

Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva

Kuzmanović, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:109:672254>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO–TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Melita Kuzmanović

**Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor*
na ekstrakciju fenolnih spojeva**

Diplomski rad

U Osijeku, srpanj, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za tehnološke operacije

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Jedinичne operacije u procesnom inženjerstvu

Tema rada: je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. 6. 2014.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva

Melita Kuzmanović, 199-DI

Sažetak:

U ovom radu ispitan je utjecaj biološke obrade (provedena u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima) tropa grožđa, pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*, na ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupni fenoli UFS, ukupni flavonoidi UF, prantocijanidini UPA, antocijanini AN) te na antioksidacijsku aktivnost (AA) ekstrakata tropa grožđa. U ekstraktima tropa grožđa određen je i udio proteina, glukoze te udio pojedinačnih šećera.

Istraživanje je provedeno u dva dijela koja se međusobno razlikuju prema načinu inokulacije *T. versicolor* na supstrat i dužini provođenja biološke obrade.

Nakon biološke obrade polovica mase biološki obrađenog tropa grožđa je odmah podvrgnuta ekstrakciji (uvjeti ekstrakcije: 50% otopina etanola/80 °C/120 min/200rpm), dok je druga polovica sušena (24 h/45 °C) te ekstrahirana pod istim uvjetima. Šećeri su određeni u vodenim ekstraktima tropa grožđa (uvjeti ekstrakcije: 27 °C/30 min/150 rpm)

Udio fenolnih tvari i glukoze kao i antioksidacijska aktivnost određena je spektrofotometrijskim metodama, dok su pojedinačni šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza) u ekstraktu određeni HPLC metodom.

U prvom dijelu istraživanja biološka obrada kod ekstrakata vlažnog tropa grožđa utjecala je na smanjenje udjela ekstrahiranih UFS do 68,2%, UPA do 93,1% i UF do 76,7% te na smanjenje AA ekstrakata do 79,1%, u odnosu na biološki neobrađeni trop grožđa (UFS - 28,5 mg_{GAE/g_{st}}, UPA - 16,8 mg/g_{st}, UF - 26,4 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}), dok je kod ekstrakata suhog tropa grožđa smanjenje udjela ekstrahiranih UFS do 80,3 %, UPA do 89,7 % i UF do 89,5 % te na smanjenje AA ekstrakata do 89,9%, u odnosu na biološki neobrađeni trop grožđa (UFS - 41,2 mg_{GAE/g_{st}}, UPA - 10,0 mg/g_{st}, UF - 30,0 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}). U drugom dijelu istraživanja dobiveno je smanjenje ekstrahiranih UPA do 46,4% i UF do 40,0% te na smanjenje AA ekstrakata do 38,6%, u odnosu na biološki neobrađeni trop grožđa (UPA - 12,7 mg/g_{st}, UF - 30,4 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}) u ekstraktima vlažnog tropa grožđa, a u suhom je dobiveno smanjenje ekstrahiranih UFS do 35,9%, UPA do 31,0% i UF do 43,4% te na smanjenje AA ekstrakata do 29,1%, u odnosu na biološki neobrađeni trop grožđa (UFS - 50,9 mg_{GAE/g_{st}}, UPA - 10,1 mg/g_{st}, UF - 31,5 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}).

Ključne riječi: trop grožđa, fenolni spojevi, biološka obrada, *Trametes versicolor*, ekstrakcija

Rad sadrži: 80 stranica
40 slika
7 tablica
41 referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| 1. doc. dr. sc. Marina Tišma | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić | član - mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Lidija Jakobek | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić | zamjenik člana |

Datum obrane: 18.srpnja 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Process engineering

Subdepartment of Unit operations

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Unit Operations in Process Engineering

Thesis subject: was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IX held on June 18, 2014.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, associate professor

Influence of biological pretreatment of grape pomace with *Trametes versicolor* on phenolic compounds extraction

Melita Kuzmanović, 199-DI

Summary:

The aim of this work was to investigate the influence of biological pretreatment (conditions of solid-state fermentation) of grape pomace with white-rot fungi *Trametes versicolor* on the extractability of phenolic compounds (total phenols TPC, total flavonoids TF, proanthocyanidins TP, anthocyanins AN). Antioxidant activity (AA) is also monitored during the process of fermentation. In grape pomace extracts proportion of proteins, glucose and share of individual sugars are determined too.

There is two segments of research differ one from the other in way of the inoculation on substratum and in duration of the fermentation process.

After biological pretreatment half of grape pomace is separated for extraction (extraction conditions: 50% ethanol/80°C/120 min/200rpm), while other half is placed on drying (24h/45°C) and then is subjected to extraction under same conditions. Sugars are determined from water extracts (extraction conditions: 27°C/30 min/150rpm).

Proportion of phenolic compounds, glucose and the antioxidant activity is determined by spectrophotometric methods, while individual sugars (glucose, fructose and saccharose) are set by HPLC method.

In first part of research biological pretreatment with *T. versicolor* have an impact on reduction of TPC up to 68,2%, TP up to 93,1% , TF up to 76,7% and AA of extracts were reduced up to 79,1%, compared with rough grape pomace samples (TPC - 28,5 mg_{GAE/g_{st}}, TP - 16,8 mg/g_{st}, TF - 26,4 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}), while reducing in dried samples were up to 80,3% for TPC, up to 89,7% for TP, up to 89,5% for UF, AA of extracts were reduced up to 89,9%, compared with initial samples (TPC - 41,2 mg_{GAE/g_{st}}, TP - 10,0 mg/g_{st}, TF - 30,0 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}). Decrease of phenolic compounds were also observed in second part of research, up to 46,4% for TP, up to 40,0% for TF and AA of extracts were diminished up to 38,6% in wet grape pomace extracts, compared with initial samples (TP - 12,7 mg/g_{st}, TF - 30,4 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}), while decreasing in dried samples were up to 35,9% for TPC, up to 31,0% for UP, up to 43,4% for TF and AA of extracts were reduced up to 29,1%, compared with initial samples of grape pomace (TFC - 50,9mg_{GAE/g_{st}}, TP - 10,1 mg/g_{st}, TF - 31,5 mg_{CE/g_{st}}, AA - 0,2 g_{inhDPPH/g_{st}}).

Key words: grape pomace, phenolic compound, biological pretreatment, *Trametes versicolor*, extraction

Thesis contains: 80 pages
40 figures
7 tables
41 references

- | | |
|--|--------------|
| 1. Marina Tišma, PhD, assistant professor | chair person |
| 2. Ana Bucić-Kojić, PhD, associate professor | supervisor |
| 3. Lidija Jakobek, PhD, associate professor | member |
| 4. Mirela Planinić, PhD, associate professor | stand-in |

Original in: in Croatian

Defense date: July 18, 2014.

Thesis is printed and electronic (pdf format) version is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. *Ani Bucić-Kojić* na nesebičnoj pomoći i posvećenom vremenu prilikom izrade ovoga rada. Neizmjerno hvala na razumijevanju i strpljivosti.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. *Marini Tišmi* na brojnim savjetima i stručnoj pomoći. Veliko hvala za sve odvojeno vrijeme i razumijevanje.

izv. prof. dr.sc. *Mireli Planinić* zahvaljujem na pruženoj pomoći i ukazanoj brizi.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju koje su mi pružali tijekom cijelog studija.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. TROP GROŽĐA	4
2.2. KEMIJSKI SASTAV POJEDINIH DIJELOVA GROŽĐA	4
2.3. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA	7
2.3.1. <i>Gljiva Trametes versicolor</i>	8
2.4. FENOLNI SPOJEVI	9
2.4.1. <i>Flavonoidi</i>	10
2.5. POZITIVNA ULOGA FENOLNIH TVARI	14
2.6. EKSTRAKCIJA	16
2.6.1. <i>Ekstrakcija kruto – tekuće</i>	16
2.7. METODE ODREĐIVANJA POJEDINIH TVARI U TROPU GROŽĐA	17
2.7.1. <i>Spektrofotometrijske metode</i>	17
2.7.2. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti</i>	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. ZADATAK	21
3.2. MATERIJALI I METODE	21
3.2.1. <i>Materijali</i>	21
3.2.2. <i>Određivanje suhe tvari</i>	21
3.2.3. <i>Biološka obrada tropa grožđa pomoću Trametes versicolor</i>	22
3.2.4. <i>Kruto-tekuća ekstrakcija fenolnih tvari iz tropa grožđa</i>	23
3.2.5. <i>Priprema ekstrakta za analizu</i>	24
3.2.6. <i>Određivanje ukupnih fenolnih Folin –Ciocalteovom metodom</i>	24
3.2.7. <i>Određivanje ukupnih fenolnih tvari Prussian Blue metodom</i>	25
3.2.8. <i>Određivanje flavonoida</i>	26
3.2.9. <i>Određivanje proteina Bradfordičinom metodom</i>	27
3.2.10. <i>Mjerenje koncentracije glukoze</i>	29
3.2.11. <i>Određivanje antocijanina pH diferencijalnom metodom</i>	30
3.2.12. <i>Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina</i>	31
3.2.13. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata</i>	33
3.2.14. <i>Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera</i>	34
4. REZULTATI	36
4.1. ODREĐIVANJE SUHE TVARI	37
4.2. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI FOLIN-CIOCALTEOVOM METODOM	38

4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI PRUSSIAN BLUE METODOM	39
4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA.....	40
4.5. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA.....	41
4.6. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE	42
4.7. KALIBRACIJSKE KRIVULJE ZA ODREĐIVANJE POJEDINIH ŠEĆERA HPLC METODOM.....	43
4.8. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA ANALIZIRANIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA	46
4.9. IZRAČUNAVANJE KONVERZIJE ANALIZIRANIH TVARI	46
4.10. EKSPERIMENT 1 (E1)	47
4.10.1. <i>Udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa.....</i>	<i>47</i>
4.10.2. <i>Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>49</i>
4.10.3. <i>Udio ukupnih proteina u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>50</i>
4.10.4. <i>Udio ukupnih antocijanina u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>51</i>
4.10.5. <i>Udio ukupnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa.....</i>	<i>52</i>
4.10.6. <i>Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa.....</i>	<i>53</i>
4.10.7. <i>Udio glukoze u ekstraktima tropa grožđa.....</i>	<i>54</i>
4.11. EKSPERIMENT 2 (E2)	55
4.11.1. <i>Udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa.....</i>	<i>55</i>
4.11.2. <i>Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>57</i>
4.11.3. <i>Udio ukupnih proteina u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>58</i>
4.11.4. <i>Udio ukupnih antocijanina u ekstraktima tropa grožđa</i>	<i>59</i>
4.11.5. <i>Udio ukupnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa.....</i>	<i>60</i>
4.11.6. <i>Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa.....</i>	<i>61</i>
4.11.7. <i>Određivanje pojedinačnih šećera HPLC metodom</i>	<i>62</i>
5. RASPRAVA.....	67
6. ZAKLJUČCI	73
7. LITERATURA	76

POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

OZNAKE:

A – apsorbancija

c – masena koncentracije analizirane tvari u ekstraktu [mg/mL]

c' – množinska koncentracija tvari [mol/ m³]

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu [mg/g_{s.t.}]

C' – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu biološki obrađenog tropa grožđa [mg/g_{s.t.}]

C'_0 – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu biološki neobrađenog tropa grožđa [mg/g_{s.t.}]

DF – faktor razrjeđenja

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

l – duljina kivete; 1 cm

M – molekularna masa

t – vrijeme fermentacije [dani]

V_e – volumen ukupno dobivenog ekstrakta [mL]

X – konverzija analizirane tvari [%]

R – koeficijent korelacije

KRATICE:

AA – antioksidacijska aktivnost

AN – antocijanini

BSA – goveđi serum albumin

CE – ekvivalenti (+)-katehina

DPPH 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

E1 – eksperiment 1

E2 – eksperiment 2

FC – Folin – Ciocalteu metoda/reagens

fru – fruktoza

GAE – ekvivalenti galne kiseline

glc – glukoza

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High-Performance Liquid Chromatography)

P – protein

PB – Prussian Blue metoda

s.t. – suha tvar

sah –saharoza

UF - ukupni flavonoidi

UFS – ukupni fenolni spojevi

UPA – ukupni proantocijanidini

SIMBOLI:

λ – valna duljina

ε - koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [m³/(mol·m)]

1. UVOD

Tijekom procesa prerade poljoprivredno-prehrambenog materijala do gotovih proizvoda zaostaju značajne količine nusproizvoda koji se tretiraju kao otpad iako imaju potencijal za daljnju obradu i iskorištavanje u cilju dobivanja visokovrijednih produkata. Trop grožđa, koji zaostaje nakon proizvodnje vina u većini slučajeva se bez dodatne obrade odlaže na deponije, koristi kao gnojivo u vinogradima i poljima ili se u krajnjem slučaju spaljuje. Takav način „zbrinjavanja“ je ekološki i ekonomski neprihvatljiv prema direktivama EU. Osim kao otpad, trop grožđa može se razmatrati i kao visokovrijedna sirovina budući da, između ostalog, predstavlja bogat izvor biološki aktivnih fenolnih spojeva kojima se pripisuju brojni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje i stabilnost hrane zbog izraženog antioksidacijskog djelovanja.

S ciljem da se aktivni fenolni spojevi sadržani u biljnom materijalu maksimalno iskoriste, nužno ih je pravilno izolirati. Fenolne tvari iz tropa grožđa moguće je izolirati postupkom ekstrakcije. Budući da su fenolne tvari strukturno raznolike ne postoji jedinstvena metoda ekstrakcije kojom bi se te tvari izdvojile iz biljnog materijala.

Ekstrakcija otapalom ili kruto-tekuća ekstrakcija najčešće je korištena operacija za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala čija ekstraktibilnost ovisi o nizu faktora: 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.

Od ukupnih fenolnih spojeva u tropu grožđa, samo 2% su „lako“ ekstraktibilni spojevi koji se mogu direktno ekstrahirati iz sirovine. Međutim, 98% fenolnih spojeva u tropu grožđa predstavljaju „teško“ ekstraktibilne spojeve budući da su vezani u kompleksnim strukturama s vlaknima koja su po kemijskom sastavu uglavnom lignin, hemiceluloza, celuloza i pektin, tj. tvari koje predstavljaju zapreku efikasnoj ekstrakciji prisutnih fenolnih tvari. Da bi se mogli iskoristiti i pozitivni učinci ovih teško topljivih složenih fenola potrebno je provesti njihovu hidrolizu, a to se najčešće provodi kiselinama i komercijalnim enzimima. Upotreba kiselina je ekološki neprihvatljiva metoda, dok je primjena komercijalnih enzimskih preparata skup proces, te se biološka obrada materijala nameće kao bolji izbor.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade tropa groždana ekstrakciju fenolnih spojeva, te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata tropa grožđa. Biološka obrada provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation - SSF) pomoću

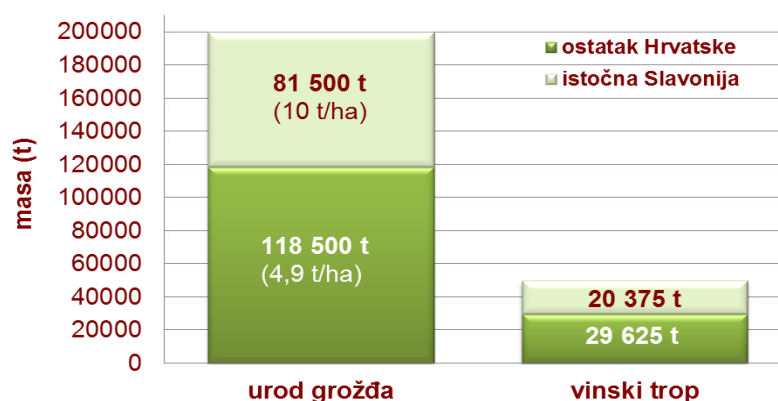
gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* koja luči izvanstanične enzime koji razgrađuju lignocelulozni materijal.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TROP GROŽĐA

Vinova loza (*Vitis Vinifera*) je jedna od najčešće uzgajanih kultura u svijetu s prosječnom godišnjom proizvodnjom grožđa od 65,5 miliona tona. Dok se oko 80% godišnje proizvodnje grožđa prerađuje u vino, 20-30% prerađenog grožđa zaostaje kao kruti otpad - trop grožđa koji se sastoji od kožica, sjemenki i peteljki (Bucić-Kojić, 2008).

Vinogradske površine u Republici Hrvatskoj zauzimaju ukupno 32 000 ha. Godišnji urod s tih površina godišnje iznosi oko 200 000 tona, od kojih 50 000 tona zaostaje kao trop grožđa. (Slika 1).



Slika 1 Godišnji urod grožđa i količina nastalog vinskog tropa u Republici Hrvatskoj

2.2. KEMIJSKI SASTAV POJEDINIH DIJELOVA GROŽĐA

Peteljka

Peteljka predstavlja skelet grozda. Sastoji se od osnovnog dijela koji se više ili manje grana. Završava sa peteljčicama koje nose cvijet, a nakon oplodnje i bobicu. Peteljka je bogata polifenolima, naročito kod crnih sorata. Ako se tijekom prerade peteljka ne odvaja, ukupna količina polifenola u vinu, osobito tanina, može biti povećana i do 25%. Najzastupljeniji polifenol je leukocijanidol. Fenolni spojevi sadržani u peteljci prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Sadržaj fenolnih spojeva u peteljci (Ribéreau – Gayon i sur, 1976)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni polifenoli	20
Tanini	15
Procijanidini	26
Katehini	15
Galna kiselina	16

Sjemenke

Najveći dio sastojaka u sjemenci su rezervni sastojci potrebni za ishranu klice, a značajni su i za tehnologiju vina. Sjemenka se sastoji od masne jezgre, koju okružuje drvena ljuska prekrivena taninskom kutikulom. Prešani trop grožđa sadrži 20 do 30% sjemenki.

Sjemenke grožđa sadrže oko 40% vlakana, 16% ulja, 11% proteina i 7% polifenolnih spojeva, nešto šećera i mineralnih tvari. Ulje sadrži 65 – 70% linoleinske kiseline i 0,1% tokoferola. Kemijski sastav sjemenki prikazan je u **Tablici 2**, dok je u **Tablici 3** sadržaj fenolnih spojeva.

Najviše tanina, od svih čvrstih dijelova grozda, nalazi se u sjemenkama. Sazrijevanjem grožđa sadržaj taninskih spojeva opada. Smješteni su u vanjskom dijelu sjemenke (taninska kutikula) i lako prelaze u vino tijekom maceracije.

Tablica 2 Kemijski sastav sjemenke grožđa (Ribéreau – Gayon i sur, 1976)

Sastojak	U 100 g
Voda	25 - 45
Ugljikohidrati	31 – 36
Ulja	13 – 20
Tanini	4 – 6
Dušični spojevi	4 – 6,5
Minerali	2 – 4
Masne kiseline	1

Tablica 3 Sadržaj fenola u sjemenci (Ribéreau – Gayon i sur., 1976)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni fenoli	22 – 56
Procijanidini	28 – 56
Katehini	67 – 86
Galna i kava kiselina	-

Kožice

Kožica predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji od 6 – 10 slojeva stanica. Na vanjskom su dijelu stanice manje, a prema unutrašnjosti veće dok su im pregrade vrlo tanke. Zahvaljujući elastičnosti staničnih stjenki u toku porasta i sazrijevanja bobice kožica povećava svoj volumen.

Po kemijskom sastavu kožica (**Tablica 4**) je siromašna šećerima (0,7 – 3,0 g/1000 bobica) a bogata je celulozom (1/4 do 1/5 suhe težine) i netopljivim pektinima i proteinima (10 – 15%). U zelenoj kožici ima puno jabučne kiseline, koja se u periodu dozrijevanja smanjuje i onda ostaje dosta ujednačena. Kožica je bogata fenolima (**Tablica 5**) (kod crnih sorata duplo više), ali još uvijek količina je znatno manja nego u peteljci. Sadrži i taninske spojeve, čiju količinu u velikoj mjeri može smanjiti pojava plijesni na grožđu.

Tablica4 Kemijski sastav kože (Radovanović, 1986)

Sastojak	%
Voda	58 - 82
Pentoza i pentozni	1 – 1,2
Celuloza	3,5
Pektin, smole i sluzi	0,9
Kiseline	0,13 – 0,67
Tanini	0,01 – 15,4
Dušični spojevi	0,8 – 1,9
Masti	1,5
Minerali	2,0 – 3,7

Tablica5 Sadržaj polifenola u kožici

Sastojak	% u grozdu
Ukupni polifenoli	12 – 61
Procijanidini	17 – 47
Taninski spojevi	14 – 50
Antocijani	100

2.3. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Gljive truljenja su jedini poznati organizmi koji razgrađuju drvo, a u prirodi nastanjuju na mrtvom ili živom drvetu te se mogu podijeliti u tri grupe (Bruce i Palfreyman, 1998):

- gljive bijelog truljenja
- gljive smeđeg truljenja
- gljive blagog truljenja.

Gljive bijelog truljenja uključuju razrede Basidiomycota i Ascomycota i imaju sposobnost razgraditi lignin i lignocelulozne supstrate. Razgrađuju prirodni polimer lignin u molekule manje molekularne mase na način da luče ekstracelularno smjesu lignolitičkih enzima. Lignin, koji ove gljive razgrađuju, ne mogu iskoristiti kao izvor ugljika za rast i razvoj. Stoga, svojim izvanstaničnim enzimima razgrađuju lignin u lignoceluloznom materijalu i dolaze do celuloze koju koriste kao drugi izvor ugljika (Gadd, 2001). Gljive bijelog truljenja veoma su pogodne za bioremedijacijske procese budući da im njihovi izvanstanični enzimi omogućuju podnošenje nepovoljnih i toksičnih uvjeta kao što su širi rasponi temperatura ili povišena pH vrijednost (Altman, 1998).

Kod ovih gljiva za razgradnju je važna kombinacija izvanstaničnih lignolitičkih enzima lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze. Prema ustrojstvu i proizvodnji lignolitičkih enzima, gljive bijelog truljenja mogu se podijeliti u tri skupine (Lankinen, 2004):

- gljive koje proizvode LiP, MnP i lakazu
- gljive koje proizvode MnP i lakazu
- gljive koje proizvode LiP i lakazu.

2.3.1. Gljiva *Trametes versicolor*

Trametes versicolor ili šarena tvrdokoška je gljiva bijelog truljenja razreda Basidiomycota koja raste u nakupinama ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog i raspadajućeg, a ponekad i na ranama živog drveća (**Slika 2**). Uzrokuje delignifikaciju drveta te je široko rasprostranjena u prirodi. Također je poznata i pod imenima *Coriolus versicolor* i *Polyporus versicolor*.

Trametes versicolor proizvodi tri lignolitička enzima, lakazu (Lac), mangan peroksidazu (MnP) i lignin peroksidazu (LiP), koje uspješno razgrađuju lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, mješavine različitih polikloriranih bifenila i brojne sintetičke boje. Proizvodnja lakaze gljive bijelog truljenja može se stimulirati nedostatkom hranjivih tvari ili prisutnošću neke fenolne komponentne u hranjivom mediju. Dodatkom različitih induktora može doći do povećane proizvodnje lignolitičkih enzima, a ti induktori mogu biti bakar, veratilni alkohol te različite smjese fenolnih spojeva (Xavier i sur., 2007).



Slika 2 Gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* (Kuo, 2005)

Najveću primjenu *Trametes versicolor* ima u industriji pulpe i papira gdje uspješno obavlja delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe, te obezbojava izlazne tokove nastale izbjeljivanjem pulpe. Gljive mogu razgraditi gotovo sve prirodne materijale, a *Trametes versicolor* razgrađuje ili akumulira neke od današnjih najgorih onečišćivača okoliša poput antracena, dioksina, organofosfata, pentaklorofenola (PKF) i trinitrotoluena (TNT), a koristi se i u bioremedijaciji onečišćenja tekstilnim bojama (Webster i Weber, 2007; Thalaro i Thalaro, 1996). Primjenom gljive bijelog truljenja u industriji, izbjegava se upotreba jakih organskih ili anorganskih kiselina te drugih kemikalija koje onečišćuju okoliš (Young i Masood, 1998).

2.4. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima. Nastaju tijekom razvoja biljke ili kao odgovor na stres (infekcije, oštećenja, UV zračenja). Količina fenolnih spojeva koja će nastati u biljnom tkivu ovisi o vrsti, sorti, uvjetima i tehnikama uzgoja, samom procesu dozrijevanja te u konačnici o uvjetima procesiranja i skladištenja (Naczki i Shahidi, 2006). Fenoli u prirodi predstavljaju najbrojniju skupinu spojeva, a zasad ih je poznato oko 8000. Međusobno se razlikuju po strukturi, aromatski prsten čini njihovu osnovnu strukturu, a na njega može biti vezana jedan ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998). U biljnom tkivu se obično pojavljuju vezani na druge molekule, najčešće glikozidnim

skupinama, ali i sa sulfatnim ili acetilnim skupinama (Harborne, 1980). Većina spojeva nastaje biosintetskim putem iz aminokiselina fenilalanina i tirozina uvođenjem jedne ili više hidroksilnih skupina u fenilni prsten te na taj način nastaje čitav niz fenolnih spojeva: cimetne kiseline, benzojeve, flavonoidi, proantocijanidi, kumarini, stilbeni, lignani i lignini (Seabra i sur., 2006).

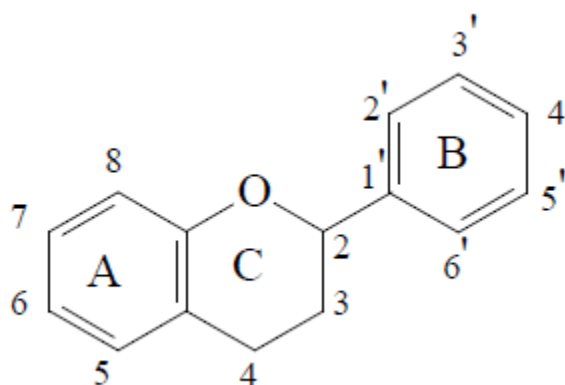
Od fenolnih spojeva u grožđu su najzastupljeniji flavonoidi i fenolne kiseline (Shi i sur., 2003). Fenolnim tvarima pripisuje se višestruko pozitivno djelovanje. U samim biljkama djeluju antioksidativno, antimikrobno, kao tvari za privlačenje pozornosti te zaštitne tvari od UV zračenja.

2.4.1. Flavonoidi

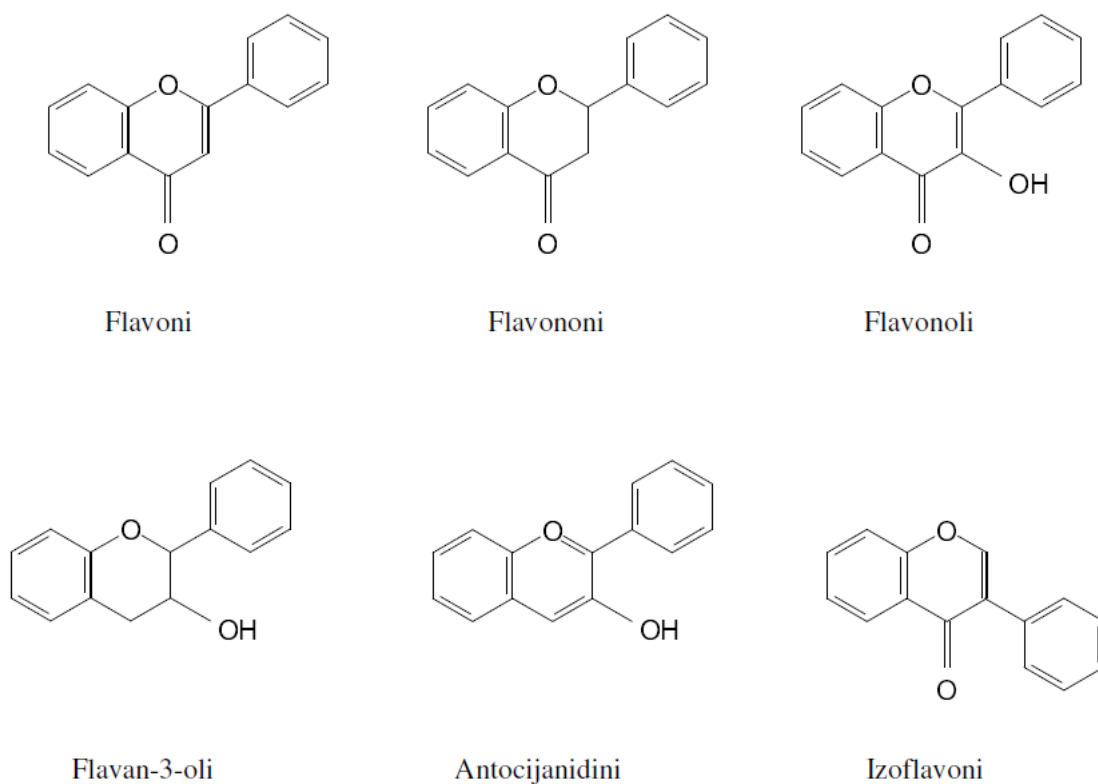
Flavonoidi su ime dobili prema latinskoj riječi flavus (žuta) iako su poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (antocijani) u biljnom tkivu (Winkel-Shirley, 2001). Predstavljaju najbrojniju skupinu fenolnih spojeva koju nalazimo u različitim biljnim vrstama, te ih je identificirano više od 6400 (Kazazić, 2004).

Flavonoidi su fenolni spojevi sastavljeni od 15 atoma ugljika sa dva aromatska prstena (A i B) međusobno povezana trećim (C) koji sadrži kisik (*Slika 3*). Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C6-C3-C6) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg potom nastaje određen broj osnovnih struktura. S obzirom na stupanj oksidacije heterocikličkog prstena flavonoidi se mogu podijeliti u 14 grupa, od toga 6 grupa predstavljaju flavonoide prisutne u hrani: 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 4*).

Flavonoidi prisutni u biljkama razlikuju se po položaju hidroksilnih i glikozidnih skupina te po konjugaciji između prstena A i B. U biljnom materijalu/hrani uglavnom se nalaze u obliku 3-O-glikozida ili polimera (tanina). Šećer koji se najčešće veže je glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Flavanoni i flavoni često se nalaze zajedno za razliku od flavona i flavonola koji se međusobno isključuju u mnogim biljkama. Antocijani su pak gotovo odsutni u biljkama bogatim flavanonima (Kazazić, 2004).



Slika 3 Osnovna monomerna struktura flavonoida (Bucić –Kojić, 2008)



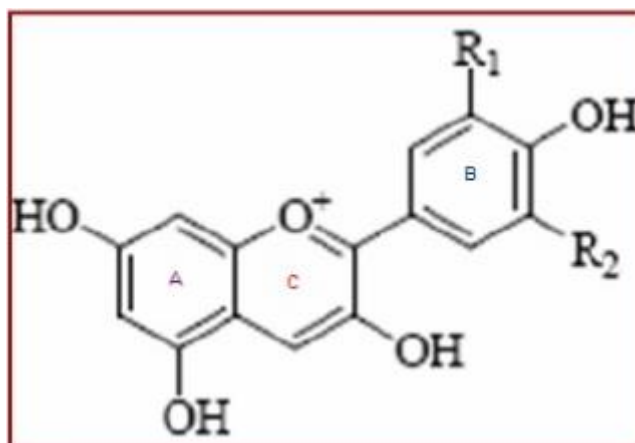
Slika 4 Osnovne grupe flavonoida najčešće prisutnih u hrani (Bucić –Kojić, 2008)

Antocijanini

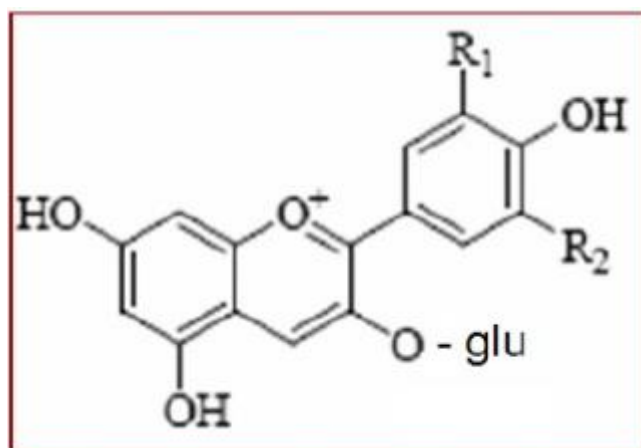
Antocijanini njihovi konjugirani derivati antocijanidini su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, u voćnom tkivu i cvijeću gdje su odgovorni za plavu, crvenu i ljubičastu boju. Važna su grupa pigmenata u biljkama, jer se otapaju u vodi. Ova grupa spojeva obuhvaća preko 500 različitih spojeva. Pripadaju grupi flavonoida koja je podgrupa još veće grupe spojeva pod nazivom fenoli.

Antocijanini postoje kao glikozidi polihidroksi i/ili polimetoksi derivati flavilium kationa (*Slika 5*). Glavne razlike između njih su broj hidroksilnih grupa koje sadrže, priroda i broj šećera u njihovoj strukturi, alifatične ili aromatične kiseline vezane za šećer u molekulu (*Slika 6*), i položaj ovih vezivanja (Ovando i sur., 2009). Od kiselina su najzastupljenije kafeinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzojeva, ferulna, sukcininska, octena. Kada se šećerni dio antocijana hidrolizira nastaje aglikon (nešećerni produkt hidrolize) koji se naziva antocijanidin.

Postoji niz faktora koji ograničavaju primjenu antocijanina kao pigmenta, a to su nestabilnost pri kontaktu sa svjetlom i toplinom, te njihova tendencija ka degradativnim reakcijama. Raspon pH vrijednosti je ograničen na kiseliu hranu zbog promjene boje i nestabilnosti iznad pH = 4 (Wrolstad, 2004).



Slika 5 Osnovna struktura antocijanidina - flavilijev kation (Scribd Inc., 2014)

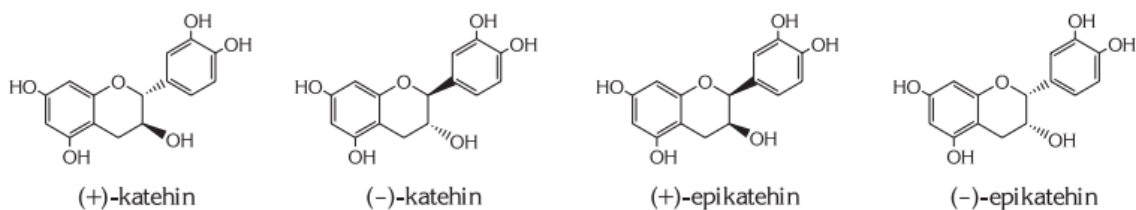


Slika 6 U prirodi – glikozidi (stabilniji i topljiviji u vodi)(Scribd Inc., 2014)

Antocijanini su prirodni pigmenti, koji imaju sve veću primjenu, jer su bezopasni i korisni po zdravlje. Usprkos njihovom velikom potencijalu primjene u farmaceutskoj industriji, industriji hrane, kozmetičkoj industriji, njihova upotreba je i dalje ograničena zbog njihove relativne nestabilnosti i niskom postotku ekstrakcije iz biljnog materijala. Još jedna značajna primjena je njihova antioksidativna aktivnost, koja igra ključnu ulogu u prevenciji neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, kancerogenih oboljenja i dijabetesa (Ovando i sur., 2009).

Proantocijanidini

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su 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. Za ljudsku prehranu najvažniji od tih spojeva su procijanidini koji se sastoje od monomera (+)-katehina i (–)-epikatehina (**Slika 7**). (–)-katehini i (+)-epikatehini su fitotoksični i neke ih biljke sintetiziraju u korijenu da bi spriječile naseljavanje drugih biljaka na tom teritoriju. Vezani procijanidni dimeri, trimeri i oligomeri nalaze se u crnim vinima, sjemenkama grožđa, jabukama i sjemenkama kakaovca (Harborne i sur., 1999).

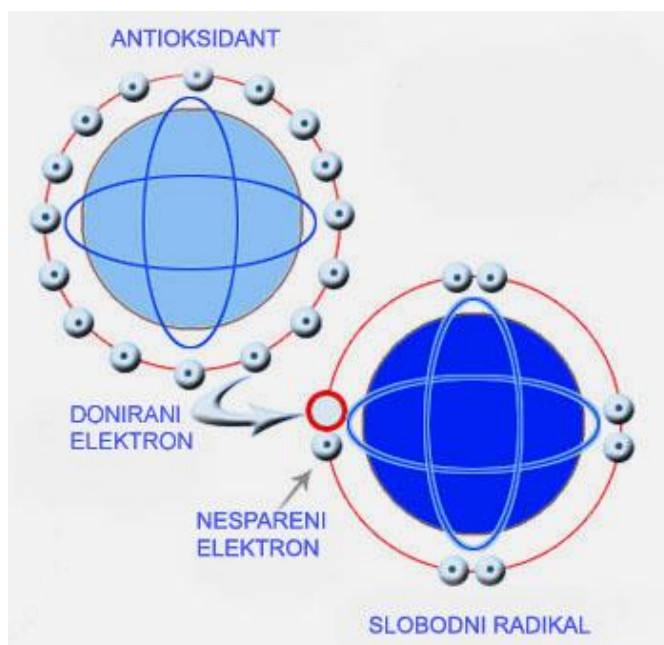


Slika 7 (\pm) katehin i (\pm)epikatehin (Kazazić, 2004.)

Ti polimeri mogu formirati komplekse s proteinima, posebice s proteinima iz sline, što je svojstvo zaslužno za kiselost namirnica koje sadrže ove molekule. Također, ovi spojevi imaju izuzetnu antioksidacijsku aktivnost.

2.5. POZITIVNA ULOGA FENOLNIH TVARI

Fenolnim tvarima pripisuje se višestruko pozitivno djelovanje. Pozitivno djeluju na zdravlje, a osim antioksidacijske aktivnosti imaju i antimikrobno i protuupalno djelovanje. Antioksidativno djelovanje fenolnih tvari očituje se kroz vezanje slobodnih radikala (*Slika 8*). 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). Budući da se fenolni spojevi ponašaju kao antioksidansi, oni štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i tako sprječavaju nastanak oksidacijskog stresa. Do oksidacijskog stresa dolazi uslijed nagomilavanja slobodnih radikala, te njihovog masovnog djelovanja koje dovodi do brojnih oštećenja u organizmu, dok ga neki čak povezuju i s nastankom kancerogenih oboljenja. Fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na brojne načine, jedan od njih je zbog prisutnosti hidroksilnih skupina u molekuli fenola koje su dobri proton donori koji mogu reagirati s reaktivnim kisikom i dušikom i na taj način spriječiti nastanak novih radikala. Također imaju sposobnost kelatnog vezanja metalnih iona (posebno bakra i željeza) koji djeluju kao katalizatori u reakciji oksidacije lipida. Aktiviranje antioksidacijskih enzima i inhibiranje oksidaza također su načini na koje fenoli mogu dovesti do antioksidacijske aktivnosti.



Slika 8 Shematski prikaz neutralizacije slobodnog radikala antioksidansom

(<http://www.nebeski-dar.hr/kristal-mjeseca/74-sungit.html>, 2014.)

Zahvaljujući specifičnoj strukturi molekule, fenolni spojevi pokazuju snažan potencijal interakcije s proteinima uslijed čega mogu inhibirati neke enzime (lipoksigenaza, ciklooksigenaza i ksantin oksidaza i dr.) (Cos i sur., 1988; Parr i sur., 2002).

Osim što djeluju antioksidativno, u biljkama djeluju i antimikrobno, prisutni su kao tvari koje privlače pozornost, te štite od UV zračenja. Daju stabilnost hrani i znatno utječu na njenu boju, miris i okus. Tako na primjer dodatkom antioksidanasa u masti, sprječava se njihova autooksidacija i povećava se trajnost namirnice (Bucić-Kojić, 2008). Smatra se da interakcije flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima (vitamin C i E) također doprinose antioksidacijskom djelovanju flavonoida. Upravo se prisutnost flavonoida u crnom vinu pripisuje Francuskom paradoksu jer zbog svojih antioksidacijskih svojstava utječe povoljno na zdravlje ljudi (Kazazić, 2004).

2.6. EKSTRAKCIJA

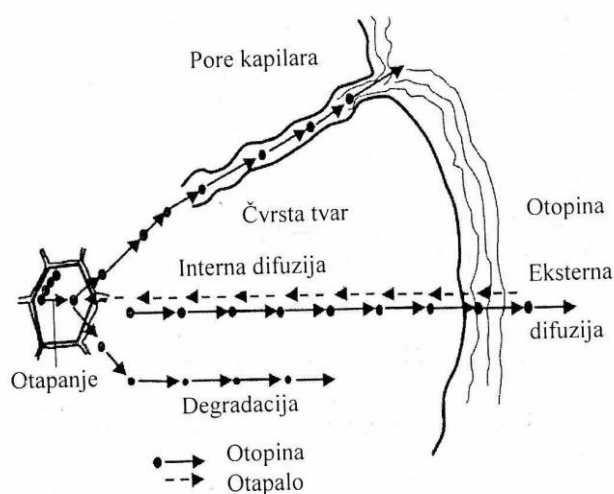
Ekstrakcija je jedinična operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju različitu topivost u različitim otapalima. Smjesa koja se odjeljuje obrađuje se selektivnim otapalom tj. otapalom u kojem se otapa komponenta koja se želi izdvojiti.

Ovisno o polaznoj fazi iz koje se tvar ekstrahira, proces ekstrakcije općenito se dijeli na:

- ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari odvija se iz krute faze, a ako se provodi otapalom koje nije lako hlapljivo često se naziva i izluživanje,
- ekstrakciju tekuće-tekuće - prijenos tvari odvija se iz tekuće faze. Taj tip ekstrakcije obično označava ekstrakciju u užem smislu (Floros i sur., 1999).

2.6.1. Ekstrakcija kruto – tekuće

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 9*): 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 (Bucić-Kojić, 2008).



Slika 9 Shema glavnih koraka ekstrakcije tvari iz krute tvari otapalom (Bucić-Kojić, 2008)

Prijenos mase u procesu ekstrakcije kruto-tekuće

Uslijed razlike koncentracije između dvije faze koje su u kontaktu, dolazi do prijenosa mase koji se odvija u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Pri kontaktu nekog tijela ili čestice s tekućinom koja ga otapa, pretpostavlja se da se na njegovoj površini vrlo brzo stvara sloj zasićene otopine (faza ispiranja ili brza ekstrakcija). Kada se taj sloj ne bi uklonio prestalo bi daljnje otapanje, a time i ekstrakcija. Uklanjanje topljivog materijala iz graničnog sloja u glavnu masu otopine zbiva se redovito kombinacijom molekularne i konvekcijske difuzije (Chalermchat i sur., 2004.).

2.7. METODE ODREĐIVANJA POJEDINIH TVARI U TROPU GROŽĐA

U analizi pojedinih tvari u tropu grožđa korištene su različite spektrofotometrijske, te kromatografska metoda (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC).

2.7.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode temelje se na Lambert-Beerovom zakonu:

$$\log\left(\frac{I_0}{I_p}\right) = A = \varepsilon \cdot l \cdot c' \quad (1)$$

gdje je:

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

A – apsorbancija

c' - množinska koncentracija tvari [mol/ m³]

l – duljina optičkog puta [m]

ε - koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [m³/(mol·m)]

Budući da je apsorbancija izravno proporcionalna koncentraciji tvari u otopini, Lambert-Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije obojenih otopina ili onih kod

kojih tijekom reakcije nastaje obojenje. Prilikom prolaska snopa paralelnih zraka monokromatskog svjetla kroz homogenu tekuću, krutu ili plinovitu tvar, dolazi do smanjenja intenziteta svjetlosti se smanjuje zbog toga što ta tvar apsorbira svjetlosno zračenje. Apsorpcija svjetlosnog zračenja ovisi o nizu faktora: prirodi tvari koja apsorbira svjetlost, valnoj duljini upadne svjetlosti, temperaturi, debljini sloja tvari, vremenu trajanja reakcije, prisutnosti tvari koje interferiraju, a kad je riječ o otopinama, i o njihovoj koncentraciji. Kod ovakvih mjerenja imamo standardnu otopinu poznate koncentracije i ispitivanu otopinu, što znači da se ne mjeri apsolutni iznos apsorbancije, već se uspoređuju intenziteti svjetlosti koja prolazi kroz te dvije otopine. 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 (Bucić-Kojić, 2008).

2.7.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High-Performance Liquid Chromatography) je oblik kromatografije na stupcu koji se koristi u analitičkoj kemiji. Budući da se kromatografija provodi pod visokim tlakom ponekad se u literaturi može naći i naziv „Tekućinska kromatografija pod visokim tlakom“ (eng. High pressure liquid chromatography - HPLC). Djelovanjem visokog tlaka u sustavu, uzorak je nošen pokretnom (mobilnom) fazom preko stacionarne faze u koloni. Komponente uzoraka različito se zadržavaju na koloni ovisno o specifičnim fizičkim i kemijskim interakcijama. Vrijeme u kojem se tvar eluira tj. vrijeme potrebno da tvar dođe do kraja stupca naziva se retencijsko vrijeme. Vrijeme zadržavanja karakteristično je za svaku pojedinu tvar, ali ovisi uvelike i o stacionarnoj fazi te sastavu mobilne faze. (Skoog i sur., 1999).

Povećanje tlaka u sustavu dovodi do povećanja linearne brzine te se poboljšava rezolucija kromatograma zbog kraćeg zadržavanja komponenata.

Razlikujemo normalno-faznu kromatografiju (polarna stacionarna i nepolarna mobilna faza) i reverzno-faznu kromatografiju (nepolarna stacionarna i polarna mobilna faza). Svestranost te tehnike omogućena je različitim separacijskim modovima, tipovima detektora (UV/Vis, PDA, elektrokemijski detektor, fluorescentni detektor, maseni spektrometar).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade tropa grožđa na ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupni fenolni spojevi, ukupni proantocijanidini, ukupni flavonoidi, antocijanini), te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata tropa grožđa. Ekstrakcija je provedena iz biološki neobrađenih uzoraka te iz sušenih i nesusenih biološki obrađenih uzoraka. U ekstraktima su također određeni i ukupni proteini te koncentracija glukoze. Biološka obrada provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*.

Osim toga cilj je bio ispitati potrošnju šećera iz tropa grožđa tijekom procesa rasta *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Istraživanja su provedena na tropu grožđa crne sorte grožđa Portugizac koji je zaostao nakon proizvodnje vina a sastojao se od kožica, sjemenki i peteljki grožđa. Trop grožđa čuvan je do provedbe eksperimenata u zamrzivaču na -20°C. Prije biološke obrade trop je grubo usitnjen u blenderu (HR 2860, Philips), steriliziran u autoklavu (TIP7510945, Sutjeska, Beograd) i ohlađen.

Biološka obrada tropa grožđa provedena je pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* AG613 (CCBAS, Prag, Češka Republika). Kulture su uzgajane sedam dana na krumpirovom agaru (PDA) (Biolife Italiana Sr.L. Viale Monza, Milan, Italy) pri 27 °C.

3.2.2. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari određen je u uzorcima prije i nakon biološke obrade s *T. versicolor*. Određivanje suhe tvari provedeno je sušenjem ispitivanih uzoraka tropa grožđa

termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) prikazanim na *Slici 10*. Ispitivani uzorak stavljen je na aluminijsku pliticu (oko 5 g), koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje, gdje se sušenje provodi do konstantne mase. Uvjeti sušenja su: standardna metoda, temperatura sušenja 105 °C i kriterij završetka procesa (*eng. switch-off 3*: gubitak mase od 1 g u 50 s). (Planinić i sur., 2003).

Određivanje suhe tvari provedeno je u dva ponavljanja.



Slika 10 Mettler Toledo HR73

3.2.3. Biološka obrada tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor*

Biološka obrada tropa grožđa provedena je pomoću *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Istraživanje je provedeno u dva dijela koji su se razlikovali u načinu pripreme materijala i inokulaciji *T. versicolor* na trop grožđa kako slijedi:

- U prvom dijelu istraživanja (Eksperiment 1) u laboratorijske staklenke odvagano je 50 g tropa grožđa u koji je dodano 30 mL vode budući da *Trametes versicolor* za svoj rast zahtjeva određeni udio vlage (70-90%). Nakon kondicioniranja tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi uzorci su sterilizirani i ohlađeni te je provedena inokulacija s 5 micelijskih diskova kulture *Trametes versicolor* promjera 5 mm. Uzorci su inkubirani na 27 °C tijekom 20 dana te je provedeno periodičko uzorkovanje svaka 3 - 4dana.
- U drugom dijelu istraživanja (Eksperiment 2) u laboratorijske staklenke odvagana je ista masa supstrata (50 g) koja je sterilizirana te je nakon hlađenja naciepljena s suspenzijom spora *T. versicolor*. Suspenzija je pripremljena na način daje 5 micelijskih

diskova *T. versicolor* raspršeno u 30 mL sterilizirane vode koja je potom dodana supstratu. Broj spora u suspenziji iznosio je 10^8 /mL. Uzorci su inkubirani na 27 °C tijekom 10 dana te je provedeno periodičko uzorkovanje svaki 1 - 2 dana.

U oba eksperimenta, nakon vađenja uzoraka s inkubacije ponovo je provedena sterilizacija kako bi se zaustavio rast *Trametes versicolor*. Uzorkovanje je provođeno u tri paralele. Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci ali bez nacjepljivanja *T. versicolor*.

Svaki je uzorak nakon fermentacije podijeljen na dva dijela, od kojih je jedan dio odmah podvrgnut ekstrakciji, a drugi dio tek nakon sušenja u električnom sušioniku (Kambič, Slovenija, VS-50 SC) tijekom 24 h pri 45 °C.

3.2.4. Kruto-tekuća ekstrakcija fenolnih tvari iz tropa grožđa

Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) (*Slika 11*) 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 11 Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23)

Provedba ekstrakcije

Prije postupka ekstrakcije provedeno je fino usitnjavanje vlažnog i sušenog uzorka u blenderu u trajanju 1 - 2 min (HR 2860, Philips). U staklene tikvice odvagano je 1 g usitnjenog uzorka, a potom je dodano 40 mL otapala (50% vodena otopina etanola). Staklene tikvice postavljene su u vodenu kupelj zagrijanu na 80 °C, te je provođena ekstrakcija tijekom 120 min pri trešnji od 200 rpm.

Za potrebe određivanja glukoze i pojedinačnih šećera u staklene tikvice je odvagano 1 g usitnjenog vlažnog tropa grožđa kojem je dodano 10 mL destilirane vode te je ekstrakcija provedena tijekom 30 min pri 27 °C i 150 rpm.

Ekstrakcija svakog uzorka provedena je u dva ponavljanja.

3.2.5. Priprema ekstrakta za analizu

Nakon postupka ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana (Multifuge 3 L-R Centrifuge) pri 15000 g u trajanju od 10 min. Supernatant je korišten za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva, proteina i glukoze te HPLC analizu pojedinačnih šećera.

3.2.6. Određivanje ukupnih fenolnih Folin –Ciocalteuovom metodom

Ukupne fenolne tvari u ekstraktima biološki obrađenog i neobrađenog tropa grožđa određene su spektrofotometrijski mikro Folin-Ciocalteuovom metodom.

Folin-Ciocalteuova metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. U alkalnom mediju u prisustvu Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfowolframove 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 (Stratil i sur., 2006).

Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prije određivanja koncentracije fenolnih tvari u ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa napravljena je baždarna krivulja galne kiseline koja je korištena kao standard. Temeljna otopina galne kiseline pripravljena je otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Tako pripravljena otopina stabilna je tijekom dva tjedna. Nakon pripreme temeljne standardne otopine galne kiseline pripravljena su različita razrjeđenja (0,05 mg/mL – 1,0 mg/mL) na način da je u odmjerene tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline, te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom.

Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline, te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline.

Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

U epruvetu je otpipetirano 40 μL pripremljenog ekstrakta biološki obrađenog tropa grožđa 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin - Ciocalteuova reagensa, te je nakon stajanja između 30 sekundi i 8 minuta u epruvetu dodano 600 μL 20%-tne vodene otopine Na_2CO_3 . Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednaki volumen (40 μL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 minuta na 40 °C da se razvije boja čija je apsorbancija mjerena na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 765 nm. Iz dobivenih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje izračunate su koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Zbog lakše usporedivosti dobivenih rezultata, konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih tvari preračunate su na suhu tvar uzorka $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u tri ponavljanja.

3.2.7. Određivanje ukupnih fenolnih tvari Prussian Blue metodom

Prussian Blue metoda temelji se na principu da fenoli reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} te nastaje kompleks s fericijanidom koji daje plavo obojenje (Budini i sur., 1980)

Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prije određivanja koncentracije fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa napravljena je baždarna krivulja galne kiseline koja je korištena kao standard. Temeljna otopina galne kiseline pripremljena je otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Ovako pripremljena otopina galne kiseline koncentracije 5 mg/mL razrijeđena je na koncentraciju 1 mg/mL . Nakon pripreme temeljne standardne otopine galne kiseline

koncentracije 1 mg/mL pripremljena su različita razrjeđenja (0,01 mg/mL – 0,07 mg/mL) na način da je u ependorfice otpipetirano po 10 μ L; 20 μ L; 30 μ L; 40 μ L; 50 μ L; 60 μ L i 70 μ L otopine galne kiseline, te je do 1000 μ L nadopunjeno destiliranom vodom.

Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline, te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline.

Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prije analize uzoraka priređeni u potrebni reagensi za provedbu metode. 50 mM otopina željezovog (III) klorida - $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ pripremljena je otapanjem 0,811 g FeCl_3 u 100 mL 0,1 M kloridne kiseline – HCl dok je otopina 8 mM kalij-heksacijanoferata - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ pripremljena otapanjem 0,263 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ u 100 mL destilirane vode.

Analiza je provedena na način da je u ependorficu je otpipetirano 50 μ L pripremljenog ekstrakta tropa grožđa, 950 μ L destilirane vode, 40 μ L 50 mM FeCl_3 i 40 μ L 8 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Svi uzorci promiješani su inverzijom i ostavljeni 20 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je mjerena apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 720 nm. Iz dobivenih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje izračunate su koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Zbog lakše usporedivosti dobivenih rezultata, konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih tvari preračunate su na suhu tvar uzorka $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u tri ponavljanja.

3.2.8. Određivanje flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida (Marinova i sur., 2005).

Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju ukupnih flavonoida

Prije određivanja koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa napravljena je baždarna krivulja (+)-katehina koja je korištena kao standard. Temeljna otopina (+)-katehina pripremljena je otapanjem 0,2 g (+)-katehina s 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 mL. Od ovako pripremljene otopine pripremljena su različita razrjeđenja (0,02 mg/mL – 1 mg/mL) na način da je u odmjerene tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; pripremljene otopine (+)-katehina, te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine (+)-katehina, te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji (+)-katehina.

Postupak za određivanje ukupnih flavonoida

U 4 mL destilirane vode dodano je 1 mL ekstrakta biološki obrađenog tropa grožđa, a potom 0,3 mL 5% natrijevog nitrita (otopiti 5 g u 100 mL) te je nakon pet minuta dodano 0,3 mL 10%-tne vodene otopine aluminij (III)-klorida heksahidrata (otopiti 10 g u 100 mL). Nakon 5 - 8 minuta dodano je 2 mL 1 M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 10 mL. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (1 mL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm. Koncentracija flavonoida u ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa određena je u odnosu na standardnu krivulju (+)-katehina (CE) te preračunata na suhu tvar biološki obrađenog tropa grožđa ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.2.9. Određivanje proteina Bradfordičinom metodom

Bradfordičina metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do

stvaranja kompleksa protein:boja, koji u kiselom mediju pokazuje maksimum apsorbancije pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2013).

Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju proteina

Prije određivanja koncentracije proteina u ekstraktima tropa grožđa napravljena je baždarna krivulja goveđeg seruma albumina (BSA) koji je korišten kao standard.

Iz otopine goveđeg serumskog albumina BSA, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg/mL}$, u kivetama pripremljen je niz otopina proteina poznate koncentracije (standardni niz) volumena 100 μL . Standardni niz pripremljen je u rasponu koncentracija 0,1 – 0,6 mg/mL, na način da je u kivete otpipetirano po 10 μL ; 20 μL ; 30 μL ; 40 μL ; 50 μL i 60 μL otopine BSA te potom nadopunjeno destiliranom vodom do 100 μL .

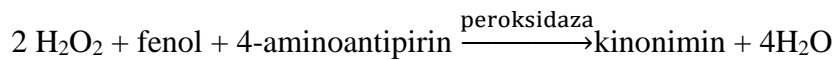
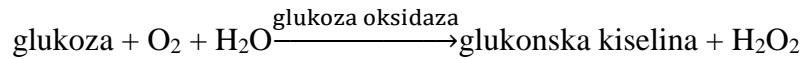
Iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentraciji BSA.

Postupak za određivanje ukupnih proteina

U kivete je dodano 100 μL ekstrakta tropa grožđa i 2 mL svježe pripremljenog Bradfordičinog reagensa (razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:4) te je reakcijska smjesa ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 5 minuta. Po isteku vremena inkubacije očitana je apsorbancija pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina u ekstraktima tropa grožđa određena je u odnosu na standardnu krivulju BSA te preračunata na suhu tvar uzorka ($\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Uzorci su analizirani u dva ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.2.10. Mjerenje koncentracije glukoze

Za mjerenje koncentracije glukoze u uzorcima je korištena je kolorencimska (PAP) metoda koja se temelji na sljedećim reakcijama:



Kinonimin daje crveno obojenje otopini koje apsorbira svjetlo u vidljivom području spektra na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$. Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je koncentraciji glukoze u otopini.

Za određivanje glukoze PAP metodom korištene su sljedeće otopine:

R1 reagens:

4-aminoantipirin, 0,04 [mmol/dm³]

Glukoza oksidaza (GOD), 10 000 [U/ dm³]

Peroksidaza (POD), 700 [U/ dm³]

R2 pufer:

Fosfatni pufer (pH = 7,4 ± 0,05), 100 [mmol/dm³]

Fenol, 10 [mmol/dm³]

R3 standard:

Glukoza 5,56 [mmol/dm³]

Reagens R1 otopljen je u puferu R2. Tako priređena otopina stabilna je 4 tjedna na temperaturi $T = 2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$. Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$ i temperaturi $T = 20 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju koncentracije glukoze

Prije određivanja koncentracije glukoze u ekstraktima tropa grožđa napravljena je baždarna krivulja glukoze o koja je korištena kao standard. Za izradu baždarnog pravca pripremljene su različite koncentracije otopine glukoze (0,056 – 2,780 mmol/L) koje su pripremljene od temeljne otopine koncentracije 5,56 mmol/L). Prema postupku za određivanje koncentracije

glukoze u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine standarda glukoze, te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji glukoze.

Postupak za određivanje koncentracije glukoze

U plastične kivete dodan je 1mL glukoza PAP otopine i 10 μ L ekstrakta tropa grožđa. Uzorci su promiješani na vorteksu te su nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi izmjerene apsorbancije pri $\lambda = 500$ nm. Koncentracija glukoze u ekstraktima tropa grožđa određena je u odnosu na standardnu krivulju glukoze te preračunata na suhu tvar tropa grožđa ($m_{glc}/g_{s.t.}$). Uzorci su analizirani u dva ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.2.11. Određivanje antocijanina pH diferencijalnom metodom

Za određivanje antocijanina primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijanina u ovisnosti o promjeni pH. Antocijanini podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorbancije. pH - diferencijalna metoda za određivanje antocijanina omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijanina, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle uzrokovati interferencije. (Giusti i Wrolstad, 2001).

Ekstrakt je razrijeđen (jednadžba 2) s otopinom pufera kalijevog klorida pH vrijednosti 1,0 (pripremljena je otapanjem 1,86 g KCl u 1 L destilirane vode, pH vrijednost namještena je s koncentriranom HCl) te s otopinom pufera natrijevog acetata pH vrijednosti 4,5 (pripremljena je otapanjem 54,43 g $CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$ u 1 L destilirane vode, pH vrijednost podešena je na 4,5 s koncentriranom HCl).

$$DF = \frac{V(ukupno)}{V(ekstrakta)} \quad (2)$$

Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija svakog razrjeđenja na valnoj duljini 510 i 700 nm (A_{510} , A_{700}) na spektrofotometru. Apsorbancija uzorka (A) izračunana je prema sljedećoj formuli:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (3)$$

Koncentracija antocijanina izračunana je prema sljedećoj formuli:

$$c_{\text{AN}} = (A \times M \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad (4)$$

gdje su:

c_{AN} – ukupni antocijanini [mg/L]

M - 449,2 [g/mol]

DF - faktor razrjeđenja (2x – 5x)

ϵ - molarna ekstinkcija - 26 900 [L/mol·cm]

l - duljina kivete; 1 cm

(M i ϵ su uzeti za dominantnu vrstu antocijanina odnosno za cijanidin-3-glukozida).

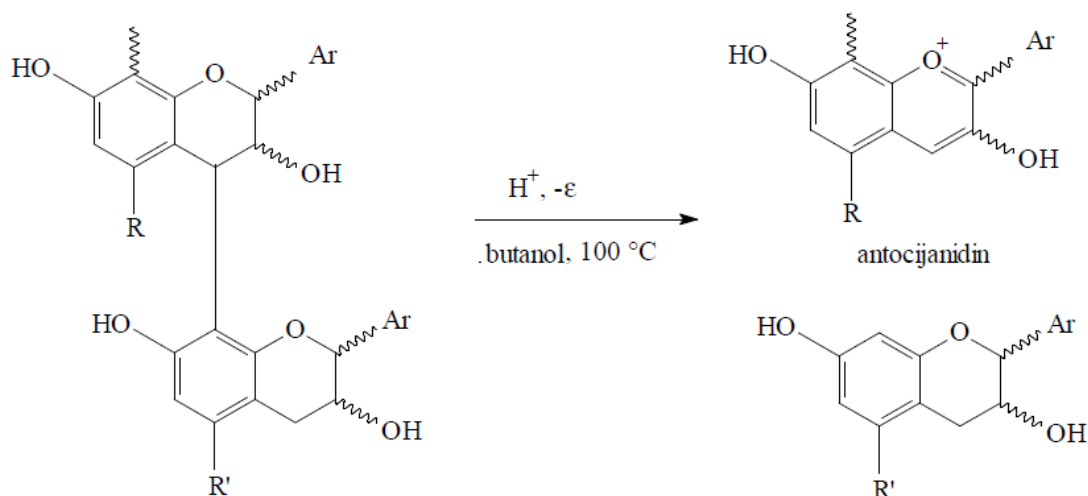
Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih antocijanina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar tropa grožđa (mg/g_{s.t.}).

3.2.12. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini u ekstraktima tropa grožđa određeni su spektrofotometrijskom metodom baziranoj na njihovoj reakciji s otopinom kiselina-butanol (*Slika 12*) (Avallone i sur., 1997; Škerget i sur., 2005).

Princip

U kiselom mediju proantocijanidini se depolimeriziraju u butanolu uz nastajanje crveno obojenih antocijanidina koji se mogu detektirati spektrofotometrijski (Schofield i sur., 2001).



Slika 12 Depolimerizacija proantocijanidina u kiselom mediju (Schofield, 2001)

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 (Naczki i Shahidi, 2004).

Postupak

U 2 mL pripremljenog ekstrakta za analizu 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 540nm. 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 ($\epsilon = 34700\text{L/mol}\cdot\text{cm}$) prema sljedećem izrazu:

$$C_{\text{UPA}} = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\epsilon \cdot l} \quad (5)$$

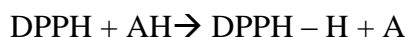
gdje je: DF - faktor razrijeđenja ($DF = 11$; omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA (22 mL) i volumena ekstrakta (2 mL)), l - duljina optičkog puta (1 cm). Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar tropa grožđa [$\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$] uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta.

3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa određena je spektrofotometrijski DPPH metodom. Ta metoda odabrana je među brojnim drugim prisutnim u literaturi zbog stabilnosti DPPH· radikala 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 (Bucić-Kojić, 2008).

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 (Benvenuti i sur., 2004)



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 tropa 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, nakon čega joj je spektrofotometrijski određena apsorbancija ($A_{\text{ekst.}}$) pri valnoj duljini od 515 nm u odnosu na slijepu probu (96% etanol).

Otopina DPPH· korištena za određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) pripremana je uvijek svježa 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. Inhibicija DPPH· uslijed antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih ekstrakata izračunana je u postotku (%) prema sljedećem izrazu (Benvenuti i sur., 2004):

$$\% \text{inhibicije DPPH} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekst.}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \cdot 100 \quad (6)$$

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

$$AA = \frac{m_{\text{inh.DPPH}}}{m_{\text{s.t.}}} \quad (7)$$

Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u dva paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti određivanja.

3.2.14. Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera

Pojedinačni šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza) određeni su pomoću HPLC sustava (Shimadzu, Prominence liquid chromatograph) koji se sastoji od izokratske pumpe LC - 20AD, vakuum otplinjača DGU - 20A3, kolonske pećnice CTO - 20A sa temperaturnim rasponom od 10 °C iznad sobne temperature do 85 °C na koju je instaliran manualni injektor, RI (indeks refrakcije) detektora RID-10A te PC-a i odgovarajućeg softvera za obradu podataka (*Slika 13*). Analiza je provedena na temperaturi od 80 °C, tlaku od 37 - 38 bara s protokom mobilne faze od 0,8 mL/min na kolonishim-pack SPR-Na (250 mm x 7,8 mm) izokratičnom metodom. Kao mobilna faza korištena je redestilirana voda. Vrijeme zadržavanja za glukoze bilo je 9 min, za fruktozu 12 min i za saharozu 7 min. Prije analize svi uzorci su profiltrirani na filter papiru promjera pora 0,45µm. Koncentracija analiziranih šećera u ispitivanim ekstraktima određena je iz pripadajućih baždarnih krivulja.

Postupak izrade kalibracijske krivulje u određivanju koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze

Prije određivanja koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze u ekstraktima tropa grožđa HPLC metodom napravljene su baždarne krivulje spomenutih šećera koji su korišteni kao standardi. Temeljne otopine glukoze i saharoze pripravljene su u koncentraciji 1 mg/mL (100 mg standarda otopljeno u 100 mL redestilirane vode). Od temeljne otopine pripravljene su sljedeće koncentracije otopina glukoze i saharoze: 0,75 g/L; 0,50 g/L; 0,25 g/L i 0,10 g/L. Temeljna otopina fruktoze pripravljena je u koncentraciji 2 mg/mL (otapanjem 200 mg fruktoze u 100 mL redestilirane vode) te su od nje pripravljene različite koncentracije fruktoze (1 g/L; 0,50 g/L; 0,20 g/L i 0,10 g/L). Prema postupku za određivanje koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima HPLC metodom određene su površine ispod pikova na dobivenim kromatogramima, te je izrađena kalibracijska krivulja tj. krivulja ovisnosti vrijednosti površina o koncentraciji standarda (glukoza, fruktoza ili saharoza).



Slika 13 Prikaz HPLC sustava

4. REZULTATI

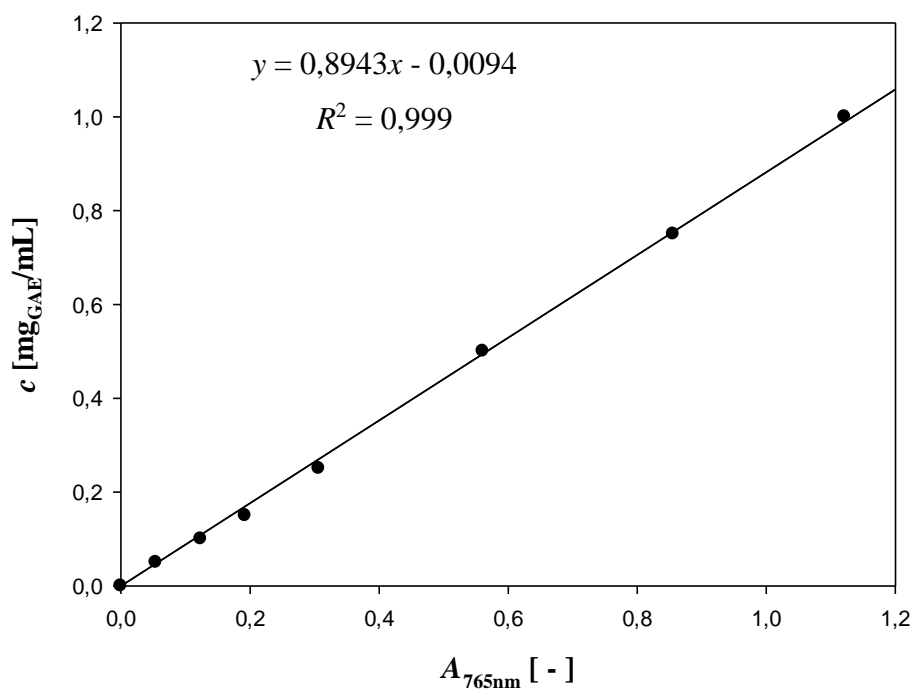
Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

4.1. ODREĐIVANJE SUHE TVARI

U prvom dijelu istraživanja (E1) vrijednosti za udio suhe tvari u vlažnom tropu grožđa kretao se u rasponu 24,41 – 35,04%, dok je u osušenom tropu grožđa taj raspon bio 92,60 – 94,08%.

U drugom dijelu istraživanja (E2) vrijednosti za udio suhe tvari u vlažnom tropu grožđa kretao se u rasponu 20,54 – 32,41%, dok je u osušenom tropu grožđa taj raspon bio 93,32 - 94,13%.

4.2. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI FOLIN-CIOCALTEOVOM METODOM



Slika 14 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari (standard: galna kiselina)

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

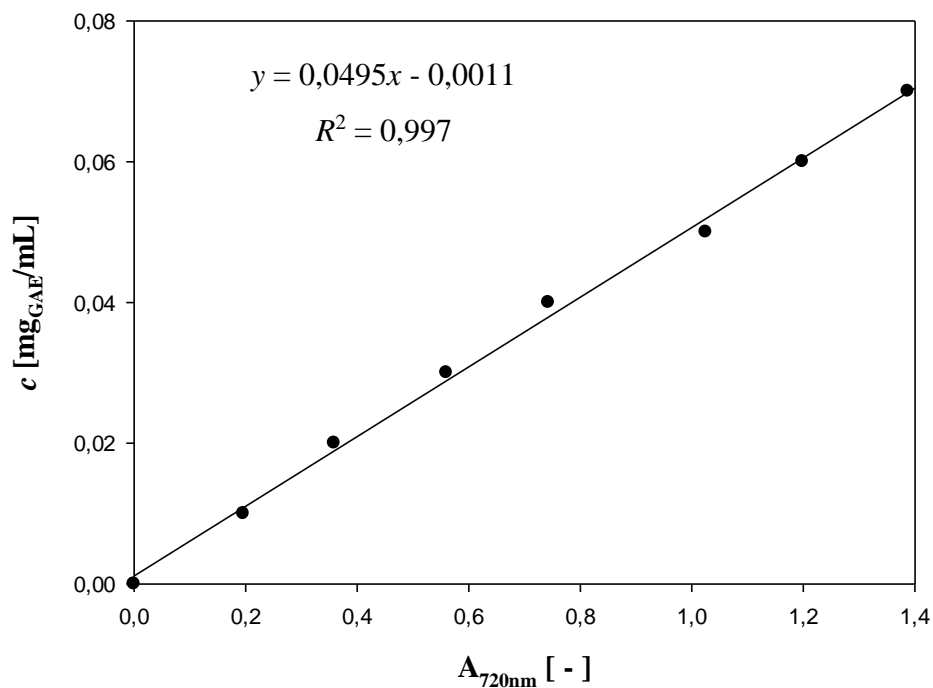
$$y = 0,8943x - 0,0094 \quad (8)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = y = 0,8943 \cdot A - 0,0094 \text{ [mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}] \quad (9)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola iz izmjerenih vrijednosti apsorbanca.

4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH TVARI PRUSSIAN BLUE METODOM



Slika 15 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari (standard: galna kiselina)

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

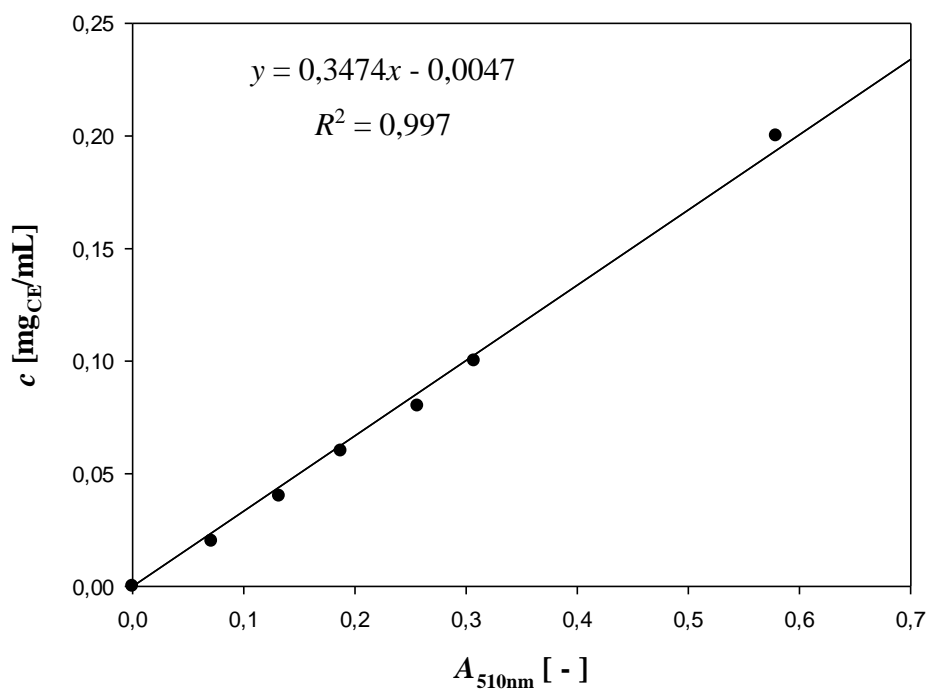
$$y = 0,0495x - 0,0011 \quad (10)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = y = 0,0495 \cdot A - 0,0011 \text{ [mg}_{GAE}\text{/mL]} \quad (11)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola iz izmjerenih vrijednosti apsorbanca.

4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA



Slika 16 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih flavonoida (standard: (+)-katehin)

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

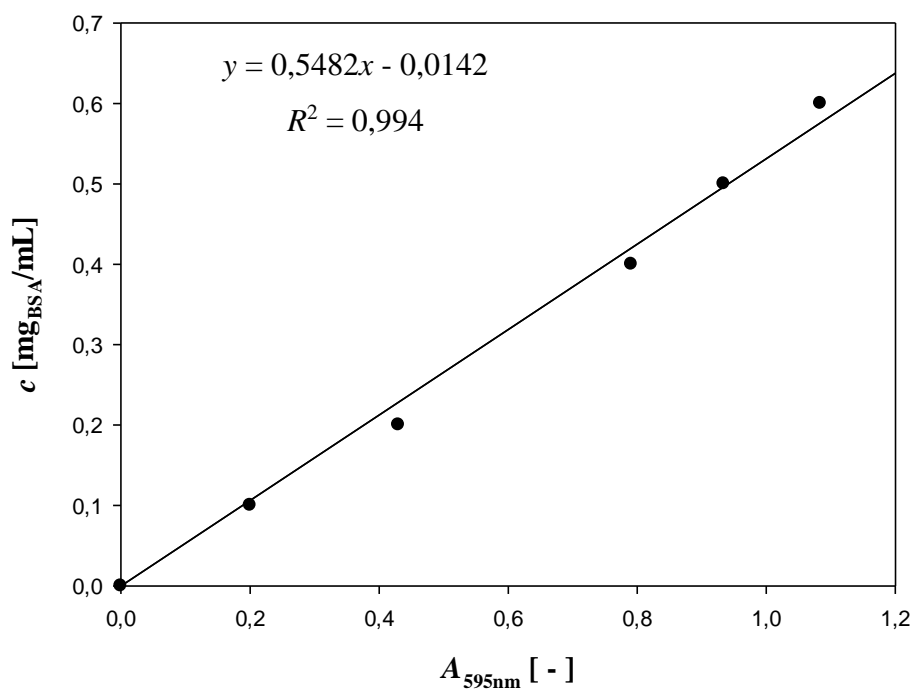
$$y = 0,3474x - 0,0047 \quad (12)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih flavonoida)} = y = 0,3474 \cdot A - 0,0047 \text{ [mg}_{\text{CE}}/\text{mL}] \quad (13)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija.

4.5. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA



Slika 17 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih proteina (standard: BSA)

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

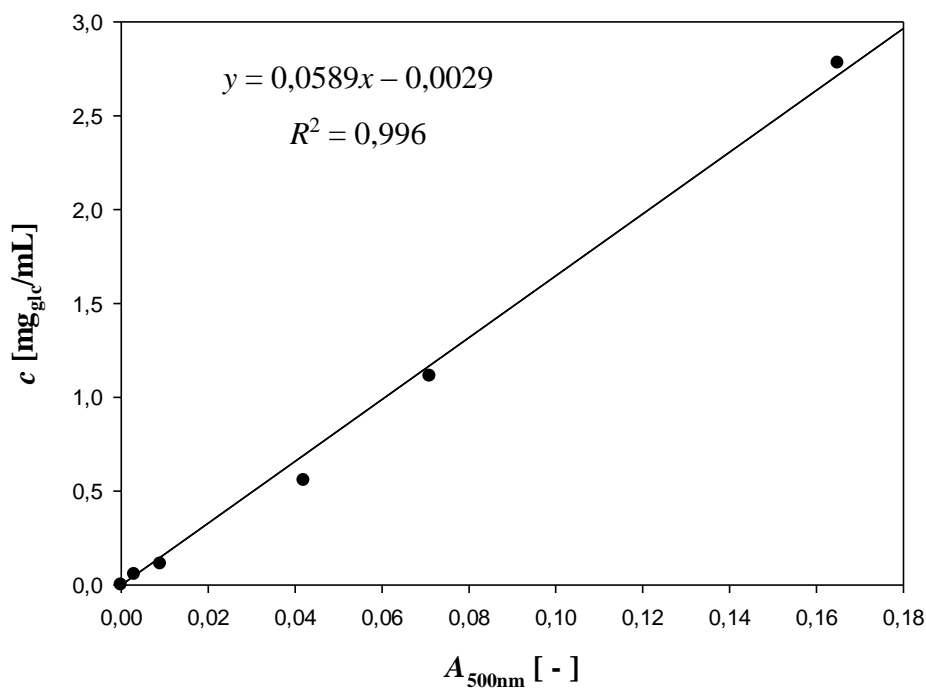
$$y = 0,5482x - 0,0142 \quad (14)$$

odnosno:

$$c (\text{ukupnih proteina}) = y = 0,5482 \cdot A - 0,0142 [\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{mL}] \quad (15)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije ukupnih proteina iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija.

4.6. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE



Slika 18 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije glukoze (standard: glukoza)

Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 0,0589x - 0,0029 \quad (16)$$

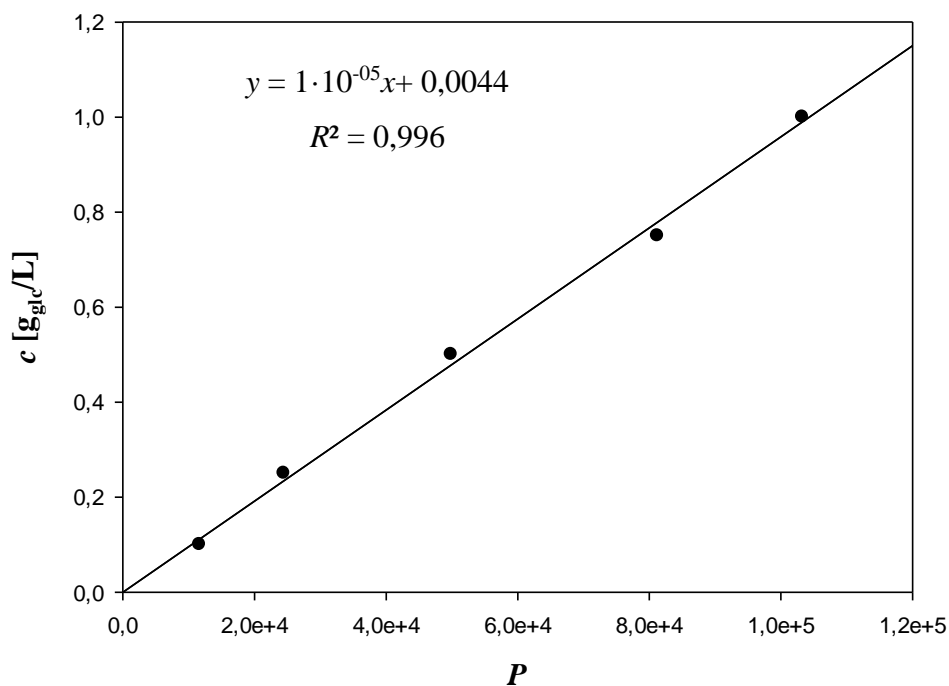
odnosno:

$$c(\text{glukoze}) = y = 0,0589 \cdot A - 0,0029 \text{ [mg}_{\text{glc}}/\text{mL}] \quad (17)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije glukoze iz izmjerenih vrijednosti apsorpcija.

4.7. KALIBRACIJSKE KRIVULJE ZA ODREĐIVANJE POJEDINIH ŠEĆERA HPLC METODOM

Glukoza



Slika 19 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije glukoze

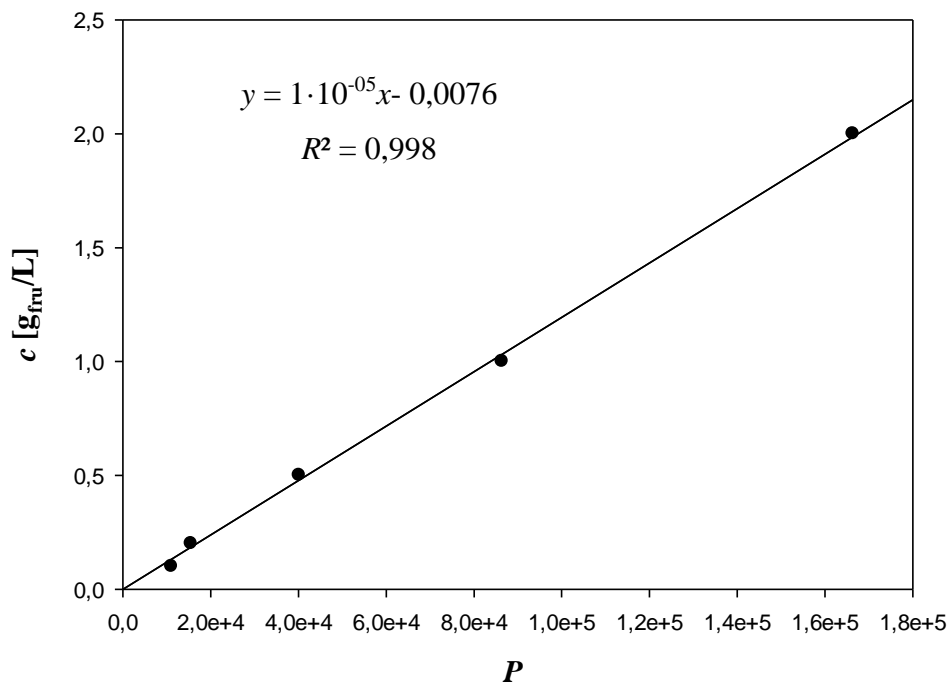
Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 1 \cdot 10^{-05}x + 0,0044 \quad (18)$$

odnosno:

$$c(\text{glukoze}) = y = 1 \cdot 10^{-05} \cdot P + 0,0044 \text{ [mg}_{\text{glc}}/\text{mL}] \quad (19)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije glukoze iz određenih površina pikova.

Fruktoza

Slika 20 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije fruktoze

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

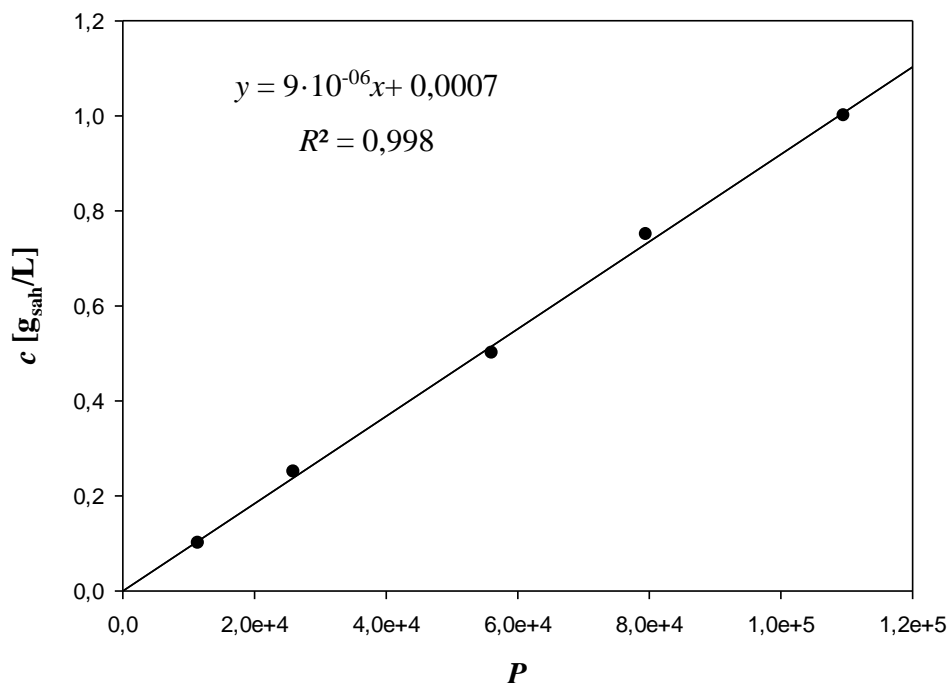
$$y = 1 \cdot 10^{-05}x - 0,0076 \quad (20)$$

odnosno:

$$c \text{ (fruktoze)} = y = 1 \cdot 10^{-05} \cdot P - 0,0076 \text{ [mg}_{\text{fru}}/\text{mL}] \quad (21)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije fruktoze iz određenih površina pikova.

Saharoza



Slika 21 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije saharoze

Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 9 \cdot 10^{-06}x + 0,0007 \quad (22)$$

odnosno:

$$c(\text{saharoza}) = y = 9 \cdot 10^{-06} \cdot P + 0,0007 \text{ [mg}_{\text{sah}}/\text{mL}] \quad (23)$$

koja je korištena je za izračunavanje masene koncentracije saharoze iz određenih površina pikova.

4.8. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA ANALIZIRANIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA

Prema jednadžbama (9, 11, 13, 15, 17) dobivenim metodom linearne regresije izračunane su koncentracije pojedinih tvari u ekstraktu tropa grožđa koje su preračunate na suhu tvar uzorka na sljedeći način:

$$C = \frac{c \cdot V_e \cdot DF}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} [\text{mg/g}_{s.t.}] \quad (24)$$

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu [$\text{mg/g}_{s.t.}$]

c – masena koncentracije analizirane tvari u ekstraktu [mg/mL]

V_e – volumen ukupno dobivenog ekstrakta [mL]

DF – faktor razrjeđenja ekstrakta za potrebe određivanja određene tvari

Prema jednadžbi 24 izračunati su maseni udjeli sljedećih tvari: ukupni fenolni spojevi određeni Folin-Cioacalteuovom metodom C_{UFS_FC} [$\text{mg}_{GAE}/\text{g}_{s.t.}$]; ukupni fenolni spojevi određeni Prussian-Blue metodom C_{UFS_PB} [$\text{mg}_{GAE}/\text{g}_{s.t.}$]; ukupni flavonoidi C_{UF} [$\text{mg}_{CE}/\text{g}_{s.t.}$]; ukupni antocijanini C_{AN} [$\text{mg}/\text{g}_{s.t.}$]; ukupni proantocijanidini C_{UPA} [$\text{mg}/\text{g}_{s.t.}$]; ukupni proteini C_P [$\text{mg}_{BSA}/\text{g}_{s.t.}$] i udio glukoze C_{glc} [$\text{mg}_{glc}/\text{g}_{s.t.}$].

4.9. IZRAČUNAVANJE KONVERZIJE ANALIZIRANIH TVARI

Pojam konverzije odnosi se na promjenu množine ili količine reaktanta za vrijeme reakcije. Često se koristi u praksi kao varijabla u reaktorskim i kinetičkim modelima umjesto koncentracije, a izračunava se na sljedeći način (Gomzi, 2009):

$$X = \frac{C'_0 - C'}{C'_0} \cdot 100\% \quad (25)$$

gdje je:

X – konverzija analizirane tvari [%]

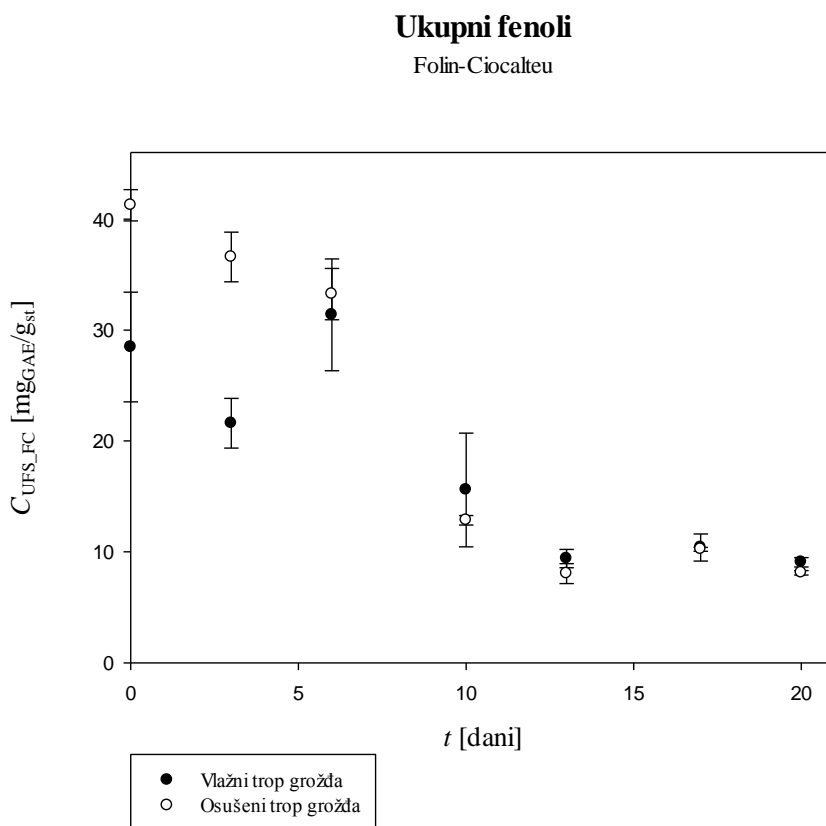
C'_0 – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu biološki neobrađenog tropa grožđa [$\text{mg}/\text{g}_{s.t.}$]

C' – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu biološki obrađenog tropa grožđa [$\text{mg}/\text{g}_{s.t.}$]

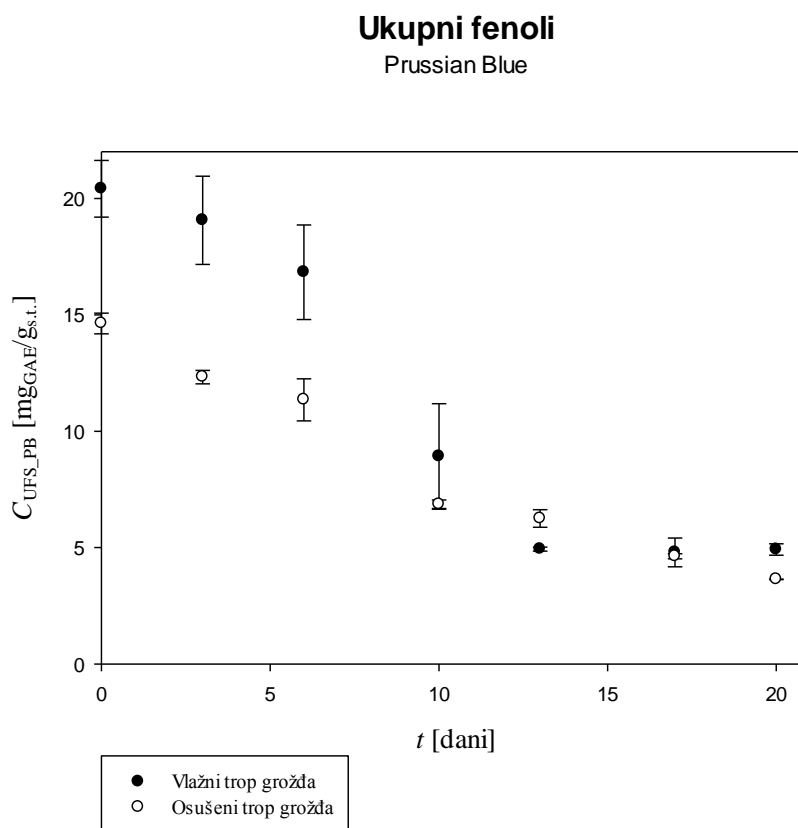
4.10. EKSPERIMENT 1 (E1)

U ovom poglavlju prikazani su rezultati za biološki obrađen trop grožđa pomoću *Trametes versicolor* nacijepjen na vlažni trop grožđa u obliku 5 micelijskih diskova promjera 5 mm. Prikazani su rezultati za ekstrakte biološki obrađenog tropa grožđa prije i nakon sušenja s ciljem praćenja utjecaja sušenja na sadržaj ekstrahiranih tvari (fenolnih tvari, flavonoida, proteina, antocijanina, proantocijanidina) te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Koncentracija glukoze određivana je u vodenim ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa. Svi uzorci uspoređeni su sa slijepom probom tj. s biološki neobrađenim tropom grožđa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti šest paralelnih ponavljanja uključujući i standardnu devijaciju te konverziju analiziranih spojeva.

4.10.1. Udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa

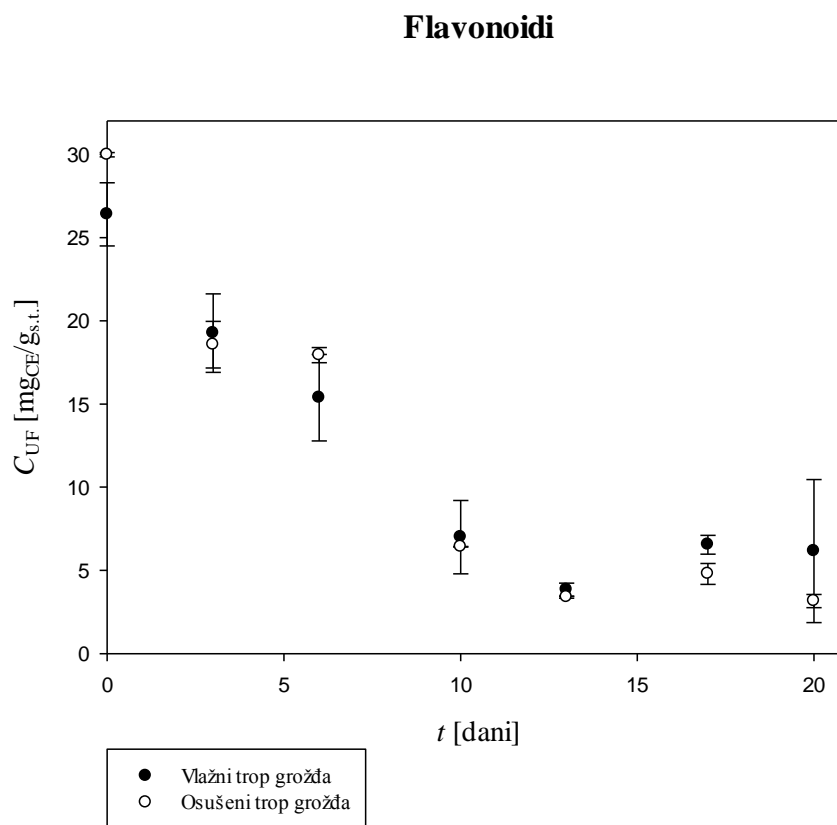


Slika 22 Udio ukupnih fenolnih spojeva (C_{UFS_FC}) u ekstraktima vlažnog i osušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)



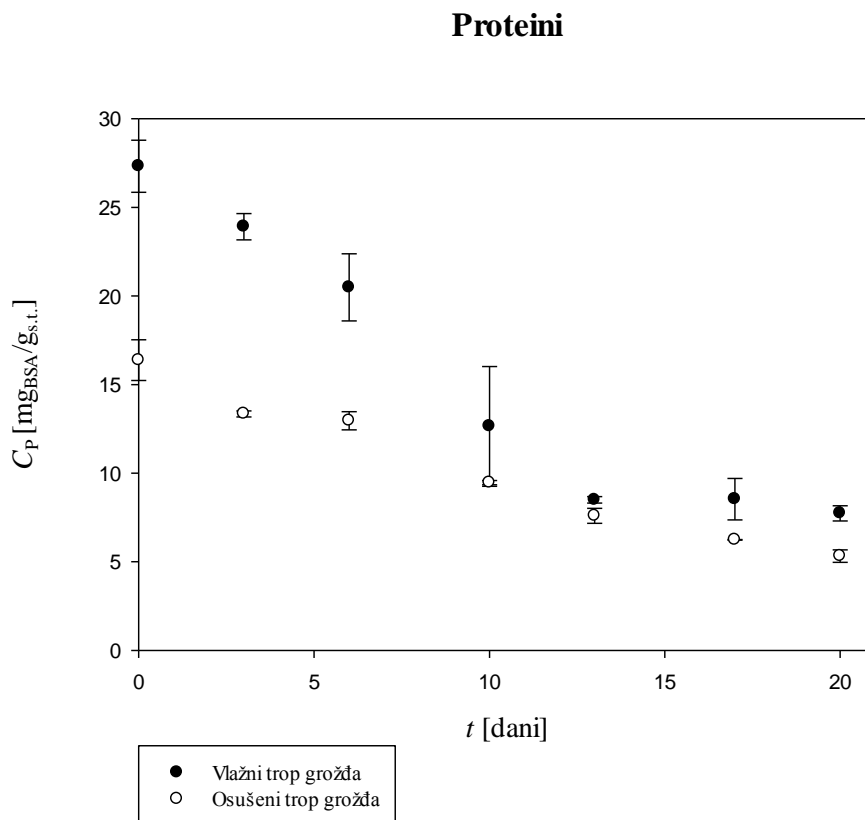
Slika 23 Udio ukupnih fenolnih spojeva (C_{UFS_PB}) u ekstraktima vlažnog i osušenog biološki obrađenog tropa grožda u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.10.2. Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa



Slika 24 Udio ukupnih flavonoida (C_{UF}) u ekstraktima vlažnog i osušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

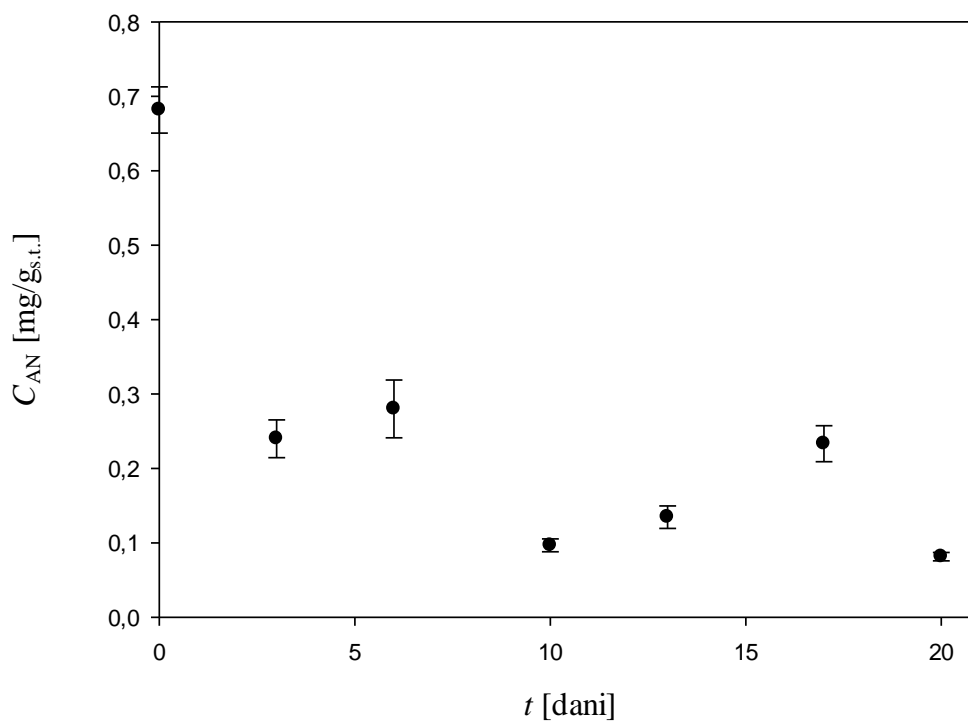
4.10.3. Udio ukupnih proteina u ekstraktima tropa grožđa



Slika 25 Udio ukupnih proteina (C_P) u ekstraktima vlažnog i osušenog biološki obradenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

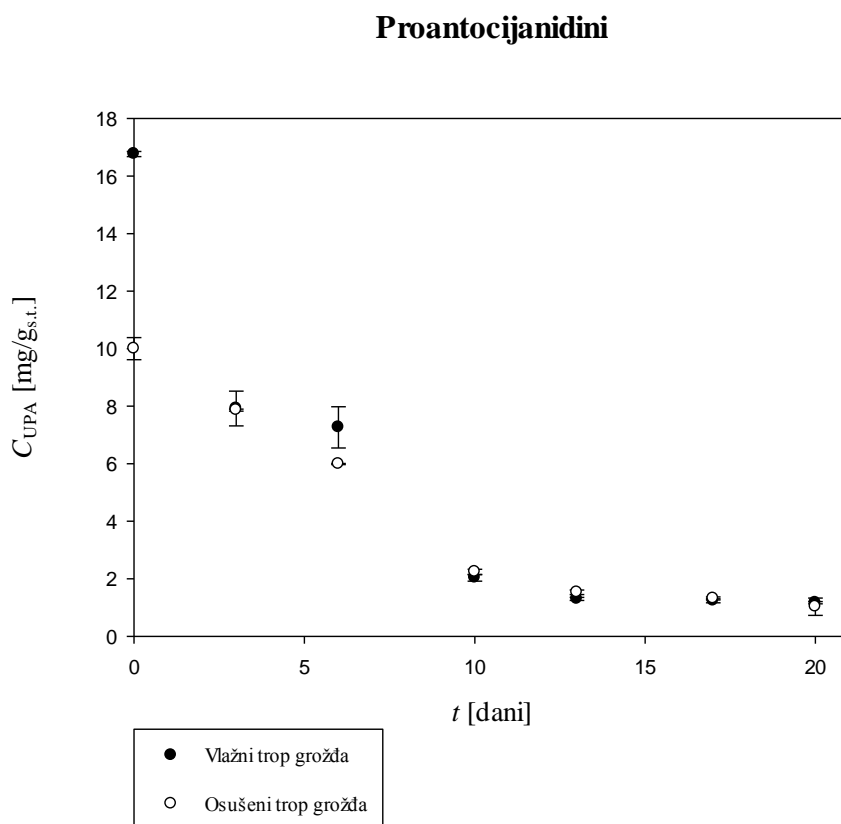
4.10.4. Udio ukupnih antocijanina u ekstraktima tropa grožđa

Ukupni antocijanini



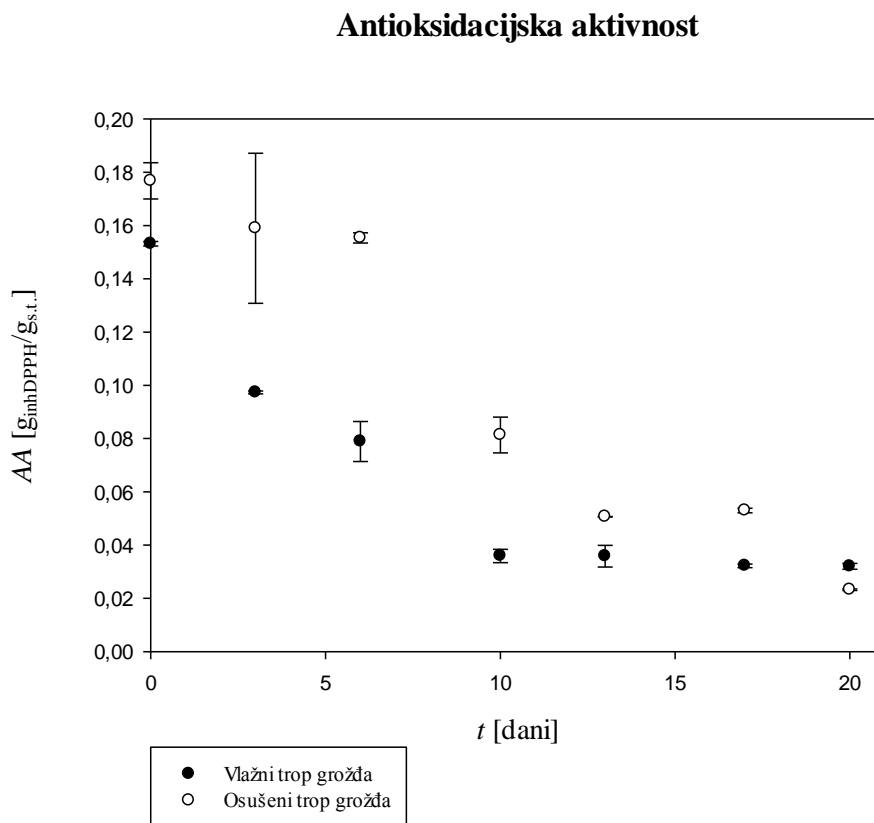
Slika 26 Udio ukupnih antocijanina (C_{AN}) u ekstraktima vlažnog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.10.5. Udio ukupnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa



Slika 27 Udio ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima vlažnog i osušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

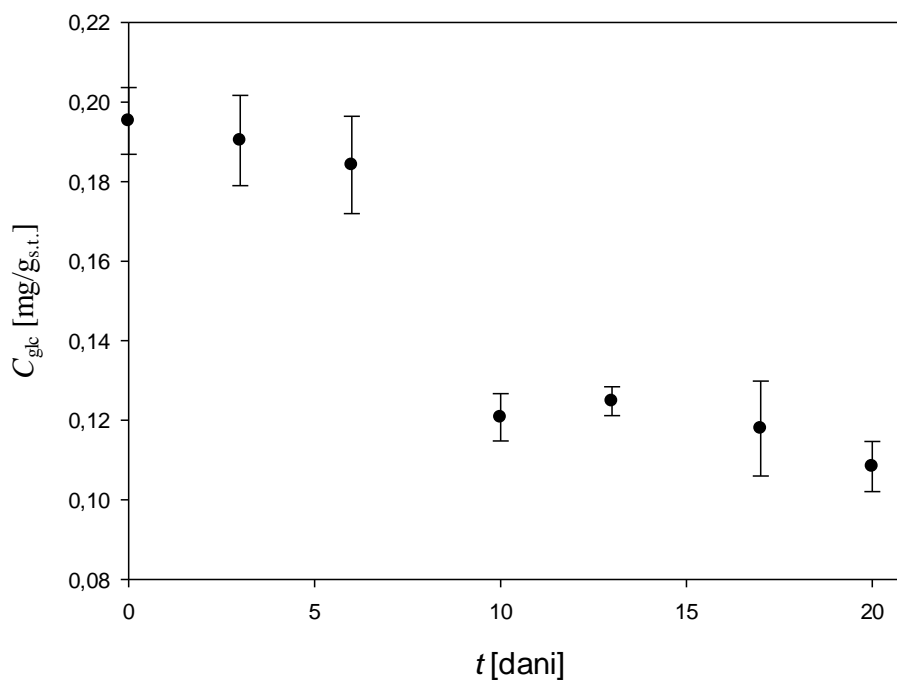
4.10.6. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa



Slika 28 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C) vlažnog i sušenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.10.7. Udio glukoze u ekstraktima tropa grožđa

Glukoza

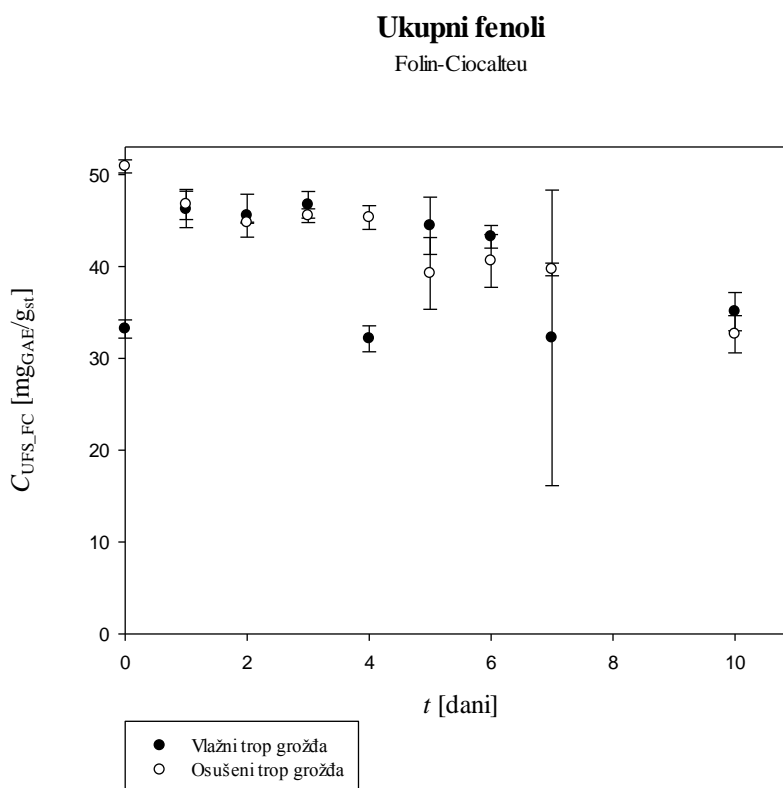


Slika 29 Udio glukoze u ekstraktima (uvjeti ekstrakcije: voda/30 min/27 °C) vlažnog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

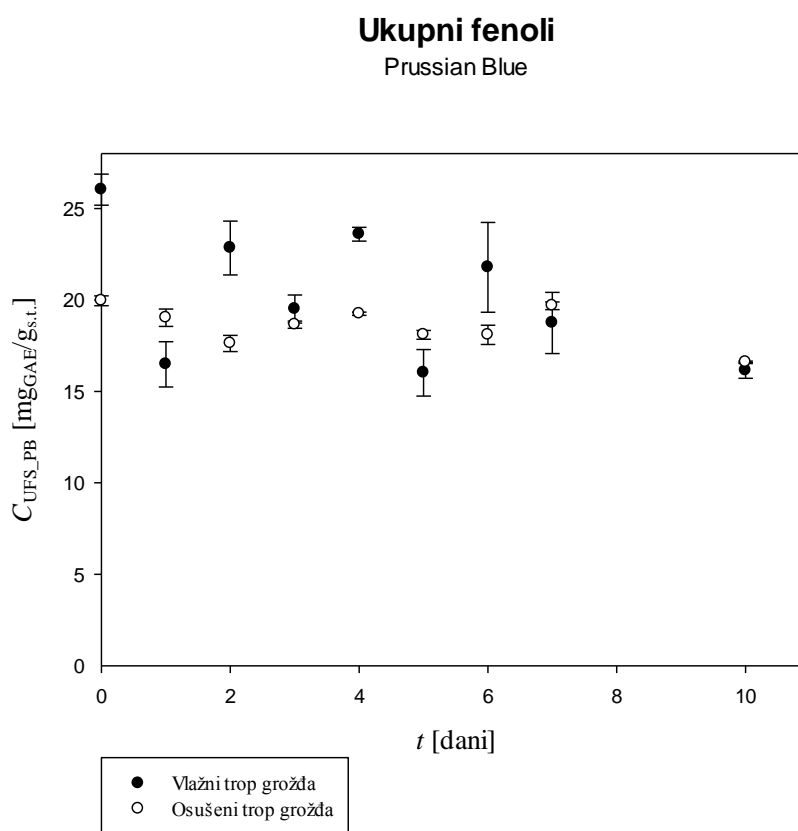
4.11. ESKPERIMENT 2 (E2)

U ovom poglavlju prikazani su rezultati za biološki obrađen trop grožđa pomoću *Trametes versicolor* nacijepljen na trop grožđa u obliku suspenzije spora. Suspenzija je pripravljena tako da je u 30 mL sterilizirane vode raspršeno 5 micelijskih diskova *T. versicolor*. Prikazani su rezultati za ekstrakte biološki obrađenog tropa grožđa prije i nakon sušenja s ciljem praćenja utjecaja sušenja na sadržaj ekstrahiranih tvari (fenolnih tvari, flavonoida, proteina, antocijanina, proantocijanidina) te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze određena je HPLC metodom u ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa. Svi uzorci uspoređeni su sa slijepom probom tj. s biološki neobrađenim tropom grožđa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti šest paralelnih ponavljanja uključujući i standardnu devijaciju te konverziju analiziranih spojeva.

4.11.1. Udio ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa

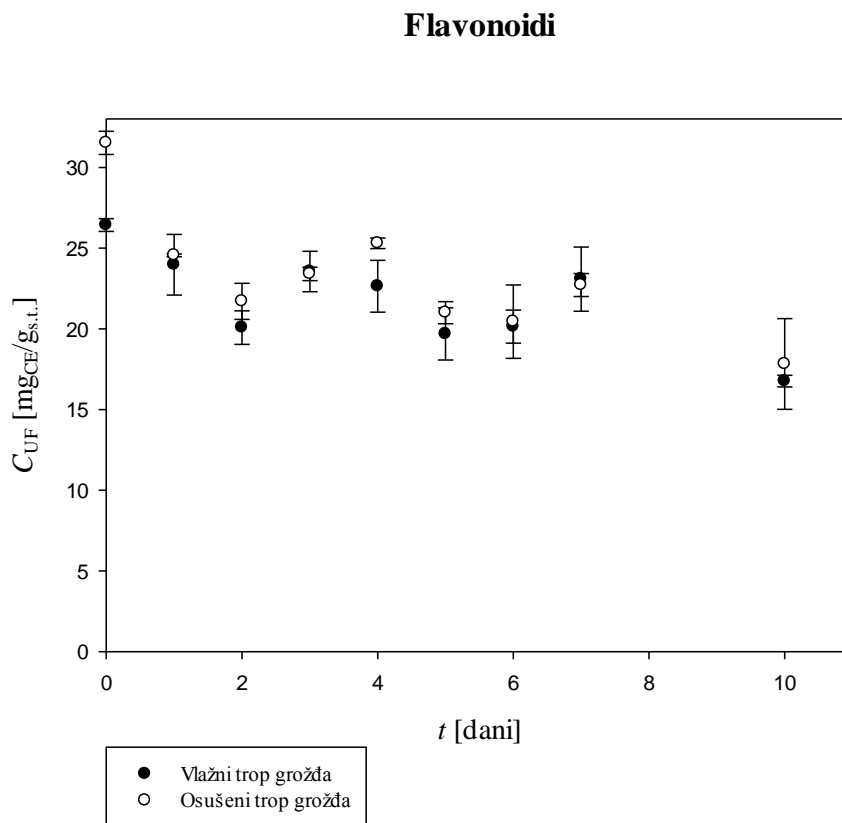


Slika 30 Udio ukupnih fenolnih spojeva (C_{UFS_FC}) u ekstraktima vlažnog i sušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)



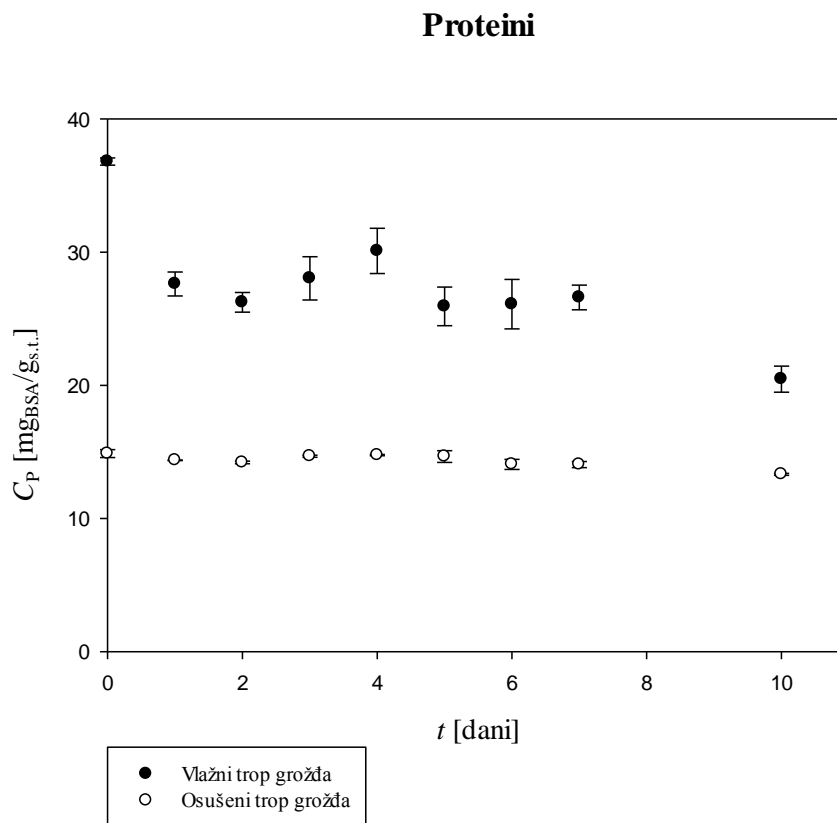
Slika 31 Udio ukupnih fenolnih spojeva (C_{UFS_PB}) u ekstraktima vlažnog i sušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)(uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.11.2. Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa



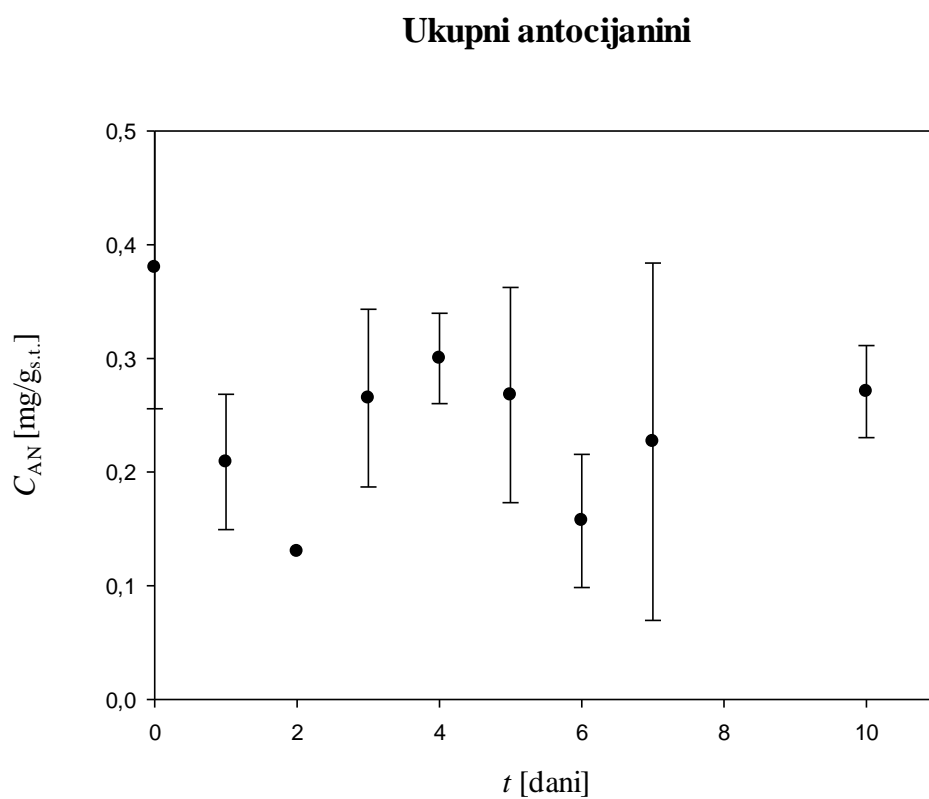
Slika 32 Udio ukupnih flavonoida (C_{UF}) u ekstraktima vlažnog i sušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.11.3. Udio ukupnih proteina u ekstraktima tropa grožđa



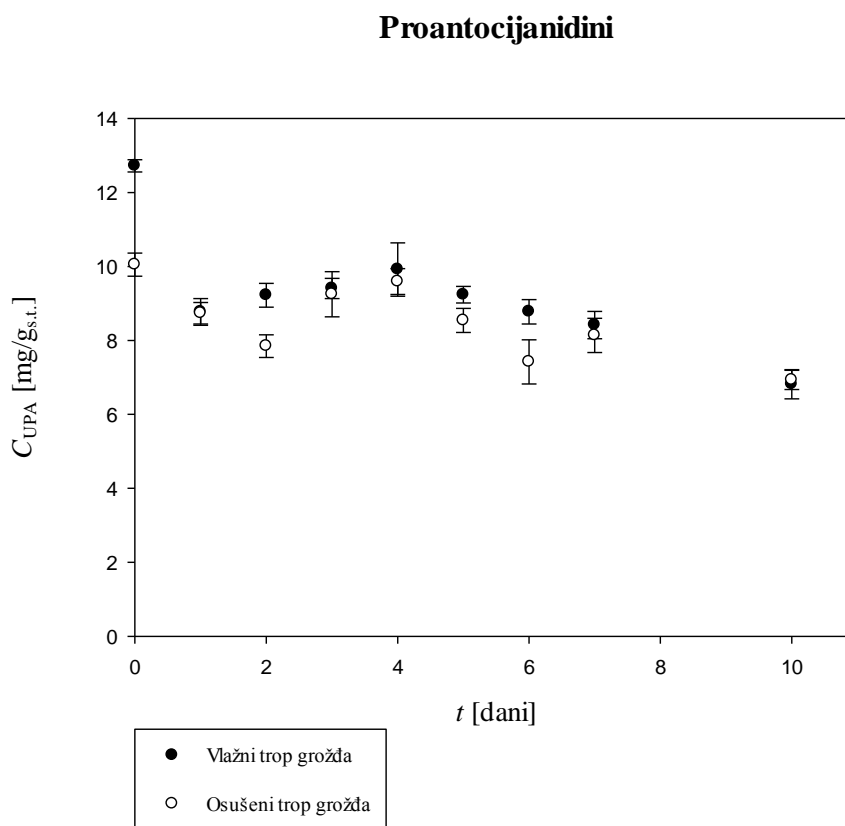
Slika 33 Udio ukupnih proteina (C_p) u ekstraktima vlažnog i sušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.11.4. Udio ukupnih antocijanina u ekstraktima tropa grožđa



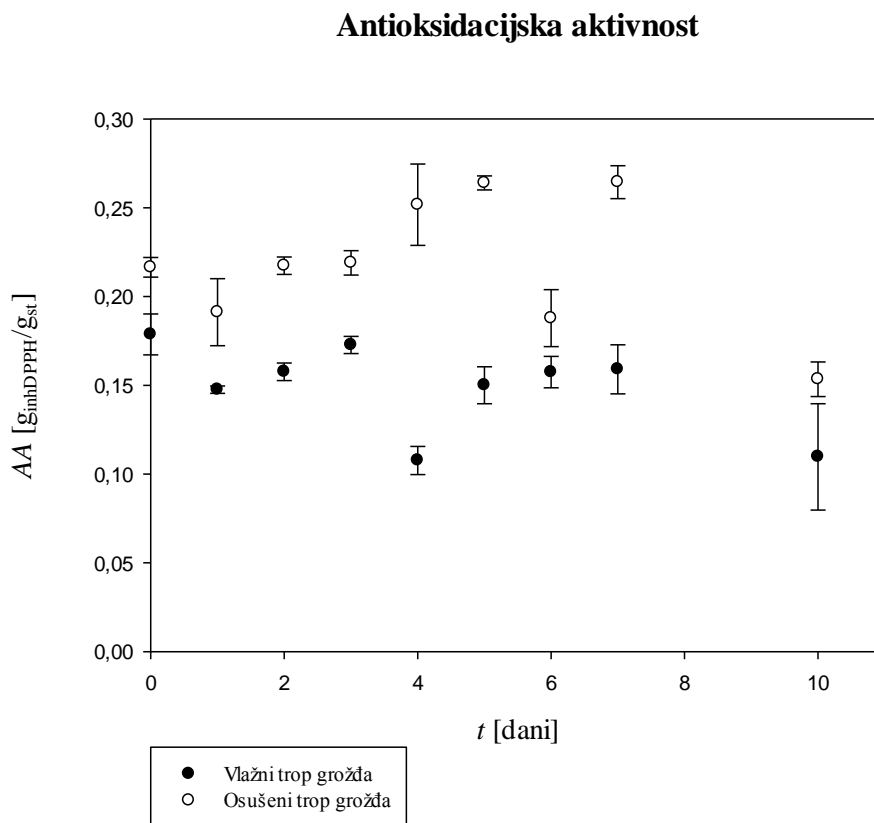
Slika 34 Udio ukupnih antocijanina (C_{AN}) u ekstraktima vlažnog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

4.11.5. Udio ukupnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa



Slika 35 Udio ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima vlažnog i sušenog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C; simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

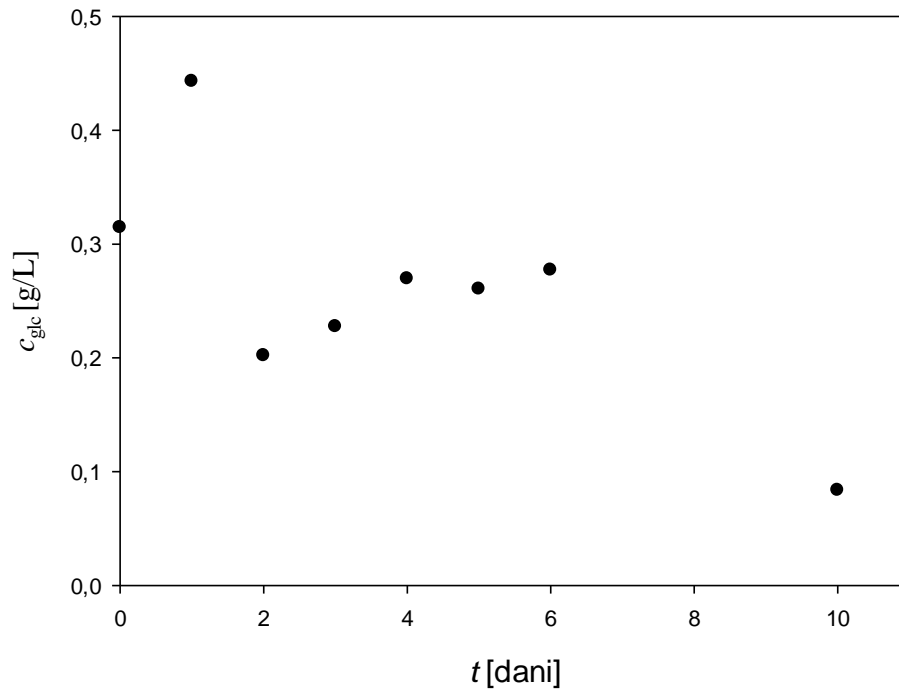
4.11.6. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa



Slika 36 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata (uvjeti ekstrakcije: 50% etanol/120 min/80 °C) vlažnog i sušenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (simboli-eksperimentalni podaci i standardna devijacija podataka)

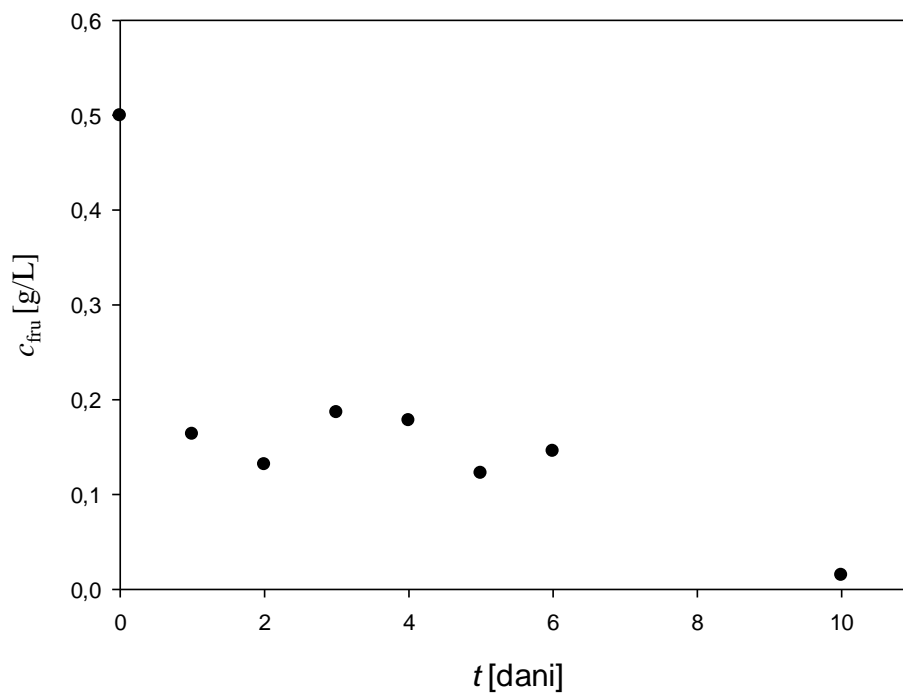
4.11.7. Određivanje pojedinačnih šećera HPLC metodom

Glukoza



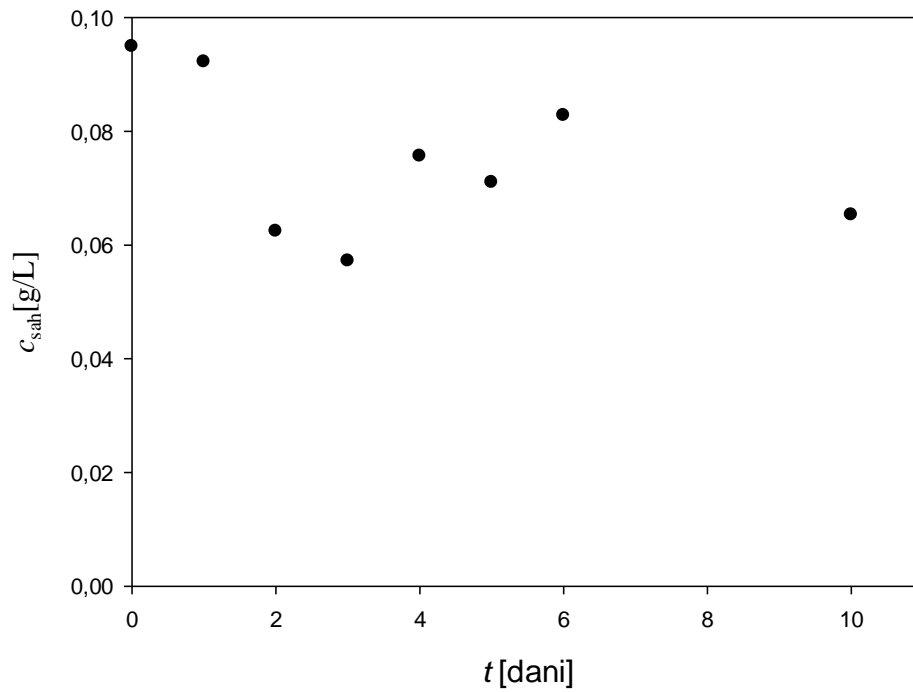
Slika 37 Masena koncentracija glukoze (c_{glc}) u ekstraktima vlažnog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) (uvjeti ekstrakcije: voda/30 min/27 °C)

Fruktoza



Slika 38 Masena koncentracija (c_{fru}) u ekstraktima vlažnog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) uvjeti ekstrakcije: voda/30 min/27 °C

Saharoza



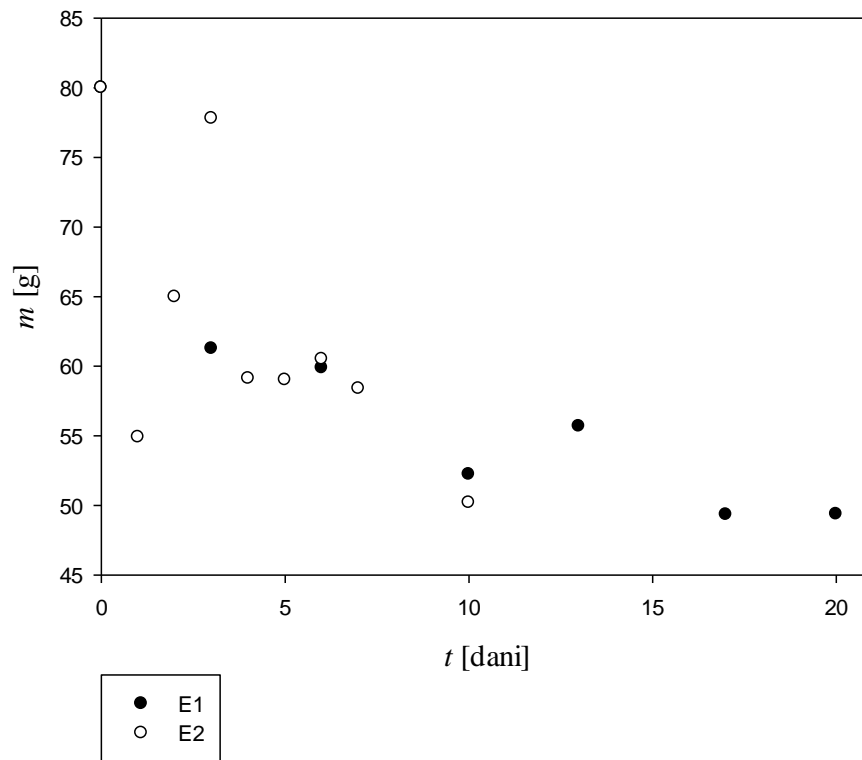
Slika 39 Masena koncentracija (c_{sah}) u ekstraktima vlažnog biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (t) uvjeti ekstrakcije: voda/30 min/27 °C)

Tablica 6 Ostvarene konverzije (X) analiziranih tvari tijekom postupka fermentacije s micelijskim diskovima *T. versicolor* u trajanju 20 dana (E1) i suspenzijom spora *T. versicolor* u trajanju 10 dana (E2)

	X [%]			
	E1		E2	
	Vlažni trop grožđa	Osušeni trop grožđa	Vlažni trop grožđa	Osušeni trop grožđa
Fenoli_FC	68,17	80,32	-5,70	35,88
Fenoli_PB	75,92	75,15	37,95	16,84
Flavonoidi	76,67	89,48	40,04	43,44
Proteini	71,71	67,53	44,39	10,46
Antocijanini	88,06	-	28,72	-
Proantocijanidini	93,04	89,71	46,39	31,00
Antioksidacijska aktivnost	79,11	86,86	38,62	29,11

Tablica 7 Korelacija udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta tijekom postupka fermentacije s micelijskim diskovima *T. versicolor* u trajanju 20 dana (E1) i suspenzijom spora *T. versicolor* u trajanju 10 dana (E2)

	R (E1)	R (E2)
C_{UFS} : AA (Folin Ciocalteu)	0,91	0,37
C_{UFS} : AA (Prussian Blue)	0,72	-0,05
C_{UF} : AA	0,91	0,16
C_{UPA} : AA	0,82	0,07



Slika 40 Ovisnost promjene mase troja grožđa o vremenu fermentacije (t) (simboli-eksperimentalni podaci za eksperimente E1 i E2)

5. RASPRAVA

Biološka obrada tropa grožđa sa *Trametes versicolor* provedena je u uvjetima *solid-state* fermentacije. Za provedbu ovakvog procesa važno je podesiti određene parametre kako bi se omogućio rast mikroorganizma. Istraživanje je provedeno u dva dijela koji se međusobno razlikuju po načinu naciepljivanja *T. versicolor* na supstrat. U oba dijela određen je udio fenolnih spojeva, flavonoida, proantocijanidina, antocijanina, proteina i glukoze. U drugom dijelu još je određen i udio pojedinih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza). Problem kod ovakvih procesa je postizanje homogenosti sustava što znatno može utjecati na krajnje rezultate.

U ovom istraživanju obrada dobivenih podataka provedena je u Excel programu, dok su grafovi izrađeni u programu SigmaPlot 12.0.

Iz eksperimentalno određenih apsorbancija dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem pomoću regresijskih jednadžbi (8 i 9) dobivenih iz kalibracijske krivulje (**Slika 14**), izračunate su masene koncentracije fenolnih tvari određene metodom prema Folin-Ciocalteu i izražene u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$). Na isti način izrađena je i kalibracijska krivulja (**Slika 15**) iz koje su dobivene regresijske jednadžbe (10 i 11) za izračun masene koncentracije fenolnih tvari određenih Prussian Blue metodom, čiji su rezultati također izraženi u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$). **Slika 16** prikazuje kalibracijsku krivulju iz koje su dobivene regresijske jednadžbe (12 i 13) za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida, a rezultati su izraženi u ekvivalentima (+)-katehina za ukupne flavonoide ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$). Za određivanje masene koncentracije proteina korištene su regresijske jednadžbe (14 i 15) dobivene iz kalibracijske krivulje prikazane na **Slici 17**. Masena koncentracija proteina izražena je ekvivalentima BSA za ukupne proteine ($\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{mL}$). Iz kalibracijske krivulje (**Slika 18**) dobivene su regresijske jednadžbe (16 i 17) za izračun masene koncentracije glukoze koja je izražena kao [$\text{mg}_{\text{glc}}/\text{mL}$].

Kalibracijske krivulje (**Slike 19- 21**) za izračunavanje pojedinih šećera HPLC metodom dobivene su iz vrijednosti koncentracija standardne otopine šećera i površina ispod pikova na dobivenom kromatogramu. Iz tako izrađenih kalibracijskih krivulja dobivene su regresijske jednadžbe za glukoze (jednadžba 18 i 19), fruktozu (jednadžba 20 i 21) i saharozu (jednadžba 22 i 23) na temelju kojih je izračunana masena koncentracija pojedinih šećera.

Masena koncentracija ukupnih antocijanina izračunana je prema jednadžbi 4, dok je masena koncentracija ukupnih proantocijanidina izračunana prema jednadžbi 5.

Rezultati svih određenih tvari u tropu grožđa preračunati su na masu suhe tvari tropa grožđa prema jednadžbi 24.

Antioksidacijska aktivnost izražena je u postotku inhibiranog DPPH (jednadžba 6), te je potom preračunata na suhu tvar tropa grožđa (jednadžba 7).

U prvom dijelu istraživanja biološka obrada tropa grožđa proveden je tijekom 20 dana, a uzorkovanje je vršeno svaka 3 - 4 dana. Udio fenolnih tvari u biološki neobrađenim uzorcima iznosio je 28,47 mg_{GAE/g_{s.t.}} prema Folin-Ciocalteovoj metodi i 20,41 mg_{GAE/g_{s.t.}} prema Prussian Blue metodi za vlažni trop i 41,25 mg_{GAE/g_{s.t.}} prema Folin-Ciocalteovoj metodi i 14,63 mg_{GAE/g_{s.t.}} prema Prussian Blue metodi za sušeni trop (*Slike 22-23*). Može se uočiti da je maseni udio ukupnih fenolnih tvari u vlažnom tropu grožđa kao i u osušenom tropu grožđa vremenom fermentacije opadao.

Određivanje ukupnih fenolnih tvari dvjema metodama provedeno je budući da je poznato da FC metoda nije strogo specifična samo za fenolne komponente nego može biti ometana prisustvom drugih spojeva (proteini, šećeri, askorbinska kiselina i dr.) koji reduciraju FC reagens dajući lažno više rezultate. Rezultati ovog rada upravo to potvrđuju budući da su dobivene niže vrijednosti za udio fenolnih tvari kod Prussian-Blue metode (do 53,9% za vlažan trop i do 66,3% za sušeni trop) koja je specifičnija za određivanje fenolnih tvari u odnosu na FC metodu. Isto tako udio fenolnih tvari određenih FC metodom bio je nešto viši u sušenim u odnosu na vlažne uzorke i ta razlika bila je veća kod nultog dana fermentacije (biološki neobrađenih uzoraka) te se smanjivala kod uzoraka podvrgnutih dužem vremenu fermentacije. Kod PB metode dobiveno je suprotno odnosno niže vrijednosti kod sušenih uzoraka. Navedena pojava se može ponovo objasniti sa nespecifičnošću FC reagensa samo za fenole budući da može reagirati s Maillardovim produktima (nastaju npr. reakcijom proteina i šećera) za koje je dokazano da se mogu stvarati pri sušenju dok PB reagens ne reagira s istim produktima.

Slika 24 prikazuje udio ukupnih flavonoida u vlažnom i sušenom tropu grožđa. Udio ukupnih flavonoida u biološki neobrađenom vlažnom tropu iznosio je 26,39 mg_{CE/g_{s.t.}} dok je u biološki neobrađenom suhom tropu iznosio 29,98 mg_{CE/g_{s.t.}}. U oba slučaja došlo je do smanjenja masenog udjela flavonoida tijekom 20 dana fermentacije.

Također možemo uočiti i smanjenje masenog udjela proteina u vlažnom i osušenom tropu grožđa (*Slika 25*). U osušenim uzorcima udio proteina je bio do 44,2% niži u odnosu na

vlažne uzorke što upućuje na to da je sušenje pri 45 °C utjecalo na smanjenje udjela proteina u ekstraktima. Iako je maseni udio antocijanina (*Slika 26*) varirao tijekom vremena fermentacije, vidljivo je da se njihov udio na kraju znatno smanjuje u odnosu na početnu vrijednost (0,68 → 0,08 mg/g_{s.t.}). Udio ukupnih proantocijanidina (*Slika 27*) u ekstraktima vlažnog tropa grožđa smanjio se sa 16,77 na 1,17 mg/g_{s.t.}, dok se udio kod ekstrakata suhog tropa grožđa smanjio sa 10,00 na 1,03mg/g_{s.t.}. Antioksidacijska aktivnost se u vlažnom i osušenom tropu grožđa (*Slika 28*) smanjivala kako je proces biološke obrade odmicao. Kod ekstrakata vlažnog tropa grožđa uočava se smanjenje sa 0,15 na 0,03 g_{inhDPPH}/g_{s.t.} te sa 0,18 na 0,02 g_{inhDPPH}/g_{s.t.} kod ekstrakata sušenog tropa grožđa. Antioksidacijska aktivnost veća je u ekstraktima suhih uzoraka tropa grožđa do 49,23%.

Udio glukoze u vlažnom tropu grožđa (*Slika 29*) smanjio se sa 0,20 na 0,11 g_{glc}/g_{s.t.} s vremenom fermentacije kao posljedica njezinog iskorištavanja za rast i razmnožavanje *T. versicolor*.

U drugom dijelu istraživanja biološka obrada tropa grožđa provedena je s suspenzijom *T. versicolor* u periodu od 10 dana, a uzorkovanje je vršeno svaki dan.

Općenito je vidljivo da se udio analiziranih tvari smanjio nakon 10 dana fermentacije u odnosu na neobrađeni uzorak, ali je bila znatno veća raspršenost rezultata tako da nije moguće izvesti precizne zaključke o utjecaju biološke obrade na udio analiziranih komponenti.

Udio ukupnih fenolnih tvari određenih Folin-Ciocalteuovom metodom u vlažnom topu grožđa varirao je tijekom 10 dana fermentacije u rasponu 32,14 – 46,71mg_{GAE}/g_{s.t.} (*Slika 30*) bez jasne slike o utjecaju vremena fermentacije dok je u sušenom tropu uočeno smanjenje udjela fenolnih tvari s napredovanjem fermentacije (50,89 → 32,63mg_{GAE}/g_{s.t.}). Udio fenolnih tvari u ekstraktima sušenog i vlažnog tropa bio je istog reda veličine uz iznimku za uzorke koji nisu bili biološki obrađeni gdje je udio fenola bio je veći za sušeni uzorak (za 34,8%). Rezultati dobiveni Prussian Blue metodom (*Slika 31*) također ukazuju na smanjenje udjela ukupnih fenolnih tvari s vremenom fermentacije (26,0 → 16,15 mg_{GAE}/g_{s.t.}) za ekstrakte vlažnog tropa grožđa i za ekstrakte suhog tropa grožđa (19,36 → 16,60 mg_{GAE}/g_{s.t.}). Udio ukupnih flavonoida u vlažnom i osušenom topu grožđa (*Slika 32*) prvog dana je padao, nakon čega se udio povećava do 4 dana te nakon 10 dana zamjećujemo znatno smanjenje udjela flavonoida. Kod vlažnog tropa uočavamo smanjenje udjela flavonoida sa 26,43 na 16,76mg_{CE}/g_{s.t.} te sa 31,52 na 17,83 mg_{CE}/g_{s.t.} kod suhog tropa. Udio ukupnih proteina opadao je do desetog dana

kako u vlažnom ($36,81 \rightarrow 20,47 \text{ mg}_{\text{BSA}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) (**Slika 33**) tako i u osušenom ($14,87 \rightarrow 13,31 \text{ mg}_{\text{BSA}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) tropu grožđa. Udio ukupnih antocijanina u vlažnom tropu grožđa (**Slika 34**) tijekom deset dana SSF smanjio se sa 0,38 na 0,27 $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. **Slika 35** predstavlja udio ukupnih proantocijanidina čiji udio smanjio sa 12,72 na 6,82 $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ kod vlažnog tropa, a kod suhog tropa sa 10,05 na 6,93 $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Antioksidacijska aktivnost se povećavala sve do 7 dana (**Slika 36**) kod sušenih uzoraka nakon čega dolazi do pada antioksidacijske aktivnosti. Tijekom 10 dana biološke obrade antioksidacijska aktivnost u ekstraktima vlažnog tropa grožđa smanjila se sa 0,18 na 0,11 $\text{g}_{\text{inhDPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$, a kod ekstrakata suhog tropa grožđa sa 0,22 na 0,15 $\text{g}_{\text{inhDPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Uočena je veća antioksidacijska aktivnost u ekstraktima suhih uzoraka tropa grožđa do 57,24%.

HPLC metodom određena je masena koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze u vodenim ekstraktima dobivenim tijekom 10 dana fermentacije. **Slika 37** prikazuje promjenu koncentracije glukoze tijekom 10 dana biološke obrade vlažnog tropa grožđa. Možemo uočiti da prvog dana biološke obrade imamo znatan porast glukoze. Budući da je glukoza građevna jedinica mnogih složenih šećera, njihovim cijepanjem oslobađa se glukoza i pridonosi povećanju ukupne koncentracije u ekstraktima. Međutim, glukoza kao jednostavan šećer predstavlja izvor ugljika kojeg mikroorganizmi prvog koriste, što onda objašnjava opadanje njene koncentracije do 10 dana. Početna koncentracija fruktoze (**Slika 38**) znatno je veća od početne koncentracije glukoze, budući da je fruktoza voćni šećer, te je logično da ima veću zastupljenost u tropu grožđa. Fruktoza, također jednostavan šećer, predstavlja lako dostupan izvor ugljika za mikroorganizme što objašnjava smanjenje njene koncentracije do 10 dana uz lagane oscilacije koncentracija tijekom procesa biološke obrade. Koncentracija saharoze u vlažnom tropu grožđa (**Slika 39**) pokazuje velike varijacije iz dana u dan, što je također posljedica cijepanja složenih šećera. Tijekom 10 dana biološke obrade uočeno je smanjenje glukoze sa 0,23 na 0,08 $\text{g}_{\text{gl}}/\text{L}$, fruktoze sa 0,41 na 0,01 $\text{g}_{\text{fru}}/\text{L}$ te saharoze sa 0,09 na 0,07 $\text{g}_{\text{sah}}/\text{L}$.

Tablica 6 prikazuje konverzije analiziranih tvari tijekom procesa biološke obrade vlažnog i osušenog tropa grožđa. Veće konverzije ostvarene su u prvom dijelu istraživanja (E1) budući da je biološka obrada duže trajala. U prvom, kao i u drugom eksperimentu najveće konverzije postignute su kod proantocijanidina.

Tablica 7 prikazuje korelaciju udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tijekom procesa fermentacije u E1 i E2. Koeficijent korelacije kreće se u rasponu $-1 \leq R \leq 1$. Ako je vrijednost koeficijenta korelacije R blizu nule ili jednaka nuli, to znači da je veza između varijabli x i y slaba ili ne postoji; što je vrijednost koeficijenta korelacije bliža ili jednaka 1 ili -1, to je veza između varijabli x i y jača.

U eksperimentu E1 korelacija udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti je $\geq 0,72$, što predstavlja jaku pozitivnu korelaciju, dok je u eksperimentu E2 korelacija udjela fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti $\leq 0,37$ što ukazuje na slabu korelaciju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka te statističke obrade istih doneseni su sljedeći zaključci:

- Biološka obrada otpada s *T. versicolor* utjecala je na smanjenje svih fenolnih spojeva kao i na smanjenje antioksidacijske aktivnosti u vlažnom i sušenom tropu grožđa
- Provedbom prvog dijela istraživanja (E1) konstatirano je:
 - smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva do 68,17% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 28,47mg_{GAE/g_{s.t.}}) i 80,32% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 41,25 mg_{GAE/g_{s.t.}}) (rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu metodom)
 - smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva do 75,92% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 20,41mg_{GAE/g_{s.t.}}) i 75,15% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 14,63 mg_{GAE/g_{s.t.}}) (rezultati dobiveni Prussian Blue metodom)
 - smanjenje udjela ukupnih flavonoida do 81,49% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 30,43m g_{CE/g_{s.t.}}) i 89,48% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 29,98 mg_{CE/g_{s.t.}})
 - smanjenje udjela proantocijanidina do 93,04% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 16,77 mg/g_{s.t.}) i 89,71% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 10,00 mg/g_{s.t.})
 - smanjenje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta do 79,11% u vlažnom tropu grožđa (antioksidacijska aktivnost u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 0,15g_{inhDPPH/g_{s.t.}}) i 86,86% u osušenom tropu grožđa (antioksidacijska aktivnost u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 0,18 g_{inhDPPH/g_{s.t.}})
- Provedbom drugog dijela istraživanja konstatirano je:
 - smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva do 35,88% u sušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 50,89 mg_{GAE/g_{s.t.}}) te povećanje udjela fenolnih spojeva u vlažnom tropu grožđa

- (Folin – Ciocalteu metoda)
- smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva do 37,95% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 26,03 mg_{GAE/g_{s.t.}} i 16,84% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 19,96 mg_{GAE/g_{s.t.}}) (rezultati dobiveni Prussian Blue metodom)
 - smanjenje udjela ukupnih flavonoida do 36,57% u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 26,43 mg_{CE/g_{s.t.}}) i 43,44% u sušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 31,52 mg_{CE/g_{s.t.}})
 - smanjenje udjela proantocijanidina do 46,39 % u vlažnom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 12,72 mg/g_{s.t.}) i 31,00% u osušenom tropu grožđa (početna koncentracija u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 10,05 mg/g_{s.t.})
 - smanjenje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta do 38,62% u vlažnom tropu grožđa (antioksidacijska aktivnost u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 0,18 g_{inhDPPH/g_{s.t.}}) i 29,11% u osušenom tropu grožđa (antioksidacijska aktivnost u biološki neobrađenom tropu grožđa iznosila je 0,22 g_{inhDPPH/g_{s.t.}})
- Masa tropa grožđa tijekom fermentacije smanjila se tijekom 20 dana za ~ 38% u E1, te za ~ 37% tijekom 10 dana u E2, što ukazuje na mogućnost razgradnje lignoceluloznog materijala pomoću *T. versicolor* te potencijal primjene razgrađenog tropa grožđa kao gnojiva
- Budući da biološka obrada tropa grožđa u ovom radu nije dovela do povećanja ekstrakcije fenolnih komponenti, može se zaključiti da *T. versicolor* razgrađuje fenolne spojeve te se da stoga ima potencijal u pročišćavanju otpadnih voda s ciljem smanjenja koncentracije štetnih fenolnih spojeva kao jednih od najvećih onečišćivača otpadnih voda industrije.

7. LITERATURA

- Altman A.: *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.
- Scribd Inc: *Antocijani*. 2014. <http://sr.scribd.com/doc/204835100/antocijani> [28.06.2014.]
- Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A.. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 475-487, 2006.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D.. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*: 69, 164-169, 2004.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review*. John Wiley & Sons, Inc, New York 56, 317 – 333, 1998.
- Bruce A., Palfreyman J. W.: *Forest products biotechnology*. Taylor & Francis LTD., London, 1998.
- Bucić-Kojić A.: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2008.
- Budini R., Tonelli D., Girotti S.: Analysis of Total Phenols Using the Prussian Blue Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 1236 – 1238, 1980.
- Chalermchat Y., Fincan M., Dejmeek P.. 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.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61**, 71-76., 1988.
- Floros J D., Rattray J., Liang H.. Mass transfer and diffusion in foods. U *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.
- Fuleren C-60 snažan antioksidans i lijek budućnosti: <http://www.nebeski-dar.hr/kristal-mjeseca/74-sungit.html> [30.06.2014.]

- Gadd G.M.: *Fungi in bioremediation*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge 2001.
- Giusti MM., Wrolstad RE: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*., John Wiley and Sons Inc., New York, 2001.
- Gomzi Z.: *Kemijski reaktori*. Udžbenici sveučilišta u Zagrebu, 2009.
- Harborne J.B, Baxter H, urednici. Handbook of natural flavonoids. Wiley & Sons, Chichester (UK), 1999.
- Harborne, J.B. Plant Phenolics. U: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- Kazazić S. P.. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*:55, 279-290, 2004.
- Lankinen P.: Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus biosporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media. *Academic Disertation in Microbiology*, Helsinki, 2004.
- Marinova D., Ribarova F., Atanassova M.. Total phenolic and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*: 40, 255-260, 2005.
- Michael Kuo: *Trametes versicolor: The Turkey Tail*, 2005. http://www.mushroomexpert.com/trametes_versicolor.html[28.06.2014.]
- Nacz M., Shahidi F.. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*:1054, 95-111, 2004.
- Nacz M., Shahidi F.. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: 41, 1523-1542, 2006.
- Ovando A.C., Hernandez L. P., Hernandez E. P., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A. Chemical studies od anthocyanins: A review, *Food Chemistry*:113, 859-871, 2009.
- Parr,A.J., Bolwell, J.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enchacement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 985-1012, 2002.

- Planinić M., Bucić A., Tomas S., Bilić M., Velić D., i Koceva Komlenić D. Fast moisture determination methods in flour samples. U *Proceedings of International Congress Flour-Bread'03 and 6. Croatian Congress of Cereal Technologists*, str. 102-108. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2004.
- Radovanović V.: *Tehnologija vina*. IRO Građevinska knjiga, Beograd, 1986.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Ribereau-Gayon P. and Sudraud P. (1976) *Sciences et Techniques du Vin*, Vol. 3: *Vinifications - Transformations du vin*, Dunod, Paris., 1976.
- Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N.. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*: 91, 21-40, 2001.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. In *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 2006.
- Shi J., Yu J., Pohorly J. E., Y. Kakuda. Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*: 6, 291-299, 2003.
- Skoog D. A., West D. M., Holler J. J.. *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Stratil P., Klejdus B., Kubán V.. 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.
- Strelec I., Kovač T. *Praktikum iz biokemije*; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.
- Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rižner Hraš A., Simonič M., Knez Ž.. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*: 89, 191-198, 2005.
- Thalero K., Thalero A.: *Foundations in microbiology*, Wm-C. Brown Publisher, USA, 1996.
- Webster J., Weber R.: *Introduction to fungi*, Cambridge University Press, Cambridge 2007.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*: 126, 485-493, 2001.

Wrolstad R.E.: Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties..*Journal of Food Science*:69, 419-425, 2004.

Xavier A. M. R. B., Tavares A. P. M., Ferreira R., Amado F.: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *Electronic Journal of Biotechnology*: 10, 444 – 451, 2007.

Young R.A., Masood A.: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*, Wiley, John & Sons, Inc., New York,1998.