhačeva 20
Rektoratu Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku, Trg Svetog Trojstva 3
Gradske i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku, Europske avenije 24
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb,
Sveučilišnoj knjižnici u Rijeci, Riječke revolucije 7,
Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Zagrebačka 3
Sveučilišnoj knjižnici u Puli, Herculov prolaz 1
Sveučilišnoj knjižnici u Zadru, Obala kralja Petra Krešimira IV 2
Sveučilišnoj knjižnici u Dubrovniku, Ćira Carića 4

Tema doktorskog rada je prihvaćena na I. (prvoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, akademske 2007/08. godine, koja je održana 18. listopada 2007. godine.

UTJECAJ PROCESNIH UVJETA I NAČINA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

SAŽETAK

U radu se istraživao utjecaj omjera-kruto-tekuće (10, 20, 30 i 40 mL/g), otapala (vode, te 50, 70 i 96%-tnog etanola), vremena (10-200 minuta) te veličine čestica ($> 0,63$ mm; $0,63 - 0,4$ mm; $0,4 - 0,16$ mm i $< 0,16$ mm) na prinos ekstrakcije ukupnih fenola iz sjemenki grožđa, kao i utjecaj temperature (25, 40, 50, 60, 70 i 80 °C) na kinetiku ekstrakcije ukupnih i individualnih fenolnih tvari. Istraživao se i utjecaj različitih načina ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom, ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju, kombinacija ekstrakcije superkritičnim fluidima i ekstrakcije otapalom) na ekstraktibilnost fenolnih tvari, antioksidacijsku aktivnost i boju ekstrakata.

Prijenos fenolnih tvari tijekom kruto-tekuće ekstrakcije odvijao se difuzijom, a određene vrijednosti koeficijenta efektivne difuzije ukupnih ($0,2 - 1,96 \cdot 10^{-10}$ m²/min) i individualnih fenolnih tvari ($0,02 - 0,69 \cdot 10^{-10}$ m²/min) povećavale su se s porastom temperature ekstrakcije. Svi ispitani eksponencijalni matematički modeli (modificirani Fickov II, modificirani Henderson-Pabisov i Pageov model) te neeksponencijalni Pelegov model bili su prikladni za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije, međutim, na osnovi više statističkih pokazatelja Pageov model je pokazao najbolja slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka.

Ekstrakcijom u vodenoj kupelji, najveći prinos ukupnih fenolnih tvari ostvaren je ekstrakcijom iz čestica manjih od 0,63 mm pri omjeru kruto-tekuće 40 mL/g i temperaturi 80 °C pomoću 50%-tnog etanola u trajanju 200 minuta, dok je za iste uvjete ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju dala veći prinos fenolnih tvari od 6 do 35 %.

Oduljavanje sjemenki grožđa pod različitim procesnim uvjetima superkritične ekstrakcije (tlakovi: 300 i 450 bara i temperature 40 i 60 °C) imalo je pozitivan utjecaj na ekstraktibilnost fenolnih tvari tijekom ekstrakcije otapalom, kao i na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata.

Procesni uvjeti i način kruto-tekuće ekstrakcije utjecali su na antioksidacijsku aktivnost i boju ekstrakta. Utvrđena je visoka korelacija između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa i masenog udjela individualnih fenolnih spojeva te ukupnih fenolnih tvari kao i postojanje povezanosti boje ekstrakata i masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima.

Ključne riječi: kruto-tekuća ekstrakcija, fenolne tvari, sjemenke grožđa, modeliranje kinetike, antioksidacijska aktivnost

THE EFFECT OF PROCESS CONDITIONS AND METHOD OF SOLID-LIQUID EXTRACTION ON EXTRACTABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE SEEDS

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the influence of solvent (water and aqueous ethanol: 50, 70 and 96%), solid-liquid ratio (10, 20, 30 and 40 mL/g), extraction time (10-200 minutes) and particle size (> 0.63 mm, 0.63 - 0.4 mm, 0.4 - 0.16 mm and < 0.16 mm) on yield of solid-liquid extraction as well as influence of temperature (25, 40, 50, 60, 70 and 80 °C) on extraction kinetics of total and individual phenolic compounds. The effect of extraction method (water bath extraction, universal extraction system, combined supercritical fluid extraction and water bath extraction) on phenolic extractability, antioxidant activity and colour of extract was also investigated.

The main mechanism of mass transfer during solid-liquid extraction was diffusion. The values of effective diffusion coefficient for total ($0.2 - 1.96 \cdot 10^{-10}$ m²/min) and individual ($0.02 - 0.69 \cdot 10^{-10}$ m²/min) phenolic compound increased with extraction temperature. All examined exponential mathematical models (modified Fick II, modified Henderson-Pabis and Page) and non-exponential model proposed by Peleg were suitable for describing extraction kinetics. However, Page model showed the best accordance between experimental and model predicted data which was confirmed by several relevant statistical criteria.

The highest phenolic yield was obtained from grape seed particle lower than 0.63 mm during 200 minutes of extraction in water bath at 80 °C and solid-liquid ratio 40 mL/g by using 50% aqueous ethanol. Results obtained by universal extraction system were higher in average 6 - 35% in relation to water bath extraction.

Oil elimination from grape seed under different regimes of supercritical fluid extraction (300 and 450 bar; 40 and 60 °C) had the positive effect on phenolic extractability by conventional solid-liquid extraction and on antioxidant activity of extracts.

The influence of process parameters and extraction method on antioxidant activity and colour of extract was observed. Antioxidant activity of grape seed extracts was strongly correlated with total and individual phenolic content. Relationship between phenolic content and colour of extracts was observed.

Keywords: solid-liquid extraction, phenolic compounds, grape seed, kinetics modeling, antioxidant activity

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Srećku Tomasu na vodstvu, podršci i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Željku Knezu i doc.dr.sc. Mojci Škerget sa Fakulteta za kemiju in kemijsko tehnologiju u Mariboru, Slovenija na pruženoj mogućnosti izrade dijela eksperimentalnog rada.

Prof.dr.sc. Višnji Katalinić i prof.dr.sc. Marijanu Šerugi zahvaljujem na stručnim komentarima kojima su pridonijeli da ovaj rad bude jasniji i potpuniji.

Veliko hvala kolegici dr.sc. Mireli Planinić na pomoći, konstruktivnim raspravama i savjetima, te kolegici dr.sc. Lidiji Jakobek na pomoći u HPLC analizama.

Zahvaljujem i svima onima koji su mi na bilo koji drugi način pomogli pri izradi ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji – ocu, suprugu i bratu na razumijevanju, strpljenju i nesebičnoj potpori u svim situacijama.

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. EKSTRAKCIJA.....	3
2.1.1. Kruto-tekuća ekstrakcija aktivnih tvari iz biljnog materijala	3
2.1.1.1. Prijenos tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije.....	4
2.1.1.2. Matematičko modeliranje kruto-tekuće ekstrakcije i efektivni koeficijent difuzije.....	6
2.1.1.3. Faktori koji utječu na prijenos tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije.....	9
2.1.2. Druge metode ekstrakcije aktivnih tvari iz biljnog materijala.....	12
2.1.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	13
2.1.2.2. Ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima.....	15
2.1.2.3. Ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom	15
2.1.2.4. Tlačna tekućinska ekstrakcija.....	16
2.1.2.5. Kruto-fazna ekstrakcija	16
2.2. FENOLNE TVARI U BILJNOM MATERIJALU	17
2.2.1. Flavonoidi.....	18
2.2.2. Fenolne kiseline	20
2.3. NUSPRODUKTI VINARIJA I NJIHOVO POTENCIJALNO ISKORIŠTAVANJE	21
2.3.1. Fenolni spojevi u sjemenkama grožđa.....	23
2.4. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI.....	27
2.4.1. Spektrofotometrijske metode.....	27
2.4.2. Kromatografske metode.....	29
2.4.2.1. Konvencionalna kromatografija	29
2.4.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	30
2.4.2.3. Plinska kromatografija	31
2.4.2.4. Kromatografija superkritičnim fluidima	31
2.4.2.5. Kapilarna elektroforeza	32
2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH TVARI	32
2.5.1. Utjecaj strukture fenolnih spojeva na antioksidacijsku aktivnost.....	35
2.5.2. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata.....	37
2.6. BOJA BILJNIH EKSTRAKATA.....	39

3. EKSPERIMENTALNI DIO	42
3.1. ZADATAK	42
3.2. MATERIJALI	42
3.2.1. Sjemenke grožđa	42
3.2.2. Kemikalije	43
3.3. METODE	44
3.3.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju	44
3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari u sjemenkama grožđa	44
3.3.3. Načini kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	45
3.3.3.1. Kruto-tekuća ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji	45
3.3.3.2. Kruto-tekuća ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju	47
3.3.3.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	49
3.3.4. Priprema ekstrakata sjemenki grožđa za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ekstraktibilnih proantocijanidina, individualnih fenolnih tvari, boje i antioksidacijske aktivnosti	51
3.3.5. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima	51
3.3.6. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima	53
3.3.7. Određivanje flavan-3-ola, procijanidina i fenolnih kiselina u ekstraktima	54
3.3.8. Određivanje boje ekstrakata	56
3.3.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata	58
3.3.10. Matematičko modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	59
3.3.11. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	62
3.3.12. Statistička obrada podataka	63
4. REZULTATI	64
4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA I SUHA TVAR UZORAKA	64
4.2. UTJECAJ OTAPALA, OMJERA KRUTO-TEKUĆE, VELIČINE ČESTICA I VREMENA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA	66
4.3. KINETIKA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE I EFEKTIVNI KOEFICIJENT DIFUZIJE FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA	69
4.3.1. Modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	70
4.3.1.1. Utjecaj temperature kruto-tekuće ekstrakcije na procijenjene parametre matematičkih modela	73
4.3.1.2. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa tijekom procesa kruto-tekuće ekstrakcije	78

4.3.2. Kinetika kruto-tekuće ekstrakcije individualnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	80
4.3.2.1. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) individualnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa tijekom procesa kruto-tekuće ekstrakcije	83
4.4. EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH PROANTOCIJANIDINA IZ SJEMENKI GROŽĐA	85
4.5. UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA	86
4.5.1. Utjecaj kombinacije superkritične i kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	90
4.6. UTJECAJ UVJETA I NAČINA EKSTRAKCIJE NA BOJU EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA.....	92
4.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA	100
4.7.1. Utjecaj uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa.....	101
4.7.1.1. Utjecaj oduljavanja sjemenki grožđa superkritičnom ekstrakcijom na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dobivenih kruto-tekućom ekstrakcijom.....	106
4.7.2. Korelacija između masenog udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa.....	107
5. RASPRAVA	109
5.1. UTJECAJ OTAPALA, OMJERA KRUTO-TEKUĆE, VELIČINE ČESTICA I VREMENA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA.....	111
5.2. UTJECAJ TEMPERATURE NA KRUTO-TEKUĆU EKSTRAKCIJU FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA.....	115
5.2.1. Modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.....	116
5.2.2. Efektivni koeficijent difuzije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa	118
5.2.3. Kinetika i efektivni koeficijent difuzije individualnih fenolnih tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije iz sjemenki grožđa	121
5.3. UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA EKSTRABILNOST FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA.....	124
5.4. BOJA EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA	126
5.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA	128
5.5.1. Utjecaj uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa.....	128
5.5.2. Korelacija između masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa	130
6. ZAKLJUČCI	132
7. LITERATURA	135
8. PRILOZI	144

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

OZNAKE

A	apsorbancija svjetlosti
A'	međufazna (kruto-tekuće) površina [m^2]
AA	antioksidacijska aktivnost [$g_{inh.DPPH}/g_{s.t.}$]
a	konstanta modificiranog Henderson-Pabisova modela [$mg_{GAE}/(g_{s.t.}\cdot min)$]
a^*	parametar CIE- $L^*a^*b^*$ sustava za boje
AU	antiradikalna učinkovitost
b^*	parametar CIE- $L^*a^*b^*$ sustava za boje
c	množinska koncentracija tvari [mol/m^3]
C'	masena koncentracija tvari [$mg/L, g/L, kg/m^3$]
C	maseni udio fenolnih tvari [$mg/g_{s.t.}$]
C^*	parametar boje – zasićenost boje (chroma, <i>engl. colorfulness, saturation, purity, intensity</i>)
dC_{UFT}/dt	brzina ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari [$mg_{GAE}/(g_{s.t.}\cdot min)$]
D_{ef}	efektivni koeficijent difuzije [$m^2/s, m^2/min$]
D_o	Arrheniusov predeksponencijski faktor [$m^2/s, m^2/min$]
E_a	energija aktivacije [kJ/mol]
EF	efikasnost modela, statistički parametar
FL	ukupno kvadratno odstupanje, statistički parametar
h^{o*}	parametar boje – ton boje (<i>hue</i>)
I_0	intenzitet ulazne svjetlosti
I_p	intenzitet propuštene svjetlosti
K/T	omjer kruto-tekuće [mL/g]
k_1	Pelegova konstanta brzine ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari [$g_{s.t.}\cdot min/mg_{GAE}$]
k_2	Pelegova konstanta dosega ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari [$g_{s.t.}/mg_{GAE}$]
k_F	konstanta Fickova modela [$mg_{GAE}/g_{s.t.}\cdot min^n$]
k_{HP}	konstanta Henderson-Pabisova modela [$mg_{GAE}/g_{s.t.}\cdot min^n$]
k_P	konstanta Pageova modela [$mg_{GAE}/g_{s.t.}\cdot min^n$]
k_t	koeficijent prijenosa tvari [m/s]
l	dužina optičkog puta [cm, m]
L	linearna dimenzija (polovina debljine materijala) [m]
L^*	parametar boje – svjetlina boje (<i>engl. lightness</i>)
m	masa [mg, g, kg]
m/t	brzina prijenosa mase [kg/s]
M	molekularna masa [g/mol]
n	parametar modificiranog Fickova modela II
n'	parametar modificiranog Henderson-Pabisova modela

n''	parametar Pageova modela
P	srednja relativna pogreška, statistički parametar [%]
R	opća plinska konstanta [J/(mol K)]
r	prosječni promjer čestica [m]
RMSE	srednje kvadratno odstupanje, statistički parametar
t	vrijeme [s, min]
T	apsolutna temperatura [K]
U	učinkovitost otapala [%]
V	volumen otopine [mL, L, m ³]
$w_{s.t.}$	udio suhe tvari u uzorku [%]
x, y, z	prostorne koordinate

SIMBOLI

ϑ	temperatura ekstrakcije [°C]
ε	koeficijent molarne ekstinkcije [L/(mol·cm)], [m ³ /(mol·m)],
χ^2	reducirani <i>chi</i> -kvadrat, statistički parametar
ΔC^*	promjena kromatičnosti
ΔE^*	ukupna promjena boje
ΔH^*	promjena tona boje
ρ	koeficijent korelacije, statistički parametar

INDEKSI

0	početno stanje
e	ravnotežno stanje
ekst.	ekstrakt
s.t.	suha tvar
uz.	uzorak
∞	beskonačno

KRATICE

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
B2	procijanidin B ₂
C	kontinuirana ekstrakcija (<i>engl. Continuous extraction</i>)
CC	otvorena kolonska kromatografija (<i>engl. Column Chromatography</i>)
CE	kapilarna elektroforeza (<i>engl. Capillary Electrophoresis</i>)
CO ₂	ugljični dioksid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
EKG	(-)-epikatehin galat
EKT	(-)-epikatehin
FC	Folin-Ciocaltaeu
FRAP	(<i>engl. Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>)
FS	Frankovka - slatinsko vinogorje
GAE	ekvivalenti galne kiseline (<i>engl. Gallic Acid Equivalents</i>)

GC	plinska kromatografija (<i>engl. Gas Chromatography</i>)
GK	galna kiselina
GKT	(-)-galokatehin
GS	Graševina – slatinsko vinogorje
H	vruća ekstrakcija (<i>engl. Soxhlet warm</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl. High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IFT	individualne fenolne tvari
KT	(+)-katehin
MWE	ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (<i>engl. Microwave - Assisted Extraction</i>)
NK	neklasirane čestice
PDA	PDA detektor (<i>engl. Photo Dioda Array Detector</i>)
PK	Portugizac – kutjevačko vnogorje
PLE	tlačna tekućinska ekstrakcija (<i>engl. Pressurized Liquid Extraction</i>)
S	Soxhlet standard (<i>engl. Soxhlet standard</i>)
SCFE	ekstrakcija superkričnim fluidima (<i>engl. Supercritical Fluid Extraction</i>)
SCFC	kromatografija superkričnim fluidima (<i>engl. Supercritical Chromatography</i>)
SPE	kruto-fazna ekstrakcija (<i>engl. Solid-Phase Extraction</i>)
TEAC	(<i>engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TLC	tankoslojna kromatografija (<i>engl. Thin Layer Chromatography</i>)
UE	uvjet ekstrakcije
UFT	ukupne fenolne tvari
UPA	ukupni ekstraktibilni proantocijanidini
UV/Vis	ultra ljubičasta / vidljiva spektroskopija (<i>engl. Ultra Violet / Visible Spectroscopy</i>)
VK	vodena kupelj
W	Soxhlet topli (<i>engl. Soxhlet hot</i>)
ZE	Zweigelt - erdutsko vinogorje

1. UVOD

Posljednja dva desetljeća objavljene su brojne znanstvene studije koje sugeriraju da konzumacija hrane biljnog porijekla, posebno voća, povrća i žitarica, ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zbog znatnog sadržaja bioaktivnih sastojaka s izraženim antioksidacijskim djelovanjem. Posebno se ističe važnost fenolnih tvari, koje su sekundarni metaboliti sintetizirani tijekom normalnog razvoja biljke, a predstavljaju vrlo raznoliku grupu fitokemikalija [1, 2]. Tijekom prerade voća i povrća nastaju znatne količine otpadnog materijala koji može predstavljati dobar, a jeftin izvor bioaktivnih fenolnih spojeva [3] koji se mogu koristiti za različite namjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Budući da još uvijek nisu dovoljno istražene mogućnosti iskorištavanja takvog otpada, njegovo iskorištavanje je neznatno [4]. Nakon prerade grožđa zaostaju velike količine krutog otpada (sjemenke, kožica, peteljke) koji se uglavnom uništava (spaljuje) ili rjeđe koristi kao stočna hrana unatoč tome što sadrži visokovrijedne prirodne antioksidanse. Sjemenke čine oko 15% krutog otpada, a sadržavaju 60 - 70% ukupnih ekstraktibilnih fenolnih tvari grožđa [4-6]. Da bi se na najbolji mogući način iskoristili aktivni fenolni spojevi sadržani u biljnom materijalu, nužno je pravilno provesti njihovu izolaciju.

Ekstrakcija predstavlja važan korak u izolaciji i u kasnijoj identifikaciji i kvantifikaciji fenolnih spojeva [7], no s obzirom na to da su fenoli biljnog porijekla strukturno raznoliki, vrlo je teško razviti standardiziranu ekstrakcijsku metodu kojom bi se simultano ekstrahirali svi prisutni fenolni spojevi [1, 2]. Ekstrakcija otapalom ili kruto-tekuća ekstrakcija najčešće je korištena operacija za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala čija ekstraktibilnost ovisi: o otapalu, kemijskoj prirodi fenolnih tvari, temperaturi i vremenu ekstrakcije, omjeru kruto-tekuće, ekstrakcijskoj metodi, veličini čestica, uvjetima i vremenu skladištenja uzorka te prisustvu interferirajućih tvari. Odabir otapala predstavlja jedan od najvažnijih koraka ekstrakcije, a u dosadašnjim istraživanjima najčešće korištena otapala za kruto-tekuću ekstrakciju fenola su: metanol, etanol, propanol i njihove tekuće smjese s različitim udjelima vode te neka druga organska otapala kao što su: aceton, etil acetat, dimetilformamid [2, 8]. U novije vrijeme sve se više razvijaju i alternativne metode ekstrakciji otapalom kao što su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, tlačna tekućinska ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim fluidima [9].

Poznato je da je difuzija glavni mehanizam prijenosa tvari, međutim, specifičnost svakog pojedinog ekstrakcijskog sustava (otapalo-materijal) čine proces kruto-tekuće ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala vrlo složenim i zasad još nedovoljno razjašnjenim i teško predvidivim [10, 11]. Navedeno posebno predstavlja problem u komercijalnoj primjeni ekstrakcije gdje do danas prevladava pragmatičan pristup rješavanja problema, često s posljedicom - neekonomičnim vođenjem procesa [12]. Razjašnjavanje takvih složenih sustava zahtjeva opsežna eksperimentalna istraživanja, što rezultira velikim utroškom energije, vremena i financijskih sredstava. Matematičko modeliranje pokazalo se kao koristan inženjerski alat u rješavanju te problematike jer znatno olakšava optimiranje, simuliranje, dizajniranje i kontrolu procesa [10, 11]. Međutim, iako u literaturi ima podataka o modeliranju i optimiranju [13, 14] kruto-tekuće ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnih materijala, oni su oskudni.

S obzirom na navedeno, cilj je ovog rada bio istražiti utjecaj različitih procesnih uvjeta (otapalo, omjer kruto-tekuće, temperatura, veličina čestica, vrijeme) i načina kruto-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom, ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju, ekstrakcija superkritičnim fluidima) na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa te na antioksidacijsku aktivnost i boju ekstrakata. Zbog sličnosti tijeka procesa ekstrakcije fenolnih tvari iz biljnog materijala i tijeka ostalih procesa koji uključuju fenomene prijenosa topline i tvari (npr. dehidratacija, rehidratacija, prženje), a za čije se opisivanje uspješno koriste različiti eksponencijalni i neeksponencijalni matematički modeli, cilj je bio i ispitati primjenjivost nekih od navedenih modela za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.

2. OPĆI DIO

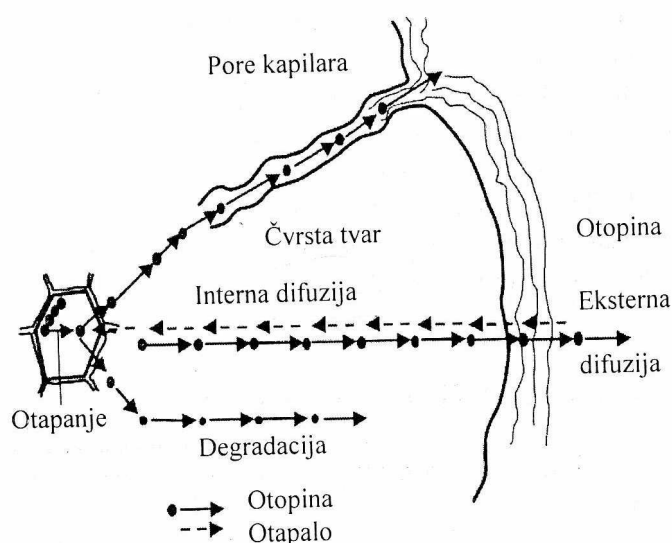
2.1. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je metoda izolacije spojeva koju određuje prijenos tvari iz otopine, krute smjese ili suspenzije u otapalo. Najčešće se odvija u dvofaznom sustavu, pri čemu ciljane tvari treba biti topljivija u otapalu, nego u početnoj fazi. Ovisno o polaznoj fazi iz koje se tvar ekstrahira, proces ekstrakcije općenito se dijeli na:

1. ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari odvija se iz krute faze, a ako se provodi otapalom koje nije lakohlapljivo često se naziva i *izluživanje*.
2. ekstrakciju tekuće-tekuće - prijenos tvari odvija se iz tekuće faze. Taj tip ekstrakcije obično označava ekstrakciju u užem smislu [15–17].

2.1.1. Kruto-tekuća ekstrakcija aktivnih tvari iz biljnog materijala

Kruto-tekuća ekstrakcija ili ekstrakcija otapalom je najčešće korištena operacija izolacije aktivnih supstanci iz biljnog materijala. Predstavlja operaciju kojom se iz čvrstog permeabilnog materijala, sastavljenog iz više sastojaka, izdvaja jedna ili više komponenti pomoću odgovarajućeg otapala u nekoliko osnovnih koraka (*Slika 2.1.*): ulazak otapala u krutu tvar, otapanje komponenti, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine s površine krute tvari u glavnu masu otopine, razdvajanje ekstrakta i krutog ostataka uzorka [11 , 15].



Slika 2.1. Shema glavnih koraka ekstrakcije tvari iz krute tvari otapalom (Cussler, 1997) [15]

2.1.1.1. Prijenos tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije

Prijenos mase, općenito, nastaje zbog razlike koncentracije (koncentracijski gradijent) između dvije faze koje su u kontaktu, a odvija se u smjeru uspostavljanja ravnoteže [12]. Glavni mehanizam prijenosa mase kod kruto-tekuće ekstrakcije je difuzija, a razlikuju se dva tipa difuzije čijom se kombinacijom odvija prijenos tvari:

- ☞ **molekularna difuzija** koja se ostvaruje tijekom kaotičnog gibanja molekula tvari, koje imaju određenu kinetičku energiju, s mjesta više na mjesto niže koncentracije (difuzija otopljene tvari kroz materijal na površinu krute tvari). Brzina molekularne difuzije ovisi o različitim faktorima kao što su: temperatura, molekularna masa difundirajuće tvari, površina i vrijeme kontakta faza te debljina sloja kroz koji se prenosi tvar,
- ☞ **turbulentna difuzija** (difuzija u molarnom razmjeru, konvekcijska difuzija) koja obuhvaća prijenos otopljene tvari između granične površine (kruta tvar-fluid) i fluida koji struji oko materijala iz kojeg se obavlja ekstrakcija [11, 15, 17].

Brzinu prijenosa mase kod kruto-tekuće ekstrakcije teško je opisati zbog složenosti procesa (npr. nepoznavanje oblika pora kojima se odvija difuzija, specifičnost svakog pojedinog sustava otapalo-materijal). Prijenos mase, međutim, moguće je približno opisati izrazom:

$$\frac{dm}{dt} = k_t \cdot A' \cdot (C'_e - C) \quad (2.1)$$

gdje je:

A' – međufazna (kruto-tekuće) površina [m^2]

C' – koncentracija otopine (u glavnoj masi otopine) [kg/m^3]

C'_e – koncentracija zasićene otopine (u graničnom sloju) [kg/m^3]

m/t - masa otopljene tvari prenesena u jedinici vremena (brzina prijenosa mase) [kg/s]

k_t - koeficijent prijenosa tvari (koeficijent difuzije, koeficijent ekstrakcije) [m/s]

Uz pretpostavku da je volumen (V) otopine konstantan, za šaržni proces vrijedi:

$$dm = V \cdot dC' \quad (2.2)$$

$$\frac{dC'}{dt} = \frac{k_t \cdot A' \cdot (C'_e - C')}{V} \quad (2.3)$$

Ako se pretpostavi da je međufazna površina A' konstantna, jednostavno se može odrediti vrijeme potrebno da se koncentracija otopljene tvari u otopini poveća od početne vrijednosti C'_0 do neke koncentracije C'

$$\int_{C'_0}^{C'} \frac{dC'}{C'_e - C'} = \int_0^t k_t \cdot \frac{A'}{V} \cdot dt \quad (2.4)$$

$$\ln \frac{C'_e - C'_0}{C'_e - C'} = \frac{k_t \cdot A'}{V} \cdot t \quad (2.5)$$

$$\frac{C'_e - C'_0}{C'_e - C'} = \exp\left(-\frac{k_t \cdot A'}{V} \cdot t\right) \quad (2.6)$$

Ako je na početku procesa upotrijebljeno čisto otapalo gdje je $C'_0 = 0$, slijedi:

$$1 - \frac{C'}{C'_e} = \exp\left(-\frac{k_t \cdot A'}{V} \cdot t\right) \quad (2.7)$$

ili

$$C' = C'_e \cdot \exp\left(-\frac{k_t \cdot A'}{V} \cdot t\right) \quad (2.8)$$

Izraz (2.8) pokazuje da se otopina približava zasićenju eksponencijalno [11, 15, 17].

2.1.1.2. Matematičko modeliranje kruto-tekuće ekstrakcije i efektivni koeficijent difuzije

Matematički model nekog sustava je skup matematičkih odnosa između ulaznih i izlaznih veličina koje definiraju taj sustav [18]. Matematičko modeliranje ima veliku važnost u modernom prehrambeno-procesnom inženjerstvu s obzirom na to da omogućava relativno brzo i jeftino procjenjivanje utjecaja različitih sustavnih i procesnih parametara na izlazne varijable procesa uz smanjenje broja potrebnih eksperimentalnih podataka [19]. Određivanje parametara modela i ispitivanje njihove funkcionalne ovisnosti o primijenjenim procesnim uvjetima olakšava predviđanje mehanizama prijenosa tvari, što je veoma značajno u optimiranju, simulaciji, dizajniranju i kontroli procesa [13, 20–22]. Razvijanje jednostavnih modela s malim brojem parametara posebno je važno za industrijske procese. Modeli za opisivanje procesa ekstrakcije aktivnih tvari iz biljnog materijala mogu se podijeliti na teorijske, poluteorijske i empirijske modele. Teorijski modeli se mogu primijeniti na različite materijale i uvjete, ali predstavljaju složene jednadžbe s velikim brojem parametara, što otežava njihovo rješavanje. Empirijski modeli daju mogućnost aproksimacije eksperimentalnih podataka, za što je potrebno puno manje vremena u odnosu na teorijske modele, a korisni su kada nije moguće jasno definirati mehanizam/mehanizme prijenosa tvari. Poluteorijski matematički modeli sadrže parametre koji su izravno povezani sa svojstvima određenog materijala i takvi su modeli najčešće korišteni u literaturi [23, 24].

Početna točka modeliranja procesa difuzije je određivanje oblika materijala te prirode samog procesa (npr. ekstrakcija, apsorpcija), kao i eksperimentalnih uvjeta (početne i ravnotežne koncentracije tvari) [11]. Koncentracijski gradijent tijekom kruto-tekuće ekstrakcije biljnog materijala ovisan je o vremenu, pri čemu se koncentracija tvari mijenja u svakoj točki sustava te se u navedenom procesu odvija nestacionarna difuzija koju opisuje drugi Fickov zakon. Stoga su prema literaturi za opisivanje procesa kruto-tekuće ekstrakcije najčešće korišteni modeli koji su proizašli iz drugog Fickova zakona difuzije (2.9, 2.10), čije je rješavanje moguće uz poznate granične uvjete, pretpostavku da je koeficijent difuzije konstantan te da je ekstrakcija kontrolirana unutarnjom difuzijom uz zanemarivanje vanjskog otpora [7, 10–12, 15–17, 25, 26]:

$$\frac{\partial C'}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C'}{\partial x^2} \text{ - jednosmjerna difuzija} \quad (2.9)$$

$$\frac{\partial C'}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C'}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C'}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C'}{\partial z^2} \right) \text{-višesmjerna difuzija} \quad (2.10)$$

gdje su : C' - koncentracija otopljene tvari [kg/m^3], t – vrijeme [s], D - koeficijent difuzije [m^2/s],
 x, y, z - prostorne koordinate

Analiza nestacionarnih difuzijskih sustava zahtjeva rješavanje parcijalnih diferencijalnih jednačbi koje sadrže više nezavisnih varijabli, analitičkim, numeričkim i grafičkim metodama, a pri tome se najčešće prijenos tvari pojednostavljeno razmatra kao jednosmjerna difuzija.

Ovisno o geometrijskom obliku krutog materijala iz kojeg se obavlja ekstrakcija, u literaturi su najčešće korišteni sljedeći izrazi za difuzijske modele:

$$\text{sferni oblik: } \frac{C'_\infty - C'(t)}{C'_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp\left(-\frac{n^2 \cdot \pi^2 \cdot D_{ef}}{r^2} \cdot t\right) \quad (2.11)$$

$$\text{oblik ravne ploče: } \frac{C'_\infty - C'(t)}{C'_\infty} = \frac{8}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \cdot \exp\left(-\frac{(2n+1)^2 \cdot \pi^2 \cdot D_{ef}}{4 \cdot L^2} \cdot t\right) \quad (2.12)$$

Općenito se pretpostavlja da u modeliranju procesa ekstrakcije tvari iz biljnog materijala prvi član jednačbi (2.11, 2.12) predstavlja dovoljno dobro rješenje [10, 27] pa se ostali članovi mogu zanemariti, pri čemu jednačbe (2.11, 2.12) poprimaju pojednostavljeni oblik:

$$\text{sferni oblik: } \frac{C'_\infty - C'(t)}{C'_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \exp(-k_F \cdot t) \quad (2.13)$$

$$\text{oblik ravne ploče : } \frac{C'_\infty - C'(t)}{C'_\infty} = \frac{8}{\pi^2} \cdot \exp(-k_F \cdot t) \quad (2.14)$$

Navedeni izrazi i njihove brojne modifikacije u smislu prilagođavanja eksperimentalnim uvjetima pokazali su se prikladni za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije antioksidativnih tvari iz melise (*Melissa officinalis*) [27], polifenolnih tvari iz komine grožđa [25], crvenog pigmenta cikle [28], kofeina iz zrna kave [29], hemiceluloze iz pogače maslina zaostale nakon ekstrakcije ulja [30] te superkrične ekstrakcije oleorezina iz nevena [31].

Unatoč prisutnosti određenih literaturnih podataka o modeliranju i optimiranju [13, 14, 32] kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz biljnih materijala, oni su često teško usporedivi zbog specifičnosti svakog pojedinog ekstrakcijskog sustava (razlike u strukturi materijala, strukturi tvari koja se ekstrahira, svojstvu otapala, procesnim uvjetima).

Tijek procesa kruto-tekuće ekstrakcije sličan je drugim procesima koji uključuju fenomene prijenosa topline i tvari (npr. dehidracija, rehidracija), u kojima difuzija kontrolira prijenos tvari. Navedeni procesi uspješno se opisuju različitim pojednostavljenim modelima koji predstavljaju rješenja drugog Fickova zakona difuzije. To su, među ostalim, različiti eksponencijalni (npr. Pageov i Henderson-Pabisov) [33, 34] i neeksponencijalni matematički modeli (npr. Pelegov model) [35–37] za koje vrijede izrazi:

Pageov model - eksponencijalni dvoparametarski (k_p, n) model

$$\frac{C' - C'_e}{C'_0 - C'_e} = \exp(-k_p \cdot t^n) \quad (2.15)$$

Henderson-Pabisov model - eksponencijalni dvoparametarski (a, k_H) model

$$\frac{C' - C'_e}{C'_0 - C'_e} = a \cdot \exp(-k_H \cdot t) \quad (2.16)$$

Pelegov model – dvoparametarski (k_1, k_2) neeksponencijalni model koji dobro opisuje sorpcijske procese (dehidraciju, rehidraciju, apsorpciju)

$$C' = C'_0 \pm \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad (2.17)$$

gdje „±“ postaje „+“ za procese apsorpcije, a „-“ u slučajevima desorpcije

S obzirom na to da ti modeli prema dostupnoj literaturi nisu korišteni u navedenom obliku za opisivanje kruto-tekuće ekstrakcije, pokušat će se ispitati njihova primjenjivost na kruto-tekuću ekstrakciju fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.

Praćenjem kinetike i modeliranjem procesa kruto-tekuće ekstrakcije na osnovi eksperimentalnih podataka moguće je odrediti *koeficijent difuzije*, koji karakterizira proces difuzije odnosno prijenos tvari tijekom procesa ekstrakcije te na osnovi njega pratiti utjecaj pojedinih varijabli na proces. Koeficijent difuzije za slučaj biljnog i krutog prehrambenog materijala najčešće se definira kao efektivni, D_{ef} (*engl. effective*) ili ukupni (*engl. apparent*) koeficijent difuzije. On predstavlja ukupni prijenos mase, a ovisi o obliku, debljini i poroznosti materijala te o selektivnosti i količini otapala. Najčešći način njegova određivanja je izračunavanjem iz konstanti matematičkih modela, izvedenih iz drugog Fickova zakona difuzije (2.11-17) [11, 12, 25, 28, 38].

2.1.1.3. Faktori koji utječu na prijenos tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije

Kruto-tekuća ekstrakcija aktivnih tvari iz biljnog materijala uvelike ovisi o različitim faktorima kao što su: svojstva i priprema materijala, otapalo, ekstrakcijska metoda, temperatura, vrijeme ekstrakcije, itd.

Svojstva i priprema materijala

Svojstva materijala imaju velik utjecaj na efikasnost ekstrakcije. Tijekom prijenosa otopljene tvari u glavnu masu tekućine glavni otpor prijenosu mase predstavljaju stanični zid i stanične membrane. Tako je protoplazma živih stanica svježeg biljnog materijala polupropusna membrana kroz koju ne mogu difundirati aktivni sastojci otopljeni u staničnom soku. Vlaženjem takvog materijala, zbog osmoze, otapalo prodire u stanice jednosmjerno. Priprema materijala prije ekstrakcije može poboljšati prijenos tvari, time i sam proces ekstrakcije, a najčešće obuhvaća:

- ☞ različite načine konzerviranja biljnog materijala (npr. sušenje, smrzavanje, liofilizacija) koji uzrokuju denaturaciju protoplazme tako da stanični zid postaje porozan i propušta otopljene supstance u oba smjera [8, 15],
- ☞ usitnjavanje materijala, pri čemu se narušava struktura materijala i povećava površina kontakta s otapalom te skraćuje put difuzije kroz kruti materijal, što uzrokuje intenzivniji prijenos tvari. Materijal je potrebno usitniti do određene veličine čestica zato što previše usitnjen materijal tvori sabijeniji sloj (npr. pri perkolaciji) ili tvori čepove zbog aglomeracije između većih čestica u sloju, što otežava difuziju otapala. Smatra se da bi

veličina čestica s promjerom manjim od 0,5 mm trebala biti zastupljena manje od 10% u ispitivanom materijalu. Osim toga, fino usitnjeni materijal zahtjeva veliki utrošak energije, što smanjuje ekonomičnost procesa, a zbog zagrijavanja je moguća i degradacija osjetljivih aktivnih spojeva. Usitnjeni materijal korisno je klasirati prije ekstrakcije jer se tako smanjuje raspon veličine čestica u uzorku, a time je i vrijeme ekstrakcije podjednako za svaku česticu [11, 15, 17]. Osim usitnjavanja za dezintegraciju uzorka, često se koriste kemijski i toplinski postupci te u novije vrijeme netoplinski postupci (npr. pulsirajuće električno polje) [28].

Otapalo

Odabir otapala predstavlja uz pripremu biljnog materijala jedan od najvažnijih koraka za učinkovitu ekstrakciju. Topljivost spojeva ovisi o odabranom otapalu, stupnju polimerizacije te o interakcijama s ostalim spojevima u biljnom materijalu, kao i o stvaranju netopljivih kompleksa [2]. Otapalo treba biti selektivno za tvar koja se ekstrahira, a ovdje se može primijeniti pravilo "slično se otapa u sličnom". Lipofilnost ili hidrofilnost spojeva utječe na topljivost fitokemikalija u otapalu za ekstrakciju, dok polarnost otapala ima utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Tako su općenito od fenolnih spojeva katehini bolje topivi u mastima, dok su procijanidini bolje topljivi u vodi, i na osnovi tog svojstva mogu se lako razdvojiti [6]. Polarni antioksidansi, kao što su fenolne kiseline i glikozidi mnogih flavonoida, općenito se ekstrahiraju polarnim otapalima: vodom, alkoholima i njihovom mješavinom. Promjene u polarnosti otapala mijenjaju njegovu učinkovitost otapanja/ekstrahiranja određene grupe antioksidanasa, a time posredno utječu i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta [39, 40]. Aglikoni nekih flavonoida i većina karotenoida ekstrahiraju se nepolarnim otapalima [9]. Manja viskoznost otapala i niža površinska napetost otapala idu u prilog bržoj cirkulaciji otapala oko krute tvari i difuziji u krutu tvar. Ako se biljni ekstrakti koriste u prehrambene svrhe, otapalo treba biti netoksično, stabilno, nereaktivno te neškodljivo za okoliš [14, 15]. U optimiranju procesa kruto-tekuće ekstrakcije bitan je i odabir omjera kruto-tekuće, a prema literaturi, najčešće korišteni omjeri su 1:4 (w/v), 1:5 (w/v), 1:10 (w/v) [2, 41].

U dosadašnjim istraživanjima najčešće korištena otapala za kruto-tekuću ekstrakciju fenola iz biljnih materijala su: metanol, etanol, propanol i njihove vodene otopine te neka druga organska otapala kao što su: aceton, etil acetat, dimetilformamid [2, 8]. Metanol je češće korišteno ekstrakcijsko otapalo od etanola zbog veće učinkovitosti ekstrakcije. Vodene otopine metanola (50 - 80%-tne) daju dobre prinose pri ekstrakciji derivata hidroksicimetne kiseline te flavona,

flavonola, flavanola iz voća, leguminoza, sjemenki grožđa i komine grožđa [8, 9]. Pekić i sur. [42] objavili su da je etil acetat puno selektivniji u ekstrakciji proantocijanidina iz biljnih materijala u odnosu na metanol, etanol, aceton i njihove mješavine s vodom koji daju veće prinose ekstrakata zbog paralelne ekstrakcije i drugih neželjenih spojeva, što kasnije otežava pročišćavanje ekstrakata te rezultira manjim prinosom proantocijanidina. Ne znači, međutim, da otapalo s najboljom učinkovitošću predstavlja i najbolji odabir za sve slučajeve ekstrakcije. Tako, iako je dokazano da 80%-tni metanol daje najbolje rezultate u ekstrakciji polifenolnih spojeva iz sjemenki grožđa, ako se ekstrakt sjemenki grožđa želi iskoristiti u prehrambene svrhe, prednost će se dati etanolu i vodenim otopinama etanola koji nemaju štetan utjecaj na ljudsko zdravlje i ne zagađuju okoliš, za razliku od metanola [6].

Temperatura

Povećanjem temperature u većini slučajeva povećava se topljivost tvari koja se ekstrahira, kao i brzina njezine difuzije, stanične membrane postaju propusnije, smanjuje se viskozitet otapala koje lakše difundira kroz krutu tvar, što rezultira i većom brzinom ekstrakcije. Međutim, kad je riječ o povećanju temperature, postoje određena ograničenja jer se neke aktivne tvari degradiraju pri visokim temperaturama pa treba uzeti u obzir i kemijsku strukturu te svojstva tvari koja se ekstrahira [7, 8, 17].

Ovisnost efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}), kao mjere ukupnog prijenosa tvari tijekom kruto-tekuće ekstrakcije, o apsolutnoj temperaturi ekstrakcije opisuje Arrheniusova jednadžba [11]:

$$D_{ef} = D_0 \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right) \quad (2.18)$$

gdje je: D_0 Arrheniusov predeksponencijalni faktor, E_a energija aktivacije za difuziju [kJ/mol], R opća plinska konstanta [8,314 kJ/mol·K], a T [K] je apsolutna temperatura.

Navedena ovisnost može se i numerički okarakterizirati određivanjem aktivacijske energije iz nagiba pravca ($\ln D_{ef}$ vs. $1/T$) koji se dobije prevođenjem izraza (2.18) u linearni oblik kako slijedi:

$$\ln(D_{ef}) = \ln(D_0) - \frac{E_a}{RT} \quad (2.19)$$

Vrijeme ekstrakcije

Vrijeme ekstrakcije uz temperaturu predstavlja važan parametar koji treba optimirati za dani proces i time posredno smanjiti energetske troškove procesa. Međutim, mnogo je kontradiktornih podataka u literaturi s obzirom na duljinu trajanja procesa ekstrakcije. Tako vrijeme ekstrakcije najčešće varira od minute do 48 sati [41 , 43].

Dulje vrijeme ekstrakcije povećava mogućnost oksidacije fenolnih spojeva, osim u slučajevima gdje se dodaju reducensi, pri čemu se produkti oksidacije mogu polimerizirati u netopljive spojeve, što smanjuje prinos ekstrakcije [2 , 14].

Miješanje

Miješanjem suspenzije povećava se turbulentna difuzija, čime se povećava prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja oko čestice u glavnu masu otapala te difuzija otopljene tvari kroz pore materijala do površine čestice. Osim toga, miješanjem suspenzije tijekom procesa ekstrakcije osigurava se homogenost sustava materijal-otapalo i sprečava taloženje čestica [11 , 17].

2.1.2. Druge metode ekstrakcije aktivnih tvari iz biljnog materijala

Ekstrakcija otapalom daje visok postotak iskorištenja (*engl. recovery*) antioksidativnih fitokemikalija iz različitih uzoraka, međutim, korištenje velike količine organskih otapala povećava zdravstveni rizik i nepovoljno djeluje na okolinu. Zbog toga se sve više razvijaju alternativne metode ekstrakcije i pomoćne metode u ekstrakciji otapalom koje znatno smanjuju ili eliminiraju potrebnu količinu ekstrakcijskog otapala, a daju istu ako ne i bolju učinkovitost, uz niže troškove procesa. Kao alternativna metoda za ekstrakciju aktivnih spojeva iz biljnog materijala ističe se ekstrakcija superkritičnim fluidima. Tlačna tekućinska ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima odnosno ultrazvukom obično se primjenjuju kao pomoćne metode pri ekstrakciji otapalom. Ekstrakcija na krutoj fazi također je metoda koja se često koristi ili kao zasebna metoda ili u kombinaciji s ekstrakcijom uz pomoć otapala [9].

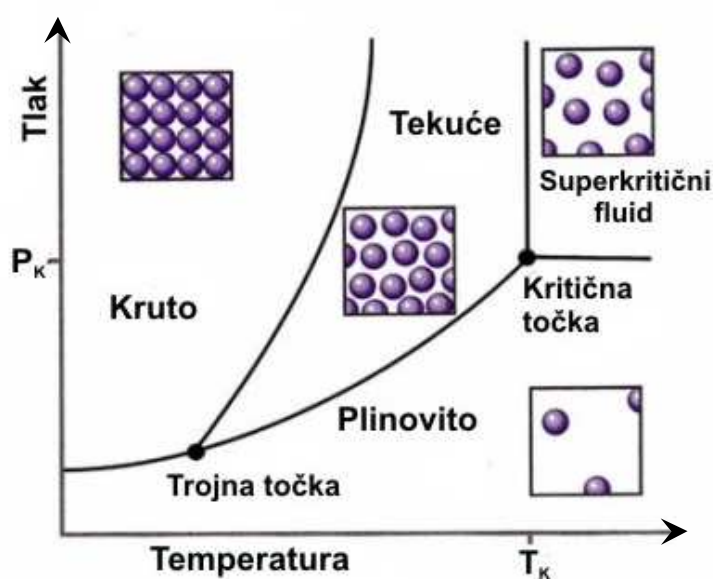
2.1.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (*engl. Supercritical Fluid Extraction - SCFE*) prihvaćena je još sedamdesetih godina kao komercijalna metoda za dekofeinizaciju kave i čaja. Međutim, tek joj se u novije vrijeme pridaje pozornost kao alternativnoj metodi ekstrakciji otapalom za dobivanje prirodnih bioaktivnih spojeva koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ona se ubraja u tip ekstrakcije otapalom, ali se zbog svojih osobitih karakteristika razmatra kao posebna metoda.

Plinovi kao što su ugljični dioksid, propan, butan, i dr. mogu se zagrijavanjem iznad kritične temperature (T_K) ili komprimiranjem iznad kritičnog tlaka (P_K) prevesti u superkritično stanje. Kritična temperatura i kritični tlak te kritična gustoća definiraju kritičnu točku neke čiste tvari koja predstavlja krajnju točku razdvajanja plinske i tekuće faze. Izvan tih kritičnih svojstava ne mogu zasebno postojati ni tekuća ni plinovita faza, zbog čega superkritični fluidi imaju svojstva i plinova i tekućina (*Slika 2.2.*) [44]. Malim promjenama tlaka i temperature fluidima u superkritičnom stanju (SCF) mijenja se sposobnost otapanja bez promjene sastava otapala.

Difuzitet SCF otapala je mnogo viši od ostalih tekućina pa je brži i prijenos tvari, kao i kompletna ekstrakcija u odnosu na tekuća otapala. Nizak viskozitet i napetost površine omogućuju jednostavno prodiranje u materijal iz kojeg se obavlja ekstrakcija aktivne komponente.

Osim za ekstrakciju, SCF je prikladan i za odvijanje kemijskih reakcija zbog povećanja brzine reakcije te povoljnog utjecaja na konverziju i selektivnost.



Slika 2.2. Fazni dijagram (tlak – temperatura) za čistu komponentu

Najčešće korišten fluid u superkričnom stanju je ugljični dioksid (CO_2). To je inertno, netoksično i relativno jeftino, lako dostupno u obilnim količinama, bez mirisa i okusa, ekološki prihvatljivo i GRAS (generalno prihvaćen kao sigurno) otapalo [45, 46]. Ugljični dioksid iz okoline, gdje dospijeva kao nusprodukt u procesu fermentacije i industriji umjetnih gnojiva, koristi se kao komercijalni CO_2 za proces superkrične ekstrakcije. Stoga kao otapalo za ekstrakciju ne uzrokuje povećanje količine CO_2 u atmosferi i ne pridonosi efektu staklenika. Nakon ekstrakcije nema ostataka otapala u ekstraktu. Superkrični CO_2 ima nisku kritičnu temperaturu ($31,1\text{ }^\circ\text{C}$) što ga čini idealnim za ekstrakciju termolabilnih prirodnih produkata. Nadalje, energija potrebna za održavanje superkričnog stanja CO_2 je često niža nego energija potrebna za destilaciju organskog otapala. Općenito, ekstraktibilnost spojeva sa superkričnim CO_2 ovisi o prisutnosti individualnih funkcionalnih grupa u tim spojevima, njihovoj molekularnoj masi i polarnosti [47, 48]. Budući da je CO_2 nepolarno otapalo, najbolju učinkovitost pokazuje u ekstrakciji nepolarnih ili slabo polarnih spojeva niže molekularne mase dok su spojevi veće molekularne mase slabo topljivi u superkričnim fluidima [9, 49]. Ako se ekstrahiraju polarne komponente kakvi su i polifenoli (posebno flavan-3-oli: katehin, epikatehin itd.) potrebno je dodavati kootapalo [8, 50]. Kootapalo zbog interakcije s nepolarnim otapalom povećava topljivost polarnih supstanci te se ekstraktibilnost povećava od 5 do 30%, a antioksidacijska aktivnost od 30 do 70% [46] u odnosu na SCFE bez kootapala. Kootapalo je organska supstanca sa hlapljivošću između SCF otapala i tvari koja se ekstrahira. Dodaje se u vrlo malim količinama (1 do 5 mol %) SCF otapalu radi promjene karakteristika otapala kao što su polarnost, specifične interakcije bez znatnih promjena u gustoći i kompresibilnosti originalnog SCF otapala. Kootapalo se odabire na osnovi njegove (ne)toksičnosti, cijene i konačne primjene ekstrakta te ovisno o spojevima koji se ekstrahiraju. U prehrambenoj industriji etanol i voda su najčešće korištena kootapala za polarne spojeve.

Ovaj način ekstrakcije, osim već navedenih, ima mnogo prednosti [51, 52] pred ekstrakcijom otapalom:

- ✓ smanjene degradacijske reakcije zbog odsustva svjetla i zraka tijekom separacijskog procesa,
- ✓ uočena je veća antioksidacijska aktivnost ekstrakata u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije otapalom,
- ✓ nije potrebno koncentrirati ekstrakt jer se koristi mali volumen organskog otapala,

dok su osnovni nedostaci veliki investicijski troškovi.

Učinkovitost ekstrakcije može se optimirati podešavanjem gustoće CO₂ i kootapala, postotka dodanog kootapala, temperature, vremena i drugih parametara.

Prijašnja istraživanja na komini grožđa pokazuju da superkritičnoj ekstrakciji fenolnih tvari pogoduju tlakovi iznad 300 bara te veći postotak kootapala (8%) te da se fenolni profil ekstrakta dobivenog superkritičnom ekstrakcijom razlikuje od onog dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom otapalom. Tako se superkritičnom ekstrakcijom bolje ekstrahiraju monomerni flavan-3-oli i galna kiselina, a konvencionalnom ekstrakcijom polimerni proantocijanidini koji su slabo topljivi u superkritičnom CO₂. Time se objašnjava i veća antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih superkritičnom ekstrakcijom koja je rezultat strukturnih svojstava monomernih fenolnih tvari [46].

2.1.2.2. Ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*engl. Microwave - Assisted Extraction - MWE*) je relativno nova tehnika ekstrakcije koja kombinira mikrovalove s konvencionalnom ekstrakcijom otapalom. Kod te metode je vrlo važno da otapalo bude polarno jer otapala s većom dielektričnom konstantom (polarna otapala) bolje apsorbiraju mikrovalnu energiju, a time i povećavaju učinkovitost ekstrakcije ciljane komponente. Često se koriste i kootapala (voda i druga polarna otapala) kojima se optimira dielektrična konstanta ekstrakcijskog otapala.

Postoje, međutim, i suprotna mišljenja prema kojima su bolja ekstrakcija otapala s manjom dielektričnom konstantom. U tom slučaju sva mikrovalna energija usmjerena je na materijal, pri čemu voda/vlaga iz unutrašnje stanične strukture brzo apsorbira energiju te dolazi do pucanja staničnih zidova i oslobađanja ciljanih komponenti u okolno otapalo.

Prednosti tog načina u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju su kraće vrijeme ekstrakcije (nekoliko minuta umjesto nekoliko sati), manji volumen otapala te veća učinkovitost ekstrakcije. Ta se metoda pokazala dobrom u ekstrakciji fenolnih spojeva iz lišća i sjemenki grožđa [8, 9].

2.1.2.3. Ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom

Zbog veće kontaktne površine između otapala i uzorka izazvane razaranjem uzorka ultrazvukom, ekstrakcija je puno brža i potpunija u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije otapalom. Ultrazvuk (>18 kHz) djeluje na biljni materijal tako da stvara

mikro-mehanički šok koji razara staničnu strukturu, što dovodi do lezije stanica. Na taj je način povećava se brzina difuzije i skraćuje vrijeme ekstrakcije ciljanih komponenti. Može se provoditi u ultrazvučnoj kupelji ili pomoću ultrazvučne sonde koja daje bolje rezultate zbog manjih gubitaka i ujednačenije distribucije energije u odnosu na ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji [8, 18, 53, 54].

2.1.2.4. Tlačna tekućinska ekstrakcija

Tlačna tekućinska ekstrakcija (*engl. Pressurized Liquid Extraction – PLE*) ili ubrzana ekstrakcija otapalom je metoda koja se, prema literaturnim podacima, najviše koristila za ekstrakciju pesticida i drugih kontaminanata okoliša. Tek se nedavno počela primjenjivati za ekstrakciju antioksidativnih fitokemikalija, npr. iz kože i sjemenki grožđa.

Ekstrakcija otapalom se ubrzava povišenjem tlaka (povećava se kontakt između uzorka i otapala) i temperature (na višoj temperaturi događa se denaturacija staničnog zida zbog koagulacije lipoproteina pa stanični zid postaje propusniji za transport otopljenih tvari). Ta metoda može se provoditi u inertnoj atmosferi uz zaštitu uzorka od svjetlosti, što je korisno za osjetljive spojeve podložne oksidaciji [8, 9, 52].

2.1.2.5. Kruto-fazna ekstrakcija

Kruto-fazna ekstrakcija (*engl. Solid-Phase Extraction - SPE*) je jednostavna, brza i ekonomična metoda u odnosu na ekstrakciju s otapalom. SPE se češće koristi za koncentriranje i pročišćavanje, nego za kvantifikaciju zbog selektivnosti i zasićenja krute faze (adsorbenta). Ekstrakcija se provodi propuštanjem tekuće faze koja sadrži željenu komponentu preko čvrstog nosača koji je najčešće u koloni u obliku gela, granula i dr., pri čemu se komponenta vezuje za čvrsti nosač, a potom se ispire čvrsta faza odgovarajućim otapalom (desorbentom) pa komponenta prelazi u otapalo.

U frakcioniranju i separaciji proantocijanidina od drugih fenolnih spojeva iz biljnih materijala i pića dobre rezultate daje čvrsta faza Sephadex LH-20. To je gel koji djeluje na temelju adsorpcije i razdjeljivanja u direktnoj fazi. Separacija se temelji na tvorenju vodikovih veza između vodika ili karboksilne grupe fenola i akceptora na gelu. Jačina adsorpcije ovisi o broju fenolnih vodika po molekuli. Tako su polimerni polifenoli, kao što su kondenzirani tanini

adsorbirani puno bolje nego monomeri, npr. katehini. Najčešća otapala koja se koriste su: etanol, metanol, aceton i njihove vodene otopine. Kao desorbent najbolji učinak ima aceton zbog karbonilnog kisika koji je jak akceptor za vodikove veze i sposoban je istisnuti polimer na gelu. Vrlo je bitno da se eluiranje provodi s niskim protokom eluenta da se osigura dovoljno vremena za izmjenu s ciljem dobre separacije. Druge stacionarne faze koje se koriste za separaciju proantocijanidina su Sephadex LH-25, Sep-Pak C₁₈, Poliamid, Amberlit, itd. SPE se često koristi za ekstrakciju fitokemikalija iz tekućeg matriksa npr. sokova [8].

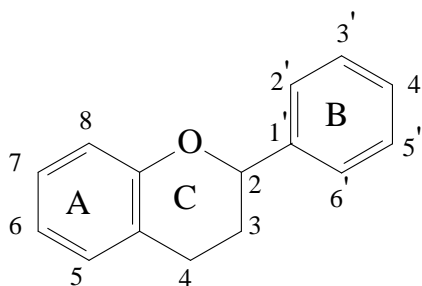
2.2. FENOLNE TVARI U BILJNOM MATERIJALU

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti sintetizirani u biljkama tijekom njihova normalnog razvoja ili kao odgovor na stres (infekcije, oštećenja, UV zračenje). Njihov sadržaj u biljnom materijalu ovisi o vrsti, sorti, uvjetima i tehnikama uzgoja, procesu dozrijevanja, kao i o uvjetima procesiranja i skladištenja [1]. S obzirom na njihovu strukturu i funkciju, predstavljaju vrlo raznoliku skupinu spojeva od jednostavnih fenola do visokopolimeriziranih spojeva [55], ali općenito podrazumijevaju spojeve koji posjeduju aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Budući da takvu strukturu mogu imati i druge skupine spojeva (npr. terpenoidi), točnija definicija temelji se na njihovu metaboličkom porijeklu pa se pod biljnim fenolnim spojevima smatraju derivati puta šikiminske kiseline i metabolizma fenilpropanoida. Često se umjesto termina "fenoli" koristi termin "polifenoli" što nije u potpunosti precizno. Fenolni spojevi obuhvaćaju: fenolne kiseline, kumarine, flavonoide, stilbene, tanine, lignane i lignine [1 , 2 , 56]. Od fenolnih spojeva u grožđu su najzastupljeniji flavonoidi i fenolne kiseline [6]. Fenolnim tvarima pripisuje se višestruko pozitivno djelovanje. U samim biljkama djeluju antioksidativno, antimikrobno, kao tvari za privlačenje pozornosti te zaštitne tvari od UV zračenja. Zaštitna uloga u obrani organizma od različitih bolesti očituje se u njihovu antibakterijskom, protuupalnom, antialergijskom, antimutagenom, antiviralnom i antikancerogenom djelovanju. Osim toga, znatno utječu na boju, okus, miris i stabilnost hrane [2 , 57].

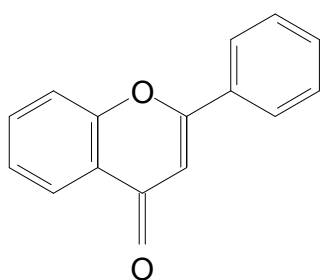
2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najrasprostranjenija skupina fenolnih spojeva u biljnom svijetu. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida [57]. Osnovnu strukturu flavonoida čine dva aromatska benzena A i B spojena preko heterocikličkog prstena C koji sadrži kisik (*Slika 2.3.*). Položaj različitih supstituenata (hidroksilne, metoksi i glikozidne skupine) na prstenu A, B i C, položaj vezivanja prstena B i C te nezasićenost i stupanj oksidacije u strukturi prstena C utječu na mogućnost postojanja brojnih flavonoida koji imaju različitu kemijsku strukturu i biološke karakteristike [58, 59]. Temeljem stupnja oksidacije heterocikličkog prstena flavonoidi se mogu podijeliti u 14 grupa, dok se flavonoidi prisutni u hrani mogu podijeliti u šest grupa [60]: antocijanidini (grožđe, vino, višnje), flavonoli (luk, brokula, kupus, kora jabuke, grožđe), flavoni (limun, maslina, celer), flavanoli (grožđe, čajevi), flavanoni (koža rajčice, citrusi) i izoflavoni (soja) (*Slika 2.4.*).

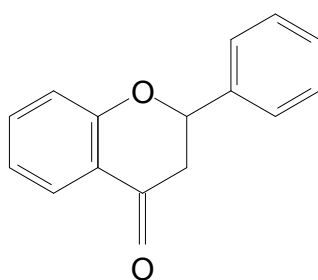
Flavonoidi se u biljnom materijalu/hrani uglavnom nalaze u obliku 3-*O*-glikozida ili polimera (tanina). Od glikozidnih jedinica najčešće se pojavljuje glukoza, glukoramnoza, galaktoza, arabinoza i ramnoza. Polimerni spojevi mogu potjecati već iz samih biljaka (proantocijanidini, tanini koji se mogu hidrolizirati) ili mogu nastati tijekom procesiranja hrane (derivati tanina)[61]. Struktura proantocijanidina je vrlo heterogena uslijed širokog raspona molekularnih masa (mogu sadržavati više od 70 monomernih jedinica), velikog broja mogućih izomera te dužine lanca sačinjenog od monomernih jedinica. Zbog toga je otežana i njihova identifikacija i kvantifikacija u odnosu na niže polimerizirane spojeve flavanola (dimere, oligomere) [55, 62].



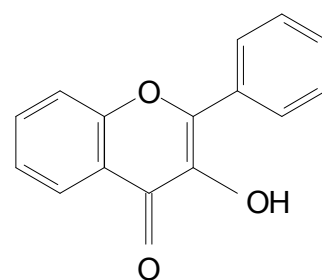
Slika 2.3. Osnovna monomerna struktura flavonoida



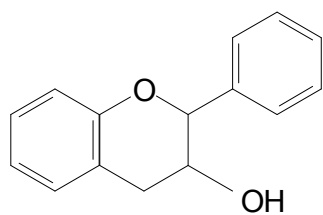
Flavoni



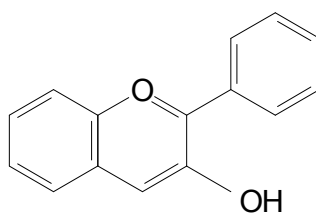
Flavononi



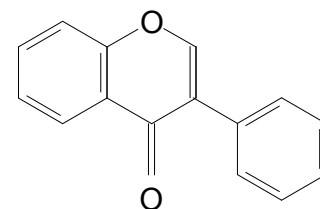
Flavonoli



Flavan-3-oli



Antocijanidini



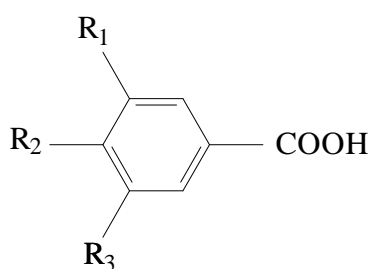
Izoflavoni

Slika 2.4. Osnovne grupe flavonoida najčešće prisutnih u hrani

2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine s obzirom na osnovnu strukturu: derivati benzojeve kiseline (*Slika 2.5.a*) i derivati cimetine kiseline (*Slika 2.5.b*).

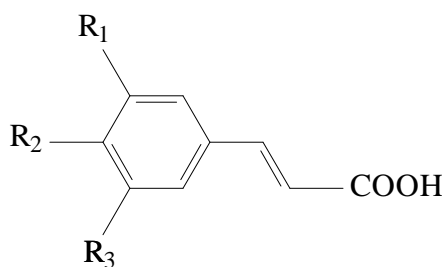
1. Derivati benzojeve kiseline



a)

Kiselina	R ₁	R ₂	R ₃
Benzojeva	H	H	H
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	H	OH	H
Protokatehinska	OH	OH	H
Vanilinska	OCH ₃	OH	H
Siringinska	OCH ₃	OH	OCH ₃
Galna	OH	OH	OH

2. Derivati cimetine kiseline



b)

Kiselina	R ₁	R ₂	R ₃
Cimetna	H	H	H
<i>p</i> -kumarinska	H	OH	H
Kafeinska	OH	OH	H
Ferulična	OCH ₃	OH	H
Sinapična	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Slika 2.5. Fenolne kiseline: (a) osnovna struktura i derivati benzojeve kiseline; (b) osnovna struktura i derivati cimetine kiseline

2.3. NUSPRODUKTI VINARIJA I NJIHOVO POTENCIJALNO ISKORIŠTAVANJE

Godišnje nastaju velike količine krutog (ljuske, kora, sjemenke, lišće) i tekućeg otpada (otpadna voda) tijekom procesiranja biljnih sirovina u prehrambenoj industriji [63], a njihovo skladištenje, prerada ili eliminiranje predstavljaju ozbiljan ekološki i ekonomski problem. S obzirom na to da je to uglavnom biorazgradivi organski materijal, on bi se mogao dodatno iskoristiti za proizvodnju bio-goriva ili kompostiranje u produkte korisne za kondicioniranje tla koji bi ravnopravno zamijenili kemijska gnojiva koja se uglavnom još koriste. Naime, glavni razlog zašto poljoprivredno-prehrambeni kompost ima ograničenu primjenu često je viši sadržaj teških metala od dopuštenog, koji bi se dugotrajnom upotrebom akumulirali u tlu i tako imali nepoželjne utjecaje i na okolinu i na zdravlje ljudi [64]. Osim toga, takav kruti otpad predstavlja alternativni izvor prirodnih bioaktivnih spojeva kao što su fenolni spojevi koji su važni zbog nutritivnih i terapijskih svojstava te moguće primjene u tehnološkim postupcima. Makris i sur. [4] su dokazali da su od različitih analiziranih nusprodukata, bioproducti prerade grožđa imali najveći sadržaj fenolnih tvari i antioksidacijsku aktivnost.

Vinova loza (*Vitis Vinifera*) je jedna od najčešće uzgajanih kultura u svijetu s prosječnom godišnjom proizvodnjom grožđa od 65,5 miliona tona (podaci za 2003.-2007.) [65]. Procjenjuje se da se 80% godišnje proizvodnje grožđa prerađuje u vino [66]. Otpad zaostao nakon prerade grožđa i proizvodnje vina sastoji se uglavnom od čvrstih bioproductata (kožica, peteljki i sjemenki) koji čine prosječno 20-30% mase prerađenog grožđa, a 15% krutog otpada čine sjemenke grožđa [4, 67]. Prema tim podacima, može se izračunati da zaostaje prosječno 15,7 milijuna tona krutog otpada godišnje, odnosno 2,3 milijuna tona sjemenki grožđa. Prema FAO [65] podacima za Hrvatsku (2003.-2007.), prosječna godišnja proizvodnja grožđa bila je 308 940 tona s vinogradske površine od ukupno 38 000 ha, pri čemu je prema prethodnom izračunu zaostalo ~74 tona krutog otpada, odnosno ~11 tona sjemenki grožđa. Iako količina otpada iz vinarija nije zanemariva te unatoč tome što predstavlja bogat izvor visokovrijednih produkata kao što su soli vinske, jabučne i limunske kiseline, ulja, hidrokoloidi i vlakna te fenolni spojevi, njegovo je iskorištavanje i dalje neznatno [4, 60]. Neke od mogućnosti iskorištavanja otpada vinarija prikazane su u **Tablici 2. 1.** [64].

Tablica 2.1. Postupci obrade otpada grožđa, produkti i njihova upotreba [64]

Otpad grožđa	Postupak obrade	Produkt	Upotreba
Otpad od grožđa	Kompostiranje komine grožđa i stajnjaka	Organske tvari	Gnojivo za uzgoj kukuruza
Ekstrakti sjemenki i kože grožđa	Frakcioniranje ekstrakata sjemenki i kože iz otpada grožđa	Fenolne tvari	Dodatak prehrani za prevenciju od bolesti
Otpad od grožđa	Nastajanje plina iz otpadnih produkata grožđa	Koncentrirani neiskorišteni ostatak	Proizvodnja plina za grijanje
Prešana kožica grožđa	Kompostiranje krutog otpada i otpadnih voda	Organske tvari	Gnojivo
Komina i sjemenke grožđa	Liofilizacija i ekstrakcija flavanola	Flavanoli	Dodatak prehrani, proizvodnja fitokemikalija
Komina i stabljika grožđa te vinski talog	Liofilizacija i ekstrakcija polifenola	Polifenoli	Dodatak prehrani
Kožica, sjemenke i peteljke grožđa	Kiselinska hidroliza polimernih proantocijanidina komine grožđa u prisustvu cistamina	Flavanoli	Izvor flavanola
Ekstrakt sjemenki grožđa	Pre- i post-mortem upotreba u hrani za životinje	Fenolne tvari	Hrana za životinje sa svrhom dobivanja tamnog mesa peradi
Pulpa kože grožđa	Fermentacija pomoću <i>Auerobasidium pullulan</i>	Fermentirani bujon	Proizvodnja pullulana
Sjemenke grožđa	Uzgoj <i>Trametes hirsuta</i> na krutim nosačima	Lignoceluloza	Proizvodnja lakaze
Komina grožđa	Uzgoj <i>Pleurotus sp</i> na krutim nosačima	Fenoli i ukupni šećeri	Hrana za životinje
Otpadna voda	Elektrodijaliza	Vinska kiselina	Aditiv u medicini i kozmetici, sredstvo za zakiseljavanje u proizvodnji bezalkoholnih pića
Otpadna voda	Elektrodijaliza pri 60 °C	Vinska i jabučna kiselina	Prehrambena i farmaceutska industrija

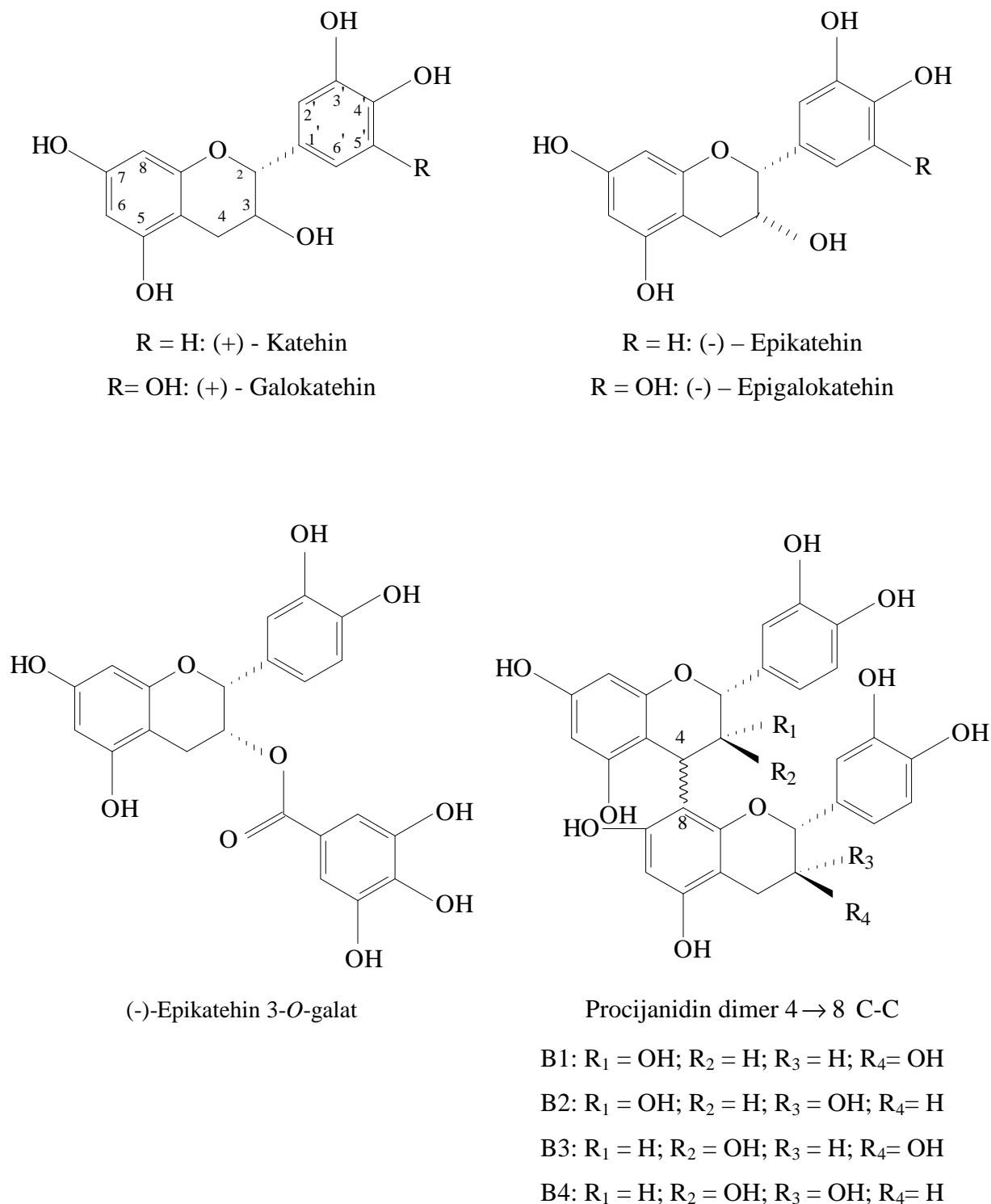
2.3.1. Fenolni spojevi u sjemenkama grožđa

Fenolne tvari u grožđu i vinu su po zastupljenosti treći sastojak nakon ugljikohidrata i voćnih kiselina. Njihov sastav ovisi o dijelu iz kojeg su izolirani (pulpa, kožica, sjemenke, peteljka) i o tehnološkim uvjetima vinifikacije [68, 69]. Od ukupnih fenolnih tvari koje je moguće ekstrahirati iz grožđa, 10% je u pulpi, 60-70% u sjemenkama grožđa i 28-35% u kožici grožđa [6, 70]. Sjemenke grožđa složene su građe i sadrže oko 40% vlakana, 16% ulja, 11% proteina i 7% polifenolnih spojeva, nešto šećera, mineralnih tvari i dr. [51]. Na sadržaj polifenola utječu i agroekološki faktori kao što su: sorta (veća koncentracija u vinskim sortama nego u stolnom grožđu, crno ili bijelo grožđe), godina proizvodnje (klimatski uvjeti od godine do godine), vinogradski položaj (utjecaj geografskog porijekla grožđa, kemijskog sastava i gnojenja tla) i stupanj dozrijevanja [6]. Tako je dokazano da se najveća koncentracija procijanidin dimera i visokopolimeriziranih proantocijanidina nalazi u ranom stupnju razvitka sjemenki grožđa te da se tijekom dozrijevanja smanjuje [71-73].

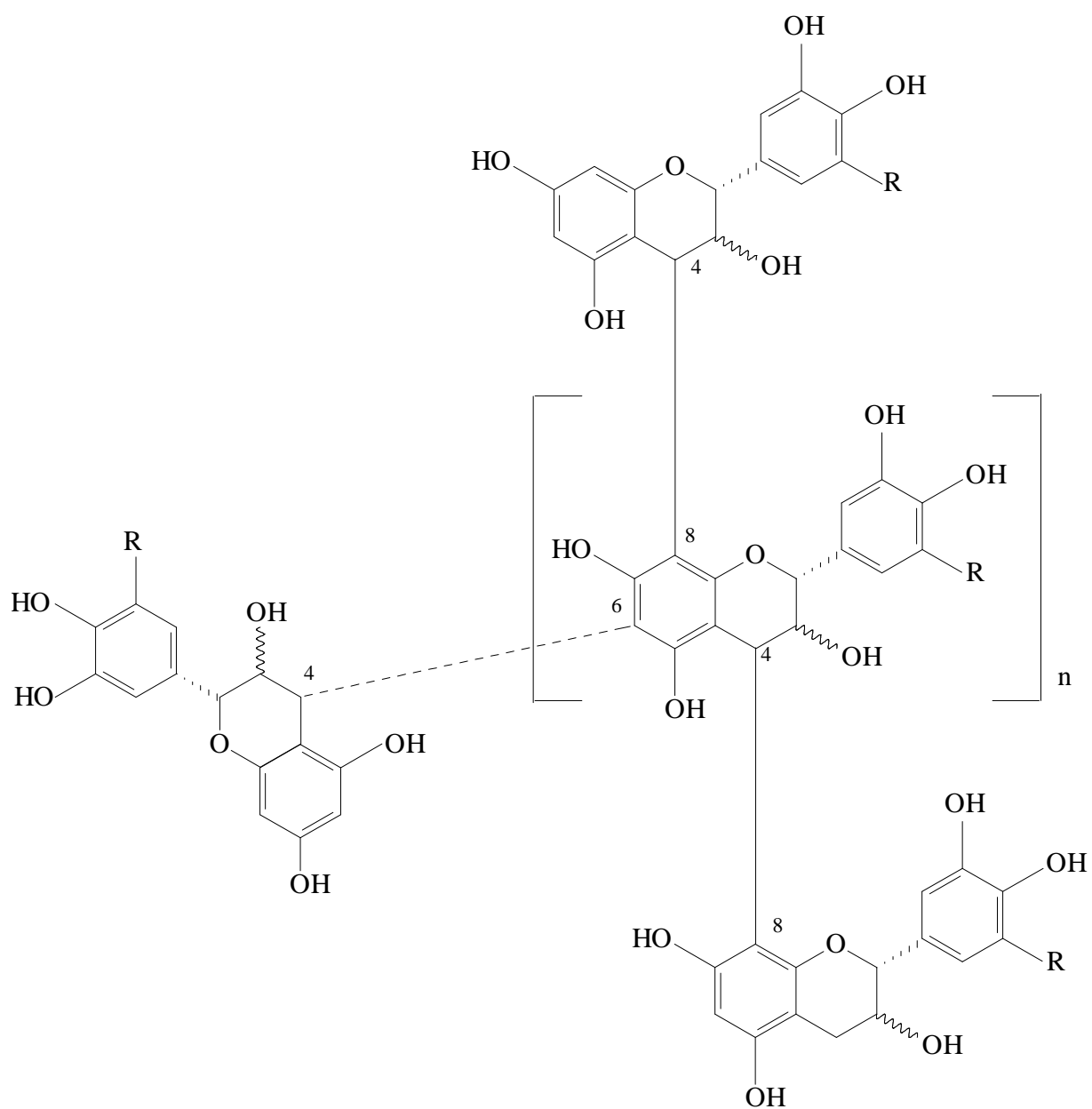
U sjemenkama grožđa od navedenih fenolnih kiselina najzastupljenija je galna kiselina, a od flavonoidnih spojeva najviše su zastupljeni flavan-3-oli koji su odgovorni za oporost i sastav vina [50, 68]. Osim toga, flavan-3-oli sudjeluju u reakcijama posmeđivanja u grožđu i vinu, u reakcijama s antocijanima iz kožice grožđa, stabiliziraju boju crnih vina [74, 75] te imaju antibakterijsko djelovanje [76]. Flavan-3-oli (*Slike 2.6, 2.7*) najčešće se pojavljuju u nekoliko oblika [6, 59, 61, 74, 77, 78]:

- ☞ **monomerni spojevi** - obuhvaćaju (+)-katehin, (-)-epikatehin, epikatehin-3-*O*-galat, (-) – galokatehin i (-)- epigalokatehin,
- ☞ **dimeri, trimeri i tetrameri (procijanidini)** - nastaju povezivanjem monomernih flavan-3-ola 4 → 6 ili 4 → 8 C-C interflavanoidnom vezom. Procijanidin dimeri najčešće se označavaju kao B-serija, a u sjemenkama grožđa identificirano ih je 8 (B1-B8) dok se procijanidin trimeri označavaju kao C serija, a identificirano ih je dva (C₁, C₂). Prema mnogim autorima, glavni proantocijanidin sjemenki grožđa je dimer B2, koji se sintetizira tijekom zrenja grožđa i dostiže najveću koncentraciju u fazi tehnološke zrelosti grožđa, dok su B1, B3 i B4 prisutni u ranom stupnju razvoja sjemenki grožđa [71]. Ostali proantocijanidini (B5-B8) manje su zastupljeni u sjemenkama grožđa ovisno o sortnim karakteristikama,

- ☞ **kondenzirani tanini (proantocijanidini)** – oligomeri i polimeri velike molekularne mase (500-3000) koji nastaju povezivanjem monomernih jedinica flavanola (polihidroksiflavan-3-ola) s ugljik-ugljik (C-C) i eterskim (C-O) vezama. Monomerni flavanoli primarno su povezani s jednom 4→6 ili 4→8 C-C vezom (B serija) ili dvostruko s 4→8 C-C vezom i 2→7(2→5) C-O vezom (A serija). U sjemenkama grožđa najčešće se vežu 4→8 C-C vezama. Broj monomernih jedinica ekstraktibilnih tanina sjemenki grožđa kreće se u rasponu od 2 do 17, a općenito stupanj polimerizacije tanina može biti još veći, međutim, tada se uvelike smanjuje njihova topljivost i ekstraktibilnost zbog kompleksnije strukture [79]. S obzirom na njihovu strukturu, osnovna svojstva [62] koja ih karakteriziraju su: antioksidacijska aktivnost, tvorenje kompleksa s proteinima i keliranje metalnih iona. Od 15 identificiranih potklasa proantocijanidina u sjemenkama grožđa se pojavljuju samo procijanidini koji su polimeri (epi)katehina i prodelefinidini koji su polimeri (epi)galokatehina [61],
- ☞ **tanini koji mogu hidrolizirati** – predstavljaju estere galne kiseline ili galotanine. Mogu se povezivati ugljik-ugljik i eterskim vezama te stvarati dimere, tetramere ili polimere.



Slika 2.6. Monomerni i dimerni fenolni spojevi sjemenki grožđa [62 , 71]



Slika 2.7. Model strukture kondenziranih tanina u sjemenkama grožđa. R = H - procijanidin, R = OH prodelfinidin [79]

2.4. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI

U analizi fenolnih tvari koriste se različite spektrofotometrijske i kromatografske metode.

2.4.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode temelje se na Lambert-Beerovom zakonu:

$$\log\left(\frac{I_0}{I_p}\right) = A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2.20)$$

gdje je:

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

A – apsorbancija

c - koncentracija tvari [mol/m^3]

l - dužina optičkog puta [m]

ε - koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [$\text{m}^3/(\text{mol}\cdot\text{m})$]

Apsorbancija je izravno proporcionalna koncentraciji tvari u otopini pa Lambert-Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije obojenih otopina ili onih kod kojih tijekom reakcije nastaje obojenje. Kada snop paralelnih zraka monokromatskog svjetla prolazi kroz homogenu, tekuću, krutu ili plinovitu tvar, intenzitet svjetlosti se smanjuje zbog toga što ta tvar apsorbira svjetlosno zračenje. Apsorpcija svjetlosnog zračenja ovisi o prirodi tvari koja apsorbira svjetlost, valnoj duljini upadne svjetlosti, temperaturi, debljini sloja tvari, vremenu trajanja reakcije, prisustnosti tvari koje interferiraju, a kad je riječ o otopinama, i o njihovoj koncentraciji. Tu se ne mjere apsolutni iznosi apsorbancije, nego se uspoređuju intenziteti svjetlosti koja prolazi kroz standardnu otopinu poznate koncentracije i ispitivanu otopinu. Spektrofotometrijska mjerenja apsorbancije se provode pri valnim duljinama koje odgovaraju određenom apsorpcijskom maksimumu jer je u toj točki promjena apsorbancije po jedinici koncentracije najveća. Koncentracija ispitivane tvari se određuje prema baždarnoj krivulji koja daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda pri istoj valnoj duljini. Standardne otopine moraju po ukupnom sastavu biti što je moguće sličnije uzorcima pa baždarne krivulje moraju obuhvatiti što veće područje koncentracije uzorka [80, 81].

Razvijene su brojne spektrofotometrijske metode za određivanje bilo ukupnih fenolnih tvari ili specifičnih podgrupa fenolnih spojeva. Metode za procjenu sadržaja polifenola i njihove antioksidacijske aktivnosti uglavnom se temelje na oksido-redukcijskim svojstvima odnosno sposobnosti fenolnih spojeva da djeluju kao reducensi donirajući vodikov radikal ili elektron [82]. Vrijednosti apsorbancija obično su proporcionalne broju reaktivnih fenolnih hidroksilnih grupa, a ovisi i o strukturi molekule, npr. o reaktivnosti individualnog fenolnog hidroksila [83].

Određivanje ukupnih fenolnih tvari u biljnom materijalu najčešće se određuju pomoću dvije spektrofotometrijske metode: Folin-Denisovom i Folin-Ciocalteuovom metodom. Obje metode temelje se na redukciji istoimenih reagensa (smjesa kiselina) u alkalnoj sredini u prisutnosti fenolnih spojeva (oni se oksidiraju), pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks kome se određuje apsorbancija, a iz nje se izračunava koncentracija fenolnih tvari [2 , 6]. Obje navedene metode nisu strogo specifične i detektiraju sve fenolne grupe prisutne u ekstraktima, uključujući i ekstraktibilne proteine. Drugi nedostatak je to što su metode osjetljive na prisutnost interferirajućih tvari (npr. askorbinska kiselina, saharidi) koji također reduciraju navedene reagense [82].

Određivanje flavan-3-ola i proantocijanidina (kondenziranih tanina) u biljnom materijalu najčešće se provodi pomoću vanilin metode koju karakteriziraju specifičnost, jednostavnost i osjetljivost, a kao standard najčešće se koristi katehin. Ta je metoda specifična za spojeve koji imaju jednostruku vezu na poziciji 2,3 i koji imaju slobodnu *m*-hidroksi grupu na B prstenu. Metoda je osjetljivija na polimerne proantocijanidine nego na monomerne jedinice.

Druga često korištena metoda za određivanje proantocijanidina temelji se na reakciji s otopinom kiselina-butanol, pri čemu se proantocijanidini pretvaraju u crveno obojene antocijanidine čija se apsorbancija određuje spektrofotometrijski. Ta metoda specifična je za proantocijanidine s obzirom na to da flavan-3-oli i drugi fenoli ne daju crveno obojeni pigment [62].

Treća metoda prikladna za određivanje proantocijanidina temelji se na stvaranju zeleno obojenog kompleksa između katehina i 4-(dimetilamino)-cimetaldhida (DMCA). Prednost metode je to što DMCA ne reagira s mnogim flavonoidnim spojevima (dihidrohalkonima, flavononima, flavonolima, fenolnim kiselinama), međutim, reagira s indolima i terpenima. U odnosu na vanilin metodu, jednako je osjetljiva za monomerne i polimerne flavanole [2].

2.4.2. Kromatografske metode

Kromatografske tehnike služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama. Postoje brojne kromatografske tehnike, a svima je zajedničko postojanje stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze koja može biti plin (plinska kromatografija) ili tekućina (tekućinska kromatografija). Princip metode je taj da sastojke koji se identificiraju i kvantificiraju nosi mobilna faza preko stacionarne faze, a odjeljivanje sastojaka temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja stacionarnom fazom. Od kromatografskih metoda za određivanje fenola osnovne su plinska kromatografija (*engl. Gas Chromatography - GC*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High-Performance Liquid Chromatography - HPLC*) i tankoslojna kromatografija (*engl. Thin Layer Chromatography - TLC*). Koja će se od navednih metoda upotrijebiti, ovisi o vrsti fenola koji se određuju, materijalu iz kojeg se određuju (voda, hrana, itd.), obliku u kojem se nalaze u ispitivanom uzorku itd. Pri spomenutim metodama u određivanju fenolnih spojeva javljaju se teškoće u analizi fenolnih spojeva zbog različitih svojstava fenola (npr. njihova polarnost) koje mogu izazvati probleme tijekom izolacije iz matriksa (voda, zemlja, hrana), kao i tijekom determinacije u kromatografskim kolonama. Kromatografske tehnike su vrlo precizne i točne, ali često puta je teško identificirati sve fenolne spojeve u nekom uzorku u prihvatljivom vremenu i cijeni analize [83].

2.4.2.1. Konvencionalna kromatografija

Konvencionalna kromatografija uključuje kromatografiju na papiru, u punjenim kolonama i tankoslojnu kromatografiju koje se koriste za separaciju i pročišćavanje mnogih fitokemikalija s dobrim antioksidacijskim svojstvima. Zbog teškoća u detekciji, kvantifikaciji i osjetljivosti, papirna kromatografija se danas manje koriste nego prijašnjih godina. Tankoslojna kromatografija i otvorena kolonska kromatografija (*engl. Column Chromatography - CC*) još se koriste za separaciju mnogih antioksidativnih fitokemikalija zbog praktičnosti, niske cijene i istodobne separacije i detekcije velike količine uzoraka te raspoloživosti novih stacionarnih faza. Glavnina TLC i CC aplikacija je u frakcioniranju i preliminarnoj separaciji antioksidativnih fitokemikalija prije separacije, kvantifikacije i identifikacije HPLC-om ili drugim visokodjelotvornim separacijskim tehnikama. Multiple mobilne faze u 2D ili običnoj TLC su prikladne za dobru separaciju antioksidativnih karotenoida iz složenijeg biljnog materijala ili

ekstrakata. Međutim, TLC i CC zahtijevaju veliku količinu uzorka pa to može ograničiti njihovu uporabu u slučajevima gdje su količine uzorka male. TLC je jedna od glavnih tehnika za frakcioniranje lipida [1, 9].

2.4.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Princip tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*engl. High-Performance Liquid Chromatography*) je to da se pod visokim tlakom u sustavu, uzorak nosi pokretnom (mobilnom) fazom preko preko stacionarne faze u koloni, pri čemu se na osnovi specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija komponente uzorka različito zadržavaju u koloni [80]. Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) ovisi o prirodi supstance koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze te je karakteristično za određenu tvar. S obzirom na polarnost stacionarne i mobilne faze, razlikuju se normalno-fazna kromatografija (polarna stacionarna i nepolarna mobilna faza) i reverzno-fazna kromatografija (nepolarna stacionarna i polarna mobilna faza). HPLC se pokazala najpopularnijom tehnikom za separaciju antioksidativnih komponenti različitog biljnog materijala. Svestranost te tehnike omogućena je različitim separacijskim modovima, tipovima detektora (UV/Vis, PDA, elektrokemijski detektor, fluorescentni detektor, maseni spektrometar).

Određivanje fenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Za separaciju fenolnih kiselina i flavonoida kromatografski uvjeti HPLC metode uključuju gotovo uvijek reverzno-faznu C18 kolonu i UV/Vis detektor te gradijentnu eluciju. Kolone su obično dugačke od 100 do 300 mm s veličinom čestica punjenja do 5 do 10 μm . Iako postoje različite mobilne faze, najčešće se primjenjuje binarni sustav koji uključuje jednu vodenu komponentu (otapalo A) i manje polarno organsko otapalo, kao što je acetonitril ili metanol (otapalo B). U mobilnu fazu se obično dodaje kiselina (mravlja, fosfatna ili octena) zbog boljeg razdvajanja spojeva. Kod reverzno-fazne tekućinske kromatografije zbog nepolarne stacionarne faze polarni spojevi ne raegiraju s njom te eluiraju prvi, a potom slijede manje polarni spojevi (npr. fenolne kiseline eluiraju prije flavonoida). Kad je riječ o fenolnim kiselinama, polarnost raste ako su hidroksilne skupine u *p*-poziciji, odnosno u *o*- i *m*- pozicijama. Metoksi skupine u strukturi fenolnih tvari smanjuju polarnost, što uzrokuje povećano retencijsko vrijeme. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih tvari uzorka razdvojenih na koloni temelji se na usporedbi njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarda [9, 56, 64, 84].

Kombinacija HPLC tehnike i voltametrije uspješno je korištena za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju flavonoidnih i neflavonoidnih fenola vina. Strukturna karakterizacija fenolnih

spojeva u različitom biljnom materijalu (sjemenke grožđa, šljive, soja, maslinovo ulje) uspješno se provodi s HPLC–ESI-MS sustavom (ESI -elektron sprej ionizacija, MS - maseni spektrometar) [2].

2.4.2.3. Plinska kromatografija

Različite tehnike plinske kromatografije (GC) korištene su za separaciju i kvantifikaciju fenolnih kiselina, izoflavona, fenolnih aldehida, monomernih flavanola i kondenziranih tanina. Priprema uzorka za GC uključuje uklanjanje lipida; oslobađanje fenolnih spojeva iz estera i glikozida pomoću lužina, kiselina ili enzimskom hidrolizom; kiselinsku depolimerizaciju proantocijanidina [1, 2]. Međutim, unatoč visokoj rezoluciji i osjetljivosti GC, zbog nedovoljne hlapljivosti većine biljnih antioksidanasa (npr. fenolne tvari) javljaju se teškoće u separaciji pa je ta metoda manje popularna u određivanju fenolnih tvari od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Zato je transformacija fenola u hlapljivije derivate poželjna, iako ona s druge strane može biti dodatni izvor pogrešaka u analizi. Postoje brojne metode derivatizacije: metilacija, trifluoracetilacija, alkiliranje, itd. [85].

2.4.2.4. Kromatografija superkritičnim fluidima

Kromatografija superkritičnim fluidima (SCFC) je relativno nova tehnika slična HPLC-u koja zbog korištenja fluida u superkritičnom stanju kao mobilne faze ima određene prednosti pred HPLC i GC metodama. Prednosti se odnose na smanjenu količinu otpadnog otapala, nisku cijenu, neotrovnost i nezapaljivost superkritičnog fluida (najčešće CO₂), lakoću razdvajanja superkritičnog fluida i separirane komponente, veći difuzitet antioksidacijskih fitokemikalija kroz superkritični fluid zbog manje viskoznosti u odnosu na tekuću mobilnu fazu, dok se parametri kao što su temperatura, tlak i sastav fluida mobilne faze mogu mijenjati tijekom procesa, što daje bolju separaciju. Ta se tehnika najčešće koristi za separaciju lipofilnih antioksidanasa kao npr. separaciju sastojaka iz ulja sjemenki grožđa (masne kiseline, karoten, tokoferol itd.), pomoću superkritičnog CO₂ koji je nepolaran. Visoko polarni spojevi kao npr. polifenoli su jedva topljivi u superkritičnim fluidima, što otežava separaciju ovom tehnikom, a to je praćeno dugim retencijskim vremenom i širokim pikovima pa treba dodavati kootapalo, kao što je opisano u ekstrakciji superkritičnim fluidima (*poglavlje 2.1.2.1.*) [8, 51, 86].

2.4.2.5. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (*engl. Capillary Electrophoresis - CE*) je relativno nova metoda koja je sve popularnija zbog nekih prednosti, a predstavlja alternativnu metodu za analizu različitih antioksidativnih fitokemikalija. Zahtjeva vrlo malo uzorka, omogućava visku učinkovitost zbog neparabolne fronte otapala, kraće vrijeme analize, a koristi malo ili ništa organskog otapala s obzirom na HPLC. Separacija se temelji na razlici između omjera mase i naboja spojeva i stvaranja kompleksa sa tetraboratnim molekulama kada fenolni spojevi sadrže *o*-hidroksilne grupe. Kapilarna zonska elektroforeza (CZE) je najjednostavnija metoda i koristi se u separaciji različitih tipova antioksidativnih fitokemikalija posebno fenolnih spojeva (katehin, epikatehin, galna kiselina, itd.) iz vina i sjemenki grožđa. CE tehnologija rapidno se razvija pa se već koriste hibridne tehnike kombinirajući kruto-fazni matriks (C18 i C30 polimeri) s visoko voltažnom elektroforezom, poznate pod nazivom kapilarna elektrokromatografija [9].

2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH TVARI

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i tako sprečavaju nastanak oksidacijskog stresa uslijed narušene ravnoteže prooksidans-antioksidans. Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci, zbog čega su vrlo reaktivni pa mogu prouzročiti oksidaciju okolnih biomolekula (proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinskih kiselina). Vezivanjem slobodnih radikala na spomenute organske molekule mogu nastati novi spojevi, također sa svojstvima radikala i mogućnošću pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija što u konačnici može rezultirati oksidacijskim stresom. Slobodni radikali nastaju kao posljedica normalnih biokemijskih procesa u tijelu, ali i kao posljedica povećanog izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobioticima. Njihovo nagomilavanje u organizmu narušava zdravlje i ubrzava starenje pa organizam postaje podložniji brojnim degenerativnim promjenama. Od slobodnih radikala relevantnih za oksidaciju najčešći su: lipidni peroksil radikal (LO_2^{\bullet}), superoksid radikal anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal, (HO^{\bullet}), hidroperoksil radikal (HO_2^{\bullet}) te aktivni oblici dušika ($HOONO$, NO , NO_3) [9, 56, 57, 87].

Isto kao i u ljudskom organizmu, neželjeni procesi oksidacije nisu poželjni ni u hrani, posebno onoj životinjskog podrijetla. Lipidna peroksidacija je najčešći mehanizam narušavanja

kvalitete hrane, posebno u hrani s visokim udjelom masti (dvostruke C-C veze)[88 , 89]. Može se odvijati enzimatskim (uz prisustvo lipooksigenaza) i neenzimatskim putem (autooksidacija, fotooksidacija).

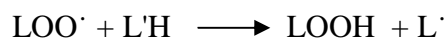
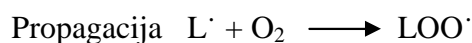
Autooksidacija (*Slika 2.8.*) je najčešći proces oksidativne razgradnje koja se odvija spontano u prisutnosti kisika, a odvija se u tri stupnja:

a) inicijacija - stvaranje slobodnih lipidnih (alkil-L \cdot) radikala. Privlačenje vodikova atoma reaktivnom skupinom kao što je hidroksil radikal (OH \cdot) od lipidne molekule (LH) može dovesti do inicijacije lipidne oksidacije.

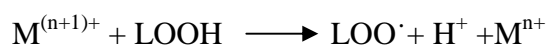
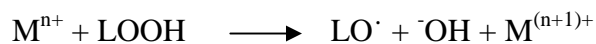
Sekundarna inicijacija homolitičkom razgradnjom hidroperoksida je relativno niskoenergetska reakcija i predstavlja glavnu inicijacijsku reakciju u jestivim uljima. Ta reakcija je redovito katalizirana metalnim ionima [90],

b) propagacija - lančana reakcija alkil radikala (L \cdot) i peroksil radikala (LOO \cdot),

c) terminacija - stvaranje neradikalnih produkata jer su slobodni radikali potpuno potrošeni i prekida se lančana reakcija slobodnih radikala.



Inicijacija katalizirana metalom

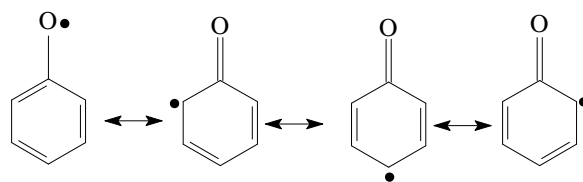
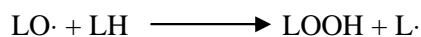
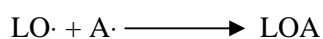
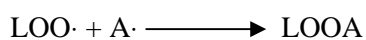
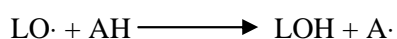
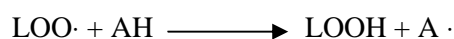


Slika 2.8. Mehanizam lipidne autooksidacije [90]

Nakon lipidne peroksidacije u inicijalnom stupnju kao produkti nastaju hidroksiperoksidi bez mirisa i okusa. Budući da su to relativno nestabilni spojevi, razgrađuju se spontano ili u kataliziranim reakcijama do alkohola, karbonilnih i karboksilnih spojeva (sekundarni produkti) koji izazivaju nepoželjan miris i okus hrane (užeglost) koji ovisi o opsegu oksidacije, tipu masne kiseline, itd. Osim neželjenog mirisa i okusa, oksidativna razgradnja može prouzročiti i bijeljenje hrane zbog reakcije slobodnih radikala sa pigmentima. Zbog toga se antioksidansi često dodaju kao aditivi hrani tijekom procesiranja u svrhu poboljšavanja kvalitete i stabilnosti prehrambenih proizvoda.

Posljednjih godina povećao se interes prehrambene industrije za korištenjem antioksidanasa iz prirodnih izvora (polifenolni spojevi iz biljaka, voća i povrća, žitarica), zato što se prema rezultatima mnogih istraživanja pretpostavlja da su sintetički antioksidansi koji su se koristili u prehrambenoj industriji (npr. butilhidroksi toluen-BHT i butilhidroksi anizol-BHA) kancerogeni [8, 74, 91].

Fenolni antioksidansi (AH) su dobri donori vodika ili elektrona i pretpostavlja se da sprečavaju lipidnu oksidaciju jer reagiraju s lipidnim radikalom i reduciraju ga (*Slika 2.9. a*), pri čemu nastaje fenoksi radikal ($A\cdot$) koji mora biti stabilan da ne bi poticao daljnje lančane reakcije (*Slika 2.9. b*). Fenoksi radikali obično se stabiliziraju delokalizacijom elektrona stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom [57].



a)

b)

Slika 2.9. Inhibicija lipidne autooksidacije uz prisustvo fenolnog antioksidansa (AH) (a) i rezonantne strukture fenoksi radikala ($A\cdot$) (b)

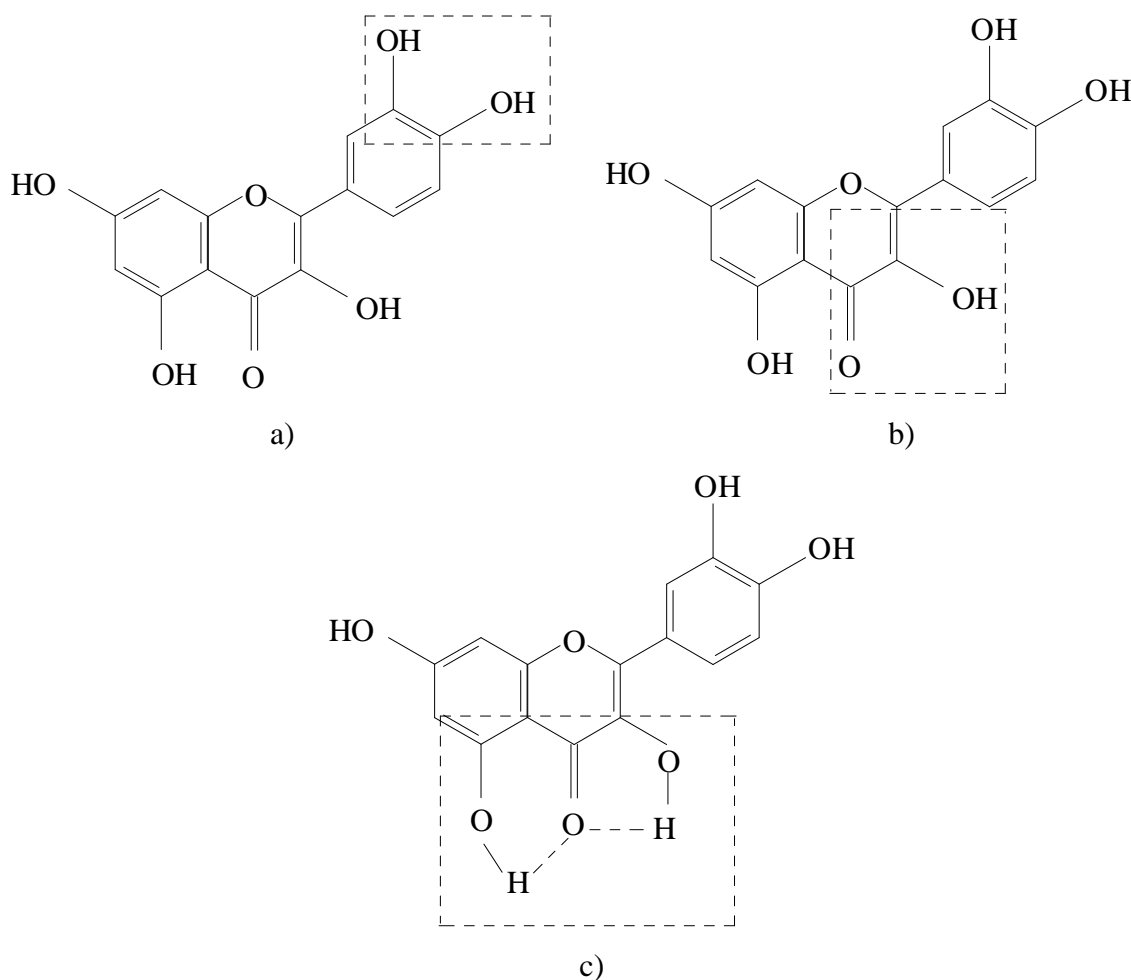
2.5.1. Utjecaj strukture fenolnih spojeva na antioksidacijsku aktivnost

Fenolni spojevi u biološkim sustavima mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko načina [40, 59, 60, 91]: hvatanjem elektrona slobodnog radikala, keliranjem metala, inhibicijom peroksidaza, aktiviranjem antioksidacijskih enzima. Njihova antioksidacijska aktivnost uvelike ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina i opsegu strukturnih konjugacija kao i o prisustvu elektron-donorskih i elektron-akceptorskih supstituenata na prstenu [56, 92]. Glavne strukturne značajke flavonoida o kojima ovisi antioksidacijskoj aktivnosti [57, 59] su sljedeće:

- ☞ postojanje vicinalnih hidroksilnih skupina na prstenu B u položajima 3'- i 4'- (*o*-dihidroksilna ili kateholna struktura). Dodatna skupina na prstenu B ne povećava antioksidacijsku aktivnost, a isto tako jedna hidroksilna skupina rezultira slabom ili gotovo nikakvom antioksidacijskom aktivnošću. Kateholna skupina se u reakciji s radikalom oksidira, pri čemu nastaje stabilizirani *o*-semikinonski radikal zbog delokalizacije elektrona. Pretpostavka je da su flavanoli jači hvatači slobodnih radikala nego flavoni, i to zbog većeg broja hidroksilnih skupina i OH-skupine u položaju 3-. Utjecaj hidroksilnih skupina na prstenu A nije još dovoljno poznat (*Slika 2.10.a*);
- ☞ prsten C pridonosi antioksidacijskoj aktivnosti ako na položaju 3- nosi slobodnu hidroksilnu skupinu jer su takvi fenoli planarni, a planarnost dopušta konjugaciju, delokalizaciju elektrona i povećava stabilnost fenoksilnih radikala. Nezasićenost prstena C, odnosno postojanje 2,3 dvostruke veze u konjugaciji s 4-keto skupinom, dodatno povećava antioksidacijsku aktivnost s obzirom na to da je omogućena rezonancijska stabilizacija preko većeg broja aromatskih jezgara (prsten A i B) (*Slika 2.10.b*);
- ☞ hidroksilne skupine na položaju 3- (prsten C) i 5- (prsten A) osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (*Slika 2.10.c*);
- ☞ metoksi skupine u *o*- položaju smanjuju antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva zbog narušavanja planarnosti uslijed steričkih smetnji;
- ☞ glikozidacija smanjuje antioksidacijsku aktivnost u odnosu na pripadajuće aglikone (struktura bez šećera). Smanjenje antioksidacijske aktivnosti pri tome ovisi o broju i položaju te strukturi molekula šećera;
- ☞ stupanj polimerizacije, općenito, ima pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost, iako zbog kompleksnije strukture polimernih flavonoida (tanina) još uvijek nije detaljno razjašnjena povezanost njihove strukture i antioksidacijske aktivnosti. Od flavonoidnih

spojeva najveću antioksidacijsku aktivnost imaju flavanoli i to posebno skupina procijanidina koji se sastoje od jedinica katehina, epikatehina i njihovih esterificiranih derivata (najčešće kao *O*-galati) zbog konjugacije između 3-OH skupine i kateholne skupine B prstena te 4→8 C-C veze između monomera, što povećava stabilnost njihova radikala [58, 78, 91]. Međutim, dokazno je da veliki polimeri imaju manju antioksidacijsku aktivnost zbog steričkih smetnji [55, 88];

- ☞ stvaranje kelatnih kompleksa s ionima metala (bakar, željezo, kobalt) povećava antioksidacijsku aktivnost sprečavanjem metalnih iona da sudjeluju kao katalizatori u Fentonovim reakcijama u kojima mogu nastati visokoreaktivni hidroksilni radikali koji brzo oksidiraju okolne biomolekule.



Slika 2.10. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala [57]

2.5.2. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata

Određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata do danas nije sasvim zadovoljavajuće i rezultiralo je velikim brojem različitih analitičkih metoda za određivanje antioksidacijskog potencijala. Elektronspin rezonantna spektroskopija je jedina analitička tehnika kojom se može izravno mjeriti hvatanje slobodnih radikala [56]. U praksi je, međutim, češće neizravno mjerenje antioksidacijske aktivnosti, a metode se najčešće temelje na određivanju sposobnosti hvatanja aktivnih vrsta kisika, određivanju sposobnosti hvatanja sintetičkih radikala te enzimskom i neenzimskom mjerenju inhibicije lipidne peroksidacije. Precizna usporedba rezultata i njihova općenita interpretacija je gotovo nemoguća zbog razlika u eksperimentalnim uvjetima te razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima supstrata koji oksidiraju u prisustvu slobodnih radikala. Antioksidacijska aktivnost ovisi o brojnim faktorima kao što su: koloidna svojstva supstrata, reaktivnost medija, oksidacijski status, lokalizacija antioksidansa u različitim fazama. S obzirom na supstrat, metode se općenito dijele na metode s lipofilnim i metode s hidrofilnim supstratima [57, 82].

Metode za procjenu udjela fenolnih tvari u biljnim ekstraktima i njihove antioksidacijske aktivnosti uglavnom su temeljene na redoks svojstvima, odnosno na sposobnosti fenolnih spojeva da djeluju kao reducensi donirajući vodikov atom ili elektron reaktivnim radikalima [82]. Određivanje antioksidacijske aktivnosti *in vitro* u biljnim ekstraktima najčešće se provodi pomoću tri spektrofotometrijske metode, koje se temelje na oksidaciji antioksidacijskog spoja specifičnim neprirodnim radikalom [82, 93–95]. To su:

1. **TEAC metoda** (*engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) koja se temelji na pH neovisnoj reakciji plavo-zelenog 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonatnog radikal kationa (ABTS⁺) s antioksidacijskim spojem koji donira atom vodika ili elektron pri čemu nastaje bezbojni ABTS. Obezbojavanje radikal kationa je praćeno smanjenjem apsorbancije koja se mjeri pri 734 nm. Smanjenje koncentracije ABTS⁺ proporcionalno je koncentraciji prisutnog antioksidansa, a antioksidacijska aktivnost izražava se u ekvivalentima Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina; u vodi topljiv analog vitamina E) koji se koristi kao standard. Prednost je te metode velika reaktivnost ABTS reagensa, međutim, on je isto tako relativno nestabilan i lako se razgrađuje pod reakcijskim uvjetima, što se očituje u smanjenju apsorbancije tijekom duljeg vremena inkubacije te pridonosi pogrešnoj interpretaciji rezultata;

2. FRAP metoda (*engl. Ferric Reducing/Antioxidant Power*) koja se temelji na sposobnosti antioksidacijskih spojeva da reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} u prisustvu željeznog 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazina (TPTZ) pri čemu se stvara plavo obojeni Fe^{2+} -TPTZ kompleks sa apsorpcijskim maksimumom 593 nm. Reakcija ovisi o pH i optimum joj je pri pH 3,6. Apsorpcija se eksponencijalno povećava s povećanjem nastajanja obojenog kompleksa, a najčešće se kao standard koristi željezo(II)-sulfat. Trolox se može također koristiti kao standard;
3. DPPH metoda se temelji na sposobnosti antioksidacijskog spoja da donira vodikov atom slobodnom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH \cdot) koji se reducira, pri čemu se njegova ljubičasta boja postupno mijenja preko zelene do žute, što se prati smanjenjem apsorbanije pri 515 nm. Ako se koristi kalibracijska krivulja, Trolox se koristi kao standard. Postoje dva načina određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom: statički i dinamički.

Statički način podrazumijeva određivanje antioksidacijske aktivnosti, grafički ili numerički, nakon određenog vremena reakcije između DPPH \cdot radikala i uzorka, a rezultat se najčešće izražava kao % inhibiranog ili zadržanog DPPH \cdot u reakcijskoj smjesi ili % obezbojenja reakcijske otopine. Dinamički način podrazumijeva praćenje kinetike reakcije DPPH \cdot radikala i ekstrakta (uzorka) do postizanja ravnotežnog stanja te određivanje brzine reakcije iz nagiba pravca na početku reakcije ($t \sim 0$ minuta).

Rezultat se najčešće prikazuje kao EC_{50} (IC_{50}) koji predstavlja koncentraciju antioksidansa pri kojoj se početna koncentracija DPPH \cdot radikala smanji na 50%. Što je ta vrijednost manja, antioksidacijska aktivnost je veća. Međutim, vrijeme za koje se postiže ravnotežno stanje upravo ovisi o koncentraciji antioksidansa pa se za izražavanje antioksidacijske aktivnosti uvodi još jedan parametar, antiradikalna učinkovitost (AU) koja se izračunava prema izrazu [82, 89]:

$$AU = \frac{1}{EC_{50}} \cdot t_{EC_{50}} \quad (2.21)$$

Budući da grafička metoda često nije dovoljno precizna i točna [83], u novije vrijeme se koriste numeričke metode za određivanje konstanti brzine i ostalih kinetičkih parametara reakcijskog sustava DPPH-ekstrakt.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakta određena ovom metodom nešto je nižih vrijednosti u odnosu na TEAC metodu [83]. Razlog tome je velika stabilnost DPPH·, a time i manja reaktivnost. To znači da ovaj radikal bolje reagira u prisustvu jače reaktivnih fenolnih supstanci dok manje reaktivne ne detektira.

2.6. BOJA BILJNIH EKSTRAKATA

Boja biljnih ekstrakata može potjecati od prirodno prisutnih obojenih pigmenata u biljci, ali i od neobojenih spojeva [96]. Prisutnost konjugiranih nezasićenih dvostrukih veza zajedničko je obilježje obojenih tvari, a obojenost ovisi o njihovom rasporedu. Prema Wittovoj teoriji (1876.) [97] sve obojene tvari moraju sadržavati barem jednu atomsku grupu (etenska, azometinska, azo, keto, nitrozo, nitro, tio karbonilna, kinoidna) koja dovodi do selektivne apsorpcije svjetlosti, a time i do obojenosti tvari. Glavni polifenolni pigmenti u biljnom materijalu su antocijani od kojih potječe crveno, purpurno i plavo obojenje, a potom slijede žuto obojeni flavoni i flavonoli [55]. Stabilnost boje antocijana ovisi o kombinaciji više faktora (strukтури i koncentraciji antocijana, te o procesnim uvjetima: pH, temperaturi, prisutnosti kisika i enzima), a neka istraživanja pokazala su da su molekularne reakcije kopigmentacije antocijana s drugim spojevima (kopigmentima) glavni mehanizam stabilizacije boje. Kopigmenti su spojevi koji su uglavnom bezbojni, a najčešće su to flavonoidi, alkaloidi, amino kiseline, organske kiseline, polisaharidi, metali ili sami antocijani [98–101].

Grožđe predstavlja dobar izvor antocijana (crne sorte) kojih u većoj količini ima u kožici i bezbojnih flavan-3-ola (katehini, proantocijanidini) koji su zastupljeniji u sjemenkama grožđa. Tijekom proizvodnje vina ti spojevi se ekstrahiraju u vino i pri starenja vina sudjeluju u različitim reakcijama (oksidacija, kondenzacija i polimerizacija) od kojih su za definiciju i stabilnost boje vina najvažnije reakcije kopigmentacije [72, 102]. Novija istraživanja, međutim, pokazuju da flavanol-antocijan kondenzirani pigmenti ne moraju nužno biti produkti formirani tijekom skladištenja i starenja vina, nego da mogu biti prirodni pigmenti biljaka, ali postoji i mogućnost njihovog stvaranja "in vitro" tijekom ekstrakcije, kada je moguća reakcija karbokationa proantocijanidina s antocijanima [103].

Boja predstavlja osjet vida koji nastaje kad svjetlost karakterističnog spektra pobudi receptore u mrežnici oka pa se može smatrati da je ona rezultat interakcije između svjetlosti, objekta i promatrača [104, 105]. Percepcija boje pri tome ovisi o spektralnom sastavu svjetla koje pada na određeni objekt, površini osvijetljenog objekta i molekularnoj strukturi materijala,

odnosno o njihovim svojstvima apsorpcije, refleksije ili emisije svjetlosnog spektra [106]. Ljudsko oko reagira samo na vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja kojem odgovaraju valne duljine od 380 do 770 nm. Padne li takvo svjetlo na potpuno bijel objekt, on će reflektirati sve valne dužine pa će i svjetlosne zrake odbijene od njega izgledati bijelo. Obrnuto, ako objekt apsorbira sve valne duljine, a niti jednu ne reflektira, izgledat će crn. Objekt koji apsorbira sve valne duljine osim one koja definira neku određenu boju npr. crvenu, te nju reflektira, izazvat će promatraču osjet upravo te boje. Prema tome, boja je rezultat reflektirane svjetlosti s površine nekog objekta.

Svaka boja može se uže okarakterizirati trima osnovnim svojstva [96, 97]:

- ☞ **ton boje ili tonalitet** (h – *hue*) - predstavlja boju koju opisujemo kao zelena, plava, žuta ili crvena, a ovisi o kemijskom sastavu tvari. Takva percepcija rezultat je razlike u apsorpciji svjetlosne energije na različitim valnim duljinama. Tako ako se svjetlosne zrake kraćih valnih duljina (400-500) nm reflektiraju s nekog objekta većim intenzitetom u odnosu na druge valne duljine, boja se opisuje kao plava. Žutom i zelenom bojom opisuje se refleksija zraka srednjeg ranga valnih duljina, a crvenom bojom maksimalna refleksija zraka valnih duljina 600 - 700 nm;
- ☞ **svjetlina ili luminiscencija** (L – *value*, engl.: *lightness*) - predstavlja odnos između reflektirane i apsorbirane svjetlosti bez obzira na valnu duljinu, a ovisi o intenzitetu zračenja. Ovim obilježjem definira se razlika između svijetlih i tamnih boja;
- ☞ **kromatičnost ili zasićenost, intenzitet** (C^* - *chroma*, engl. *colorfulness, saturation, purity, intensity*) - označava stupanj zasićenosti nekog tona. Na osnovi zasićenosti, boje se dijele na akromatske ili neboje (bijela, siva, crna) i kromatske boje ili prave boje. Kromatičnost se odnosi na refleksiju pri određenoj valnoj duljini i ukazuje na različitost neke boje od sive, koja se smatra nezasićenom ($C^* = 0$). Nadalje, ona ovisi o "čistoći boje" te se pomoću ovog obilježja razlikuju jasne od nejasnih boja. Boja može imati istu svjetlinu i ton, a pri tome se razlikovati po zasićenosti bojom.

Budući da je ljudska percepcija boje subjektivni doživljaj koji ovisi o prilagođenosti promatračevog oka, za objektivno odnosno numeričko vrednovanje boja i razlika u bojama vrlo je važna metrika boje [104]. U tu svrhu razvijeni su stabilni, prenosivi mjerni instrumenti visoke osjetljivosti kojima se lako rukuje, a koji za mjerenje boje koriste različite matematičke sustave za boju (CIE- xyY , CIE- XYZ , CIE- LUV , CIE- $L^*a^*b^*$, Hunter-*Lab*) što ih je odobrila Međunarodna komisija za svjetlo i rasvjetu (CIE – *Commission Internationale de l'Eclairage*).

Za određivanje boje biljnih ekstrakta, vina i različitih prehrambenih proizvoda, najčešće je korišten CIE- $L^*a^*b^*$ sustav koji je CIE preporučio 1976. godine. Navedeni sustav je vrlo učinkovit u praćenju razlike i promjene boje tijekom procesiranja i skladištenja prehrambenih materijala zato što je kompatibilan s percepcijom ljudskog oka, za razliku od ostalih navedenih sustava [107, 108]. Tako ukupna promjena boje (ΔE^*) predstavlja udaljenost između dviju točaka koje opisuju boje u prostoru boja, a vrijednost $\Delta E^* = 1$ [105] je određena kao prag uočavanja razlike boje percepcijom ljudskog oka (*engl. JND, Just Noticeable Difference*) (**Tablica 2.2**).

Tablica 2.2. Odnos između izračunane vrijednosti (ΔE^*) i tolerancije ljudskog oka za uočavanje razlike između boja [109]

ΔE^*	uočljivost
< 0,2	nije uočljiva
0,2 – 1	vrlo slabo uočljiva
1 – 3	slabo uočljiva
3 – 6	uočljiva
> 6	vrlo uočljiva

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- ☞ ispitati utjecaj različitih procesnih uvjeta (otapalo, temperatura, omjer kruto-tekuće, veličina čestica, vrijeme) i načina kruto-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom, ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju, ekstrakcija superkritičnim fluidima) na ekstraktibilnost fenolnih komponenti iz sjemenki grožđa, antioksidacijsku aktivnost (*in vitro*) i boju ekstrakata te pokušati odrediti optimalne uvjete ekstrakcije za provedeno istraživanje;
- ☞ ispitati postojanje korelacije između identificiranih i kvantificiranih fenolnih spojeva s određenom antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata, kao i postojanje veze između boje ekstrakata i koncentracije fenolnih tvari u ekstraktima sjemenki grožđa;
- ☞ ispitati primjenjivost određenih matematičkih modela, uspješno korištenih za opisivanje ostalih procesa koji uključuju fenomene prijenosa topline i tvari, na proces kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sjemenke grožđa

U radu su korištene sjemenke vinskih sorti grožđa s područja kontinentalne Hrvatske (podregije Slavonija i Podunavlje), koje su zaostale kao otpadni materijal u procesu proizvodnje vina. Sjemenke su se ručno izdvajale iz kome grožđa (nakon prešanja i odvajanja mošta) koja je dobivena iz vinarija ili privatnih gospodarstava. Ispitivanja su provedena na sjemenkama različitih uzoraka (sorti) grožđa (**Tablica 3.1.**). Svi uzorci kome dobiveni su u roku od 10 dana od berbe grožđa, osim kome grožđa sorte zweigelt (Erduť). Ona je uzorkovana mjesec dana nakon berbe, s obzirom na to da je u tom razdoblju bila tretirana malolaktičkim bakterijama kojima je cilj smanjivanje kiselosti vina. Za uzorak kome mješavine bijelog grožđa MixBG_03 poznato je samo da je u uzorku prevladavala sorta graševina, dok ostale sorte kao ni njihova zastupljenost u uzorku nisu poznate.

Tablica 3.1. Ispitivani uzorci sjemenki dobiveni iz komine grožđa

Uzorak komine	Godina berbe	Kratice
Mješavina bijelih sorti grožđa (Slatinsko vinogorje)	2003.	MixBG_03
Frankovka (Slatinsko vinogorje)	2004.	FS_04
Graševina (Slatinsko vinogorje)		GS_04
Portugizac (Kutjevačko vinogorje)		PK_04
Frankovka (Kutjevačko vinogorje)		FK_04
Frankovka (Slatinsko vinogorje)	2005.	FS_05
Graševina (Slatinsko vinogorje)		GS_05
Graševina (Erdutsko vinogorje)		GE_05
Zweigelt (Erdutsko vinogorje)		ZE_05

3.2.2. Kemikalije

U istraživanju su korišteni Folin-Ciocalteuov reagens, etanol p.a. (96 %), natrij-karbonat p.a., kloridna kiselina p.a. (36,5%) i željezo(II)-sulfat-heptahidrat p.a. (Kemika, Hrvatska) te 1-butanol p.a. i metanol HPLC čistoće (Panreac, Španjolska). Od standarda su korišteni galna kiselina, (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-galokatehin (G6657), *p*-hidroksibenzojeva kiselina (H5376), *p* - kumarinska kiselina (C9008), ferulična kiselina (F3500), kafeinska kiselina (C0625), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal - DPPH[•] radikal (D9132) (Sigma-Aldrich, SAD) te standardi (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokatehin, procijanidin B₂ i *o*-fosforna kiselina (85%, HPLC čistoće) (Fluka, Švicarska).

3.3. METODE

3.3.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju

Prije ekstrakcije, sjemenke grožđa su usitnjene mlinom (MKM 7000, Bosh, Njemačka) s mogućnošću podešavanja finoće mljevenja. Nakon mljevenja, provedeno je klasiranje prosijavanjem radi utvrđivanja raspodjele veličine čestica (granulometrijska analiza) u uzorcima. Prosijavanje je provedeno pomoću tresilice (Fritisch Vibratory Sieve Shaker "Analysette 3", Njemačka) kroz sita s veličinama otvora: 0,630 mm; 0,500 mm; 0,400 mm; 0,160 mm i 0,125 mm. U istraživanju su korištene usitnjene neklasirane sjemenke i sljedeće klase veličine čestica: ($> 0,63$) mm, ($0,63 - 0,4$ mm), ($0,4 - 0,16$) mm i ($< 0,16$) mm. Usitnjene sjemenke grožđa su vakumirane i čuvane u hladnjaku na temperaturi $+4$ °C do provedbe ekstrakcije.

3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari u sjemenkama grožđa

Udio suhe tvari u uzorcima određivan je sušenjem svježe usitjenih neklasiranih i/ili klasiranih uzoraka (5 g) u električnom sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Određivanje je provedeno u dva paralelna ponavljanja za sve uzorke. Udio suhe tvari ($w_{s.t.}$) izražen je u postocima (%), a izračunan je prema sljedećem izrazu:

$$w_{s.t.} = \left(\frac{m_2}{m_1} \right) \cdot 100 \quad (3.1)$$

gdje su :

m_1 – masa uzorka prije sušenja [g]

m_2 – masa uzorka nakon sušenja [g]

3.3.3. Načini kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

U eksperimentalnom radu ispitan je utjecaj tri načina ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa:

- ☞ ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom
- ☞ ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju s 4 različite metode ekstrakcije
- ☞ ekstrakcija superkritičnim fluidima

3.3.3.1. Kruto-tekuća ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji

Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) (*Slika 3.1.*) namijenjena je za laboratorijsku upotrebu koja ima mogućnost podešavanja temperature (od 20 do 99,9 °C), vremena trešnje (od 1 min do 10 h) te frekvencije trešnje (od 20 do 200 rpm).



Slika 3.1. Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23)

Eksperimenti tog načina kruto-tekuće ekstrakcije provedeni su u dva odvojena pokusa radi ispitivanja:

- A) utjecaja otapala, omjera kruto-tekuće, veličine čestica te vremena ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa, odnosno
- B) utjecaja temperature na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.

U oba slučaja, za svaki ispitivani uvjet ekstrakcija je provedena u šest ponavljanja.

A) Ispitivanje utjecaja otapala, omjera kruto-tekuće, veličine čestica i vremena ekstrakcije na prinos fenolnih tvari u ekstraktima sjemenki grožđa

Ekstrakcija fenolnih tvari iz uzorka MixBG_03 provodila se u staklenim epruvetama s čepom (16 x 16 mm) položenim u vodenu kupelj. Eksperimenti kruto-tekuće ekstrakcije postavljali su se u serijama, a u svakoj pojedinoj seriji mijenjao se samo jedan procesni parametar uz ostale konstantne uvjete kako slijedi:

- ☞ **određivanje utjecaja omjera kruto-tekuće** - u epruvete je odvagano oko 0,5 g usitnjenih neklasiranih sjemenki grožđa te je u svaku epruvetu dodan različit volumen otapala (5, 10, 15 ili 20 mL) da bi se dobili različiti omjeri kruto-tekuće (10, 20, 30 ili 40 mL/g) čiji se utjecaj pratio pri različitim temperaturama ekstrakcije (25, 40, 50, 60, 70 i 80 °C) tijekom 120 minuta;
- ☞ **određivanje utjecaja ekstrakcijskog otapala** - omjer kruto-tekuće, 40 mL/g i temperatura 80 °C korišteni su za ispitivanje učinkovitosti ekstrakcijskih otapala: vode i vodenih otopina etanola (50, 70 i 96 %) tijekom 120 minuta;
- ☞ **određivanje utjecaja veličine čestica i vremena** - omjer kruto-tekuće, 40 mL/g i temperatura 80 °C korišteni su za ispitivanje utjecaja veličine čestica: (> 0,63) mm, (0,63 – 0,4) mm, (0,4 – 0,16) i (< 0,16 mm) i vremena ekstrakcije. Utjecaj vremena je praćen na način da je određen maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim nakon 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 i 200 minuta ekstrakcije.

Tijekom ekstrakcije svaka epruveta sa suspenzijom vadila se u intervalima od 15 minuta (osim u slučaju gdje je ekstrakcija trajala kraće) te je protresena na Vorteksu (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija) u trajanju dvadeset sekundi nakon čega je ponovo vraćena na ekstrakciju u kupelj.

B) Ispitivanje utjecaja temperature na prinos fenolnih tvari u ekstraktima sjemenki grožđa

Utjecaj temperature na kinetiku ekstrakcije i ekstraktibilnost ukupnih i individualnih fenolnih tvari praćen je tijekom 200 minuta, dok je utjecaj na ekstrakciju ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina procijenjen analizom ekstrakta dobivenih nakon 200 minuta ekstrakcije.

Ekstrakcija je provođena u vodenoj kupelji s tresilicom uz frekvenciju trešnje od 200 rpm i podešenu željenu temperaturu (25, 40, 50, 60, 70 i 80 °C). Eksperiment za praćenje kinetike je postavljen tako da je u deset Erlenmayer tikvica odvagana jednaka količina uzorka (oko 0,5

g) i dodana jednaka količina 50%-tnog etanola s omjerom kruto-tekuće 40 mL/g, tikvice su začepljene i stavljene u vodenu kupelj.

Kinetika ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari praćena je na sjemenkama grožđa FS_05 veličine čestica ($< 0,63$) mm u vremenu 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 i 200 minuta, a za individualne fenolne tvari u vremenu 10, 30, 60, 120 i 200 minuta.

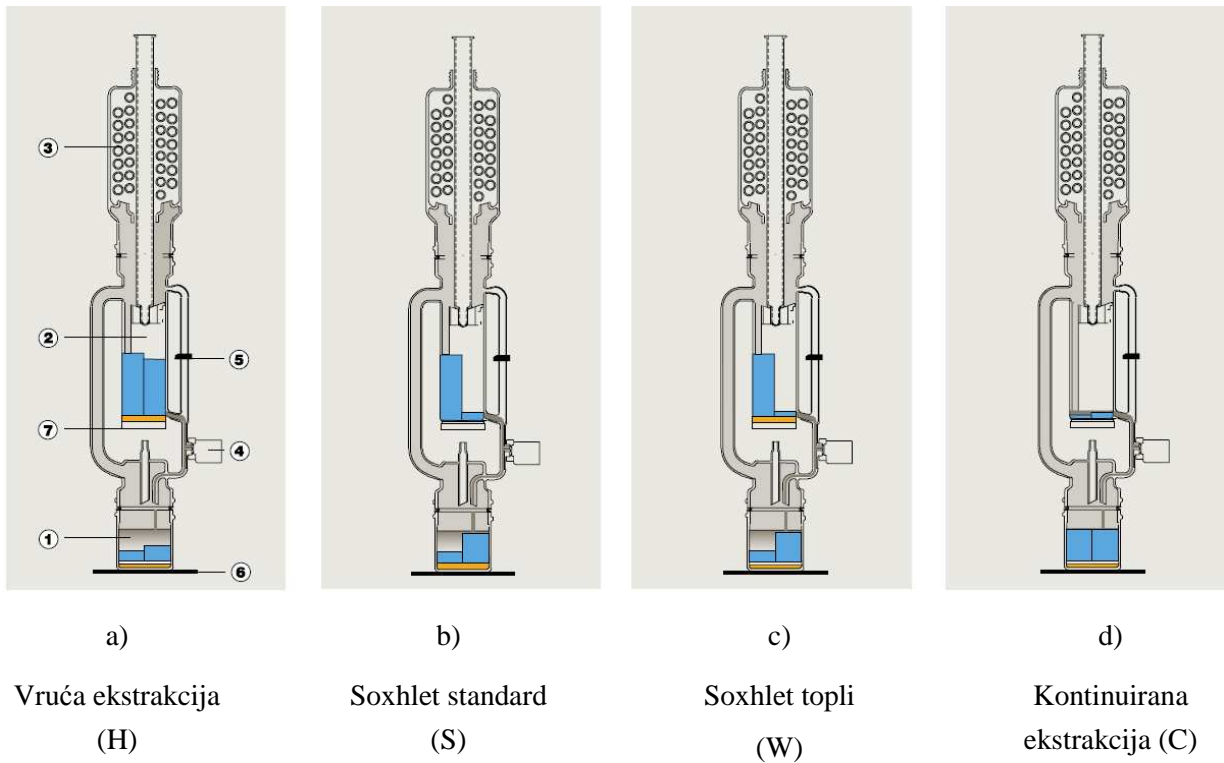
3.3.3.2. Kruto-tekuća ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju

Univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi B-811-LSV, Švicarska) (*Slika 3.2.*) izrađen je za laboratorijsku primjenu kruto-tekuće ekstrakcije, a ima mogućnost ekstrakcije s ispiranjem i sušenjem ekstrakta ili bez njih. Postoji mogućnost odabira vremena ekstrakcije i broja ciklusa, ali ne i temperature ekstrakcije. Naime, ekstrakcija se temelji na vrelištu otapala, pri čemu otapalo isparava, kondenzira se i prelijeva preko uzorka, tijekom čega se odvija ekstrakcija topljivih tvari u primijenjenom otapalu. Prikladan je za otapala s točkom vrelišta od 30 °C do 150 °C.

Uređaj (*Slika 3.3.*) je opremljen sa posudom za otapalo (1), ekstrakcijskom čahuricom (fritom) za kruti uzorak (2) koja se polaže u ekstrakcijsku komoru, hladilom (3), staklenim ventilom (4), optičkim senzorom (5) te donjim (6) i gornjim (7) grijačem. Podesivi optički senzor u kombinaciji s ventilom od inertnog stakla daje mogućnost izvođenja četiri metode kruto-tekuće ekstrakcije koje su i korištene u ovom istraživanju (Vruća ekstrakcija, Soxhlet standard, Soxhlet topli, Kontinuirana ekstrakcija).



Slika 3.2. Univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi B-811_LSV)



Slika 3.3. Shematski prikaz četiri metode ekstrakcije univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi

Princip

Vruća ekstrakcija (H) (Slika 3.3.a). Otapalo isparava iz posude za otapalo zbog grijanja donjim grijačem, pare se dižu do hladila gdje se kondenziraju i otapalo se preko kondenzacijske cijevi prelijeva preko uzorka, nakuplja se u ekstrakcijskoj komori, gdje se odvija ekstrakcija iz uzorka i pri tom se grije gornjim grijačem. Kada nivo otapala dosegne visinu optičkog senzora koji upravlja otvaranjem/zatvaranjem staklenog ventila u posudu s otapalom vraća se samo nekoliko mililitara otapala, a ostatak ostaje u kontaktu s uzorkom. Na taj način postiže se to da u ekstrakcijsku komoru stalno dolazi svježije otapalo, čime se sprečava zasićenje otapala u ekstrakcijskoj komori.

Soxhlet standard (S) (Slika 3.3.b). Otapalo isparava iz posude, pri čemu se pare se dižu do hladila, kondenziraju i kondenzirano otapalo prelijeva se preko kondenzacijske cijevi u uzorak koji se nalazi u ekstrakcijskoj čahuri. Stakleni ventil je zatvoren. Ekstrahiraju se tvari topljive u otapalu koje se zadržava u kontaktu s uzorkom sve dok nivo otapala ne dosegne visinu na koji je postavljen optički senzor, kada se otvara stakleni ventil i otapalo s ekstrahiranom tvari ispušta se nazad u posudu s otapalom. Ciklus se ponavlja dok ne istekne postavljeno vrijeme ekstrakcije.

Soxhlet topli (W) (Slika 3.3.c). Princip rada ove metode je isti kao i za standardni Soxhlet, jedina je razlika to što se aktivira i gornji grijač. Tada se pri ekstrakciji i podizanju nivoa otapala s ekstrahiranom tvari do optičkog senzora dodatno zagrijava taj ekstrakt u ekstrakcijskoj komori prije no što se otvori stakleni ventil i sav ekstrakt otpusti u posudu za otapalo.

Kontinuirana ekstrakcija (C) (Slika 3.3.d). To je metoda kod koje je optički senzor neaktivan, a stakleni ventil stalno otvoren. Tako otapalo nakon isparavanja i kondenziranja konstantno cirkulira preko uzorka bez zadržavanja u ekstrakcijskoj komori. Ekstrakcija prestaje kad istekne zadano vrijeme trajanja procesa.

Postupak

Pri provedbi sve četiri metode ekstrakcije uzorci za ekstrakciju pripremani su na isti način. Odvagano je oko 2,5 g usitnjenih sjemenki grožđa veličine (< 0,63) mm u staklene frite koje su potom pričvršćene u ekstrakcijsku komoru. U posude za otapalo stavljeno je po 100 mL 50%-tnog etanola, tako da je omjer kruto-tekuće u svim ekstrakcijskim ciklusima bio 40 mL/g. Praćena je kinetika ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari određivanjem njihove koncentracije u ekstraktima dobivenim u različitim vremenskim intervalima (20, 30, 60, 120 i 200 minuta).

3.3.3.3. Ekstrakcija superkričnim fluidima

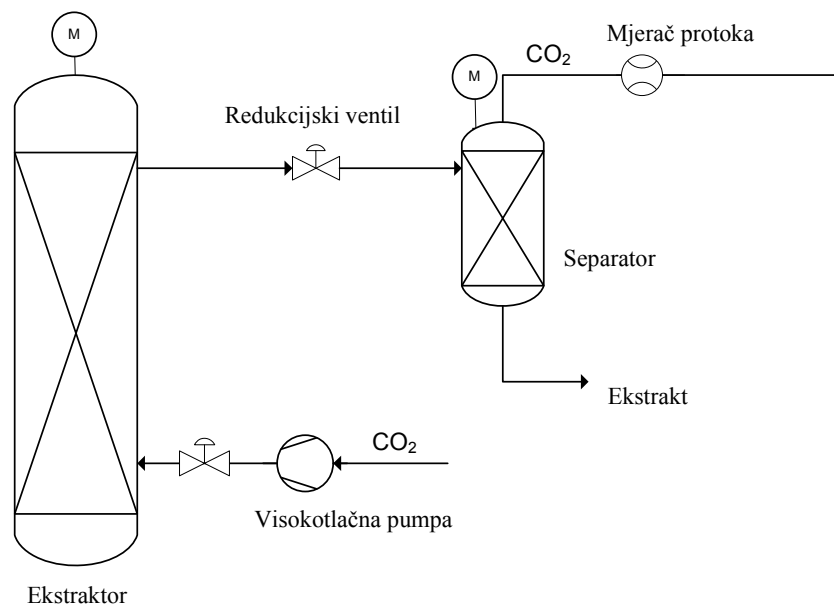
Superkrična ekstrakcija provedena je na pilot-postrojenju (UHDE-GmbH, Njemačka) u Laboratoriju za separacijske procese, Fakulteta za kemiju in kemijsko tehnologiju u Mariboru (Slovenija) pomoću superkričnog ugljičnog dioksida - CO₂ (**Slika 3.4**). Postrojenje može razviti maksimalni tlak 500 bara i temperaturu 120 °C.

Princip

Superkrični CO₂ se pomoću visokotlačne pumpe dovodi u ekstraktor s uzorkom pod visokim tlakom i prelazi preko uzorka obavljajući ekstrakciju topljivih komponenti. Potom ekstrahirane komponente nošene s CO₂ odlaze u separator gdje se pod sniženim tlakom i temperaturom odvija razdvajanje ekstrakta, koji se skuplja na dnu separatora, od CO₂ koji se odvodi iz sustava (**Slika 3.5**). Temperatura u autoklavu regulira se pomoću grijanog plašta i održava se konstantnom. Postrojenje je opremljeno i mjerjačem protoka CO₂.



Slika 3.4. Pilot-postrojenje za ekstrakciju superkričnim fluidima (UHDE, Njemačka)



Slika 3.5. Shematski prikaz procesa ekstrakcije sa superkričnim fluidima

Postupak

Usitnjene sjemenke grožđa (GS_04, PK_04, FK_04, FS_04) odvagane su (oko 100 g) i stavljene u ekstraktor u koji se pomoću pumpe tlačio superkrični CO₂. Eksperiment je proveden pod tlakovima 300 bara i 450 bara te temperaturama 40 °C i 60 °C pri oba ispitivana tlaka u trajanju jedan sat. Protok CO₂ održavan je na 15 L/h. Razdvajanje CO₂ i ekstrakta provedeno je u separatoru pri tlaku 55 bara i temperaturi 30 °C.

3.3.4. Priprema ekstrakata sjemenki grožđa za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ekstraktibilnih proantocijanidina, individualnih fenolnih tvari, boje i antioksidacijske aktivnosti

Nakon ekstrakcije, suspenzije sjemenki grožđa i ekstrakcijskog otapala (ekstrakcija u vodenoj kupelji), odnosno ekstrakti (univerzalni sustav za ekstrakciju), centrifugirani (Sigma 2 - 16, Njemačka) su pri 15 000 g tijekom 5 minuta. Supernatanti su odvojeni od taloga te su nadopunjeni ekstrakcijskim otapalom do poznatog volumena. Tako dobiveni ekstrakti sjemenki grožđa dalje su korišteni za analitičko određivanje masenog udjela fenolnih tvari.

Za određivanje ukupnih fenolnih tvari i ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima dobivenim korištenjem vodene kupelji pripremljeno je razrijeđenje ekstrakata ~1:4 (v/v) (6 mL ekstrakta otpipetirano je u tikvice od 25 mL i nadopunjeno s ekstrakcijskim otapalom do oznake), dok su ekstrakti dobiveni na univerzalnom sustavu za ekstrakciju pripremani razrijeđenjem ekstrakata ~1:8 (v/v) (3 mL ekstrakta i do 25 mL nadopunjeno otapalom). Izuzetak u pripremi ekstrakata u cilju određivanja ukupnih fenolnih tvari bili su vodeni ekstrakti koji se nisu dodatno razrjeđivali nakon centrifugiranja.

Za određivanje individualnih fenolnih tvari (flavanola, procijanidina, fenolnih kiselina), boje i antioksidacijske aktivnosti dobiveni ekstrakti profiltrirani su kroz filtere veličine pora 0,45 μm (Cameo 30F Syringe, Teflon, 0,45 μm , 30 mm). Ekstrakti za određivanje individualnih fenolnih tvari i boje nisu dodatno razrjeđivani, dok su ekstrakti za određivanje antioksidacijske aktivnosti razrjeđivani ekstrakcijskim otapalom prema potrebi u omjerima 1:40 (v/v), odnosno 1:80 (v/v). Pripremljeni ekstrakti čuvali su se u hladnjaku na +4 °C do analize koja je provedena tijekom 24 sata od ekstrakcije.

3.3.5. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima

Ukupne fenolne tvari (UFT) u ekstraktima sjemenki grožđa određene su spektrofotometrijski mikro Folin-Ciocalteuovom metodom [110].

Princip

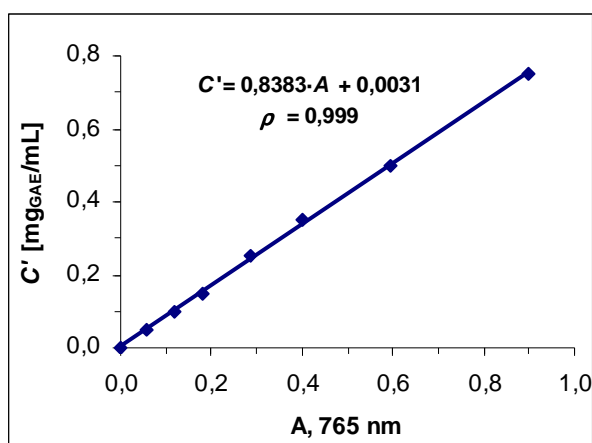
Folin-Ciocalteuova metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. U alkalnom mediju u prisustvu Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfwolframove i fosfomolibden kiseline) fenolni spojevi se oksidiraju, a navedene kiseline

reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni, a čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm [83 , 92].

Postupak

U 20 μL alikvota ekstrakta sjemenki grožđa dodano je 1580 μL destilirane vode i 100 μL Folin-Ciocalteuova reagensa te je nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta u svaku epruvetu dodano 300 μL 20%-tne vodene otopine natrij-karbonata, tako da je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 2 mL. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (20 μL) destilirane vode. Svi uzorci dobro su protreseni na Vorteksu (Vibromix 10, Tehtnica) i stavljeni na inkubaciju u vodenu kupelj pri temperaturi 40 °C. Nakon 30 minuta uzorcima je očitana apsorbancija (A) na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini 765 nm. Iz dobivenih apsorbancija preko kalibracijske krivulje (**Slika 3.6.**) izračunane su koncentracije ukupnih polifenola i izražene u ekvivalentima galne kiseline (GAE - *engl. Gallic Acid Equivalents*) koja je korištena kao standard, odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Zbog lakše usporedivosti dobivenih rezultata konačne koncentracije preračunate su na suhu tvar uzorka ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$), uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta.

Za svaki pokus ekstrakcije koncentracija je određena u dva ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.



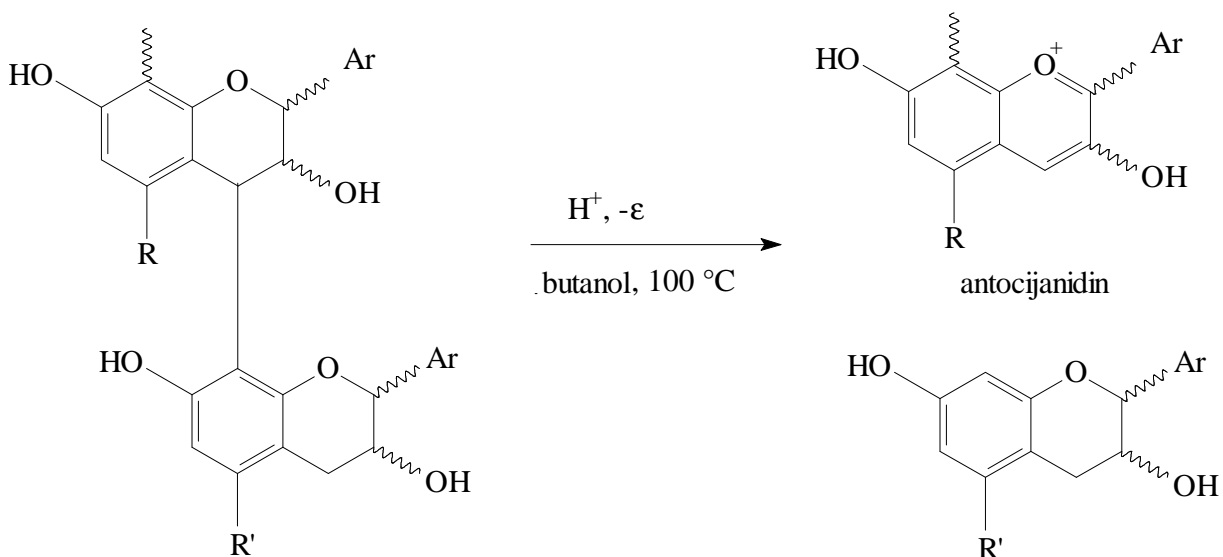
Slika 3.6. Primjer kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari prema micro Folin-Ciocalteuovoj metodi (galna kiselina korištena je kao standard)

3.3.6. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini (UPA) u ekstraktima sjemenki grožđa određeni su spektrofotometrijskom metodom baziranoj na njihovoj reakciji s otopinom kiselina-butanol (*Slika 3.7*) [111, 112].

Princip

U kiselom mediju proantocijanidini se depolimeriziraju u butanolu uz nastajanje crveno obojenih antocijanidina koji se mogu detektirati spektrofotometrijski [79].



Slika 3.7. Depolimerizacija proantocijanidina u kiselom mediju [79]

Prinos i reproducibilnost ove reakcije ovisi o udjelu kiseline i vode, temperaturi i reakcijskom vremenu te o prisustvu prijelaznih metala, kao i o stupnju polimerizacije proantocijanidina. Željezo i ioni željeza pokazali su se kao najučinkovitiji katalizatori u reakcijama nastajanja antocijanidina iz proantocijanidina [2].

Postupak

U 2 mL pripremljenog ekstrakta za analizu (*poglavlje 3.3.4.*) dodano je 20 mL otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrata (pripremljena je otapanjem 77 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 500 mL otopine kloridne kiseline : 1-butanol pomiješane u omjeru 2:3). Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali je umjesto uzorka dodavan jednak volumen (2 mL) destilirane vode. Nakon inkubacije uzoraka 15 minuta pri 95 °C u vodenoj kupelji, uzorci su naglo ohlađeni i odmah analizirani mjerenjem apsorbancija (A) na valnoj duljini od 540 nm. Za svaki uzorak rađena su dva paralelna ponavljanja. Iz dobivenih apsorbancija (A), masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C'_{UPA} , g/L) izračunana je pomoću molarne mase cijanidina ($M = 287$ g/mol) i koeficijenta molarne ekstinkcije cijanidina ($\epsilon = 34700$ L/(mol·cm)) prema sljedećem izrazu:

$$C'_{\text{UPA}} = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\epsilon \cdot l} \quad (3.2)$$

gdje je: DF - faktor razrijeđenja ($DF = 11$; omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA (22 mL) i volumena ekstrakta (2 mL)), l - duljina optičkog puta (1 cm).

Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar sjemenki grožđa (mg/g_{s.t.}) uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta.

3.3.7. Određivanje flavan-3-ola, procijanidina i fenolnih kiselina u ekstraktima

Određivanje flavan-3-ola, procijanidina B₂ i fenolnih kiselina provedeno je na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti - HPLC (Varian, SAD) povezanom s IBM kompjuterskom sustavom s instaliranim softverom Star Chromatography Workstation (verzija 5.52) pomoću kojeg su prikupljeni i obrađeni podaci analiza. Fenolni spojevi razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom [113] primjenom 0,1%-tne fosforne kiseline (H_3PO_4) kao mobilne faze A te 100%-tnog metanola kao mobilne faze B (**Tablica 3.2.**). Spektar je sniman u području valnih duljina od 190 do 600 nm. Identifikacija individualnih fenolnih spojeva temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja (retencijskog vremena) razdvojenih spojeva s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom njihovih spektara. *p*-hidroksibenzojeva kiselina detektirana je na valnoj duljini 260 nm, (+)-katehin,

(-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokatehin, (-)-galokatehin, procijanidin B₂ i galna kiselina na 280 nm, a kafeinska, *p*-kumarinska i ferulična kiselina na 320 nm.

Tablica 3.2. Uvjeti HPLC metode za određivanje flavanola i fenolnih kiselina

Kolona:	OmniSpher C18 (unutarnjeg promjera 250 x 4.6 mm, promjer čestica 5 μm) zaštićena pretkolonom (ChromSep 1 cm x 3 mm)
Detektor:	PDA (ProStar 330)
Mobilna faza:	A = 0,1% H ₃ PO ₄ , B = 100% metanol 0 min 95% A 5% B 30 min 20% A 80% B 33 min 20% A 80% B 35 min 95% A 5% B
Protok:	0,8 mL/min
Temperatura:	20 °C
Volumen injektiranja:	20 μL
Vrijeme uravnoteženja kolone između analiza:	10 minuta

Kvantifikacija spojeva u ekstraktima provedena je pomoću kalibracijske krivulje (koja prikazuje ovisnost površine pika o masenoj koncentraciji spoja) za svaki standard. Kalibracijske krivulje bile su u rasponu koncentracija kako slijedi: 1 - 85 mg/L (galna i kafeinska kiselina), 1 - 100 mg/L ((+)-katehin, (-)-epikatehin, *p*-hidroksibenzojva kiselina), 1 - 240 mg/L (ferulična i *p*-kumarinska kiselina), 1 - 40 mg/L ((-)-galokatehin, procijanidin B₂, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokatehin) pri čemu su različite koncentracije standarda pripremljene razrjeđivanjem stock otopine standarda pomoću metanola HPLC čistoće. Masene koncentracije individualnih fenolnih tvari u ekstraktima (C'_{IFT_HPLC} , mg/L) preračunate su na masu suhe tvari sjemenki grožđa (C_{IFT_HPLC} , mg/g_{s.t.}) prema izrazu:

$$C_{IFT_HPLC} = \frac{C'_{IFT_HPLC} \cdot V \cdot 100}{m_{uz.} \cdot w_{s.t.}} \quad (3.3)$$

gdje je: V - ukupni volumen ekstrakta sjemenki grožđa [L],

$m_{uz.}$ - masa sjemenki grožđa [g],

$w_{s.t.}$ - udio suhe tvari u sjemenkama grožđa [%]

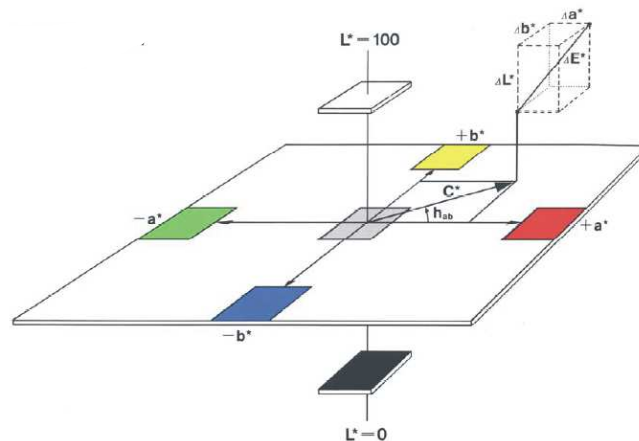
Analiza svakog ekstrakta provedena je u dva paralelna ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti.

U ovom radu pojam "ukupni fenolni spojevi određeni HPLC-om" (UFT_HPLC) predstavlja sumu određenih koncentracija individualnih spojeva.

3.3.8. Određivanje boje ekstrakata

Mjerenje boje ekstrakata sjemenki grožđa dobivenih pri različitim procesnim uvjetima provedeno je pomoću kromametra Chroma Meter CR 400 (Konica Minolta, Japan) korištenjem CIE- $L^*a^*b^*$ mjernog sustava za boje. Sustav se temelji na trodimenzionalnom prostoru boja (*Slika 3.8.*) koji opisuju tri koordinatne osi (parametri boje):

- ☞ a^* - os obojenja s pozitivnim smjerom ka crvenoj boji ($+a^*$) i negativnim smjerom ka komplementarnoj zelenoj boji ($-a^*$)
- ☞ b^* - os obojenja s pozitivnim smjerom k žutoj boji ($+b^*$) i negativnim smjerom prema komplementarnoj plavoj boji ($-b^*$)
- ☞ L^* - os svjetline – okomita je na osi a^* i b^* , a ima vrijednost 0 za idealno crno tijelo te vrijednost 100 za idealno bijelo tijelo



Slika 3.8. $L^*a^*b^*$ sustav boja (CIE 1976.) [114]

Princip

Metoda se zasniva na mjerenju reflektirane svjetlosti s površine osvijetljenog uzorka. Uzorak se osvjetljava pomoću pulsirajuće ksenonske lampe koja baca difuzno svjetlo okomito na površinu uzorka kroz otvor na mjerne glavi kromametra, a potom se reflektirana svjetlost mjeri pomoću šest osjetljivih silikonskih fotoćelija.

Postupak

Boja je određena u nerazrijeđenim ekstraktima dobivenim u prethodno opisanim eksperimentalnim uvjetima. Određeni volumen ekstrakta (10 mL) otpipetiran je u petrijevu zdjelicu visine 1 cm i stavljen u specijalnu komoru za mjerenje boje praškastih materijala (CR-A50) s otvorom kroz koji se mjerila boja ekstrakta. Za svaki uzorak mjerenje parametara boje, L^* , a^* i b^* provedeno je u šest ponavljanja te su bilježene njihove minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti, kao i standardne devijacije vrijednosti svih mjerenja. Neposredno prije svakog mjerenja instrument je baždaren pomoću standardne bijele keramičke pločice (CR-A43). Prema izmjerenim parametrima boje (L^* , a^* , b^*) izračunane su vrijednosti za ton boje izražen kao kut tona boje (h^{0*}) te za promjene svojstava boje ekstrakta (ΔE^* , ΔC^* i ΔH^*) u odnosu na ekstrakcijsko otapalo kako slijedi [97, 104, 108, 115, 116]:

ton boje, izražen kao kut boje (*engl. hue angle*) koji predstavlja raspored boja po krugu boja

$$h^{0*} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right), \quad (3.4)$$

Izražava se u stupnjevima od 0° do 360° počevši od $+a^*$. Pri tome je $0^\circ =$ crveno, $90^\circ =$ žuto, $180^\circ =$ zeleno, $270^\circ =$ plavo, $360^\circ =$ plavo-crveno. Kut od 1° već je zamjetan ljudskom oku.

ukupna promjena boje ekstrakta (ΔE^*)

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (3.5)$$

gdje su: L^* , a^* , b^* - parametri boje za ispitivane ekstrakte

L_0^* , a_0^* , b_0^* - parametri boje za čisto ekstrakcijsko otapalo

promjena kromatičnosti boje (ΔC^*)

$$\Delta C^* = C^* - C_0^* \quad (3.6)$$

gdje je: C^* - kromatičnost ekstrakta izračunana prema izrazu $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$

C_0^* - kromatičnost čistog ekstrakcijskog otapala izračunana prema izrazu $C_0^* = \sqrt{(a_0^*)^2 + (b_0^*)^2}$

promjena tona boje (ΔH^*)

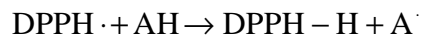
$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*)^2 - (L^* - L_0^*)^2 - (\Delta C^*)^2} \quad (3.7)$$

3.3.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa određena je spektrofotometrijski DPPH metodom. Ta metoda odabrana je među brojnim drugim prisutnim u literaturi zbog stabilnosti DPPH· radikala [83], jednostavnosti i brzine metode. Stabilnost DPPH radikala je posljedica delokalizacije slobodnog elektrona preko cijele molekule, pri čemu molekula ne dimerizira, za razliku od većine drugih slobodnih radikala [117].

Princip

Metoda se temelji na redukciji sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH·) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa (AH) koji donira jedan atom vodika i "hvata" slobodni DPPH· radikal pri čemu nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A·) kako slijedi [118, 119]:



Pri redukciji DPPH· radikala u određenom vremenu dolazi do smanjenja apsorbancije (mjerene pri 515 nm) reakcijske otopine zbog smanjenja koncentracije zaostalog slobodnog DPPH· radikala, što se očituje u promjeni ljubičaste boje otopine prema žutoj. Količina inhibiranog DPPH· radikala dokazuje veću ili manju antioksidacijsku aktivnost ispitivanog uzorka.

Postupak

U 0,1 mL alikvota razrijeđenog ekstrakta (*poglavlje 3.3.4.*) sjemenki grožđa dodano je 3,9 mL otopine DPPH· u 96%-tnom etanolu (0,026 mg DPPH·/mL). Reakcijska otopina ostavljena je na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu 30 minuta (odnosno 10, 30, 60 i 120 minuta za slučaj kada je praćena dinamika inhibicije DPPH·), nakon čega joj je spektrofotometrijski određena apsorbancija ($A_{\text{ekst.}}$) pri valnoj duljini od 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba je priređena na isti način kao i ispitivani uzorci, samo je umjesto otopine DPPH· dodavan jednak volumen ekstrakcijskog otapala (3,9 mL).

Otopina DPPH· korištena za određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) pripremana je uvijek svježija neposredno prije provođenja analiza te je upotrijebljena unutar 24 sata (između mjerenja čuvala se na +4°C zaštićena aluminijskom folijom), a njezina apsorbancija (A_{DPPH}) očitavala se pod istim uvjetima kao i uzorci u odnosu na slijepu probu (0,1 mL otopine DPPH

i 3,9 mL 96% etanola). Inhibicija DPPH· uslijed antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih ekstrakata izračunana je u postotku (%) prema sljedećem izrazu [118]:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[\frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekst.}})}{A_{\text{DPPH}}} \right] \cdot 100 \quad (3.8)$$

Međutim, s obzirom na to da se za kompleksne sustave kao što su biljni ekstrakti preporučuje da se rezultati izrazite po masi materijala [117], postotak (%) inhibiranog DPPH· radikala je preračunat na masu inhibiranog DPPH izraženu po masi suhe tvari sjemenki grožđa odnosno:

$$AA = \frac{m_{\text{inh.DPPH}}}{m_{\text{s.t.}}} \quad [\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}] \quad (3.9)$$

Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u najmanje šest paralelnih ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti određivanja.

3.3.10. Matematičko modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa ispitana je primjenjivost modela koji predstavljaju analitička rješenja drugog Fickova zakona difuzije (2.13, 2.15-2.17), a uspješno su korišteni za opisivanje kinetike dehidracije i rehidracije (Fickov, Pageov, Henderson-Pabisov i Pelegov model) [34, 36, 120].

Pri tome je pretpostavljeno da se ekstrakcija odvijala u sljedećim uvjetima:

- čestice sjemenki grožđa su sfernog oblika i ujednačene veličine,
- deformacija uzorka je zanemariva,
- glavni mehanizam prijenosa fenolnih tvari je difuzija,
- nema interakcije između fenolnih tvari i drugih spojeva koji difundiraju paralelno,
- otpor prijenosu tvari kroz kruti materijal može se zanemariti.

Modeliranje kinetike ekstrakcije provedeno je na osnovi eksperimentalnih podataka za maseni udio ekstrahiranih ukupnih fenolnih tvari u ovisnosti o vremenu. Modeli su korišteni u pojednostavljenom obliku te su prilagođeni eksperimentalnim uvjetima ovog rada, kako slijedi:

$$\text{modificirani Fickov II model} \quad C_{\text{UFT}}(t) = \frac{6}{\pi^2} \cdot \exp(-k_F \cdot t^n) \quad (3.10)$$

$$\text{Pageov model} \quad C_{\text{UFT}}(t) = \exp(-k_P \cdot t^{n''}) \quad (3.11)$$

$$\text{modificirani Henderson-Pabisov model} \quad C_{\text{UFT}}(t) = a \cdot \exp(-k_{\text{HP}} \cdot t^{n'}) \quad (3.12)$$

$$\text{Pelegov model} \quad C_{\text{UFT}}(t) = \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad (3.13)$$

gdje su: $C_{\text{UFT}}(t)$ - maseni udio fenolnih tvari u vremenu t

k_F, n - konstante modificiranog Fickova modela

k_P, n'' - konstante Pageova modela

a, k_{HP}, n' - konstante modificiranog Henderson-Pabisova modela

k_1 - Pelegova konstanta, u obliku $1/k_1$ predstavlja inicijalnu brzinu ekstrakcije ($t = 0$)

k_2 - Pelegova konstanta, u obliku $1/k_2$ predstavlja doseg ekstrakcije (ravnotežnu koncentraciju) u vremenu t , ($t \rightarrow \infty$)

Fickov i Henderson-Pabisov model u obliku navedenom u *poglavljju 2.1.1.2.*, prema izrazima (2.13) odnosno (2.16) nisu dobro aproksimirali eksperimentalne podatke te su modificirani uvođenjem dodatnog parametra n . Modificirani Henderson-Pabisov model predložen je za opisivanje kinetike sušenja i rehidracije mrkve i krumpira [121], dok prema dostupnim literaturnim podacima matematički modeli u navedenom obliku (3.10-12) nisu korišteni za opisivanje kruto-tekuće ekstrakcije. Pelegov model (3.13) korišten je za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa [122], te ekstrakcije rezinoida iz Gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) [123].

Parametri ispitivanih matematičkih modela izračunani su Quasi-Newton metodom nelinearne regresije pomoću programa Statistica (Statistica 7.1; StatSoft, Inc., SAD). Nakon što su

određeni parametri primijenjenih modela, ispitana je njihova funkcionalna ovisnost s temperaturom.

Uspješnost aproksimacije eksperimentalnih podataka ekstrakcije navedenim matematičkim modelima procijenjena je na osnovi više statističkih kriterija [24 , 124–126]:

$$\text{Koeficijent korelacije } (\rho) \quad \rho = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^N (C(t)_{pre,i} - C(t)_{eks,i})^2}{\sum_{i=1}^N (C(t)_{eks,i} - C(t)_{eks,sr})^2}} \quad (3.14)$$

$$\text{Ukupno kvadratno odstupanje} \quad FL = \sum_{i=1}^N (C(t)_{pre,i} - C(t)_{eks,i})^2 \quad (3.15)$$

$$\text{Srednje kvadratno odstupanje} \quad RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (C(t)_{pre,i} - C(t)_{eks,i})^2} \quad (3.16)$$

$$\text{Efikasnost modela} \quad EF = \frac{\sum_{i=1}^N (C(t)_{eks,i} - C(t)_{eks,sr})^2 - \sum_{i=1}^N (C(t)_{pre,i} - C(t)_{eks,i})^2}{\sum_{i=1}^N (C(t)_{eks,i} - C(t)_{eks,sr})^2} \quad (3.17)$$

$$\text{Reducirani chi-kvadrat} \quad \chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (C(t)_{eks,i} - C(t)_{pre,i})^2}{N - z} \quad (3.18)$$

$$\text{Srednja relativna pogreška } (\%) \quad P = \frac{100}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left| \frac{C(t)_{eks,i} - C(t)_{pre,i}}{C(t)_{eks,i}} \right| \quad (3.19)$$

gdje su :

$C(t)_{pre,i}$ - modelom predviđeni maseni udjeli fenolnih tvari

$C(t)_{eks,i}$ - eksperimentalno određeni maseni udjeli fenolnih tvari

$C(t)_{eks,sr}$ - srednje vrijednosti eksperimentalno određenih masenih udjela fenolnih tvari

N - broj eksperimentalnih podataka

z - broj parametara modela

Aproksimacija podataka modelom je to bolja što su niže vrijednosti χ^2 , FL, RMSE i P ($\rightarrow 0$) te više vrijednosti za ρ i EF ($\rightarrow 1$).

3.3.11. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Određivanje koeficijenta efektivne difuzije (D_{ef}) fenolnih tvari u sjemenkama grožđa provedeno je iz eksperimentalnih podataka dobivenih praćenjem kinetike ekstrakcije, odnosno promjene koncentracije fenolnih tvari u ekstraktu tijekom određenog vremena. Za određivanje D_{ef} korištena je pojednostavljena jednadžba drugog Fickova zakona za sferne oblike materijala (2.13) prevedena u linearni (polulogaritamski) oblik (3.20) [120]:

$$\ln Y = \frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C(t)} = \ln \left(\frac{6}{\pi^2} \right) - \left(\frac{D_{ef} \cdot \pi^2}{r^2} \cdot t \right) \quad (3.20)$$

Efektivni difuzijski koeficijent izračunan je iz nagiba pravca (k), koji prikazuje ovisnost $\ln Y$ o vremenu ekstrakcije, kako slijedi :

$$k = \frac{D_{ef} \cdot \pi^2}{r^2} \quad (3.21)$$

odnosno:

$$D_{ef} = \frac{k \cdot r^2}{\pi^2} \quad (3.22)$$

gdje je: Y - bezdimenzionalna koncentracija fenolnih tvari u ekstraktu
 $C(t)$ – maseni udio fenolnih tvari u ekstraktu u vremenu t [mg/g_{s.t.}]
 C_{∞} - ravnotežni maseni udio fenolnih tvari u ekstraktu ($t = \infty$) [mg/g_{s.t.}]
 D_{ef} - efektivni koeficijent difuzije [m²/s]
 r - promjer prosječne veličine čestice [m]

Procjena ravnotežnog stanja za različite eksperimentalne uvjete vrlo je važna za opisivanje procesa difuzije, no ipak u mnogim biološkim sustavima ona nije utvrđena [11]. U ovom radu za izražavanje bezdimenzionalne koncentracije fenolnih tvari, kao ravnotežni maseni udio uzet je udio fenolnih tvari u ekstraktima dobivenim nakon 200 minuta ekstrakcije.

Utjecaj temperature na efektivni koeficijent difuzije procijenjen je izračunavanjem energije aktivacije iz linearnog oblika Arrheniusove jednadžbe (2.19).

Nakon izračunavanja efektivnog koeficijenta difuzije ispitana je njegova ovisnost o procijenjenim parametrima ispitivanih matematičkih modela (modificirani Fickov II, modificirani Henderson-Pabisov, Pageov, Pelegov).

3.3.12. Statistička obrada podataka

Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišteni su računalni programi Microsoft® Office Excel 2003 i Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., SAD).

Statistička značajnost utjecaja procesnih parametara i načina ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari, antioksidacijsku aktivnost i boju ekstrakata procijenjena je analizom varijance (ANOVA) uz primjenu višefaktorijskog testa sa slučajnim blok rasporedom, Duncanovim *post-hoc* testom te t-testom.

4. REZULTATI

Prikaz rezultata rada podijeljen je u nekoliko osnovnih dijelova:

- ☞ određivanje užeg područja eksperimentalnih uvjeta rada: izbor otapala, omjera kruto-tekuće, veličine čestica i vremena ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa;
- ☞ određivanje utjecaja temperature ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa praćenjem kinetike kruto-tekuće ekstrakcije i određivanjem koeficijenta efektivne difuzije; ekstrakcija provedena uz korištenje vodene kupelji;
- ☞ usporedba rezultata dobivenih ekstrakcijom pomoću vodene kupelji i univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi, te utjecaj superkritične ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari;
- ☞ određivanje utjecaja procesnih uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata te na njihovu boju; ispitivanje korelacije između masenog udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti odnosno masenog udjela fenolnih tvari i boje ekstrakata sjemenki grožđa.

4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA I SUHA TVAR UZORAKA

Tablica 4.1. Raspodjela veličina čestica u usitnjenim uzorcima utvrđena granulometrijskom analizom i udio suhe tvari

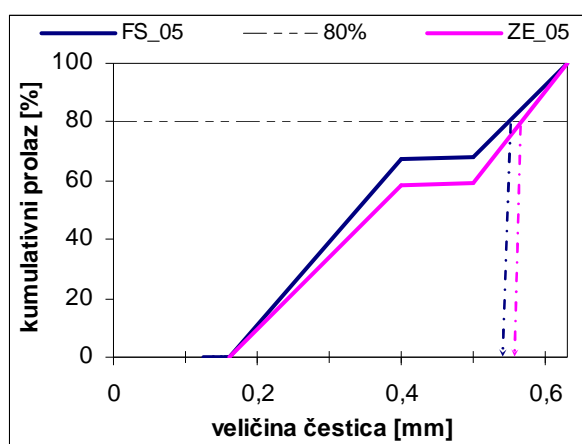
Veličina čestica [mm]	Udio čestica u uzorku [%]								
	Mix_03	FS_04	GS_04	PK_04	FK_04	FS_05	GS_05	GE_05	ZE_05
(> 0,630)	70,25	71,50	70,48	72,48	69,66	65,33	74,87	71,61	72,10
(0,500 - 0,630)	12,97	11,15	6,82	8,96	13,18	11,17	9,93	4,12	11,31
(0,400 - 0,500)	1,27	0,50	1,62	0,54	3,39	0,07	0,73	2,05	0,24
(0,160 - 0,400)	15,28	16,84	21,08	18,02	23,66	23,35	14,47	22,23	16,36
(< 0,160)	0,23	-	-	-	-	0,08	-	-	-
	Udio suhe tvari [%]								
	91,59	91,39	91,16	90,95	90,92	91,12	89,64	90,39	91,08

S obzirom na to da je ponovljivost rezultata ekstrakcije fenolnih tvari za najmanju ispitivanu klasu čestica uzorka MIX_BG_03 bila najlošija, a za najveće čestice najbolja, te uzimajući u obzir i količinu ekstrahiranih fenolnih tvari iz navedenih klasa čestica, u daljnjim istraživanjima utjecaj procesnih uvjeta i načina ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari praćen je na česticama manjim od 0,63 mm dok su veće čestice odbačene. Stoga je i unutar čestica klase (< 0,63 mm) određena raspodjela veličina čestica kao i prosječna veličina čestica navedene klase (*Tablica 4.2., Slika 4.1.*).

Tablica 4.2. Raspodjela veličina čestica za sve čestice (< 0,63) mm i prosječna veličina čestica ispitivanim uzorcima utvrđena granulometrijskom analizom

Veličina čestica [mm]	Udio čestica u uzorku [%]								
	Mix_03	FS_04	GS_04	PK_04	FK_04	FS_05	GS_05	GE_05	ZE_05
(0,500 - 0,630)	43,60	39,14	5,50	32,57	43,43	32,22	39,51	14,50	40,52
(0,400 - 0,500)	4,27	1,76	23,10	1,98	11,18	0,20	2,90	7,21	0,85
(0,160 - 0,400)	51,36	59,10	71,40	65,46	77,97	67,35	57,59	78,29	58,63
(< 0,160)	0,77	-	-	-	-	0,23	-	-	-
Prosječna veličina čestica uzoraka [mm]									
	0,57	0,57	0,52	0,56	0,49	0,56	0,57	0,41	0,57

Prosječna veličina čestica svakog uzorka određena je grafički iz integralne granulometrijske krivulje, koja prikazuje koliki bi udio čestica od prisutnih u uzorku prošao kroz očiće sita određenog promjera (kumulativni prolaz čestica). Veličina otvora sita kroz koje prolazi 80% čestica predstavlja ujedno i prosječnu veličinu čestica uzorka.



Slika 4.1. Primjer određivanja prosječne veličine čestica iz integralne granulometrijske krivulje na sjemenkama grožđa FS_05 i ZE_05

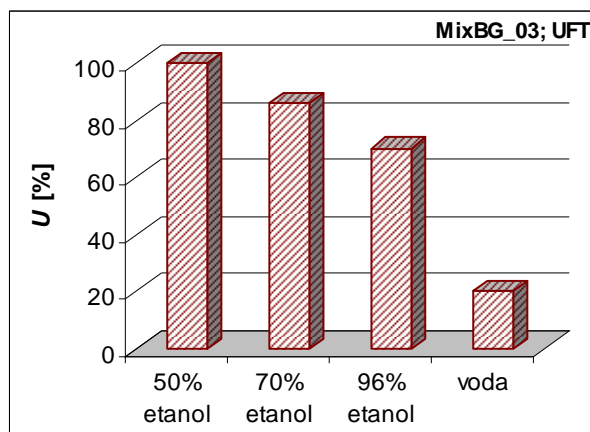
4.2. UTJECAJ OTAPALA, OMJERA KRUTO-TEKUĆE, VELIČINE ČESTICA I VREMENA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

U ovom djelu su prikazani rezultati ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz sjemenki mješavine bijelih sorti grožđa s područja slatinskog vinogorja, berba 2003. godine (MixBG_03) za:

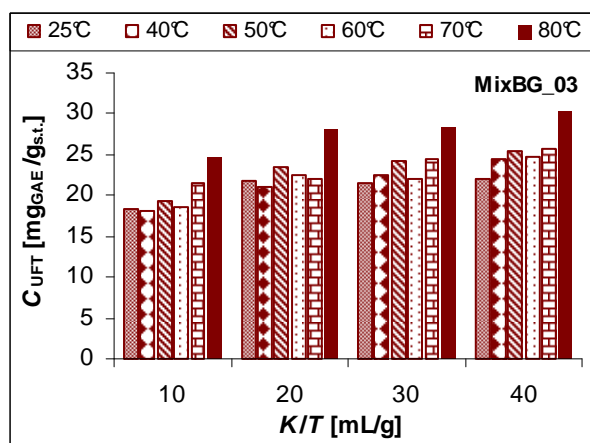
- ☞ različita otapala: voda i vodene otopine etanola (50, 70 i 96%),
- ☞ različite omjere kruto-tekuće: (10, 20, 30 i 40 mL/g),
- ☞ različite veličine čestica:
 - usitnjene i neklasirane
 - usitnjene i klasirane - (> 0,63) mm, (0,4 - 0,63) mm, (0,16 - 0,4) mm, (< 0,16) mm,
- ☞ različito vrijeme ekstrakcije (10-200 minuta).

S obzirom na to da se 50% - tni etanol pokazao kao najučinkovitije ispitivano otapalo, pomoću kojeg je ekstrahirano 30,24 mg_{GAE}/g_{s.t} ukupnih fenolnih tvari, učinkovitost (U) svih otapala prikazana je u odnosu na 50%-tni etanol (*Slika 4.2.*) te je izražena u postocima (%) prema izrazu (4.1):

$$U = \frac{\text{udio fenolnih tvari ekstrahiranih otapalom}}{\text{udio fenolnih tvari ekstrahiranih 50\% – tnim etanolom}} \cdot 100 \quad (4.1)$$



Slika 4.2. Učinkovitost (U , %) različitih otapala u ekstrakciji ukupnih fenolnih tvari (UFT) ekstrahiranih pri temperaturi $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i omjeru kruto-tekuće 40 mL/g iz usitnjenih i neklasiranih sjemenki grožđa MixBG_03 nakon 120 minuta ekstrakcije



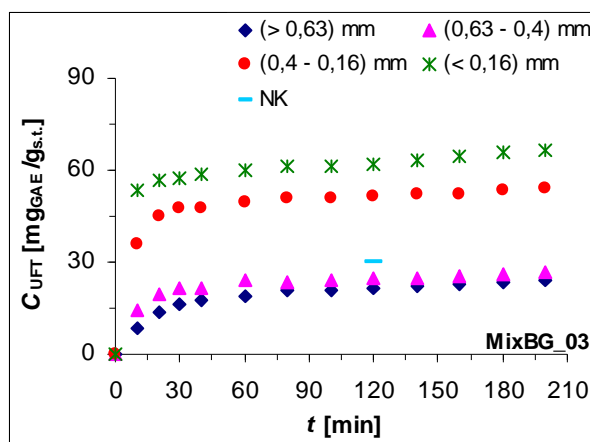
Slika 4.3. Ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz neklasiranih usitnjenih sjemenki grožđa MixBG_03 uz korištenje 50%-tnog etanola pri različitim omjerima kruto-tekuće (K/T) i različitim temperaturama ekstrakcije tijekom 120 minuta

Tablica 4.3. Statistička značajnost utjecaja omjera kruto-tekuće i temperature ekstrakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa MixBG_03 prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4×6)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljanja	ns
Temperatura ekstrakcije (ϑ)	**
Omjer kruto-tekuće (K/T)	**
Interakcija ($\vartheta \times K/T$)	**

^{ns} nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$



Slika 4.4. Utjecaj veličine čestica i vremena ekstrakcije (t) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz sjemenki grožđa MixBG_03 pomoću 50%-tnog etanola pri temperaturi ekstrakcije 80 °C i omjeru kruto-tekuće 40 mL/g (klase veličina čestica: I - (> 0,63) mm, II - (0,63 – 0,4) mm, III - (0,4 - 0,16) mm; IV - (< 0,16) mm, NK - neklasirane sjemenke)

Tablica 4.4. Statistička značajnost (ANOVA) utjecaja veličine čestica na ekstrakciju ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa (a) i usporedba srednjih vrijednosti masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (UFT) u ispitivanim klasama čestica Duncanovim *post-hoc* testom (b) nakon ekstrakcije 120 minuta

(a)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljjanja	ns
Veličina čestica	**

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

(b)

C_{UFT}^a [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	klasa veličine čestica			
	a	b	c	d
21,78	I			
24,54	II			
30,24		NK		
51,71			III	
61,99				IV

^a srednja vrijednost masenog udjela UFT

slova označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$

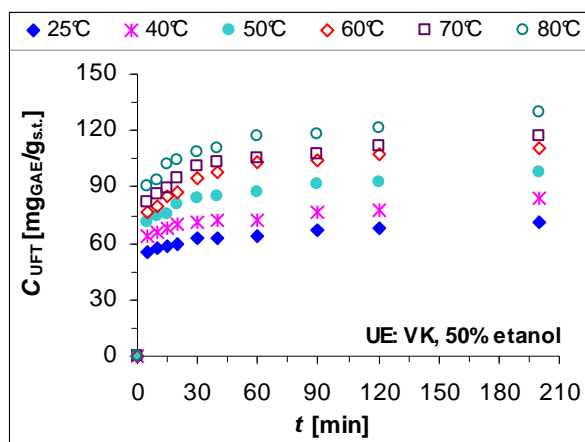
4.3. KINETIKA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE I EFEKTIVNI KOEFICIJENT DIFUZIJE FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

Kinetika kruto-tekuće ekstrakcije i efektivni koeficijent difuzije fenolnih tvari praćeni su na sjemenkama grožđa sorte frankovka s područja slatinskog vinogorja, berba 2005. godine (FS_05). Korištene su sjemenke grožđa manje od 0,63 mm čija je prosječna veličina bila 0,56 mm, a ekstrakcija fenolnih tvari provedena je u temperaturnom području 25-80 °C u vodenoj kupelji (VK).

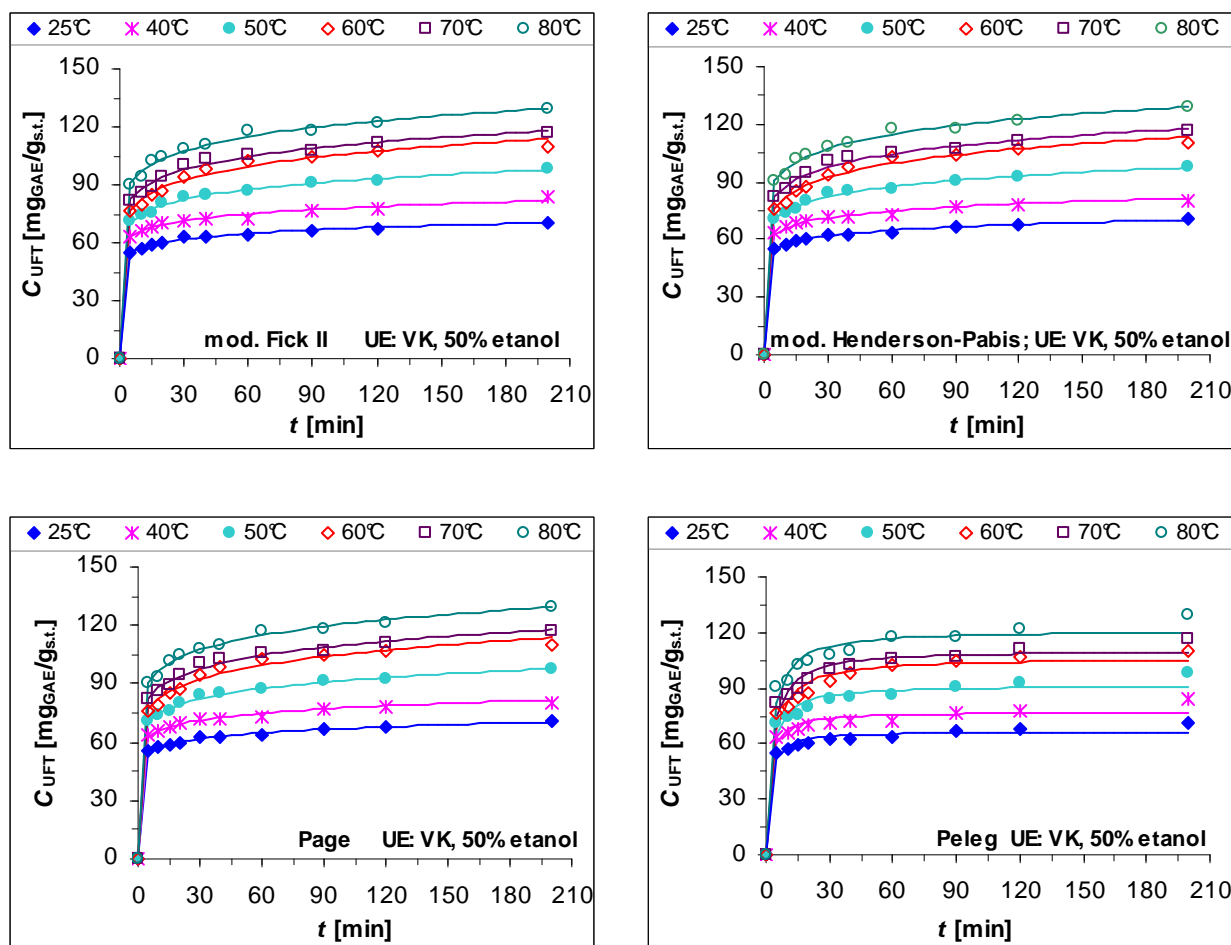
Rezultati utjecaja temperature ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari prikazani su na način da su najprije prikazani eksperimentalni podaci, a potom i rezultati njihove obrade kako slijedi:

- ☞ kinetika ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari
 - eksperimentalni podaci
 - aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelima
 - utjecaj temperature na ekstraktibilnost fenolnih tvari odnosno na procijenjene parametre matematičkih modela
 - određivanje efektivnog koeficijenta difuzije
- ☞ kinetika ekstrakcije individualnih fenolnih tvari ((+)-katehina, (-)-epikatehina, galne kiseline i procijanidina B₂)
 - eksperimentalni podaci
 - utvrđivanje ovisnosti udjela individualnih o udjelu ukupnih fenolnih tvari
 - određivanje efektivnog koeficijenta difuzije
- ☞ utjecaj temperature na ekstraktibilnost ukupnih proantocijanidina u ekstraktima sjemenki grožđa

4.3.1. Modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa



Slika 4.5. Ovisnost masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije (eksperimentalni podaci)



Slika 4.6. Ovisnost masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije (simboli - eksperimentalni podaci, linije - aproksimacijske krivulje prema različitim modelima)

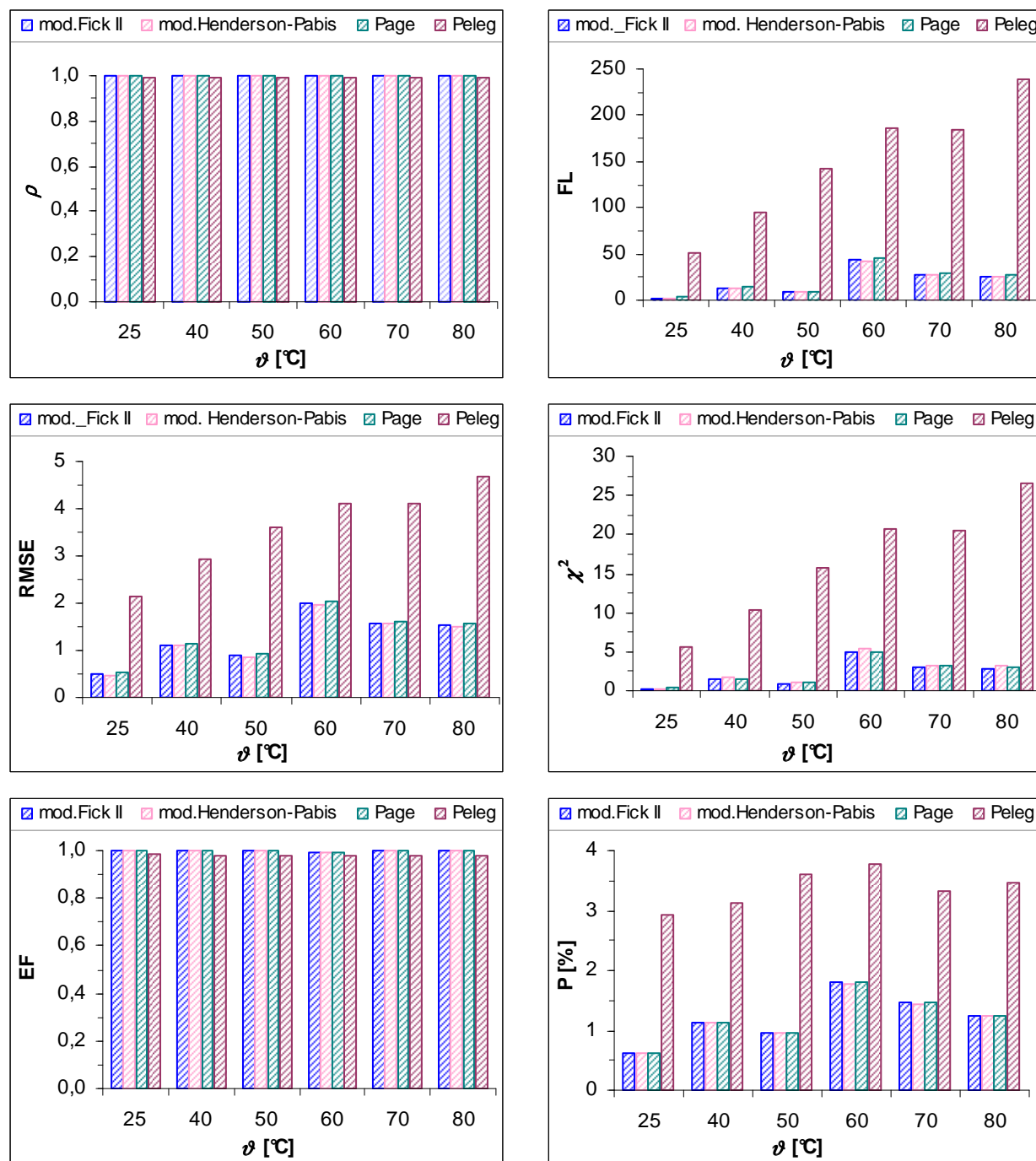
Rezultati primjene matematičkih modela

Tablica 4.5. Procijenjeni parametri primijenjenih matematičkih modela za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 sa 50%-tnim etanolom u vodenoj kupelji

	Temperatura ekstrakcije [°C]	25	40	50	60	70	80
Matematički model	parametri modela						
modificirani Fick II	k_F	4,4002	4,5314	4,6192	4,6741	4,7606	4,8568
	n	0,0145	0,0148	0,0179	0,0212	0,0191	0,0186
modificirani Henderson-Pabis	a	0,2400	0,3034	0,2858	0,1914	0,1624	0,0820
	k_{HP}	5,3287	5,2256	5,3727	5,8271	6,0782	6,8576
	n'	0,0120	0,0129	0,0155	0,0173	0,0151	0,0134
Page	k_P	3,9031	4,0343	4,1225	4,1779	4,2641	4,3602
	n''	0,0162	0,0165	0,0199	0,0235	0,0211	0,0206
Peleg	k_1	0,0210	0,0187	0,0222	0,0268	0,0220	0,0195
	k_2	0,0150	0,0129	0,0109	0,0094	0,0090	0,0082

Aproksimacijske krivulje (**Slika 4.6.**) odabranih modela (modificirani Fick II, modificirani Henderson-Pabis, Page, Peleg) pokazale su da se dobro slažu s eksperimentalnim podacima kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. Međutim, analizom izračunanih statističkih kriterija uspješnosti aproksimacije (**Slika 4.7., Tablica 4.6.**) utvrđeno je da je Pelegov model u odnosu na ostala tri eksponencijalna modela imao veće vrijednosti za srednju relativnu pogrešku aproksimacije eksperimentalnih podataka (P, %), ukupno (FL) i srednje (RMSE) odstupanje eksperimentalnih od izračunanih podatka te reducirani *chi*-kvadrat (χ^2).

Statistički pokazatelji uspješnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka matematičkim modelima

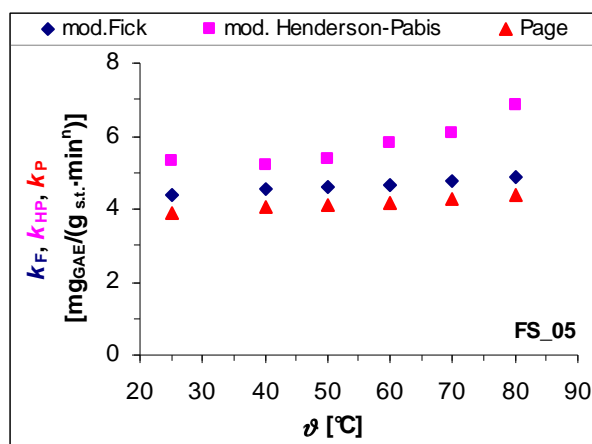


Slika 4.7. Koeficijent korelacije (ρ), ukupno kvadratno odstupanje (FL), srednje kvadratno odstupanje (RMSE), reducirani χ -kvadrat (χ^2), efikasnost odabranih modela (EF) i srednja relativna pogreška (P, %) aproksimacije eksperimentalnih podataka kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa (FS_05) s odabranim modelima za različite temperature ekstrakcije

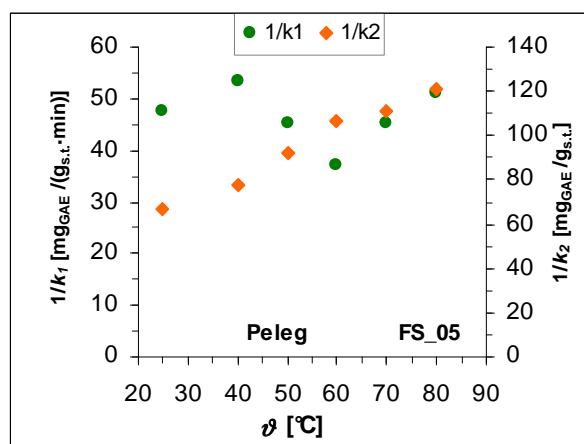
Tablica 4.6. p -vrijednosti određene prema Duncanovu *post-hoc* testu kao pokazatelji razlike između svih statističkih kriterija (za sve modele i temperature) uspješnosti aproksimacije eksperimentalnih podatka

MODEL	p – vrijednost ($p < 0,0500$ statistički značajno)			
	mod. Fick	mod. HP	Page	Peleg
modificirani Fick II	x	0,9478	0,8978	0,0027
modificirani Henderson-Pabis	0,9478	x	0,9421	0,0027
Page	0,8978	0,9421	x	0,0024
Peleg	0,0027	0,0027	0,0024	x

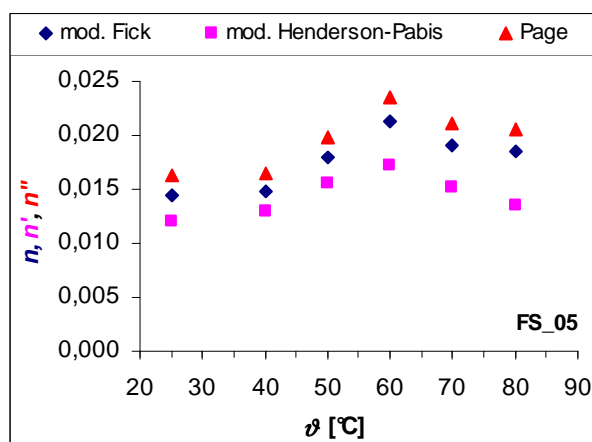
4.3.1.1. Utjecaj temperature kruto-tekuće ekstrakcije na procijenjene parametre matematičkih modela



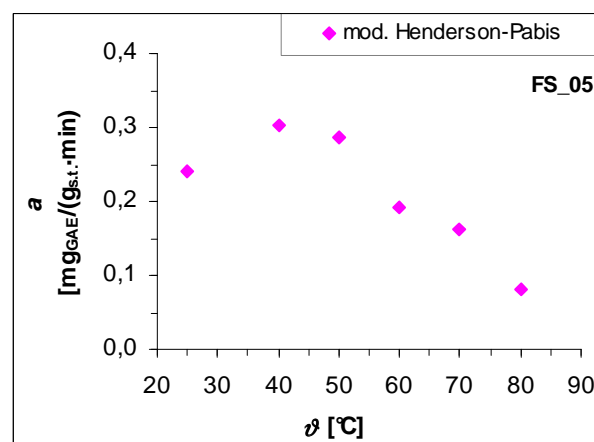
Slika 4.8. Utjecaj temperature (ϑ) ekstrakcije na parametre svih primijenjenih eksponencijalnih modela (k_F , k_{HP} , k_P), koji u sebi sadrže dimenziju vremena



Slika 4.9. Utjecaj temperature (ϑ) ekstrakcije na recipročne vrijednosti parametara ($1/k_1$, $1/k_2$) neeksponencijalnog Pelegova modela



Slika 4.10. Utjecaj temperature (ϑ) ekstrakcije na bezdimenzionalne (n , n' , n'') parametre svih primijenjenih eksponencijalnih modela



Slika 4.11. Utjecaj temperature (ϑ) ekstrakcije na parametar a modificiranog Henderson-Pabisova modela

Tablica 4.7. Funkcionalne ovisnosti parametara primijenjenog modificiranog Fickova, modificiranog Henderson-Pabisova i Pageova modela o temperaturi kruto-tekuće ekstrakcije provedene u vodenoj kupelji za uzorak FS_05 i koeficijent korelacije (ρ)

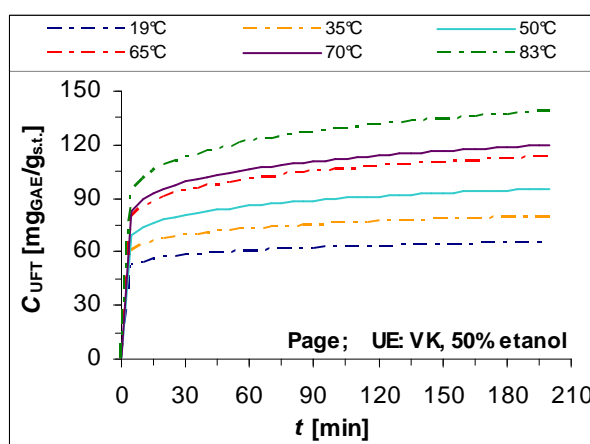
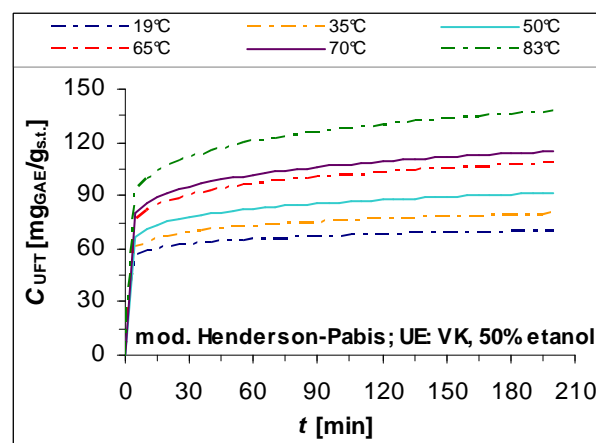
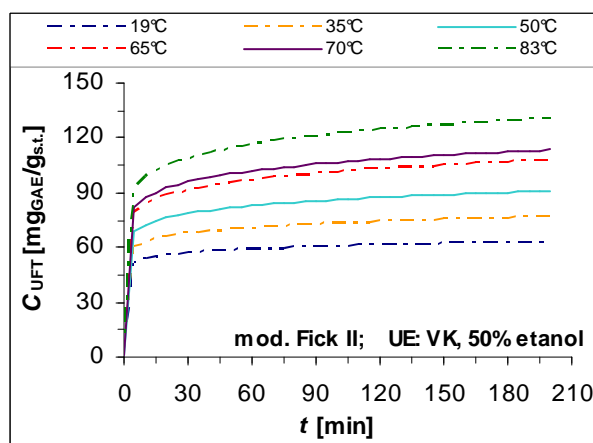
Matematički model		ρ
modificirani Fick II	$k_F = 0,0081 \cdot \vartheta + 4,2027$	0,9980
	$n = 0,0055 \cdot \vartheta^{0,2928}$	0,8226
modificirani Henderson-Pabis	$k_{HP} = 4,477 \cdot \exp^{0,0046 \cdot \vartheta}$	0,8979
	$n' = 0,0069 \cdot \vartheta^{0,1863}$	0,5882
	$a = 0,556 \cdot \exp^{-0,0195 \cdot \vartheta}$	0,8087
Page	$k_P = 0,0081 \cdot \vartheta + 3,7054$	0,9981
	$n'' = 0,0065 \cdot \vartheta^{0,2811}$	0,8133

S obzirom na to da nije vidljiva jasna funkcionalna ovisnost Pelegove konstante ($1/k_1$), koja predstavlja inicijalnu brzinu ekstrakcije, o temperaturi ekstrakcije (*Slika 4.9.*) te da je navedeni model najlošije aproksimirao eksperimentalne podatke, dalje su razmatrani samo eksponencijalni modeli. Nakon što su utvrđene funkcionalne ovisnosti parametara eksponencijalnih modela (modificirani Fick II, modificirani Henderson-Pabis, Page) o temperaturi u obliku jednadžbi (*Tablica 4.7.*), iste su uvrštene u izraze za ispitivane matematičke modele (3.10-12), pri čemu su dobivene složenije jednadžbe (*Tablica 4.8.*). Numeričko rješavanje takvih jednadžbi daje mogućnost simulacije procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa (za čestice manje od 0,63 mm) za određeno šire područje temperature i vrijeme ekstrakcije od ispitivanih. Uvrštavanjem određene temperature ekstrakcije u dobivene jednadžbe moguće je izravno predvidjeti udio ekstrahiranih fenolnih tvari u određenom vremenu ekstrakcije, što je i prikazano na *Slici 4.12.* ili brzinu ekstrakcije. Eksperimentalni podaci su uspoređeni s odgovarajućim vrijednostima procijenjenim pomoću simulacijskih jednadžbi te je na osnovi određenih statističkih kriterija (*Slika 4.13.*) utvrđeno da je, općenito gledajući, Pageov model najprikladniji za modeliranje i simulaciju kruto-tekuće ekstrakcije. Stoga je brzina ekstrakcije pri različitim temperaturama prikazana simulacijskim krivuljama prema Pageovu modelu (*Slika 4.14.*), a prema izrazu koji predstavlja prvu derivaciju Pageova modela (3.11) kako slijedi:

$$\frac{dC_{UFT}}{dt} = k_P \cdot n'' \cdot t^{(n''-1)} \cdot \exp\left(k_P \cdot t^{n''}\right) \quad (4.2)$$

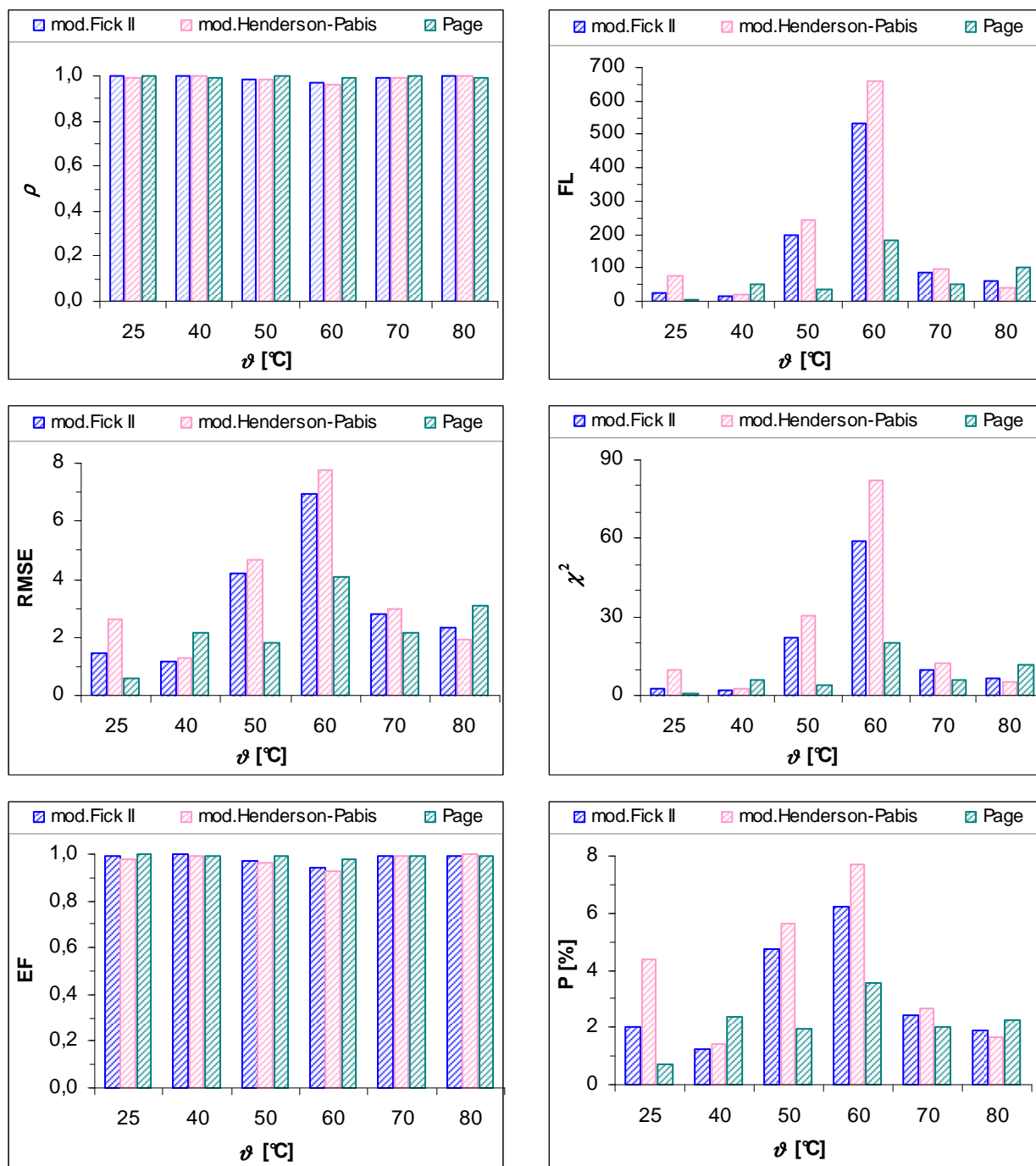
Tablica 4.8. Matematički izrazi koji omogućuju procjenu masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima sjemenki grožđa (simulaciju procesa) pri određenoj temperaturi (ϑ) i vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije provedene uz primjenu vodene kupelji

Matematički model	
modificirani Fick II	$C_{UFT}(t) = \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \cdot \exp\left[(0,0081 \cdot \vartheta + 4,2027) \cdot t^{(0,005 \cdot \vartheta^{0,2928})}\right]$
modificirani Henderson-Pabis	$C_{UFT}(t) = [0,556 \cdot \exp(-0,0195 \cdot \vartheta)] \cdot \exp\left[(4,477 \cdot \exp(0,0046 \cdot \vartheta)) \cdot t^{(0,0069 \cdot \vartheta^{0,1863})}\right]$
Page	$C_{UFT}(t) = \exp\left[(0,0081 \cdot \vartheta + 3,7054) \cdot t^{(0,0065 \cdot \vartheta^{0,2811})}\right]$

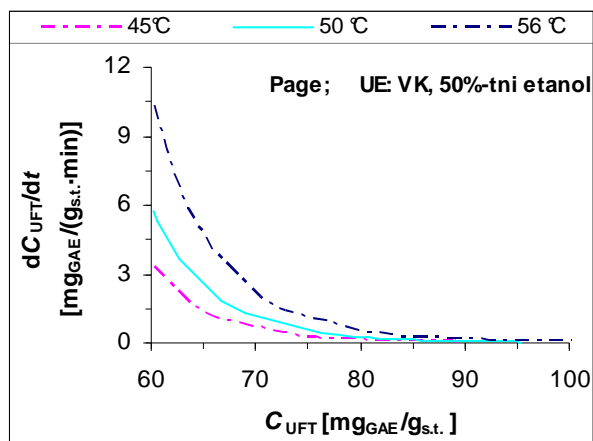


Slika 4.12. Ovisnost masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) ekstrahiranih iz sjemenki grožđa FS_05 o vremenu (t) ekstrakcije za različite temperature (simulacijske krivulje prema primijenjenim eksponencijalnim modelima: isprekidane linije - proizvoljno odabrane temperature, pune linije - temperature na kojima je provedena ekstrakcija)

Statistički pokazatelji slaganja eksperimentalnih i simulacijom procijenjenih podataka



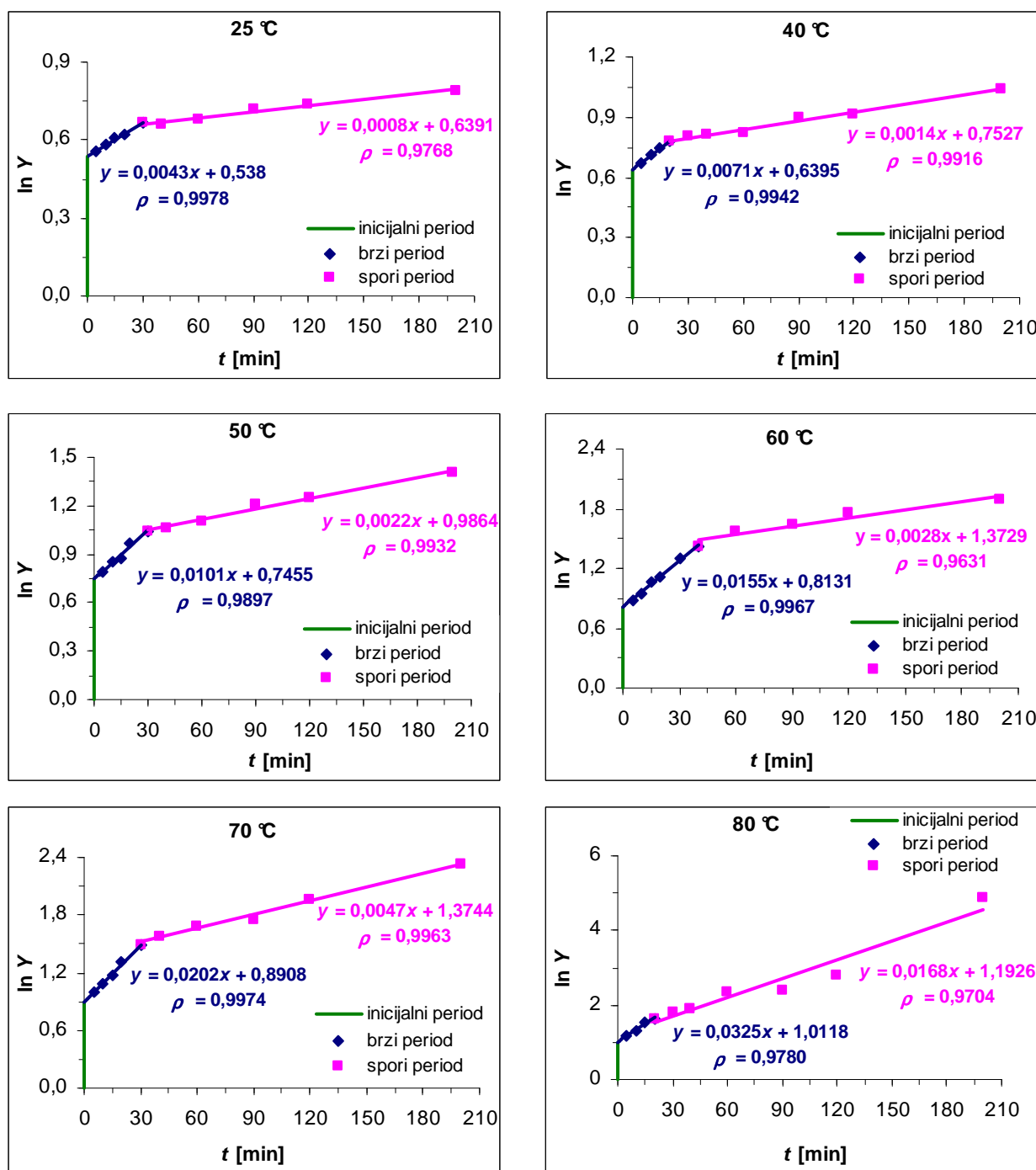
Slika 4.13. Koeficijent korelacije (ρ), ukupno kvadratno odstupanje (FL), srednje kvadratno odstupanje (RMSE), reducirani χ -kvadrat (χ^2), efikasnost odabranih modela (EF) i srednja relativna pogreška (P, %) slaganja eksperimentalnih i simulacijom (prema odabranim modelima) procijenjenog masenog udjela ekstrahiranih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa (FS_05) za različite temperature ekstrakcije



Slika 4.14. Ovisnost brzine ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari (dC_{UFT}/dt) iz sjemenki grožđa FS_05 o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) za različite temperature (simulacijske krivulje prema Pageovu modelu: isprekidane linije - proizvoljno odabrane temperature, puna linija - temperatura na kojoj je provedena ekstrakcija)

4.3.1.2. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa tijekom procesa kruto-tekuće ekstrakcije

Ovisnost $\ln Y$ o vremenu ekstrakcije (t) za različite temperature prikazana je pravcima te je uočeno postojanje tri perioda ekstrakcije: inicijalni, brzi i spori (*Slika 4.15*). Iz nagiba pravaca (k) izračunat je efektivni koeficijent difuzije prema izrazu (3.21, 3.22) za brzi i spori period ekstrakcije (*Tablica 4.9*).

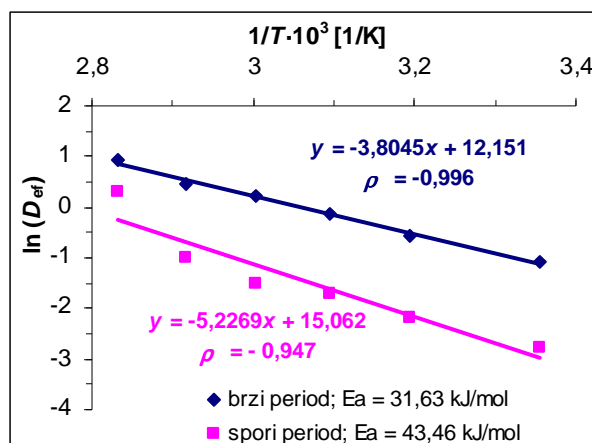


Slika 4.15. Dijagrami ovisnosti $\ln Y$ (bezdimenzionalna koncentracija fenolnih tvari) o vremenu (t) ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije: inicijalni, brzi i spori period ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 sa 50%-tnim etanolom u vodenoj kupelji

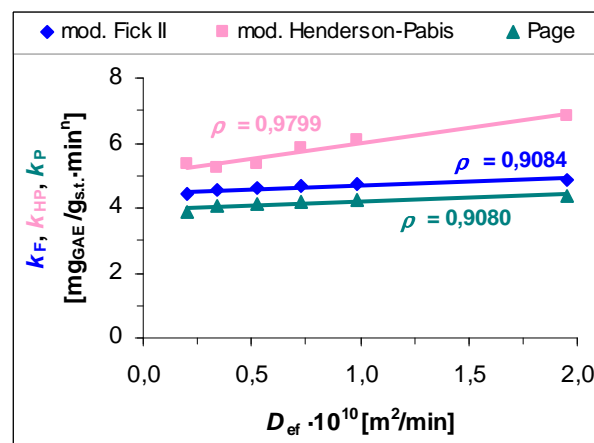
Tablica 4.9. Izračunane vrijednosti efektivnih koeficijenata difuzije (D_{ef}) za brzi i spori period kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 sa 50%-tnim etanolom u vodenoj kupelji za različite temperature ekstrakcije (ϑ)

ϑ [°C]	25	40	50	60	70	80
$k_{brzi\ period}$	0,0043	0,0071	0,0110	0,0155	0,0202	0,0325
$k_{spori\ period}$	0,0008	0,0014	0,0023	0,0028	0,0047	0,0168
$D_{ef_brzi\ period} \cdot 10^{10}$ [m ² /min]	0,34	0,56	0,87	1,23	1,60	2,58
$D_{ef_spori\ period} \cdot 10^{10}$ [m ² /min]	0,06	0,11	0,18	0,22	0,37	1,33
$D_{ef_sr} \cdot 10^{10}$ [m ² /min]	0,20	0,34	0,53	0,73	0,99	1,96

Utjecaj temperature na koeficijent efektivne difuzije procijenjen je na osnovi linearnog oblika Arrheniusove (2.19.) jednadžbe iz kojega je izračunana i energija aktivacije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa za brzi i spori period ekstrakcije .



Slika 4.16. Utjecaj temperature kruto-tekuće ekstrakcije na koeficijent efektivne difuzije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05



Slika 4.17. Slaganje prosječnih vrijednosti D_{ef} za spori i brzi period ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05, sa procijenjenim konstantama matematičkih modela

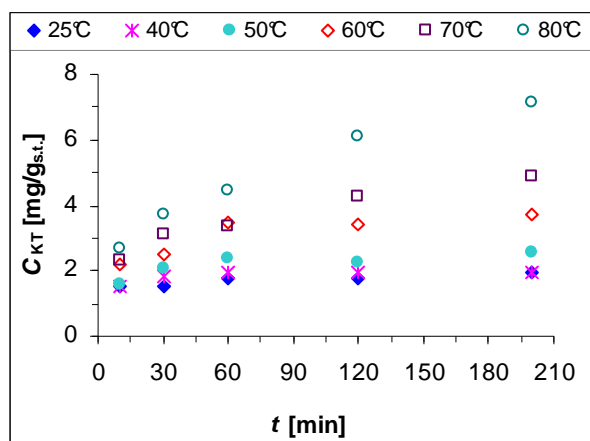
4.3.2. Kinetika kruto-tekuće ekstrakcije individualnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Ekstrakti sjemenki grožđa dobiveni pri različitim procesnim uvjetima (vrijeme, temperatura) analizirani su HPLC-om da bi se utvrdio utjecaj navedenih procesnih parametara na ekstraktibilnost individualnih fenolnih tvari karakterističnih za sjemenke grožđa. Ekstrakti su ispitani na sadržaj fenolnih kiselina (4 - hidroksibenzojeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulična kiselina, kafeinska kiselina, galna kiselina), te flavan-3-ola ((+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokatehin, (-)-galokatehin) i procijanidina B₂. Od navedenih spojeva identificirani su i kvantificirani galna kiselina, (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-galokatehin i procijanidin B₂, dok ostali spojevi nisu detektirani u ekstraktima dobivenim u eksperimentalnim uvjetima. Svi kromatogrami ispitivanih ekstrakata te standarda, kao i spektri standarda, nalaze se u *Prilozima*.

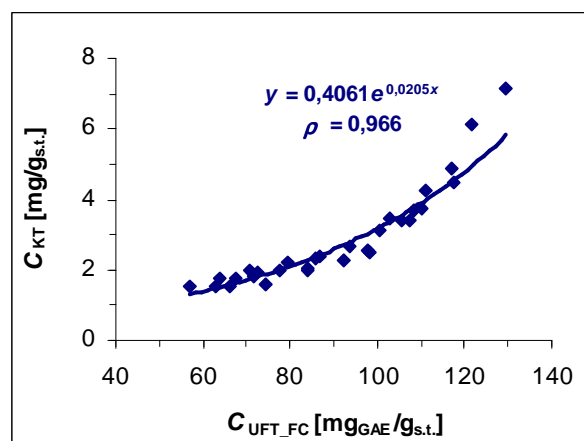
Iako su (-)-epikatehin galat i (-)-galokatehin identificirani u ispitivanim ekstraktima, kvantificirani su u malim koncentracijama/tragovima (*Tablica 4.10.*) i nije uočen jasan utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na njihovu ekstraktibilnost. Stoga će u daljnjem razmatranju biti obuhvaćeni spojevi koji su kvantificirani u ekstraktima u većim koncentracijama ((+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin B₂ i galna kiselina).

Tablica 4.10. Maseni udio (-)-epikatehin galata i (-)-galokatehina u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 dobivenim pri različitim temperaturama ekstrakcije (ϑ) neovisno o vremenu ekstrakcije (10 - 200 minuta)

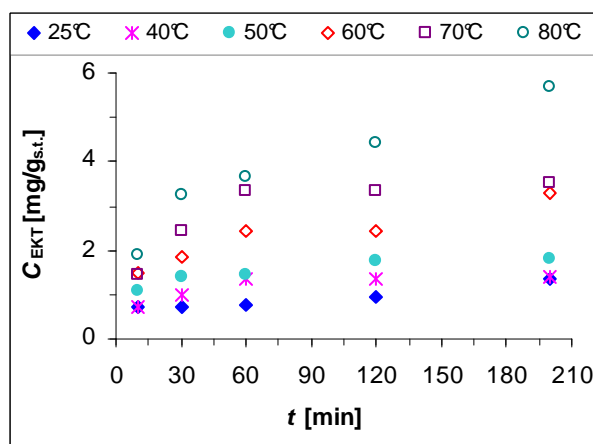
ϑ [°C]	25	40	50	60	70	80
(-)-epikatehin galat [mg/g _{s.t.}]	0,01 - 0,04	0,07 - 0,16	0,01 - 0,02	0,02 - 0,10	0,04 - 0,014	0,03 - 0,09
(-)-galokatehin [mg/g _{s.t.}]	0,00	0,28 - 2,02	0,00 - 0,88	0,0 - 0,27	0,00 - 0,24	0,00- 0,24



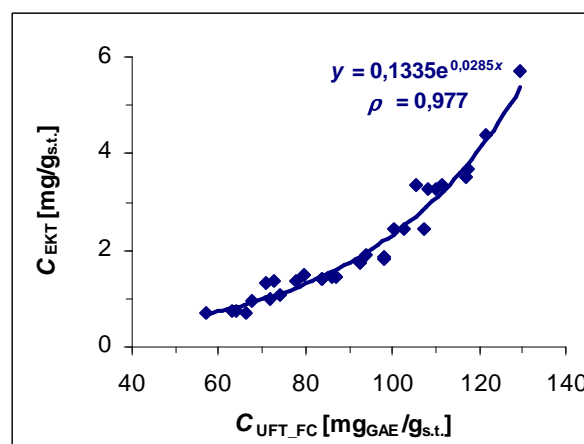
Slika 4.18. Maseni udio (+)-katehina (C_{KT}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 u ovisnosti o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije



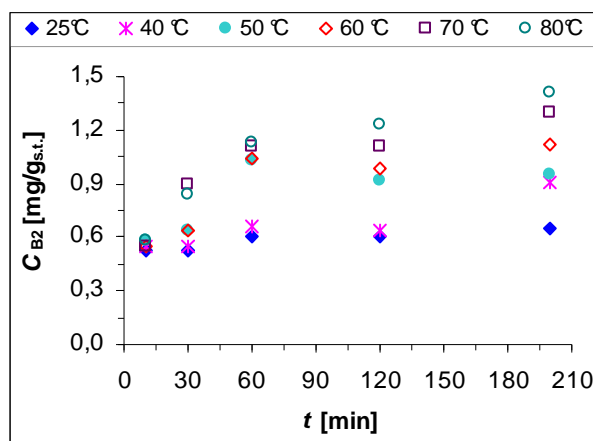
Slika 4.19. Korelacija masenog udjela (+)-katehina (C_{KT}) određenog HPLC-om i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenog spektrofotometrijski (C_{UFT_FC}) u ekstraktima dobivenim pri različitom vremenu (10, 30, 60, 120, 200 minuta) i temperaturi ekstrakcije (25 – 80 °C)



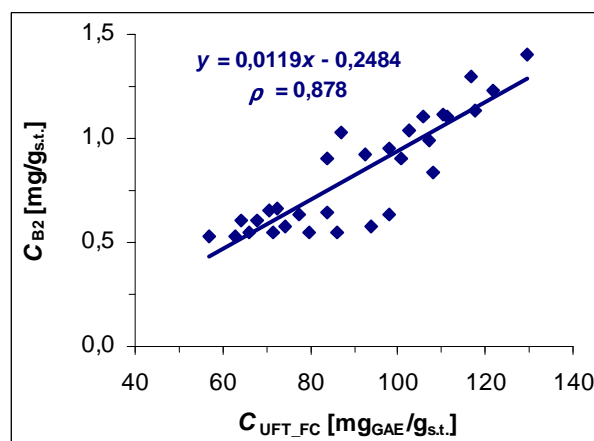
Slika 4.20. Maseni udio (-)-epikatehina (C_{EKT}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 u ovisnosti o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije



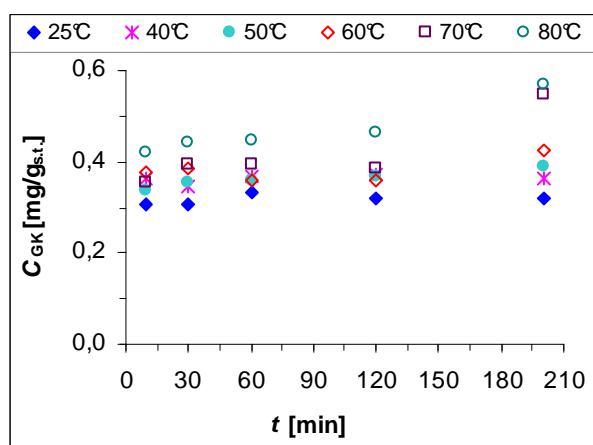
Slika 4.21. Korelacija masenog udjela (-)-epikatehina (C_{EKT}) određenog HPLC-om i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenog spektrofotometrijski (C_{UFT_FC}) u ekstraktima dobivenim pri različitom vremenu (10, 30, 60, 120, 200 minuta) i temperaturi ekstrakcije (25 – 80 °C)



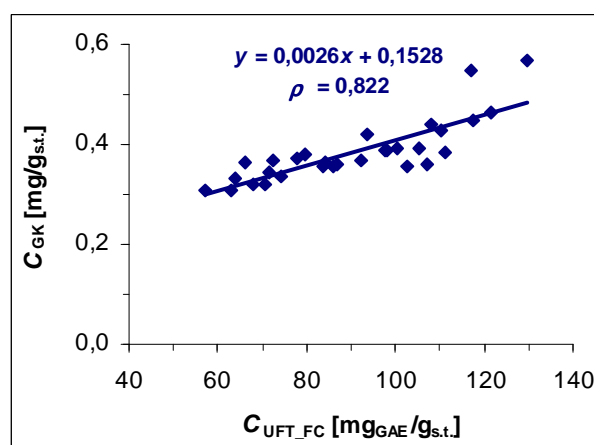
Slika 4.22. Maseni udio procijanidina B₂ (C_{B_2}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 u ovisnosti o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije



Slika 4.23. Korelacija masenog udjela procijanidina B₂ (C_{B_2}) određenog HPLC-om i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenog spektrofotometrijski (C_{UFT_FC}) u ekstraktima dobivenim pri različitom vremenu (10, 30, 60, 120, 200 minuta) i temperaturi ekstrakcije (25 – 80 °C)



Slika 4.24. Maseni udio galne kiseline (C_{GK}) u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05 u ovisnosti o vremenu (t) kruto-tekuće ekstrakcije za različite temperature ekstrakcije



Slika 4.25. Korelacija masenog udjela galne kiseline (C_{GK}) određene HPLC-om i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenog spektrofotometrijski (C_{UFT_FC}) u ekstraktima dobivenim pri različitom vremenu (10, 30, 60, 120, 200 minuta) i temperaturi ekstrakcije (25 – 80 °C)

Tablica 4.11. Statistička značajnost utjecaja temperature i vremena ekstrakcije na ekstraktibilnost (+)-katehina (KT), (-)-epikatehina (EKT), galne kiseline (GK) i procijanidina B₂ prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (6 x 5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost			
	KT	EKT	GK	B2
Ponavljjanja	ns	ns	ns	ns
Temperatura (ϑ)	**	**	**	**
Vrijeme (t)	**	**	**	**
Interakcija ($\vartheta \times t$)	**	**	**	**

^{ns}nije statistički značajno

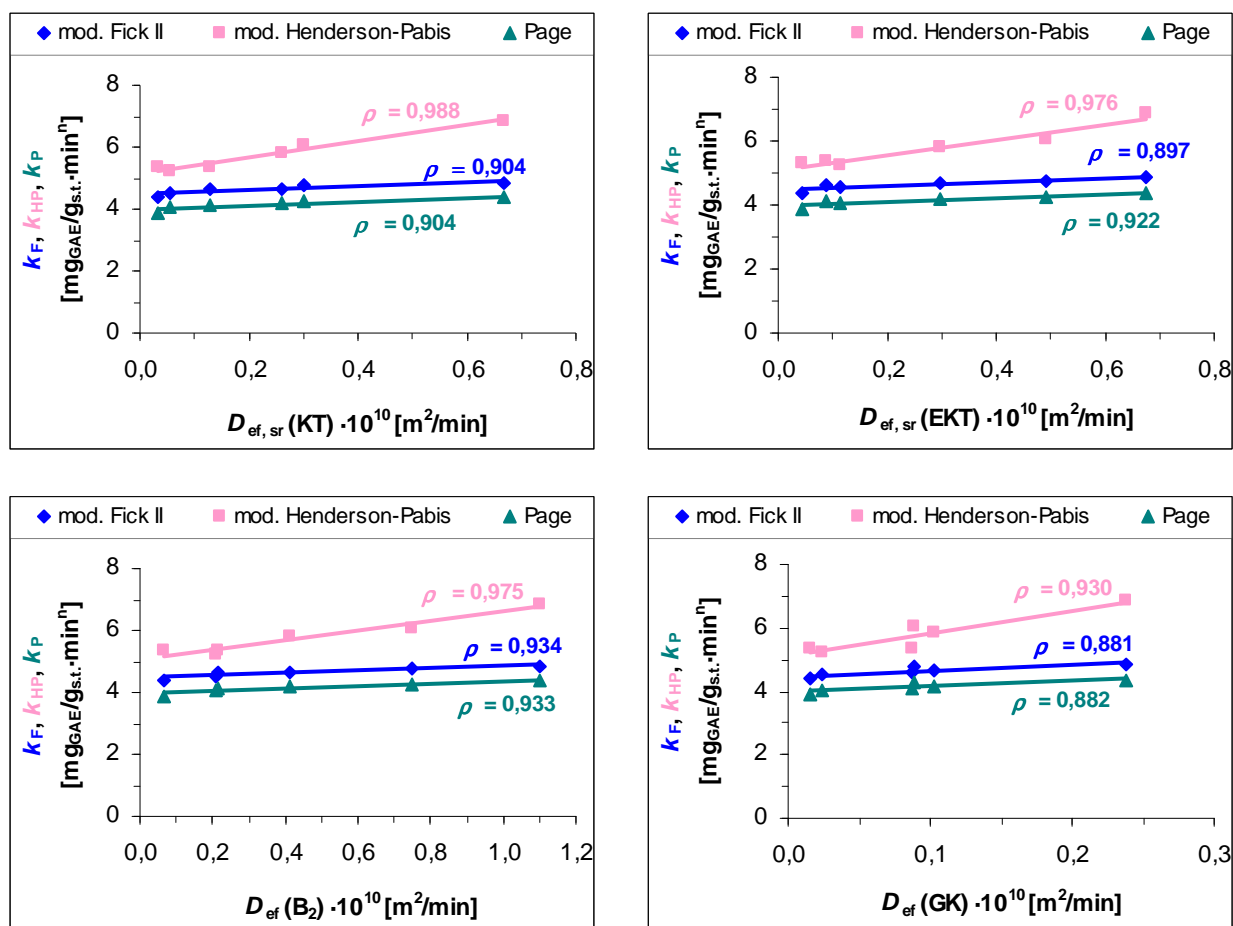
**statistički značajno uz $p = 0,01$

4.3.2.1. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) individualnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa tijekom procesa kruto-tekuće ekstrakcije

Koeficijenti efektivne difuzije i energija aktivacije za individualne fenole određeni su na isti način kao i za ukupne fenolne tvari. Tijekom ekstrakcije (+)-katehina i (-)-epikatehina uočen je brzi i spori period ekstrakcije, dok se za galnu kiselinu i procijanidin B₂ ekstrakcija odvijala u jednom periodu. Stoga su radi lakše usporedbe rezultata koeficijenti efektivne difuzije za (+)-katehin i (-)-epikatehin izraženi kao srednje vrijednosti D_{ef_sr} za oba perioda, a podaci su prikazani u **Tablici 4.12.**

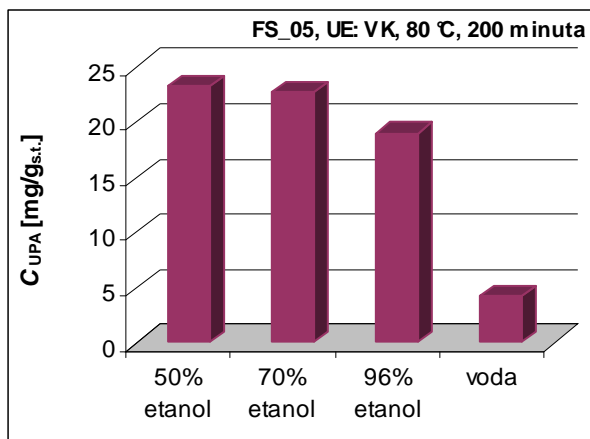
Tablica 4.12. Izračunane vrijednosti koeficijenata efektivne difuzije (D_{ef}) (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B₂ i galne kiseline iz sjemenki grožđa FS_05 i energije aktivacije (E_a) tijekom ekstrakcije sa 50%-tnim etanolom provedene u vodenoj kupelji

ϑ [°C]	$D_{ef_sr} \cdot 10^{10}$ [m ² /min]		$D_{ef} \cdot 10^{10}$ [m ² /min]	
	(+)-katehin	(-)-epikatehin	galna kiselina	procijanidin B ₂
25	0,03	0,04	0,02	0,06
40	0,06	0,11	0,02	0,21
50	0,13	0,09	0,09	0,21
60	0,26	0,30	0,10	0,41
70	0,30	0,49	0,09	0,75
80	0,67	0,69	0,24	1,10
E_a [kJ/mol]	48,79	44,98	41,29	44,13

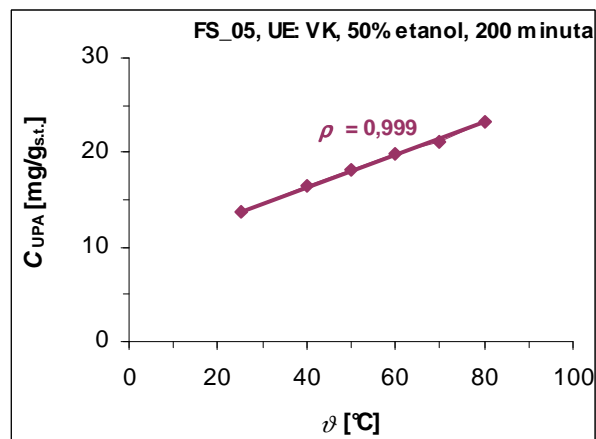


Slika 4.26. Slaganje vrijednosti efektivnih koeficijenata difuzije (D_{ef}) (+)-katehina (KT), (-)-epikatehina (EKT), procijanidina B₂ i galne kiseline (GK) iz sjemenki grožđa FS_05 s procijenjenim konstantama (k_F , k_{HP} , k_P) matematičkih modela

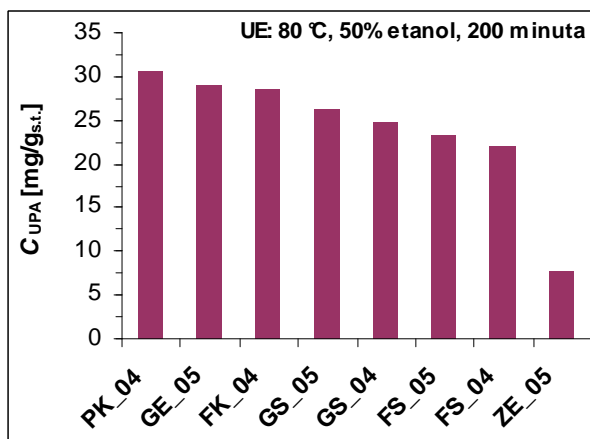
4.4. EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH PROANTOCIJANIDINA IZ SJEMENKI GROŽĐA



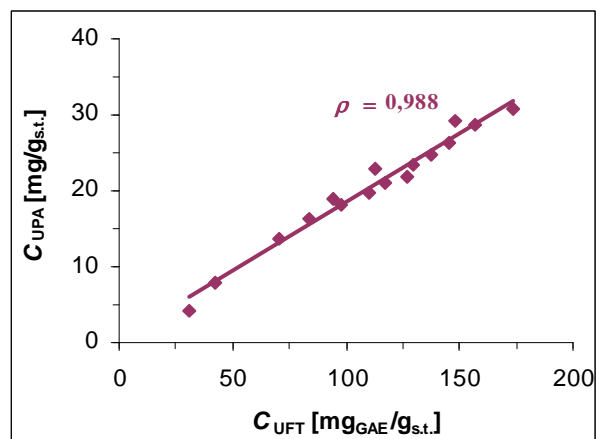
Slika 4.27. Utjecaj otapala na ekstrakciju ukupnih proantocijanidina (UPA) iz sjemenki grožđa FS_05 pri temperaturi 80 °C tijekom 200 minuta pomoću vodene kupelji



Slika 4.28. Utjecaj temperature (ϑ) na ekstrakciju ukupnih proantocijanidina (UPA) iz sjemenki grožđa FS_05 pomoću 50%-tnog etanola tijekom 200 minuta pomoću vodene kupelji



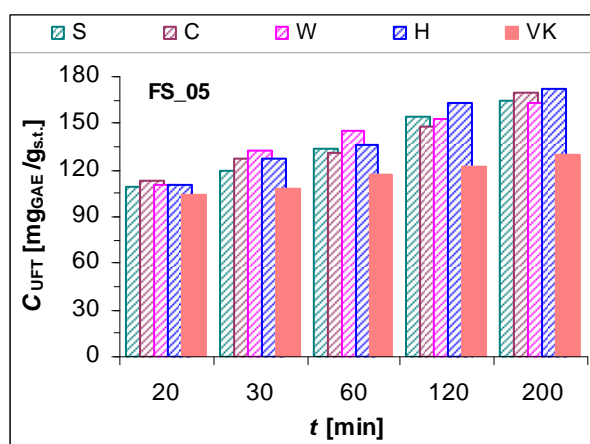
Slika 4.29. Maseni udio ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) različitih uzoraka (sorti) sjemenki grožđa ekstrahiranih pomoću 50%-tnog etanola pri temperaturi ekstrakcije 80 °C tijekom 200 minuta pomoću vodene kupelji



Slika 4.30. Korelacija između masenog udjela ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) ekstrahiranih tijekom 200 minuta pomoću vodene kupelji za sva ispitivana otapala, temperature ekstrakcije i uzorke

4.5. UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

Rezultati kruto-tekuće ekstrakcije provedene pomoću vodene kupelji uspoređeni su s rezultatima ekstrakcije provedene na univerzalnom sustavu za ekstrakciju Büchi te s rezultatima kombinirane ekstrakcije superkritična/kruto-tekuća ekstrakcija. Kruto-tekuća ekstrakcija na univerzalnom sustavu provedena je pomoću četiri različite metode ekstrakcije: Soxhlet standard (S), kontinuirana ekstrakcija (C), Soxhlet topli (W), vruća ekstrakcija (H). Budući da univerzalni sustav za ekstrakciju funkcionira na principu isparavanja/kondenziranja otapala pri njegovom vrelištu koje za etanol pri atmosferskom tlaku iznosi oko 78,5 °C, nije postojala mogućnost regulacije temperature te su rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim pomoću vodene kupelji (VK) pri 80 °C.



Slika 4.31. Utjecaj načina ekstrakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz sjemenki grožđa FS_05 ovisno o vremenu ekstrakcije (t)

Tablica 4.13. Statistička značajnost (F -test) utjecaja načina ekstrakcije (četiri metode sustava Büchi: S, C, W, H i ekstrakcija pomoću vodene kupelji - VK) u ovisnosti o vremenu na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 prema slučajnom blok rasporedu za dvofaktorijski pokus (5x5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljanja	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	**
Vrijeme (t)	**
Interakcija (ME x t)	**

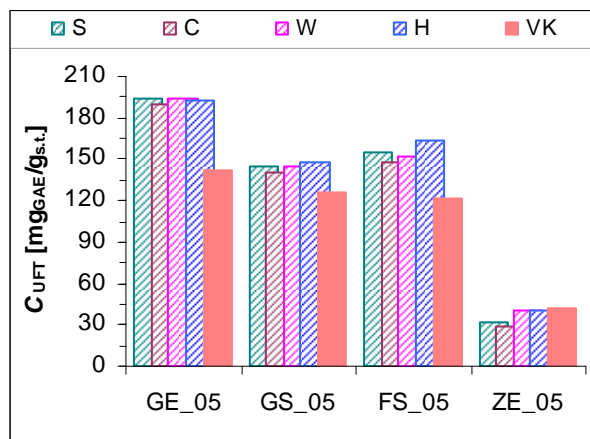
^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.14. Usporedba srednjih vrijednosti (Duncanovim *post-hoc* testom) masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) određenih u ekstraktima sjemenki grožđa FS_05, dobivenim ekstrakcijom pomoću vodene kupelji te različitim metodama ekstrakcije univerzalnog sustava Büchi u različitom vremenu ekstrakcije

C_{UFT} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	Interakcija vremena i metoda ekstrakcije										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
104,53	VK20										
108,24	VK30 VK30										
109,84	S 20	S 20	S 20								
110,01	H 20	H 20	H 20								
110,71	W 20	W 20	W 20								
113,61		C 20	C 20	C 20							
117,42			VK60	VK60							
119,74				S 30	S 30						
121,62				VK120	VK120	VK120					
127,31					H 30	H 30	H 30				
127,72					C 30	C 30	C 30	C 30			
129,59						VK200	VK200	VK200			
130,76							C 60	C 60			
132,19							W 30	W 30			
133,83							S 60	S 60			
136,47								H 60			
145,19									W 60		
147,98									C 120	C 120	
152,58									W 120	W 120	
154,86										S 120	
163,61											W 200
163,79											H 120
164,89											S 200
169,60											C 200
172,33											H 200

slova označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$



Slika 4.32. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima različitih uzoraka (sorti) sjemenki grožđa, dobivenim različitim načinima ekstrakcije (S, C, W, H; VK) tijekom 120 minuta

Tablica 4.15. Statistička značajnost (F -test) utjecaja načina ekstrakcije (četiri metode sustava Büchi: S, C, W, H i ekstrakcija pomoću vodene kupelji - VK) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari iz različitih uzoraka sjemenki grožđa prema slučajnom blok rasporedu za dvofaktorijski pokus (4×5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljjanja	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	**
Uzorak (U)	**
Interakcija (ME x U)	**

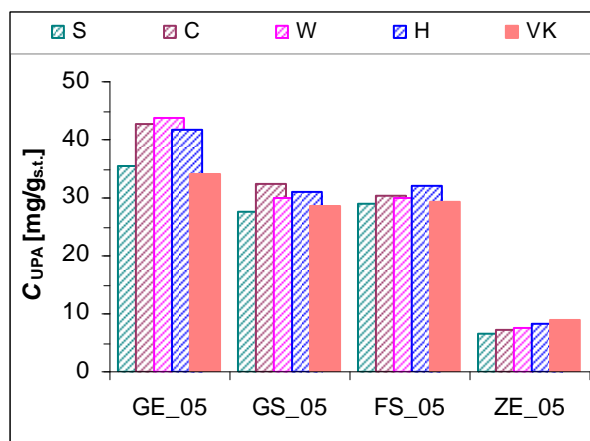
^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.16. Usporedba srednjih vrijednosti (Duncanovim *post-hoc* testom) masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) određenih u ekstraktima različitih uzoraka sjemenki grožđa (GE_05, GS_05, FS_05, ZE_05), dobivenim ekstrakcijom pomoću vodene kupelji (VK) te različitim metodama ekstrakcije univerzalnog sustava (S, C, W, H) tijekom 120 minuta

C_{UFT} [mg _{GAE} /g _{s.l.}]	Interakcija uzorka i metoda ekstrakcije							
	a	b	c	d	e	f	g	h
28,82	ZE_05_C							
32,03	ZE_05_S							
39,86	ZE_05_W							
40,38	ZE_05_H							
41,59	ZE_05_VK							
121,62	FS_05_VK							
126,71	GS_05_VK							
140,86	GS_05_C							
142,25	GE_05_VK							
144,26	GS_05_S GS_05_S							
144,74	GS_05_W GS_05_W							
147,19	GS_05_H GS_05_H GS_05_H							
147,98	FS_05_C FS_05_C FS_05_C							
152,58	FS_05_W FS_05_W							
154,86	FS_05_S							
163,79	FS_05_H							
189,03	GE_05_C							
192,40	GE_05_H							
193,56	GE_05_S							
194,30	GE_05_W							

slova označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$



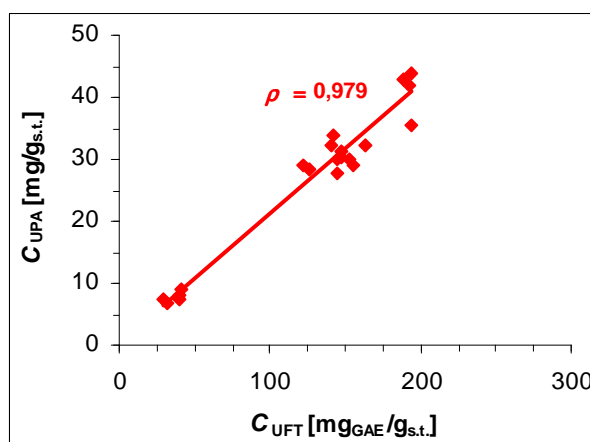
Slika 4.33. Maseni udio ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima različitih uzoraka (sorti) sjemenki grožđa, dobivenim različitim načinima ekstrakcije (S, C, W, H; VK) tijekom 120 minuta

Tablica 4.17. Statistička značajnost (F -test) utjecaja načina ekstrakcije (četiri metode sustava Büchi: S, C, W, H i ekstrakcija pomoću vodene kupelji - VK) na ekstraktibilnost ukupnih proantocijanidina iz različitih uzoraka sjemenki grožđa prema slučajnom blok rasporedu za dvofaktorijalni pokus (4x5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljanja	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	**
Uzorak (U)	**
Interakcija (ME x U)	**

^{ns}nije statistički značajno

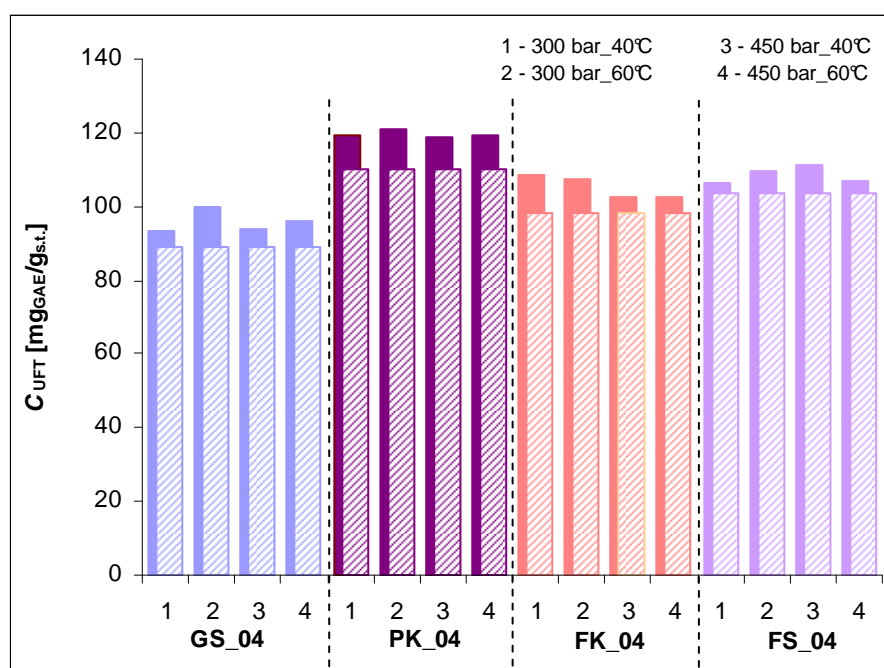
**statistički značajno uz $p = 0,01$



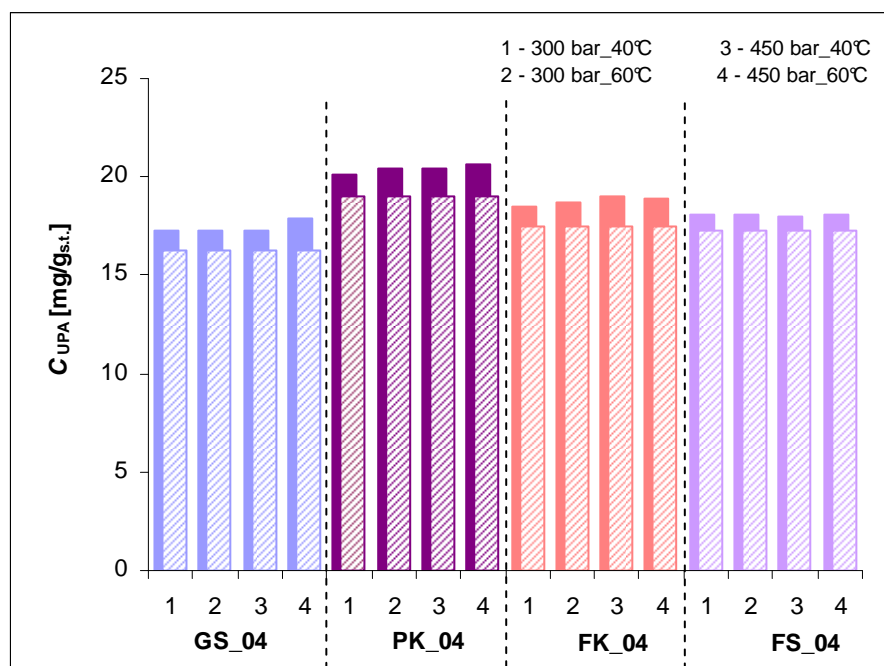
Slika 4.34. Korelacija između masenih udjela ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) i masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) određenih u ekstraktima, različitih uzoraka sjemenki grožđa (GE_05, GS_05, ZE_05, FS_05), dobivenim ekstrakcijom tijekom 120 minuta pomoću vodene kupelji (VK) i četiri metode univerzalnog sustava za ekstrakciju (S, C, W, H)

4.5.1. Utjecaj kombinacije superkritične i kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

S obzirom na to da su superkritičnom ekstrakcijom pod svim ispitivanim uvjetima (tlak: 300 i 450 bara, te temperature: 40 i 60 °C) dobiveni ekstrakti uljaste konzistencije bez utvrđene volumne koncentracije fenolnih tvari u njima, ta metoda ekstrakcije razmatrana je u kombinaciji s kruto-tekućom ekstrakcijom. Kruto-tekućoj ekstrakciji podvrgavali su se kruti ostaci oduljenih sjemenki grožđa zaostali nakon superkritične ekstrakcije.



Slika 4.35. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) u ekstraktima (kruto-tekuća ekstrakcija: 50%-tni etanol, 80 °C, 200 minuta) različitih uzoraka sjemenki grožđa prije (stupci s uzorkom) i nakon superkritične ekstrakcije - SCFE (obojeni stupci)



Slika 4.36. Maseni udio ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima (kruto-tekuća ekstrakcija: 50% etanol, 80 °C, 200 minuta) različitih uzoraka sjemenki grožđa prije (stupci s uzorkom) i nakon superkritične ekstrakcije - SCFE (obojeni stupci)

Tablica 4.18. Utjecaj uzorka i uvjeta SCFE na maseni udio ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) ekstrakata dobivenih ekstrakcijom otapalom iz krutog ostatka sjemenki grožđa nakon superkritične ekstrakcije (SCFE) prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijski pokus (4 x 4)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost	
	C_{UFT}	C_{UPA}
Ponavljanja	ns	ns
Uzorak (U)	**	**
Uvjet SCFE	ns	*
Interakcija (SCFE x U)	ns	ns

^{ns}nije statistički značajno

*statistički značajno uz $p = 0,05$

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.19. Statistička značajnost razlike masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom otapalom iz sjemenki grožđa prije i nakon superkritične ekstrakcije-SCFE (za oba tlaka i temperature) (prema t-testu)

Uzorak	Statistička značajnost	
	C_{UFT}	C_{UPA}
GS_04	**	**
PK_04	**	**
FK_04	**	**
FS_04	*	*

*statistički značajno uz $p = 0,05$

**statistički značajno uz $p = 0,01$

4.6. UTJECAJ UVJETA I NAČINA EKSTRAKCIJE NA BOJU EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA

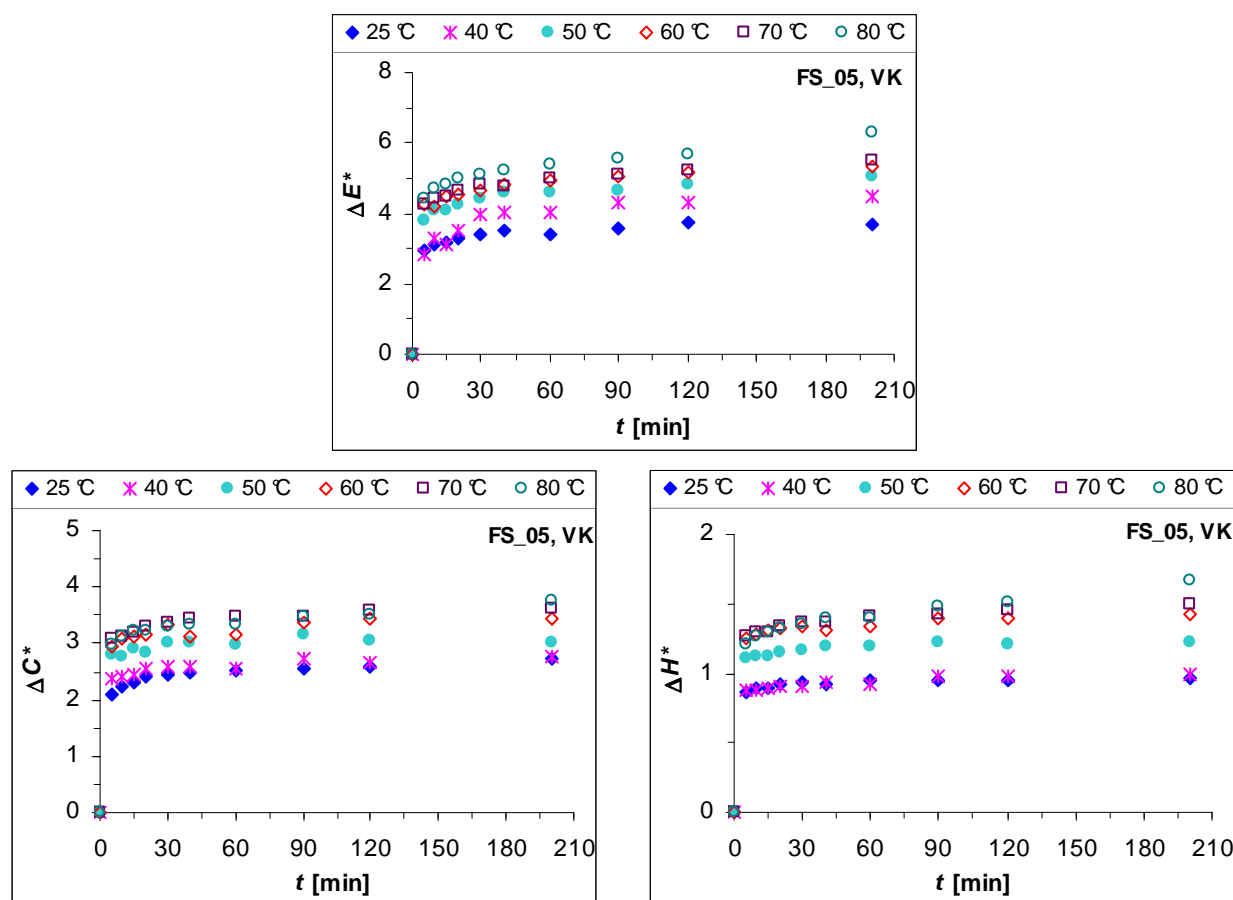
Tablica 4.20. Izmjereni parametri CIE- $L^*a^*b^*$ sustava boje (L^* , a^* , b^*) za ekstrakte sjemenki grožđa FS_05 dobivene ekstrakcijom pomoću 50%-tnog etanola, pri različitim temperaturama (25 - 80 °C) i vremenima trajanja ekstrakcije (5 - 200 minuta), uz korištenje vodene kupelji

t [min]	25 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
L^*						
0*	20,30	20,35	20,41	20,26	19,79	19,81
5	18,42	19,08	18,09	17,47	17,11	16,76
10	18,37	18,35	17,59	17,67	16,94	16,55
15	18,27	18,65	17,72	17,33	16,88	16,49
20	18,23	18,12	17,49	17,22	16,80	16,21
30	18,14	17,52	17,43	17,31	16,63	16,17
40	18,01	17,40	17,19	16,79	16,82	16,07
60	18,18	17,34	17,13	16,74	16,50	15,82
90	18,02	17,17	17,19	16,80	16,29	15,73
120	17,81	17,10	16,86	16,72	16,24	15,59
200	18,00	16,98	16,52	16,43	15,95	15,02
a^*						
0*	-0,18	-0,18	-0,24	-0,24	-0,23	-0,29
5	0,18	0,25	0,31	0,44	0,50	0,62
10	0,18	0,25	0,39	0,48	0,64	0,76
15	0,18	0,27	0,28	0,61	0,63	0,80
20	0,22	0,27	0,46	0,68	0,69	0,96
30	0,26	0,28	0,44	0,59	0,84	1,03
40	0,19	0,36	0,56	0,62	0,76	1,17
60	0,29	0,37	0,57	0,69	1,01	1,17
90	0,24	0,50	0,57	0,85	1,07	1,43
120	0,19	0,58	0,59	0,83	1,18	1,57
200	0,19	0,59	0,68	0,97	1,42	2,10
b^*						
0*	0,02	0,06	0,07	0,03	0,03	0,19
5	2,28	2,56	3,05	3,14	3,26	3,26
10	2,42	2,59	3,00	3,28	3,27	3,40
15	2,47	2,63	3,13	3,31	3,35	3,50
20	2,58	2,74	3,06	3,31	3,47	3,43
30	2,61	2,76	3,23	3,52	3,49	3,50
40	2,64	2,76	3,22	3,30	3,60	3,49
60	2,68	2,71	3,18	3,34	3,55	3,50
90	2,73	2,88	3,36	3,51	3,53	3,56
120	2,77	2,79	3,24	3,60	3,62	3,54
200	2,90	2,91	3,20	3,56	3,59	3,55

izmjereni parametri boje L_0^ , a_0^* i b_0^* za 50%-tni etanol pri ispitivanim temperaturama ekstrakcije

Tablica 4.21. Ton boje (h^{o*}) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih ekstrakcijom pomoću 50%-tnog etanola, pri različitim temperaturama (25 - 80 °C) i vremenima trajanja ekstrakcije (5 - 200 minuta), uz korištenje vodene kupelji

t [min]	25 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
	h^{o*}					
5	85,49	84,49	84,14	82,09	81,30	79,30
10	85,67	84,55	82,66	81,67	78,89	77,35
15	85,76	84,07	84,95	79,50	79,41	77,12
20	85,05	84,31	81,38	78,45	78,70	74,32
30	84,33	84,15	82,26	80,49	76,41	73,62
40	85,90	82,51	80,19	79,43	78,14	71,42
60	83,82	82,18	79,89	78,38	74,19	71,58
90	84,91	80,25	80,37	76,44	73,21	68,09
120	86,01	78,19	79,75	77,01	71,90	66,13
200	86,19	78,50	78,01	74,80	68,42	59,38



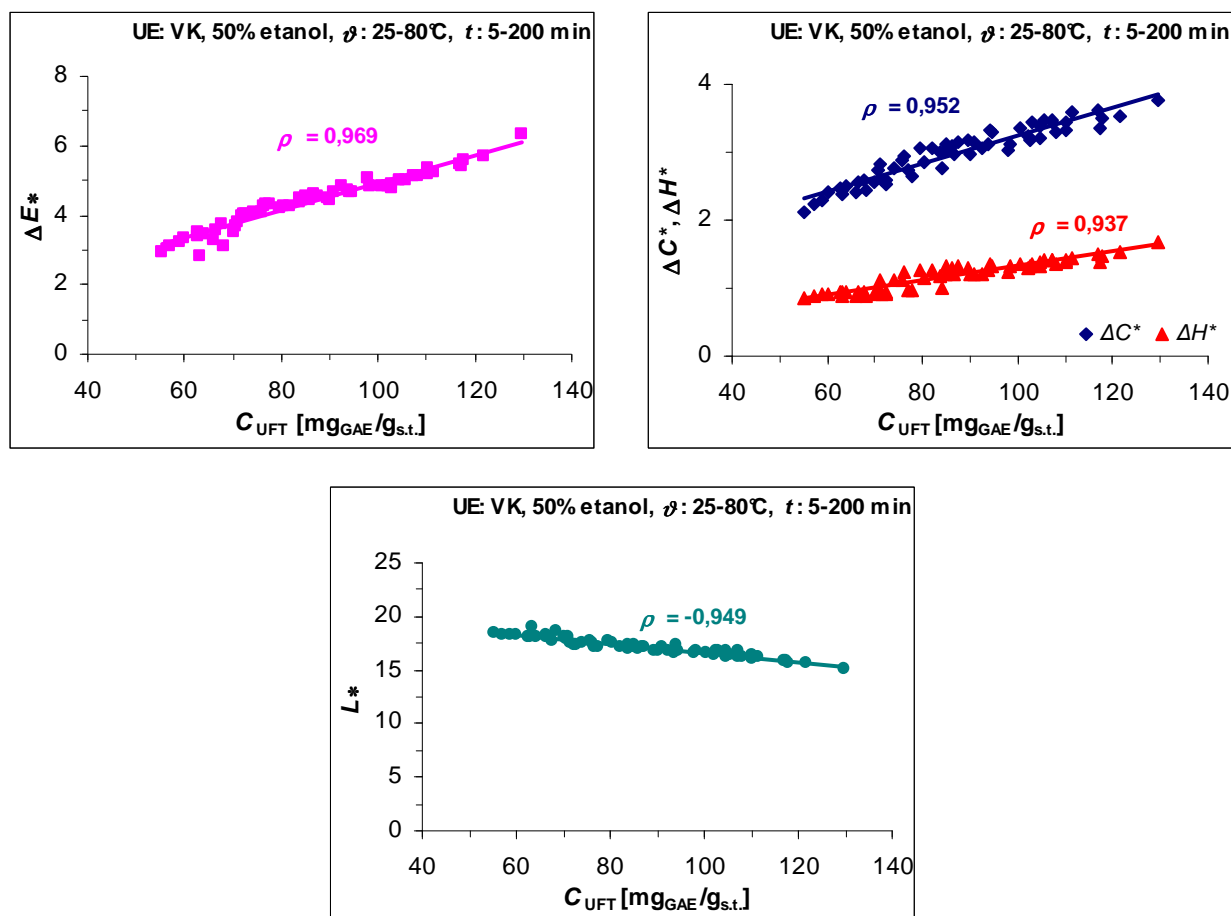
Slika 4.37. Ukupna promjena boje (ΔE^*), promjena zasićenja (kromatičnosti) boje (ΔC^*) i promjena tona boje (ΔH^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 u ovisnosti o vremenu ekstrakcije (t), za različite temperature ekstrakcije (ekstrakcija pomoću 50%-tnog etanola provedena u vodenoj kupelji – VK)

Tablica 4.22. Statistička značajnost utjecaja temperature i vremena ekstrakcije na parametre boje (L^* , a^* , b^*), ton boje (h^{0*}), te promjene svojstava boje (ΔC^* , ΔE^* , ΔH^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (6 x 10)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost						
	L^*	a^*	b^*	h^{0*}	ΔC^*	ΔE^*	ΔH^*
Ponavljjanja	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temperatura (ϑ)	**	**	**	**	**	**	**
Vrijeme (t)	**	**	**	**	**	**	**
Interakcija ($\vartheta \times t$)	**	**	**	**	**	**	**

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$



Slika 4.38. Ovisnost ukupne promjene boje (ΔE^*), promjene kromatičnosti (ΔC^*) i promjene tona boje (ΔH^*) te svjetline (L^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari - C_{UFT} (podaci za ekstrakte dobivene ekstrakcijom, pomoću 50%-tnog etanola pri različitim temperaturama (ϑ) i vremenu ekstrakcije (t), uz korištenje vodene kupelji-VK)

Tablica 4.23. Izmjereni parametri CIE- $L^*a^*b^*$ sustava boje (L^* , a^* , b^*), ton boje ($h^{°*}$) te ukupna promjena boje (ΔE^*), promjena kromatičnosti (ΔC^*) i promjena tona boje (ΔH^*) ekstrakata različitih sorti sjemenki grožđa (PK_04, FK_04, FS_04, GS_04, FS_05, GE_05, GS_05, ZE_05) dobivenih nakon 200 minuta ekstrakcije pri temperaturi 80 °C pomoću 50%-tnog etanola, uz korištenje vodene kupelji

	PK_04	FK_04	FS_04	GS_04	FS_05	GE_05	GS_05	ZE_05
L^*	14,88	14,45	15,04	14,93	15,02	14,81	15,06	16,59
a^*	2,50	2,05	2,02	2,12	2,10	1,75	2,31	0,94
b^*	3,56	3,12	3,39	3,90	3,55	3,32	3,70	2,46
$h^{°*}$	54,91	56,77	59,22	61,45	59,38	62,26	57,99	59,38
ΔE^*	6,82	6,78	6,43	6,84	6,32	6,49	6,69	4,39
ΔC^*	4,21	3,59	3,81	4,30	3,78	3,61	4,22	2,49
ΔH^*	1,52	1,41	1,44	1,52	1,67	1,40	1,52	1,15

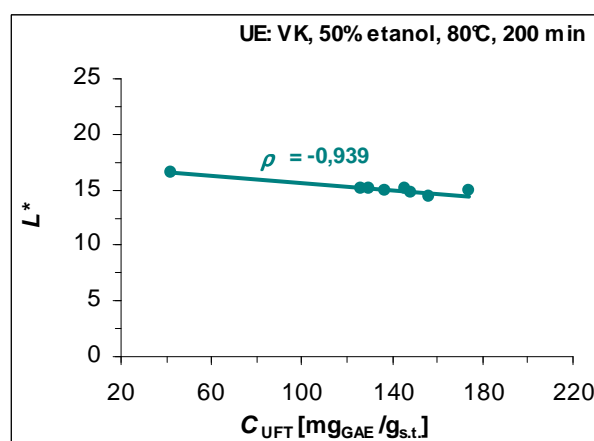
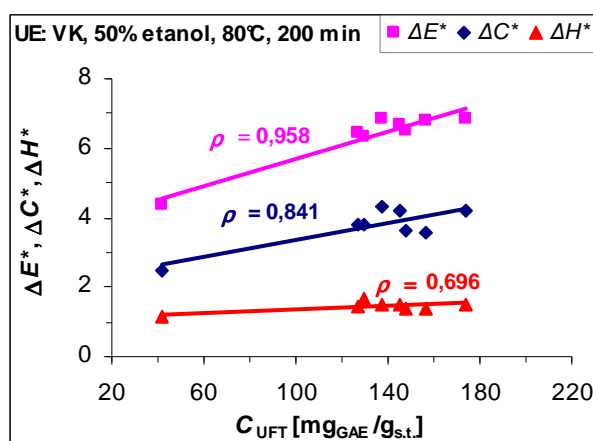
Izmjereni parametri boje za 50%-tni etanol: $L_0^* = 20,02$, $a_0^* = -0,11$ i $b_0^* = -0,08$

Tablica 4.24. Statistička značajnost (ANOVA) utjecaja sorte (PK_04, FK_04, FS_04, GS_04, FS_05, GE_05, GS_05, ZE_05) na parametre boje (L^* , a^* , b^*), ton boje ($h^{°*}$), te promjene svojstava boje (ΔC^* , ΔE^* , ΔH^*) ekstrakata sjemenki grožđa

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost						
	L^*	a^*	b^*	$h^{°*}$	ΔC^*	ΔE^*	ΔH^*
Ponavljjanja	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Uzorci	**	**	**	**	**	**	**

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$



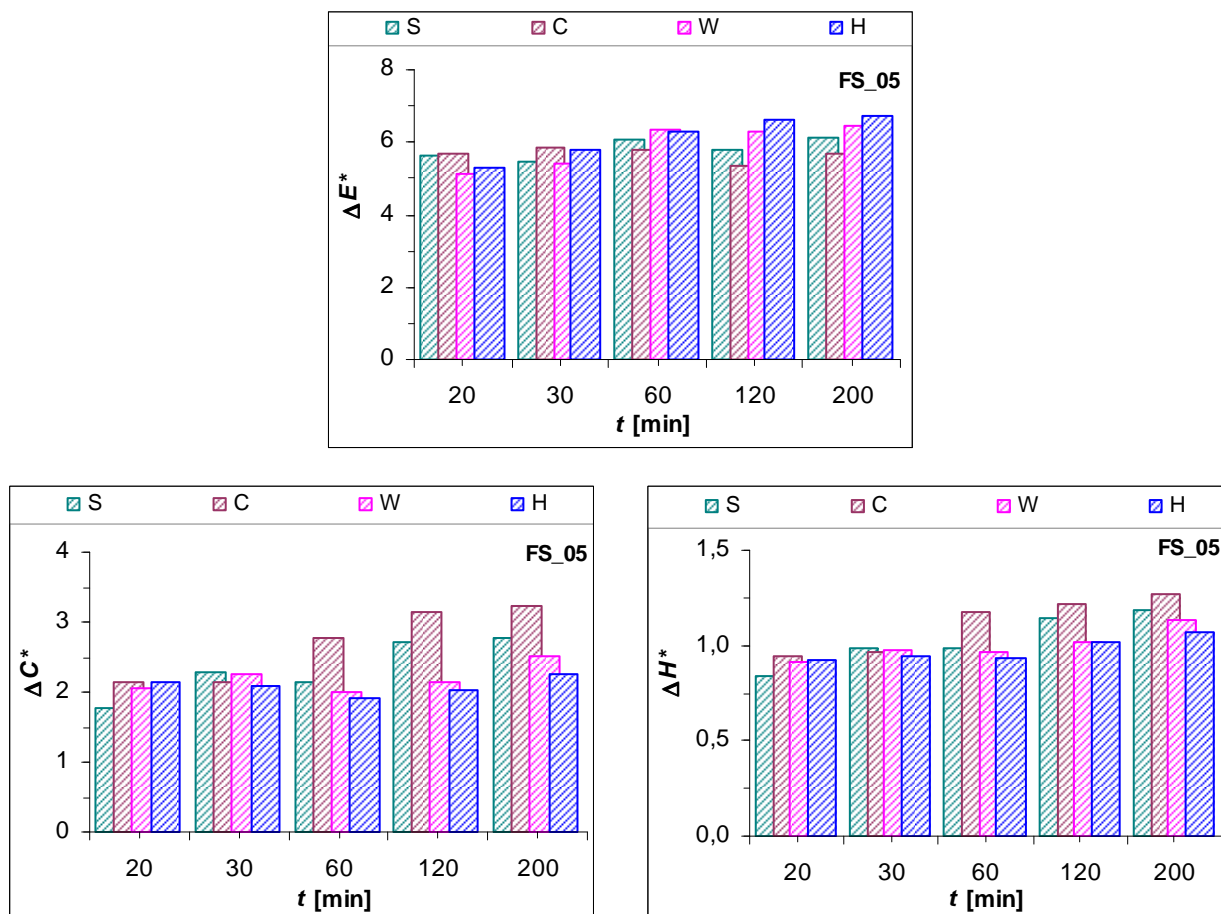
Slika 4.39. Ovisnost ukupne promjene boje (ΔE^*), promjene kromatičnosti (ΔC^*) i promjene tona boje (ΔH^*) te svjetline (L^*) ekstrakata različitih sorti sjemenki grožđa (PK_04, FK_04, FS_04, GS_04, FS_05, GE_05, GS_05, ZE_05) o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari - C_{UFT} (podaci za ekstrakte dobivene ekstrakcijom pomoću 50%-tnog etanola, pri temperaturi ekstrakcije 80 °C i vremenu trajanja 200 minuta, uz korištenje vodene kupelji-VK)

Tablica 4.25. Izmjereni parametri CIE- $L^*a^*b^*$ sustava boje (L^* , a^* , b^*) te izračunane vrijednosti za ton boje (h^{o*}) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05, dobivenih pomoću 50%-tnog etanola pri različitom vremenu trajanja ekstrakcije (20-200 minuta) primjenom četiri metode univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi

t [min]	S	C	W	H
L^*				
20	14,28	14,35	14,95	14,82
30	14,72	14,20	14,72	14,21
60	13,95	14,60	13,64	13,62
120	14,56	15,42	13,76	13,37
200	14,25	15,05	13,76	13,34
a^*				
20	0,53	0,85	0,71	0,72
30	0,96	0,97	0,96	0,88
60	1,08	1,85	1,11	0,98
120	1,64	1,85	1,25	1,35
200	1,88	2,13	1,73	1,54
b^*				
20	1,86	2,12	2,10	2,19
30	2,23	2,09	2,20	2,05
60	2,02	2,25	1,83	1,82
120	2,35	2,72	1,94	1,73
200	2,24	2,63	2,05	1,87
h^{o*}				
20	74,10	68,11	71,32	71,88
30	66,71	65,10	66,49	66,84
60	61,92	50,57	58,76	61,70
120	55,17	55,80	57,24	51,95
200	50,07	51,00	49,85	50,45

Parametri boje za 50%-tni etanol: $L_0^* = 19,56$; $a_0^* = -0,15$; $b_0^* = 0,01$

S - Soxhlet standard, C – kontinuirana ekstrakcija, W – Soxhlet topli, H - vruća ekstrakcija



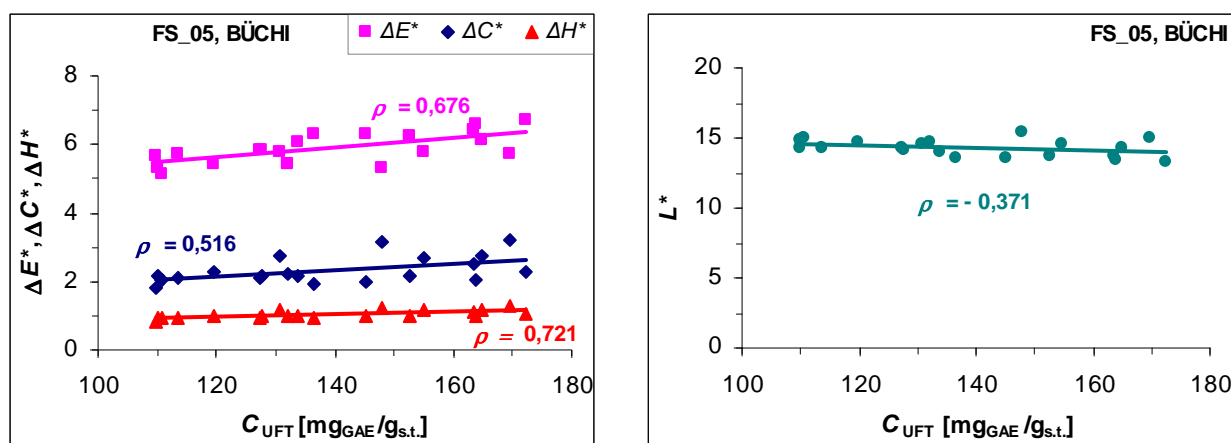
Slika 4.40. Ukupna promjena boje (ΔE^*), promjena zasićenja (kromatičnosti) boje (ΔC^*) i promjena tona boje (ΔH^*) ekstrakta sjemenki grožđa FS_05 dobivenih 50%-tnim etanolom u ovisnosti o vremenu ekstrakcije za različite načine ekstrakcije univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi (S - Soxhlet standard, C – kontinuirana ekstrakcija, W – Soxhlet topli, H - vruća ekstrakcija)

Tablica 4.26. Statistička značajnost utjecaja metode (ME) i vremena ekstrakcije (t) na parametre boje (L^* , a^* , b^*), ton boje (h^{o*}), te promjene svojstava boje (ΔC^* , ΔE^* , ΔH^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4 x 5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost						
	L^*	a^*	b^*	h^{o*}	ΔC^*	ΔE^*	ΔH^*
Ponavljanja	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	**	**	**	**	**	**	**
Vrijeme (t)	**	**	**	**	**	**	**
Interakcija (ME x t)	**	**	**	**	**	**	**

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$



Slika 4.41. Ovisnost ukupne promjene boje (ΔE^*), promjene kromatičnosti (ΔC^*), promjene tona boje (ΔH^*) i svjetline (L^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari – C_{UFT} (podaci za ekstrakte dobivene pomoću 50%-tnog etanola nakon ekstrakcije u vremenu trajanja od 20 do 200 minuta uz primjenu četiri metode ekstrakcije univerzalnog sustava Büchi - Soxhlet standard, kontinuirana ekstrakcija, Soxhlet topli i vruća ekstrakcija)

Tablica 4.27. Izmjereni parametri CIE- $L^*a^*b^*$ sustava boje (L^* , a^* , b^*), ton boje (h°) te ukupna promjena boje (ΔE^*), promjena kromatičnosti (ΔC^*) i promjena tona boje (ΔH^*) ekstrakata različitih uzoraka sjemenki grožđa (GE_05, GS_05, FS_05, ZE_05) dobivenih pomoću četiri metode (ME) univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi (Standard - S, kontinuirana - C, topla - W i vruća - H ekstrakcija); ekstrakcija provedena pomoću 50%-tnog etanola u vremenu trajanja 120 minuta

ME	Sorta	GE_05	GS_05	FS_05	ZE_05
S	L^*	12,75	13,50	14,56	13,09
	a^*	1,09	0,87	1,63	0,32
	b^*	1,40	1,72	2,35	1,04
	h°	52,27	63,10	55,23	73,11
	ΔE^*	7,07	6,38	5,80	5,10
	ΔC^*	1,63	1,78	2,71	0,93
	ΔH^*	0,90	0,89	1,13	0,67
C	L^*	14,96	15,24	15,41	14,37
	a^*	1,61	1,83	1,84	0,74
	b^*	2,50	2,84	2,72	1,27
	h°	57,26	57,27	55,88	59,72
	ΔE^*	5,52	5,53	5,34	4,00
	ΔC^*	2,82	3,23	3,14	1,31
	ΔH^*	1,14	1,21	1,20	0,83
W	L^*	13,09	13,09	13,76	12,92
	a^*	1,14	0,90	1,24	0,36
	b^*	1,57	1,57	1,93	1,05
	h°	54,16	60,22	57,28	71,36
	ΔE^*	6,78	6,74	6,27	5,27
	ΔC^*	1,79	1,66	2,15	0,95
	ΔH^*	0,93	0,87	1,00	0,68
H	L^*	14,09	13,73	13,36	13,06
	a^*	1,07	1,33	1,34	0,37
	b^*	1,93	2,04	1,73	1,16
	h°	61,05	56,86	52,14	72,39
	ΔE^*	5,92	6,35	6,60	5,15
	ΔC^*	2,06	2,28	2,04	1,06
	ΔH^*	0,96	1,03	1,00	0,71

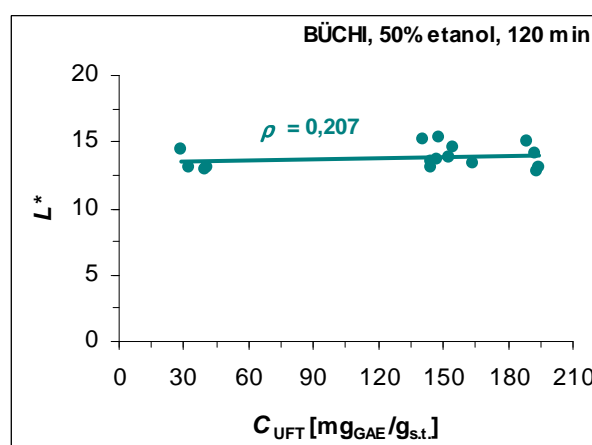
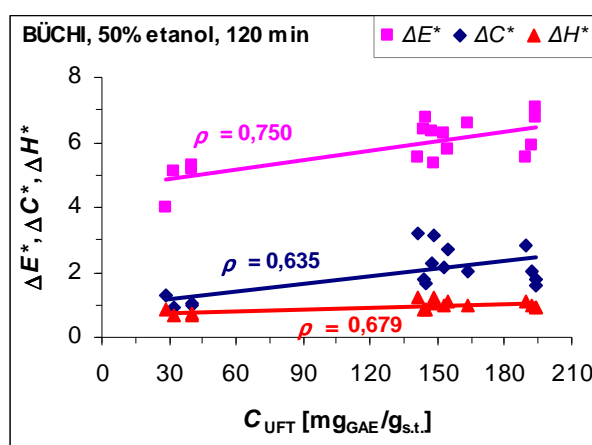
Parametri boje za 50%-tni etanol (otapalo za sve uzorke osim ZE_05): $L_0^*=19,56$; $a_0^*=-0,15$; $b_0^*=0,01$; $C_0^*=0,15$

Parametri boje za 50%-tni etanol (otapalo za ZE_05): $L_0^*=18,05$; $a_0^*=-0,16$; $b_0^*=-0,01$; $C_0^*=0,16$

Tablica 4.28. Statistička značajnost utjecaja uzorka i metode ekstrakcije na parametre boje (L^* , a^* , b^*), ton boje (h^{o*}), te promjene svojstava boje (ΔC^* , ΔE^* , ΔH^*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4 x 4)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost						
	L^*	a^*	b^*	h^{o*}	ΔC^*	ΔE^*	ΔH^*
Ponavljjanja	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	**	**	**	**	**	**	**
Uzorak (U)	**	**	**	**	**	**	**
Interakcija (ME x U)	**	**	**	**	**	**	**

^{ns}nije statistički značajno; **statistički značajno uz $p = 0,01$



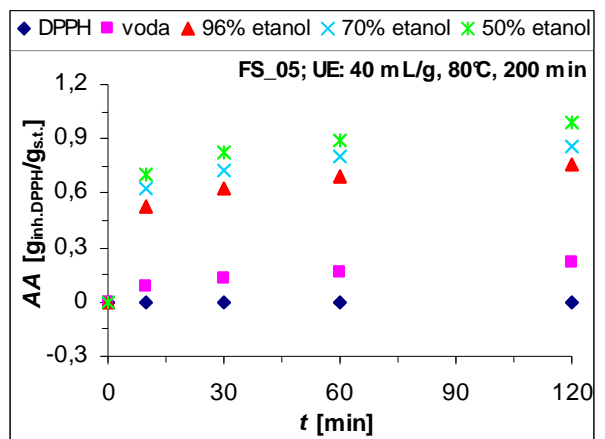
Slika 4.42. Ovisnost ukupne promjene boje (ΔE^*), promjene kromatičnosti (ΔC^*) i promjene tona boje (ΔH^*) te svjetline (L^*) ekstrakta različitih sorti sjemenki grožđa (GE_05, GS_05, FS_05, ZE_05) o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari – C_{UFT} (podaci za ekstrakte dobivene pomoću 50%-tnog etanola nakon 120 minuta ekstrakcije uz primjenu četiri metode ekstrakcije univerzalnog sustava Büchi - Soxhlet standard, kontinuirana ekstrakcija, Soxhlet topli i vruća ekstrakcija)

4.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA

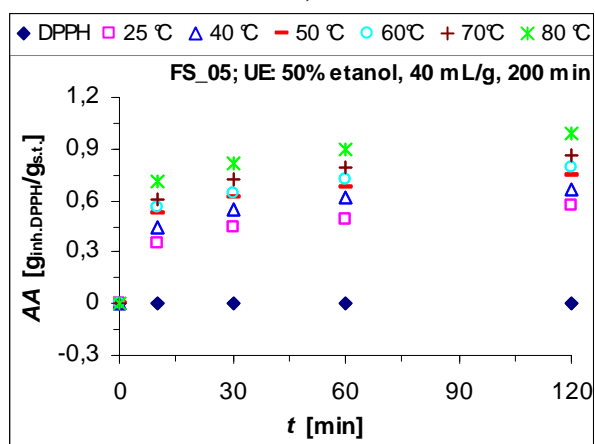
U ovom djelu prikazani su rezultati ispitivanja:

- ☞ kinetike reakcija otopina DPPH radikala i ekstrakata sjemenki grožđa dobivenih pri različitim uvjetima (otapalo, temperatura, različiti uzorci) radi određivanja optimalnog vremena provođenja DPPH testa za dobivene ekstrakte,
- ☞ utjecaja uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata različitih uzoraka sjemenki grožđa,
- ☞ korelacije ekstrahiranih i kvantificiranih fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata.

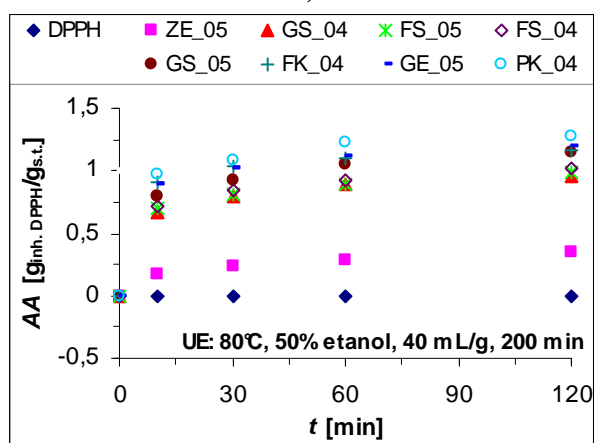
4.7.1. Utjecaj uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa



a)



b)



c)

Slika 4.43. Kinetika inhibicije DPPH radikala (izražena kao antioksidacijska aktivnost ekstrakta) ekstraktima sjemenki grožđa dobivenim pomoću vodene kupelji pri različitim uvjetima ekstrakcije (UE): a) različita otapala, b) različite temperature, c) različiti uzorci sjemenki grožđa

Tablica 4.29. Statistička značajnost (F -test) utjecaja otapala, temperature i različitih uzoraka sjemenki grožđa na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta s obzirom na vrijeme reakcije DPPH radikala i ekstrakta prema dvofaktorijalnom testu (4 x 4, 6 x 4, 8 x 4)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
4 otapala x 4 vremena reakcije (FS_05)	
Ponavljjanja	ns
Otapalo (O)	**
Vrijeme (t)	**
Interakcija (O x t)	ns
6 temperature x 4 vremena reakcije (FS_05)	
Ponavljjanja	ns
Temperatura (ϑ)	**
Vrijeme (t)	**
Interakcija (ϑ x t)	ns
8 uzoraka x 4 vremena reakcije	
Ponavljjanja	ns
Uzorak (U)	**
Vrijeme (t)	**
Interakcija (U x t)	ns

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.30. *p*-vrijednosti određene prema Duncanovu *post-hoc* testu za različita vremena inhibicije DPPH radikala ekstraktima sjemenki grožđa dobivenim u različitim uvjetima ekstrakcije (otapalo, temperatura i različiti uzorci sjemenki grožđa)

Vrijeme reakcije DPPH i ekstrakta [min]	<i>p</i> – vrijednost (<i>p</i> < 0,0500 statistički značajno)			
	Otapalo			
	10	30	60	120
10	x	0,278077	0,086379	0,013618
30	0,278077	x	0,461441	0,131808
60	0,086379	0,461441	x	0,386068
120	0,013618	0,131808	0,386068	x
	Temperatura			
	10	30	60	120
10	x	0,080304	0,000011	0,000003
30	0,080304	x	0,05132	0,000011
60	0,000011	0,05132	x	0,086118
120	0,000003	0,000011	0,086118	x
	Različiti uzorci			
	10	30	60	120
10	x	0,136609	0,013954	0,001025
30	0,136609	x	0,267225	0,050507
60	0,013954	0,267225	x	0,334994
120	0,001025	0,050507	0,334994	x

Analizom podataka popraćenom statističkom obradom (**Tablica 4.30**) utvrđeno ja da je 30 minuta optimalno vrijeme inhibicije DPPH radikala ekstraktima sjemenki grožđa dobivenim u eksperimentalnim uvjetima te su za daljine usporedbe rezultata (praćenje utjecaja otapala, temperature i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost) korišteni podaci za antioksidacijsku aktivnost dobiveni nakon 30 minutne inhibicije DPPH radikala.

Tablica 4.31. Usporedba srednjih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (AA) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih različitim otapalima tijekom ekstrakcije 200 minuta pri temperaturi 80 °C prema Duncanovu *post-hoc* testu

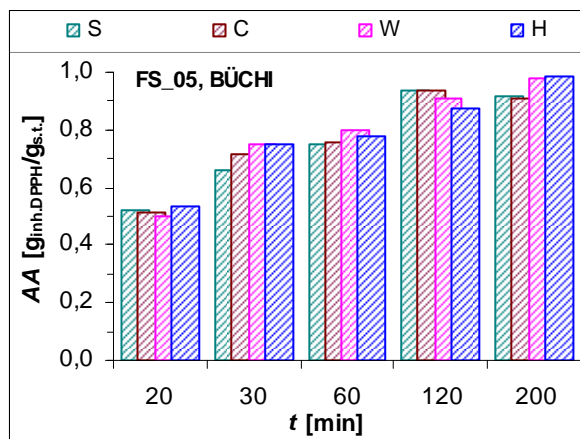
AA [g _{inh.DPPH} /g _{s.t.}]	Otapalo			
	a	b	c	d
0,13	voda			
0,63	96% etanol			
0,73	70% etanol			
0,82	50% etanol			

slova označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$

Tablica 4.32. Usporedba srednjih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (AA) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih pri različitim temperaturama ekstrakcije tijekom 200 minuta pomoću 50%-tnog etanola prema Duncanovu *post-hoc* testu

AA [g _{inh.DPPH} /g _{s.t.}]	t [°C]				
	a	b	c	d	e
0,45	25				
0,55	40				
0,61	50 50				
0,64	60 60				
0,72	70				
0,82	80				

slova označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$



Slika 4.44. Antioksidacijska aktivnost (AA) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih tijekom 20-200 minuta ekstrakcije različitim metodama univerzalnog sustava za ekstrakciju: Soxhlet standard (S), kontinuirana ekstrakcija (C), Soxhlet topli (W) i vruća ekstrakcija (H) pomoću 50%-tnog etanola

Tablica 4.33. Statistička značajnost utjecaja metode univerzalnog sustava za ekstrakciju (S, C, W, H) i vremena ekstrakcije (t) na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dobivenih u navedenim uvjetima iz sjemenki grožđa FS_05 prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4 x 5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljjanja	ns
Metoda ekstrakcije (ME)	ns
Vrijeme (t)	**
Interakcija (ME x t)	ns

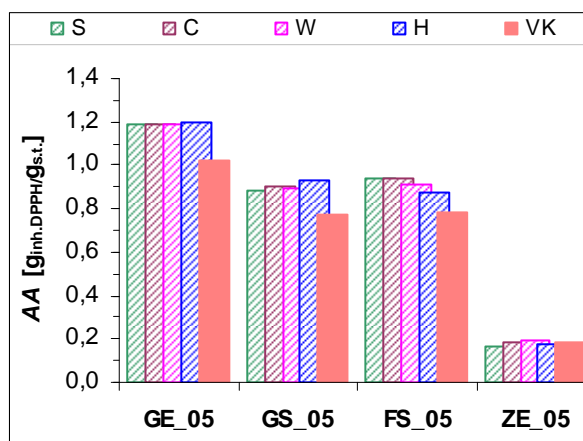
^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.34. Usporedba srednjih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (AA) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih u različitom vremenu (t) metodama univerzalnog sustava za ekstrakciju (S, C, W, H) prema Duncanovu *post-hoc* testu

AA [g _{inh.DPPH} /g _{s.t.}]	t [min]			
	a	b	c	d
0,52	20			
0,72	30			
0,77	60			
0,92	120			
0,95	200			

slava označavaju statistički različite grupe podataka uz $p = 0,05$



Slika 4.45. Antioksidacijska aktivnost (AA) ekstrakata različitih uzoraka (sorti) sjemenki grožđa dobivenih različitim metodama univerzalnog sustava za ekstrakciju: Soxhlet standard (S), kontinuirana ekstrakcija (C), Soxhlet topli (W), vruća ekstrakcija (H) i ekstrakcijom pomoću vodene kupelji (VK) tijekom 120 minuta; ekstrakcija provedena 50%-tnim etanolom

Tablica 4.35. Statistička značajnost utjecaja uzoraka (sorti) sjemenki grožđa na AA ekstrakata dobivenih pomoću pet načina ekstrakcije (S, C, W, H; VK) tijekom 120 minuta prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4 x 5)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljanja	ns
Uzorak (U)	**
Metoda ekstrakcije (ME)	**
Interakcija (ME x U)	**

^{ns}nije statistički značajno

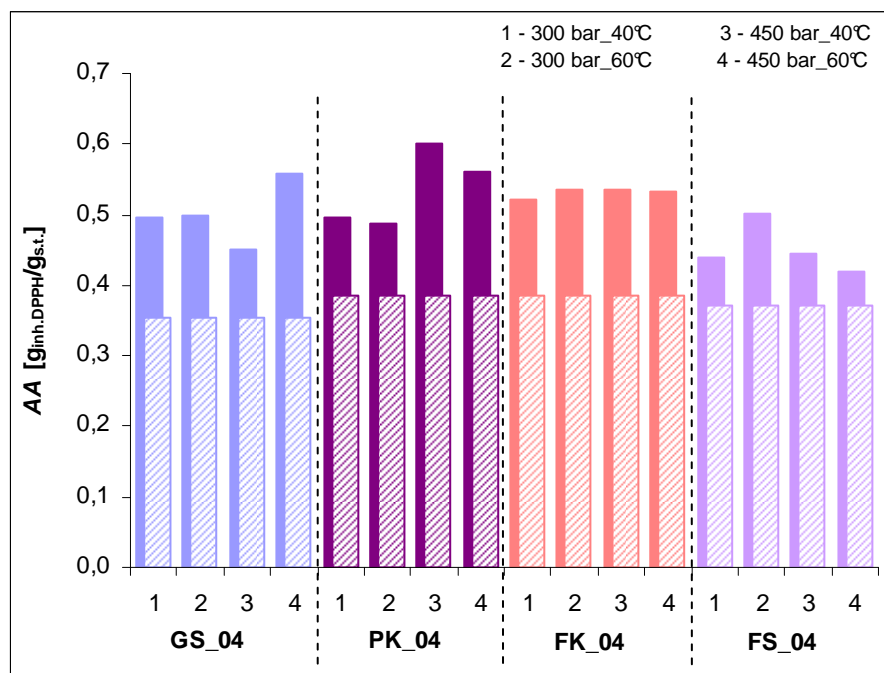
**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.36. Statistička značajnost utjecaja metode ekstrakcije (S, C, W, H; VK) na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata različitih uzoraka sjemenki grožđa dobivenih tijekom 120 minuta ekstrakcije prema Duncanovu *post-hoc* testu

GE_05		GS_05		FS_05		ZE_05
a	b	a	b	a	b	a
VK		VK		VK		S
	W		S		H	H
	S		W		W	C
	C		C		S	VK
	H		H		C	W

isto slovo označava istu statističku značajnost ispitivanih parametara ($p < 0,05$)

4.7.1.1. Utjecaj oduljavanja sjemenki grožđa superkričnom ekstrakcijom na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dobivenih kruto-tekućom ekstrakcijom



Slika 4.46. Antioksidacijska aktivnost (AA) ekstrakata dobivenih kruto-tekućom ekstrakcijom (50%-tni etanol, 80 °C, 200 minuta, vodena kupelj) iz različitih uzoraka sjemenki grožđa prije (stupci s uzorkom) i nakon superkrične ekstrakcije - SCFE (obojeni stupci)

Tablica 4.37. Utjecaj uzorka i uvjeta SCFE na AA ekstrakata dobivenih iz krutog ostatka sjemenki grožđa nakon SCFE prema slučajnom blok rasporedu (ANOVA) za dvofaktorijalni pokus (4 x 4)

Izvori varijabilnosti	Statistička značajnost
Ponavljjanja	ns
Uzorak (U)	**
Uvjet SCFE	ns
Interakcija (SCFE x U)	ns

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

Tablica 4.38. Statistička značajnost razlike AA ekstrakata dobivenih iz različitih uzoraka sjemenki grožđa prije i nakon SCFE (za oba tlaka i temperature) (prema t-testu)

Uzorak	Statistička značajnost
GS_04	**
PK_04	**
FS_04	**
FK_04	**

^{ns}nije statistički značajno

**statistički značajno uz $p = 0,01$

4.7.2. Korelacija između masenog udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa

Tablica 4.39. Koeficijent korelacije (ρ) između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i masenog udjela individualnih te ukupnih fenolnih tvari za ekstrakte dobivene ekstrakcijom u vodenoj kupelji (VK) nakon 200 minuta iz sjemenki grožđa:

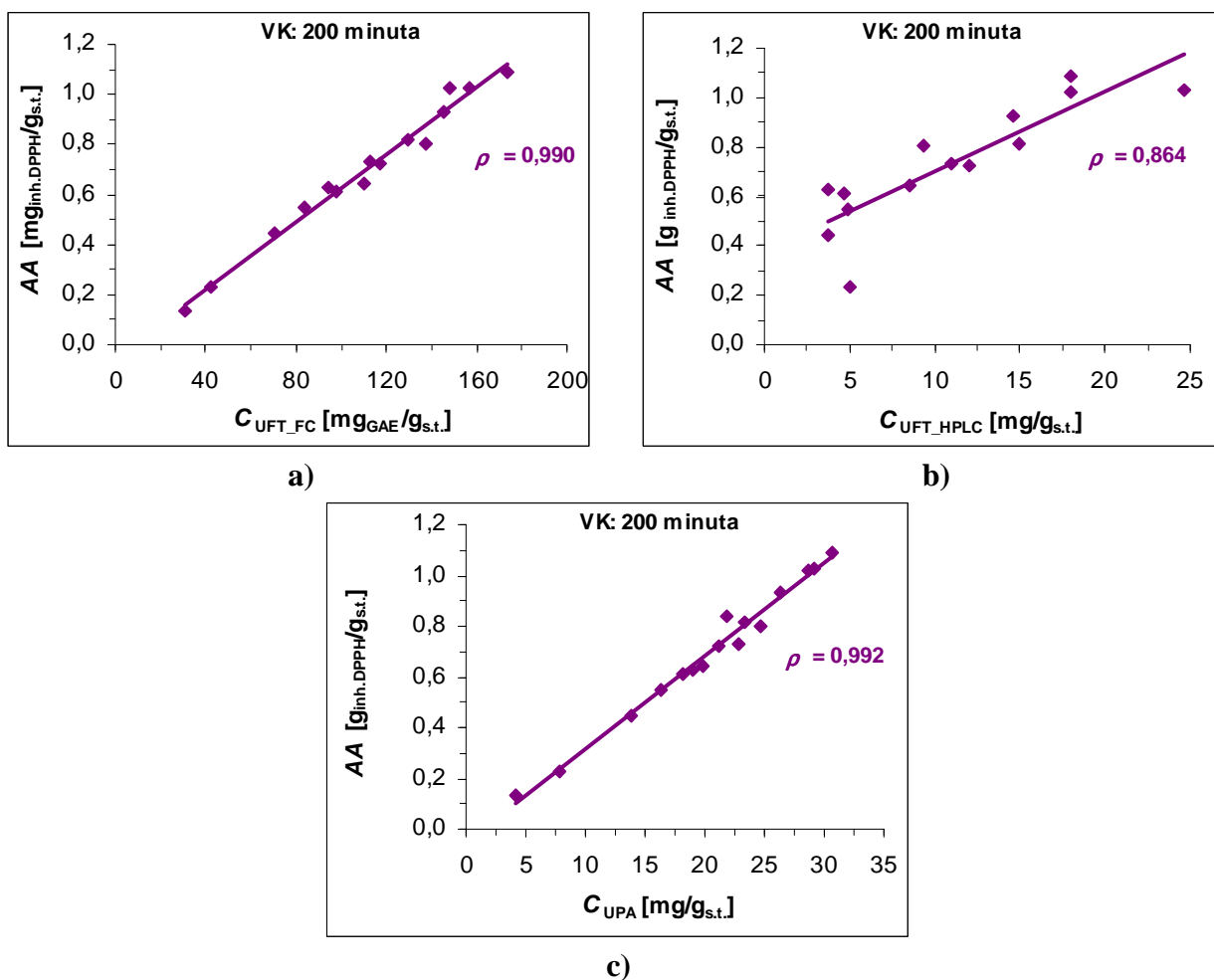
- a) FS_05 pri 80 °C za otapala: voda, 50%, 70%, 96% etanol,
 b) FS_05 pri temperaturama ekstrakcije: 25, 40, 50, 60, 70 i 80 °C pomoću 50%-tnog etanola te
 c) različitih uzoraka (GE_05, GS_05, ZE_05, FS_05, PK_04, FK_04, GS_04) sa 50%-tnim etanolom pri temperaturi ekstrakcije 80 °C

METODA KVANTIFIKACIJE	FENOLNI SPOJ	ρ (a)	ρ (b)	ρ (c)
UV/VIS ^a	UFT _{FC}	0,996	0,986	0,987
	UPA	0,996	0,994	0,997
HPLC	KT	0,999	0,935	0,851
	EKT	0,999	0,926	0,708
	B2	0,998	0,986	0,259
	GK	0,971	0,961	0,831
	GKT	0,529	0,110	0,039
	EKG	0,571	0,042	0,135
	UFT _{HPLC}	0,993	0,944	0,842

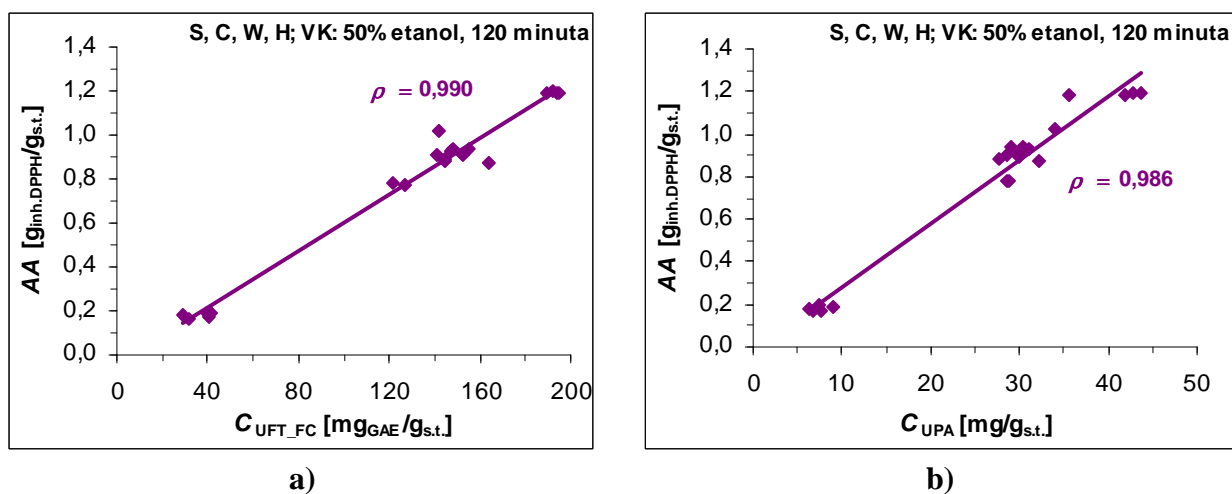
^a Spektrofotometrijska analiza;

UFT - ukupne fenolne tvari, UPA - ukupni ekstraktibilni proantocijanidini, KT-(+)-katehin,

EKT-(-)-epikatehin, B2 - procijanidin B₂, GK - galna kiselina, GKT - (-)-galokatehin, EKG - (-)-epikatehin galat



Slika 4.47. Korelacija između antioksidacijske aktivnosti (AA) ekstrakata sjemenki grožđa ekstrahiranih tijekom 200 minuta pomoću vodene kupelji (VK) i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenih prema Folin-Ciocalteuovoj metodi (C_{UFT_FC}) (a); i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari određenih HPLC metodom (C_{UFT_HPLC}) (b); i masenog udjela ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) (c) za sva ispitivana otapala, temperature i uzorke sjemenki grožđa



Slika 4.48. Korelacija između antioksidacijske aktivnosti (AA) ekstrakata sjemenki grožđa (GE_05, GS_05, ZE_05, FS_05) ekstrahiranih tijekom 120 minuta pomoću vodene kupelji (VK) te četiri metode univerzalnog sustava za ekstrakciju (S, C, W, H) i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT_FC}) (a); i masenog udjela ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) (b)

5. RASPRAVA

Kruto-tekuća ekstrakcija jedna je od najčešće korištenih metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala, međutim, zbog složenosti svakog ekstrakcijskog sustava još nije razvijena standardizirana metoda za ekstrakciju svih fenolnih tvari iz različitih materijala. Zbog toga se u literaturi mogu naći brojni ekstrakcijski uvjeti kojima je provedena ekstrakcija fenolnih tvari iz krutog materijala, gdje odabir otapala i temperatura predstavljaju glavne procesne parametre. Implementacija određenog ekstrakcijskog procesa u industrijsko mjerilo zahtijeva preliminarna laboratorijska istraživanja da bi se utvrdila izvedivost procesa. Takva istraživanja obuhvaćaju pronalaženje optimalnih uvjeta ekstrakcije radi postizanja maksimalne učinkovitosti uz prihvatljive investicijske i pogonske troškove. Iako su istraživanja na tom području u porastu, još uvijek nema sistematizacije u pristupu optimizaciji procesa.

Sjemenke grožđa odabrane su kao uzorak zato što se smatraju potencijalno dobrim i relativno jeftinim izvorom bioaktivnih fenolnih spojeva čijom bi se izolacijom (ekstrakcijom) dodatno valoriziralo grožđe kao početna sirovina za preradu.

S obzirom na navedeno, cilj je provedenih istraživanja u ovom radu bio:

- ☞ odabir otapala, omjera kruto-tekuće, veličine čestica i vremena ekstrakcije pri kojima je praćen utjecaj temperature na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa,
- ☞ praćenje utjecaja temperature na kinetiku ekstrakcije ukupnih i individualnih fenolnih tvari,
- ☞ ispitivanje primjenjivosti različitih eksponencijalnih matematičkih modela proizašlih iz drugog Fickova zakona difuzije (modificirani Fickov, modificirani Henderson-Pabisov i Pageov model) i neeksponencijalnog Pelegova modela za opisivanje procesa kruto-tekuće ekstrakcije te određivanje efektivnog koeficijenta difuzije fenolnih tvari,
- ☞ ispitivanje utjecaja načina ekstrakcije (u vodenoj kupelji, na univerzalnom sustavu za ekstrakciju i ekstrakcija superkritičnim fluidima) na ekstraktibilnost fenolnih tvari,
- ☞ utvrđivanje povezanosti (korelacije) između masenog udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta te masenog udjela fenolnih tvari i boje ekstrakta.

Maseni udio ekstrahiranih ukupnih fenolnih tvari u ovom radu, bez obzira na ispitivane procesne uvjete, način ekstrakcije i heterogenost uzoraka kretao se u rasponu od 18,29 do 94,30 mg_{GAE}/g_{s.t.}, odnosno od 1,83 do 19,43% izraženo na suhu tvar sjemenki. Isto tako, maseni udio ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina za sve ispitivane ekstrakte kretao se u rasponu od 4,21

do 43,77 mg/g_{s.t.}, odnosno od 0,42 do 4,38% izraženo na suhu tvar sjemenki grožđa. Slične podatke za udio ukupnih fenolnih tvari (**Tablica 5.1.**) i udio proantocijanidina (**Tablica 5.2.**) u ekstraktima sjemenki grožđa objavili su i drugi autori uz različite metodologije eksperimentalnog rada.

Tablica 5.1. Ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz sjemenki grožđa pri različitim uvjetima ekstrakcije prema literaturnim podacima

Uzorak	Uvjeti ekstrakcije	UFT	Literaturni izvor
Sjemenke bijelih i crnih sorti grožđa	<i>uredaj:</i> magnetska miješalica <i>otapalo:</i> metanol /aceton/voda <i>vrijeme:</i> 30 minuta <i>omjer kruto-tekuće:</i> 3,5 - 12,5 mL/g <i>temperatura:</i> sobna	10,33 - 11,11% _{s.t.} (GAE)	[4]
Sušene i oduljene sjemenke grožđa	<i>uredaj:</i> ekstrakcija po Soxhletu <i>otapalo:</i> aceton/voda/octena kiselina etil-acetat/metanol/voda <i>vrijeme:</i> 8 sati <i>omjer kruto-tekuće:</i> 20 mL/g <i>temperatura:</i> 60 °C	9,61 - 10,83% _{uz.} (GAE)	[76]
Osušene, usitnjene i oduljene sjemenke grožđa	<i>uredaj:</i> ekstrakcija po Soxhletu <i>otapalo:</i> aceton/voda/octena kiselina metanol/voda/octena kiselina <i>vrijeme:</i> 8 sati <i>omjer kruto-tekuće:</i> 1,5 mL/g <i>temperatura:</i> vrelište otapala	2,13 - 2,57% _{uz.} (CTE)	[74]
Osušene, usitnjene i oduljene sjemenke bijelog i crnog grožđa	<i>uredaj:</i> uzv sonda i tresilica <i>otapalo:</i> 95%-tni etanol, metanol, aceton te njihove mješavine s vodom <i>vrijeme:</i> 15 minuta UZV + 30 minuta tresilica <i>omjer kruto-tekuće:</i> 10 mL/g <i>temperatura:</i> sobna	0,23 - 5,27% _{s.t.} (GAE)	[78]
Smrznute sjemenke grožđa na -20 °C	<i>uredaj:</i> centrifuga <i>otapalo:</i> etil-acetat <i>vrijeme:</i> 10 - 20 minuta <i>omjer kruto-tekuće:</i> 4 mL/g <i>temperatura:</i> sobna	0,06 - 0,96% _{uz.} (GAE)	[127]
Pogača od sjemenki grožđa zaostala nakon odaljavanja sjemenki	<i>otapalo:</i> 50% vodena otopina etanola <i>vrijeme:</i> 1 - 2 sata <i>omjer kruto-tekuće:</i> 5 -10 mL/g <i>temperatura:</i> 25 – 70 °C	1,65 - 4,27% _{s.t.} (GAE)	[14]

GAE- ekvivalenti galne kiseline, CTE-ekvivalenti (+)- katehina

%_{s.t.} - udio fenolnih tvari izražen na suhu tvar uzorka; %_{uz.} - udio fenolnih tvari izražen na uzorak

Tablica 5.2. Ekstraktibilnost ukupnih proantocijanidina (UPA) iz sjemenki grožđa pri različitim uvjetima ekstrakcije prema literaturnim podacima

Uzorak	Uvjeti ekstrakcije	UPA	Literaturni izvor
Sjemenke bijelih sorti grožđa u različitim stadijima zrenja grožđa	<i>uredaj:</i> magnetska miješalica <i>otapalo:</i> etanol/voda/triklor metan <i>vrijeme:</i> 2 minute <i>omjer kruto-tekuće:</i> 40 mL/g	15,94 - 70,41% _{s.t.}	[71]
Sušene i usitnjene sjemenke grožđa	<i>uredaj:</i> - <i>otapalo:</i> 100% etanol <i>vrijeme:</i> 24 sata <i>omjer kruto-tekuće:</i> 10 mL/g <i>temperatura:</i> sobna	0,54% _{uz.} (tanini)	[128]
Neusitnjene sjemenke bijelog grožđa	<i>uredaj:</i> tresilica <i>otapalo:</i> etil-acetat/voda <i>vrijeme:</i> 8 sati <i>omjer kruto-tekuće:</i> 4 mL/g <i>temperatura:</i> sobna	0,17 - 8,02% _{s.t.}	[42]

%_{s.t.} - udio proantocijanidina izražen na suhu tvar uzorka; %_{uz.} - udio proantocijanidina izražen na uzorak

5.1. UTJECAJ OTAPALA, OMJERA KRUTO-TEKUĆE, VELIČINE ČESTICA I VREMENA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

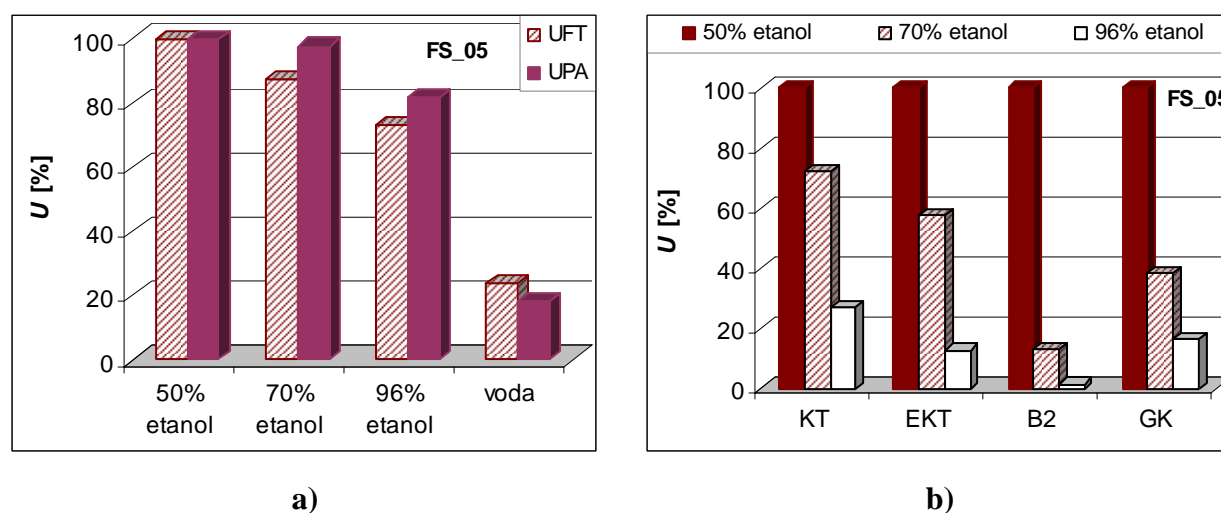
Učinkovitost ekstrakcije znatno ovisi o procesnim parametrima (svojstva materijala, otapalo, omjer kruto-tekuće, temperatura, veličina čestica) koji mogu djelovati nezavisno ili zavisno [25 , 32 , 88 , 120].

Pri određivanju najpovoljnijih procesnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih tvari, uvijek se mijenjao samo jedan parametar dok su ostali bili konstantni, a ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji.

Utjecaj otapala

Voda i etanol (50, 70 i 96%-tni) odabrani su kao otapala zbog njihove ekološke prihvatljivosti i netoksičnosti za ljude [1 , 8]. Osim toga, tijekom postupka vinifikacije, etanol je prirodno otapalo za ekstrakciju fenola iz sjemenki grožđa u vino [41]. Ispitivanjem njihove učinkovitosti

u ekstrakciji ukupnih fenolnih tvari pri temperaturi 80 °C na uzorcima mješavine sjemenki bijelog grožđa - MixBG_03 (*Slika 4.2.*) utvrđena je najveća učinkovitost 50%-tnog etanola ($U = 100\%$), a potom slijede 70%-tni etanol ($U = 86,15\%$), 96%-tni etanol ($U = 70,21\%$) te voda ($U = 20,04\%$). Isti redoslijed učinkovitosti dobiven je ispitivanjem učinkovitosti navedenih otapala na drugom uzorku sjemenki grožđa, FS_05 za ukupne fenolne tvari i ukupne proantocijanidine (*Slika 4.27.* i *5.1.a*) kao i za individualne fenolne tvari (KT – (+)-katehin, EKT – (-)-epikatehin, B2 - procijanidin B₂ i GK - galnu kiselinu) određene HPLC-om (*Slika 5.1.b*). Vodeni ekstrakti nisu analizirani HPLC-om zbog slabe učinkovitosti vode u ekstrakciji fenolnih tvari pri navedenim uvjetima.



Slika 5.1. Učinkovitost (U , %) različitih otapala u ekstrakciji (a) ukupnih fenolnih tvari (UFT) i ukupnih proantocijanidina (UPA) te (b) individualnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 pri temperaturi 80 °C i omjeru kruto tekuće 40 mL/g tijekom 200 minuta ekstrakcije

Bolju učinkovitost mješavine otapala alkohol/voda u odnosu na navedena monokomponentna otapala utvrdili su i drugi autori. Shi i sur. [14] dokazali su najveću ekstraktibilnost fenolnih tvari iz pogače sjemenki grožđa zaostale nakon oduljavanja pomoću 50%-tnog etanola, a Yilmaz i sur. [78] sa 47,5 - 66,5%-tnim etanolom iz sjemenki bijelog i crnog grožđa. Spigno i sur. [41] utvrdili da veći udio vode u mješavini etanol/voda (koncentracija etanola manja od 50%) smanjuje ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Pekić i sur. [42] tijekom ekstrakcije proantocijanidina iz sjemenki grožđa pomoću mješavine etil-acetat/voda dokazali su da se njihov prinos u ekstraktu povećavao do trenutka dok je etil-acetat, koji je nepolarno otapalo, bio potpuno zasićen vodom uzimajući u obzir i vlagu u samim sjemenkama. Daljnjim povećanjem udjela vode nije se povećavao prinos proantocijanidina. Naime, iako bi u prehrambene svrhe, sa stajališta netoksičnosti i dostupnosti otapala, voda predstavljala najbolji odabir otapala, ona kao

izrazito polarno otapalo (kakvi su i fenolni spojevi) ekstrahira i druge nepoželjne makromolekule (proteine, polisaharide, čestice koloida), čemu posebno pogoduju povišena temperatura i tlak. Pročišćavanje takvih ekstrakata može biti komplicirano zato što makromolekule (molarne mase veće od 1000 g/mol) izazivaju polarizaciju koncentracije i umanjuju učinkovitost procesa [9, 14]. Razlog manje koncentracije fenolnih tvari u vodenim ekstraktima može biti i veća aktivnost enzima polifenol oksidaze koja razgrađuje fenolne tvari za razliku od alkoholnog medija u kojem je neaktivna [92]. Isto tako, čisti etanol može dati manji prinos fenolnih tvari zato što je lako hlapljiv pri višim temperaturama, pri čemu se mijenjaju uvjeti ekstrakcije, tj. omjer kruto-tekuće [14].

Omjer kruto-tekuće (sjemenke grožđa-otapalo)

Ispitana je učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari (UFT) iz neklasiranih sjemenki grožđa MixBG_03 tvari pri četiri različita omjera kruto-tekuće, K/T (10, 20, 30 i 40 mL/g) na šest različitih temperatura ekstrakcije (25, 40, 50, 60, 70, 80 °C) (**Slika 4.3.**). Pri navedenim uvjetima ekstrahirano je od 18,09 mg_{GAE}/g_{s.t.} do 30,24 mg_{GAE}/g_{s.t.}. Rezultati pokazuju da je pri omjeru K/T = 40 mL/g na svim ispitivanim temperaturama zabilježena najbolja ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, uz najveći prinos fenolnih tvari pri 80 °C. Statističkom analizom (**Tablica 4.3.**) utvrđen je značajan utjecaj temperature ekstrakcije i omjera kruto-tekuće kao zasebnih procesnih parametara, ali i njihovo zavisno djelovanje. To znači da svaka temperatura pri svakom omjeru K/T ima drugačiji utjecaj na ekstraktibilnost UFT, iako se generalno može utvrditi uglavnom pozitivan trend koncentracije UFT s temperaturom za ispitivane omjere K/T. Takvi rezultati su u skladu s osnovnim principom prijenosa mase gdje je glavni pokretač prijenosa tvari koncentracijski gradijent između topljive tvari i glavne mase otapala, a veći je što je veći omjer kruto-tekuće. Cacace i Mazza [7] dobili su slične rezultate pri praćenju utjecaja temperature i omjera K/T na ekstrakciju polifenola iz crnog ribizla kao i Stangler Herodež i sur.[27] pri ekstrakciji fenolnih tvari iz melise. Naczk i Shahidi [2] su dokazali da se povećanjem omjera K/T od 1:5 (w/v) na 1:10 (w/v) povećala ekstrakcija kondenziranih tanina i ukupnih fenola iz kanole dok su Pinelo i sur. [88] utvrdili da smanjenje omjera kruto-tekuće (manja količina otapala) uz dulje vrijeme ekstrakcije i povećanje temperature pogoduje ekstrakciji fenolnih tvari iz komine grožđa. Shi i sur. [14] navode da veći omjer kruto-tekuće može smanjiti prinos fenola jer veća količina otapala ima i više inkorporiranog kisika, što brže dovodi do oksidacije te da je optimalni omjer za ekstrakciju fenola iz pogače sjemenki grožđa 1:7,5 (w/v).

Veličina čestica

Utjecaj veličine čestica na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa MixBG_03 ispitan je na četiri klase čestica: ($> 0,63$) mm, (0,63 - 0,4) mm, (0,4 - 0,16) mm i ($< 0,16$) mm (*Slika 4.4.*). Ekstrakcija je provedena pomoću 50%-tnog etanola i omjera kruto-tekuće 40 mL/g budući da su se pokazali najučinkovitijima pri ispitivanjima na neklasiranim sjemenkama. Vidljivo je da je najveća količina ukupnih fenolnih tvari (61,99 mg_{GAE} /g_{s.t.}) ekstrahirana iz najmanje klase čestica ($< 0,16$ mm), a najmanja (21,78 mg_{GAE} /g_{s.t.}) iz najveće klase čestica ($> 0,63$ mm), iako su klase čestica ($> 0,63$) mm i (0,63 - 0,4) mm iste statističke značajnosti (uspoređeni podaci nakon 120 minuta ekstrakcije) (*Tablica 4.4.*). Ukupna količina ukupnih fenolnih tvari ekstrahiranih iz usitnjenih, neklasiranih čestica sjemenki približno je odgovarala ukupnoj srednjoj vrijednosti količine ukupnih fenolnih tvari ekstrahiranih iz pojedinih frakcija. Usitnjavanjem materijala povećava se površina kontakta kruta tvar-otapalo što pogoduje prijenosu tvari, a klasiranjem se postiže veća homogenost ispitivanog uzorka, a time i bolja ponovljivost rezultata. Međutim, iako je ekstraktibilnost fenolnih tvari bila veća kod manjih klasa čestica, koeficijent varijacije ponavljanja eksperimenta rastao je od većih prema manjim frakcijama (1,92%; 3,32%; 6,24%; 12,64%). Vrlo sitne čestice mogu imati sklonost aglomeraciji, što može rezultirati pogrešnom interpretacijom rezultata [10]. Osim toga, neka istraživanja [42] pokazuju da se usitnjavanjem skraćuje vrijeme ekstrakcije, ali se ne povećava prinos fenolnih tvari (proantocijanidina), nego se u tome slučaju uz fenolne tvari bolje ekstrahiraju i druge neželjene komponente. Zbog toga su ostali uzorci koji su korišteni u ovom radu pripremljeni na način da su usitnjeni, provedena je granulometrijska analiza (*Tablica 4.1.*), odbačena je klasa čestica ($> 0,63$) mm, te su ispitivanja provedena na svima česticama ($< 0,63$) mm kojima je određena prosječna veličina čestica (*Tablica 4.2., Slika 4.1.*).

Vrijeme ekstrakcije

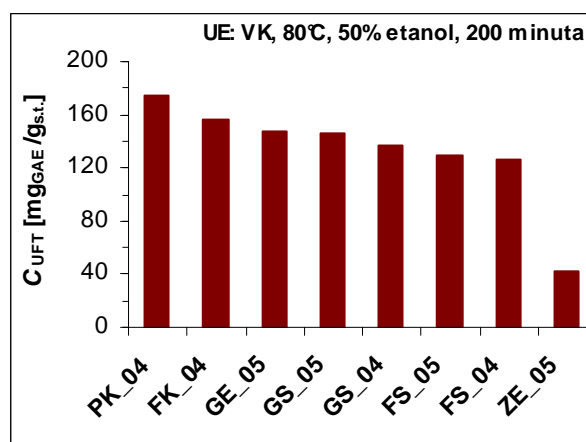
Prema literaturnim podacima, vrijeme potrebno za ekstrakciju fenolnih tvari varira od 1 minute do nekoliko sati [2, 43, 50], a ovisi o svim prethodno spomenutim faktorima o kojima ovisi i učinkovitost ekstrakcije. Tako se npr. povećanjem temperature povećava brzina ekstrakcije, a time se smanjuje potrebno vrijeme ekstrakcije [7]. *Slika 4.4.* prikazuje kinetiku ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa MixBG_03 praćenu tijekom 200 minuta. Bez obzira na veličinu čestica količina ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima u početku ekstrakcije se brže povećavala, a potom sporije, odnosno u 40 - 60 minuta ekstrakcije ekstrahirano je 80 - 90% fenolnih tvari od ukupno ekstrahiranih tijekom 200 minuta. S obzirom na to, te da se u literaturi

za ekstrakciju fenolnih tvari iz nusprodukata grožđa spominje optimalno vrijeme od 30 - 90 minuta [46], može se smatrati da je vrijeme ekstrakcije od 200 minuta za eksperimentalne uvjete ovog rada dovoljno za praćenje utjecaja temperature i načina ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari.

5.2. UTJECAJ TEMPERATURE NA KRUTO-TEKUĆU EKSTRAKCIJU FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

Utjecaj temperature na ekstrakciju fenolnih tvari ispitan je za temperaturni interval 25-80 °C. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji u eksperimentalnim uvjetima koji su odabrani na osnovi najvećeg prinosa ukupnih fenolnih tvari (*poglavlje 5.1.*): 50% etanol, omjer kruto-tekuće 40 mL/g, čestice sjemenki manje od 0,63 mm, ekstrakcija u trajanju 200 minuta.

U ispitivanom temperaturnom intervalu utvrđeno je da se ekstraktibilnost fenolnih tvari povećavala s porastom temperature od 25 °C do 80 °C. Tako su se maseni udjeli ukupnih fenolnih tvari sjemenki grožđa FS_05 nakon ekstrakcije 200 minuta, od nižih prema višim temperaturama, kretali u rasponu od 70,77 do 129,59 mg_{GAE}/g_{s.t.} (*Slika 4.5.*), a ukupnih proantocijanidina u rasponu od 13,79 do 23,33 mg/g_{s.t.} (*Slika 4.28.*). Ispitivanjem ekstraktibilnosti navedenih spojeva iz drugih uzoraka sjemenki grožđa pri temperaturi ekstrakcije 80 °C utvrđeni su maseni udjeli za ukupne fenolne tvari u rasponu od 41,92 do 173,92 mg_{GAE}/g_{s.t.} (*Slika 5.2.*) te za ukupne proantocijanidine u rasponu od 7,82 do 30,71 mg/g_{s.t.} (*Slika 4.29.*), iz čega je vidljivo da osim procesnih parametara, uzorak (sorta, agrotehnoški uvjeti uzgoja grožđa) ima znatan utjecaj na maseni udio ekstrahiranih fenolnih tvari.



Slika 5.2. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) ekstrakata različitih uzoraka (sorti) sjemenki grožđa dobivenih pomoću 50%-tnog etanola pri temperaturi ekstrakcije 80 °C tijekom 200 minuta

Povećanje temperature poboljšava ekstrakciju dvojako, povećanjem topljivosti krute tvari i povećanjem difuzijskog koeficijenta [7, 88]. S obzirom na to, utjecaj temperature detaljnije je objašnjen na osnovi praćenja kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih i individualnih fenolnih tvari te određivanjem njihovih efektivnih koeficijenta difuzije.

5.2.1. Modeliranje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Modeliranje kinetike određenog procesa ima važnu ulogu u dizajniranju procesa budući da daje nužne informacije o brzini prijenosa tvari, brzini reakcije ili nastajanju određenih promjena kao funkcije eksperimentalnih varijabli [115].

Kinetika kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa FS_05 praćena je pri šest različitih temperatura (25, 40, 50, 60, 70 i 80 °C) na način da su njihove koncentracije određivane u ekstraktima dobivenim nakon različitog vremena ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 i 200 minuta). Pri svim ispitanim temperaturama uočeno je eksponencijalno povećanje koncentracija fenolnih tvari u ekstraktima s vremenom te asimptotsko približavanje ravnotežnoj koncentraciji (*Slika 4.5.*). Navedeni tijek ekstrakcije sličan je tijekom rehidratacije odnosno njoj obrnutog procesa, sušenja, koji uključuju fenomene prijenosa topline i tvari, a za čije se matematičko modeliranje uspješno koriste različiti eksponencijalni i neeksponencijalni modeli. Stoga su za opisivanje kinetike u ovom radu ispitana tri eksponencijalna modela (modificirani Fick II, modificirani Henderson-Pabisov i Pageov model) prema izrazima (3.10 - 12) koji u takvom obliku prema literaturnim podacima nisu korišteni za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije, te Pelegov neeksponencijalni model (3.13) [122, 123]. Primijenjeni modeli su jednočlani dvoparametarski osim modificiranog Henderson-Pabisova modela koji je troparametarski model. Na osnovi parametara modela može se procijeniti ukupni prijenos tvari u ispitivanom procesu. Parametri modela određeni su nelinearnom regresijom eksperimentalnih podataka (*Tablica 4.5.*) te su na osnovi njih konstruirane krivulje ekstrakcije koje su uspoređene s eksperimentalnim podacima (*Slika 4.6.*). Iako se iz grafičkog prikaza može uočiti da svi primijenjeni modeli dobro aproksimiraju eksperimentalne podatke, uspješnost aproksimacije primijenjenih matematičkih modela dodatno je analizirana na osnovi više statističkih kriterija uz uobičajeni koeficijent korelacije (ρ) koji sam nije dovoljan za vrednovanje primjenjivosti nelinearnih modela [34]. Određeni su efikasnost modela (EF), koja bi kao i koeficijent korelacije u idealnom slučaju imala vrijednost 1, ukupno kvadratno

odstupanje (FL), srednje kvadratno odstupanje (RMSE) i reducirani *chi*-kvadrat (χ^2) koji bi u idealnom slučaju imali vrijednost 0 [24], kao i srednja relativna pogreška (P, %) za koju se smatra da je prihvatljiva do 5%, dok iznad 10% označava loše slaganje eksperimentalno određenih i modelom predviđenih vrijednosti podataka [22].

Za sve matematičke modele srednja relativna pogreška (**Slika 4.7.**) bila je manja od 4%, što potvrđuje njihovu prikladnost za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenola pri eksperimentalnim uvjetima. Međutim, na osnovi drugih određenih statističkih kriterija uočene su određene razlike između modela. Tako je Pelegov model imao najniže vrijednosti koeficijenata korelacije (0,9899 - 0,9932) i efikasnosti modela (0,9799 - 0,9864) te najveće vrijednosti RMSE (2,1600 - 4,6667), P (2,9187 - 3,7832%) i χ^2 (5,7025 - 26,6180) i po tome se znatno razlikovao od ostala tri eksponencijalna modela koji su pokazali bolje slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka, a čiji su svi statistički kriteriji aproksimacije imali jednaku statističku značajnost (prema Duncanovu *post-hoc* testu, $p < 0,05$) (**Tablica 4.6.**).

Budući da je temperatura jedan od glavnih procesnih parametara koja znatno utječe na prijenos tvari, a matematičko modeliranje dobra podloga za simuliranje i dizajniranje određenog procesa, provedene su analize ovisnosti procijenjenih parametara modela (grupirani su prema sličnosti bez obzira na primijenjeni model) o temperaturi ekstrakcije. Konstante eksponencijalnih modela koje u sebi sadrže dimenziju vremena prikazane su na **Slici 4.8.**, gdje je vidljiva eksponencijalna ovisnost konstante modificiranog Henderson-Pabisova modela (k_{HP}) te linearna ovisnost konstanti Fickova (k_F) i Pageova (k_P) modela o temperaturi ekstrakcije.

Na **Slici 4.9.** prikazane su ovisnosti recipročnih vrijednosti konstanti Pelegova modela ($1/k_1$ i $1/k_2$) o temperaturi. Konstanta $1/k_1$ predstavlja inicijalnu brzinu ekstrakcije, a njezina jasna funkcionalna ovisnost o temperaturi nije utvrđena. Može se pretpostaviti da je razlog tome velika brzina ekstrakcije u prvih nekoliko minuta bez obzira na temperaturu ekstrakcije što je vidljivo i iz eksperimentalnih i modelima predviđenih podataka za kinetiku ekstrakcije (**Slike 4.5., 4.6.**). Za razliku od konstante $1/k_1$, recipročna vrijednost druge Pelegove konstanta ($1/k_2$) koja predstavlja doseg ekstrakcije u nekom konačnom vremenu ekstrakcije, pokazala je pozitivnu linearnu ovisnost o temperaturi ekstrakcije, što je u skladu s rezultatima drugih istraživača na području ispitivanja sorpcijskih procesa [129, 130]. **Slika 4.10.** prikazuje ovisnost bezdimenzionalnih parametara modificiranog Fickova (n), modificiranog Henderson-Pabisova (n'), i Pageova modela (n'') o temperaturi. Vidljivo je da vrijednosti navedenih konstanti rastu s porastom temperature (do 60 °C), a potom lagano padaju. Najbolju aproksimaciju takve ovisnosti dala je potencijalna funkcija. Sličan slučaj je i s konstantom (a) modificiranog Henderson-Pabisova

modela, čija je vrijednost rasla do 40 °C, a potom opadala te je aproksimirana s eksponencijalnom funkcijom (*Slika 4.11.*).

S obzirom na to da nije utvrđena jasna ovisnost Pelegove konstante ($1/k_1$) o temperaturi ekstrakcije, te da je taj model pokazao najlošija slaganja s eksperimentalnim podacima ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari, dalje su određene samo funkcionalne ovisnosti parametara eksponencijalnih modela o temperaturi (*Tablica 4.7.*). Uvrštavanjem dobivenih funkcionalnih ovisnosti u matematičke modele (3.10-12) dobivene su složenije jednadžbe (*Tablica 4.8.*) čijim je rješavanjem moguće simulirati kinetiku, odnosno brzinu kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari za određeno šire područje temperatura i vremena ekstrakcije od eksperimentalno ispitanih. Primjeri simulacije kinetike kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari na četiri proizvoljno odabrane temperature (19, 35, 65 i 83 °C) te dvije eksperimentalno ispitane temperature (50 °C i 70 °C) prikazani su na *Slici 4.12.* Uspješnost simulacije kinetike kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari određena je također na osnovi istih statističkih kriterija (*Slika 4.13.*) korištenih za procjenu prikladnosti modela za aproksimaciju eksperimentalnih podataka. Srednja relativna pogreška svih ispitivanih modela za simulaciju bila je manja od 4%, što potvrđuje prikladnost danih numeričkih modela za aproksimaciju eksperimentalnih podataka i daje mogućnost simulacije procesa kruto-tekuće ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. Međutim, ostali izračunani statistički pokazatelji pokazali su da je Pageov model najprikladniji model za simulaciju procesa kruto-tekuće ekstrakcije provedene u eksperimentalnim uvjetima ovog rada. Stoga su prema navedenom modelu također prikazane krivulje simulacije brzine kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari za proizvoljno odabrane i ispitane temperature ekstrakcije u ovisnosti o masenom udjelu ekstrahiranih fenolnih tvari (*Slika 4.14.*). Iz krivulja simulacije vidljivo je da u ispitivanom procesu nema konstantnog perioda brzine ekstrakcije, nego da se prijenos tvari odvija u padajućem periodu brzine ekstrakcije gdje difuzija fenolnih tvari kontrolira proces ekstrakcije [10].

5.2.2. Efektivni koeficijent difuzije ukupnih fenolnih tvari iz sjemenki grožđa

Najčešći pristup u određivanju efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) tijekom kruto-tekuće ekstrakcije temelji se na praćenju kinetike [25]. Efektivni koeficijent difuzije kao mjerilo prijenosa fenolnih tvari difuzijom u procesu krute-tekuće ekstrakcije određen je iz nagiba pravca $\ln Y$ (bezdimenzionalne koncentracije fenolnih tvari) vs. vrijeme ekstrakcije pri različitim temperaturama (*Slika 4.15.*). Iz slike je vidljivo da se prijenos fenolnih tvari difuzijom odvijao u

dva perioda (brži i sporiji period) kojima prethodi inicijalni period ekstrakcije. Slična opažanja zabilježili su i drugi autori tijekom ekstrakcije komponenti iz biljnog materijala [27, 53] te procesa rehidratacije [131]. Inicijalna ekstrakcija tvari odvija se trenutno pri kontaktu otapala i materijala, pri čemu se otapaju tvari na samoj površini materijala (period "ispiranja") velikom brzinom i zbog toga je teško mjerljiva te nije utvrđena njezina ovisnost o temperaturi. Inicijalna ekstrakcija praćena je brzim periodom difuzije (strmiji pravac) (između 5 i 30-40 minuta ekstrakcije), pri čemu se ekstrahiraju fenolne tvari iz površinskih pukotina (pora) sjemenki, a potom brzina ekstrakcije postepeno opada (pravac s manjim nagibom) i ovisi o molekularnoj difuziji otopljenih tvari kroz pore materijala te o vremenu ekstrakcije. Određeni efektivni koeficijenti difuzije za oba perioda ekstrakcije prikazani su u **Tablici 4.9.**, iz čijih vrijednosti se može uočiti da su se isti povećavali s temperaturom, što je u skladu s rezultatima drugih autora [7, 25]. Veća difuzija fenolnih tvari iz sjemenki grožđa na površinu s porastom temperature ekstrakcije može se objasniti većom unutrašnjom energijom molekula, a time njihovom većom pokretljivošću kao i smanjenjem dinamičkog viskoziteta otapala. Tako se koeficijent difuzije za brzi period ekstrakcije kretao u rasponu $(0,34-2,58) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$, a za spori period u rasponu $(0,06-1,33) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$, što je u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora provedenih na biljnim materijalima (**Tablica 5.3.**).

Numerička vrijednost energije aktivacije koja pokazuje ovisnost efektivnog koeficijenta difuzije o temperaturi ekstrakcije određena je iz lineariziranog oblika Arrheniusove jednadžbe (2.19) (**Slika 4.16.**). Literaturni podaci o objašnjenju energije aktivacije u slučaju ekstrakcije tvari iz biljnog materijala vrlo su oskudni (zbog složenosti i nedovoljne razjašnjenosti ekstrakcijskih sustava), za razliku od brojnih teorija o njezinom značenju u sorpcijskim procesima za različite biljne materijale [132, 133]. Niža vrijednost energije aktivacije izračunana je za brzi period ekstrakcije (31,63 kJ/mol) u odnosu na spori period ekstrakcije (43,46 kJ/mol), što upućuje na veći utjecaj temperature na brzinu ekstrakcije, odnosno na D_{ef} u sporijem periodu nego u bržem periodu ekstrakcije, gdje je brzina difuzije veća od 1,9 - 5,5 puta u odnosu na sporiji period. Prema literaturnim podacima, energija aktivacije prijenosa tvari kroz različite krute biološke materijale kreće se od 9,46 do 50,1 kJ/mol [11]. Budući da su konstante primijenjenih eksponencijalnih modela procijenjene na osnovi svih podataka za kinetiku ekstrakcije, njihove vrijednosti su uspoređene s srednjim vrijednostima efektivnog koeficijenta difuzije na svim temperaturama (**Slika 4.17.**). Sve konstante ispitanih eksponencijalnih modela (modificirani Fick II, modificirani Henderson-Pabis, Page) pokazale su pozitivnu linearnu ($\rho > 0,908$) ovisnost o efektivnom difuzijskom koeficijentu određenom prema izrazima (3.21, 3.22). Navedena linearna ovisnost upućuje na činjenicu da konstante primijenjenih modela (k_F , k_P , k_H) u sebi sadrže

koeficijent efektivne difuzije te da su primijenjeni eksponencijalni modeli prikladni za opisivanje procesa difuzije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa.

Tablica 5.3. Vrijednosti efektivnog koeficijenta difuzije (D_{ef}) tvari iz različitog biljnog materijala pri različitim uvjetima ekstrakcije prema literaturnim podacima

Uzorak	Uvjeti ekstrakcije	D_{ef} [m^2/min]	Literaturni izvor
Komina grožđa (sjemenke, kožica, peteljke) osušena na zraku i usitnjena	<i>uređaj</i> : imerzijski ekstraktor <i>otapalo</i> : etanol <i>vrijeme</i> : 6 sati <i>omjer kruto-tekuće</i> : - <i>temperatura</i> : 50 °C <i>cilj</i> : ekstrakcija ukupnih polifenola	$(0,079 - 0,63) \cdot 10^{-10}$	[10]
Komina grožđa zaostala nakon destilacije alkohola, osušena na zraku i usitnjena	<i>uređaj</i> : imerzijski ekstraktor <i>otapalo</i> : etanol, voda <i>vrijeme</i> : 100 minuta <i>omjer kruto-tekuće</i> : - <i>temperatura</i> : 40 – 50 °C <i>cilj</i> : ekstrakcija ukupnih polifenola	$(0,01 - 0,2) \cdot 10^{-10}$	[25]
Melisa	<i>uređaj</i> : miješalica s grijanjem <i>otapalo</i> : etanol <i>vrijeme</i> : 5 sati <i>omjer kruto-tekuće</i> : 4 - 10 mL/g <i>temperatura</i> : ~79 °C <i>cilj</i> : ekstrakcija individualnih antioksidanasa	Brzi period: $(2,52 - 18,42) \cdot 10^{-10}$ Spori period: $(0,19 - 0,64) \cdot 10^{-10}$	[27]
Crni ribizl	<i>uređaj</i> : miješalica s grijanjem <i>otapalo</i> : etanol, zakiseljena voda <i>vrijeme</i> : 5 sati <i>omjer kruto-tekuće</i> : 6 - 74 mL/g <i>temperatura</i> : 6 -74 °C <i>cilj</i> : ekstrakcija antocijana /ukupnih fenolnih tvari	$(6,00 - 1560,00) \cdot 10^{-10}$	[7]
Zrno kave	<i>uređaj</i> : vodena kupelj <i>otapalo</i> : voda <i>vrijeme</i> : 5 sati <i>omjer kruto-tekuće</i> : 2 - 8 mL/g <i>temperatura</i> : 90 °C <i>cilj</i> : dekofeinizacija kave	$3,21 \cdot 10^{-10}$	[29]

5.2.3. Kinetika i efektivni koeficijent difuzije individualnih fenolnih tvari u procesu kruto-tekuće ekstrakcije iz sjemenki grožđa

Kinetika individualnih fenolnih spojeva ((+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B₂ i galne kiseline) praćena je na istom uzorku (FS_05) kao i kinetika ukupnih fenolnih spojeva zbog utvrđivanja njihove ekstraktibilnosti pri različitim temperaturama. Analizirani su ekstrakti dobiveni nakon 10, 30, 60, 120 i 200 minuta ekstrakcije pri šest različitih temperatura ekstrakcije (25-80 °C). S obzirom na to da su (-)-epikatehin galat i (-)-galokatehin kvantificirani u malim količinama (*Tablica 4.10*) te da nije uočena jasna ovisnost njihove koncentracije u ekstraktima o vremenu i temperaturi ekstrakcije, oni dalje nisu razmatrani.

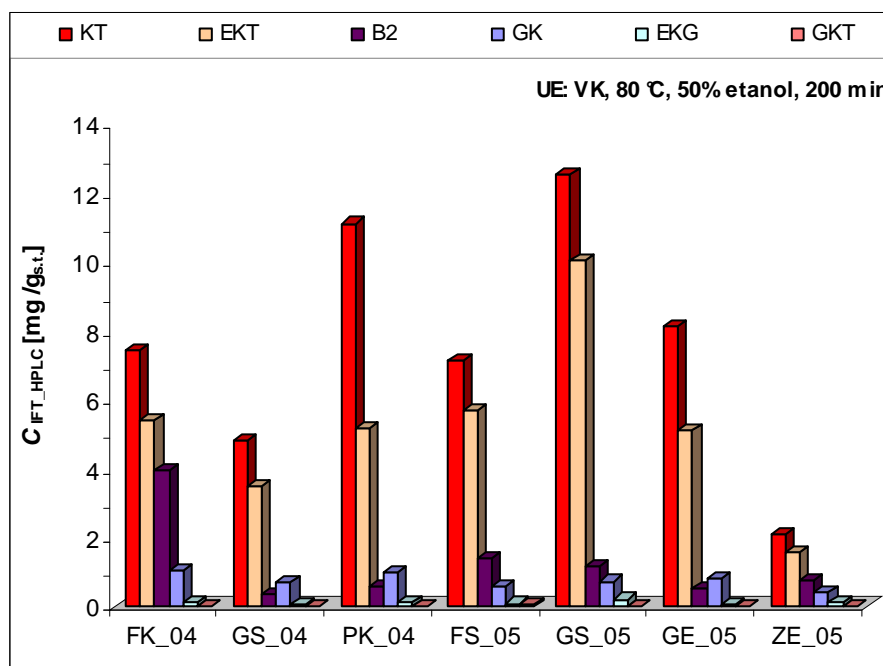
U svim ispitivanim ekstraktima sjemenki FS_05 najzastupljeniji je bio (+)-katehin (*Slika 4.18.*) čiji se maseni udio kretao u rasponu od 1,52 do 7,15 mg/g_{s.t.} od nižih prema višim temperaturama i s porastom vremena ekstrakcije, a potom slijede (-)-epikatehin (*Slika 4.20.*) s rasponom masenih udjela od 0,71 do 5,69 mg/g_{s.t.}, procijanidin B₂ (*Slika 4.22.*) od 0,53 do 1,41 mg/g_{s.t.} i galna kiselina (*Slika 4.24.*) od 0,31 do 0,57 mg/g_{s.t.}

Statističkom obradom podataka potvrđeno je da temperatura i vrijeme, kao i njihova interakcija imaju značajan utjecaj na ekstrakciju (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B₂ i galne kiseline iz sjemenki grožđa pri ispitivanim eksperimentalnim uvjetima (*Tablica 4.11.*). Uspoređivanjem masenog udjela ukupnih fenolnih tvari, određenih spektrofotometrijski u ekstraktima sjemenki grožđa dobivenim u različitom vremenu ekstrakcije i pri različitim temperaturama, s individualnim fenolnim tvarima utvrđena je eksponencijalna ovisnost s masenim udjelom (+)-katehina ($\rho = 0,966$) (*Slika 4.19.*) i (-)-epikatehina ($\rho = 0,977$) (*Slika 4.21.*) te linearna ovisnost s masenim udjelom procijanidina B₂ ($\rho = 0,878$) (*Slika 4.23.*) i galne kiseline ($\rho = 0,822$) (*Slika 4.25.*). Eksponencijalna ovisnost s masenim udjelom (+)-katehina i (-)-epikatehina upućuje na znatno povećanje udjela tih flavan-3-ola u ukupnim fenolnim tvarima s porastom temperature, a time i na njihovu veću ekstraktibilnost pri višim temperaturama. Shi i sur. [14] dokazali su da se sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina povećavao u ekstraktima dobivenim pri temperaturama većim od 50 °C (ispitivano područje temperatura ekstrakcije do 70 °C). Linearna ovisnost s masenim udjelom procijanidina B₂ i galne kiseline upućuje također na pozitivan utjecaj temperature na njihovu ekstraktibilnost, međutim, njihov udio u ukupnim fenolnim tvarima se proporcionalno povećavao s porastom temperature.

Efektivni koeficijent difuzije određen je na isti način kao i za ukupne fenolne tvari. Pri tome je za koeficijent difuzije (+)-katehina i (-)-epikatehina uočen brzi i spori period ekstrakcije, dok se za galnu kiselinu i procijanidin B₂ ekstrakcija odvijala u jednom periodu, što je u skladu s

literaturnim podacima [25]. Izračunane vrijednosti efektivnog koeficijenta difuzije (+)-katehina kretale su se u rasponu $(0,03 - 0,67) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$ od nižih prema višim temperaturama, (-)-epikatehina $(0,04 - 0,69) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$, procijanidina B₂ $(0,06 - 1,10) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$ te galne kiseline $(0,02 - 0,24) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$, a iz njihove ovisnosti o temperaturi izračunana je i energija aktivacije (**Tablica 4.12.**) za svaki individualni fenoli spoj. Tako se prema vrijednostima energije aktivacije može uočiti da je ekstrakcija galne kiseline najmanje ovisna o temperaturi, jer ima najnižu energiju aktivacije (41,29 kJ/mol), potom slijedi procijanidin B₂ (44,13 kJ/mol) što objašnjava i njihovu linearnu ovisnost o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima. Vrijednosti energije aktivacije (+)-katehina (48,79 kJ/mol) i (-)-epikatehina (44,98 kJ/mol) su nešto više u odnosu na prethodne dvije što upućuje na njihovu veću temperaturnu ovisnost, a što je u skladu s njihovom eksponencijalnom ovisnosti o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima.

Ispitivanjem ekstraktibilnosti individualnih fenolnih tvari iz ostalih uzoraka sjemenki grožđa (**Slika 5.3.**) utvrđeno je da su svi uzorci - iako se maseni udio fenolnih tvari u ekstraktima razlikovao ovisno o uzorku što je posljedica sortnih karakteristika, različitog vremena uzorkovanja s različitih lokacija, godina berbe itd. [6, 68] - imali najveći sadržaj (+)-katehina čiji se maseni udio kretao u rasponu od 2,11 do 12,55 mg/g_{s.t.}, a potom ga je slijedo (-)-epikatehin (1,59-10,03 mg/g_{s.t.}), dok se zastupljenost procijanidina B₂ (0,33-3,97 mg/g_{s.t.}) i galne kiseline (0,41-1,06 mg/g_{s.t.}) mijenjala ovisno o uzorku.



Slika 5.3. Maseni udio individualnih fenolnih tvari (C_{IFT_HPLC}) u ekstraktima različitih uzorka sjemenki grožđa dobivenih ekstrakcijom u vodenoj kupelji pomoću 50%-tnog etanola, tijekom 200 minuta pri temperaturi 80 °C

Također je i za ove uzorke utvrđena jaka korelacija fenolnih tvari određenih HPLC-om i ukupnih fenolnih tvari određenih spektrofotometrijski ($\rho = 0,749$). Katehin i epikatehin su dominantni flavan-3-oli u sjemenkama grožđa i prema istraživanjima drugih autora [46], međutim, njihove vrijednosti te vrijednosti ostalih spojeva u odnosu na vrijednosti prikazane u ovom radu su niže (**Tablica 5.4**). Može se pretpostaviti da razlika postoji zbog različitog načina i uvjeta ekstrakcije uzoraka te načina prikazivanja podataka.

Preračunavanjem tih podataka na suhu tvar (koja nije u radovima uvijek naznačena) sjemenki grožđa dobile bi se vjerojatno veće vrijednosti u odnosu na rezultate izražene na masu sjemenki ili masu grožđa iz kojeg su izdvojene.

Tablica 5.4. Vrijednosti sadržaja individualnih fenolnih spojeva u sjemenkama grožđa pri različitim uvjetima ekstrakcije prema literaturnim podacima

Uzorak	Uvjeti ekstrakcije	Fenolni spoj	Literaturni izvor
Liofilizirane sjemenke bijelog i crnog grožđa	<i>uredaj:</i> centrifuga <i>otapalo:</i> metanol /voda/mravlja kis <i>vrijeme:</i> 10 minuta <i>omjer kruto-tekuće:</i> 50 mL/g	KT: (0,08-0,39) mg/g _{gr} EKT: (0,06-0,31) mg/g _{gr} B2: (0,02-0,04) mg/g _{gr} EKG: (0,01-0,07) mg/g _{gr}	[75]
Osušene i oduljene sjemenke u prahu	<i>uredaj:</i> uzv sonda i tresilica <i>otapalo:</i> 70% metanol/voda <i>vrijeme:</i> 15 minuta UZV + 30 min tresilica <i>omjer kruto-tekuće:</i> 10 mL/g	GK: (0,10-0,99) mg/g _{s.t.} KT: (0,12-3,58) mg/g _{s.t.} EKT: (0,96-4,21) mg/g _{s.t.}	[68]
Sjemenke osušene na zraku	<i>uredaj:</i> ekstrakcija u atmosferi CO ₂ <i>otapalo:</i> višestupanjska ekstrakcija: 80% metanol, 50% metanol, 75% aceton <i>vrijeme:</i> 16 sati <i>omjer kruto-tekuće:</i> 4,2 mL/g	KT: (0,21-2,44) mg/g _{gr} EKT: (0,23-2,84) mg/g _{gr} B2: (0,09-1,06) mg/g _{gr} EKG: (0,01-0,07) mg/g _{gr}	[77]
Sjemenke bijelih sorti grožđa u različitim stadijima zrenja grožđa	<i>uredaj:</i> - <i>otapalo:</i> etanol/voda/triklor metan <i>vrijeme:</i> 2 minute <i>omjer kruto-tekuće:</i> 40 mL/g	KT: (15,9-703,2) mg/g _{s.t.} EKT: (2,7-218,3) mg/g _{s.t.} B2: (0,9- 5,6) mg/g _{s.t.} EKG: (1,2-33,5) mg/g _{s.t.}	[71]

KT - (+) - katehin, EK - (-) - epikatehin, B2 - procijanidin B₂, EKG - (-) - epikatehin galat, GK – galna kiselina
mg/g_{gr} - masa fenolnog spoja po masi grožđa, mg/g_{s.t.} - masa fenolnog spoja po masi suhe tvari sjemenki

Na osnovi praćenja kinetike individualnih fenolnih tvari i utvrđivanja visoke korelacije s masenim udjelima ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima dobivenim u istim eksperimentalnim uvjetima, može se uočiti isti pozitivan trend ovisnosti o temperaturi kao glavnom procesnom parametru. Nadalje, određivanjem efektivnih koeficijenata difuzije za svaki fenolni spoj te utvrđivanjem pozitivne ovisnosti o temperaturi, što je u skladu s koeficijentima difuzije ukupnih fenolnih tvari, može se zaključiti da u ukupnom prijenosu mase difuzijom znatan doprinos imaju određivani individualni fenolni spojevi.

S obzirom na navedeno i uzimajući u obzir da je jedan od osnovnih ciljeva svakog procesa ostvariti ga uz što niže ekonomsko-energetske troškove, preko ukupnih fenolnih tvari (što predstavlja znatno jeftiniju, jednostavniju i bržu metodu od određivanja individualnih polifenola HPLC-om) može se uspješno modelirati i simulirati proces kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa što potvrđuje i visoka korelacija (ρ) između svih konstanti ispitivanih modela, dobivenih aproksimacijom ukupnih fenolnih tvari, i efektivnih koeficijenata difuzije (+)-katehina ($\rho > 0,90$), (-)-epikatehina ($\rho > 0,89$), procijanidina ($\rho > 0,93$) i galne kiseline ($\rho > 0,88$) (*Slika 4.26.*).

5.3. UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA EKSTRABILNOST FENOLNIH TVARI IZ SJEMENKI GROŽĐA

Rezultati ekstrakcije provedene u vodenoj kupelji uspoređeni su s rezultatima ekstrakcije provedene na univerzalnom sustavu za ekstrakciju, Büchi.

Kruto-tekuća ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju provedena je pomoću četiri metode (Soxhlet standard, kontinuirana ekstrakcija, Soxhlet topli i vruća ekstrakcija). Praćenjem kinetike ekstrakcije (20, 30, 60, 120 i 200 minuta) na uzorcima sjemenki grožđa FS_05 utvrđeno je da se maseni udio ukupnih fenolnih tvari povećavao s vremenom bez obzira na primijenjenu metodu ekstrakcije (*Slika 4.31*). Maseni udio ekstrahiranih fenolnih tvari ovim načinom ekstrakcije kretao se u rasponu od 109,00 do 194,30 mg_{GAE}/g_{s.t.} ovisno o metodi, vremenu i uzorku (GE_05, GS_05, FS_05, ZE_05) (*Slika 4.32.*). Iz navedenih slika vidljivo je da se maseni udio ekstrahiranih ukupnih fenolnih tvari pomoću četiri metode univerzalnog sustava nije međusobno znatno razlikovao. Međutim, usporedbom metoda univerzalnog sustava za ekstrakciju s ekstrakcijom u vodenoj kupelji uočena je statistička značajnost metode ekstrakcije te njezine interakcije s ispitivanim vremenima ekstrakcije i uzorcima (*Tablice 4.13 i 4.15*). Značajna razlika (ANOVA, $p = 0,01$) potjecala je od rezultata dobivenih ekstrakcijom u vodenoj

kupelji (*Tablice 4.14.* i *4.16.*), s obzirom na to da su maseni udjeli ukupnih fenolnih tvari u tom slučaju bili niži za 6-35% u odnosu na one dobivene ekstrakcijom na univerzalnom sustavu ovisno o uzorku, metodi i vremenu ekstrakcije (maseni udjeli ukupnih fenolnih tvari dobiveni ekstrakcijom u vodenoj kupelji nakon 200 minuta odgovaraju onima dobivenim na univerzalnom sustavu Büchi u vremenu 30-60 minuta). Jedino u slučaju sorte zweigelt nije uočena navedena razlika, nego su nešto veći ili jednaki rezultati (ovisno o Büchi metodi) dobiveni ekstrakcijom u vodenoj kupelji.

Maseni udio ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima dobivenim metodama univerzalnog sustava za ekstrakciju kretala se od 6,66 do 43,77 mg/g_{s.t.} ovisno o ispitivanom uzorku (GE_05, GS_05, FS_05, ZE_05), te je bio viši za 4-20% u odnosu na masene udjele proantocijanidina u ekstraktima dobivenim pomoću vodene kupelji (izuzev sjemenki grožđa sorte zweigelt).

Sjemenke grožđa (GS_04, FS_04, PK_04, FK_04) podvrgnute su superkritičnoj ekstrakciji pomoću ugljičnog dioksida (CO₂) pod tlakovima 300 bara i 450 bara te temperaturama 40 °C i 60 °C pri oba ispitivana tlaka, bez dodatka kootapala u trajanju jedan sat. Nakon ekstrakcije dobiveni su ekstrakti uljaste konzistencije u kojima nisu dokazani ukupni fenoli i ukupni proantocijanidini, budući da je CO₂ nepolarno otapalo za razliku od fenolnih tvari. Kamengerpoura i sur. [86] su superkritičnom ekstrakcijom ulja iz sjemenki grožđa bez kootapala dobili uljne ekstrakte bogate esterima masnih kiselina, aldehidima i sterolima bez fenolnih komponenti, a slične rezultate objavili su i drugi autori [50, 51, 134]. Međutim, iako je u dosadašnjim istraživanjima superkritična ekstrakcija pomoću CO₂ uglavnom razmatrana kao alternativa kruto-tekućoj ekstrakciji, gdje se uz dodatak prikladnog kootapala mogu dobiti veći prinosi fenolnih tvari i bolja organoleptička svojstva ekstrakata, novija istraživanja pokazuju da se ta metoda uspješno koristi u kombinaciji sa kruto-tekućom ekstrakcijom, bilo u pročišćavanju dobivenih ekstrakata [45, 135] ili kao metoda prethodne obrade uzoraka [45, 136], npr. umjesto heksana koji se koristi za oduljavanje uzoraka. Prijašnja istraživanja [67, 78] pokazuju da prethodna obrada grožđa nepolarnim organskim otapalima kao što je npr. heksan, pozitivno utječu na kruto-tekuću ekstrakciju polifenola iz grožđa pri procesnim uvjetima koji i inače pogoduju ekstrakciji fenolnih tvari.

S obzirom na navedeno, i na dobivene ekstrakte bez dokazanih fenolnih tvari, superkritična ekstrakcija pod primijenjenim uvjetima dalje je razmatrana kao metoda prethodne obrade uzorka te je kruti ostatak sjemenki grožđa nakon superkritične ekstrakcije ponovno ekstrahiran konvencionalnom kruto-tekućom ekstrakcijom u uvjetima koji su se u ovom radu pokazali optimalnim (50% etanol, 80 °C, 200 minuta). Maseni udio ukupnih fenolnih tvari (*Slika 4.35.*) i

ukupnih proantocijanidina (*Slika 4.36.*) u ekstraktima oduljenih sjemenki grožđa bio je nešto veći u odnosu na neoduljene sjemenke bez obzira na uvjete superkritične ekstrakcije, prosječno 7,07% odnosno 6,62 %, što je prema t-testu bilo statistički značajno (*Tablica 4.19.*). Isto tako, statistička analiza (ANOVA) je pokazala da primijenjeni uvjeti superkritične ekstrakcije nisu imali utjecaj na količinu ukupnih fenolnih tvari ekstrahiranu konvencionalnom ekstrakcijom iz oduljenih sjemenki grožđa dok je razlika u količini postojala između uzoraka (*Tablica 4.18.*). Drugi autori [136] objavili su nešto veću razliku u sadržaju fenolnih tvari (2-3 puta) u ekstraktima komine grožđa prethodno obrađenim superkritičnom ekstrakcijom, ali su i ostali eksperimentalni uvjeti bili drugačiji od navedenih u ovom radu.

5.4. BOJA EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA

Ekstrakti dobiveni pri eksperimentalnim uvjetima u ovom radu vizualno su se razlikovali u boji. Zbog subjektivnog zapažanja provedeno je i objektivno mjerenje parametara (L^* , a^* , b^*) CIE- $L^*a^*b^*$ sustava boje iz čijih vrijednosti su određeni ton boje ($h^{°*}$) prema izrazu (3.4) te promjene svojstava boje (ukupna promjena boje ekstrakta (3.5), promjena kromatičnosti (3.6) i promjena tona boje (3.7) u odnosu na ekstrakcijsko otapalo) (*Tablice 4.20., 4.21. 4.23., 4.25., 4.27.*) za koje je ispitana i ovisnost o sadržaju ukupnih fenolnih tvari.

U svim ispitivanim ekstraktima bez obzira na procesne uvjete, način ekstrakcije i uzorak vrijednosti za ukupnu promjenu boje (ΔE^*) kretale su se u rasponu od 2,96 do 7,07 što odgovara, prema percepciji ljudskog oka, slabo uočljivoj do vrlo uočljivoj promjeni boje.

Ukupna promjena boje, kao i promjena kromatičnosti i tona boje (*Slika 4.37.*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih pomoću vodene kupelji povećavala se s povećanjem temperature i vremena trajanja ekstrakcije, a statističkom analizom utvrđeno je i zavisno djelovanje navedenih faktora (*Tablica 4.22.*). Iz slike je vidljivo da je tijekom ukupne promjene boje, promjene kromatičnosti i promjene tona boje ekstrakata sličan tijeku ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari, stoga je ispitana njihova međusobna ovisnost (*Slika 4.38.*) gdje je utvrđena potpuna pozitivna korelacija ($\rho = 0,937 - 0,969$), što upućuje na to da fenolne tvari ekstrahirane pri različitim temperaturama i vremenu ekstrakcije pomoću vodene kupelji znatno doprinose boji ekstrakta. Povećanje promjene svojstava boje praćeno je i negativnom potpunom korelacijom ukupnih fenolnih tvari i svjetline ekstrakata ($\rho = -0,949$), što potvrđuje činjenicu da su ekstrahirani fenolni spojevi utjecali na tamnjenje ekstrakta. Da bi se rezultati potvrdili, ispitana je ovisnost ukupne promjene boje, promjene kromatičnosti i promjene tona boje ekstrakta različitih

uzorka (sorti) sjemenki grožđa (*Tablica 4.23*) o masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari, gdje je također utvrđena vrlo jaka pozitivna korelacija ($\rho = 0,696 - 0,958$), kao i potpuna negativna korelacija između masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima i svjetline ekstrakata ($\rho = -0,939$) (*Slika 4.39.*).

Svi ispitivani uzorci (sorte) imali su znatan utjecaj na parametre boje, ton boje te na promjenu svojstava boje (*Tablica 4.24.*). Postojanje veze između sadržaja fenolnih tvari i promjene boje utvrdili su i i Larrauri García i Saura Calixo [137] u šećernom sirupu ekstrahiranom iz leguminoza te Pervan i suradnici [97] tijekom hidrotermičkih procesa obrade drveta, gdje se smatra da se promjena boje drveta mijenja zbog oksidacije fenolnih tvari. Stratil i sur. [83] objavili su da je sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost bila veća za intenzivnije obojeno povrće (crveni kupus, crveni luk) u odnosu na bezbojno povrće (krumpir, krastavac) dok su Pérez –Magariño i González-San José utvrdili postojanje korelacije između boje vina i sadržaja fenolnih tvari u vinu, odnosno u grožđu [69].

Ton boje ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih pomoću vodene kupelji izražen kao kut tona boje (h^{*}) kretao se u smjeru kazaljke na satu i to od žutih ka žuto/crvenim tonovima ($86,19 - 59,38^{\circ}$) s povećanjem masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima, odnosno s povećanjem temperature i vremena trajanja ekstrakcije. U području žuto/crvenih tonova boje bili su i tonovi ispitivanih ekstrakata različitih sorti sjemenki grožđa ($69^{\circ} - 54,91^{\circ}$).

Ton boje svih ekstrakata dobivenih univerzalnim sustavom za ekstrakciju Büchi kretao se od $68,11^{\circ}$ od $51,00^{\circ}$, što odgovara žuto/crvenim tonovima kao i kod ekstrakata dobivenih pomoću vodene kupelji. Za ekstrakte dobivene pomoću četiri metode univerzalnog sustava Büchi uočeno je da su metoda i vrijeme zavisno utjecali na parametre boje, ton boje i promjenu svojstava boje (*Slika 4.40, Tablica 4.26*) ekstrakata sjemenki grožđa FS_05, za razliku od utjecaja istih uvjeta ekstrakcije na maseni udio ukupnih fenola koji nije bio značajan. Takvi rezultati očito upućuju na veći utjecaj metode ekstrakcije i vremena ekstrakcije na boju nego li na sadržaj fenolnih tvari. Iako je utvrđena jaka pozitivna korelacija između masenog udjela fenolnih tvari ekstrahiranih metodama Büchi sustava i promjena svojstava boje za ekstrakte FS_05 ($\rho = 0,516 - 0,721$) (*Slika 4.41.*) te za različite sorte ($\rho = 0,635 - 0,750$) (*Slika 4.42*), ona je bila nešto niža u odnosu na ekstrakte dobivene vodenom kupelji. Slaba negativna korelacija svjetline ekstrakata FS_05 s masenim udjelom fenolnih tvari ($\rho = -0,371$) dobivenih u različitom vremenu upućuje na to da se s povećanjem masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima svjetlina nije proporcionalno smanjivala pri svim metodama Büchi sustava, a u slučaju različitih uzoraka koji su sa metodom ekstrakcije imali zavisno djelovanje na boju ekstrakta (*Tablica 4.28*), ta korelacija bila je vrlo slaba i pozitivna ($\rho = 0,207$).

5.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA SJEMENKI GROŽĐA

Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva temelje se na visokom redoks potencijalu, odnosno sposobnosti doniranja vodikovog atoma ili elektrona reaktivnim radikalima, što rezultira zaustavljanjem nepoželjnih lančanih reakcija koje dovode do oksidacijskog stresa [9, 57, 92].

Procjena antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa dobivenih u prethodno opisanim eksperimentalnim uvjetima provedena je pomoću DPPH metode koja je prema literaturi jedna od najčešće korištenih metoda, zbog stabilnosti DPPH radikala. U literaturi su, ovisno o supstratu, prisutne različite modifikacije DPPH metode, koje se najčešće odnose na različite inicijalne koncentracije otopine DPPH radikala [83] te na različito vrijeme reakcije (5 - 120 minuta ili do postizanja ravnoteže) između otopine DPPH radikala i ekstrakta [89, 94, 118, 127, 138]. Da bi se utvrdila dinamika inhibicije DPPH radikala ispitivanim ekstraktima, tijekom 120 minuta (10, 30, 60, 120 minuta) praćena je kinetika reakcije otopine DPPH radikala i ekstrakata sjemenki grožđa, dobivenih pomoću vodene kupelji pri različitim uvjetima (otapala, temperatura, različiti uzorci) (*Slika 4.43.*). Rezultati pokazuju da vrsta otapala, temperatura ekstrakcije, različiti uzorci (sorte), kao i vrijeme reakcije između DPPH radikala i ekstrakta imaju nezavisan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata (*Tablica 4.29.*). Statističkom analizom utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti svih ispitivanih ekstrakata nakon 30 minuta i 60 minuta reakcije između DPPH radikala i ekstrakta (*Tablica 4.30.*). S obzirom na to te da je nakon 30-minutnog DPPH testa inhibirano 62 - 88% (ovisno o ekstraktu) od ukupno inhibiranog DPPH radikala u vremenu od 120 minuta, za daljnju analizu rezultata korišteni su podaci tridesetminutnog DPPH testa. Stratil i sur. [83] dobili su slične rezultate tijekom istraživanja antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva povrća pomoću različitih metoda (DPPH test, FRAP, TEAC).

5.5.1. Utjecaj uvjeta i načina ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa

Antioksidacijska aktivnost (AA) ispitivanih ekstrakata, bez obzira na uvjete i način ekstrakcije i različitost uzoraka, kretala se u rasponu od 0,13 do 1,19 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$.

Ekstrakti sjemenki grožđa FS_05 dobiveni ispitivanjem otapalima pomoću vodene kupelji imali su različit utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta (**Tablica 4.31.**). Najnižu antioksidacijsku aktivnost pokazali su vodeni ekstrakti (0,13 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$), a potom slijede ekstrakti 96% - tnog etanola (0,63 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$), 70% - tnog etanola (0,73 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) te ekstrakti dobiveni 50% - tnim etanolom koji su pokazali najveću antioksidacijsku aktivnost (0,82 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u okviru ispitivanih otapala (**Slika 4.43.**), što je u skladu s redoslijedom učinkovitosti navedenih otapala za ekstrakciju ukupnih fenolnih tvari i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina. Pinelo i sur. [88] su ispitivanjem antioksidacijske aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata komine grožđa utvrdili najmanju aktivnost vodenih ekstrakata, kao i neki drugi autori za različite biljne bioproducte [92]. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 ekstrahiranih 50%-tnim etanolom pri različitim temperaturama ekstrakcije kretala se od 0,45 do 0,82 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ od nižih prema višim temperaturama, što je također u skladu s utjecajem temperature na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, odnosno ukupnih proantocijanidina. Utjecaj na antioksidacijsku aktivnost bio je veći što su se temperature više razlikovale dok su susjedne ispitivane temperature imale istu statističku značajnost (**Tablica 4.32.**).

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih pomoću četiri metode univerzalnog sustava za ekstrakciju Büchi kretala se od 0,50 do 0,99 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ (**Slika 4.44.**), pri čemu metoda ekstrakcije unutar sustava Büchi nije imala značajan utjecaj, za razliku od vremena ekstrakcije (**Tablice 4.33. i 4.34.**) koje je pozitivno utjecalo na porast antioksidacijske aktivnosti bez statistički značajne razlike samo za ekstrakte dobivene nakon 120 i 200 minuta ekstrakcije. Ispitivanjem antioksidacijske aktivnosti ekstrakata različitih uzoraka sjemenki grožđa (**Slika 4.45.**) utvrđeno je da su najveću antioksidacijsku aktivnost imali ekstrakti GE_05 (1,02-1,19 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$), a potom slijede GS_05 (0,78-0,93 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$), FS_05 (0,78-0,94 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) i ZE_05 (0,17-0,19 $\text{g}_{\text{inh.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) te da su metoda ekstrakcije (četiri metode univerzalnog sustava za ekstrakciju - Büchi i vodena kupelj) i uzorak zavisno djelovali na antioksidacijsku aktivnost (**Tablica 4.35.**). Osim toga, uočava se da su svi ekstrakti osim ZE_05 dobiveni pomoću vodene kupelji pokazali manju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na one dobivene metodama univerzalnog sustava za ekstrakciju (prosječno 16,66%) što je potvrđeno i statistički Duncanovim *post-hoc* testom (**Tablica 4.36.**).

Razlikovanje sjemenki sorte grožđa zweigelt od ostalih uzoraka u pogledu utjecaja procesnih parametara i načina ekstrakcije kako na maseni udio ekstrahiranih ukupnih fenolnih tvari, tako i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata, najvjerojatnije je posljedica vremena maceracije grožđa. Sjemenke su mjesec dana bile u komu izloženom djelovanju malolaktičkih bakterija radi

smanjenja kiselosti vina i tek tada su uzorkovane, dok su ostali uzorci dobiveni u deset dana od prešanja grožđa. Zbog toga su se vjerojatno fenolne tvari iz sjemenki grožđa zweigelt bolje ekstrahirale u mošt/vino, dok je njihov manji udio ostao u sjemenkama. Osim toga, tijekom procesiranja vina trop grožđa izvrnut je određenim promjenama okolnih uvjeta (temperatura, tlak, aeracija), što može utjecati na uzorak s posljedicom promjena svojstava ekstrakata [88].

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata oduljenih sjemenki grožđa superkritičnom ekstrakcijom znatno se povećala (prosječno za 35,16%) u odnosu na neoduljene sjemenke grožđa (*Slika 4.46., Tablica 4.38.*) bez značajnog utjecaja primjenjenih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije, za razliku od značajnog utjecaja uzorka sjemenki grožđa (*Tablica 4.37.*). Louli i sur. [45] su dokazali da je superkritična ekstrakcija pogodna operacija za pročišćavanje ekstrakata komine grožđa dobivenih konvencionalnim putem, te da se već pri tlaku iznad 150 bara ekstrahiraju nepoželjni spojevi koji ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost, a pri tome pročišćeni ekstrakti imaju veću antioksidacijsku aktivnost i bolja organoleptička svojstva (svjetliji ekstrakt, bez nepoželjnih okusa i mirisa), što je bitno ako se koriste kao prehrambeni aditivi ili sastojci kozmetičke i farmaceutske industrije. Rezultati oba rada pokazuju da superkritična ekstrakcija pozitivno utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata bilo kao metoda pročišćavanja ekstrakata ili kao metoda prethodne obrade uzorka iz kojeg će se obavljati ekstrakcija.

5.5.2. Korelacija između masenog udjela fenolnih tvari u ekstraktima i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa

Prema literaturi nema generalnog zaključka o korelaciji sadržaja fenolnih tvari iz biljnih ekstrakata i antioksidacijske aktivnosti, s obzirom da su neki autori pronašli visoku korelaciju [4, 39, 41, 58, 88, 118, 139] dok drugi nisu pronašli nikakvu korelaciju [46, 67]. Razlog je tome: različit način određivanja antioksidacijske aktivnosti i interpretacija rezultata pojedine metode; (ne)uzimanje u obzir prisutnosti interferirajućih supstanci (askorbinska kiselina, saharidi ili eventualno karotenoidi); ekstrakcija fenolnih spojeva različite prirode i strukture ovisno o primijenjenim procesnim uvjetima. Metoda primijenjena za određivanje ukupnih fenolnih tvari (Folin-Ciocalteu) i antioksidacijske aktivnosti u ovom radu temeljile su se na istom principu, redoks svojstvima spojeva u ekstraktima sjemenki grožđa [83], stoga se moglo očekivati da postoji korelacija između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari. Antioksidacijska aktivnost svih ekstrakata, bez obzira na

primijenjene uvjete i način ekstrakcije te različitost uzorka potpuno je korelirala ($\rho = 0,990$) s masenim udjelom ukupnih fenolnih tvari određenih Folin - Ciocalteuovom metodom (UFT_FC) (*Slike 4.47.a, 4.48.a*). U odnosu na to, ukupni fenolni spojevi određeni HPLC metodom (zbroj dokazanih individualnih fenolnih spojeva u ekstraktima) (*Slika 4.47.b*) pokazali su samo nešto manju korelaciju ($\rho = 0,864$) s antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata iako je maseni udio fenolnih tvari bio manji u prosjeku 12,9 puta u odnosu na udio UFT_FC. To znači da kvantificirani individualni spojevi znatno pridonose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata sjemenki grožđa.

Određivanjem korelacije između svakog individualnog fenolnog spoja i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta može se dobiti jasnija slika o njihovu doprinosu ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta sjemenki grožđa.

Na primjeru sjemenki grožđa FS_05 (**Tablica 4.39.**) vidljivo je da monomerni flavan-3-oli ((+)-katehin: $\rho = 0,851-0,999$; i (-)-epikatehin: $\rho = 0,708-0,999$), galna kiselina ($\rho = 0,831-0,971$) i procijanidin B₂ ($\rho = 0,259-0,998$) znatno pridonose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta, dok je doprinos (-)-epikatehin galata i (-)-galokatehina bio manje važan što je u skladu i s njihovim niskim masenim udjelom u ekstraktima. Iako monofenolni spojevi imaju manju antioksidacijsku aktivnost od polifenola, galna kiselina zbog induktivnog efekta hidroksilnih skupina znatno pridonosi ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti [89 , 119].

Ukupni proantocijanidini (*Slike 4.47.c, 4.48.b*) pokazali su visoku korelaciju sa antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata ($\rho = 0,986-0,992$). S obzirom na to, kao i na njihovu visoku korelaciju sa masenim udjelom ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima (*Slike 4.30., 4.34.*), može se zaključiti da upravo oni najviše pridonose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata sjemenki grožđa. Prema literaturnim podacima flavan-3-oli sjemenki grožđa osim djelovanja "in vitro", pokazuju "in vivo" antioksidacijsku aktivnost kroz sprečavanje lipidne peroksidacije ili blokiranje stvaranja radikala, a posebno se ističu procijanidini ekstrakta sjemenki grožđa [64 , 68 , 78].

6. ZAKLJUČCI

Ispitivanjem utjecaja otapala (vode i vodenih otopina etanola: 50 - 96%), omjera kruto-tekuće (10 - 40 mL/g), veličine čestica (usitnjene neklasirane i klasirane: (> 0,63 mm, 0,63 - 0,4 mm, 0,4 - 0,16 mm, < 0,16 mm)) i temperature ekstrakcije (25-80 °C) kao i načina kruto-tekuće ekstrakcije (zagrijavanje u vodenoj kupelji, ekstrakcija na univerzalnom sustavu za ekstrakciju, kombinacija superkritične i konvencionalne ekstrakcije otapalom) na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- ☞ U ekstraktima sjemenki grožđa dokazano je 1,8 – 19,5% ukupnih fenolnih tvari, odnosno 0,42 - 4,38% ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u odnosu na suhu tvar sjemenki grožđa iz kojih je ekstrakcija provedena, ovisno o uvjetima i načinu ekstrakcije kao i o ispitivanom uzorku;
- ☞ Otapalo, omjer kruto-tekuće i veličina čestica utjecali su na prinos fenolnih tvari u ekstraktima sjemenki grožđa:
 - ✓ smanjenjem veličine čestica (na veličinu čestica manju od 0,63 mm) te povećanjem omjera kruto-tekuće (od 10 do 40 mL/g) povećavao se prinos fenolnih tvari u ekstraktima sjemenki grožđa,
 - ✓ za ispitivana otapala, 50%-tni etanol pokazao je najbolju učinkovitost u ekstrakciji fenolnih tvari iz sjemenki grožđa;
- ☞ Proces ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa odvijao se u periodu padajuće brzine ekstrakcije, gdje je glavni mehanizam prijenosa fenolnih tvari difuzija, a koju karakterizira efektivni koeficijent difuzije;
- ☞ Povećanjem temperature ekstrakcije povećavao se efektivni koeficijent difuzije, odnosno brzina ekstrakcije, a najveći prinos fenolnih tvari (ukupnih i individualnih) ostvaren je pri temperaturi ekstrakcije 80 °C;
- ☞ Kinetika ekstrakcije fenolnih tvari bila je karakterizirana velikom inicijalnom brzinom ekstrakcije (period ispiranja topljive tvari s površine materijala), koju je pratio brzi period difuzije, a potom je brzina ekstrakcije (difuzije) opadala te se postupno približavala ravnotežnom stanju;

- ☞ Iako su svi ispitivani matematički modeli (modificirani Fickov II, Pageov, modificirani Henderson-Pabisov, Pelegov) prikladni (prema statističkim kriterijima) za opisivanje kinetike kruto-tekuće ekstrakcije, Pelegov neeksponencijalni model lošije je aproksimirao eksperimentalne podatke u odnosu na ostala tri eksponencijalna modela;
- ☞ Funkcionalna ovisnost parametara eksponencijalnih modela o temperaturi ekstrakcije dala je mogućnost simulacije brzine ekstrakcije fenolnih tvari iz sjemenki grožđa za područje ispitivanih temperatura i vremena ekstrakcije. Pageov model pokazao je najbolja slaganja eksperimentalnih i simulacijom predviđenih koncentracija fenolnih tvari;
- ☞ Visoka korelacija ($\rho = 0,822 - 0,977$) masenog udjela dominantnih individualnih fenolnih spojeva ((+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B₂ i galne kiseline) i ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima dobivenim pri različitim temperaturama i vremenu ekstrakcije iz sjemenki grožđa upućuju na mogućnost modeliranja i simuliranja procesa kruto-tekuće ekstrakcije preko ukupnih fenolnih tvari, što je puno ekonomičniji način u odnosu na praćenje ekstraktibilnosti individualnih fenolnih tvari;
- ☞ Usporedbom masenog udjela ekstrahiranih fenolnih tvari u ekstraktima dobivenim pomoću vodene kupelji i univerzalnog sustava za ekstrakciju utvrđena je:
 - ✓ veća ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari s univerzalnim sustavom za ekstrakciju za 6 - 35% u odnosu na ekstrakciju u vodenoj kupelji. Međutim, univerzalni sustav za ekstrakciju nije imao mogućnost podešavanja temperature za razliku od vodene kupelji;
- ☞ Superkričnom ekstrakcijom (tlak: 300 i 450 bara; temperatura: 40 i 60 °C) dobiveni su ekstrakti uljaste konzistencije u kojima nisu dokazani fenolni spojevi. Međutim, superkrična ekstrakcija kao prethodna metoda obrade uzorka, s ciljem oduljavanja, prije konvencionalne ekstrakcije utjecala je na povećani prinos ukupnih fenolnih tvari (7,07%), ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (6,62%) te na bolju antioksidacijsku aktivnost (35,16%) u odnosu na uzorke koji nisu podvrgnuti superkričnoj ekstrakciji;
- ☞ Svi ispitivani procesni uvjeti, načini ekstrakcije te različiti uzorci imali su utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta sjemenki grožđa. Uočena je visoka korelacija između antioksidacijske aktivnosti svih ispitivanih ekstrakata i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari ($\rho = 0,990 - 0,996$) odnosno masenog udjela ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina ($\rho = 0,989 - 0,992$). Visoka korelacija ($\rho = 0,529 - 0,999$) individualnih fenolnih tvari

((+)-katehina, (-)-epikatehina, galne kiseline, procijanidina B₂, (-)-epikatehin galata i (-)-galokatehina) sa antioksidacijskom aktivnošću ukazuje na njihov veliki doprinos u ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta sjemenki grožđa;

☞ Vizualna razlika u boji ekstrakata dobivenih pod različitim ispitivanim uvjetima potvrđena je objektivnim mjerenjem parametara boje ekstrakata. S obzirom da je utvrđeno postojanje određene povezanosti boje i masenog udjela ukupnih fenolnih tvari, određivanje navedenih parametara moglo bi poslužiti za brzu i grubu procjenu sadržaja fenolnih tvari u različitim ekstraktima.

Rezultati ovoga rada, s obzirom na dokazani fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sjemenki grožđa potvrđuju početnu pretpostavku da je otpad vinarija, koji sadrži i sjemenke grožđa, visokovrijedan bioproduct čijom bi se preradom smanjio problem njegovog odlaganja u okolišu, te dobila jeftina i dobra sirovina za izolaciju (ekstrakciju) prirodnih bioaktivnih spojeva kakvi su i fenolni spojevi. S obzirom na to da je matematičkom modeliranju, kao i simuliranju procesa cilj predviđanje složenih procesa kakva je ekstrakcija uz ekonomsko-energetsku uštedu, rezultati rada mogli bi poslužiti kao početni korak za implementaciju procesa u poluindustrijsko mjerilo te biti početna točka u optimizaciji kontinuiranog procesa ekstrakcije fenolnih tvari, što je od posebne važnosti za industrijske procese.

7. LITERATURA

1. M. Naczki, F. Shahidi. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1523-1542, 2006.
2. M. Naczki, F. Shahidi. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111, 2004.
3. A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez, J. C. Parajó. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72, 145-171, 2001.
4. D. P. Makris, G. Boskou, N. K. Andrikopoulos. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 125-132, 2007.
5. J. M. Luque-Rodríguez, M. D. Luque de Castro, P. Pérez-Juan. Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta* 68, 126-130, 2005.
6. J. Shi, J. Yu, J. E. Pohorly, Y. Kakuda. Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food* 6, 291-299, 2003.
7. J. E. Cacace, G. Mazza. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59, 379-389, 2003.
8. M. T. Escribano-Bailon, C. Santos-Buelga. Polyphenols extraction from foods. U *Methods in Polyphenol Analysis*. C. Santos-Buelga and G. Williamson (ur.), Cambridge, str. 1-16, 2003.
9. R. Tsao, Z. Deng. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B* 812, 85-99, 2004.
10. M. Pinelo, J. Sineiro, M. J. Núñez. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering* 77, 57-63, 2006.
11. T. H. Varzakas, G. C. Leach, C. J. Israilides, D. Arapoglou. Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 29-41, 2005.
12. J. Welti-Chanes, F. Vergara-Balderas, D. Bermúdez-Aguirre. Transport phenomena in food engineering: basic concepts and advances. *Journal of Food Engineering* 67, 113-128, 2005.
13. M. Pinelo, P. D. Fabbro, L. Manzocco, M. J. Núñez, M. C. Nicoli. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry* 92, 109-117, 2005.
14. J. Shi, J. Yu, J. Pohorly, J. C. Young, M. Bryan, Y. Wu. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food, Agriculture & Environmental* 1, 42-47, 2003.
15. I. Mujić. *Ekstrakcija i ekstraktori biljnih materijala*. Biotehnički fakultet, Bihać, 2006.
16. W. L. McCabe, J. C. Smith, P. Harriot. Leaching and Extraction. U *Unit operations of chemical engineering*. E. D. Glandt, M. T. Klein, T. F. Edgar (ur.), McGraw-Hill, New York, str. 764-795, 2005.
17. J. M. Coulson, J. F. Richardson, J. R. Backhurst, J. H. Harker. Leaching. U *Chemical Engineering*. J. M. Coulson, J. F. Richardson, J. R. Backhurst, J. H. Harker (ur.), Pergamon Press, Oxford, str. 375-387, 1978.

18. T. Lovrić. *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. HINUS, Zageb, 2003.
19. K. P. Sandeep, J. Irudayaraj. Introduction to modeling and numerical simulation. U *Food processing operations modeling. Design and analysis*. J. Irudayaraj.(ur.), New York, Basel, str. 25-36, 2001.
20. I. Dincer, M. M. Hussain, A. Z. Sahin, B. S. Yilbas. Development of a new moisture transfer (Bi-Re) correlation for food drying applications. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 45, 1749-1755, 2002.
21. M. Rodríguez-Fernández, E. Balsa-Canto, J. A. Egea, J. R. Banga. Identifiability and robust parameter estimation in food process modeling: Application to a drying model. *Journal of Food Engineering* 83, 374-383, 2007.
22. B. Singh, A. Kumar, A. K. Gupta. Study of mass transfer kinetics and effective diffusivity during osmotic dehydration of carrot cubes. *Journal of Food Engineering* 79, 471-480, 2007.
23. O. Döker, U. Salgin, I. Şanal, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalimli. Modeling of extraction of β -carotene from apricot bagasse using supercritical CO₂ in packed bed extractor. *The Journal of Supercritical Fluids* 28, 11-19, 2004.
24. H. O. Menges, C. Ertekin. Thin layer drying model for treated and untreated Stanley plums. *Energy Conversion and Management* 47, 2337-2348, 2006.
25. M. S. Guerrero, J. S. Torres, M. J. Núñez. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology* 99, 1311-1318, 2008.
26. J. D. Floros, J. Rattray, H. Liang. Mass transfer and diffusion in foods. U *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. F. J. Francis (ur.), John Wiley and Sons, Inc., New York, str. 1538-1549, 1999.
27. Š. Stangler Herodež, M. Hadolin, M. Škerget, Ž. Knez. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* 80, 275-282, 2003.
28. Y. Chalermchat, M. Fincan, P. Dejmek. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering* 64, 229-236, 2004.
29. J. D. Espinoza-Pérez, A. Vargas, V. J. Robles-Olvera, G. C. Rodríguez-Jimenes, M. A. García-Alvarado. Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid-liquid extraction of coffee beans. *Journal of Food Engineering* 81, 72-78, 2007.
30. R. Derriche, K. S. Berrahmoune. Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering* 78, 1149-1154, 2007.
31. L. M. A. S. Campos, E. M. Z. Michielin, L. Danielski, S. R. S. Ferreira. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *The Journal of Supercritical Fluids* 34, 163-170, 2005.
32. C. Liyana-Pathirana, F. Shahidi. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93, 47-56, 2005.
33. G. P. Sharma, R. C. Verma, P. Pathare. Mathematical modeling of infrared radiation thin layer drying of onion slices. *Journal of Food Engineering* 71, 282-286, 2005.

34. M. Kashaninejad, A. Mortazavi, A. Safekordi, L. G. Tabil. Thin-layer drying characteristics and modeling of pistachio nuts. *Journal of Food Engineering* 78, 98-108, 2007.
35. M. Maskan. Effect of processing on hydration kinetics of three wheat products of the same variety. *Journal of Food Engineering* 52, 337-341, 2002.
36. M. Planinić, D. Velić, S. Tomas, M. Bilić, A. Bucić. Modelling of drying and rehydration of carrots using Peleg's model. *European Food Research and Technology* 221, 446-451, 2005.
37. M. Peleg. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science* 53, 1216-1219, 1988.
38. E. Simeonov, I. Tsibranska, A. Minchev. Solid-liquid extraction from plants - experimental kinetics and modelling. *Chemical Engineering Journal* 73, 255-259, 1999.
39. N. Turkmen, F. Sari, Y. S. Velioglu. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 99, 835-841, 2006.
40. K. Zhou, L. Yu. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Science and Technology* 37, 717-721, 2004.
41. G. Spigno, L. Tramelli, D. M. De Faveri. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81, 200-208, 2007.
42. B. Pekić, V. Kovač, E. Alonso, E. Revilla. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry* 61, 201-206, 1998.
43. G. Spigno, D. M. De Faveri. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78, 793-801, 2007.
44. M. Jukić, S. Đaković, Ž. Filipović-Kovačević, V. Kovač, J. Vorkapić-Furač. Dominantni trendovi "zelene kemije". *Kemija u industriji* 54, 255-272, 2005.
45. V. Louli, N. Ragoussis, K. Magoulas. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology* 92, 201-208, 2004.
46. M. Pinelo, A. Ruiz-Rodríguez, J. Sineiro, F. J. Senoráns, G. Reglero, M. J. Núñez. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *European Food Research and Technology* 226, 199-205, 2007.
47. L. T. Taylor. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996.
48. M. Mukhopadhyay. *Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, Boca Raton, 2000.
49. G. Brunner. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67, 21-33, 2005.
50. M. Palma, L. T. Taylor. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 849, 117-124, 1999.
51. A. Cháfer, A. Berna, J. B. Montón, R. Munoz. High-pressure solubility data of system ethanol (1)+epicatechin (2)+CO₂ (3). *The Journal of Supercritical Fluids* 24, 103-109, 2002.

52. M. Palma, Z. Pineiro, C. G. Barroso. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A* 921, 169-174, 2001.
53. D. T. Veličković, D. M. Milenović, M. S. Ristić, V. B. Veljković. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrasonics Sonochemistry* 13, 150-156, 2006.
54. J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 41-47, 2003.
55. V. Cheynier. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 223S-229S, 2005.
56. K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66, 401-436, 1999.
57. S. P. Kazazić. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 55, 279-290, 2004.
58. J. E. Wood, S. T. Senthilmohan, A. V. Peskin. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry* 77, 155-161, 2002.
59. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584, 2002.
60. Y. Yilmaz, R. T. Toledo. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15, 422-433, 2004.
61. G. R. Beecher. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet*. J. Blumberg (ur.) American Society for Nutritional Sciences, Washington, SAD, str. 3248S-3254S, 2003.
62. C. Santos-Buelga, A. Scalbert. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094-1117, 2000.
63. N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191-203, 2006.
64. I. S. Arvanitoyannis, D. Ladas, A. Mavromatis. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 475-487, 2006.
65. FAO. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org.htm>. 2008. 1-10-2008.
66. A. Schieber, F. C. Stintzing, R. Carle. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 12, 401-413, 2001.
67. G. Ruberto, A. Renda, C. Daquino, V. Amico, C. Spatafora, C. Tringali, N. De Tommasi. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry* 100, 203-210, 2007.
68. Y. Yilmaz, R. T. Toledo. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 255-260, 2004.

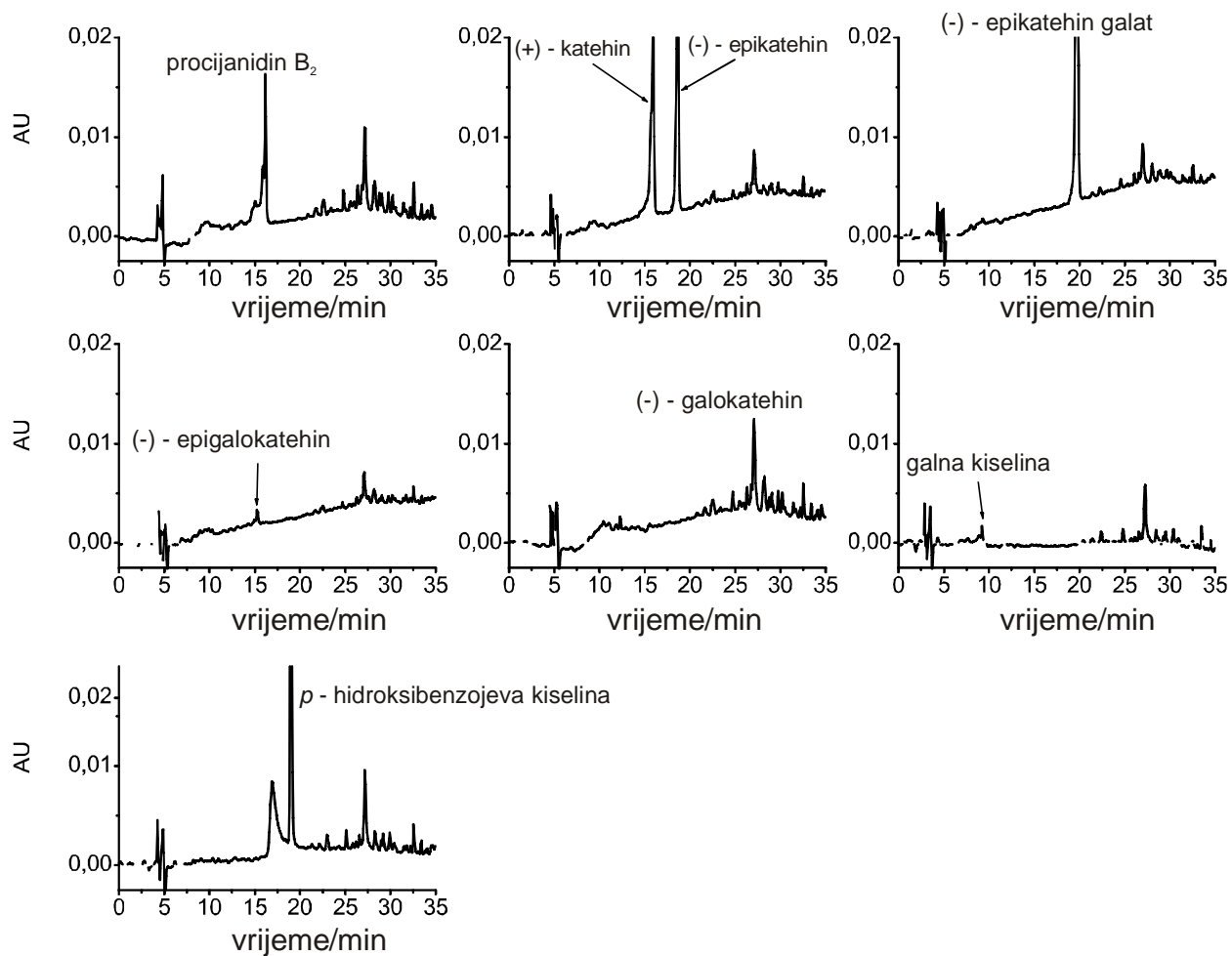
69. S. Pérez-Magarino, M. L. González-San José. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 96, 197-208, 2006.
70. H. Nawaz, J. Shi, G. S. Mittal, Y. Kakuda. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 48, 176-181, 2006.
71. V. A. P. De Freitas, Y. Glories. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1601-1606, 1999.
72. S. González-Manzano, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513, 283-289, 2004.
73. J. A. Kennedy, M. A. Matthews, A. L. Waterhouse. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77-85, 2000.
74. G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, K. K. Sakariah. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* 36, 117-122, 2003.
75. R. Rodríguez-Montealegre, R. Romero Peces, J. L. Chacón Vozmediano, J. Martínez Gascuena, E. García Romero. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 687-693, 2006.
76. N. G. Baydar, G. Özkan, O. Sağdıç. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15, 335-339, 2004.
77. T. Fuleki, J. M. R. da Silva. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1156-1160, 1997.
78. Y. Yilmaz, R. T. Toledo. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 41-48, 2006.
79. P. Schofield, D. M. Mbugua, A. N. Pell. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40, 2001.
80. D. A. Skoog, D. M. West, J. J. Holler. *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
81. M. Šeruga. *Laboratorijske vježbe iz fizikalne kemije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 1988.
82. P. Stratil, B. Klejdus, V. Kubán. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* 71, 1741-1751, 2007.
83. P. Stratil, B. Klejdus, V. Kubán. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 607-616, 2006.
84. K. Robards. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1000, 657-691, 2003.

85. K. Bielicka-Daszkiwicz, M. Dębicka, A. Voelkel. Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples. *Journal of Chromatography A* 1052, 233-236, 2004.
86. A. Kamangerpour, M. Ashraf-Khorassani, L. T. Taylor, H. M. McNair, L. Chorida. Supercritical fluid chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract. *Chromatographia* 55, 417-421, 2002.
87. V. Roginsky, E. A. Lissi. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235-254, 2005.
88. M. Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, M. J. Núñez. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2111-2117, 2005.
89. C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 270-276, 1998.
90. J. Pokorny. *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2001.
91. L. Yu, S. Haley, J. Perret, M. Harris, J. Wilson, M. Qian. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1619-1624, 2002.
92. B. Lapornik, M. Prošek, A. Golc Wondra. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71, 214-222, 2005.
93. D. Huang, O. U. Boxin, R. L. Prior. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856, 2005.
94. V. Katalinić, M. Miloš, T. Kulišić, M. Jukić. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94, 550-557, 2006.
95. J. M. R. da Silva, N. Darmon, Y. Fernandez, S. Mitjavila. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1549-1552, 1991.
96. Y. Pomeranz, C. E. Meloan. Measurement of color. U *Food Analysis: Theory and Practice*. Y. Pomeranz, C. E. Meloan (ur.), Chapman and Hall, New York, str. 87-98, 1994.
97. S. Pervan, A. Antonović, M. Humar, A. Straže, Gorišek Željko. Colour chemistry of steamed and boiled walnutwood (*Juglans regia* L.). *Drvna Industrija* 57, 127-133, 2006.
98. A. Bąkowska, A. Z. Kucharska, J. Oszmiański. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry* 81, 349-355, 2003.
99. J. Darias-Martín, M. Carrillo, E. Díaz, R. B. Boulton. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry* 73, 217-220, 2001.
100. K. Duangmal, B. Saicheua, S. Sueeprasan. Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1437-1445, 2008.

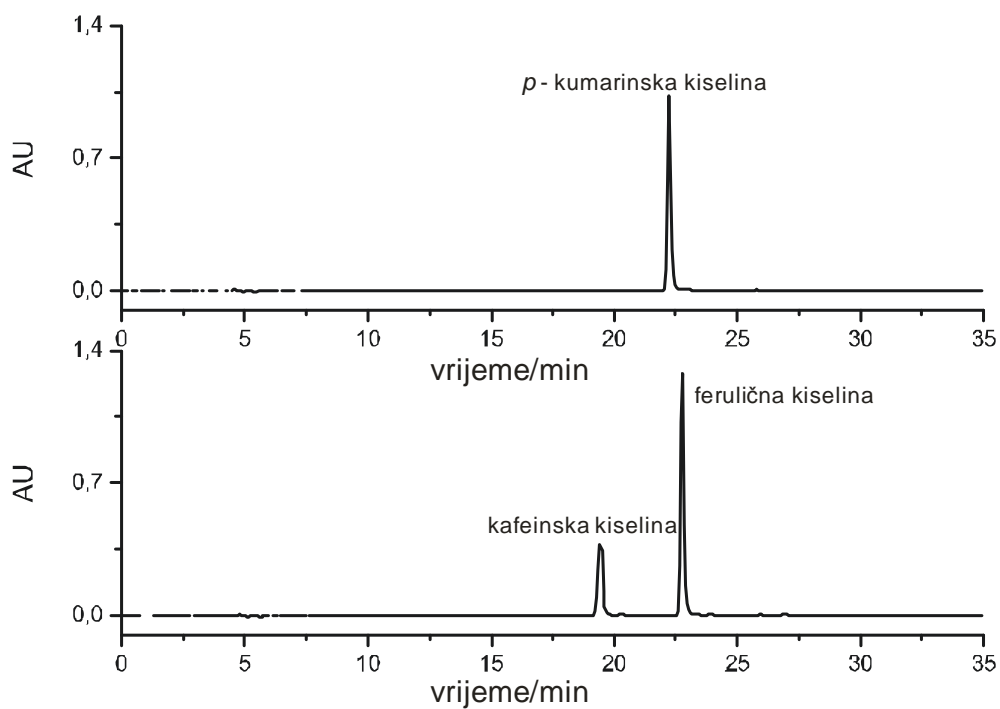
101. T. Vatai, M. Škerget, Ž. Knez, S. Kareth, M. Wehowski, E. Weidner. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The Journal of Supercritical Fluids* 45, 32-36, 2008.
102. B. Berké, V. De Freitas. A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 260-265, 2007.
103. A. M. González-Paramás, F. Lopes da Silva, P. Martnín-López, G. Macz-Pop, S. González-Manzano, C. Alcalde-Eon, J. J. Pérez-Alonso, M. T. Escribano-Bailón, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chemistry* 94, 428-436, 2006.
104. T. N. Kočevár. Kolorimetrijska analiza i vizualna ocjena boja na dvobojnoj tkanini. *Tekstil* 55, 127-134, 2006.
105. L. Mandić. Kolorimetrijska razlika.
http://repro.grf.hr/modules/download_gallery/dlc.php?file=http://repro.grf.hr/media/download_gallery/KOLORIMETRIJSKA%20RAZLIKA.ppt . 2008. 1-10-2008.
106. T. Rolich. Boja i atributi boje.
http://racunala.ttf.hr/files/Boja_i_atributi_boje.pdf . 2007. 1-10-2008.
107. ETS Laboratories. The ETS Wine Color Analysis.
www.etslabs.com/scripts/ets/pagetemplate/blank.asp?pageid=352 . 2001. 20-9-2008.
108. R. E. Wrolstad, R. W. Durst, J. Lee. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 16, 423-428, 2005.
109. Grapho Metronic. Color + Quality Part 3: Color systems .
<http://www.grapho-metronic.com/content/en/TechNotes/index.html> . 2008. 12-2-2008.
110. A. Waterhouse. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine.
<http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro.htm> . 2001. 12-2-2008.
111. R. Avallone, M. Plessi, M. Baraldi, A. Monzani. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* 10, 166-172, 1997.
112. M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. Rižner Hraš, M. Simonič, Ž. Knez. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89, 191-198, 2005.
113. L. Jakobek, M. Šeruga, I. Novak, M. Medvidović-Kosanović. Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103, 369-378, 2007.
114. V. Jirouš-Rajković. Mjerenje boje/Priručnik za izvođenje laboratorijskih vježbi iz ispitivanja kvalitete površinske obrade.
http://www.sumfak.hr/~finala/za_download/PRIRUCNIK%20ZA%20LAB.%20VJEZBE.pdf . 2005. 20-9-2008.
115. M. Maskan. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering* 48, 169-175, 2001.
116. V. V. de Rosso, A. Z. Mercadante. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 347-352, 2007.

117. P. Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26, 212-219, 2004.
118. S. Benvenuti, F. Pellati, M. Melegari, D. Bertelli. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science* 69, 164-169, 2004.
119. C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International* 32, 407-412, 1999.
120. I. Doymaz. Drying kinetics of black grapes treated with different solutions. *Journal of Food Engineering* 76, 212-217, 2006.
121. M. Planinić. Modeliranje procesa i određivanje efektivnog koeficijenta difuzivnosti vlage tijekom sušenja mrkve i krumpira, *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2008.
122. A. Bucić-Kojić, M. Planinić, S. Tomas, M. Bilić, D. Velić. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81, 236-242, 2007.
123. S. Kitanović, D. Milenović, V. B. Veljković. Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biochemical Engineering Journal* 41, 1-11, 2008.
124. I. Türk Toğrul, D. Pehlivan. Modelling of drying kinetics of single apricot. *Journal of Food Engineering* 58, 23-32, 2003.
125. H. Toğrul. Suitable drying model for infrared drying of carrot. *Journal of Food Engineering* 77, 610-619, 2006.
126. N. Rahman, S. Kumar. Influence of sample size and shape on transport parameters during drying of shrinking bodies. *Journal of Food Process Engineering* 30, 186-203, 2007.
127. R. Guendez, S. Kallithraka, D. P. Makris, P. Kefalas. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* 89, 1-9, 2005.
128. H. S. Ahn, T. I. Jeon, J. Y. Lee, S. G. Hwang, Y. Lim, D. K. Park. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. *Nutrition Research* 22, 1265-1273, 2002.
129. N. Abu-Ghannam, B. McKenna. The application of Peleg's equation to model water absorption during the soaking of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Engineering* 32, 391-401, 1997.
130. P. A. Sopade, J. A. Obekpa. Modelling water absorption in soybean, cowpea and peanuts at three temperatures using Peleg's equation. *Journal of Food Science* 55, 1084-1087, 1990.
131. M. Kashaninejad, Y. Maghsoudlou, S. Rafiee, M. Khomeiri. Study of hydration kinetics and density changes of rice (Tarom Mahali) during hydrothermal processing. *Journal of Food Engineering* 79, 1383-1390, 2007.
132. T. M. Afzal, T. Abe. Diffusion in potato during far infrared radiation drying. *Journal of Food Engineering* 37, 353-365, 1998.

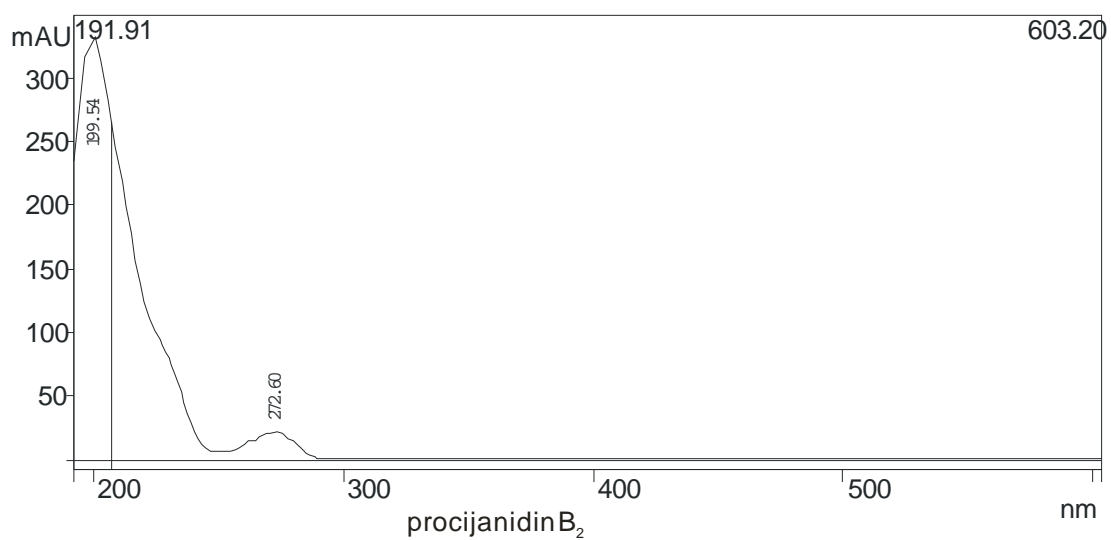
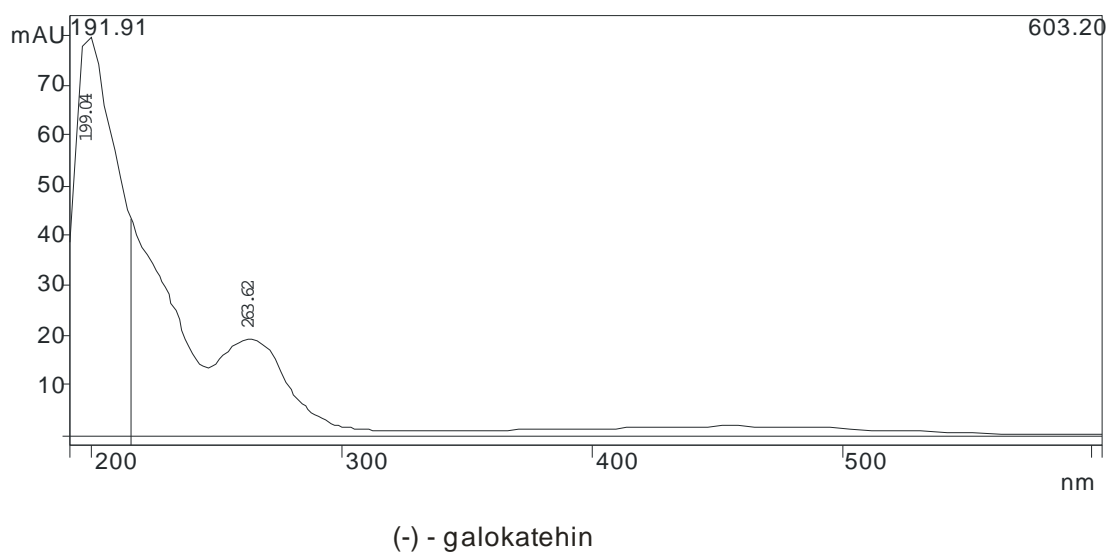
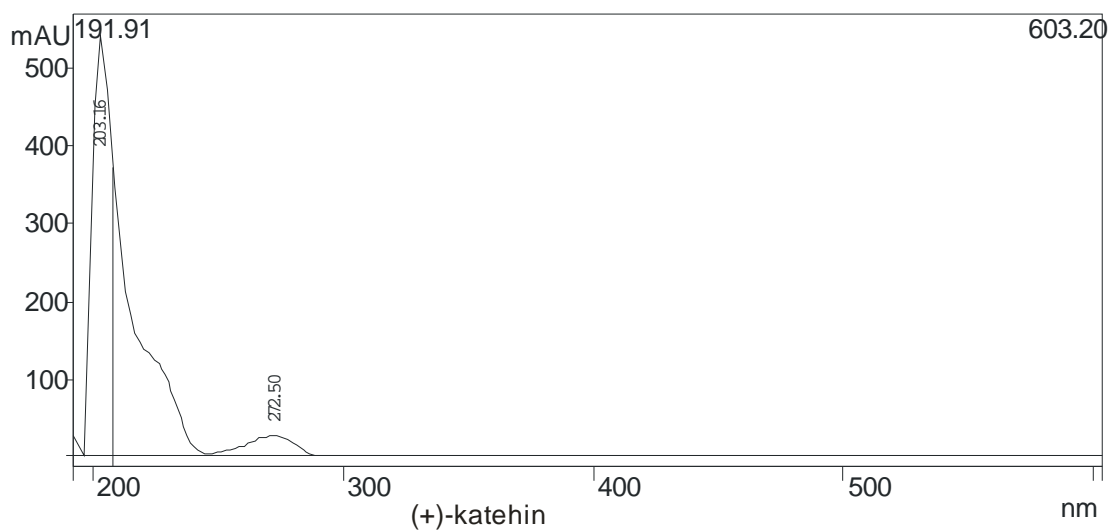
133. S. Sayar, M. Turhan, S. Gunasekaran. Analysis of chickpea soaking by simultaneous water transfer and water-starch reaction. *Journal of Food Engineering* 50, 91-98, 2001.
134. X. Cao, Y. Ito. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1021, 117-124, 2003.
135. M. Hadolin, A. Rižner Hras, D. Bauman, Ž. Knez. Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5, 245-248, 2004.
136. T. Vatai, M. Škerget, Ž. Knez. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90, 246-254, 2009.
137. G. Larrauri, F. Saura Calixto. Evaluation of CIE-lab colour parameters during the clarification of a sugar syrup from mesquite pods (*Prosopis Pallida* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 35, 385-389, 2000.
138. W. Peschel, F. Sánchez-Rabaneda, W. Diekmann, A. Plescher, I. Gartzía, D. Jiménez, R. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas, C. Codina. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97, 137-150, 2006.
139. A. Arnous, D. P. Makris, P. Kefalas. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 655-665, 2002.



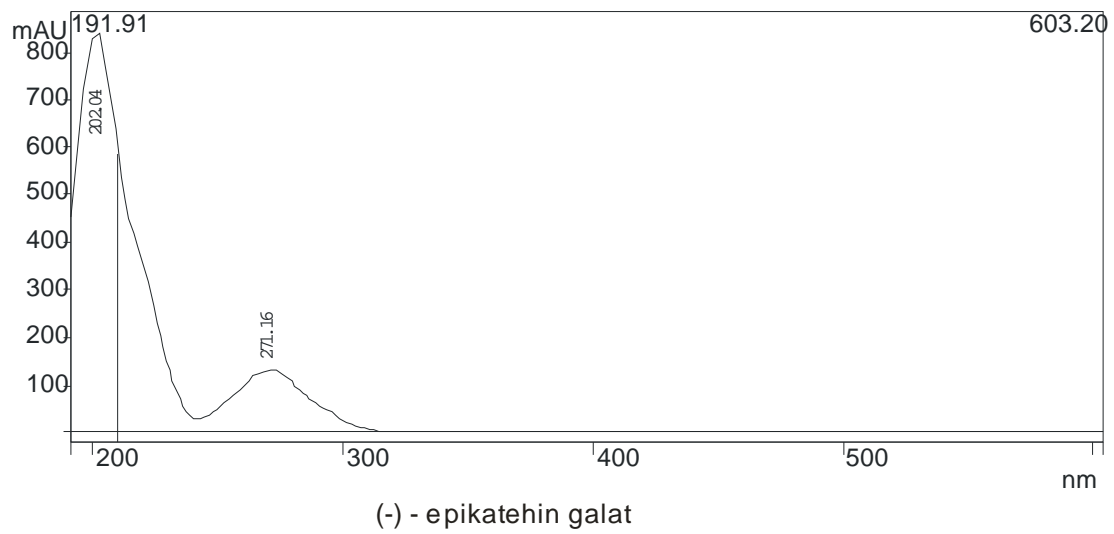
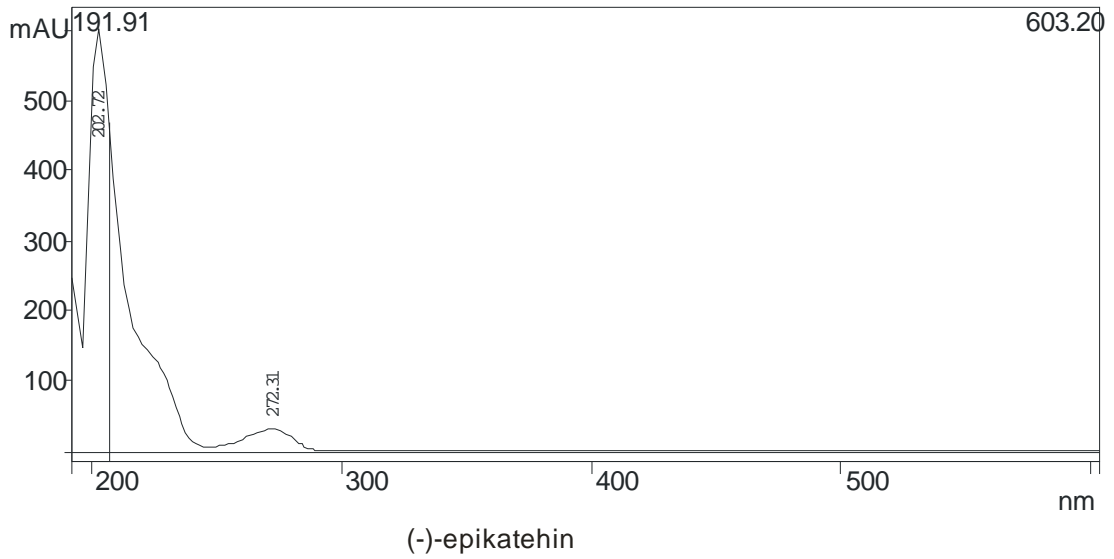
Prilog I-1. Kromatogrami standarda flavanola i hidroksibenzojevih kiselina snimljeni na 280 nm



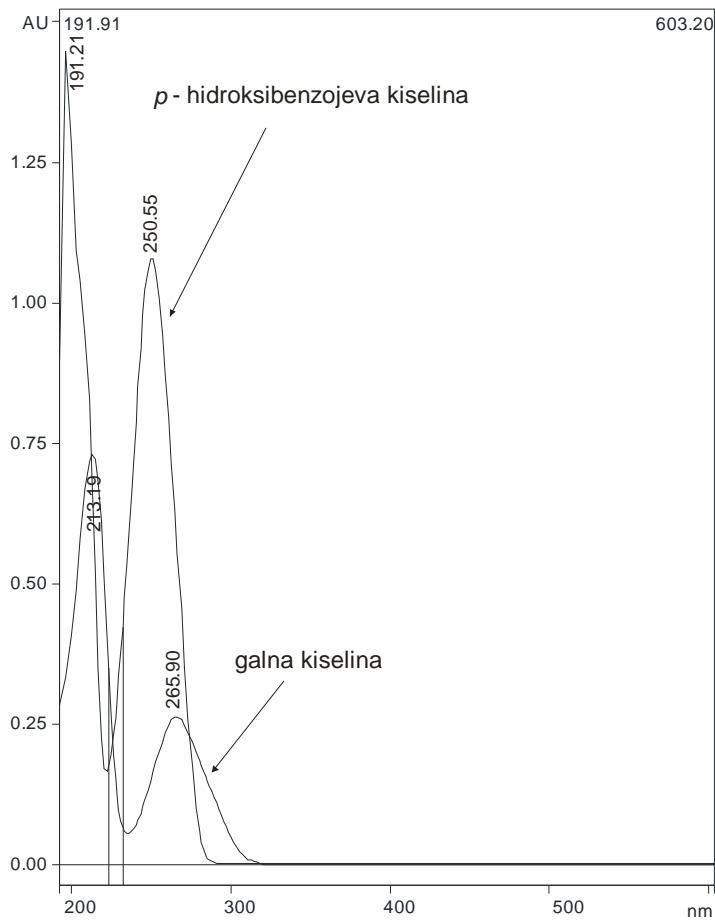
Prilog I-2. Kromatogrami standarda hidroksicimetnih kiselina snimljeni na 320 nm



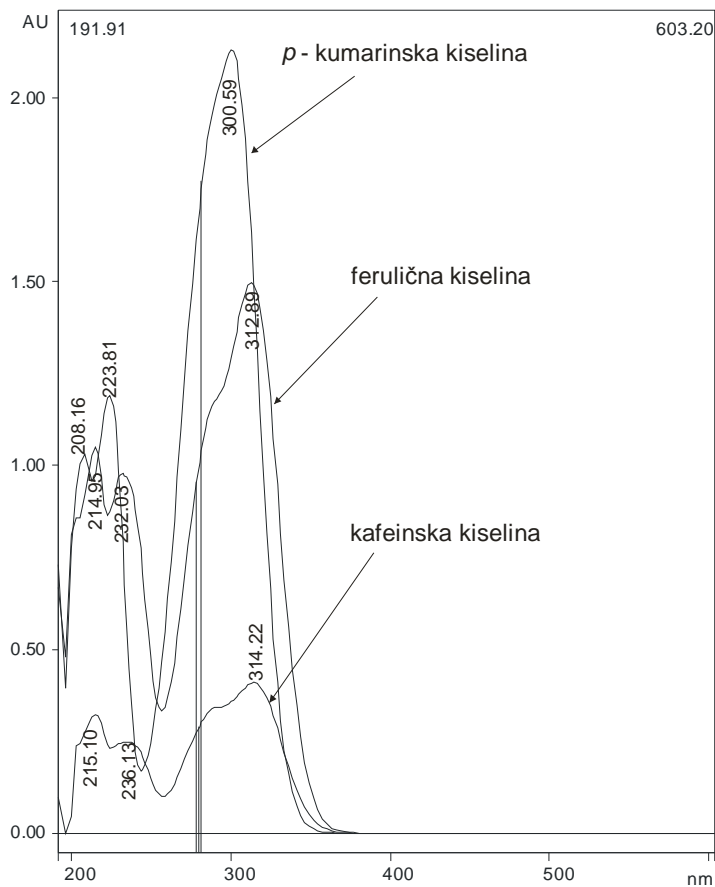
Prilog II-1a. Spektri flavanola



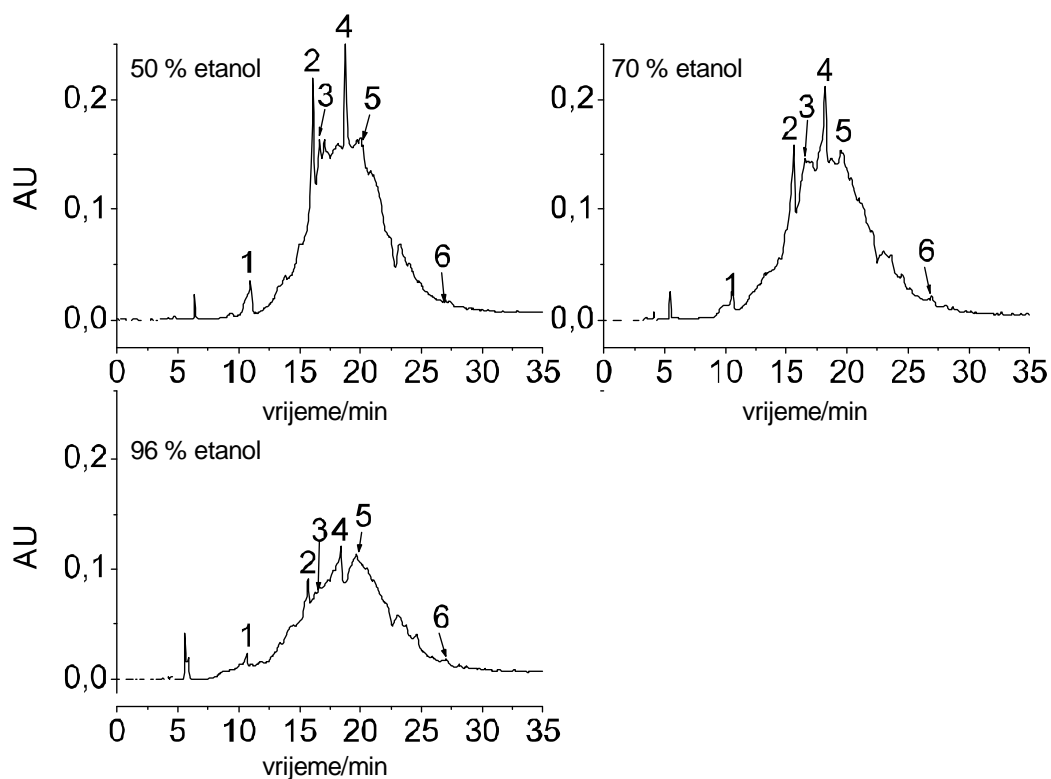
Prilog II-1b. Spektri flavanola



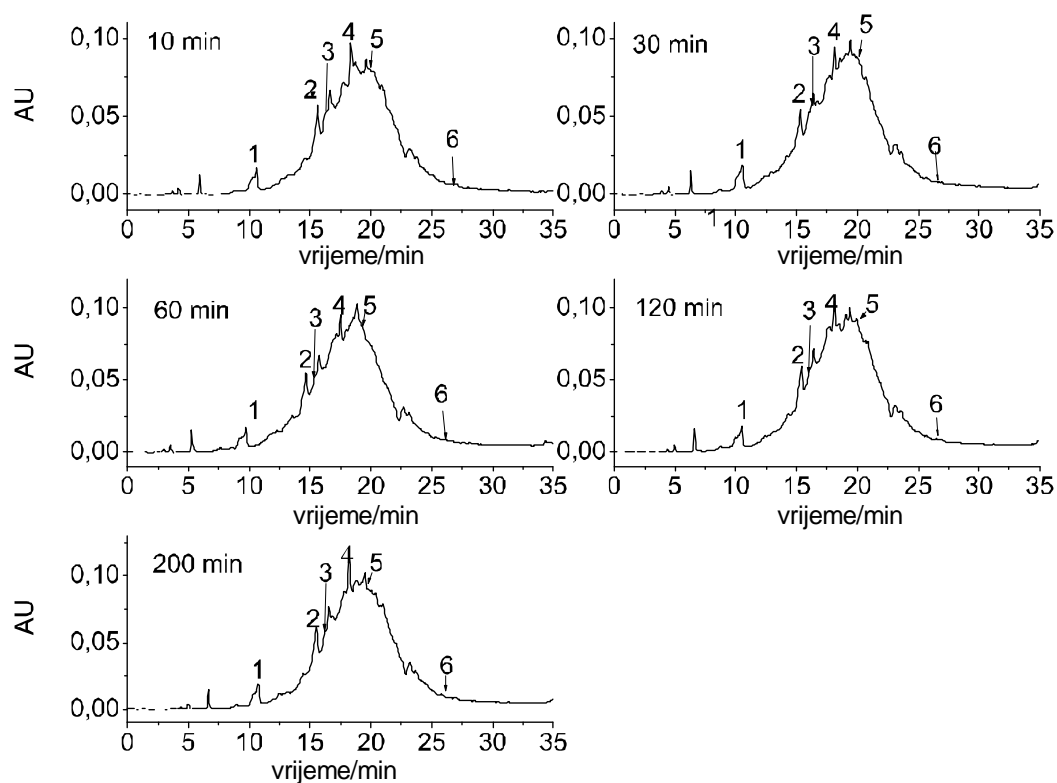
Prilog II- 2. Spektri hidroksibenzojevih kiselina



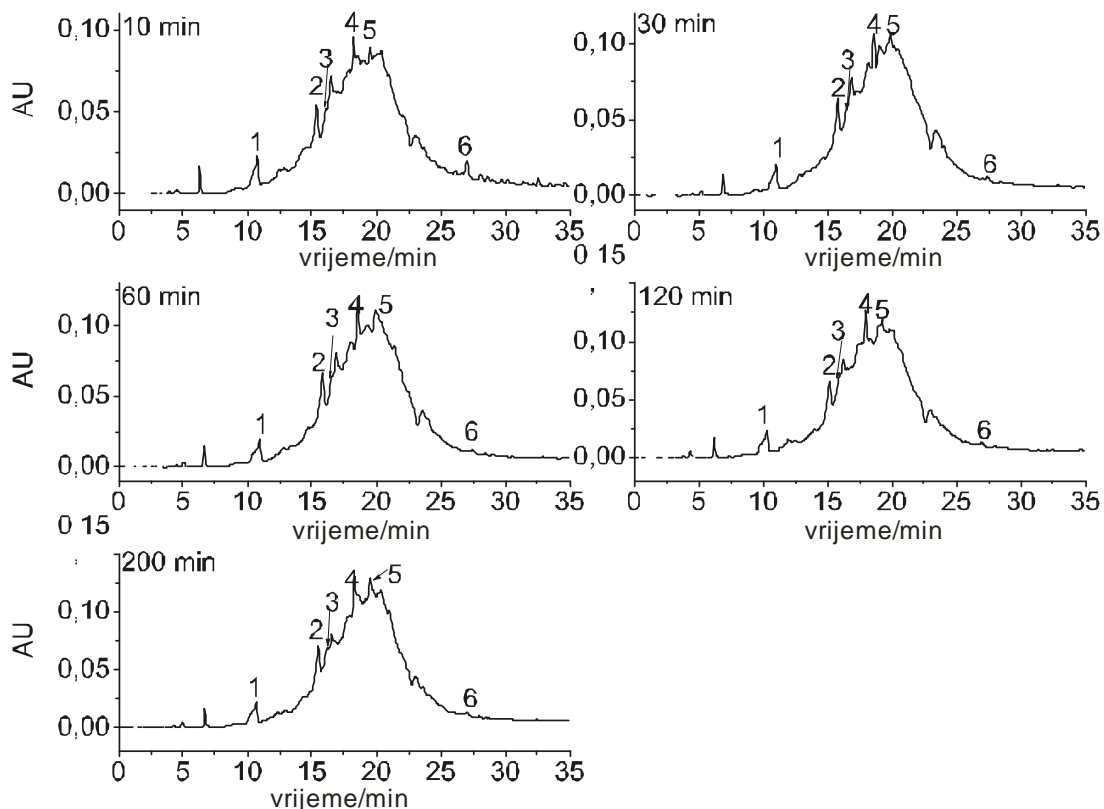
Prilog II-3. Spektri hidroksicimetnih kiselina



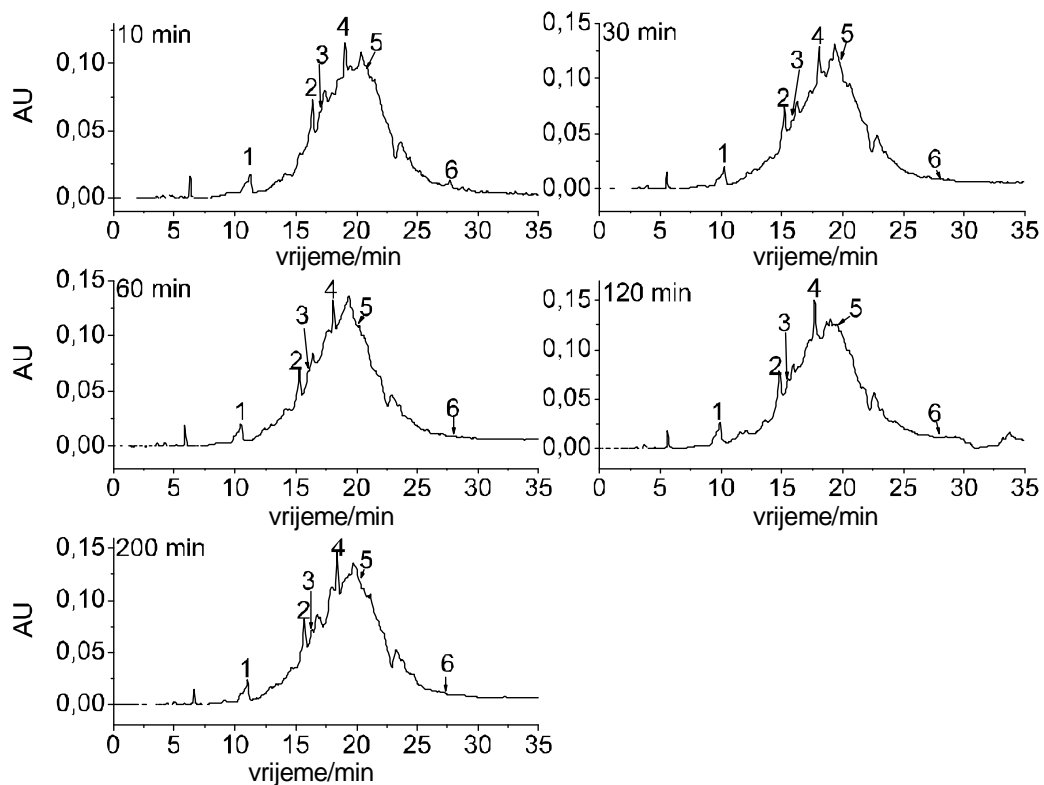
Prilog III. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobivenih pri 80°C pomoću različitih otapala nakon 200 minuta ekstrakcije (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



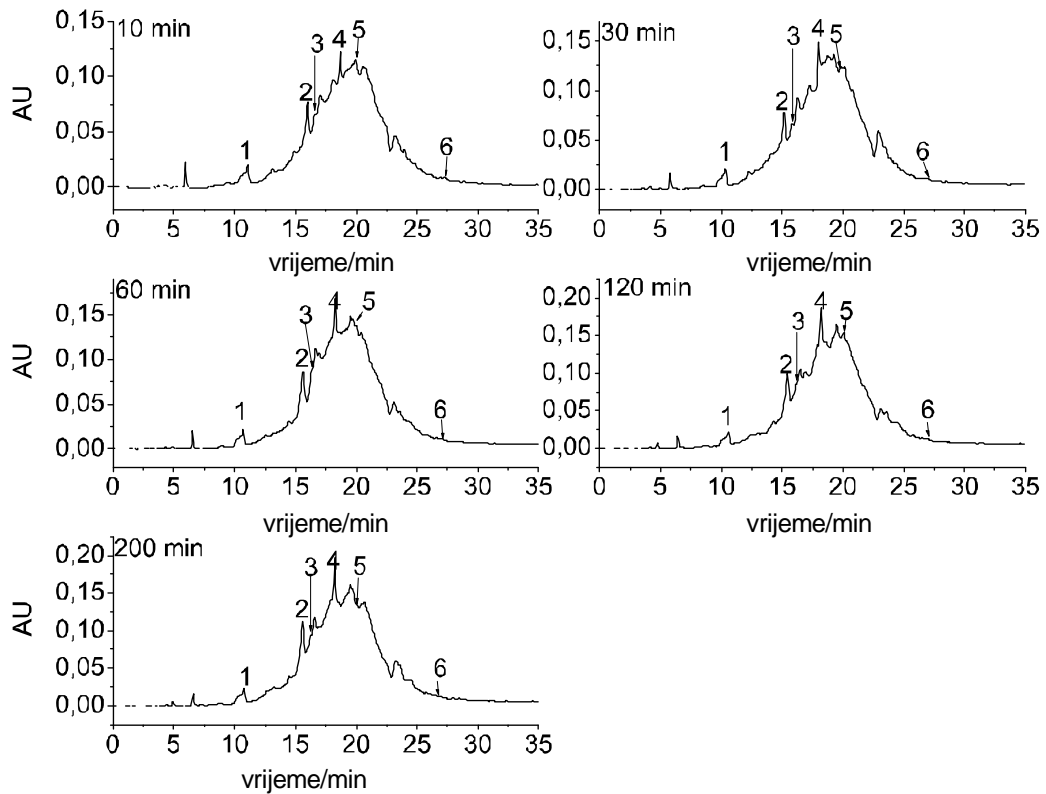
Prilog IV-1. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 25 °C pomoću 50%-tnog etanola u različito vrijeme ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



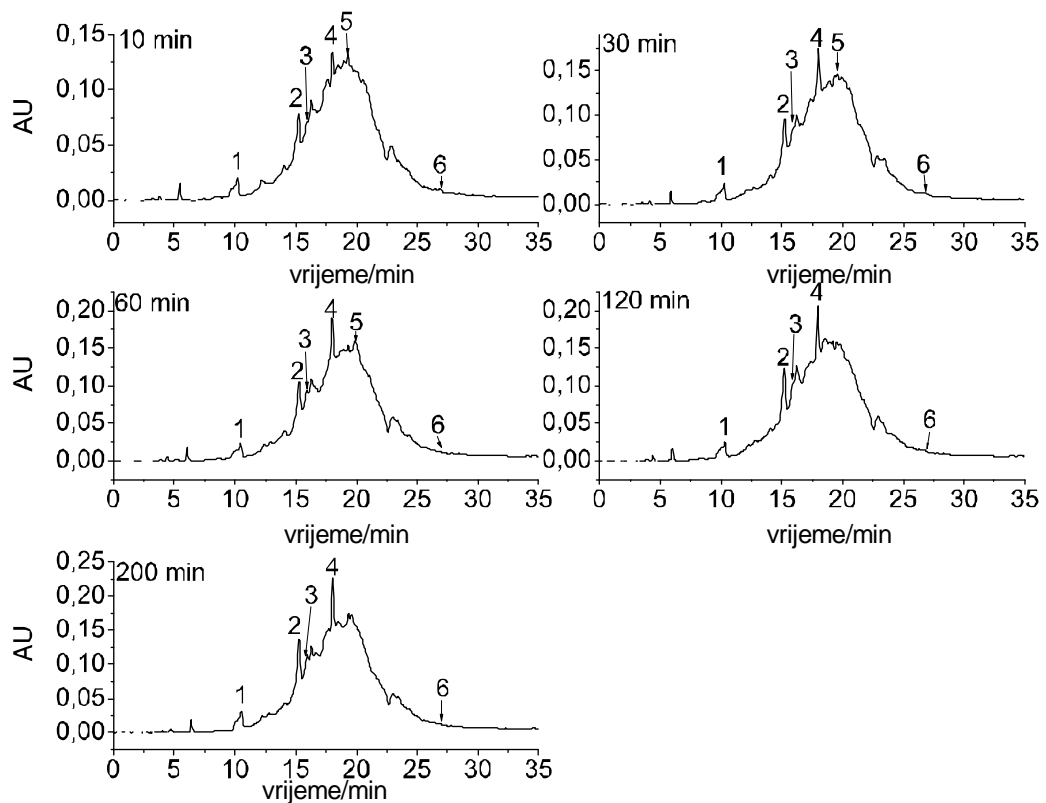
Prilog IV-2. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 40 °C pomoću 50%-tnog etanola u različitom vremenu ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



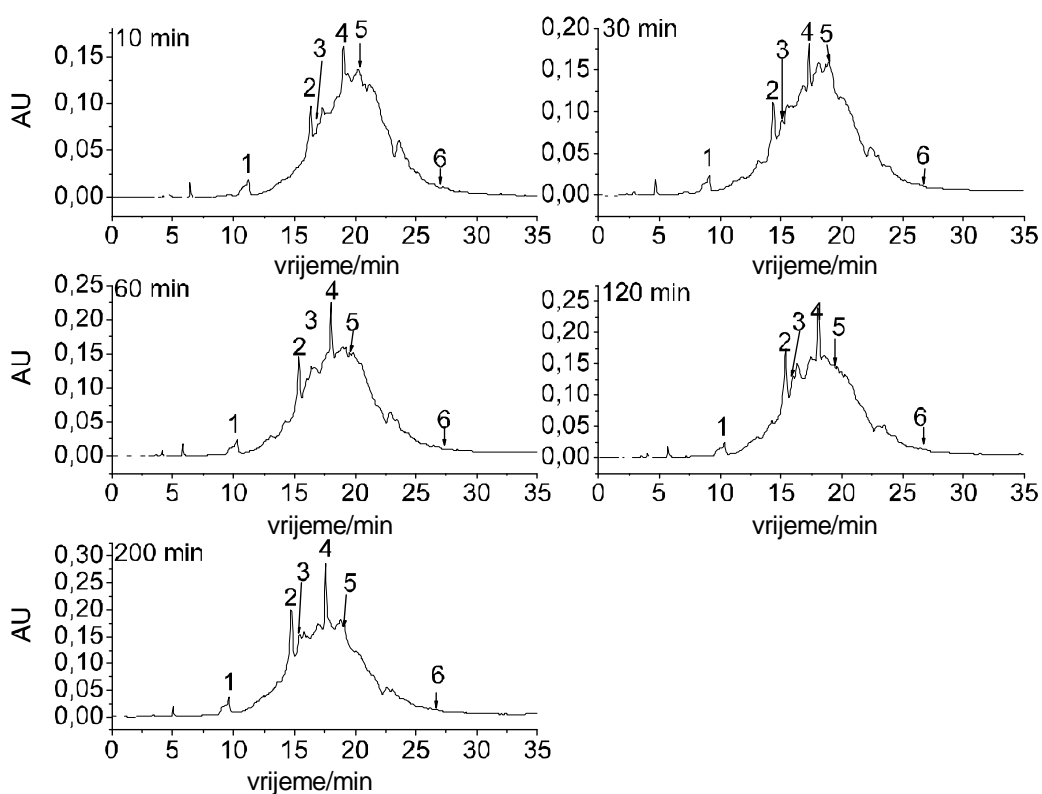
Prilog IV-3. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 50 °C pomoću 50%-tnog etanola u različitom vremenu ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



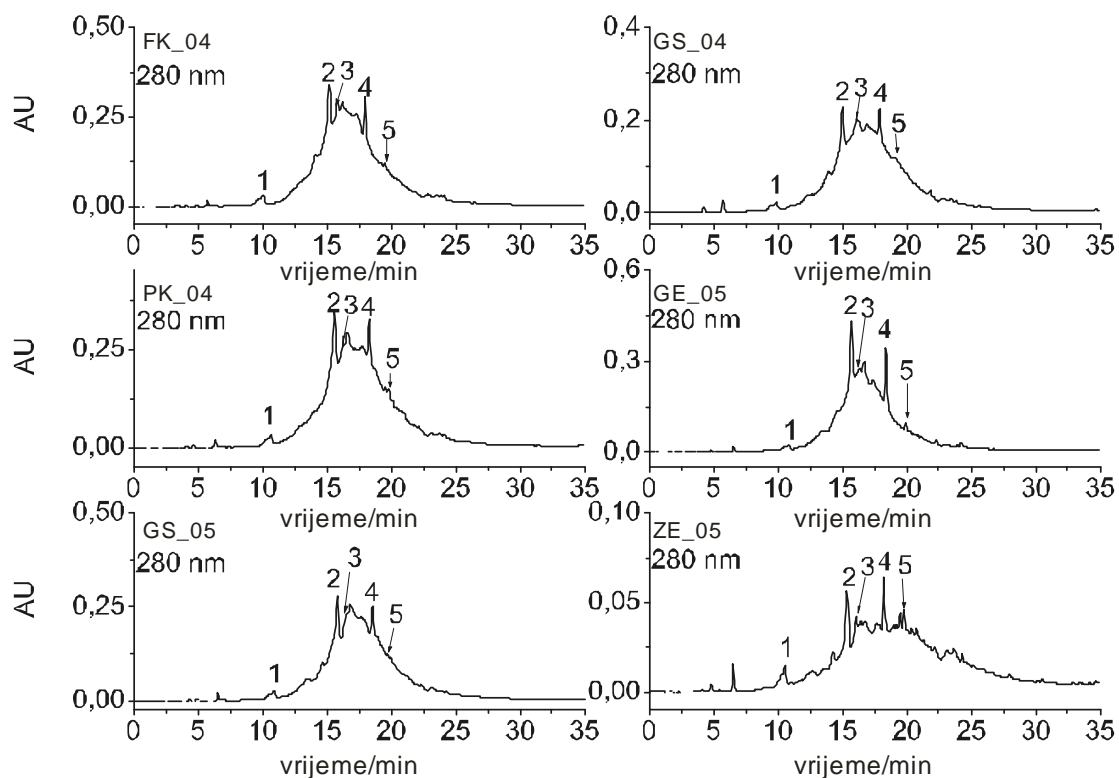
Prilog IV-4 Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 60 °C pomoću 50%-tnog etanola u različitom vremenu ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



Prilog IV-5. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 70 °C pomoću 50%-tnog etanola u različitom vremenu ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



Prilog IV-6. Kromatogrami ekstrakata sjemenki grožđa FS_05 dobiveni pri 80 °C pomoću 50%-tnog etanola u različito vrijeme ekstrakcije (10, 30, 60, 120, 200 minuta) (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat, 6 – (-)-galokatehin)



Prilog V. Kromatogrami ekstrakata različitih uzorka sjemenki grožđa dobiveni pri 80 °C pomoću 50%-tnog etanola tijekom 200 minuta ekstrakcije (1 - galna kiselina, 2 – (+)-katehin, 3 - procijanidin B₂, 4 – (-)-epikatehin, 5 – (-)-epikatehin galat)

ŽIVOTOPIS

Ana Bucić-Kojić, dipl. ing., rođena je 21.01.1977. godine u Virovitici. Nakon završene osnovne škole u Slatini te srednje medicinske škole u Bjelovaru, 1995. godine upisala je Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, smjer prehrambeno inženjerstvo. Za uspjeh tijekom studiranja nagrađena je sveučilišnim stipendijama 1997., 1998., 1999. te nagradom Lions Cluba 1998. godine. Diplomirala je s izvrsnim uspjehom 2001. godine, a od 2002. godine radi u svojstvu znanstvenog novaka - suradničko zvanje asistent na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, gdje je iste godine upisala i Poslijediplomski doktorski znanstveni studij *Prehrambeno inženjerstvo*.

Od početka rada na Fakultetu aktivno je sudjelovala/sudjeluje kao znanstveni novak/istraživač na projektima Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske: "Suvremene metode sušenja u prehrambeno-procesnom inženjerstvu" (2002.-2006.) i "Modeliranje i simuliranje procesa sušenja i ekstrakcije u proizvodnji hrane" (113-1130471-0338) (aktivan od 2007. godine), te na VIP-projektu "Sušenje slavonskih autohtonih i ekoloških proizvoda" (2004.-2006.) Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva na kojima je glavni istraživač prof.dr.sc. Srećko Tomas.

Tijekom dosadašnjeg rada u suradničkom zvanju asistenta aktivno je sudjelovala/sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija: *Tehnološke operacije, Kemijski i biokemijski reaktori, Ekološko inženjerstvo i Prijenos tvari i energije* na dodiplomskom/preddiplomskom studiju odnosno iz kolegija *Jedinične operacije u prehrambenom inženjerstvu* na diplomskom studiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, te iz kolegija *Osnove tehnoloških operacija u industriji* na stručnom studiju Elektrotehničkog fakulteta u Osijeku. U svojstvu predavača sudjelovala je u izvođenju nastave iz kolegija *Tehnološke operacije* na stručnom studiju Prehrambene tehnologije Veleučilišta u Požegi.

Sudjelovala je na pet domaćih i dvanaest međunarodnih znanstvenih skupova. Objavila (ili u postupku objave) je ukupno petanest znanstvenih radova, od toga dva iz skupine (a1) i jedan prihvaćen za objavljivanje, dva iz skupine (a2), sedam znanstvenih radova u zbornicima radova s međunarodnih znanstvenih skupova (a3), jedan (1) rad u zborniku radova s domaćeg znanstvenog skupa te 2 rada u neindeksiranom časopisu.

U sklopu Tempus programa 2005. godine boravila je na Fakultetu za kemiju i kemijsku tehnologiju u Mariboru (Slovenija), a 2007. u "Applied Biosystems" centru u Darmstadtu (Njemačka) s ciljem obuke za rad na LC/MS/MS-u.

Aktivno je sudjelovala u organizaciji 4. Međunarodnog kongresa Flour-Bread '07 (u organizaciji Prehrambeno-tehnološkog Fakulteta, Katedre za tehnologije prerade žitarica i ICC-a) kao član Tajništva.