

Optimiranje procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa metodom odzivnih površina

Božik Balog, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:178882>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

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

REPOZITORIJ

PTFS

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**

Vedrana Božik Balog

**OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA ULTRAZVUČNE
EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI IZ BRAŠNA SJEMENKI
GROŽĐA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada prihvaćena je na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2023./2024. održanoj 24. srpnja 2024.
Mentor: prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić
Pomoć pri izradi: dr. sc. Gordana Šelo

**OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE FENOLNIH TVARI IZ
BRAŠNA SJEMENKI GROŽĐA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA
Vedrana Božik Balog, 0113137624**

Sažetak:

U ovom radu ispitan je utjecaj tri procesna uvjeta ultrazvučne ekstrakcije (temperatura ekstrakcije: 40 – 60 – 80°C, vrijeme trajanja ekstrakcije: 10 – 25 – 40 min i koncentracija vodene otopine etanola: 30 – 60 – 90 %) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina iz brašna sjemenki grožđa te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata, metodom odzivnih površina prema Box–Behnkenovom planu pokusa. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji, a primijenjena je snaga ultrazvuka od 60% max. efektivne snage pri 37 kHz u *sweep* modu. Ekstrakt brašna sjemenki grožđana analiziran je spektrofotometrijski. Proces ekstrakcije najbolje je opisivao kvadratni model gdje je utvrđena jaka pozitivna korelacija ($R > 0,96$) između eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Koncentracija otapala je imala najveći utjecaj na ekstraktibilnost svih fenolnih tvari te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Numeričkom optimizacijom određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih tvari kako slijedi: temperatura 80 °C, koncentracija vodene otopine etanola 50% i vrijeme ekstrakcije 40 minuta. Prema kvadratnom modelu izračunato je da bi se pri navedenim uvjetima mogao ostvariti maksimalan prinos ukupnih fenolnih spojeva od 57,46 mg_{GAE/g_{s,t}}, ukupnih flavonoida od 20,67 mg_{CE/g_{s,t}}, ukupnih proantocijanidina od 11,99 mg/g_{s,t}, te antioksidacijska aktivnost ekstrakata prema DPPH metodi od 99,63 mg_{troloksa/g_{s,t}}, prema ABTS metodi od 269,93 mg_{troloksa/g_{s,t}} i FRAP metodi od 165,21 mg_{troloksa/g_{s,t}}.

Ključne riječi: ultrazvučna ekstrakcija, metoda odzivnih površina, fenolne tvari, brašno sjemenki grožđa

Rad sadrži: 43 stranica
11 slika
14 tablica
33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

1. prof. dr. sc. Mirela Planinić	predsjednik
2. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić	član-mentor
3. dr. sc. Gordana Šelo	član
4. prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study Food Engineering

Department of Process Engineering
Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X held on 24 July 2024.
Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.
Technical assistance: Gordana Šelo, PhD

**OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS
FROM GRAPE SEED MEAL BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**
Vedrana Božik Balog, 0113137624

Summary:

In this work, the influence of three process conditions of ultrasonic extraction (extraction temperature: 40 - 60 – 80 °C, extraction duration: 10 – 25 – 40 min and concentration of the aqueous ethanol solution: 30 – 60 – 90 %) on the extractability of total phenolic compounds, total flavonoids and total extractable proanthocyanidins from grape seed meal as well as on the antioxidant activity of the extracts was investigated using the response surface method according to the Box–Behnken experimental design. The extraction was carried out in an ultrasonic bath and an ultrasonic power of 60 % maximum effective power at 37 kHz in sweep mode. The grape seed meal extract was analyzed spectrophotometrically. The extraction process was best described by the quadratic model, which showed a strong positive correlation ($R > 0.96$) between the experimental and model-predicted data. The solvent concentration had the greatest influence on the extractability of all phenolic compounds and on the antioxidant activity of the extracts. The optimal conditions for the extraction of the phenolic compounds were determined by numerical optimization, as follows: temperature 80 °C, concentration of aqueous ethanol solution 50 % and extraction time 40 minutes. According to the quadratic model, it is predicted that under optimal conditions a maximum yield of total phenolic compounds of 57.46 mg_{GAE/g_{db}}, of total flavonoids of 20.67 mg_{CE/g_{db}}, of total proanthocyanidins of 11.99 mg/g_{db} and an antioxidant activity of the extracts of 99.63 mg_{trolox/g_{db}} according to the DPPH method, 269.93 mg_{trolox/g_{db}} according to the ABTS method and 165.21 mg_{trolox/g_{db}} according to the FRAP method could be achieved.

Key words: ultrasound extraction, response surface method, phenolic compounds, grape seed meal

Thesis contains: 43 pages
11 figures
14 tables
33 references

Original in: Croatian

Review and defence committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Mirela Planinić, PhD, full prof. | chair person |
| 2. Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof. | member |
| 3. Gordana Šelo, PhD | member |
| 4. Daliborka Kocova Komlenić, PhD, full prof. | stand-in |

Defence date: 27th September 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

27. rujna 2024.

TE OCIJENJEN USPJEHOM

izvrstan (5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc., Mirela Planinić

predsjednik

Mirela Planinić
(potpis)

2. prof. dr. sc., Ana Bucić-Kojić

član

Ana Bucić-Kojić
(potpis)

3. dr. sc., Gordana Šelo

član

Gordana Šelo
(potpis)

Veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić, na pomoći, savjetima, uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebna zahvala dr. sc. Gordani Šelo i univ. mag. techn. aliment. Gabrijeli Perković na bezuvjetnoj pomoći i susretljivosti prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojoj majci na ljubavi i podršci koju mi je pružala cijelog života pa tako i prilikom trajanja ovog studija.

Naposlijetku, najveću zahvalnost dugujem mome suprugu koji je najviše vjerovao i bio uz mene svake sekunde ovog studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROIZVODNI OSTACI INDUSTRIJE VINA	4
2.1.1. Sastav komine grožđa	4
2.1.2. Brašno sjemenki grožđa	6
2.2. FENOLNI SPOJEVI	6
2.3. EKSTRAKCIJA	9
2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće.....	9
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJALI	14
3.2.1. Uzorak.....	14
3.2.2. Kemikalije.....	14
3.2.3. Uređaji.....	14
3.3. METODE	15
3.3.1. Određivanje udjela suhe tvari u brašnu sjemenki grožđa.....	15
3.3.2. Ultrazvučna ekstrakcije fenolnih tvari	15
3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima.....	16
3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima	17
3.3.5. Određivanje ukupnih proantocijanidina u ekstraktima.....	18
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima DPPH metodom.....	19
3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima ABTS metodom.....	20
3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima FRAP metodom	21
3.3.9. Refraktometrijsko određivanje topljive suhe tvari u ekstraktima.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Određivanje suhe tvari brašna sjemenki grožđa.....	23
4.2. Utjecaj procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata	23
4.2.1. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na maseni udio fenolnih tvari.....	23
4.2.2. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata	29
4.3. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih otopljenih tvari u ekstraktima	34
4.4. Određivanje optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije metodom odzivnih površina.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	40

Oznake

A – apsorbancija

AA – antioksidacijska aktivnost [$\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

c – masena koncentracija fenolnih tvari [$\text{mg}_{(\text{GAE, CE})}/\text{mL}$]

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

df – stupnjevi slobode

DF – faktor razrijeđena

F – Fisherov koeficijent

l - duljina optičkog puta [cm]

m_{uz} – masa uzorka [g]

M - molarna masa [g/mol]

MS – varijanca

p – razina signifikantnosti

R – koeficijent korelacije

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti

T – temperatura ekstrakcije [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme ekstrakcije [min]

V_e – ukupni volumen dobivenog ekstrakta [mL]

$w_{\text{s.t.}}$ – udio suhe tvari u uzorku (%)

X_1 – ispitivana temperatura ekstrakcije [$^{\circ}\text{C}$]

X_2 – ispitivano vrijeme ekstrakcije [min]

X_3 – ispitivana koncentracija etanola [%]

Y – prinos fenolnih tvari (ukupnih otopljenih tvari) predviđen modelom

Kratice

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

CE – ekvivalenti katehina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

FRAP – engl. Ferric Reducing/Antioxidant Power

GAE – ekvivalenti galne kiseline

s.t. – suha tvar

TEAC – antioksidativni kapacitet ekvivalentan standardu troloksa (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

UFT – ukupne fenolne tvari

UFL – ukupni flavonoidi

UPA – ukupni ekstraktibilni proantocijanidini

Simboli

ε - koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina

φ – koncentracija vodene otopine etanola [%]

λ – valna duljina [nm]

1. UVOD

Ususret izazovima u obliku pronalaženja novih, ekološki prihvatljivih tehnologija, sve prerađivačke industrije pa tako i prehrambena usmjeravaju se ka održivoj proizvodnji koja podrazumijeva i zbrinjavanje te iskorištavanje otpadnih struja kroz proizvodnju visokovrijednih proizvoda. Stoga i industrija vina kao važan segment gospodarstva postaje veoma zanimljiva u pogledu načina iskorištavanja proizvodnih ostataka posebice u svrhu izdvajanja određenih bioaktivnih komponenti koje se dalje mogu upotrijebiti primjerice u proizvodnji funkcionalne hrane, dodataka prehrani ili u različitim formulacijama stočne hrane.

Kruti proizvodni ostatak vinarija poznat kao trop grožđa ili komina grožđa čini 20% do 30% mase prerađenog grožđa te ima veliki potencijal za iscrpljivanje bioaktivnih komponenti, čiji najveći udio čine fenolne tvari (Ferrer-Gallego i Silva, 2022). Komina grožđa sastoji se od kože, sjemenki, i opcionalno peteljki i predstavlja bogat izvor bioaktivnih fenolnih tvari.

Fenolne tvari predstavljaju najveću skupinu prirodnih spojeva koji imaju niz korisnih svojstava po ljudsko zdravlje, od kojih se najviše ističu antioksidacijska, antimikrobna, antikancerogena te antialergijska svojstva (Abotaleb i sur., 2020).

Kruto-tekuća ekstrakcija je najčešći separacijski postupak fenolnih spojeva iz prirodnih izvora, a njezina učinkovitost značajno ovisi o različitim procesnim uvjetima kao i o primijenjenoj metodi ekstrakcije (Manach i sur., 2004).

U ovom radu je naglasak na kruto-tekućoj ekstrakciji fenolnih tvari potpomognutoj ultrazvukom iz brašna sjemenki grožđa koje je dobiveno usitnjavanjem uljne pogače zaostale nakon hladnog prešanja sjemenki grožđa. Primjena ultrazvuka u ekstrakciji dovodi do dezintegracije stanične stjenke pri čemu je olakšan izlazak topljive tvari iz stanica te se posljedično povećava brzina prijenosa tvari odnosno brzina ekstrakcije (Drmić i Jambrak, 2010).

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj različitih procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (temperatura, vrijeme, koncentracija ekstrakcijskog otapala) na ekstraktibilnost fenolnih spojeva iz brašna sjemenki grožđa i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNI OSTACI INDUSTRIJE VINA

Proizvodni ostaci vinarija dijele se na krute ostatke poznate kao trop grožđa ili komina grožđa i tekuće ostatke od čega najveći dio čine otpadne vode vinarija. Procjenjuje se da trop grožđa koji se sastoji od kožice, sjemenki, pulpe i opcionalno peteljki čini 20 – 30% mase prerađenog grožđa (Ferrer-Gallego i Silva, 2022). S obzirom na to da je grožđe jedan od najviše uzgajanih kultura u svijetu navedene količine tropa grožđa nisu zanemarive te se posljednjih godina teži uspostavljanju odgovarajućeg sustava njegovog zbrinjavanja. Naime, uobičajena praksa vinarija je bila neplansko odlaganje tropa grožđa na deponije, u vinograde ili njegovo spaljivanje što u svim navedenim slučajima nepovoljno utječe na okoliš. Primjerice, ovisno o procesu vinifikacije, komina sadrži veći ili manji udio kiselina te nije pogodna za direktno korištenje kao vinogradsko gnojivo. S druge strane, ukoliko se komina propisno ne zbrine, njeno dugo stajanje može prouzročiti površinska i dubinska zagađenja u obliku zakiseljavanja tla, uklanjanja kisika iz tla i konačno, njenog prodiranja u tlo i zagađivanja podzemnih voda. Spaljivanjem dolazi do nastanka stakleničkih plinova, prvenstveno ugljikovog dioksida, koji imaju negativan utjecaj na okoliš. Sve navedeno negativno utječe na klimatske promjene i cijeli ekosustav, a posljedično i na smanjenu dostupnost hrane, te suvremena prehrambena i prerađivačka industrije teži uspostavljanju održive proizvodnje koja uključuje proizvodnju visokovrijednih produkata iz nastalih otpadnih struja. Komina se ističe bogatim kemijskim sastavom te postoje brojne mogućnosti njezinog korištenja, primjerice u proizvodnji biogoriva, enzima, farmaceutskih pripravaka, dodataka prehrani i sl.

Iako postoje brojne mogućnosti iskorištavanja komine grožđa ipak najveći fokus znanstvene zajednice je usmjeren na kominu grožđa zbog značajnog udjela bioaktivnih tvari, a posebice fenolnih tvari koji zbog svog antioksidativnog djelovanja predstavljaju dobru alternativu sintetičkim antioksidansima od kojih su neki i kancerogeni (Tsao, 2010). Nakon djelomične fermentacije i prvog pretoka mošta, u komini zaostaje do 70% fenolnih spojeva od ukupno prisutnih u grožđu te ovaj proizvodni ostatak ima visok potencijal u pogledu izolacije ovih bioaktivnih tvari.

2.1.1. Sastav komine grožđa

Udio pojedinih dijelova komine grožđa kao i njezin kemijski sastav ovisi o vrsti grožđa, agrotehničkim uvjetima uzgoja, geografskom položaju, procesu vinifikacije i brojnim drugim faktorima. Udio sjemenki grožđa u komini varira u rasponu 15 – 52 %s.t. a udio kožice grožđa

može iznositi i do 65 %s.t. tropa grožđa (Teixeira i sur., 2014). Ovisno o procesu vinifikacije poneka može sadržavati i peteljke.

Kožica grožđa je najzastupljeniji sastojak komine grožđa. Ona predstavlja vanjski omotač te ima ulogu zaštititi bobice od vanjskih utjecaja prilikom sazrijevanja. Kožica čini od 8 do 11% ukupne težine bobice. S obzirom na njenu primarnu ulogu, kožica je bogata proteinima i polisaharidima među kojima se ističu celuloza (20,8%) i hemiceluloza (12,5%) te pektini (Bucić-Kojić i sur., 2017). Nadalje, kožica obiluje taninima i polifenolnim tvarima posebice antocijanima koji imaju najveći utjecaj na organoleptička svojstva vina, ali značajan dio ovih spojeva zaostaje u komini grožđa. Ekstrakti kožice se najčešće koriste kao prirodna boje te u različitim funkcionalnim formulacijama. Koncentracija antocijana u komini crnih sorta grožđa kreću se od 287 mg do 4527 mg u 100g metilnog ekstrakta (Amico, 2004).

Peteljka čini kostur grozda te joj je glavna funkcija opskrba i svojevrsni transport hranjivih tvari od korijena i lišća do bobica. Peteljke grožđa čine 25% mase otpada koji nastane nakon proizvodnje vina. Uglavnom se smatraju otpadom i nemaju veliki značaj prilikom proizvodnje vina zbog niskog udjela šećera i visokog udjela tanina koji daju trpkost i gorčinu vinu iako su tanini u određenim nižim koncentracijama poželjni u vinu pogotovo u fazi bistrenja radi svog specifičnog svojstva vezanja i taloženja proteina (Pichler, 2019). Udio fenolnih tvari u peteljci iznosi oko 5,8 %, a najviše su zastupljeni flavanoli, flavonoli, fenolne kiseline i stilbeni. Osim toga, peteljka sadrži visok udio vlakana, prvenstveno celuloze, hemiceluloze i lignina zbog čega ima dobar potencijal biokonverzije u visokovrijedne produkte (dijetalna vlakna, polifenoli, biosorbenti i aktivni ugljen) iako se za sad najviše upotrebljava kao stočna hrana ili kao biognojivo (Bucić-Kojić i sur., 2017).

Sjemenka je onaj dio grozda iz kojeg klijanjem izrasta nova biljka te stoga najveći dio kemijskog sastava sjemenke predstavljaju upravo pričuvene tvari potrebne za inicijalni rast i razvoj. Sjemenke grožđa prosječno sadrže 40% vlakana, 16% ulja, 11% proteina, 1% masnih kiselina i 7% fenolnih tvari te druge tvari kao što su minerali, vitamini i šećeri (Bucić-Kojić i sur., 2017). Od fenolnih tvari najzastupljeniji su flavanoli, procijanidini dobiveni kondenzacijom flavanola te njihovi polimerni proantocijanidini ili kondenzirani tanini. Ti spojevi imaju glavnu ulogu u senzorskim svojstvima crnog vina, gdje doprinose ekstrakcijom iz sjemenki i kožice grožđa tijekom proizvodnje vina (Makris, Boskou i Andrikopoulos, 2007).

2.1.2. Brašno sjemenki grožđa

Najpoznatiji komercijalni proizvod iz sjemenki grožđa je ulje sjemeni grožđa koje zbog svoje stabilnosti uslijed prisustva nezasićenih masnih kiselina nalazi primjenu u kulinarstvu, kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Boja ulja kreće se od zelenkasto smeđe do zlatno žute te okusom podsjeća na orahe (Cindrić, 2019).

Ono u prosjeku sadrži 90% polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, posebice linolne kiselina (58 – 78%) i oleinske kiselina (3 – 15%) uz nizak sadržaj zasićenih masnih kiselina (do 10%). Pored toga groždano ulje sadržava i polifenolne, tokoferolne i druge bioaktivne komponente koje odlikuje dobra antioksidacijska aktivnost (Bali i sur., 2008).

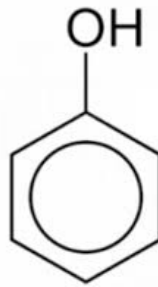
Kako bi se očuvale bioaktivne tvari ulja, ulje se najčešće dobiva hladnim prešanjem sjemenki grožđa iako ga je moguće dobiti i različitim postupcima ekstrakcije uz primjenu organskih otapala. Oduljena pogača zaostala nakon hladnog prešanja predstavlja brašno sjemenki grožđa koje još uvijek obiluje bioaktivnim komponentama koje se mogu ekstrahirati iz njega. Osim toga, oduljeno brašno se također može koristiti kao stočna hrana te u kulinarstvu.

2.2 FENOLNI SPOJEVI

Znanstvena istraživanja pokazuju da su fenolni spojevi imaju značajnu primjenu u prevenciji zdravlja te liječenju različitih bolesti (npr. kardiovaskularnih i neurodegenerativnih) zbog antioksidativnog, antimikrobnog, antiupalnog, antikancerogenog i dr. djelovanja. Zbog takvog djelovanja se svrstavaju u bioaktivne komponente. Nazivamo ih antioksidansima jer imaju za cilj štititi organizam od nakupljanja slobodnih radikala te na taj način štite organizam od oksidativnog stresa i posljedično bolesti (Abotaleb i sur., 2020). Kao prirodni antioksidansi, fenolni spojevi nalaze primjenu u proizvodnji različitih funkcionalnih proizvoda. Osim toga budući da utječu na organoleptička svojstva proizvoda, nalaze primjenu u različitim prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima.

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti sintetizirani u biljkama tijekom njihovog normalnog razvoja ili odgovora na stres. Vrlo su rasprostranjena skupina organskih spojeva, te ih je do danas nađeno i opisano više od 8000, te su klasificirani prema izvoru podrijetla, biološkoj funkciji te kemijskoj strukturi. Zbog nemogućnosti ljudskog ili životinjskog organizma da ih sintetizira, često se još nazivaju i biljni spojevi (Tsao, 2010).

Građeni su od minimalno jednog aromatskog prstena na koji mogu biti vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (**Slika 1**). Općenito se dijele u više skupina kao što su fenolne kiseline, flavonidi, stilbeni i lignani.



Slika 1 Strukturna formula fenola

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su skupina fenolnih tvari koji čine jednu trećinu ukupnih fenolnih tvari. U svojoj strukturi sadrže aromatski prsten sa najmanje jednom karboksilnom skupinom i jednom hidroksidnom kiselinom. Dije se na derivate benzojeve (struktura C6 – C1) ili derivate cimetine (struktura C6 – C3) kiseline (**Tablica 1, Slika 2**)(Grgić i sur., 2020). U biljnim tkivima ih najmanje možemo zateći u slobodnom obliku, a najčešće su vezane esterskim ili glikozidnim vezama na druge prirodno prisutne komponente.

Tablica 1 Podjela fenolnih kiselina na temelju podrijetla (Grgić i sur., 2020)

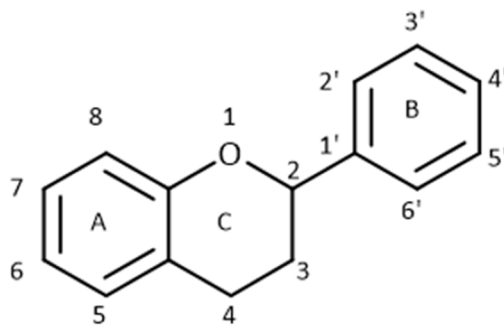
Derivati benzojeve kiseline			
	<i>R</i>₁	<i>R</i>₂	<i>R</i>₃
Galna kiselina	OH	OH	OH
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	H	OH	H
3,4-hidroksibenzojeva kiselina	OH	OH	H
Vanilinska kiselina	OCH ₃	OH	H
Siringinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃
Benzojeva kiselina	H	H	H
Derivati cimetine kiseline			
<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	OH	H
Kafeinska kiselina	OH	OH	H
Ferulinska kiselina	OCH ₃	OH	H
Sinapinska kiselina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Cimetna kiselina	H	H	H



Slika 2 Osnovne strukture derivata benzojeve i cimetine kiseline

Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljenija skupina fenolnih tvari. Otkriveno je i opisano više od 4000 organskih spojeva koji se sa svojim svojstvima mogu zajedno grupirati u skupinu flavonoida. Strukturno sadrže 15 atoma ugljika koji su raspoređeni u dva aromatska prstena (A i B) povezana preko heterocikličkog prstena C koji sadržava kisik (**Slika 3**). Strukturna raznolikost flavonoida je posljedica vezanja različitih organskih skupina poput hidroksilnih, metoksi i glikozidnih na prstenove A, B, C zasićenim ili nezasićenim kovalentnim vezama (Šelo, 2022). Flavonoidi se pojavljuju u glikozidnom obliku vezani za jednostavne ugljikohidrate (šećere) te su upravo zbog toga flavonoidi topljivi u vodi.



Slika 3 Osnovna kemijska struktura flavonoida (Grgić i sur., 2020)

Ovisno o razlikama u strukturnim karakteristikama, flavonoidi se dijele u različite podskupine kao što su flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavoni, flavanoni i antocijane. Flavonoidi su i nosiocci boje biljnog materijala (**Tablica 2**).

Tablica 2 Podjela flavonoida prema boji koju nose i izvoru (Besten, 2011)

Boja	Izvor
Purpurni, plavi i crveni antocijani	Grožđe, bobičasto voće, šljive, patliđan
Žuti antocijani	Jabuka, luk, krumpir, cvjetača
Tanini koji konvertiraju u smeđe pigmente	Jabuke, grožđe, čaj

2.3. EKSTRAKCIJA

Pod pojmom ekstrakcije podrazumijeva se izdvajanje određene komponente iz smjese tvari (krute smjese, otopine ili suspenzije) na temelju njezine različite topljivosti u nekom otapalu. Najznačajniji parametri provedbe ekstrakcije jesu temperatura i trajanje postupka ekstrakcije te pravilan izbor otapala. Temperatura i vrijeme procesa ekstrakcije trebaju biti takvi da ubrzaju provedbu istog dok s druge strane ne smiju imati degradacijski efekt na komponentu koja se želi izdvojiti. Uobičajene temperature ekstrakcije kreću se od 32° do 80°C dok vrijeme ekstrakcije može biti od 5 minuta do 48 sati (Bucić-Kojić i sur. 2007). Ekstrakcijsko otapalo prije svega treba biti selektivno, da što bolje otapa samo željenu komponentnu iz smjese tvari dok ostale komponente zaostaju u polaznom materijalu. Nadalje, ekstrakcijsko otapalo treba imati nisku viskoznost te stvarati nižu napetost površine, mora biti inertno, nekorozivno te mora imati nižu temperaturu vrelišta kako bi se što lakše ispitivana komponenta odvojila od istog. Kao najbolji izbor ekstrakcijskih otapala kod ekstrakcije polifenolnih komponenata iz proizvodnih ostataka vinske industrije pokazale su se vodene otopine alkohola (metanola, etanola itd.) (Bucić-Kojić 2008). Na temelju agregatnog stanja smjese tvari iz koje izdvajamo određenu komponentu, ekstrakciju možemo podijeliti na ekstrakciju kruto- tekuće te ekstrakciju tekuće- tekuće.

2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Naziv pod kojim se u literaturi može naći kruto-tekući princip ekstrakcije je izluživanje. Kruto tekuća ekstrakcija se može provesti na nekoliko načina. Prva je perkolacija. Pod perkolacijom podrazumijevamo prolaz otapala kroz nepomičnu, poroznu krutu smjesu tvari. Prolaskom otapala dolazi do prijelaza ekstrahirane komponente iz krute smjese tvari u otapalo koje ju prolaskom „odnosi“. Drugi način provedbe ekstrakcije kruto-tekuće je maceracija. Maceracija predstavlja potapanje krute smjese tvari u otapalu na nižim temperaturama te ostavljanje u tim uvjetima na duži period uz povremeno miješanje. Nadalje, digestija je način provedbe

ekstrakcije kruto-tekuće, a naziva se još i topla maceracija, jer je princip provedbe isti jedino se kod ove tehnike koriste više temperature što značajno skraćuje vrijeme ekstrakcije.

Mehanizam procesa ekstrakcije kruto-tekuće zasniva se na stvaranju sloja zasićene otopine (otapalo i ekstrahirana komponenta) na površini krute tvari iz koje se odvija ekstrakcija. Prijenos otopljene komponente iz graničnog sloja zasićene otopine u otapalo odvija se radi razlike u koncentracijskom gradijentu. Otopljena komponenta prelazi s mjesta veće koncentracije na mjesto manje koncentracije u otopini sve dok se koncentracije ne izjednače odnosno dok se ne uspostavi ravnoteža. Prijenos tvari odvija se procesom difuzije koja predstavlja kombinaciju molekulske i konvekcijske difuzije.

Brzina prijelaza topljive komponente iz krute smjese tvari prilikom izluživanja jeste ona količina tvari koja u određenom vremenskom intervalu prijeđe iz krute smjese tvari u otapalo. Brzina ekstrakcije ovisi o nekoliko parametara. Što je veća razlika u koncentracijskom gradijentu, između površinskog sloja zasićene otopine i glavne otopine, brzina ekstrakcije će biti veća. To se može postići stalnim dotokom svježeg otapala u sustav i odvođenjem otopine. Drugi način postizanja veće razlike u koncentracijskom gradijentu predstavlja povećanje temperature, ali ono ne smije biti preveliko da ne bi došlo do degradacije termolabilnih bioaktivnih komponenti koje se ekstrahiraju. Povećanje brzine ekstrakcije može se postići i povećanjem dodirne površine između krute tvari i otapala. Povećanje brzine protoka otapala i stvaranje turbulentnih uvjeta u sustavu povećava brzinu ekstrakcije. Također, na brzinu prijelaza i otapanja topljive ekstrahirane komponente može se utjecati i dezintegracijom krute netopljive tvari. Na taj način se olakšava i ubrzava prodor otapala do željenih topljivih komponenti smjese, temperatura procesa ekstrakcije može biti manja te je očuvanost termolabilnih komponenti ekstrakta veća. Kruto-tekuća ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jedan od načina dezintegracije krute tvari (Tomas, Planinić i Bucić-Kojić, 2013).

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Jedan od načina izdvajanja fenolnih spojeva iz biljnog materijala koji ispunjava uvjete „zelene tehnologije“ jest ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija. Ultrazvuk prema njegovoj primjeni možemo podijeliti na osnovu količine proizvedene energije, snazi zvuka te intenzitetu snage.

Ultrazvuk može biti visokog intenziteta i niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta radi pri nižim frekvencijama i većim snagama te se koristi za nedestruktivne analize i procjenu kvalitete, dok ultrazvuk visokog intenziteta koristi visoke frekvencijske raspone i male snage te ima svoje područje primjene za ubrzavanje i progresiju efektivnosti pripreme uzoraka

(Pavlović, 2020). Na proces ekstrakcije potpomognute ultrazvukom utječu procesni parametri kao što je vrsta uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju, frekvencija i snaga ultrazvuka, temperatura, vrijeme ekstrakcije vrsta i koncentracija otapala te priroda samog materijala (Pavlić, 2017).

Za potrebu ekstrakcije koristi se ultrazvuk visoke snage, a niske frekvencije (18 – 40 kHz) koji se temelji na fenomenu kavitacije. Pod kavitacijom podrazumijevamo urušavanje mjehurića nastalih djelovanjem longitudinalnih valova kroz tekućinu pri određenom temperaturnom intervalu i pod određenim tlakom pri čemu dolazi do pucanja stanične stjenke te bržeg prodiranja otapala u materijal i bržeg prijenosa ekstrahirane tvari u glavnu masu otapala (Drmić i Jambrak, 2010). Za svaku kavitaciju je poželjno da se događa pri što manjim temperaturama jer tako dolazi do manje degradacije tvari koju želimo ekstrahirati.

Fizikalne karakteristike odabranog otapala za ekstrakciju poput viskoziteta, tlaka para iznad otapala, dielektrične konstante te površinske napetosti direktno utječu na selektivnost ekstrakcije te na konačni kemijski sastav ekstrakta. Zato je kod otapala koje ima veću viskoznost i površinsku napetost smanjen utjecaj ultrazvučne kavitacije na prijenos željenih komponenti iz uzorka u ekstrakt te se u tim slučajevima primjenjuje zračenje većeg intenziteta (Chemat i sur., 2017).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom značajno smanjuje vrijeme potrebno za ekstrakciju željenih komponenata, uz veće iskorištenje i kvalitetu samog ekstrakta a osim toga, kao zasebna metoda, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija može se koristiti i kao predtretman sofisticiranijim metodama ekstrakcije (Pavlović, 2020).

2.4. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Učinkovitost svakog separacijskog procesa značajno ovisi o brojnim procesnim uvjetima te je za postizanje maksimalne učinkovitosti procesa potrebno pronaći optimalne procesne uvjete. Budući da se uglavnom radi o velikom broju faktora koji utječu na promatrani proces potrebno je optimirati glavne parametre procesa. U slučaju ekstrakcije to su uglavnom vrsta i koncentracija otapala, vrijeme ekstrakcije, temperatura, omjer kruto-tekuće, veličina čestica uzorka i sl. Postoje različite metode optimizacije, ali za ekstrakciju bioaktivnih tvari iz biljnog materijala korisna se pokazala metoda odzivnih površina.

Metoda odzivnih površina je multivarijantna statistička i matematička tehnika koja uzima u obzir utjecaj parametara, ali i njihovu međusobnu interakciju uz minimalan potrebnih eksperimenata što pridonosi uštedi vremena, materijala, kemikalija (Jing, Dong i Tong, 2015).

Prema ovoj metodi potrebno je odabrati odgovarajući plan pokusa prema kojem se provode eksperimenti na osnovi čega se prema određenom matematičkom modelu aproksimiraju eksperimentalni podaci te se dobiva odzivna ploha koja daje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Za aproksimaciju podataka koji se mogu opisati linearnim modelom koristi se faktorijski plan pokusa dok se za one podatke koji se ne mogu aproksimirati linearnim modelom koristi plan pokusa za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su Box-Behnken dizajn, središnji kompozitni dizajn i Doehlert dizajn (Bezerra i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj različitih procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (temperatura, vrijeme i koncentracija ekstrakcijskog otapala) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina iz brašna sjemenki grožđa te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Nadalje, cilj je bio odrediti optimalne uvjete za ekstrakciju fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa primjenom navedene metode ekstrakcije.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Uzorak

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korišten je uzorak brašna sjemenki grožđa koji je dobiven od vinarije Trs (Ilok) te je čuvan u hladnjaku na + 4 °C. Korišteni uzorak brašna sjemenki grožđa predstavlja usitnjenu uljnu pogaču zaostalu nakon hladnog prešanja sjemenki grožđa.

3.2.2. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije: apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), butanol (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), galna kiselina, katehin (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), natrijev hidroksid, natrijev nitrit (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), troloks (Acros Organics, Geel, Belgija), klorovodična kiselina (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka), natrijev karbonat, željezov(II)sulfat heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), aluminijev(III)klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Kandel, Njemačka) i Folin-Ciocalteu reagens (CPAchem, Bogomilovo, Bugarska).

3.2.3. Uređaji

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći laboratorijski uređaji:

- analitička vaga Nimbus NBL-214i (Adam Equipment, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo)

- centrifuga Z 326 K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic P120 H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- vorteks miješalica DLab MX-S (Los Angeles, SAD)
- automatski digitalni refraktometar RX-7000 α (Atago, USA)
- Analizator vlage HR 73 (Mettler Toledo, Zürich, Švicarska)

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje udjela suhe tvari u brašnu sjemenki grožđa

Udio suhe tvari određen je termogravimetrijskom metodom korištenjem analizatora vlage. Određena masa uzorka (3g) stavljena je u aluminijsku posudicu, koja je zatim postavljena na integriranu vagu unutar komore za sušenje. Uzorak je sušen do postizanja konstantne mase. Sušenje je provedeno pri temperaturi od 105 °C standardnom metodom koja kao kriterij završetka procesa uzima gubitak mase od 1 mg u 50 sekundi.

3.3.2. Ultrazvučna ekstrakcije fenolnih tvari

Ultrazvučna ekstrakcija je provedena pri kruto-tekućem omjeru 40 mL/g. Eksperimenti su provedeni u ultrazvučnoj kupelji u sweep modu pri 37 kHz. Ispitan je utjecaj tri procesna uvjeta u tri razine prikazane u **Tablici 3** na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina iz brašna sjemenki grožđa na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Eksperimenti su provedeni pri petnaest kombinacija procesnih uvjeta temeljenih na Box-Bhenkenovom planu pokusa (**Tablice 3 i 4**). Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 10000g tijekom 10 minuta te je odvojen supernatant (tekući ekstrakt) koji je korišten za analize.

Tablica 3 Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata brašna sjemenki grožđa

Faktor	Donja razina	Centralna razina	Gornja razina
Temperatura (X_1 , °C)	40	60	80
Vrijeme (X_2 , min)	10	25	40
Koncentracija vodene otopine etanola (X_3 , %)	30	60	90

Dobiveni eksperimentalni podaci (**Tablica 4**) su aproksimirani sa matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda prema izrazu (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gdje su :

Y – modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma (odsječak)

β_i – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

Temeljem dobivenog matematičkog modela konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na proces ekstrakcije fenolnih spojeva.

Statistička analiza (ANOVA) značajnosti utjecaja ispitivanih procesnih uvjeta na ekstrakciju fenolnih spojeva i na antioksidacijsku aktivnost, određivanje koeficijenata regresije nelinearnom regresijom, te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softerskog paketa Design Expert 12.

3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima

Ukupne fenolne tvari određene su spektrofotometrijski mikro Folin- Ciocalteuovom metodom (Waterhouse, 2001). Metoda se temelji na oksidacijskim i redukcijским reakcijama. Fenolni spojevi se oksidiraju u alkalnoj sredini uz prisustvo Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenove kiseline) dok se kiseline koje tvore Folin-Ciocalteu reagens reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid od kojih potječe plavo obojenje otopine čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrijski pri 765 nm (Stratil, Klejdus i Kuban, 2006).

Postupak

Volumen od 40 μL ekstrakta brašna sjemenki grožđa je otpipetiran u epruvete u koje je potom dodano 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj epruveta je ostavljen na stalku 8 minuta i 30 sekundi, nakon čega je u svaku epruvetu dodano 600 μL 20%-

tne vodene otopine natrijevog karbonata, te je reakcijska otopina vorteksirana, a potom inkubirana pri 40 °C tijekom 30 minuta. Slijepa proba je pripremljena na isti način, samo je umjesto ekstrakta dodan jednak volumen (40 µL) destilirane vode. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija reakcijske otopine pri 765 nm, a iz dobivenih apsorbancija (A) preko jednadžbe pravca (2) koji je dobiven linearnom regresijom iz kalibracijske krivulje izračunate su masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari izražene u ekvivalentima galne kiseline (GAE) koja je korištena kao standard (c , mg_{GAE}/mL):

$$c_{UFT} = 1,007 \cdot A + 0,0167 \quad [\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}] \quad (2)$$

Nakon toga, konačne koncentracije ukupnih fenolnih tvari preračunate na suhu tvar uzorka (C , mg_{GAE}/g_{s.t.}) prema formuli (3):

$$C_{UFT} = \frac{c \cdot V_e \cdot DF}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100 \quad [\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}] \quad (3)$$

C – maseni udio fenolnih tvari [mg_{GAE}/g_{s.t.}]

c – masena koncentracija ukupnih fenolnih tvari [mg_{GAE}/mL]

V_e - volumen ukupno dobivenog ekstrakta [mL]

DF - faktor razrjeđenja ekstrakta za potrebe određivanja ukupnih fenolnih tvari

3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima

Ukupni flavonoidi određeni su spektrofotometrijskom metodom uz primjenu aluminijevog klorida, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 510 nm (Marinova, Ribarova i Atanassova, 2005).

Postupak

Mjerenje je provedeno tako da je u epruvete dodano 2 mL destilirane vode, zatim je dodano 0,5 mL ekstrakta te 0,15 mL 5 % (w/v) natrijevog nitrita. Nakon pet minuta dodano je 0,15 mL 10 %-tne vodene otopine aluminijevog klorida heksahidrata, a nakon 6 minuta dodan je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida. Reakcijska smjesa je nadopunjena s 1,2 mL destilirane vode. Slijepa

proba je pripremljena na isti način, pri čemu je umjesto ekstrakta dodan jednak volumen (0,5 mL) destilirane vode. Sadržaj epruveta je promiješan na vorteksu, nakon čega je odmah izmjerena apsorbancija pri 510 nm. Dobivene apsorbancije korištene su za izračun masene koncentracije ukupnih flavonoida koristeći jednadžbu pravca (4) dobivenu linearnom regresijom podataka za izradu kalibracijske krivulje koja pokazuje funkcionalnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda:

$$c_{UFL} = 0,2084 \cdot A + 0,0066 \quad [\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}] \quad (4)$$

Koncentracija ukupnih flavonoida izražena je u ekvivalentima (+)-katehina (CE) koji je korišten kao standard. Rezultati su preračunati na suhu tvar uzorka (C_{UFL} , $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) prema izrazu (3). Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.3.5. Određivanje ukupnih proantocijanidina u ekstraktima

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini određeni su spektrofotometrijskom metodom (Škerget i sur, 2005) koja se temelji na njihovoj reakciji s otopinom kiselina-butanol pomiješanoj u omjeru 2 : 3, mjereći apsorbanciju reakcijske smjese pri valnoj duljini od 540 nm, uz određene modifikacije opisane u postupku.

Postupak

Otopina kiselina-butanol pripremljena je u volumenu od 500 mL tako da su kloridna kiselina i butanol pomiješani u omjeru 2:3 te je dodano 77 mg željezo(II)sulfata heptahidrata . U epruvete je dodano 500 μL ekstrakta i 5 mL prethodno pripremljene otopine željezo (II)-sulfatheptahidrata. Sadržaj epruveta je promiješan na vorteksu, nakon čega je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji pri 95 °C tijekom 15 minuta. Nakon inkubacije, sadržaj epruveta je ohlađen te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 540 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele, a koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C , g/L) je izračunata prema izrazu (5):

$$c_{UPA} = \frac{A \cdot DF \cdot M}{\epsilon \cdot l} \quad [\text{g/L}] \quad (5)$$

gdje je: A – apsorbancija, DF - faktor razrjeđenja, M - molarna masa cijanidina ($M = 287$ g/mol), ε - koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina ($\varepsilon = 34\,700$ L/mol·cm), l - duljina optičkog puta ($l = 1$ cm).

Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar tropa grožđa (C_{UPA} , mg/g_{s.t.}) prema izrazu (3).

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima DPPH

metodom

DPPH spektrofotometrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) je široko primjenjiva zbog prednosti poput stabilnosti sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH·) radikala, brzine i jednostavne izvedbe. Metoda se temelji na svojstvu DPPH· radikala da delokalizira slobodni elektron što uzrokuje njegovu stabilnost, pri čemu molekula ne dimerizira (Alam, Bristi i Rafiquzzaman, 2013). Kada se DPPH· radikali reduciraju tijekom određenog vremenskog perioda, dolazi do smanjenja apsorbancije ($\lambda = 515$ nm) u reakcijskoj otopini, što je rezultat smanjenja koncentracije preostalih slobodnih DPPH· radikala. Ovo smanjenje koncentracije se očituje u promjeni boje otopine od ljubičaste prema žutoj. Što je veći postotak inhibicije DPPH· radikala AA ekstrakta je veća.

Postupak

U 0,1 mL uzorka dodano je 3,9 mL otopine DPPH· u 96 %-tnom etanolu (s koncentracijom 0,026 mg_{DPPH}/mL). Ova reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi i u tami tijekom 30 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija ($A_{ekstrakta}$) pri 515 nm u odnosu na slijepu probu (96% etanol). Apsorbancija otopina DPPH· (A_{DPPH}) je mjerena pri istim uvjetima kao i kod uzoraka, u odnosu na slijepu probu.

Inhibicija DPPH· ispitivanih uzoraka izračunata je u postotku (%) prema izrazu (6) (Benvenuti i sur., 2006):

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

Postotak (%) inhibiranog DPPH· radikala je uvršten u jednadžbu pravca (7) dobivenu iz kalibracijske krivulje pripremljene s troloksom kao standardom te je antioksidacijska aktivnost (AA'_{DPPH}) izražena u ekvivalentima troloksa (g_{troloksa}/L) i preračunata na masu suhe tvari brašna od sjemenki grožđa (AA_{DPPH} , mg_{troloksa}/g_{s.t.}) kao i udio fenolnih tvari prema izrazu (3).

$$AA'_{DPPH} = 0,0036 \cdot \%inhibDPPH + 0,0032 \quad [g_{troloksa}/L] \quad (7)$$

Mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima ABTS metodom

ABTS metoda, poznata i kao TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), temelji se na sposobnosti antioksidanasa da reduciraju $ABTS^{\bullet+}$ radikalni kation. Ovo se očituje smanjenjem plavo-zelene boje radikalnog kationa, pri čemu se apsorbancija mjeri na 734 nm. Brzina obezbojenja ($ABTS^{\bullet+}$) otopine ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti uzorka, koncentraciji antioksidanasa i trajanju reakcije (Re i sur., 1999).

Reagens za provedbu metode pripremljen je prema protokolu opisanom u radu autora Šelo (2022).

Postupak

U 50 μ L ekstrakta dodano je 950 μ L razrijeđene otopine $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Nakon 10 minuta inkubacije na tamnom mjestu, izmjerena je apsorbancija pri 734 nm. Kontrolni uzorak pripremljen je na isti način, ali je umjesto ekstrakta korišten etanol. Kao slijepa proba korišten je apsolutni etanol. Inhibicija (%) $ABTS^{\bullet+}$ radikala izračunata je prema izrazu (8):

$$\% \text{ inhibicije } ABTS = \left(\frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{kontrola}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

gdje je: $A_{kontrola}$ – apsorbancija kontrolnog uzorka i A_{uzorak} – apsorbancija uzorka.

Postotak inhibiranog $ABTS^{\bullet+}$ radikala preračunat je u ekvivalente troloksa ($g_{troloksa}/L$) preko jednadžbe pravca (9) dobivenog iz kalibracijske krivulje:

$$AA'_{ABTS} = 0,003 \cdot \%inhibABTS - 0,0037 \quad [g_{troloksa}/L] \quad (9)$$

Konačne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražene su ekvivalentima troloksa po masi suhe tvari brašna sjemenki grožđa (AA_{ABTS} , $mg_{troloksa}/g_{s.t.}$) prema izrazu (3). Mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima FRAP metodom

FRAP metoda se zasniva na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ione u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe^{2+} ioni reagiraju s TPZT (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagensom stvarajući intenzivno plavi kompleks koji ima maksimum apsorpcije pri 592 nm. Brzina ove reakcije zavisi od redukcijskog potencijala i koncentracije dodanog antioksidansa (Benzie i Strain, 1996).

Postupak

Reagensi potrebni za provedbu metode pripremljeni su prema protokolu opisanom u radu autora Šelo (2022).

Uzorci su pripremljeni miješanjem 2,7 mL FRAP reagensa, 270 μL destilirane vode i 150 μL ekstrakta, nakon čega je sadržaj epruveta promiješan. Slijepa proba je pripremljena miješanjem 2,7 mL FRAP reagensa i 420 μL destilirane vode. Apsorbancija je izmjerena na 592 nm nakon 40 minuta inkubacije na tamnom mjestu pri 37 °C.

Pomoću jednadžbe pravca (10) rezultati su izraženi u ekvivalentima troloksa koji je korišten kao standard ($\text{g}_{\text{TROLOKS}}/\text{L}$), te su preračunati na suhu tvar uzorka ($\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) prema izrazu (3).

$$AA'_{FRAP} = 0,2436 \cdot A - 0,0099 \quad [\text{g}_{\text{troloksa}}/\text{L}] \quad (10)$$

3.3.9. Refraktometrijsko određivanje topljive suhe tvari u ekstraktima

Na prizmu refraktometra nanoseno je oko 600 μL ekstrakta brašna sjemenki grožđa. Refraktometar mjeri topljivu suhu tvar na temelju loma svjetlosne zrake pri prijelazu između zraka i tekućine. Ovaj lom svjetlosti koristi se za određivanje odnosa između brzine prolaza svjetlosti kroz tekućinu (ekstrakt brašna od sjemenki grožđa) i zraka. Vrijednost topljive suhe tvari očitava se u postotku prema Brix ljestvici, koja mjeri od 0 % do 30 % po Brixu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Svi eksperimentalni i izračunati podaci prikazani su u tablicama i dijagramima.

4.1. Određivanje suhe tvari brašna sjemenki grožđa

Udio suhe tvari u brašnu sjemenki grožđa iznosio je 93,66 %.

4.2. Utjecaj procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata

Poznato je da proces ekstrakcije bioaktivnih tvari, uključujući i fenolne spojeve, ovisi o brojnim procesnim uvjetima koji mogu imati samostalan utjecaj na promatrani proces ili djelovati u interakciji. Temperatura i vrijeme provedbe ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su usko povezani parametri jer što je vrijeme provedbe duže, to su potrebne manje temperature ekstrakcijskog sustava i obrnuto (Alara, Abdurahman i Ukaegbu, 2021).

Metoda odzivnih površina pokazala se kao koristan alat pomoću kojeg je moguće uz minimalan broj eksperimenata procijeniti utjecaj najvažnijih procesnih uvjeta i njihovu interakciju na promatrani proces te odrediti optimalne uvjete procesa.

U eksperimentalnom dijelu ovog rada ispitan je utjecaj tri procesna uvjeta ultrazvučne ekstrakcije u tri razine kako slijedi: temperatura ekstrakcije (40 – 60 – 80°C), vrijeme trajanja ekstrakcije (10 – 25 – 40 min) i koncentracija vodene otopine etanola (30 – 60 – 90 %) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina iz brašna sjemenki grožđa te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata.

Procjena utjecaja ispitivanih procesnih uvjeta na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije provedena je metodom odzivnih površina pomoću programskog paketa Design Expert 12 uz primjenu Box-Behnkenovog plana pokusa.

4.2.1. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na maseni udio fenolnih tvari

Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u brašnu sjemenki grožđa unutar ispitivanog eksperimentalnog područja kretao u rasponu od 19,35 do 60,41 mg_{GAE}/g_{s.t.}, udio flavonoida od 4,53 do 20,50 mg_{CE}/g_{s.t.} i udio proantocijanidina u rasponu od 2,71 do 11,87 mg/g_{s.t.} (**Tablica 4**).

Tablica 4 Srednje vrijednosti eksperimentalno određenih masenih udjela, ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}), ukupnih flavonoida (C_{UFL}) i ukupnih proantocijanidina (C_{UPA}) u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, dobivenih pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije (temperatura – T , vrijeme – t , koncentracija vodene otopine etanola – φ) definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

	X_1	X_2	X_3	Eksperimentalni podaci		
	T	t	φ	C_{UFT}	C_{UFL}	C_{UPA}
	[°C]	[min]	[%]	[mg _{GAE} /g _{s.t.}]	[mg _{CE} /g _{s.t.}]	[mg/g _{s.t.}]
1	60	40	90	27,02	10,43	6,74
2	40	10	60	28,57	8,15	6,56
3	40	25	30	27,23	10,67	6,72
4	40	25	90	22,77	4,53	2,71
5	80	10	60	38,57	13,05	8,96
6	60	25	60	38,41	10,68	8,26
7	40	40	60	35,10	12,16	7,74
8	60	40	30	38,69	15,14	8,77
9	60	10	90	19,35	8,79	4,13
10	80	40	60	60,41	20,50	11,87
11	80	25	30	40,22	18,00	9,59
12	80	25	90	27,27	11,03	5,76
13	60	25	60	45,62	14,69	8,95
14	60	25	60	45,68	14,25	8,82
15	60	10	30	31,61	11,39	7,15

Kako bi se ispitaio i procijenio utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije (temperature, koncentracije otapala i vremena ekstrakcije) i njihove interakcije na zavisnu varijablu (prinos fenolnih tvari) provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka prikazanih **Tablicom 4** matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema **izrazu (1)**.

Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisne i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Za opisivanje konkretnog procesa ekstrakcije sve tri skupine fenolnih tvari kao najprihvatljiviji model pokazao se kvadratni polinom ($R > 0,96$) što je vidljivo iz **Tablica 5 – 7**. Dobro slaganje eksperimentalnih i kvadratnim modelom predviđenih podataka za masene udjele analiziranih fenolnih tvari vidljivo je na **Slikama 4.a – 6.a**. Odzivne funkcije predviđene kvadratnim modelom prikazane su **jednadžbama (11) – (13)** kako slijedi:

$$Y_{\text{UFT}} = 43,24 + 6,60X_1 + 5,34X_2 - 5,17X_3 + 3,83X_1 X_2 - 2,12X_1 X_3 + 0,15X_2 X_3 - 1,19X_1^2 - 1,39X_2^2 - 12,68X_3^2 \quad (11)$$

$$Y_{\text{UFL}} = 13,21 + 3,38X_1 + 2,11X_2 - 2,55X_3 + 0,86X_1X_2 - 0,21X_1X_3 - 0,53X_2X_3 - 0,06X_1^2 + 0,32X_2^2 - 2,08X_3^2 \quad (12)$$

$$Y_{\text{UPA}} = 8,68 + 1,55X_1 + 1,04X_2 - 1,61X_3 + 0,43X_1X_2 + 0,04X_1X_3 + 0,25X_2X_3 - 0,20X_1^2 + 0,30X_2^2 - 2,28X_3^2 \quad (13)$$

gdje su:

Y - modelom predviđen maseni udio fenolnih tvari [$\text{mg}_{(\text{GAE, CE})}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

X_1 - ispitivana temperatura ekstrakcije [$^{\circ}\text{C}$]

X_2 – ispitivano vrijeme ekstrakcije [min]

X_3 - ispitivana koncentracija vodene otopine etanola [%]

Podebljane vrijednosti koeficijenata regresije - označavaju parametre odnosno procesne uvjete koji su imali statistički značajne utjecaje na ekstraktibilnost fenolnih spojeva.

Nadalje, provedena je detaljnija statistička analiza (ANOVA) kako bi se s većom sigurnošću provela procjena utjecaja pojedinih parametara i njihove interakcije na promatrani proces, a rezultati su prikazani u **Tablicama 5 – 7**. Kada su vrijednosti " $Prob > F$ " za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost) onda ti članovi statistički značajno utječu na promatrani proces.

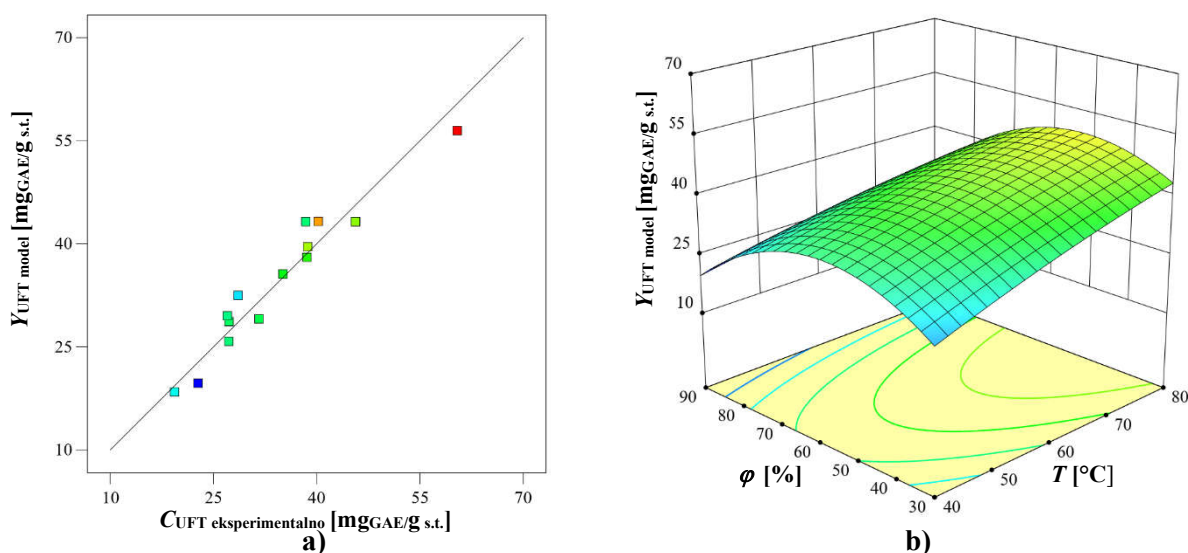
Za ukupne fenolne spojeve (**Tablica 5**) utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti prinosa ukupnih fenolnih tvari kvadratnim modelom statistički značajna što znači da je primjena modela opravdana za ispitivano područje. Tome u prilog ide činjenica da je statistički parametar "nedostatak modela" bio statistički neznačajan za $p < 0,05$. Iz iste tablice je vidljivo da je najveći utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenolnih tvari imala koncentracija otapala budući da je bio statistički značajan linerani i kvadratni član modela dok su temperatura i vrijeme ekstrakcije bili statistički značajni samo kao linearni članovi. Interakcija ispitivanih parametra nije bila statistički značajna. Vizualni prikaz parametra (temperature i otapala) koji značajno utječu na prinos ukupnih fenolnih tvari dan je 3D dijagramom odzivne površine (**Slika 4b**) gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđeni prinos ukupnih fenolnih tvari za ispitane kombinacije temperature i koncentracije otapala pri konstantnom vremenu ekstrakcije. Iz dijagrama je vidljivo da porastom temperature linearno raste prinos ukupnih fenolnih tvari dok s porastom koncentracije vodene otopine etanola raste prinos ukupnih fenola do neke maksimalne vrijednosti (dokaz je značajnost kvadratnog člana), a potom opada.

Tablica 5. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Ukupni flavonoidi					
Model	1465,97	9	162,89	7,9*	0,017
X ₁ – temperatura	348,6	1	348,6	16,91*	0,009
X ₂ – vrijeme	232,36	1	232,36	11,27*	0,020
X ₃ – koncentracija otapala	213,78	1	213,78	10,37*	0,024
X ₁ X ₂	58,69	1	58,69	2,85 ^{ns}	0,152
X ₁ X ₃	18,04	1	18,04	0,88 ^{ns}	0,393
X ₂ X ₃	0,0864	1	0,0864	0,0042 ^{ns}	0,951
X ₁ ²	5,2	1	5,2	0,25 ^{ns}	0,637
X ₂ ²	7,1	1	7,1	0,34 ^{ns}	0,583
X ₃ ²	593,67	1	593,67	28,8*	0,003
Ostatak	103,07	5	20,61		
Nedostatak modela	68,17	3	22,72	1,3 ^{ns}	0,462
Pogreška	34,9	2	17,45		
Ukupno	1569,04	14			
R	0,97				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanica

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 4 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (ϕ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta.

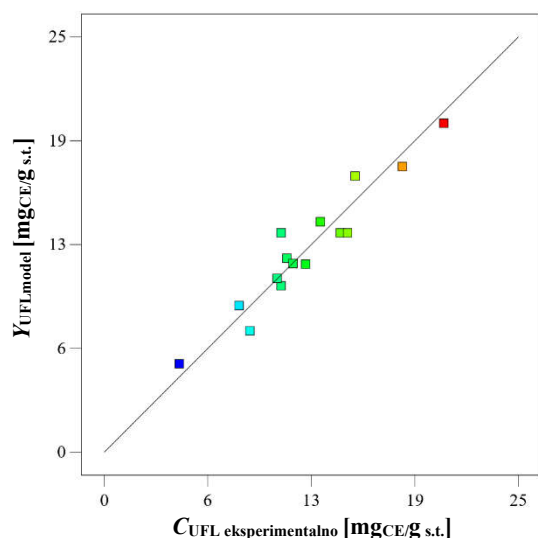
Sličan utjecaj procesni uvjeti imali su i na ekstrakciju ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina. Tome u prilog ide i činjenica da je utvrđena jaka pozitivna korelacija između ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida ($R = 0,87$) odnosno ukupnih proantocijanidina ($R = 0,92$) (**Tablica 12**). Analizom varijance utvrđeno je da je kvadratni model bio statistički značajan kod ukupnih flavonoida (**Tablica 6**) i ukupnih proantocijanidina (**Tablica 7**). Također je otapalo imalo najveći utjecaj na ekstraktibilnost ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina što se očitovalo kroz linearni i kvadratni član odzivne funkcije (**jed. 12 i 13**), dok su vrijeme i temperatura imali utjecaj na ekstrakciju, ali samo kao linearni članovi što je grafički prikazano s trodimenzionalnim dijagramima odzivnih površina (**Slike 5b i 6b**).

Tablica 6 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

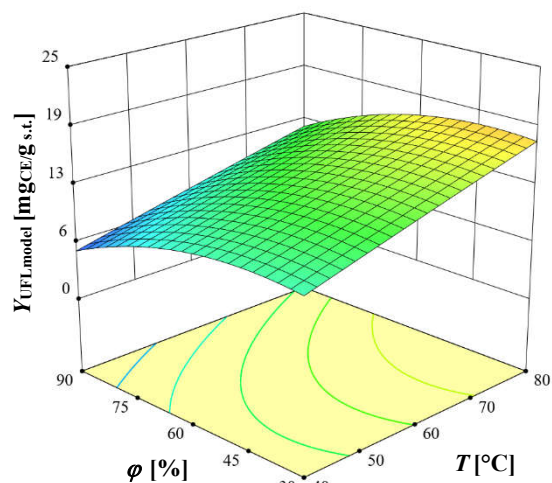
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Ukupni flavonoidi					
Model	200,29	9	22,25	6,00*	0,031
X ₁ – temperatura	91,52	1	91,52	24,67*	0,004
X ₂ – vrijeme	35,5	1	35,5	9,57*	0,027
X ₃ – koncentracija otapala	52,12	1	52,12	14,05*	0,013
X ₁ X ₂	2,96	1	2,96	0,80 ^{ns}	0,413
X ₁ X ₃	0,171	1	0,171	0,05 ^{ns}	0,836
X ₂ X ₃	1,11	1	1,11	0,30 ^{ns}	0,607
X ₁ ²	0,0152	1	0,0152	0,0041 ^{ns}	0,952
X ₂ ²	0,3741	1	0,3741	0,10 ^{ns}	0,764
X ₃ ²	16,05	1	16,05	4,32 ^{ns}	0,092
Ostatak	18,55	5	3,71		
Nedostatak modela	8,87	3	2,96	0,61 ^{ns}	0,66
Pogreška	9,69	2	4,84		
Ukupno	218,84	14			
R	0,96				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



a)



b)

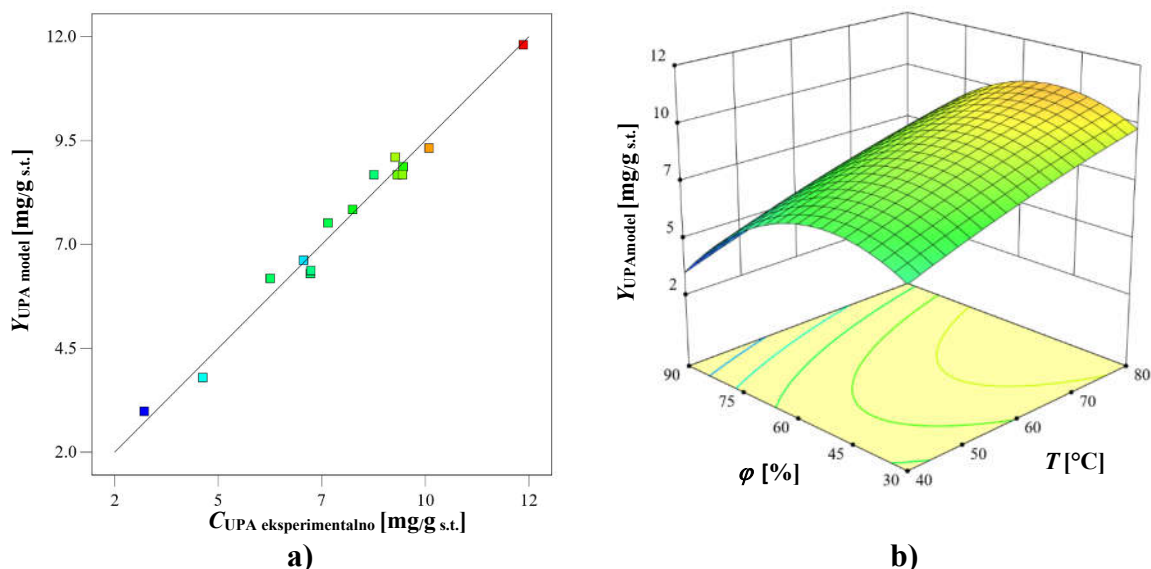
Slika 5 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

Tablica 7 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> vrijednost	<i>Prob > F</i> ($p < 0,05$)
<i>Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini</i>					
Model	69,9	9	7,77	30,05*	0,0008
X_1 – temperatura	19,33	1	19,33	74,8*	0,0003
X_2 – vrijeme	8,65	1	8,65	33,46*	0,0022
X_3 – koncentracija otapala	20,81	1	20,81	80,52*	0,0003
$X_1 X_2$	0,7334	1	0,73	2,84 ^{ns}	0,1529
$X_1 X_3$	0,008	1	0,01	0,03 ^{ns}	0,8674
$X_2 X_3$	0,246	1	0,25	0,95 ^{ns}	0,3741
X_1^2	0,1437	1	0,14	0,55 ^{ns}	0,4894
X_2^2	0,3397	1	0,34	1,31 ^{ns}	0,3035
X_3^2	19,26	1	19,26	74,51*	0,0003
Ostatak	1,29	5	0,26		
Nedostatak modela	1,02	3	0,34	2,51 ^{ns}	0,2974
Pogreška	0,2709	2	0,14		
Ukupno	71,19	14			
<i>R</i>	0,99				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df* – stupnjevi slobode; *F* – Fisherov koeficijent, *R* – koeficijent korelacije, *MS* – varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 6 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos proantocijanidna (Y_{UPA}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

4.2.2. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost prema DPPH testu kretala se u rasponu 19,49 – 96,95 $\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$, prema ABTS testu 30,81 – 265,59 $\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ te prema FRAP testu 27,70 – 158,86 $\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ (**Tablica 8**). Utvrđena je jaka pozitivna korelacija između korištenih testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti (**Tablica 12**).

Dobiveni eksperimentalni podaci (**Tablica 8**) su aproksimirani matematičkim modelom (kvadratnim polinomom) prema **jednadžbi (1)** te su dobivene odzivne funkcije odnosno funkcionalne ovisnosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom (Y_{AA_DPPH}), ABTS metodom (Y_{AA_ABTS}) i FRAP metodom (Y_{AA_FRAP}) (**jed. 14-16**) o ispitivanim procesnim uvjetima i o njihovoj interakciji kako slijedi:

$$Y_{AA_DPPH} = 72,73 + 14,94X_1 + 9,15X_2 - 9,88X_3 + 4,45X_1 X_2 - 0,36X_1 X_3 + 2,49X_2 X_3 - 7,05X_1^2 + 0,35X_2^2 - 22,76X_3^2 \quad (14)$$

$$Y_{AA_ABTS} = 182,77 + 45,41X_1 + 29,35X_2 - 56,28X_3 + 7,29X_1X_2 - 8,11X_1X_3 + 7,77X_2X_3 - 3,25X_1^2 - 9,27X_2^2 - 56,33X_3^2 \quad (15)$$

$$Y_{AA_FRAP} = 122,73 + 24,03X_1 + 15,83X_2 - 24,67X_3 + 7,68X_1X_2 - 4,38X_1X_3 + 1,47X_2X_3 - 5,89X_1^2 - 4,04X_2^2 - 38,88X_3^2 \quad (16)$$

gdje su:

Y - modelom predviđene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti [$\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

X_1 - ispitivana temperatura ekstrakcije [$^{\circ}\text{C}$]

X_2 - ispitivano vrijeme ekstrakcije [min]

X_3 - ispitivana koncentracija vodene otopine etanola [%]

Podebljane vrijednosti koeficijenata regresije – označavaju parametre odnosno procesne uvjete koji su imali statistički značajne utjecaje na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata.

Tablica 8. Srednje vrijednosti eksperimentalno određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata brašna sjemenki grožđa, prema DPPH metodi, ABTS metodi i FRAP metodi, pri različitim procesnim uvjetima ekstrakcije (temperatura – T , vrijeme – t , koncentracija vodene otopine etanola – φ) definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

	X_1	X_2	X_3	Eksperimentalni podaci		
	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [min]	φ [%]	AA_{DPPH} [$\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]	AA_{ABTS} [$\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]	AA_{FRAP} [$\text{mg}_{\text{troloksa}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]
1	60	40	90	55,20	81,20	77,66
2	40	10	60	44,02	89,52	82,09
3	40	25	30	42,99	122,40	77,97
4	40	25	90	19,49	35,84	27,70
5	80	10	60	71,55	168,43	112,60
6	60	25	60	73,55	184,67	115,41
7	40	40	60	51,64	157,50	97,62
8	60	40	30	65,51	187,99	114,35
9	60	10	90	30,15	30,81	42,32
10	80	40	60	96,95	265,59	158,86
11	80	25	30	67,07	226,78	136,98
12	80	25	90	42,12	107,77	69,17
13	60	25	60	70,74	181,56	117,39
14	60	25	60	73,89	182,08	135,38
15	60	10	30	50,41	168,71	84,88

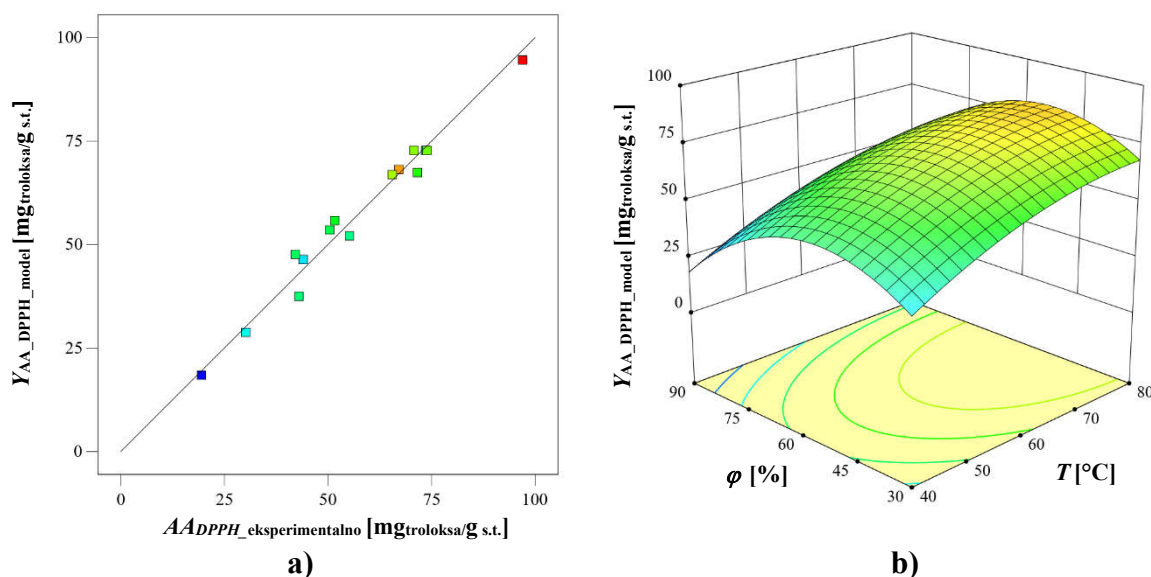
Iz **Tablica 9 – 11** vidljivo je da su procesni parametri na antioksidacijsku aktivnost imali sličan utjecaj kao i na fenolne spojeve odnosno najznačajniji utjecaj imala je koncentracija vodene otopine etanola što se očitovalo kroz statistički značajan linearni i kvadratni član modela. Ovisnost antioksidacijske aktivnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije je bila linearna s izuzetkom kod DPPH testa gdje je i kvadratni član modela bio statistički značajan. Navedena funkcionalna ovisnost antioksidacijske aktivnosti o temperaturi i koncentraciji otapala prikazana je i trodimenzionalnim dijagramima **Slikama 7b – 9b**.

Tablica 9 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
<i>AADPPH</i>					
Model	5381,21	9	597,91	21,71*	0,002
X ₁ – temperatura	1786,69	1	1786,69	64,88*	0,000
X ₂ – vrijeme	669,23	1	669,23	24,30*	0,004
X ₃ – koncentracija otapala	780,44	1	780,44	28,34*	0,003
X ₁ X ₂	79,05	1	79,05	2,87 ^{ns}	0,151
X ₁ X ₃	0,52	1	0,53	0,02 ^{ns}	0,896
X ₂ X ₃	24,74	1	24,74	0,90 ^{ns}	0,387
X ₁ ²	183,26	1	183,26	6,65*	0,0495
X ₂ ²	0,46	1	0,46	0,02 ^{ns}	0,902
X ₃ ²	1913,41	1	1913,41	69,48*	0,000
Ostatak	137,69	5	27,54		
Nedostatak modela	131,74	3	43,91	14,74*	0,064
Pogreška	5,96	2	2,98		
Ukupno	5518,91	14			
R	0,99				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns} utjecaj faktora nije statistički značajan



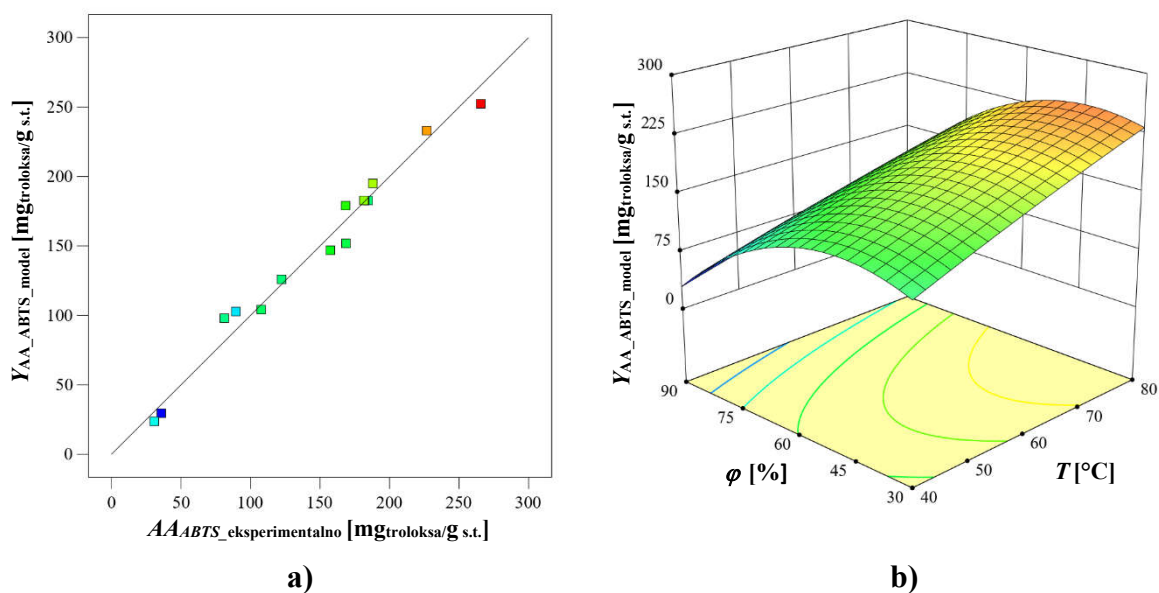
Slika 7 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost (Y_{AA_DPPH}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

Tablica 10 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
<i>AA_{DPPH}</i>					
Model	61262,50	9	6806,94	25,19*	0,001
X ₁ – temperatura	16499,72	1	16499,72	61,07*	0,0006
X ₂ – vrijeme	6891,40	1	6891,40	25,50*	0,0039
X ₃ – koncentracija otapala	25341,21	1	25341,21	93,79*	0,0002
X ₁ X ₂	212,89	1	212,88	0,79 ^{ns}	0,4154
X ₁ X ₃	263,20	1	263,20	0,97 ^{ns}	0,3690
X ₂ X ₃	241,95	1	241,95	0,90 ^{ns}	0,3874
X ₁ ²	38,90	1	38,90	0,14 ^{ns}	0,7199
X ₂ ²	317,02	1	317,02	1,17 ^{ns}	0,3281
X ₃ ²	11714,01	1	11714,01	43,35*	0,0012
Ostatak	1350,97	5	270,19		
Nedostatak modela	1345,44	3	448,48	161,99 ^{ns}	0,0061
Pogreška	5,54	2	2,77		
Ukupno	62613,48	14			
R	0,99				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns} utjecaj faktora nije statistički značajan



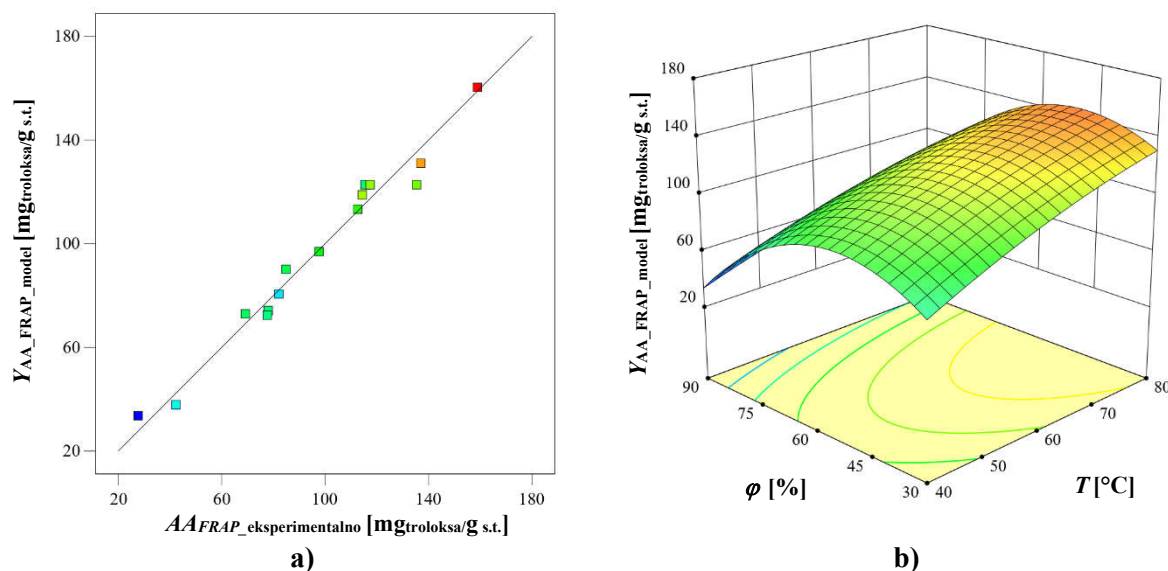
Slika 8 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost (Y_{AA_ABTS}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

Tablica 11 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
<i>AA_{FRAP}</i>					
Model	61262,50	9	6806,94	25,19*	0,001
X ₁ – temperatura	16499,72	1	16499,72	61,07*	0,0006
X ₂ – vrijeme	6891,40	1	6891,40	25,50*	0,0039
X ₃ – koncentracija otapala	25341,21	1	25341,21	93,79*	0,0002
X ₁ X ₂	212,89	1	212,88	0,79 ^{ns}	0,4154
X ₁ X ₃	263,200	1	263,20	0,97 ^{ns}	0,3690
X ₂ X ₃	241,95	1	241,95	0,90 ^{ns}	0,3874
X ₁ ²	38,90	1	38,90	0,14 ^{ns}	0,7199
X ₂ ²	317,02	1	317,02	1,17 ^{ns}	0,3281
X ₃ ²	11714,01	1	11714,01	43,35*	0,0012
Ostatak	1350,97	5	270,19		
Nedostatak modela	1345,44	3	448,48	161,99 ^{ns}	0,0061
Pogreška	5,54	2	2,77		
Ukupno	62613,48	14			
R	0,99				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz p < 0,05; ^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 9 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost (Y_{AA_FRAP}) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

Sličan utjecaj procesnih uvjeta na ekstrakciju fenolnih spojeva i postignutu antioksidacijsku aktivnost može se objasniti i njihovom međusobnom jakom pozitivnom korelacijom ($R > 0,87$) (Tablica 12). Slične rezultate objavili su i Kunjiappen i sur. (2024) koji su određivali antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima sjemenki grožđa dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom te koncentriranim na rotacijskom vakuum uparivaču.

Tablica 12 Korelacija između pojedinih odzivnih svojstava ekstrakta brašna sjemenki grožđa

	UFT	UFL	UPA	AA_DPPH	AA_ABTS	AA_FRAP
UFT	x	0,87	0,92	0,94	0,91	0,94
UFL		x	0,92	0,87	0,91	0,91
UPA			x	0,96	0,95	0,98
AA_DPPH				x	0,90	0,96
AA_ABTS					x	0,95
AA_FRAP						x

UFT – ukupne fenolne tvari, UFL – ukupni flavonoidi, UPA – ukupni ekstraktibilni proantocijanidini, AA_DPPH – antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom, AA_ABTS – antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom, AA_FRAP – antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom

Kvadratni model pokazao se kao prikladan za opisivanje procesa ekstrakcije u pogledu postignute antioksidacijske aktivnosti budući da je statistički parametar modela bio statistički značajan, što potvrđuje i statistička neznačajnost statističkog parametra "nedostatak modela". Osim toga jaka pozitivna korelacija ($R > 0,99$) između eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka za antioksidacijsku aktivnost potvrđuje opravdanost primjene kvadratnog modela (Tablice 9 –11). Dobro slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka vidljivo je iz Slika 7a –9a.

4.3. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih otopljenih tvari u ekstraktima

Pored primarnog cilja ispitivanja utjecaja procesnih uvjeta ekstrakcije na udio ekstrahiranih fenolnih tvari i na antioksidacijska svojstva ekstrakata određena je i koncentracija ukupnih otopljenih tvari u ekstraktima pri navedenim eksperimentalnim uvjetima. Udio otopljenih tvari u ekstraktima određen je refraktometrijski mjerenjem Brix-a pri čemu 1 °Bx odgovara 1 g otopljene tvari po 100 g tekućeg ekstrakta. Prema dobivenim rezultatima udio otopljenih tvari u ekstraktima se kretao od 11,70 – 20,76 g/100 g_{ekstrakta}. Rezultati su prikazani Tablicom 13.

Tablica 13 Srednje vrijednosti eksperimentalno određenih vrijednosti Brix-a kao jedinice za procjenu udjela otopljenih tvari u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (temperatura – T , vrijeme – t , koncentracija vodene otopine etanola – φ) definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

	X_1	X_2	X_3	Eksperimentalni podaci
	T	t	φ	$C_{\text{otopljene tvari}}$
	[°C]	[min]	[%]	[% Brix]
1	60	40	90	20,76
2	40	10	60	19,58
3	40	25	30	11,92
4	40	25	90	20,52
5	80	10	60	18,26
6	60	25	60	18,91
7	40	40	60	18,94
8	60	40	30	12,04
9	60	10	90	20,66
10	80	40	60	18,15
11	80	25	30	11,70
12	80	25	90	20,65
13	60	25	60	18,23
14	60	25	60	18,07
15	60	10	30	12,17

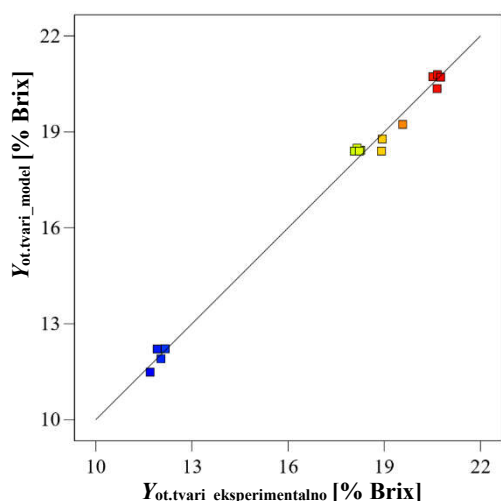
Statističkom obradom podataka utvrđeno je da kvadratni model dobro opisuje proces ekstrakcije otopljenih tvari što potvrđuje statistička značajnost modela i statistički neznačajan parametar "nedostatak modela" prikazani **Tablicom 14**. Utvrđena je jaka pozitivna korelacija ($R > 0,99$) između eksperimentalnih i kvadratnim modelom aproksimiranih podataka što se također može vidjeti na **Slici 10a**. Od svih ispitivanih uvjeta jedino je otapalo statistički značajno utjecalo na ekstrakciju ukupnih otopljenih tvari i to kao linearni i kvadratni član modela što se vizualno vidi iz 3D dijagrama ovisnosti masenog udjela otopljenih tvari o temperaturi i koncentraciji vodene otopine etanola prikazanog **Slikom 10b**.

Tablica 14 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog udjela otopljenih tvari, u ekstraktima brašna sjemenki grožđa, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

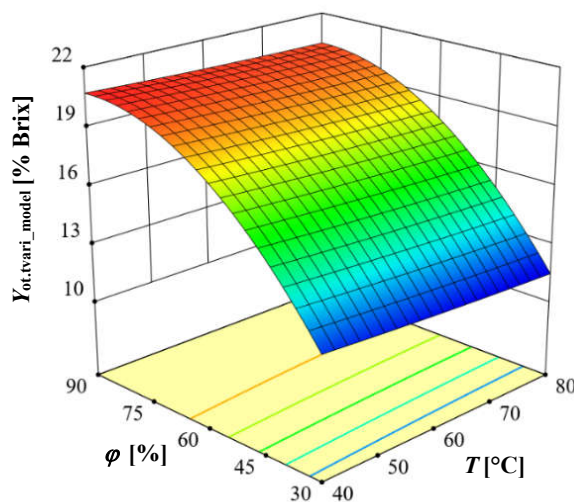
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)	
<i>Cotopljene tvari</i>						
Model		171,67	9	19,07	96,31*	< 0,0001
X ₁ – temperatura		0,560	1	0,60	3,03 ^{ns}	0,1424
X ₂ – vrijeme		0,08	1	0,08	0,38 ^{ns}	0,5638
X ₃ – koncentracija otapala		151,01	1	151,01	762,47*	< 0,0001
X ₁ X ₂		0,07	1	0,07	0,35 ^{ns}	0,5809
X ₁ X ₃		0,03	1	0,03	0,15 ^{ns}	0,7104
X ₂ X ₃		0,01	1	0,01	0,06 ^{ns}	0,8043
X ₁ ²		0,01	1	0,01	0,07 ^{ns}	0,8069
X ₂ ²		0,27	1	0,27	1,37	0,2938
X ₃ ²		18,98	1	18,98	95,83*	0,0002
Ostatak		0,99	5	0,20		
Nedostatak modela		0,59	3	0,20	0,97 ^{ns}	0,5432
Pogreška		0,40	2	0,20		
Ukupno		172,66	14			
R		0,99				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; F – Fisherov koeficijent, R – koeficijent korelacije, MS – varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$; ^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



a)

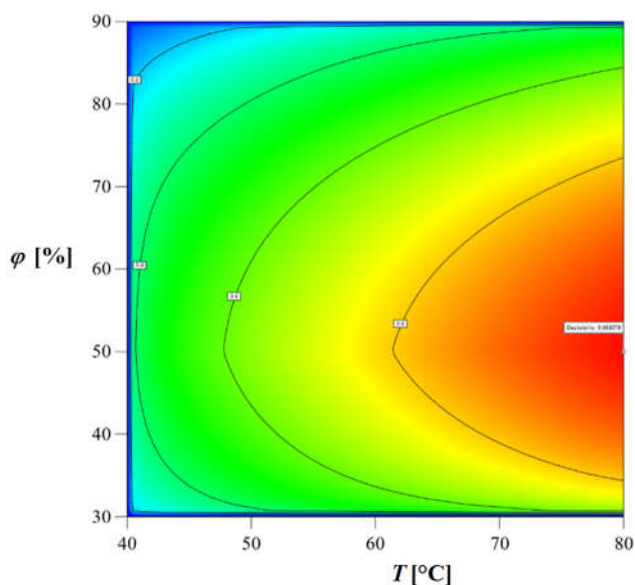


b)

Slika 10 a) Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih vrijednosti masenog udjela otopljenih tvari i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu; **b)** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za maseni udio otopljenih tvari ($Y_{ot.tvari}$) u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije (T) i koncentraciji vodene otopine etanola (φ) pri konstantnom vremenu ekstrakcije u trajanju 25 minuta

4.4. Određivanje optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije metodom odzivnih površina

Da bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida, ukupnih proantocijanidina te maksimalne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima brašna sjemenki grožđa za ispitivano eksperimentalno područje provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 12. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih varijabli, međutim kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (engl. Desirability), kao kriterij za optimalno provođenje procesa, bila najbliže vrijednosti 1. Optimalno područje uvjeta ekstrakcije prikazano je grafički jednim konturnim dijagramom za sve odzivne funkcije (za ukupne fenolne tvari, ukupne flavonoide, ukupne proantocijanidine te antioksidacijsku aktivnost određenu trima metodama) (**Slika 11**). Određeni optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa uz poželjnost 0,988 su: temperatura 80 °C, koncentracija vodene otopine etanola 50 % i vrijeme ekstrakcije 40 minuta. Prema kvadratnom modelu numeričkom optimizacijom izračunato je da bi se pri navedenim uvjetima mogao ostvariti maksimalan prinos ukupnih fenolnih spojeva od 57,46 mg_{GAE/g_{s,t}}, ukupnih flavonoida od 20,67 mg_{CE/g_{s,t}}, ukupnih proantocijanidina od 11,99 mg/g_{s,t}, te antioksidacijska aktivnost ekstrakata prema DPPH metodi od 99,63 mg_{troloksa/g_{s,t}}, prema ABTS metodi od 269,93 mg_{troloksa/g_{s,t}} i FRAP metodi 165,21 mg_{troloksa/g_{s,t}}.



Slika 11 Optimalno područje (crveno obojeno) ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije (temperatura: 80 °C, koncentracija etanola: 50%, pri konstantnom vremenu ekstrakcije: 40 minuta) za dobivanje maksimalnog prinosa fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta brašna sjemenki grožđa

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka i njihove statističke obrade mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U ekstraktima brašna sjemenki grožđa dokazano je 19,35 – 60,41 mg_{GAE/g_{s,t}} ukupnih fenolnih tvari i 4,53 – 20,50 mg_{CE/g_{s,t}} ukupnih flavonoida te 2,71 – 11,87 mg/g_{s,t} ukupnih proantocijanidina.
- Temperatura i vrijeme ekstrakcije te koncentracija etanola značajno su utjecali na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dok interakcija procesnih parametara nije utvrđena.
- Koncentracija etanola je imala najveći utjecaj na promatrani proces ekstrakcije što potvrđuje statistička značajnost linearnog i kvadratnog člana modela.
- Ispitivani matematički model (kvadratni polinom) pokazao je dobra slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka uz jaku pozitivnu korelaciju ($R > 0,96$) dok je statistički parametar "nedostatak modela" bio statistički neznačajan što upućuje na mogućnost primjene ovoga modela za opisivanje kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz brašna sjemenki grožđa.
- Određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije za postizanje maksimalnog prinosa svih fenolnih tvari i maksimalnu vrijednost antioksidacijske aktivnosti: 50%-tna vodena otopina etanola, temperatura ekstrakcije od 80 °C i trajanje ekstrakcije od 40 minuta.
- Prema kvadratnom modelu numeričkom optimizacijom izračunato je da bi se pri navedenim uvjetima mogao ostvariti maksimalan prinos ukupnih fenolnih spojeva od 57,46 mg_{GAE/g_{s,t}}, ukupnih flavonoida od 20,67 mg_{CE/g_{s,t}}, ukupnih proantocijanidina od 11,99 mg/g_{s,t}.
- Prema kvadratnom modelu numeričkom optimizacijom izračunato je da bi se pri navedenim uvjetima mogao ostvariti maksimalan prinos antioksidacijske aktivnost ekstrakata prema DPPH metodi od 99,63 mg_{troloksa/g_{s,t}}, prema ABTS metodi od 269,93 mg_{troloksa/g_{s,t}} i FRAP metodi od 165,21 mg_{troloksa/g_{s,t}}.
- Na ekstrakciju ukupnih otopljenih tvari od ispitivanih procesnih uvjeta jedino je koncentracija etanola imala statistički značajan utjecaj.
- Metoda odzivnih površina pokazala se kao pogodna metoda za optimizaciju procesa ekstrakcije fenolnih tvari i ukupno otopljenih tvari iz brašna sjemenki grožđa.

6. LITERATURA

- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P. i Büsselberg, D. (2020) 'Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer' *Biomolecules*, 10(2):221, 109-121.
- Alam, M.N., Bristi, N.J. i Rafiquzzaman, M. (2013) 'In vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity' *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H. i Ukaegbu, C.I. (2021) 'Extraction of phenolic compounds: A review' *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.
- Amico, G. (2004) 'Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome' *Seminars in Nephrology*, 24(3), 179-196.
- Bali, S., Stuebiger, G., Krist, S. i Unterweger H. Buchbauer, G. (2008) 'Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity' *Food Chemistry*, 108 (3), 22-32.
- Benvenuti, F., Beedetti, S., Rinalducci, S., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M., D'Amici, G., Zolla, L. i Canestrari, F. (2006), 'Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Alphanizomenon Flosaquae*' *Journal of Chromatography B* 833(1), 12-18.
- Benzie, I.F.F. i Strain, J.J. (1996) 'The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay' *Analytical Biochemistry* 239(1), 70-76.
- Besten, V. (2011) 'Antocijani: stabilnost i važnost u prehrambenim proizvodima' *Završni rad*, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
- Bezzera, M.A., Santelli, R.E., Oliviera, E.P., Villar, L.S. i Escalera, L.A. (2008) 'Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry' *Talanta*, 76, 965-977.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. i Velić, D. (2007) 'Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds' *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242, 2007.
- Bucić-Kojić, A. (2008) 'Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstrahirabilnost fenolnih tvari iz sjemenke grožđa' *Disertacija*, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
- Bucić-Kojić, A. (2017) 'Trop grožđa – otpad i visokovrijedna sirovina' u Šubarić, D (ur.) *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, str. 111-131.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. i Abert-Vian, M. (2017) 'Ultrasound assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications' *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cindrić, K. (2019) 'Utjecaj antioksidanasa na stabilizaciju mješavine lješnjakovog ulja i ulja koštice grožđa' *Diplomski rad*, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek.
- Drmić H. i Jambrak, A.R. (2010) 'Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva', *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2, 22-33.
- Ferrer-Gallego, R. i Silva, P.(2022) 'The wine industry by-products: Applications for food industry and health benefits' *Antioxidants*, 11 (10), 1102-1123.

- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M. i Bucić-Kojić, A. (2020) 'Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds' *Antioxidants* 9(10), 39-49.
- Jing, C.L., Dong, X.F. i Tong, J.M. (2015) 'Optimization of ultrasound assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method' *Molecules*, 20, 50-71.
- Kunjiappen, S., Ramasamy, L.K., Kannan, S., Pavadaj, P., Theivendren, P. i Palanisamy, P. (2024) 'Optimization of ultrasound-aided extraction of bioactive ingredients from *Vitis vinifera* seeds using RSM and ANFIS modeling with machine learning algorithm' *Scientific Report*, 1219, 65-78.
- Makris, D. P., Boskou, G. i Andrikopoulos, N.K. (2007) 'Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts' *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. i Jimenez, L. (2004). 'Polyphenols: food sources and bioavailability' *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-47.
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005)' Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables' *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40, 255-260.
- Pavlić, B. (2017) 'Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije' Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Pavlović, N. (2020) 'Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz kakaove ljuske' Doktorska disertacija, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
- Pichler, A. (2019) 'Mehanički sastav grozda i kemijski sastav grozda' *Nastavni materijali*, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. i Rice-Evans, C. (1999) 'Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorization assay' *Free Radicalbiology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rrižner Hraš, A., Simonić, M. i Knez, Ž. (2005) 'Phenols, proantocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities' *Food Chemistry* 89(2), 191-198.
- Stratil, P., Klejdus, B. i Kubáň, V. (2006) 'Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables, Evaluation of Spectrophotometric Methods' *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3),607–616.
- Šelo, G. (2022) 'Razvoj procesa biološke obrade i funkcioniranja tropa grožđa u svrhu proizvodnje fenolnih spojeva' Disertacija, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Tomas, S., Planinić, M. i Bucić-Kojić, A. (2013) 'Jedinične operacije u prehrambenom inženjerstvu', *Interna skripta*, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
- Tsao, R. (2010) 'Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols' *Nutrients*, 2(12), 31-46.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A. i Garcia-Viguera, C. (2014) 'Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters' *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 38-78.

Waterhouse, A.L. (2001) 'Determination of Total Phenolics' u Wrolstad, R.E. (ur.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, 1-28, John Wiley & Sons, New York.