Ekstrakcija flavonoida iz kožice grožđa primjenom enoloških enzima

Lesković, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:020580

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Matija Lesković

EKSTRAKCIJA FLAVONOIDA KOŽICE GROŽĐA PRIMJENOM ENOLOŠKIH ENZIMA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET
Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo

Matija Lesković

EKSTRAKCIJA FLAVONOIDA KOŽICE GROŽĐA PRIMJENOM ENOLOŠKIH ENZIMA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Jasminka Karoglan Kontić

Zagreb, 2016

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____
s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

prof.dr.sc. Jasminka Karoglan Kontić _____

doc.dr.sc. Darko Preiner _____

izv.prof.dr.sc. Marija Bujan _____

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Jasminki Karoglan Kontić na podršci, savjetima i stručnom vođenju tijekom izrade diplomskog rada.

Iskreno zahvaljujem Ivani Tomaz, dipl.ing. na nesebičnoj pomoći, korisnim uputama te neposrednom nadzoru tijekom cjelokupnog rada u laboratoriju i u izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem također svim profesorima, asistentima i ostalim djelatnicima Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na pruženom znanju i iskustvu učenja o vinogradarsko-vinarskoj struci.

Zahvaljujem komisiji Hrvatske Školske Zaklade (Croatian Scholarship Fund) i gospodinu Miljenku (Mike) Grgiću, na omogućenoj stručnoj praksi u vinariji Cakebread cellars (Napa Valley, Kalifornija) koja mi je pružila nova praktična znanja i neprocjenjivo iskustvo rada u vinarskoj industriji.

Hvala svim kolegama i prijateljima na uzajamnoj podršci, suradnji i lijepim zajedničkim trenucima.

Najveća hvala mojim roditeljima, sestri i ostatku rodbine koji su me uvijek neizmjerno motivirali i poticali da dajem više od sebe, od samih početka mog školovanja.

SAŽETAK

Kožica bobice grožđa sadrži veliku količinu različitih polifenolnih spojeva, a posebice flavonoida. Kako bi se izdvojili polifenolni spojevi iz kožice grožđa, u svrhu provedbe analize ili komercijalne proizvodnje, potrebno je provesti ekstrakciju koja je vrlo složena.

U ovom radu istraženi su utjecaji temperature, pH, količine dodanih enzima i vremena trajanja ekstrakcije na djelotvornost enzimski potpomognute ekstrakcije (EAE) uz primjenu enzimskih pripravaka, Lallzyme EX-V i Lallzyme HC, sa ciljem optimizacije procesa ekstrakcije polifenolnih spojeva. Optimalni uvjeti za ekstrakciju su dobiveni upotrebom enzimskog pripravka Lallzyme EX-V, pri temperaturi od 45 °C, vremenskom periodu od 3 h, pH 2,0 i masenom udjelu dodanih enzima od 10,52 mg/g.

KLJUČNE RIJEČI: polifenoli, enzimima potpomognuta ekstrakcija, pektinaze, kožice grožđa, optimizacija ekstrakcije, flavonoidi, sorta 'Regent'

ABSTRACT

The grape berries skins contain very large amount of different polyphenols, especially flavonoids. In order to separate polyphenols from grape skins, to carry out laboratory analyses or commercial production, it is needed to conduct very complex extraction.

In this research certain factors such as temperature, pH, enzyme dosage and time of extraction have been investigated, in order to optimize extraction process of polyphenols using two observed enzymes, Lallzyme EX-V and Lallzyme HC.

Optimal conditions were achieved using enzyme preparation Lallzyme EX-V, at the temperature of 45 °C, time of 3 h, pH 2.0 and enzyme dosage of 10.52 mg/g.

KEY WORDS: polyphenols, enzyme-assisted extraction, pectinases, grape skins, flavonoids, grape variety 'Regent'

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. FLAVONOIDI ... 2
2.1. Antocijani ... 2
2.2. Flavonoli ... 5
2.3. Flavan-3-oli ... 6
3. ANATOMIJA BOBICE GROŽĐA ... 8
3.1. Sastav stanične stijenke ... 9
4. ENZIMIMA POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE ... 13
5. CILJ RADA ... 17
6. MATERIJALI I METODE ... 18
6.1. Uzorci i njihova priprava ... 18
6.2. Čvrsto-tekuće ekstrakcije ... 19
6.3. Enzimima potpomognute ekstrakcije ... 19
6.3.1. Određivanje utjecaja kalcijevih iona ... 20
6.3.2. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije ... 20
6.3.3. Određivanje raspona masenih udjela enzimskog pripravka ... 20
6.3.4. Optimiranje postupka enzimima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna ... 20
6.4. HPLC analize ... 23
7. REZULTATI I RASPRAVA ... 24
7.2. Utjecaj količine upotrijebljenih enzima na ekstrakciju flavonoida ... 25
7.3. Utjecaj dodatka kalcijevih iona u ekstrakcijsku otopinu na ekstrakciju flavonoida ... 26
7.4. Optimizacija uvjeta ekstrakcije ... 26
7.5. Optimalni uvjeti i potvrda modela ... 32
7.6. Usporedba enzimski potpomognute ekstrakcije i čvrsto tekuće ekstrakcije ... 35
8. ZAKLJUČAK ... 36
9. POPIS LITERATURE ... 37
10. ŽIVOTOPIS AUTORA ... 39

1. UVOD

Vinova loza (Vitis vinifera L.) je po udjelu u proizvodnji najznačajnija voćna vrsta (uz naranču) s proizvedenom količinom od 77 milijuna tona grožđa (podaci za 2013. godinu) od čega se 80 % preradi u vino (Maier i sur., 2007; www.fao.org).

Fenolne tvari imaju važnu ulogu u vinarstvu, a mogu biti korišteni i kao prirodni aditivi u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. One su zaslužne za sve glavne razlike između bijelih i crnih vina, posebice za boju i okus kod crnih vina.

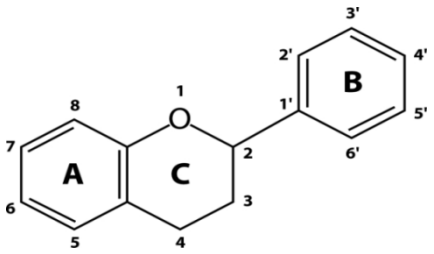
Fenolne tvari u vinu te njihov povoljan učinak na zdravlje zaslužne su za fenomen "francuskog paradoksa". Taj pojam objašnjava činjenicu da Francuzi unatoč velikom unosu zasićenih masnih kiselina kroz svoju prehranu nemaju očekivano visoku stopu obolijevanja od srčanih bolesti. Razlog za to leži upravo u konzumaciji crnog vina bogatog fenolima. Fenoli imaju baktericidna, antioksidacijska, antimikotička i druga svojstva koja prema tome, štite od bolesti kardiovaskularni sustav potrošača (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Zbog svoje izričite antioksidacijske aktivnosti, koriste se i kao prirodni antioksidansi u prehrambenoj industriji. Antocijani se smatraju najvrijednijim fenolnim komponentama te se izdvajaju već desetljećima i koriste kao prirodna bojila hrane, što im daje tehnološku i nutritivnu vrijednost (Kammerer i sur., 2005). Zabrinutost kupaca i potrošača zbog mogućeg štetnog djelovanja sintetičkih prehrambenih aditiva, daje hrani s prirodnim aditivima dodatnu prednost na tržištu.

Metode ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kožice grožđa često uključuju uporabu etil-acetata, metanola, acetona i drugih organskih otapala, od kojih se najčešće primjenjuju različite ekstrakcije čvrsto-tekuće (engl. *Solid-liquid Extraction*, SLE). Organska otapala mogu imati negativni utjecaj na okoliš te se njihova uporaba smanjuje, a zamjenjuju ih ekološki prihvatljiva otapala i ekstrakcijske tehnike kao što je enzimski potpomognuta ekstrakcija (engl. *Enzyme-assisted Extraction*, EAE). Ova ekstrakcijska tehnika može se primijeniti i za ekstrakciju polifenola iz kožice grožđa, a smatra se zelenom ekstrakcijskom tehnikom. Ona obuhvaća razgradnju pektina u staničnoj stijenci kožice grožđa djelovanjem enzima, prilikom čega dolazi do oslobađanja polifenolnih spojeva iz stanice. Djelotvornost enzimskih pripravaka u procesu ekstrakcije uvjetovana je s četiri faktora: temperaturom, pH, količinom dodanih enzima i vremenom trajanja ekstrakcije. Kako bi se optimizirala metoda EAE potrebno je utvrditi vrijednosti pri kojima navedeni faktori najpovoljnije djeluju na

aktivnost enzima, a time i na učinkovitost ekstrakcije, pri čemu se dobivaju najveći mogući maseni udjeli polifenolnih spojeva.

2. FLAVONOIDI

Svi polifenolni spojevi, odnosno fenoli sintetiziraju se iz aminokiseline fenilalanina. Osnovna podjela fenola je na flavonoide (flavonole, flavanonole, flavanole ili flavan-3-ole i antocijane) te ostale fenolne spojeve (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te stilbene). Strukturu flavonoida čine dva hidroksilirana benzenska prstena, A i B, međusobno povezana heterocikličkim prstenom C (Slika 1).



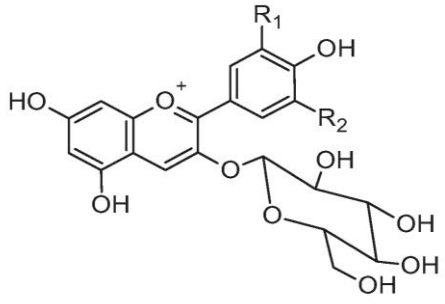
Slika 1. Osnovna struktura flavonoida

2.1. Antocijani

Antocijani su crveni pigmenti u grožđu, smješteni većinom u kožici i ponekad u mesu bobice (tzv. sorte bojadiseri). Oni imaju različite biološke funkcije u tkivu biljaka poput zaštite od sunčevog UV zračenja, napada patogenih organizama, oksidacijskih oštećenja i djelovanja slobodnih radikala. Pigmenti također stvaraju boju koja privlači životinje koje probavom rasprostranjuju sjeme biljke (primjerice ptice). Njihova biološka svojstva imaju dokazani pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi i antioksidacijsku, antimikrobnu i antikancerogenu ulogu te djeluju kao zaštita kardiovaskularnog sustava. Važno je navesti da su antocijani također bitan izvor prirodnih bojila u prehrambenoj, kozmetičkoj i

farmaceutskoj industriji (Flamini i sur., 2013). Antocijani se sintetiziraju u citosolu te se potom prenose u vakuolu, gdje se pohranjuju u posebnim odjeljcima koji se često nazivaju antocijanske vakuolarne inkluzije (Flamini i sur., 2013). Njihova osnovna građevna jedinica je flavilijev kation koji uključuje dva benzenska prstena povezana nezasićenim heterocikličnim prstenom s jednim atomom kisika. Šest je molekula antocijanidina identificirano u grožđu i vinu (malvidin, petunidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin i cijanidin) koji se međusobno razlikuju prema broju i vrsti vezanih skupina kao što su hidroksilne i metoksilne skupine (-OH i -OCH_3). Osim navedenih skupina na položaju C-3 vezana je molekula glukoze čime nastaju odgovarajući antocijanidin-3-*O*-glukozidi. Delfinidin-3-*O*-glukozid je povezan s plavim nijansama boje dok cijanidin-3-*O*-glukozid daje crvenu nijansu. Od šest antocijana sadržanih u kožici grožđa, malvidin-3-*O*-glukozid najzastupljeniji je spoj kod svih sorata (50 – 90 %). Obojenje antocijana izravno je povezano s pH medija u kojem se nalaze. Tako u kiselom mediju oni su crvene boje dok s povišenjem pH-vrijednosti postupno gube boju.

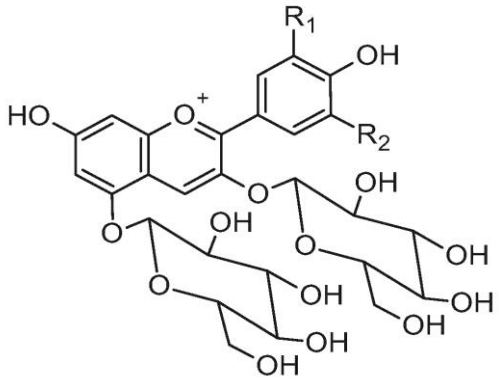
Pigmenti su smješteni u soku vakuole stanice zajedno s drugim polifenolima (ostali fenolni spojevi i flavonoidi) koji kopigmentacijom utječu na konačnu boju. Konačna boja je pak posljedica različitih udjela svih šest prisutnih antocijana. Antocijani su puno stabilniji u glikozidnom obliku (Slika 2) nego kao aglikoni (antocijanidini). U grožđu sorata *V. vinifera* identificirani su isključivo monoglukozidni oblici antocijana (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).



Pelargonidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = H$
Cijanidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OH$; $R_2 = H$
Delfinidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = OH$
Peonidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$
Petunidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$
Malvidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = OCH_3$

Slika 2. Strukturne formule antocijanidin-3-*O*-monoglukozidi

Prisutnost diglukozidnih oblika antocijana (Slika 3) u grožđu i vinu dokaz je da grožđe potječe od drugih vrsta roda *Vitis* (primjerice američkih loza) ili od njihovih međuvrsnih križanaca nastalih križanjem sa sortama vrste *V. vinifera* kao što je dobivena i sorta 'Regent'. Monoglukozidni oblici su jače obojani od diglukozidnih, dok acilacija dodatno povećava stabilnost molekule (Flamini i sur., 2013).



Pelargonidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = H$
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OH$; $R_2 = H$
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = OH$
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$
Petunidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = OCH_3$

Slika 3. Strukturne formule antocijanidin-3,5-*O*-diglukozidi

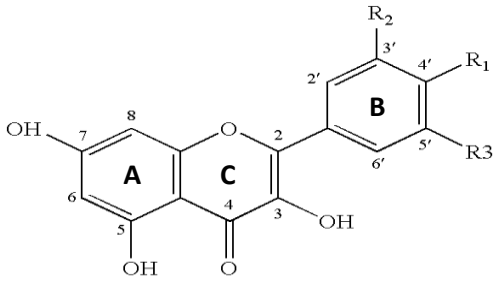
Biosinteza antocijana može biti pod utjecajem okolišnih čimbenika i tehnologije vinogradarske proizvodnje (utječu na sadržaj, dok je sastav većinom sortno specifičan), ali i hormona (apscizinska kiselina primjerice pojačava biosintezu antocijana u grožđu) (Flamini i sur., 2013). Sinteza antocijana započinje u šari, a nakupljanje se nastavlja sve do faze potpune zrelosti grožđa. Nakon te faze dolazi do njihove postupne razgradnje kako grožđe postaje prezrelo. Stanice bliže mesu bobice sadrže veće količine pigmenata od onih smještenih bliže epidermi (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Određene su prosječne količine fenolnih tvari u kožici grožđa sorte 'Regent' (Karoglan Kontić i sur., 2016). Grožđe sorte 'Regent' pokazalo se kao jako dobar izvor antocijana s ukupnim sadržajem od 9810 mg/kg suhe kožice grožđa, s velikim masenim udjelima mono- kao i diglikozida, uz gotovo identičan udio malvidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3,5-*O*-diglukozida (oko 35 % pojedinačno).

2.2. Flavonoli

Flavonoli su sekundarni metaboliti prisutni u gotovo svim višim biljkama pa time i u svima vrstama roda *Vitis*. Smatra se da djeluju kao UV-zaštitne tvari jer snažno apsorbiraju UV-A i UV-B valne duljine. Flavonoli su vrlo zastupljena skupina flavonoida u kožici bobice grožđa i doprinose kopigmentaciji (zajedno s antocijanima). Također su bioaktivne molekule te imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.

Općenito, flavonoli su C6-C3-C6 spojevi s dva hidroksilirana benzenska prstena, A i B, međusobno povezana trikarboksilnim lancem. Međusobno se razlikuju s obzirom na vrstu i broj supstituenata na B prstenu (Slika 4). Manjak ekspresije enzima flavonoid-3',5'-hidroksilaze kod bijelih sorata grožđa ograničava prisutnost flavonola na one s mono- i di-supstituiranim B prstenom pa stoga one mogu sintetizirati samo kvercetin, kemferol i izoramnetin, dok crne sorte grožđa uobičajeno još sadrže i tri-supstituirane molekule miricetina, laricitrina i sirngentina. U grožđu je ova skupina spojeva zastupljena isključivo u obliku glikozida kao što su glukozidi, galaktozidi i glukuronidi, dok su pentoze i rutinoza nešto rjeđe zastupljene šećerne jedinice. Flavonoli su povezani sa šećerom na položaju 3 C prstena molekule flavonola.



Kemferol $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$
Kvercetin $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$
Miricetin $R_1 = R_2 = R_3 = OH$
Izoramnetin $R_1 = OH; R_2 = OCH_3; R_3 = H$
Laricitrin $R_1 = OH; R_2 = OCH_3; R_3 = OH$
Siringetin $R_1 = OH; R_2 = R_3 = OCH_3$

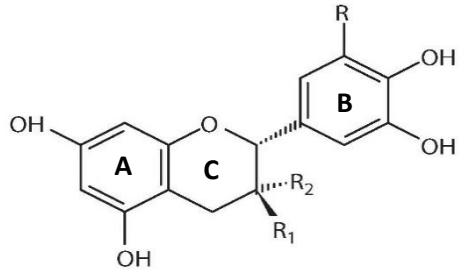
Slika 4. Strukturne formule aglikona flavonola

Flavonoli su pretežno smješteni u vanjskoj epidermi kožice, pošto imaju ulogu UV-zaštitnih tvari. Njihova sinteza počinje u cvatnji, a najveća koncentracija u grožđu dostiže se nekoliko tjedana nakon šare te se potom smanjuje kako bobica grožđa ulazi u zadnju fazu rasta. Ukupna količina flavonola u grožđu u rasponu je od 1 do 80 mg/kg svježih bobica grožđa i crne su sorte grožđa bogatije flavonolima. Neke divlje vrste roda *Vitis* sadrže znatno veće količine flavonola od sorata vrste *V. vinifera* (primjerice vrsta *Vitis riparia* sadrži 111 mg/kg). Sorta 'Regent' sadrži velike količine ovih spojeva, a ovisno o mjestu uzgoja sadržaj je

u rasponu od 840 pa do 3000 mg/kg suhih kožica bobica grožđa. (Karoglan Kontić i sur., 2016; Tomaz i sur., 2015). Drugi genetski uvjetovan faktor koji utječe na količinu flavonola je debljina kožice grožđa (sorte s debelom kožicom sadrže više flavonola). Utjecaj okoline i vanjskih čimbenika na biljku također imaju snažan efekt na količinu flavonola u grožđu. Biosinteza flavonola u tkivima biljke je potaknuta sunčevom svjetlošću (pošto oni djeluju kao UV-zaštitene tvari) te je pod njegovim utjecajem više nego bilo koji drugi metabolit bobice grožđa. UV zračenje (posebice UV-B) aktivira biosintezu flavonola. Temperatura ima manji utjecaj na sintezu flavonola. Optimalne su dnevne temperature 15 - 20 °C, s noćnima 10 - 20 °C što rezultira sintezom veće količine flavonola u bobici grožđa. U fazi dozrijevanja previsoke temperature mogu nepovoljno djelovati na ekspresiju gena za sintezu flavonola, no one pogoduju sintezi antocijana (Flamini i sur., 2013).

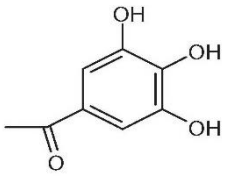
2.3. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su skupina flavonoida sadržana u kožicama bobica grožđa. Oni mogu biti u obliku monomera, dimera, trimera te polimera, a u tom slučaju se nazivaju taninima. Kožica bobica grožđa sadrži sljedeće monomerne oblike: (+)-katehin, galokatehin, (-)-epikatehin, epigalokatehin te epikatehin-3-*O*-galate. Od dimernih oblika najzastupljeniji su procijanidin B1 i B2, dok se u nešto nižim koncentracijama nalaze procijanidini B3 i B4. Katehin i njegov epimer epikatehin međusobno se razlikuju po stereoizomernoj strukturi oko C-3 ugljikova atoma. Epigalokatehin se razlikuje od epikatehina po oksidiranom C-5' atomu prstena B, a epikatehin-3-*O*-galat esterificirani je epikatehin s galnom kiselinom. Kondenzirani tanini u grožđu i vinu uglavnom kao glavne strukturne jedinice sadrže (+)-katehin i (-)-epikatehin (Slika 5) (Hanlin i sur., 2009).



(+)-Katehin R = H; R_1 = OH; R_2 = H
(-)-Epikatehin R = H; R_1 = H; R_2 = OH
(+)-Galokatehin R = OH; R_1 = OH; R_2 =H
(-)-Epigalokatehin R = OH; R_1 = H; R_2 =OH
(-)-Epikatehin-3-*O*-galat R = H; R_1 = H; R_2 = O-G
(+)-Galokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G
(-)-Epigalokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G

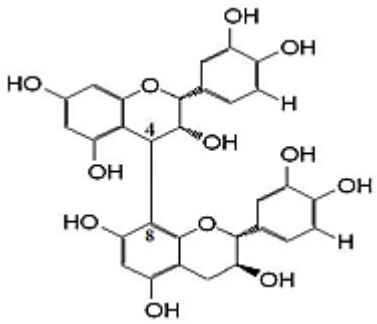
G=



Slika 5. Strukturne formule monomera flavan-3-ola

Flavan-3-oli su amfipatske molekule koje imaju hidrofobni aromatski prsten i hidrofilnu hidroksilnu grupu pomoću kojih se vežu istovremeno na nekoliko mjesta na površinu druge molekule. Polisaharidi stanične stijenke također sadržavaju hidroksilne skupine, kao i aromatske i glikozidne kisikove atome koji imaju sposobnost tvorbe vodikovih veza i hidrofobnih interakcija s taninima. Tanini također mogu biti zarobljeni u utorima i porama mreže polisaharidnog gela. Netopljivi matriks kožice i mezokarpa može imati na sebe vezano preko 22 % tanina prisutnih u grožđu (Hanlin i sur., 2009).

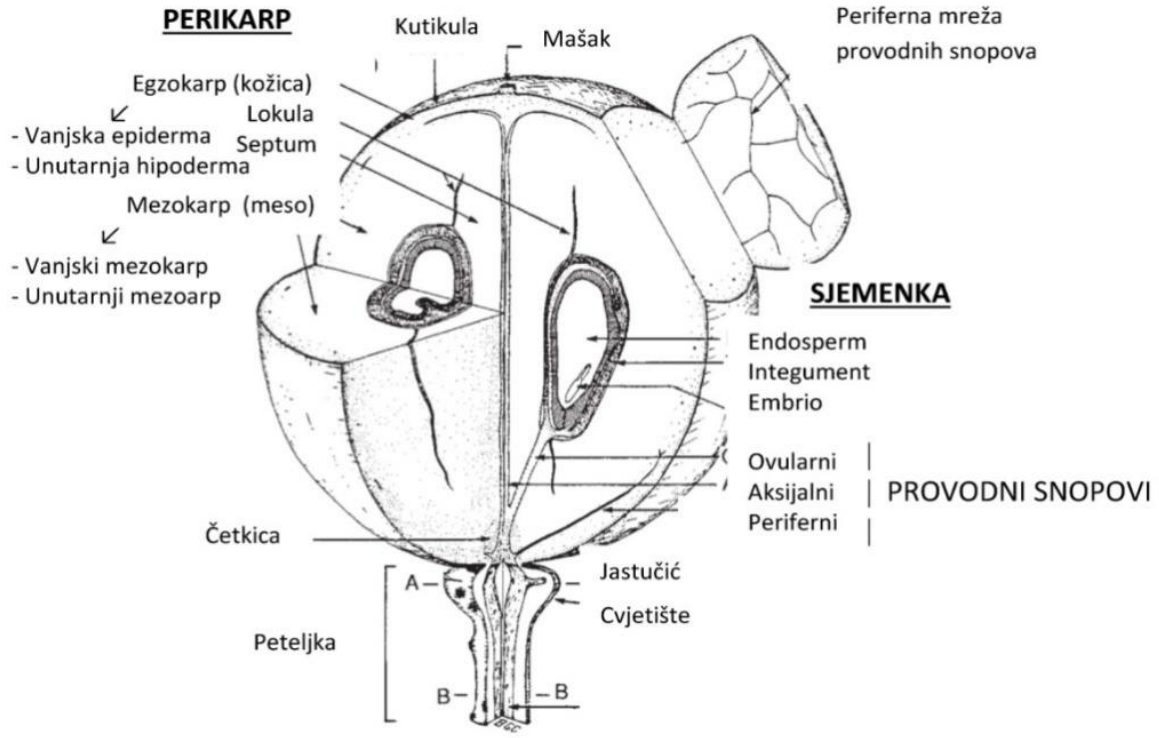
Zastupljenost flavan-3-ola u sorti 'Regent' nešto je niža u usporedbi s ostalim skupinama, a najzastupljeniji je procijanidin B1 (Slika 6) (Karoglan Kontić i sur., 2016).



Slika 6. Procijanidin B1: Epikatehin-(4β→8)-katehin

3. ANATOMIJA BOBICE GROŽĐA

Bobica grožđa je smještena na peteljčici, na proširenju koji se naziva jastučić. Iz peteljčice u bobicu ulaze provodni snopovi koji imaju funkciju ishrane. Kada se bobica otkine od peteljčice, na peteljčici ostaju prekinuti provodni snopovi koji se nazivaju četkice. Bobica je građena od kožice ili egzokarpa, mesa ili mezokarpa (najvećeg dijela bobice), a u sredini su smještene sjemenke (Slika 7). Kožica se sastoji od više slojeva epidermalnih stanica, a kod različitih sorata razlikuje se po debljini. O debljini i čvrstoći kožice ovisi prikladnost sorte za čuvanje, prijevoz i sušenje. Kožica je prekrivena voštanom prevlakom pepeljakom ili mašakom, koji ima funkciju zaštite bobice od prekomjerne vlage. U kožici su pretežito smještene tvari arome i boje. Nezrele bobice imaju zelenu boju zbog prisutnosti klorofila te su one u početku fotosintetski aktivne. Nakon početka dozrijevanja kožica mijenja boju te kod bijelih sorata dolazi do pojave ksantofila i karotenoida (daju nijanse žute boje), a kod crnih sorata do pojave antocijana koji daju sortno tipične svijetlije ili tamnije nijanse ružičaste, crvene, ljubičaste i plave boje (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).



Slika 7. Glavne sastavnice bobice grožđa (Mirošević, 2008)

Rast bobica može se opisati dvostrukom sigmoidnom krivuljom. U prvoj fazi rasta (faza I) događa se intenzivna dioba stanica i postupni rast stanica, nakon čega slijedi lag faza u kojoj dolazi do zastoja rasta bobice (faza II). Zatim slijedi početak dozrijevanja (šara) koja počinje 5 do 8 tjedana prije potpune zrelosti bobice, a kod crnih sorata je okarakterizirana pojavom boje na kožici bobice. Fazu šare slijedi faza ponovnog rasta bobice (faza III) zbog povećanja volumena stanica mezokarpa. Bobica postaje mekana i dolazi do njenog dozrijevanja.

Akumulacijom šećera uz dostupnost vode dolazi do sinteze novih staničnih stijenki (Goulao i sur., 2012). Stanične stijenke imaju hidroksilne skupine koje omogućuju vodikove veze i hidrofobne interakcije s polifenolima. S ciljem razlaganja ovih veza i oslobađanja nutrijenata zarobljenih unutar njih, provode se istraživanje usmjerene na primjenu različitih hidrolizirajućih enzima koji djeluju na stanične stijenke (Chamorro i sur., 2012).

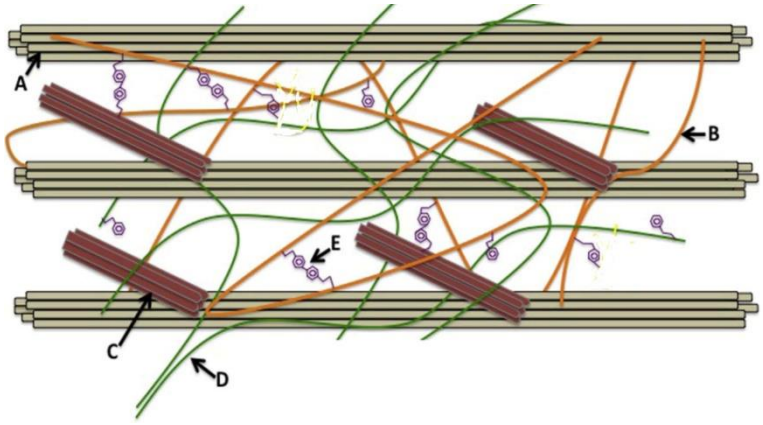
3.1. Sastav stanične stijenke

Stanična stijenka je kompleksna makromolekularna struktura koja okružuje i štiti stanicu. Uloga primarne stijenke uključuje mehaničku potporu biljnoj strukturi, određivanje i održavanje oblika stanice, omogućava otpornost na unutarnji turgorski tlak stanice, regulaciju difuzije kroz apoplast te zaštitu od patogena, dehidracije i vanjskih čimbenika (Goulao i sur., 2012). Mogućnost stanične stijenke da se mijenja do određene mjere pruža fleksibilnost ključnu za povećanje volumena stanice tijekom rasta biljke. U dozrijevanju, dolazi do mekšanja strukture te sinteze tvari odgovornih za ugodan okus i aromu ploda te on postaje atraktivnija hrana životinjama koje hraneći se njime raspršuju sjeme u prirodi, čime biljka osigurava opstanak svoje vrste.

Stanična stijenka biljke se sastoji većinom od biopolimera celuloze, hemiceluloze, lignina i pektina, a udio tih komponenti može varirati ovisno o starosti i fiziološkom stanju biljke (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Stanične stijenke kožica grožđa čine 75 % ukupne mase staničnih stijenki cijele bobice te 25 % sveukupne mase svježe bobice grožđa (Goulao i sur., 2012).

Primarna stanična stijenka dikotiledona (među koje se ubraja i *V. vinifera*) sastoji se od približno 90 % polisaharida koji potječu iz triju glavnih skupina polisaharida, a pri čemu formiraju strukturne elemente: celulozu, matriks unakrsno povezanih glikana (hemiceluloza) i

pektinske polisaharide, koji u voću čine 35, 15 i 40 % udjela u staničnim stijenkama (Slika 8) (Hanlin i sur., 2009).



Slika 8. Shematski prikaz građe primarne stanične stijenke. A-celuloza, B-hemiceluloza, C-proteini, D-pektin, E-fenoli.

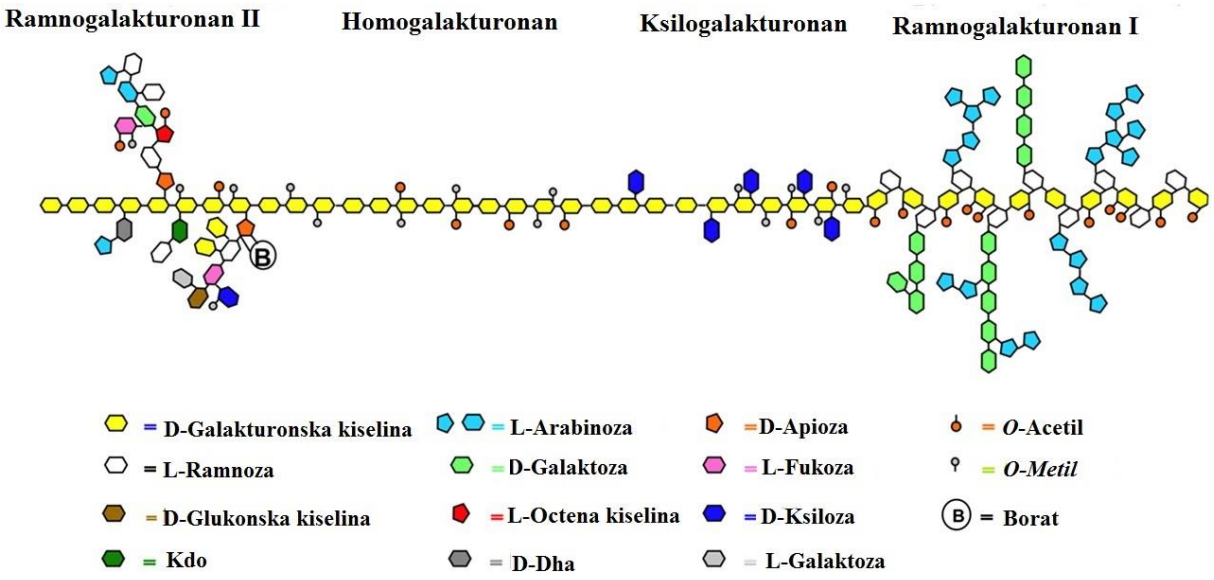
Celuloza je linearni polisaharid koji se sastoji od nerazgranatih lanaca β-D-glukoze povezanih s β-1,4-glikozidaznim vezama. Lanci se međusobno povezuju vodikovim vezama i tvore kristalnu strukturu koja se naziva mikrofibril. Celuloza se može prikazati kao okosnica ili kostur oko kojeg su raspoređeni ostali građevni elementi stanične stijenke. Hemiceluloza se razlikuje od celuloze po tome što ima uključene i druge različite šećere u svojoj strukturi. Najznačajnija hemiceluloza je ksiloglukan koji veže glukane na celulozna vlakna (Goulao i sur., 2012).

Pektini su ugrađeni između celulozne i hemicelulozne mreže, formirajući hidrofilne gelove koji predstavljaju mehaničku okosnicu stijenke, poput regulacije stanja hidratacije i ionskog transporta. Na taj način određuju kapacitet za vodu, kontroliraju propusnost stijenke za enzime i daju dodatnu čvrstoću matriksu (Goulao i sur., 2012). Pektinske supstance (pektini) se nalaze u središnjem dijelu stanične stijenke, kao kalcijevi i magnezijevi pektati. Pektini su kompleksi glikozidnih makromolekula (polisaharida), velike molekulske mase, kiselog karaktera (Hanlin i sur., 2009) i negativnog naboja. U masi ukupne svježe biljne tvari čine udio od 0,5 do 4 % te nemaju definiranu molekulsku masu (25- 360 kDa).

Postoje različiti oblici pektina (Singh Ranveer i sur., 2005). Protopektin je netopljiv i prisutan u provodnom staničju, restrikcijskom hidrolazom se cijepa na pektin i pektinske

kiseline koje su topljivi polimeri galakturonske kiseline i tvore soli "pektate". U nedozrelom voću, pektin se nalazi u obliku netopljivog protopektina, vezanog čvrsto za celulozne mikrofibrile stanične stijenke. Tijekom dozrijevanja, enzimi u voću mijenjaju strukturu pektina, cijepajući njegovu strukturu (glavni lanac ili sporedne lance) (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Pektinske kiseline su lanci poligalakturonske kiseline koji sadrže do 75 % metiliranih galakturonskih prstenova, a njihove soli se nazivaju "pektinati". Molekula pektina (polimetilgalakturonat) je polimerni materijal sa 75 % karboksilnih skupina esterificiranih metilnom skupinom. Faza mekšanja zrele bobice grožđa je rezultat depolimerizacije i otapanja polimera stanične stijenke. Tijekom faze dozrijevanja, zajedničko djelovanje različitih enzima je od glavnog značaja za metabolizam stanične stijenke (Goulao i sur., 2012).

Postoje tri glavne skupine pektina i svaka sadrži D-galakturonsku kiselinu (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Homogalakturonan (HG) je linearni polimer, izgrađen od jedinica D-galakturonske kiseline koje mogu biti acetilirane i/ili esterificirane metilnim skupinama. Homogalakturonan čini 80 % udjela u staničnim stijenkama bobice grožđa (Hanlin i sur., 2009). Metil-esterificirane regije imaju neutralni naboj, dok su nemetilirani dijelovi negativno nabijeni te mogu biti ionski umreženi s ionom Ca^{2+} i tako formirati stabilne gelove s drugim pektinskim molekulama (Goulao i sur., 2012). Nastali gelovi u staničnoj stijenci imaju ulogu regulacije njezine propusnosti i doprinose čvrstoći stanice (Hanlin i sur., 2009). Ramnogalakturonan I (RGI) sačinjavaju ponavljajuće jedinice disaharida ramnoza-galakturonske kiseline koje mogu biti acetilirane i sadržavati bočne lance neutralnih šećera poput galaktoze, arabinoze i ksiloze. Ramnoza sačinjava 20 do 80 % njegove strukture (Goulao i sur., 2012). Glavna razgranata i heterogena komponenta središnje lamele stanične stijenke je RGI te je tri puta zastupljenija u bobici grožđa od ramnogalakturonana II (Hanlin i sur., 2009). Ramnogalakturonan II (RGII) je homogalakturonski lanac s kompleksnim i razgranatim bočnim lancima te tvori njegove produžetke. Jedan je od glavnih polisaharida u crnom vinu s udjelom 100 do 150 mg/l (Goulao i sur., 2012). Te tri skupine pektina međusobno su povezane kovalentnim vezama i tako formiraju pektinski matriks. Smatra se da su pektini kovalentno vezani za celuloznu i ksiloglukansku mrežu pomoću arabinogalaktanskih bočnih lanaca i ksiloglukana (Slika 9) (Hanlin i sur., 2009).



Slika 9. Shematski prikaz pektina primarne stanične stijenke

Fenolne tvari gotovo nisu prisutne u mesu bobice te su pretežno smještene u kožici i sjemenci bobice. Stanične stijenke kožice grožđa sadrže oko 15 % tanina s visokim stupnjem polimerizacije. Također, udio proantocijanidina u kožici bobice čini oko 54 % ukupno ekstraktibilnog iz bobice grožđa. Tijekom dozrijevanja bobice, pektin općenito postaje lakše topljiv. Epidermalne i sub-epidermalne stanice kožice pojačano bubre te dolazi do razgradnje središnje lamele u staničnim stijenkama. Površina stijenke postaje valovita kako dolazi do prekida veza između kalcijevih iona i pektinskih molekula. Kovalentne promjene u polisaharidima stanične stijenke kožice grožđa tijekom dozrijevanja su rezultat zajedničke aktivnosti enzima hidrolaze i *trans*-glikolaze (Goulao i sur., 2012). Homogalakturonani su pojačano deesterificirani i tako stvaraju mjesta podložna daljnjoj razgradnji. Povećava se topljivost pektinskih polisaharida koji se razgrađuju. Promjene u primarnoj staničnoj stijenci tijekom dozrijevanja grožđa mogu, stoga, biti posljedica kovalentnih promjena, kao posljedice djelovanja enzima te nekovalentnih promjena uzrokovanih promjenom pH medija ili koncentracijom metabolita (Hanlin i sur., 2009).

4. ENZIMIMA POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE

Cijeli sadržaj polifenola smješten je većim dijelom u vakuolama stanica kožice grožđa. Kako bi došlo do otpuštanja tih visoko vrijednih nutrijenata, potrebno je osloboditi put otapalu izvan stanice kožice grožđa do vakuole. Najčvršća barijera koja sprječava prolaz fenolnih tvari iz vakuole u stanici u medij izvan stanice je stanična stijenka. Ona također formira hidrofobnu barijeru za difuziju fenola, utječući tako na tok ekstrakcije. Fenolne tvari mogu biti otopljene u vakuoli (najčešće) ili povezane s polisaharidima stanične stijenke (Goulao i sur., 2012).

Razgradnja polisaharida stanične stijenke je ključna za ekstrakciju fenolnih komponenti iz kožice bobice. Stupanj zadržavanja tih komponenti (fenola) ovisi o kompoziciji, strukturi i molekulskoj masi određene fenolne molekule te o fizičkim osobinama stanične stijenke. Poroznost, struktura i kemijska građa mogu utjecati na vezanja (nakupljanja) između polisaharida stanične stijenke i fenolnih supstanci.

Pošto se stanična stijenka sastoji prvenstveno od pektina, logično je da je to komponenta koju treba razgraditi kako bi se razgradila stanična stijenka i sadržaj stanice (fenolne tvari) ekstrahirao izvan nje. Za proces ekstrakcije polifenola iz kožice bobice grožđa koriste se različite ekstrakcijske tehnike, a koje se temelje na uporabi organskih otapala, primjerice: metanola, acetonitrila, etil-acetata, etanola i drugih. Ostaci organskih otapala mogu biti potencijalno štetni za ljudsko zdravlje, a otapalo nakon korištenja treba zbrinuti i stoga se tehnike ekstrakcije organskim otapalima ne smatraju "zelenima". Metoda ekstrakcije može poskupiti proces jer se otapalo mora naknadno odvojiti od ekstrakta prilikom pročišćavanja. Biološka "zelena" metoda za razgradnju stanične stijenke podrazumijeva upotrebu pektolitičkih (i celulaznih) enzima.

Pektolitički enzimi ili pektinaze su prirodni produkti metabolizma bakterija, gljivica, kvasaca, insekata, nematoda, protozoa i biljaka. Mikrobne pektinaze su važne u fitopatogenim procesima, u simbiozi biljaka i mikroba te razgradnji mrtvog biljnog materijala, doprinoseći prirodnom ciklusu ugljika. Napad patogenih mikroorganizama na biljku počinje izlučivanjem pektolitičkih enzima pošto su pektini najzastupljenija tvar u staničnoj stijenci biljke, njenoj prirodnoj barijeri koja štiti od ulaska patogenih organizama. (Biscaro Pedrolli i sur., 2009)

Pektinaze su velika grupa enzima koja cijepa pektinske polisaharide biljnog tkiva na jednostavnije molekule poput galakturonske kiseline. Pošto su pektini supstance s veoma

kompleksnom makromolekulskom strukturom, različiti pektolitički enzimi su potrebni kako bi se pektin razgradio do kraja (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Pektinaze (pektolitički enzimi) hidroliziraju pektinske tvari i čine oko 25 % ukupnih svjetskih enzima u tehnološkoj upotrebi (Singh Ranveer i sur., 2005). Postoje brojne primjene pektinaza u industriji poput ekstrakcije soka iz voća i bistrenje soka (pektin je vlaknasti koloid koji uzrokuje začepljenja tijekom postupka filtracije). Pektinaze koje se primjenjuju u kiselim medijima (ekstrakcije i bistrenja voćnih sokova, proizvodnja pasta od povrća te vinarstvu) se dobivaju najčešće od gljivica vrste *Aspergillus niger* (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Podaci govore da primjena pektinaza poboljšava organoleptička svojstva produkta (boju i okus) i nutritivna svojstva (udio vitamina) te tehnološku učinkovitost (olakšana filtracija).

Pektinaze se mogu podijeliti na (Singh Ranveer i sur., 2005) (Slika 10):

-Protopektinaze koje kataliziraju otapanje inače netopljivog protopektina i razlažu ga na polimere topljivog pektina (protopektin + $H_2O \rightarrow$ pektin). A-tip protopektinaza reagira s unutarnjom stranom u području poligalakturonske kiseline. B-tip reagira s vanjske strane s polisaharidnim lancem koji može povezivati poligalakturonsku kiselinu i sastavnice stanične stijenke.

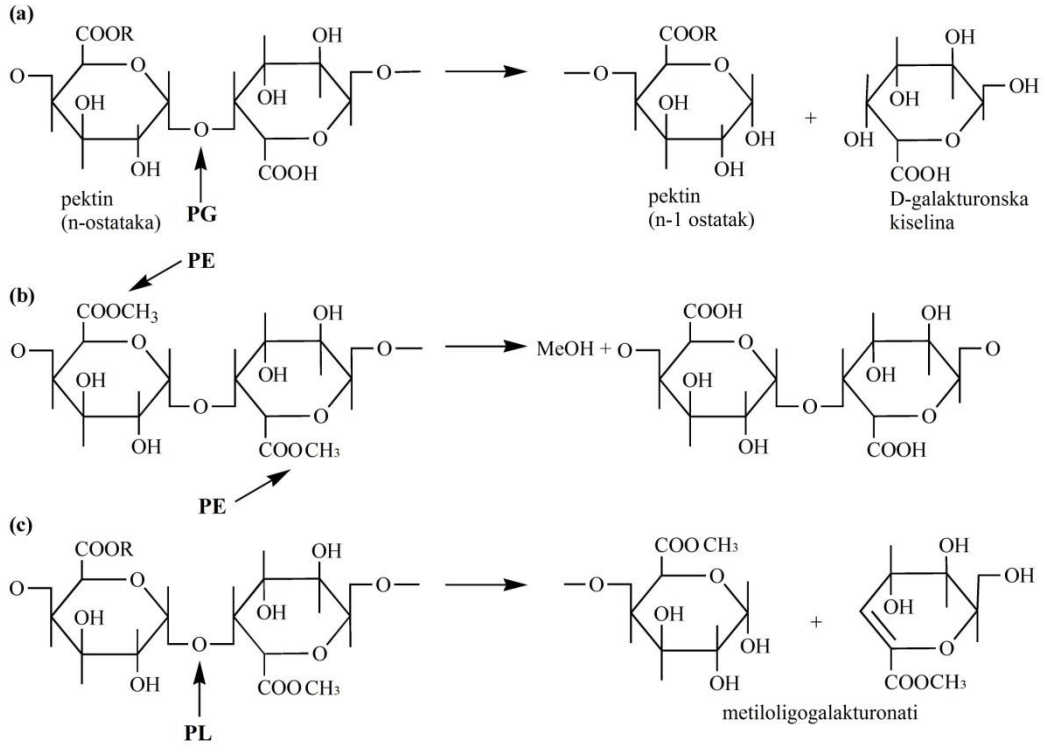
-Poligalaturonaze (pektin depolimeraze) hidraliziraju poligalaturonski kiselinski lanac dodatkom vode te razgrađuju pektat i pektin, a najzastupljeniji je od pektolitičkih enzima. Kataliziraju hidrolitičko cijepanje α-1,4-glikozidnih veza u ostacima D-galakturonske kiseline pektinske tvari. Mogu djelovati na egzo- i endogeni način. Endogeni način katalizira nasumično cijepanje supstrata, dok egzo-poligalakturonaza katalizira hidrolitičko cijepanje s nereducirajućeg kraja tvoreći mono- i digalatkuronate (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Postoje dva načina djelovanja depolimeraza. Hidrolaze kataliziraju hidrolitičko cijepanje uvođenjem vode preko kisikovog mosta, dok *trans*-eliminacijske liaze cijepaju glikozidne veze putem *trans*-eliminacijske reakcije bez sudjelovanja vode. Depolimerizacija se događa nakon djelovanja esteraze.

-Liaze kataliziraju poprečno cijepanje polimera galakturonske kiseline (pektat i pektin) β-eliminacijom. Pektat liaza prilikom djelovanja zahtjeva prisutnost kalcijevih iona, dok oni u slučaju pektin liaze samo povećavaju njezinu aktivnost (Biscaro Pedrolli i sur., 2009).

-Pektin esteraze oslobađaju pektinske kiseline i metanol deesterifikacijom metil-esterskih veza pektinske strukture. Enzim djeluje prvo na metil-esterske grupe galakturonske jedinice

blizu neesterificirane jedinice (Biscaro Pedrolli i sur., 2009). Esteraze djeluju prije depolimeraza.

Potpuna razgradnja pektina zahtjeva i enzime koji cijepaju ramnogalakturonanske lance, međutim to nije potrebno prilikom ekstrakcije polifenola, pošto je cilj samo narušiti kompoziciju stanične stijenke kako bi se oslobodio sadržaj iz stanice.



Slika 10. Način djelovanja pojedinih pektinaza: a) poligalakturonaze (PG), b) pektin metilesteraze (PE), c) pektin liaze (PL)

Postoje određeni faktori o kojima ovisi djelovanje pektinaza, a time i tijek te ujedno povećanje masenog udjela polifenola u ekstraktu. Prvenstveno su to pH medija, temperatura, količina enzima i vrijeme inkubacije.

Djelovanje pektolitičkih enzima i otpuštanje galakturonske kiseline u povećanim koncentracijama može dodatno sniziti pH medija u kojem se provodi ekstrakcija polifenola iz kožice grožđa (Kammerer i sur., 2005). Porast temperature nema značajniji utjecaj na pektinaze, no njezino sniženje (ispod 45 °C) usporava rad enzima (Kammerer i sur., 2005).

Temperaturne oscilacije nemaju tako značajan utjecaj (osim na rad enzima) (Maier i sur., 2007). Optimalne koncentracije enzima su također važne prilikom ekstrakcije te dolazi do pada koncentracije antocijana u mediju ukoliko su one previsoke. Uočeno je također da primjena pektinaza djeluje pozitivno na povećanje koncentracije polifenola samo prvih osam sati primjene. Nakon 24 sata dolazi do istovremene ekstrakcije i razgradnje polifenola te stagnira njihovo povećanje masenog udjela i koncentracija (Chamorro i sur., 2012).

Upotreba pektinaza učinkoviti je način za razgradnju komponenti stanične stijenke pri čemu dolazi do otpuštanja monosaharida i olakšavanja ekstrakcije polifenola, dok celulaze ne dovode do značajnog povećanja koncentracije polifenola (Chamorro i sur., 2012). Prilikom ekstrakcije važna su i kemijska svojstva komponente koja se izdvaja kao i njezina hidrofilnost. Glukozidazna aktivnost nekih enzima može stvoriti aglikone koji su manjeg afiniteta za vodu i manje stabilni (Kammerer i sur., 2005; Maier i sur., 2007).

5. CILJ RADA

Cilj rada je ispitati mogućnost primjene enoloških enzimskih pripravaka koji sadrže pektinaze kao zamjene za uobičajena organska otapala koja se koriste u ekstrakciji flavonoida kožice grožđa te provesti optimizaciju takve metode. Primjena ovih enzimskih pripravaka omogućila bi ekstrahiranje polifenola prema principima zelene ekstrakcije kao i mogućnost uporabe dobivenih ekstrakata u komercijalne svrhe (prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije). Iako je korištenje enzima ekološki opravdana zamjena organskim otapalima, neracionalna količina uporabljenih enzima za ekstrakciju može poskupiti njegovu primjenu. Stoga postoji opravdani razlog za razmatranje faktora koji bi utjecali na ekonomičnost ove metode.

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Uzorci i njihova priprava

'Regent' pripada novoj generaciji sorata s otpornošću na gljivične bolesti stvorenih u Njemačkoj. 'Regent' je sorta vrlo kompleksnog pedigrea u čijem je genomu vrlo mali udio podrijetlom iz ne-vinifera pretka (američke vrste roda *Vitis* otporne prema gljivičnim bolestima).

Veća ekološka osviještenost vinogradara i zabrinutost zbog prekomjerne uporabe pesticida potakle su interes za sorte s otpornošću na gljivične bolesti koje poput 'Regenta' imaju i primjerenu kakvoću. Uz Regent, u Europskoj uniji nekoliko je desetaka sorata s otpornošću na gljivične bolesti formalno priznato kao sorte *Vitis viniferae* i od njih je dozvoljena proizvodnja vina sa zaštitom zemljopisnog podrijetla.

Vina dobivena od grožđa sorte Regent su duboke tamne boje što je rijetka karakteristika vina iz hladnijih podneblja, zbog visoke koncentracije antocijana i flavonola koji zajedno tvore stabilne pigmente.

Istraživanjem i analizom sorte 'Regent' utvrđeno je da u usporedbi s drugim međuvrsnim križancima i sortama s otpornošću na gljivične bolesti sadrži izrazito velike masene udjele polifenolnih komponenti, antocijana i ukupnih flavonola što ovu sortu čini pogodnom za ekstrakcije fenolnih tvari u vinarskoj, prehrambenoj i farmacijskoj industriji.

Uzorci grožđa sorte 'Regent' uzeti su 2014. godine iz vinograda u sklopu pokušališta Jazbina, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Grožđe je ubrano u fazi pune zrelosti i potom su bobice grožđa odmah odvojene od peteljke.

Kako bi se dobio jednoličan (homogen) uzorak grožđa jednake razine dozrelosti prema sadržaju šećera i flavonoida, korištena je metoda flotacije. U procesu flotacije korištene su otopine saharoze različite gustoće. Za daljnju analizu odabrane su bobice grožđa gustoće između 1,088 i 1,099 g/cm^3.

Kožice bobica odstranjene su ručno te zatim posušene na zraku na 25 °C do stalne mase. Suhe kožice grožđa su zatim samljevene, a dobiveni prah je pohranjen na temperaturi 2 °C u staklenom spremniku.

6.2. Čvrsto-tekuće ekstrakcije

Prah dobiven od kožica grožđa (125 mg) je ekstrahiran pomoću 10 mL vodene otopine s udjelom etanola 70 % i mravlje kiseline 1 %, ekstrakcija je provođena jedan dan u zamračenoj prostoriji. Ekstrakt je centrifugiran 20 min na 5000 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi. Supernatant je izdvojen i ukoncentriran pod vakuumom kako bi se izdvojio etanol (40 °C). Preostali ekstrakt nakon uparavanja prenesen je u odmjernu tikvicu od 10 mL i do oznake nadopunjen otopinom vode i fosforne kiseline (99,5 : 0,5 , *v/v*). Ekstrakt je filtriran primjenom membranskog PTFE filtra i analiziran pomoću HPLC uređaja i metode. Sve ekstrakcije su ponovljene tri puta.

6.3. Enzimima potpomognute ekstrakcije

U svim pokusima masa praha kožice grožđa je bila 125 mg, a volumen pufera odgovarajućeg pH koji sadrži određenu količinu enzimskog pripravka (ekstrakcijskog otapala) iznosio je 10 mL. Pripremljene su otopine pufera s vrijednostima pH 2, 3,5 i 5. Otopine enzima bile su pripremane svakodnevno otapanjem 50 mg enzimskih pripravaka u 100 mL otopine pufera odgovarajućeg pH. Deaktivacija enzima je provedena na 90°C u trajanju od 1 min u vodenoj kupelji. Ekstrakt je zatim centrifugiran, a supernatant je sakupljen. Karakteristike korištenih enzimskih pripravaka izoliranih iz vrste *A. niger* prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike uporabljenih enzimskih pripravaka

Naziv enzimskog pripravka	**Glavna enzimska aktivnost**			
	Poligalakturonaza (PG U/g)	**Pektin liaza (PL U/g)**	**Pektin metilesteraza (PE U/g)**	**Celulaza i hemicelulaza**
Lallzyme EX-V	4000	120	1000	+++
Lallzyme HC	3500	100	800	---

6.3.1. Određivanje utjecaja kalcijevih iona

Prije otapanja određenih enzimskih pripravaka, dodani su kalcijevi ioni soli kalcijev klorid heptahidrata ($CaCl_2\ x\ 7H_2O$) u otopine pufera u koncentracijama od 0,015 mol/L. Vrijeme inkubacije je iznosilo 2 h, a temperatura 40 °C uz dodanih 15 mg/g masenog udjela pripravka Lallzyme EX-V. Na taj način se potiče aktivnost pektin metilesteraza.

6.3.2. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije

U ovom nizu pokusa korišten je enzimski pripravak Lallzyme EX-V masenog udjela 15 mg/g pripravljen u otopini pufera pH-vrijednosti 3,5 s dodanim ionima kalcija soli kalcijev klorid heptahidrata. Temperatura prilikom inkubacije iznosila je 40 °C za različite vremenske periode od 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 17, 20 i 24 h.

6.3.3. Određivanje raspona masenih udjela enzimskog pripravka

Tijekom ovog niza pokusa temperatura i vrijeme inkubacije iznosili su 40 °C odnosno 2 h. Otopina enzimskog pripravka Lallzyme EX-V je priređivana otapanjem 50 mg svakog pripravka u 100 mL pufera s pH-vrijednosti 3,5 koja je sadržavala kalcijeve ione u koncentraciji 0,015 mol/L. U posudice s uzorcima pipetirani su određeni volumeni otopine enzimskog pripravka i pufera pH-vrijednosti 3,5 te su tako dobiveni konačni maseni udjeli pripravaka od 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 i 45 mg/g.

6.3.4. Optimiranje postupka enzimima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna

Nakon određivanja optimalnog raspona faktora ekstrakcije kroz zasebne pokuse, efekt četiriju faktora (masenog udjela enzima, pH, temperature ekstrakcije i vremena) na maseni udio ekstrahiranih antocijana, flavonol glikozida i flavan-3-ola je izučen pomoću Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna (BBD) i metode odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM). Navedena četiri parametra su istražena na tri različite kodirane razine za dva različita enzimska pripravka (Tablica 3). Rezultati masenih udjela 3-*O*-glukozida i 3,5-*O*-diglukozida delfinidina, cijanidina, peonidina i malvidina izraženi su

kao njihova suma (maseni udio antocijana), dok su maseni udjeli 3-*O*-glikozidi kvercetina, miricetina, kemferola i izoramnetina izraženi kao njihova suma (maseni udio flavonol glikozida). Maseni udjeli galokatehina, procijanidina B1, procijanidina B2, katehina, epikatehina i epigalokatehina također su izraženi kao njihova suma (maseni udio flavan-3-ola). Dobiveni maseni udjeli korišteni su kao odzivi odnosno Y nezavisne varijable. Rezultati BBD eksperimenta su analizirani pomoću nelinearne višestruke regresije s povratnom eliminacijom kako bi se prilagodili sljedećoj jednadžbi drugog reda sa zavisnom Y varijablom:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (i = 1, 2 \ldots k)$$

β_0, β_i, β_{ii} i β_{ij} su koeficijenti za linearni, kvadratni odnosno interakcijski efekt, dok su x_i i x_j razine kodiranih vrijednosti nezavisnih faktora. Analize eksperimentalnog dizajna i izračuni predviđenih rezultata su provedeni korištenjem računalnog programa Design Expert (Trial Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD).

Srednje vrijednosti, standardne devijacije te razlike između rezultata izračunate su korištenjem Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, Northampton, SAD). Rezultati su analizirani pomoću analize varijance (ANOVA) te su razlike vrednovane Turkey's post-hoc testom na razini od 95 % ($p < 0,05$). Rezultati prikazani u tablicama su srednja vrijednost trostruko provedenih testova.

Tablica 2. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode EAE

Faktori	**Razine faktora**		
Kodirane razine	-1	0	1
A: Maseni udio enzima (mg/g)	10	15	20
*B:*pH	2,0	3,5	5,0
C: Temperatura (°C)	30	40	50
D: Vrijeme (h)	1	2	3

Tablica 3. Uvjeti za provedbu EAE pokusa primjenom BBD

Broj	Maseni udio enzima (mg/g)	pH	Temperatura (°C)	Vrijeme (h)
1	15	3,5	40	2
2	20	3,5	40	3
3	15	2,0	40	1
4	20	3,5	30	2
5	10	2,0	40	2
6	10	5,0	40	2
7	15	5,0	30	2
8	10	3,5	40	3
9	10	3,5	50	2
10	10	3,5	40	1
11	15	5,0	40	1
12	10	3,5	30	2
13	15	3,5	30	3
14	15	3,5	50	3
15	15	5,0	50	2
16	20	3,5	50	2
17	15	2,0	30	2
18	15	5,0	40	3
19	15	3,5	40	2
20	15	2,0	40	3
21	20	3,5	40	1
22	15	3,5	50	1
23	20	2,0	40	2
24	15	2,0	50	2
25	15	3,5	30	1
26	15	3,5	40	2
27	20	5,0	40	2

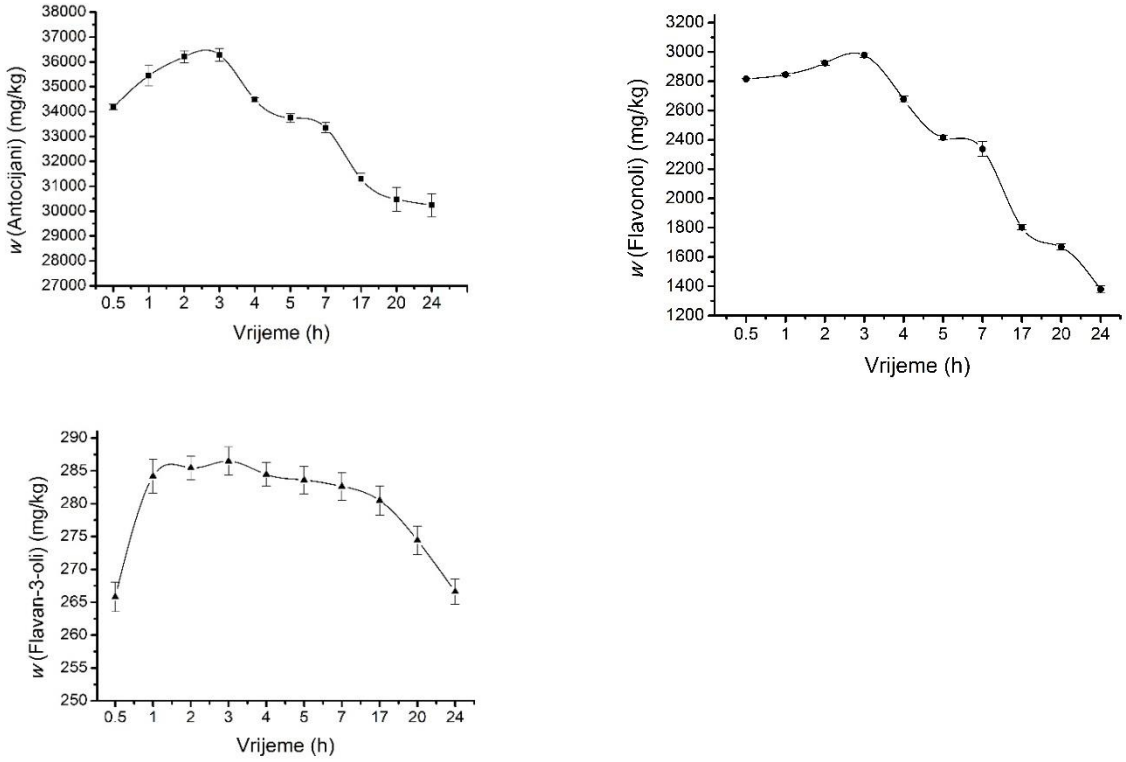
6.4. HPLC analize

Sadržaj pojedinačnih polifenola u dobivenim ekstraktima iz kožica određen je HPLC metodom pomoću HPLC instrumenta Agilent 1100 Series (Agilent, SAD). Odvajanje polifenola provedeno je na Phenomenex Luna Phenyl-hexyl koloni (250 x 4,6 mm, Phenomenex, SAD) uz gradijentno eluiranje korištenjem 0,5 % (*v/v*) vodene otopine fosforne kiseline (otapalo A) dok se kao otapalo B koristila otopina koja je sadržavala acetonitril : vodu : fosfornu kiselinu (50 : 49,5 : 0,5; *v/v/v*) s brzinom protoka 0,9 mL/min. Tijekom analize korišteni su sljedeći uvjeti: volumen ubrizganog uzorka 20 µL i temperatura kolone 50 °C. Flavonoli su detektirani pri valnoj duljini 360 nm, a antocijani pri 518 nm. Flavan-3-oli su određeni primjenom fluorescencijskog detektora pri λ_{ex} = 225 nm i λ_{em} = 320 nm. Identifikacija spojeva temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka s vremenima zadržavanja kao i usporedbom s UV spektrima standarada, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda.

7. REZULTATI I RASPRAVA

7.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na maseni udio flavonoida

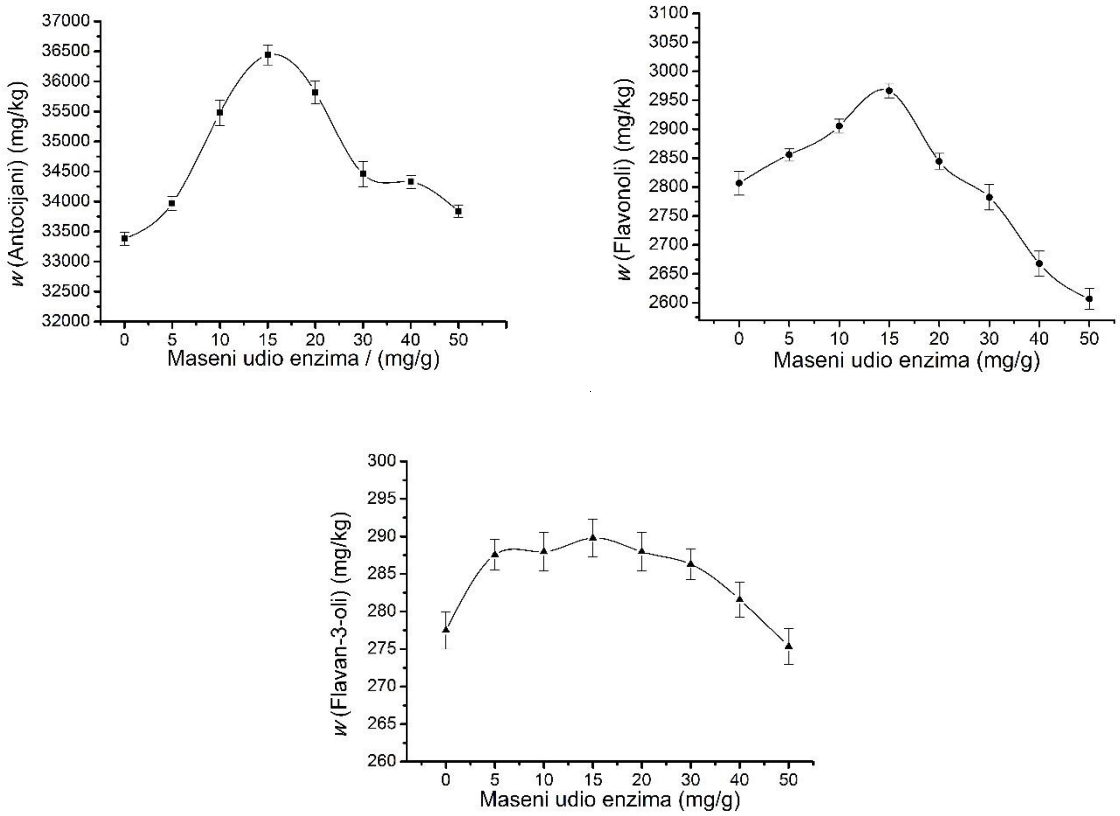
Ovisnost masenih udjela antocijana, flavonol glikozida i flavan-3-ola o vremenu ekstrakcije prikazana je na slici 11. Enzimska hidroliza je provedena u različitim vremenskim periodima (30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 17, 20 i 24 h), dok su drugi parametri bili konstantni, a to su: maseni udio dodanih enzima u vrijednosti 10 mg/g, pH 3,5 i temperatura 40 °C. Značajan porast ukupnog masenog udjela antocijana je zamijećen u rasponu od 1 do 3 h. U istom vremenskom intervalu su ekstrahirane najveće količine ukupnih flavonol glikozida i flavan-3-ola. Ustvrđeno je da dulje vrijeme ekstrakcije rezultira značajnim smanjenjem masenog udjela ukupnih antocijana i flavonol glikozida, dok je maseni udio flavan-3-ola ostao stabilan. Zabilježeni rezultati mogu biti povezani s aktivnošću enzimskog pripravka EX-V koji nije naveden na certifikatu proizvoda, posebice ukoliko on sadrži glikozidaze. Navedeni enzimi imaju sposobnost pretvoriti flavonol glikozide u njihove aglikone. U slučaju produljene hidrolize, dulje od 7 h, opaženo je povećanje masenog udjela nestabilnih aglikona flavonola, posebice kvercetina. Zbog toga je u eksperimentalnom dizajnu je korišten vremenski period od 1 do 3h.



Slika 11. Ovisnost masenog udjela antocijana, flavonola i flavan-3-ola o vremenu inkubacije

7.2. Utjecaj količine upotrijebljenih enzima na ekstrakciju flavonoida

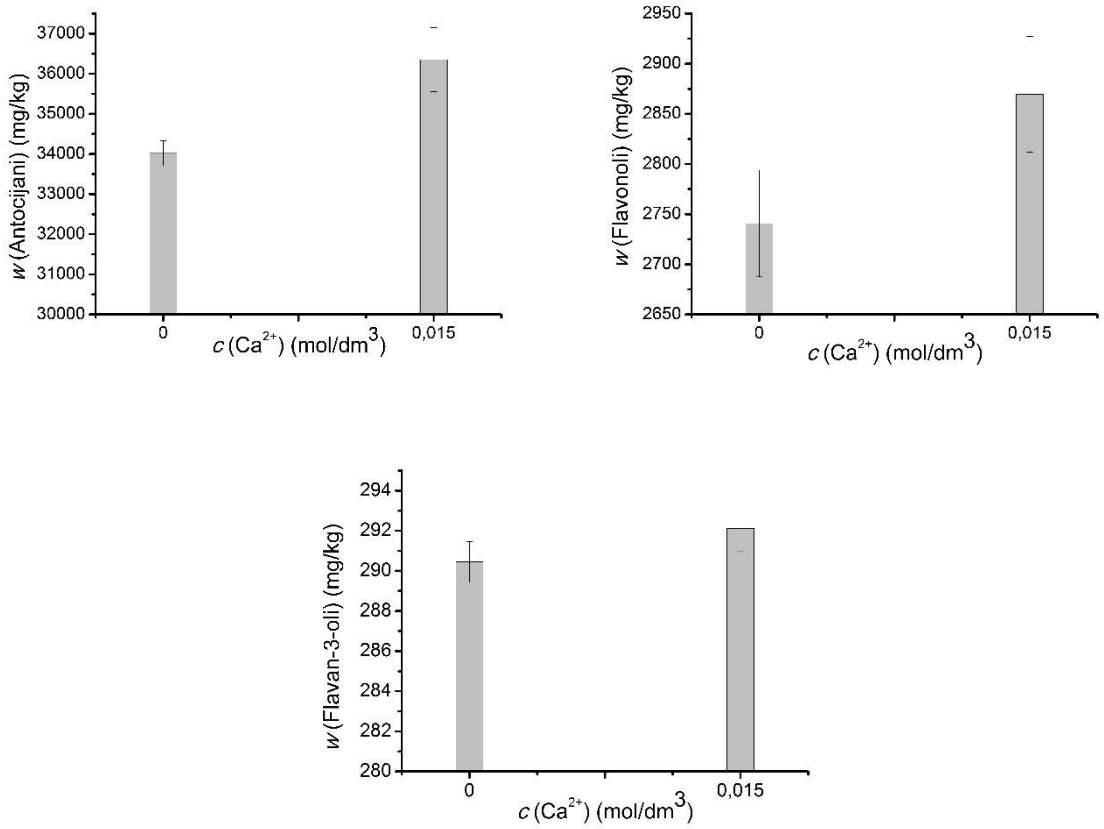
Poznato je da visoke koncentracije fenola mogu inhibirati aktivnost pektinaza. Sorta 'Regent' sadrži izuzetno velike masene udjele antocijana, stoga je neophodno odrediti optimalni raspon količine enzima. Utjecaj različitih masenih udjela dodanih enzima na ukupni maseni udio antocijana, flavonol glikozida i flavan-3-ola je prikazan na slici 12. Uporabljeni su različiti maseni udjeli enzimskog pripravka EX-V (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 i 50 mg/g), dok su ostali parametri bili konstantni: vrijeme ekstrakcije 2 h, pH 3,5 i temperatura 40 °C. Dodatak enzima čak i u malim količinama uzrokuje značajno povećanje masenih udjela svih promatranih skupina spojeva. Najviši maseni udio antocijana dobiven je u slučaju dodatka enzimskog pripravka u rasponu masenih udjela od 10 do 20 mg/g. Vrlo slični rezultati su dobiveni i u slučaju masenog udjela flavonol glikozida pa je stoga taj raspon odabran u daljnjim pokusima. Količina dodanih enzima je imala najmanji utjecaj na maseni udio flavan-3-ola.



Slika 12. Utjecaj masenog udjela enzimskog pripravka na masene udjele antocijana, flavonola i flavan-3-ola

7.3. Utjecaj dodatka kalcijevih iona u ekstrakcijsku otopinu na ekstrakciju flavonoida

Nari i sur. (1991) su demonstrirali da dodatak kalcijevih iona u koncentracijama od 0,015 mol/L snažno potiče aktivnost pektin metilesteraza. Dodatak kalcijevih iona soli kalcijev klorid heptahidrata u ekstrakcijsko otapalo u navedenoj koncentraciji rezultira značajnim porastom ukupnih masenih udjela antocijana i flavonol glikozida (Slika 13).



Slika 13. Utjecaj dodatka kalcijevih iona u otopinu enzima na masene udjele antocijana, flavonola, flavan-3-ola

7.4. Optimizacija uvjeta ekstrakcije

Prema rezultatima dobivenim u prethodno provedenim pokusima i svojstvima pektinaza navedenim u literaturi, odabrane su razine ekstrakcijskih parametara za pokuse provedene u sklopu postupka optimiranja metode primjenom BBD. Temeljem analize dobivenih modela, ustanovljeno je da se maseni udjeli antocijana, flavonol glikozida i

flavan-3-ola najbolje mogu opisati kvadratnim polinomnim modelom za oba istražena enzimska pripravka. Parametri analize varijance (ANOVA) za modele prikazani su u tablicama 4 i 5. Determinacijski koeficijenti (R^2) su u rasponu od 0,8502 do 0,9743, dok su p-vrijednosti u rasponu od <0,0001 do 0,0002 što pokazuje da su modeli visoko signifikantni. Modeli također imaju zanemarivu neprikladnost, jer su određene p-vrijednosti veće od 0,2300, dok su F-vrijednosti veoma male. Kvadratne polinomne jednadžbe za sve varijable su prikazane u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Lallzyme EX-V

Član	**Antocijani**		**Flavonoli**		**Flavan-3-oli**	
	Koeficijent	***p*-vrijednost**	**Koeficijent**	***p*-vrijednost**	**Koeficijent**	***p*-vrijednost**
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,7781		0,6034		0,7148
Odsječak	35310,86		3228,00		298,95	
A:Maseni udio enzima	73,97	0,7327	-51,18	0,0359	-1,64	0,2038
B:pH	-2522,82	<0,0001	-289,69	< 0,0001	-8,58	<0,0001
C:Temperatura	1008,92	0,0008	51,51	0,0454	1,77	0,1963
D:Vrijeme	-78,06	0,7685	-47,79	0,0868	1,69	0,2557
AB	568,65	0,1453			5,34	0,0832
AC					-3,98	0,3447
AD			-43,25	0,2743	2,07	0,0012
BC	-245,83	0,5148	-29,86	0,4448		
BD	-605,08	0,3755	-152,67	0,0518		
CD	469,15	0,3348				
A^2			-78,70	0,0430	6,29	0,0052
B^2	2797,05	<0,0001	143,92	0,0029	7,14	0,0026
C^2	-852,51	0,0206	-190,05	0,0001	7,38	0,0021
D^2	-311,03	0,4617	-5,83	0,2393	9,03	0,0005
R^2	0,9535		0,9513		0,9032	
Prilagođeni *R^2*	0,9141		0,9100		0,8865	
Preciznost	16,78		15,30		11,49	

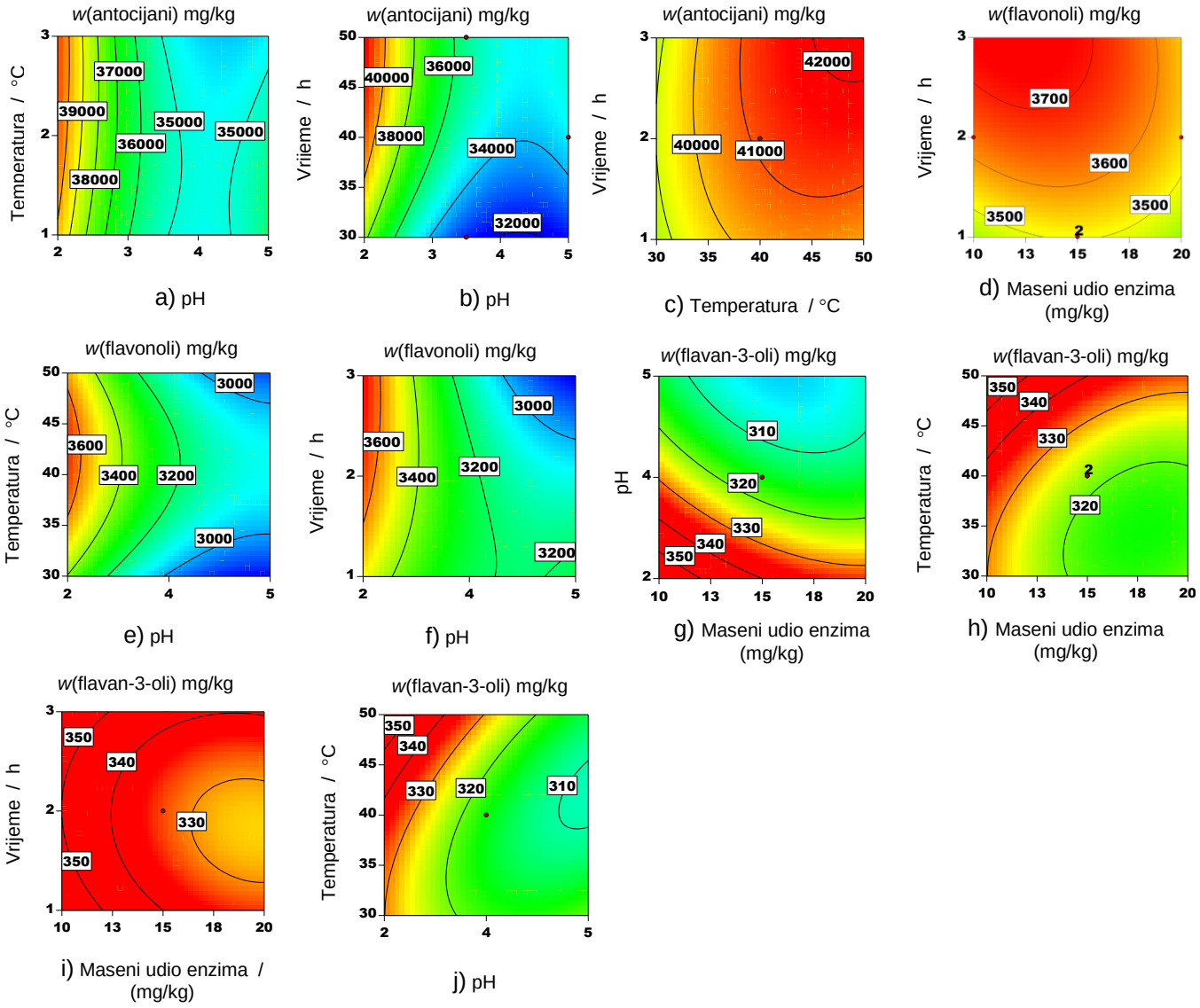
Tablica 5. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Lallzyme HC

Član	Antocijani		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	***p*-vrijednost**	**Koeficijent**	***p*-vrijednost**	**Koeficijent**	***p*-vrijednost**
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,7781		0,6034		0,7148
Odsječak	35310,86		3228,00		298,95	
A:Maseni udio enzima	73,97	0,7327	-51,18	0,0359	-1,64	0,2038
B:pH	-2522,82	<0,0001	-289,69	< 0,0001	-8,58	<0,0001
C:Temperatura	1008,92	0,0008	51,51	0,0454	1,77	0,1963
D:Vrijeme	-78,06	0,7685	-47,79	0,0868	1,69	0,2557
AB	568,65	0,1453			5,34	0,0832
AC					-3,98	0,3447
AD			-43,25	0,2743	2,07	0,0012
BC	-245,83	0,5148	-29,86	0,4448		
BD	-605,08	0,3755	-152,67	0,0518		
CD	469,15	0,3348				
A^2			-78,70	0,0430	6,29	0,0052
B^2	2797,05	<0,0001	143,92	0,0029	7,14	0,0026
C^2	-852,51	0,0206	-190,05	0,0001	7,38	0,0021
D^2	-311,03	0,4617	-5,83	0,2393	9,03	0,0005
R^2	0,9535		0,9513		0,9032	
Prilagođeni *R^2*	0,9141		0,9100		0,8865	
Preciznost	16,78		15,30		11,49	

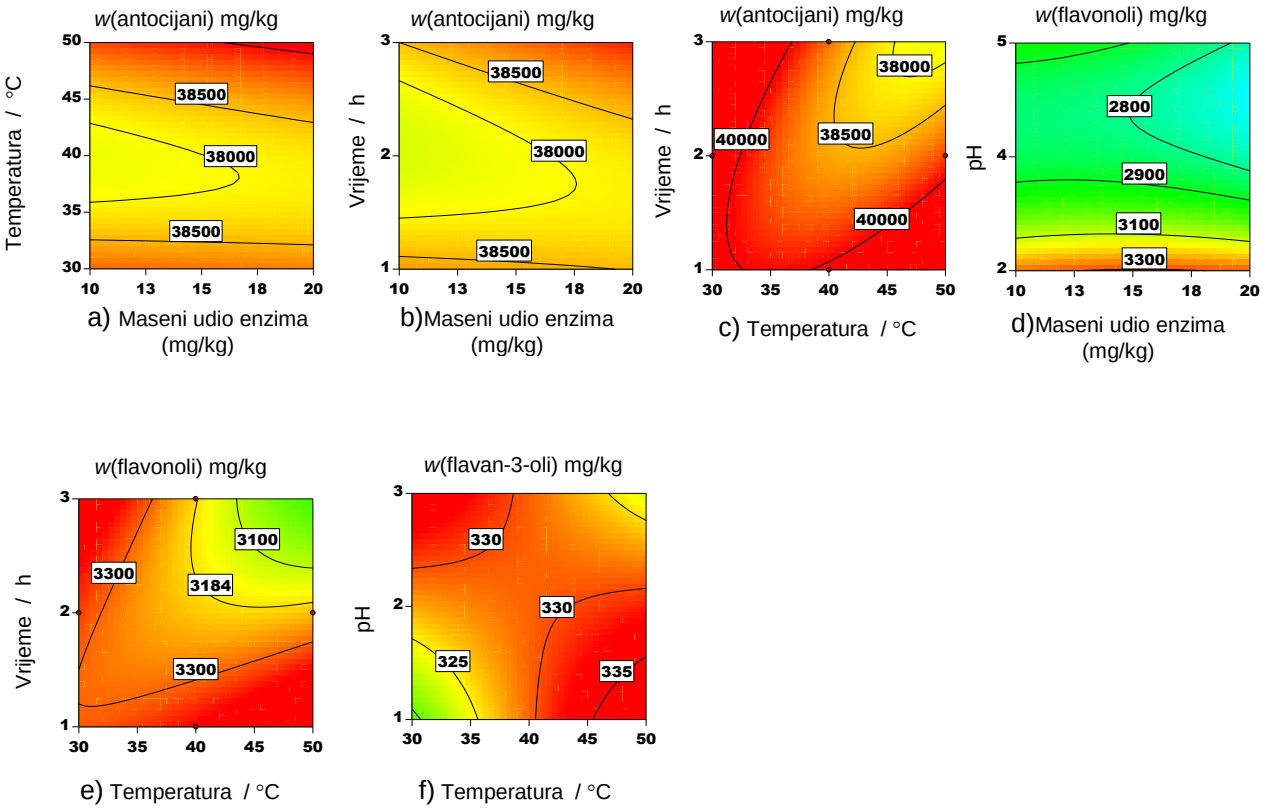
Iz grafova konturnih prikaza (Slika 14 i 15) može se očitati da je najznačajniji faktor u svim promatranim slučajevima bila pH-vrijednost. Niže pH-vrijednosti su polučile veće masene udjele antocijana, flavonol glikozida i flavan-3-ola. Ovakvi rezultati mogu biti objašnjeni stabilnošću fenolnih komponenti u kiselim uvjetima te aktivnošću pektinaza. Antocijani su najstabilniji pri vrlo niskim pH-vrijednostima kada su u obliku flavilijevog kationa (Skrede G.,W. R. E., 2002). Pektinaze izolirane iz *A. niger* imaju najveću aktivnost pri niskom pH.

Temperatura je također važan parametar te njezino povišenje dovodi do povećanja djelotvornosti rada enzima. Iz prikaza (Slika 14 c) vidljivo je da se ekstrakcija antocijana korištenjem enzima Lallzyme EX-V poboljšala proporcionalno s povišenjem temperature i vremenom ekstrakcije. U slučaju enzimskog pripravka Lallzyme HC, prilikom ekstrakcije antocijana i flavonola (Slika 15 c, e), utjecaj temperature je bio obrnuto proporcionalan vremenu. Iz navedenih grafova kontura enzimskog pripravka Lallzyme HC moguće je iščitati da i niže temperaturne vrijednosti (oko 30 °C) te produljeno vrijeme ekstrakcije (do 3 h) imaju jednako dobar učinak kao i najviše promatrane temperaturne u kraćem vremenu. Pri višim temperaturama topljivost fenolnih spojeva u kožici grožđa može porasti, dok u isto vrijeme dolazi do smanjenja viskoznosti dobivenih ekstrakata što rezultira većim udjelom ekstrahiranih komponenti (Cacace J. E., Mazza G., 2003). Prema literaturi, pektinaze izolirane iz *A. niger* imaju veće aktivnosti pri temperaturama u rasponu od 40 do 50 °C, što se može potvrditi prikazom (Slika 14 h).

Iz istog prikaza utjecaja temperature i masenog udjela enzima, može se zaključiti da je manja količina enzima potrebna za ekstrakciju pri višim temperaturama za postizanje veće učinkovitosti ekstrakcije. Povećanje masenog udjela enzima iznad 10 mg/kg nije ni u jednom slučaju rezultiralo boljom učinkovitošću ekstrakcije (Slika 14 d, g, h, i; Slika 15 a, d). Ustanovljeno je da povećane količine dodanih enzimskih pripravaka nisu umanjile potrebno vrijeme ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije u trajanju od tri sata je doprinijelo u gotovo svim pokusima boljoj ekstrakciji ciljanih flavonoida (Slika 14 b, c, d). Kod viših temperatura potreban je kraći vremenski period da bi se postigla uspješnost ekstrakcije u istoj mjeri kao i u slučaju provođenja ekstrakcije pri nižim temperaturama i produljenom vremenu.


mg/kg="" temperatura="" °c="" vrijeme="" h="" flavonoli="" flavan-3-oli="" ph="" maseni="" udio="" enzima="" (mg/kg)="" a)="" ph="" b)="" c)="" temperatura="" d)="" e)="" f)="" g)="" h)="" i)="" j)="" 37000="" 39000="" 36000="" 35000="" 38000="" 40000="" 34000="" 32000="" 42000="" 41000="" 3700="" 3600="" 3500="" 3400="" 3200="" 3000="" 310="" 320="" 330="" 340="" 350="" 2="" 4="" 5="" 10="" 13="" 15="" 18="" 20="" 30="" 35="" 40="" 45="" 50="" 1="" 3="">

Slika 14. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka na masene udjele za pripravak Lallzyme EX-V a) antocijani uz maseni udio enzima 15 mg/g i vremenu inkubacije 3 h, b) antocijani uz maseni udio enzima 15 mg/g pri 40 °C, c) antocijani uz maseni udio enzima 15 mg/g pri pH 2, d) flavonola pri pH 2 i 40 °C, e) flavonola uz maseni udio enzima 15 mg/g i vremenu inkubacije 2 h, f) flavonola uz maseni udio enzima 15 mg/g pri 40 °C, g) flavan-3-ola pri 50 °C i vremenu inkubacije od 1 h, h) flavan-3-ola pri pH 2 i vremenu inkubacije 1 h, i) flavan-3-ola pri pH 2 i 50 °C, j) flavan-3-ola uz maseni udio enzima 10 mg/g i vremenu inkubacije 1 h



Slika 15. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka na masene udjele za pripravak Lallzyme HC a) antocijana pri pH 2 i vremenu inkubacije 3 h, b) antocijana pri pH 2 i 35 °C, c) antocijana uz maseni udio enzima 15 mg/g pri pH 2, d) flavonola pri 40 °C i vremenu inkubacije 1 h, e) flavonola uz maseni udio enzima 15 mg/g i pH 2, f) flavonola uz maseni udio enzima 15 mg/g i vrijeme inkubacije 1 h

7.5. Optimalni uvjeti i potvrda modela

Optimalni uvjeti ekstrakcije za pojedine skupine flavonoida za svaki pojedini enzimski pripravak prikazani su u tablici 6. Dobiveni optimalni uvjeti razlikuju se kako za pojedine enzimske pripravke tako i za pojedine skupine flavonoida, ali je svima zajedničko da je potrebno ekstrakciju provoditi pri niskim pH-vrijednostima. Razlike u dobivenim optimalnim vrijednostima za pojedinu skupinu flavonoida ekstrahiranu različitim enzimskim pripravcima posljedica su različitog sadržaja pojedinih enzima kao što su poligalakturonaza, pektin liaza te pektin metilesteraza u određenom enzimskom pripravku (Tablica 1), ali i moguće prisutnosti drugih enzimskih aktivnosti koje nisu navedene u specifikacijama proizvođača za pripadni pripravak. Najveći maseni udjeli antocijana, flavonola i flavan-3-ola dobiveni su primjenom pripravka Lallzyme EX-V. Bez obzira što pripravak Lallzyme HC ne sadrži celulaze i hemicelulaze on je također pokazao zadovoljavajući učinak pri ekstrakciji flavonoida. Temeljem dobivenih rezultata kao i sadržaja pojedinih enzima u pojedinom pripravku, može se zaključiti da je za ekstrakciju flavonoida najvažnija aktivnost različitih pektinaza, a posebice one poligalakturonaze i pektin metilesteraze koje su u najvećim udjelima zastupljene u pripravku Lallzyme EX-V, dok pripravak Lallzyme HC sadrži nešto manje količine tih enzima (Tablica 1).

Prikladnost jednadžbi za dobivene modele određena je u nizu pokusa u kojima su korišteni optimalni uvjeti navedeni u tablici 6. Eksperimentalno određene vrijednosti su vrlo bliske predviđenim vrijednostima, a razlika između njih je manja od 1,5 % što upućuje da su dobiveni modeli pouzdani i točni.

Tablica 6. Optimalni uvjeti ekstrakcije EAE, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

Skupina	**Maseni udio enzima (mg/g)**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**Vrijeme (h:min)**	**Predviđena vrijednost (mg/kg)**	**Dobivena vrijednost (n=3) (mg/kg)**
EX-V						
Antocijani	10,30	2,00	46	2:30	41966,08	41907,41±45,13
Flavonoli	12,00	2,00	43	2:45	3736,42	3811,98±21,03
Flavan-3-oli	12,00	2,00	49	1:15	347,45	341,30±9,65
Konačni uvjeti	**10,50**	**2,00**	**45**	**3:00**		
Antocijani					41905,32	41753,21±76,22
Flavonoli					3726,47	3718,34±5,88
Flavan-3-oli					344,21	346±2,83
HC						
Antocijani	20,00	2,00	30	1:00	41224,10	41072,84±83,47
Flavonoli	12,00	2,00	45	1:00	3517,60	3498,47±38,14
Flavan-3-oli	15,00	2,20	50	3:00	335,28	329,35±4,71
Konačni uvjeti	**11,20**	**2,00**	**31**	**2:45**		
Antocijani					41325,07	40949,21±19,82
Flavonoli					3395,74	3392,21±14,08
Flavan-3-oli					340,20	336,27±1,054

Tablica 7. Maseni udio pojedinih flavonoida ekstrahiranih iz kožice grožđa korištenjem različitih metoda ekstrakcija, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kožice.

Pojedinačni flavonoidi	**EX-V**		**HC**		**SLE**	
	$\tilde{Y}$± SD	RSD	$\tilde{Y}$± SD	RSD	$\tilde{Y}$± SD	RSD
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	263,34±3,12[a]	1,18	263,45±1,16[a]	0,44	240,50±0,68[a]	0,28
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	642,78±10,08[a]	1,57	634,04±9,38[a]	1,48	588,09±1,92[b]	0,33
Delfinidin-3-*O*-glukozid	8732,79±5,49[a]	0,06	8532,13±8,38[b]	0,10	8084,17±14,03[c]	0,17
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1636,11±4,00[a]	0,24	1589,88±4,90[b]	0,31	1563,32±3,51[c]	0,22
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10370,30±36,78[a]	0,35	10330,40±14,90[a]	0,14	10091,90±16,81[b]	0,17
Cijanidin-3-*O*-glukozid	3261,43±7,69[a]	0,24	3181,12±4,96[b]	0,16	3122,48±5,21[c]	0,17
Peonidin-3-*O*-glukozid	1089,60±3,25[a]	0,30	1041,68±1,03[b]	0,10	1069,62±0,80[c]	0,07
Malvidin -3-*O*-glukozid	15756,60±55,01[a]	0,35	15376,07±20,92[b]	0,14	15736,10±17,94[a]	0,11
MASNI UDIO ANTOCIJANA	**41752,95±76,10[a]**	0,22	**40948,77±18,85[b]**	0,06	**40496,19±58,18[c]**	0,14
Miricetin-3-*O*-glukozid	172,41±0,19[a]	0,11	157,29±0,83[b]	0,53	148,18±1,51[c]	1,02
Rutin	281,28±0,30[a]	0,11	256,61±1,35[b]	0,53	263,53±1,09[c]	0,41
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	251,18±2,79[a]	1,11	229,14±2,49[b]	1,08	263,74±1,54[c]	0,58
Kvercetin-3-*O*-glukozid	2753,68±2,99[a]	0,11	2512,15±13,23[b]	0,53	2851,82±1,57[c]	0,06
Kemferol-3-*O*-glukuronide	108,50±0,12[a]	0,11	98,98±0,52[b]	0,53	111,95±0,76[c]	0,68
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	151,23±0,16[a]	0,11	137,96±0,73[b]	0,53	156,49±1,45[c]	0,93
MASENI UDIO FLAVONOL GLIKOZIDA	**3718,27±6,27[a]**	0,17	**3392,13±17,69[b]**	0,52	**3795,71±1,42[c]**	0,04
Galokatehin	253,66±3,12[a]	1,23	251,29±1,37[a]	0,54	233,95±1,91[b]	0,81
Procijanidin B1	15,71±1,15[a,b]	7,32	15,94±0,29[a,b]	1,83	14,35±0,32[b]	2,23
Epigalokatehin	11,16±0,53[a]	4,72	9,62±0,37[a]	3,85	15,79±0,77[c]	4,88
Katehin	7,27±0,49[a]	6,74	2,75±0,05[b]	8,19	8,08±0,78[a]	9,65
Procijanidin B2	40,06±1,14[a]	2,85	39,09±0,30[a]	0,77	40,01±1,06[a]	2,66
Epikatehin	18,08±0,48[a]	2,65	17,19±0,49[a]	2,85	17,14±1,08[a]	6,32
MASENI UDIO FLAVAN-3-OLA	**345,94±2,88[a]**	0,83	**335,87±1,64[b,d]**	0,49	**329,32±2,46[c]**	0,75

$\tilde{Y}$ srednja vrijednost (n = 3), SD standardna devijacija, RSD relativna standardna devijacija. Slova a, b i c na mjestu eksponenta odnose se na grupiranje unutar reda. Različita slova prikazuju statističku razliku $p<0,05$.

7.6. Usporedba enzimski potpomognute ekstrakcije i čvrsto tekuće ekstrakcije

Kako bi se odredila učinkovitost utjecaja enzimima potpomognute ekstrakcije korištenjem različitih enzimskih pripravaka, maseni udjeli flavonoida dobiveni u tim ekstraktima uspoređeni su s onima u ekstraktima dobivenim primjenom metode SLE. Maseni udjeli pojedinih flavonoida u ekstraktima dobivenima različitim metodama su navedeni u tablici 7. Iz rezultata se može zaključiti da se ekstrakcija flavonoida iz kožice grožđa odvija najintenzivnije djelovanjem pektinaza, posebice poligalakturonaza i pektin metilesteraza. Rezultati pokazuju da je enzimima potpomognuta ekstrakcija uz primjenu enzimskog pripravaka Lallzyme EX-V učinkovitija metoda za ekstrakciju antocijana i flavan-3-ola od ekstrakcije čvrsto-tekuće. Dok je metoda SLE učinkovitija za ekstrakciju flavonol glikozida, posebice za ekstrakciju kvercetin-3-*O*-glukozida. Dobivene vrijednosti se mogu objasniti sekundarnom aktivnošću enzimskih pripravaka, posebice glikozidaza. Relativna standardna devijacija (RSD) je izračunata kako bi usporedili ponovljivost i preciznost metoda EAE i SLE. Ponovljivosti i preciznosti metoda EAE korištenjem različitih enzimskih pripravaka (RSD: od 0,06 do 8,19 %) su veoma slične onima dobivenim u slučaju primjene metode SLE (RSD: od 0,06 do 9,65 %). Za obje metode ekstrakcije najviši RSD je izračunat kod pojedinačnih flavan-3-ola. To se može objasniti njihovom kemijskom prirodnom i malim masenim udjelima. Tijekom ekstrakcije, ovi spojevi mogu hidrolizirati, izomerizirati te mogu nastati kao produkti hidrolize tanina (Skrade G., W.R.E., 2002). Neki enološki enzimski pripravci mogu sadržavati aktivnosti tanaza. Velika prednost korištenja metode EAE je smanjenje broja potrebnih koraka tijekom ekstrakcije. Ne postoji potreba da se ekstrakcijsko otapalo uklanja čime se izbjegava mogućnost pojave pogreški, a do kojih može doći tijekom učestalog prenošenja uzoraka iz jedne posude u drugu. Zagrijavanje ekstrakta na 90 °C u trajanju 1 min tijekom deaktivacije enzima, ne uzrokuje razgradnju flavonoida.

8. ZAKLJUČAK

Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn uspješno je primijenjen za optimiranje enzimima potpomognute ekstrakcije flavonoida iz kožice grožđa. Rezultati ukazuju da je metoda EAE uz primjenu enzimskog pripravka Lallzyme EX-V, pri temperaturi ekstrakcije od 45 °C, tijekom vremena ekstrakcije 3 h, pri pH 2,0 te masenog udjela enzimskog pripravka 10,52 mg/g djelotvorna metoda za ekstrakciju flavonoida iz kožice grožđa. Prednosti ove metode uključuju smanjeno trajanje ekstrakcije, korištenje kemikalija koje nisu štetne za okoliš, a dobiveni ekstrakt je odmah spreman za HPLC analizu, kao i za industrijsku upotrebu, bez potrebe da se uklanja ekstrakcijsko otapalo.

9. POPIS LITERATURE:

1. Biscaro Pedrolli D., Costa Monteiro A., Gomes E., Cano Carmona E. (2009) Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbal Pectinolytic Enzymes. The Open Biotechnology Journal: 9-15.
2. Cacace J. E.; Mazza G. (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries.
3. Chamorro S., Viveros A., Alvarez I., Vega E., Brenes A. (2012) Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. Food Chemistry. 133: 308-314.
4. Flamini R., Mattivi F., De Roso M., Arapitsas P., Bavaresco L. (2013) Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int. J. Mol. Sci*. 14: 19652-19663.
5. Goulao L.F., Fernandes J.C., Lopes P., Amancio S. (2012) Tackling the cell wall of grape berry. The Biochemistry of the Grape Berry: 172-181.
6. Hanlin R.L., Hrmova M., Harbertson J.F., Downey M.O. (2009) Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. Australian Journal of Grape and Wine Research. 16: 173-184.
7. Kammerer D., Claus A., Shieber A., Carle R. (2005) A novel process for the recovery of polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) pomace. Journal of food science. 70: 157-162.
8. Karoglan Kontić J., Rendulić Jelušić I., Tomaz I., Preiner D., Marković Z., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E. (2016) Polyphenolic Composition of the Berry Skin of Six Fungus-Resistant Red Grapevine Varieties. International Journal of Food Properties. 00: 1-14.
9. Maier T., Göppert A., Kammerer D. R., Schieber A., Carle R. (2007) Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. Springer-Verlag. 227: 267-274.
10. Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008) Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
11. Nari J., Noat G., Ricard J. (1991) Pectin methylesterase, metal-ions and plant cell-wall extension – hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase.
12. Ribéreau-Gayon P, Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006) Handbook of enology, Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments 141.

13. Singh Ranveer J., Saxena S., Gupta R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry 40: 2931-2940.
14. Skrede G., W. R. E. (2002) Flavonoids from berries and grapes in Shi J., M. G., Le Maguer M. (Ed.) Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects; CRC Press: Boca Raton, FL.
15. Tomaz I., Maslov L., Stupić D., Preiner D., Ašpergerb D., Karoglan Kontića J. (2015) Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. *Phytochem. Anal*. 27:19-20.

10. ŽIVOTOPIS AUTORA

Matija Lesković rođen je 8. studenog 1991. godine u Zagrebu. Pohađa i završava osnovnu školu "Davorin Trstenjak" te opću "XI." gimnaziju u Zagrebu. Godine 2010. nakon uspješno položene državne mature upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Hortikultura. Obranom završnog rada pod nazivom *Utjecaj primjene novih tehnologija filtracije na kemijski sastav vina* stječe 2013. godine akademski naziv Sveučilišnog prvostupnika *Baccalaurea* Inženjera Hortikulture. Iste godine upisuje diplomski studij Hortikultura, usmjerenja Vinogradarstvo i vinarstvo. Za vrijeme studija sudjeluje u dvije internacionalne stručne prakse, u Ujedinjenom Kraljevstvu (Plumpton college, East Sussex) te u Sjedinjenim Američkim Državama (vinarija Cakebread Cellars, Napa Valley, Kalifornija). Dobitnik je stipendije grada Zagreba za izvrsnost, akademske godine 2014./2015.