

Vida Petrušić

Ekstrakcijske tehnike kod analize fenola u grožđu

T.M.Takeuchi,C.G.Pereira, M.E.M.Braga, M.R.Marostica Jr, P.F.Leal,
M.A.A,Meireles,*Extracting Bioactive Compounds from Food Products:Theory and
Application*, CRC Press, 2009

Kemijski seminar I

Zagreb, 2021.

0. SADRŽAJ

0. Sadržaj	2
1. Uvod	4
2. Vinova loza	5
2.1. Anatomska građa bobice grožđa	5
2.2. Fenoli u grožđu	9
2.2.1 Fenolne kiseline	10
2.2.2 Stilbeni	11
2.2.3 Flavonoidi	11
2.2.3.1 Flavanoli	12
2.2.3.2 Flavan-3-oli	13
2.2.3.3 Antocijanini	14
3. Ekstrakcijske tehnike	16
3.1. Ekstrakcija čvrsto – tekuće	16
3.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija	17
3.1. Ekstrakcija čvrsto- tekuće	16
3.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija	17
3.3 Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija	18
3.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija	18
3.5. Raspšenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu	22
3.6. Ostale ekstrakcijske metode	21
4. Zaključak	23

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je po udjelu u proizvodnji najznačajnija voćna vrsta s proizvedenom količinom od 77 milijuna tona grožđa (podaci za 2013. godinu) od čega se 80 % preradi u vina . 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 . 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 . 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.

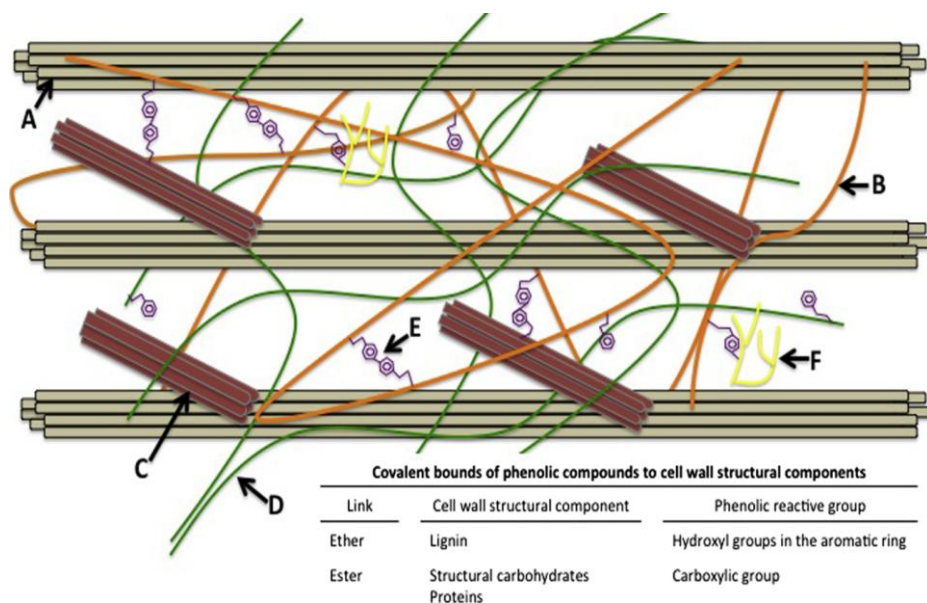
2. Vinova loza

Vinova loza se ubraja u porodicu lozica. Rod loza (*Vitis*) sastoji se od 70 vrsta, i dijeli se u dva podroda *Muscadinia* i *Euvitis*. Oni se razlikuju prema morfološkim i anatomskim karakteristikama i po broju kromosoma (*Muscadinia* $2n=40$, *Euvitis* $2n=38$).²¹ Vrste podroda *Euvitis* (Sjevernoamerička, Istočnoazijska, Euroazijska) su najznačajnije za vinogradarstvo.²¹ Većina sorata vinove loze nastale su spontanim križanjem, iako ima i onih koje su stvorene utjecajme čovjeka, točnije odgovarajućim oplemenjivačkim postupcima. Danas se veliki trud ulaže u stvaranje sorata koje su otporne na bolesti i utjecaj štetnika. U Europi danas su aktivni brojni prorami oplemenjivanja u svrhu dobivanja što kvalitetnijeg vina.

2.1. Anatomski građa bobice grožđa

Biljna stanica sadrži organele: jezgru, endoplazmatski retikul, mitohondrij, plastide, ribosome, Golgijev kompleks i stanične vakuole, obavijena je plazmom. Organele dijele stanicu na različite odjeljke a svaki odjeljak ima različitu funkciju u metabolizmu. Najveća organela je vakuola, obavijena je tonoplastom, biološkom membranom koja odvija lumen vakuole od citostola. One su glavni spremnik u stanicama bobica grožđa za šećere, organske kiseline, aromatske spojeve, fenole, ione i vodu. Postoji više vrsta vakuola litičke, taninske, lipidne i fenolne vakuole. Fenolne vakuole su specijalizirane, koje karakterizira velika količina fenola i kiselo okruženje. Fenoli se nakupljaju u glikoziranim oblicima što povećava njihovu topljivost i olakšava prijenos. Stanična stijenka je neživa složena makromolekularna struktura koja štiti živi dio stanice, te daje čvrstoću i oblik biljnoj stanici, s kemijskog stajališta definira se kao netopljiva tvar koja ostaje nakon lize biljnog tkiva koje je izloženo djelovanju pufera, enzima i organskih otapala. 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. Stanične stijenke kožica grožđa čine 75 % ukupne mase staničnih stijenki cijele bobice te 25 % sveukupne mase svježe bobice grožđa. 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,

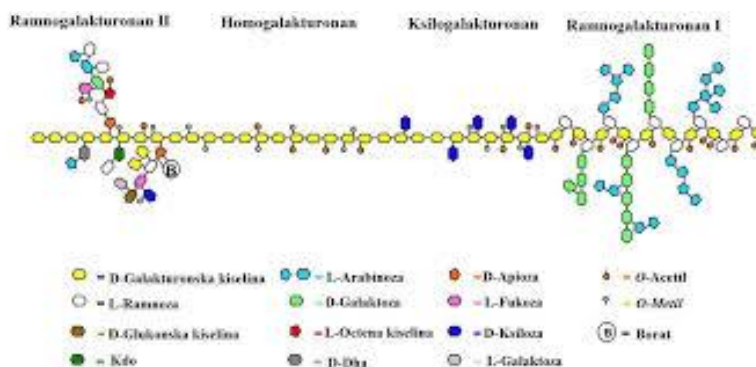
matriks unakrsno povezanih glikana (hemiceluloza) i pektinske polisaharide, koji u voću čine 35, 15 i 40 % udjela u staničnim stijenka (Slika1.)



Slika 1. Shematski prikaz građe primarne stanične stijenke

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. 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. 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 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 tri glavne skupine pektina i svaka sadrži D-galakturonsku kiselinu. 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.. 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. Nastali gelovi u staničnoj stijenci imaju ulogu regulacije njezine propusnosti i doprinose čvrstoći stanice. Ramnogalakturonan I (RGI) sačinjavaju ponavljajuće jedinice disaharida ramnozagalakturonske kiseline koje mogu biti acetilirane i sadržavati bočne lance neutralnih šećera poput galaktoze, arabinoze i ksiloze. Ramnoza sačinjava 20 do 80 % njegove strukture. Glavna razgranata i heterogena komponenta središnje lamele stanične stijenke je RGI te je tri puta zastupljenija u bobici grožđa od ramnogalakturonana II . 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 . 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 2).



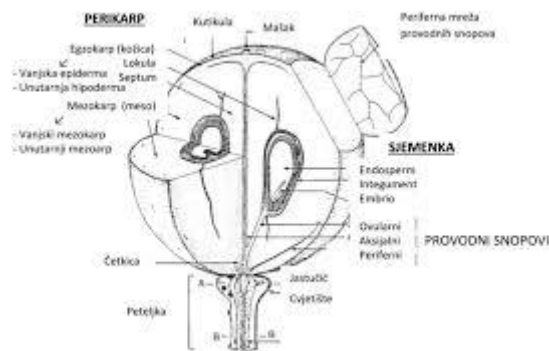
Slika 2. Shematski prikaz pektina primarne stanične stijenke

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 kože 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 kože grožđa tijekom dozrijevanja su rezultat zajedničke aktivnosti enzima hidrolaze i transglikolaze. 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 .

Prema histološkoj diferenciji razlikujemo središnju lamelu, primarnu i sekundarnu staničnu stijenku. Kožica grožđa u svojim stanicama sadrži samo središnju lamelu i primarnu staničnu stijenku tipa 1. Središnja lamela povezuje susjedne stanice, građena je od pektina i malih proteina. Primarna stanična stijenka je građena od polisaharida, strukturnih proteina, fenola minerala i enzima.²²⁻²⁴

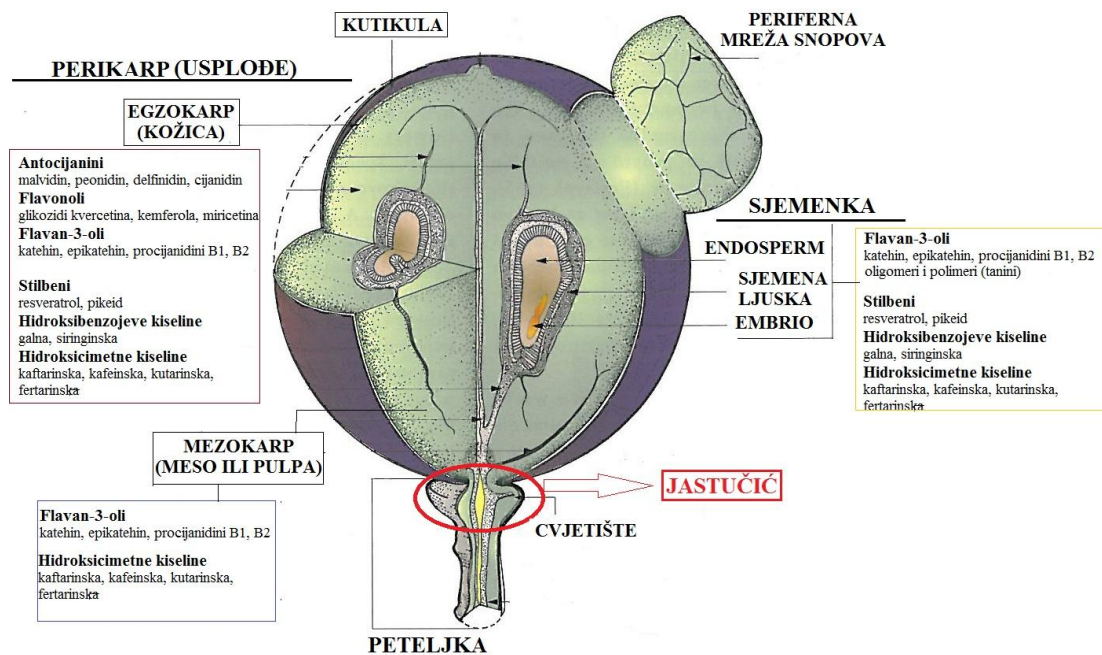
Nakon oplodnje iz plodnice razvija se bobica, plod vinove loze, koja je smještena na proširenju peteljčice koju nazivamo jastučić. Provodni snopovi imaju funkciju ishrane bobica, a u istu ulaze iz peteljčica. Rast bobica može se opisati dvostrukom sigmoidnom krivuljom. U prvoj fazi rasta (faza I) događa 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. 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 istraživanja usmjerena na primjenu različitih hidrolizirajućih enzima koji djeluju na stanične stijenke. Bobicu grožđa čine sjemenka i perikap (Slika 3).²²⁻²⁵



Slika 3. Glavne sastavnice bobice grožđa (Mirošević, 2008)

2.2. Fenoli u grožđu

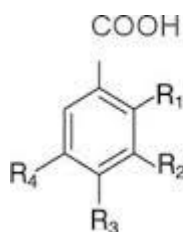
Fenolni spojevi su najrašireniji sekundarni metaboliti u biljnom svijetu, identificirano je više od 8000 različitih biljnih fenolnih spojeva. Oni imaju ulogu u rastu, oplodnji i razmnožavanju i sudjeluju u obrambenim reakcijama. Kako bi ostvarili svoju funkciju ovi se spojevi nakupljaju u posebnim tkivima i vrstama stanica. Sekundarni metaboliti se prenose iz stanica u kojima su sintetizirani u susjedne stanice ili u druga tkiva. Obično se nalaze u vakuolama. Zbog složene građe podjeljeni su u skupine i podskupine. Podjela se temelji na složenih fenolnih pretenova. Sastav i sadržaj fenolnih spojeva u bobicama grožđa ovisi o genotipu vinove loze, okolišnim uvjetima i uvjetima uzgoja. U bobicama se sintetiziraju fenolne kiseline, stilbeni i flavonoidi. Većina fenola kožice grožđa je sadržana u stanicama hipoderme i epiderme, a položaj ovisi o strukturi, pa tako mogu biti vezani na staničnu stijenku, nalaziti se u vakuolama ili citoplazmi ili biti udruženi sa jezgrom (Slika 4).



Slika 4. Razdioba fenola u različitim tkivima bobice grožđa

2.2.1. Fenolne kiseline

To su C_6-C_1 aromatske karboksilne kiseline koje su preteča drugih brojnih spojeva važnih za rast i razvoja. U grožđu je sadržano nekoliko hidroksibenzojevih kiselina: galna, getinzinska, p-Hidroksibenzojeva kiselina, prokatehinska, salicilna, siringinska, vanilinska. Ove su kiseline zastupljene u konjugiranim oblicima kao esteri ili glikozidi. U najvećim količinama sadržane su u sjemenkama bobica grožđa, a kada dolaze u slobodnom obliku mogu se naći i u kožicama. Od navedenih kiselina galna je najzastupljenija i vrlo često tvori estere s flavan-3-olima.

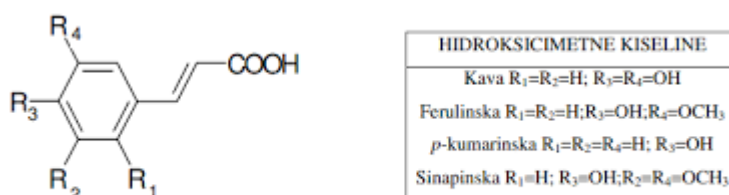


Galna kiselina $R_1 = H; R_2 = R_3 = R_4 = OH$
 Prokatehinska kiselina $R_1 = H; R_2 = OCH_3; R_3 = R_4 = OCH_3$
 Siringinska kiselina $R_1 = H; R_2 = OCH_3; R_3 = OH; R_4 = OCH_3$
 Vanilinska kiselina $R_1 = H; R_2 = OCH_3; R_3 = OH; R_4 = H$

Slika 5. Strukturne formule hidroksibenzojevih kiselina

Hidroksicimetne kiseline imaju osnovnu strukturu s jedinicom C_6-C_3 koja sadrži dvostruku vezu na bočnom lancu, može biti *trans* i *cis* konfiguraciji. U grožđu su bili

najzastupljeniji *trans*-izomeri. Ove se kiseline razlikuju prema broju i vrsti supstituenata na benzenskom prstenu. Slika 6.



Slika 6. Strukturne formule hidroksicimetnih kiselina

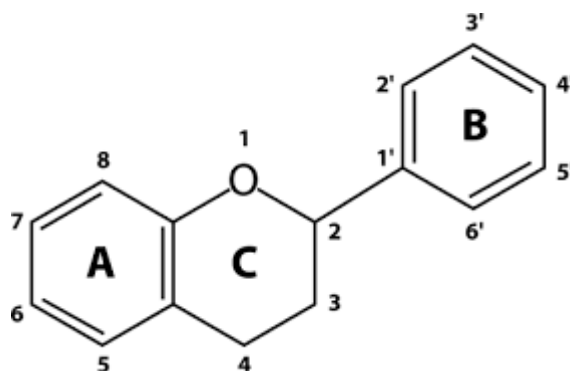
Hidroksicimetne kiseline nalaze se ponajviše u vakuolama stanica perikarpa. Kaftarinska je kiselina najzastupljenija.

2.2.2. Stilbeni

Vrlo značajna skupina spojeva za rast i razvoj bobica grožđa, jer je štite od različitih biotički i abiotičkih utjecaja. U strukturi sadrže 1,2-difeniletilen ($C_6-C_2-C_6$). Najjednostavniji i isto tako ishodni stilben je *trans*-reservatrol, posjeduje antimikrobnu aktivnost. Manje stabilan je *cis*-reservatrol, manja stabilnost je posljedica steričkih smetnji između aromatskih prstena. Jedna od mogućih modifikacija je glikozilacija koja je pogodno sredstvo za pohranu, prijenos, promjene antimikotičke aktivnosti. lkolizirani derivati reservartola su *trans*- i *cis*-reservatrol - 3-O- β -D-glukopiranozidi te astringin. Dolazi i do metilacije. Pterostilben je dimetilirani derivat *trans*-reservatrola. Oksidacijskim povezivanjem *trans*-reservatrola i njegovih derivata nastaju dimeri, trimeri i tetrameri, a najznačajnija skupina su viniferini. Sinteza stilbena u bobicama grožđa je potaknuta biotičkim i abiotičkim stresom. S obzirom na udjel stilbena sorte vinove loze dijelimo na dvije skupine. Prvu skupinu čine sorte koje sadrže velike masene udjele ($1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ svježih bobica do $22,5 \text{ mg kg}^{-1}$) dok drugu skupinu čine ($0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ svježih bobica do $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$). Promjena masenih udjela ovise o samoj sorti te okolišnim uvjetima kao i o uvjetima uzgoja.²⁶

2.2.3. 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 7).



Slika 7. Osnovna struktura flavanoida

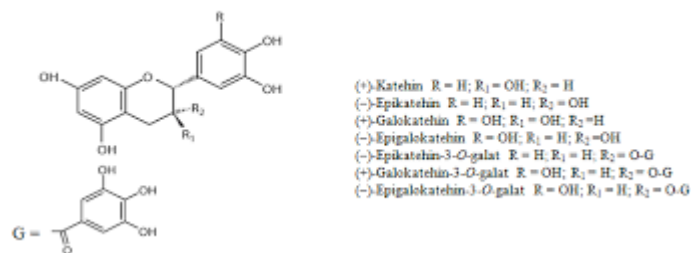
2.2.3.1 Flavonoli

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. Manjak ekspresije enzima flavonoid-3',5'-hidroksilaze kod bijelih sorata grožđa ograničava prisutnost flavonola na one s mono- i disupstituiranim 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. Flavonoli su pretežno smješteni u vanjskoj epidermi kože, pošto imaju ulogu UVzaštitnih 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. Drugi genetski uvjetovan faktor koji utječe na količinu flavonola je debljina kože 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 noćima 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.²⁶

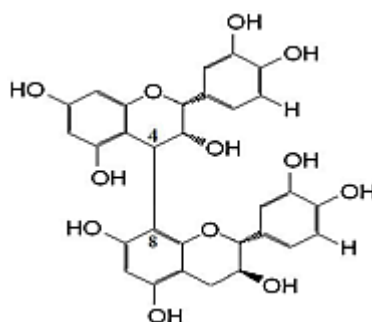
2.2.3.2 Flavan-3-oli

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 stereoisomernoj 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 (-)-epikatehi.²⁷



Slika 8. 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 kože i mezokarpa može imati na sebe vezano preko 22 % tanina prisutnih u grožđu. Zastupljenost flavan-3-ola u sorti 'Regent' nešto je niža u usporedbi s ostalim skupinama, a najzastupljeniji je procijanidin B1 (Slika 9).²⁶

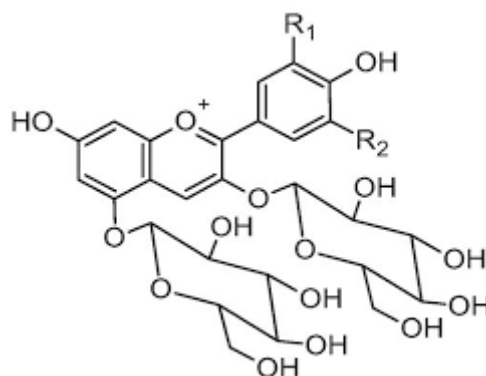


Slika 9. Procijanidin B1: Epikatehin-(4β→8)-katehin

2.2.3.3. Antocijanini

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.²⁶ Antocijani se sintetiziraju u citosolu te se potom prenose u vakuolu, gdje se pohranjuju u posebnim odjeljcima koji se često nazivaju antocijanske vakuolarne inkluzije.²⁶ 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 -OCH₃). 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 10) nego kao aglikoni (antocijanidini). U grožđu sorata *V. vinifera* identificirani su isključivo monoglukozidni oblici antocijana.



Slika 10. Strukturne formule antocijanidin-3,5-O-diglukozidi

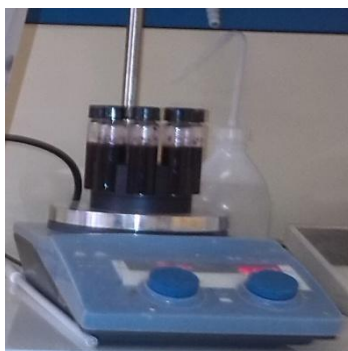
3. Ekstrakcijske tehnike

Ekstrakcija je selektivno odjeljivanje jednog ili više analita između dvije faze koje se miješaju. Proces se sastoji od niza koraka. U prvom koraku se putem difuzije uzorak dovodi u neposredan kontakt sa ekstrakcijskim otapalom. U drugom koraku dolazi do razdvajanja i/ili otapanja analita u ekstrakcijskom otapalu. Afinitet analita prema ekstrakcijskom otapalu mora biti veći nego afinitet prema matrici uzorka. Na kraju ekstrakcijska faza mora difundirati kroz uzorak te se odijeliti u zasebnu fazu koja se potom uklanja od netopljive matrice centrifugiranjem ili filtriranjem. Do podjele ekstrakcijskih tehnika dolazi s obzirom na fizikalni proces do kojega dolazi tijekom razdvajanja analita od matrice uzorka. Za ekstrakciju fenola koriste se brojne ekstrakcijske tehnike kao što su ekstrakcija čvrsto tekuće (eng. Solid-liquid extraction SLE),^{2,3,7} ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (eng. Ultrasound-Assisted extraction, UEA), mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (eng. Microwave-Assisted extraction, MAE),⁸ enzimima potpomognuta ekstrakcija (eng. Enzyme-Assisted Extraction, EAE),⁸ tlačna ekstrakcija tekućinom (eng. Pressurized Liquid Extraction, PLE),⁹ naziva se još i ASE, ekstrakcija superkričnim fluidom (eng. Supercritical Fluid extraction), raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu (eng. Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)¹⁰. Za sve vrste ekstrakcije vrijede ista pravila: vrstu ekstrakcijskog otapala, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, veličinu čestica te omjer faza koji se definira kao omjer čvrstog uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala.

3.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće

Najčešće je primjenjivana tehnika za ekstrakciju fenola. Definira se kao fenomen prijenosa mase u kojemu analiti sadržani u čvrstoj matrici difundiraju u ekstrakcijsko otapalo koje je s njom u kontaktu. Ova se ekstrakcija može provesti: maceracijom, miješanjem ili mućkanjem. Prijenos mase mogu povećati promjenom gradijenta koncentracije, difuzijskih koeficijenata, graničnih slojeva, na koje utječe vrsta otapala, veličina čestica, temperatura i trajanje ekstrakcije. Otapalo je glavni faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije^{11,12}. Topljivost fenolnih spojeva ovisi o njihovoj polarnosti. Vrlo često tijekom ekstrakcije fenola dolazi i do ekstrakcije drugih spojeva. Do koekstrakcije¹³ dolazi kada se koriste ekstrakcijska otapala s udjelom

organske faze većim od 70%. U tom slučaju potrebn je provesti naknadni postupak pročišćavanja ekstrakciju tekuće-tekuće ili ekstrakciju na čvrstoj fazi. Za ekstrakciju se najčešće koristi metanol,² etanol,³ aceton, etil-.acetat, te njihove vodene otopine. Na ekstrakciju utječe i Ph vrijednost ekstrakcijskog otapala. U ekstrakcijska otapala dodaju se različite kiseline . Vrijeme ekstrakcije i temperaturu potrebno je optimirati. Fenoli imaju ograničenu termičku stabilnost pa nije moguće konstantno povećanje temperature, max temperatura je 60°C Povećanje temperature, povećanje omjera faza ima pozitivan učinak na ekstrakciju. Brzina difuzije se povećava što je veći omjer mase čvrstog uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala. Veličina čestica ima maksimalan učinak na ekstrakciju tako da manje čestice dovode smanjenja difuzijske udaljenosti soluta čime se poveća brzina ekstrakcije.



Slika 11. Ekstrakcija čvrsto tekuće uz miješanje

3.2 Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Temelji se na razdiobi uz primjenu ultrazvuka visokog inteziteta raspona frekvencije od 20 kHz do 100 kHz. Pizelektrični sustavi se koriste za pretvorbu električne u energiju zvuka. Kada je intezitet ultrazvuka dovoljno veliki, ekspanzijski ciklus dovodi do nastanka kavitacija. Mjehurići apsorbiraju energiju zvučnih valova te se u ciklusu ekspanzije povećavaju, a u ciklusu kompresije se smanjuju. U jednom ciklusu eksapnzije i ekspresije, rast mjehurića je veći od njegovog smanjenja pa dolazi do urušavanja. U darni valovi uzrokuju visoke tlakove i temperature. Kada udare u površinu uzorka dovode do fizikalno-kemijskih promjena uzorka. Pojava kavitacije ovisi o intezitetu i frekvenciji ultrazvuka te o viskoznosti i površinskoj napetosti i gustoći tekućine. Svaka tekućina pri određenoj temepraturi ima najveću aktivnost kavitacije.^{16,17} Prilikom djelovanja udarnih valova dolazi do razaranja stanične

stijenke čime se olakšava izlučivanje željenog analita u ekstrakcijsko otapalo. Na ekstrakciju utječu brojni faktori kao što su omjer faza, veličina čestica uzorka, vrijeme, temperatura, otapalo. Ova tehnika se vrlo rijetko primjenjuje u ekstrakciji fenola.

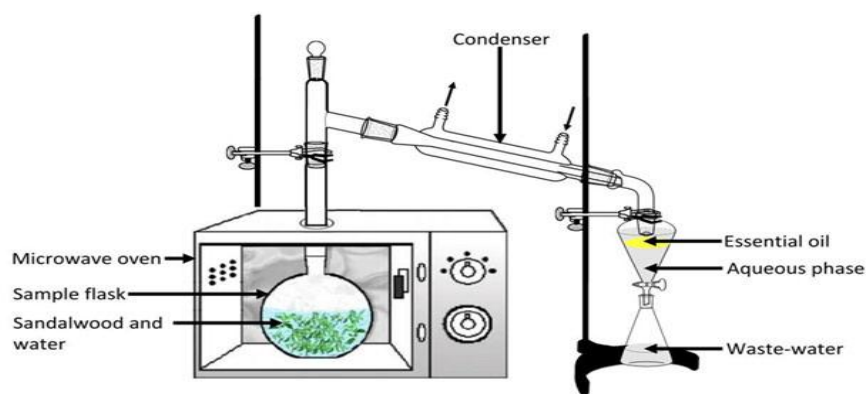


Slika 12. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

3.3. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija

Temelji se na primjeni mikrovalne energije. Mikrovalovi (MV) dio su elektromagnetskog zračenja (EMZ) s rasponom frekvencija od 0.3 GHz do 300 GHz. U komercijalnim mikrovalnim sustavima najviše se koriste frekvencije mikrovalova 2.45 GHz. Prolaskom mikrovalova kroz medij, dolazi do apsorpcije njihove energije koja se prevodi u termičku energiju. Tijekom provedbe MAE dolazi do zagrijavanja tekućine unutar stanica čvrstog uzorka, koja zatim isparava i uzrokuje povišenje tlaka koje djeluje na staničnu stijenk. Porast tlaka unutar stanica uzrokuje razaranje staničnih stijenki i organela što za posljedicu ima porast poroznosti uzorka, čime se omogućuje bolje prodiranje ekstrakcijskog otapala u matricu. Na učinkovitost ekstrakcije utječu brojni čimbenici: snaga zračenja, trajanje postupka, sadržaj vlage, veličina čestica uzorka, otapalo, omjer faza, temperatura i tlak, broj ekstrakcijskih koraka. Pri odabiru otapala moramo razmotriti tri faktora: topljivost analita, dielektričnu konstantu, faktor rasipanja. Faktor rasipanja je mjera učinkovitosti kojom se određeno otapalo zagrijava djelovanjem MV. Otapala s visokom dielektričnom konstantom voda i druga polarna otapala apsorbiraju više energije. Metanol i etano su najbolja otapala za ekstrakciju. Postupak se provodi u zatvorenim ekstrakcijskim posudama načinjenim od PTFE pri kontroliranom tlaku i temperaturi. Započinje unošenjem uzorka i određenog volumena otapala u ekstrakcijsku posudu. Uzorci se stavljaju na okretnicu u pećnic, te se primjenjuje MV zračenje određene snage s tme započinje predekstrakcijski korak tijekom kojeg se zagrijava otapalo na

određenu temperaturu. Vrijeme potrebno za postizanje temperature ovisi o broju uzoraka. Nakon postizanja određene temperature, primjenom MV ona se zagrijava određeni vremenski period max 30 minuta. To se naziva statička ekstrakcija. Nakon toga se uzorci hlade u pećnici na RT. Ova se ekstrakcijska metoda koristi za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa.



Slika 13. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija

3.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija

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. 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,

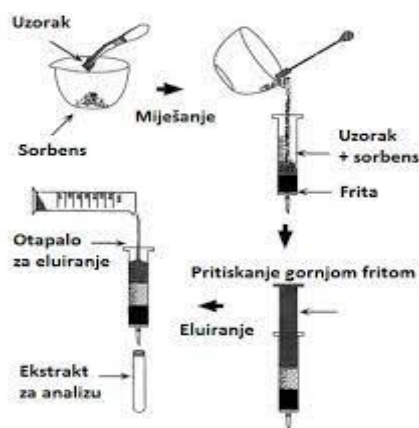
etanola i drugih. Ostaci organskih otapala mogu biti potencijalno štetni za ljudsko zdravlje, a otapalo nakon korištenja treba zbrinuti i stoga se tehnike ekstrakcije organskim otapalima ne smatraju "zelenima". Metoda ekstrakcije može poskupiti proces jer se otapalo mora naknadno odvojiti od ekstrakta 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. 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. Pektinaze (pektolitički enzimi) hidroliziraju pektinske tvari i čine oko 25 % ukupnih svjetskih enzima u tehnološkoj upotrebi . Postoje brojne primjene pektinaza u industriji poput ekstrakcije soka iz voća i bistrenje soka (pektin je vlaknasti koloid koji uzrokuje začepjenja 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*. 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 :

Protopektinaze koje kataliziraju otapanje inače netopljivog protopektina i razlažu ga na polimere topljivog pektina ($\text{protopektin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pektin}$). 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 digalakturonate.^{8,9} 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. -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. 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. 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 kože grožđa). Porast temperature nema značajniji utjecaj na pektinaze, no njezino sniženje (ispod 45 °C) usporava rad enzima. Glukozidazna aktivnost nekih enzima može stvoriti aglikone koji su manjeg afiniteta za vodu i manje stabilni. Temperaturne oscilacije nemaju tako značajan utjecaj (osim na rad enzima. 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. 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. Prilikom ekstrakcije važna su i kemijska svojstva komponente koja se izdvaja kao i njezina hidrofilnost.

3.5. Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu

Novi je postupak za razaranje i ekstrakciju koji se primjenjuje na čvrste uzorke. Koristi se nekoliko tehnika za razaranje uzorka, a sam postupak ekstrakcije sastoji se od nekoliko koraka. Uzorak i čvrsta faza stavljaju se u tarionik te se miješaju pomoću tučka. Nakon što se dobije dobro usitnjena homogena masa prenosi se u kolonicu u kojoj je porozni disk, komprimira se klipom te se provodi elucija. Na učinkovitost utječe niz faktora: veličina čestica, vrsta i volumen otapala, omjer mase uzorka i mase čvrste faze. Uporaba čvrste faze vrlo malih veličina čestica produljuje trajanje elucije zbog smanjenja protoka elucijskog otapala. Kao čvrsta faza koristi se silicijev dioksid na koji je vezana hidrofobna faza. Kadase uzorak miješa sa sorbensom, on se prvo ponaša kao abraziv što dovodi do razaranja strukture. Vezana faza uzorka ima funkciju vezanog otapala kako bi došlo do potpuno razaranja. Uzorak se raspršuje po čitavoj površini vezane faze sorbensa tvoreći jedinstveni miješani karakter faze putem idrofilnih i hidrofobnih interakcija s sastavnicama uzorka. Mogu se koristiti silikati i druge anorganske čvrstine. Čvrsta faza ima ulogu abraziva koji razara strukturu uzorka. Dodatno razaranje sastavnica odvija se do stupnja kojim sastavnice međudjeluju s kemijskim skupinama čvrste površine. Kod ove ekstrakcije dolazi do različitih međudjelovanja koja se odvijaju istovremeno. Najčešći korišteni omjer mase uzorka i čvrste faze je 1:5. Omjer ovisi o prirodi uzorka i cilju same ekstrakcije. Nažalost do danas nije ova metoda optimirana.

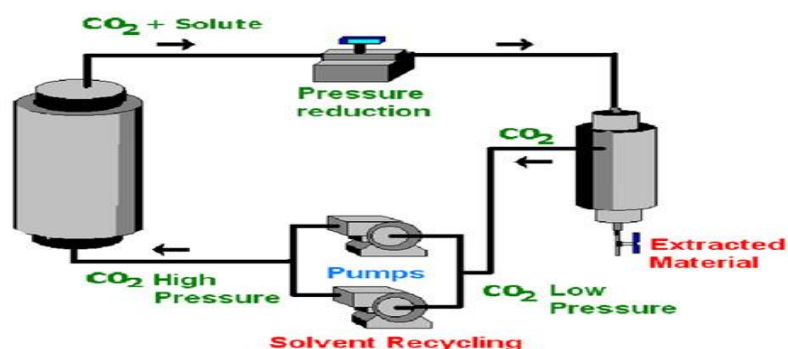


Slika 14. Raspršenje matrice kroz uzorak čvrste faze

3.6. Ostale ekstrakcijske metode

Ekstrakcija superkritičnim fluidom temelji se na uporabi superkritičnog fluida kao ekstrakcijskog otapala. Ta otapala imaju jako dobre osobine otapala kao što su velika difuznost, mala viskoznost, mala površinska napetost. Zbog navedenih svojstava omogućen je brzi prijenos mase i povećanu sposobnost prodiranja u pore matrice uzorka. Uzorak se stavlja u posudu ekstraktora te se podvrgava djelovanju superkritičnog fluida pri povišenom tlaku. Kao fluidi se koriste dušik, ksenon, amonijak i najčešće korišteni uglji(IV) oksid. S obzirom da je CO₂ nepolaran za ekstrakciju polarnih uzoraka potrebno je dodati modifikator. Kao modifikatori koriste se etanol, metanol, aceton, acetonitril.¹³

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu kombinira povišeni tlak i temperaturu kako bi se postigla učinkovita ekstrakcija. Kao otapala se koriste organska ubičajena otapala ili njihove otopine. Uzorak je smješten u ekstrakcijsku čeliju od nehrđajućeg čelika koja se pod tlakom zagrijava i puni otapalom. Ekstrakcija se poboljšava uporabom otapala na temperaturi iznad temperature vrelišta. Povišena temperatura povećava brzinu difuzije, topljivost analita, i brzinu ekstrakcije. Komercijalno dostupni PLEsustavi mogu se automatizirati vrlo lako. Kod ekstrakcije fenola iz kožica grožđa koristi se morski pijesak kao sredstvo za sušenje. Kao otapalo se koristi metanol, voda ili vodena otopina natrijevog bisulfida. Broj ciklusa ovisi o uporabljenomj otapalu.



Slika 15. Ekstrakcija u superkritičnim uvjetima

4. ZAKLJUČAK

U ovom seminarskom radu prikazane su metode analize koje se rabe u analizi fenola sadržanih u grožđu. Neke od opisanih metoda ekstrakcije kao što su SPME, LLE i SPE imaju široku primjenu, dok su za primjenu drugih metoda potrebna dodatna istraživanja njihove točnosti i preciznosti. U posljednje vrijeme teži se bržim, jednostavnijim, jeftinijim i po mogućnosti automatiziranim metodama ekstrakcije.

5. LITERATURA VRELA

1. E. Bayer, *Vitis* **1** (1958) 298–312.
2. J.Cacho, P. Fernández, V. Ferreira, J. E. Castells. *Am J Enol Vitic.* (1992) **43**: 244-248
3. D.Favretto, R.Flamini, *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, (2000) 55-64.
4. B. Sun; A. M. Ribes; M. C. Leandro; A. P. Belchior; M. I. Spanger, *Anal. Chim. Acta* (2006), 563, 382-390.
5. P. Ribèreau-Gayon, *Handbook of Enology, Vol.2: The Chemistry of Wine and Stabilisation and Treatments*, John Wiley & Sons, Ltd., SAD, 2006.
6. Z.M.Jin, H.Q.Bi, N.N. Ling, C.Q.Duan *Anal. Lett* 43 (2010), 76-785
7. P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi and L. Sebastiani, “Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, in Vitro Antioxidant Activity and Interactions,” *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**, (2008), pp. 589-598
8. D.Kammer, A.Caus, A.Schieber, R.Carle,*J.Food Sci* **70** (2005), C157-C163
9. Z.Y.Ju, L.R.Howard, *J.Agric Chem* **51** (2003) 5297-5213.
10. M.S.Dopico-Garcia,P.Valentao,
A.JagodzinskaJ.Klepczyaska,L.Guerra,P.B.Andrade,R.M.Setra,*Talanta* **74**
(2007) 20-31.
11. T.M.Takeuchi,C.G.Pereira, M.E.M.Braga, M.R.Marostica Jr, P.F.Leal, M.A.A,Meireles,*Extracting Bioactive Compounds from Food Products:Theory and Application*, CRC Press, 2009.
12. J.M.Aguliera, *Extraction Optimization in Food Engineering*, Mrcel Decker, Inc. 2003.
13. C.M.Ajila,S.K.Brar,M.Verma,R.D.Tyagi,S.Godbout,
J.R.Valero,*CritRev.Biotechnol.***31** (2011) 227-249.
14. J.E. Cacace, G.Mazza, *J.Food Eng* **59** (2003) 379-389
15. M.Pinelo, J.Sineiro, M.J.Nunez, *J.Food Eng* **77** (2006) 57-63
16. J.L.Capelo-Martinez,*Ultrasound in Chemistry:Analytical Application*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009.
17. M.Vinatour,*Ultrason.Sonochem*, **8**. (2001)303-313
18. V. Ivanova, M. Stefova, T. Stafilov, B. Vojnoski, I. Biro, A. Bufa, F. Kilar, *Food Anal. Int.*, (2012).

19. M. Ortega-Heras, M.L. González-SanJosé, S. Beltrán, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 85–93.
20. R. M. Pena, J. Barciela, C. Herrero, S. Garcia-Martin, *Talanta* **67** (2005) 129–135.
21. E.Maletić, J.Karoglan Kontić, I. Pejić, *Vinova loza*, Školska knjiga, Zagreb 2008.
22. M.A.O Neill, W.S.YORK, *The Plant Cell Wall, Annual Plant, Reviews*, CRS Press, 2003
23. K,M,Caffall, D.Mohnen, *Carbohydr.Res.* **344**, (2009) 1879-1900
24. N.C.Carpita, D.M.Gibeau *Plant J.***3** (1993) 1-30
25. N.Mirošević, J.Karoglan Kontić, *Vinogradarstvo*, Nakladni zavod Globus Zagreb
26. R.Flamini, F.Mattivi, M.De Roso, P.Arapitas, L.Bavaresco, *Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics, anthocyanins, stilbenes and flavonols* ,*Int. J.Mal. Sci* **14** 19652-9663
27. R.Hanlin, M.Hrmova, J.Harberston, M.Downey *Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2010; **16**(1):173-188