

Valorizacija sjemenki komine grožđa primjenom superkritičnog CO₂

Šmic, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:521354>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Mihaela Šmic
0125161755

**VALORIZACIJA SJEMENKI KOMINE GROŽĐA
PRIMJENOM SUPERKRITIČNOG CO₂**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina

Mentor: izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Valorizacija sjemenki komine grožđa primjenom superkritičnog CO₂

Mihaela Šmic, 0125161755

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih parametara ekstrakcije superkritičnim CO₂ i to tlaka (300 i 500 bara), temperature (35, 45 i 55 °C) i protoka CO₂ (15, 30 i 45 g CO₂ min⁻¹) na iskorištenja ekstrakcije ulja sjemenki komine grožđa. Također, istražen je i utjecaj navedenih parametara na antioksidacijski kapacitet ekstrahiranog ulja ORAC metodom. Istraživanje je provedeno na komini sorte Graševina, berba 2021. Dobiveni rezultati pokazali su kako među navedenim procesnim parametrima tlak, a zatim i protok CO₂ značajno utječu na iskorištenje ekstrakcije (%), kao i na antioksidacijski kapacitet ulja sjemenki grožđa. Najveće iskorištenje ekstrakcije (7,63 %) postignuto je pri tlaku od 500 bara, temperaturi od 35 °C te protoku od 30 g CO₂ min⁻¹. Najveći antioksidacijski kapacitet (429,62 μM Trolox ekvivalenta 100 g⁻¹ ulja) utvrđen je kod ulja ekstrahiranog pri uvjetima tlaka od 500 bara, temperature od 45 °C i protoka od 45 g CO₂ min⁻¹.

Ključne riječi: sjemenka komine grožđa, ulje sjemenki grožđa, ekstrakcija superkritičnim CO₂, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 33 stranice, 11 slika, 1 tablica, 44 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko

Pomoć pri izradi: Anita Pušek, mag.ing.

Datum obrane: 18. srpanj 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Valorization of grape pomace seeds using supercritical CO₂

Mihaela Šmic, 0125161755

Abstract: This study aimed to investigate the influence of different supercritical CO₂ extraction parameters; pressure (300 and 500 bar), temperature (35, 45 and 55 °C) and CO₂ flow (15, 30 and 45 g CO₂ min⁻¹) on the grape seed oil extraction yield (%). In addition, the influence of these parameters on the antioxidant capacity of the obtained oil extracts was also investigated using ORAC method. Study was conducted on Graševina pomace, vintage 2021. The obtained results showed that pressure, followed by CO₂ flow significantly affect extraction yield and antioxidant capacity of the obtained oils. The highest extraction yield (7.63 %) was achieved at conditions of 500 bar, 35 °C and 30 g CO₂ min⁻¹. The highest antioxidant capacity (429.62 μM Trolox equivalent 100 g⁻¹ oil) was observed in oil extracted at conditions of 500 bar, 45 °C and 45 g CO₂ min⁻¹.

Keywords: grape pomace seed, grape seed oil, supercritical CO₂ extraction, antioxidant capacity

Thesis contains: 33 pages, 11 figures, 1 table, 44 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Natka Ćurko, Associate Professor

Technical support and assistance: MSc Anita Pušek

Thesis defended: 18 July, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SASTAV KOMINE GROŽĐA.....	2
2.2. SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA.....	3
2.3. KONVENCIONALNE I INOVATIVNE METODE EKSTRAKCIJE ULJA SJEMENKI GROŽĐA.....	5
2.4. EKSTRAKCIJA ULJA SJEMENKI GROŽĐA SUPERKRITIČNIM CO ₂	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL.....	13
3.2. METODE	13
3.2.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkritičnim CO ₂	13
3.2.2. Ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO ₂	13
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ulja sjemenke grožđa ORAC metodom	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO ₂ NA PRINOS ULJA.....	17
4.1.1. Utjecaj tlaka na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO ₂	17
4.1.2. Utjecaj temperature na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO ₂	23
4.1.3. Utjecaj protoka CO ₂ na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO ₂	24
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO ₂ NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA.....	25
5. ZAKLJUČCI.....	28
6. POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

Smanjenje količine otpada nastalog tijekom procesa prerade hrane te iskorištenje dobivenih nusproizvoda uz korištenje ekološki prihvatljivih i održivih metoda jedan je od temeljnih izazova prehrambene industrije, pa tako i industrije vina. Naime, poznato je kako proizvodnja vina, kao jedna od vodećih svjetskih industrijskih grana, na globalnoj razini godišnje generira od 7-10 milijuna tona otpada. Nadalje, dodatno opterećenje industrije vina predstavlja i činjenica da se velike količine ovog otpada generiraju u relativnom kratkom periodu berbe. Također, dobiveni je otpad, uslijed njegovog utjecaja na okoliš, potrebno propisno zbrinuti. Budući da adekvatno zbrinjavanje otpada dobivenog od proizvodnje vina istodobno povećava i troškove proizvodnje, u novije vrijeme se sve više razmatraju mogućnosti valorizacije ovog otpada, koje ekološki i ekonomski predstavljaju prihvatljivije rješenje.

Iako razlikujemo različite frakcije otpada od proizvodnje vina, kvantitativno, ali i kvalitativno, komina grožđa, koju dobivamo nakon prešanja mošta ili masulja, najvrjednija je frakcija. Kominu grožđa čine sjemenke, pokožica te peteljke, a upravo iz sjemenki komine grožđa moguće je proizvesti visokokvalitetno ulje koje se dalje koristi u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Naime, ulje sjemenki grožđa bogat je izvor nezasićenih masnih kiselina, prvenstveno linolne kiseline, kao i brojnih bioaktivnih komponenti sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem poput tokoferola i tokotrienola, fitosterola i polifenolnih spojeva.

Ulje sjemenki grožđa najčešće se ekstrahira hladnim prešanjem ili ekstrakcijom otapalima, međutim, u novije vrijeme se sve više razmatraju i inovativne netoplinke tehnike poput ekstrakcije primjenom superkritičnog CO₂ (SC CO₂), čije prednosti uključuju primjenu ekološki prihvatljivog CO₂, dobru selektivnost i visoko iskorištenje ekstrakcije, kao i mogućnost ekstrakcije termolabilnih spojeva.

Cilj ovog rada je provesti valorizaciju sjemenki komine grožđa primjenom superkritičnog CO₂. Istražit će se utjecaj različitih parametara ekstrakcije: (i) tlaka (300 i 500 bara), (ii) temperature (35, 45 i 55 °C) i (iii) protoka CO₂ (15, 30 i 45 g CO₂ min⁻¹) na iskorištenje ekstrakcije kao i antioksidacijski kapacitet (ORAC) ulja sjemenki grožđa. Temeljem dobivenih rezultata definirat će se optimalni uvjeti ekstrakcije SC CO₂.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SASTAV KOMINE GROŽĐA

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) predstavlja jednu od vodećih i najviše uzgajanih voćnih kultura u svijetu. Od 50 milijuna tona proizvodnje grožđa u svijetu, u europskim zemljama proizvodi se količina od 27 milijuna tona (Scoma i sur., 2016). Pritom se oko 75 % grožđa koristi u proizvodnji vina, koja na globalnoj razini iznosi oko 27 milijardi litara (Amienyo i sur., 2014). Prilikom prerade grožđa u proizvodnji vina (nakon mehaničkog prešanja ili fermentacije) dobiva se nusproizvod koji čini oko 25 % ukupno prerađene mase grožđa. Taj nusproizvod naziva se komina. Najznačajniji ostatak u komini grožđa čini pokožica grožđa (75 % krutog otpada), a potom sjemenka (28 % krutog otpada), rezidualna pulpa i peteljke čine manje značajan dio komine. Komina grožđa prije se većinom smatrala agroindustrijskim otpadom čija je količina predstavljala ekološki i ekonomski izazov. U mediteranskim zemljama godišnja proizvodnja komine grožđa može dosegnuti čak 1200 tona (Kalli i sur., 2018). Zbrinjavanje komine stvara ekološke probleme kao što su onečišćenje podzemnih i površinskih voda, privlačenje vektora koji šire bolesti i potrošnja kisika u tlu i podzemnim vodama što može imati utjecaj na divlje životinje (Dwyer i sur., 2014), potom oštećenje biljaka, porast kiselosti tla, proizvodnja metana. Vrlo mala količina proizvedene komine grožđa koristi se za stočnu hranu. Komina se može koristiti kao i kompost baziran na otpadu.

U novije vrijeme, spoznaja o komini kao vrijednom nusproizvodu zamjetno je porasla. Naime, tijekom proizvodnje vina samo 40-60 % polifenolnih spojeva grožđa ekstrahira se u vino (60-70 % iz sjemenki, 30-35 % iz pokožice i gotovo 10 % ili manje iz pulpe), dok veći dio zaostaje u samoj komini (Sirohi i sur., 2020). Uslijed toga, komina je izrazito bogata polifenolnim spojevima koji pokazuju velik raspon bioloških svojstava tj. antialergijsko, protuupalno, antikancerogeno, antimikrobno, antioksidativno, antitrombotičko, inzulinotropno, antilipotropno, kardioprotektivno i vazodilatatorno djelovanje (Haminiuk i sur., 2012). Polifenolni sastav komine ovisi o sorti grožđa, udjelu sjemenke i pokožice u grožđu, zrelosti, godini berbe, raznim agrotehničkim uvjetima kao i primijenjenoj tehnologiji proizvodnje vina. U sastav polifenola pokožice komine grožđa ulaze antocijani, flavanoli, flavonoli, hidroksicimetne kiseline i stilbeni, dok sjemenka primarno sadrži flavonole, ali i nefenolne antioksidanse, tokoferole, β -karoten te fitosterole (Beres i sur., 2017). Nadalje,

sjemenka komine grožđa uz navedene polifenolne spojeve sadrži 10-20 % lipida (Beres i sur., 2017). Također, komina grožđa sadrži i 11-13 % proteina, ali ne ističe se kao bitan izvor proteina.

Uslijed navedenog, komina grožđa danas se sve više koristi kao izvor bioaktivnih spojeva u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Ekstrakti polifenolnih spojeva najčešće su dio funkcionalnih i dijetetskih suplemenata, nutraceutika ili funkcionalnih dodataka različitih prehrambenih proizvoda s ciljem poboljšanja bilo nutritivnih karakteristika ili ukupne stabilnosti prehrambenog proizvoda (Sirohi i sur., 2020). Primjerice, istraživanja su pokazala potencijal primjene polifenolnih spojeva komine grožđa kao antioksidansa, stabilizatora boje i konzervansa te za sprječavanje oksidacije lipida i suzbijanje rasta nekih bakterijskih sojeva kao što su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* i *Escherichia coli* te za očuvanje mikrobiološke stabilnosti, ali i cjelokupne prihvatljivosti različitih prehrambenih proizvoda (Kalli i sur., 2018; Yu i Ahmedna, 2013; Özvural i Vural, 2011). S druge strane, ulje sjemenki grožđa najznačajniju primjenu našlo je u kozmetičkoj industriji (Beres i sur., 2017), a u posljednje vrijeme i prehrambenoj industriji kao alternativno kulinarsko ulje, čija popularnost raste zbog specifičnih organoleptičkih svojstava (Martin i sur., 2020).

2.2. SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Sjemenka grožđa sadrži oko 7-20 % ulja s visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina, od kojih je najzastupljenija linolna te spojeva od biološke važnosti poput sterola, vitamina E, polifenolnih spojeva i drugih spojeva s antioksidativnim učinkom.

Sastav masnih kiselina ulja sjemenki grožđa ovisi prvenstveno o zrelosti i sorti grožđa, a također i o primijenjenoj tehnologiji ekstrakcije ulja. Glavne masne kiseline u sastavu ulja sjemenki grožđa su linolna kiselina (66,8-73,6 %), potom oleinska kiselina (17,8-26,5 %), palmitinska kiselina (6,4-7,9 %) i stearinska kiselina (3,6-5,3 %) (Beveridge i sur., 2005; Rubio i sur., 2009), dok su u značajno manjem udjelu prisutne linolenska (0,2-0,9 %) i arahinska kiselina (0,1-0,2 %) (Sabir i sur., 2012). Nezasićene masne kiseline, oleinska i linolna kiselina zajedno predstavljaju oko 90 % ukupnog sastava ulja sjemenki grožđa. Sastavom masnih kiselina, ovo ulje najbliže je sastavu suncokretovog ulja (Matthäus, 2008).

Ukupni sadržaj fitosterola u sjemenkama grožđa iznosi 257,6-1125,1 mg 100 g⁻¹ ulja gdje

je β -sitosterol najzastupljeniji (69,8–61,5 %), a slijede ga stigmasterol (11,9–16,0 %), kampesterol (10,79–9,28 %) i stigmastanol (3,5–4,0 %) (Rubio i sur., 2009). Biološka važnost fitosterola je u njihovom antioksidativnom djelovanju, kao i njihovoj ulozi u metabolizmu kolesterola (Martin i sur., 2020).

Također, ulje sjemenki grožđa odličan je izvor vitamina E, a osim tokoferola od kojih je najzastupljeniji α -tokoferol (135,1 do 260,5 mg kg⁻¹), ovo ulje sadrži i tokotrienole i to α -tokotrienol (253,5–352 mg kg⁻¹) i γ -tokotrienol (487,4–785,2 mg kg⁻¹) (Matthäus, 2008; Sabir i sur., 2012). Sadržaj tokoferola u ulju sjemenki grožđa ovisi o sorti i uvjetima uzgoja grožđa, kao i postupku ekstrakcije ulja.

Nadalje, među polifenolnim spojevima u ulju sjemenki grožđa prisutni su galna kiselina, katehin, epikatehin i procijanidini (Martin i sur., 2020). Ipak, potrebno je naglasiti da je udio polifenolnih spojeva u ulju značajno niži od udjela u samoj komini, budući da se prilikom proizvodnje ulja iz sjemenki grožđa ekstrahira vrlo maleni udio ovih inače polarnih spojeva, zbog čega veći dio polifenola zaostaje u pogači.

Ulje sjemenki grožđa dobro je poznato i već je široko komercijalizirano u nekim zemljama, a najširu primjenu našlo je u kozmetičkoj industriji, kao dio različitih formulacija (Beres i sur., 2017). Naime, visoka regenerativna kvaliteta ovog ulja, tj. sposobnost umanjivanja ožiljaka i zacjeljivanja kožnog tkiva upravo se pripisuje sastavu fitosterola kao i ostalih antioksidansa prisutnih u ovom ulju. U kozmetičkoj industriji ulje sjemenki grožđa najčešće se koristi kao sastojak u proizvodima za hidrataciju kože, omekšavanje teksture, zatezanje kože, smanjenje oteklina te u drugim proizvodima s hipoalergenim djelovanjem (Martin i sur., 2020).

Također, osim u kozmetičkoj industriji, ovo „alternativno“ ulje uslijed nutritivnih i senzorskih karakteristika nailazi na sve širu primjenu u prehrambenoj industriji. Brojne studije su dokazale povoljan učinak ulja sjemenki grožđa na zdravlje uslijed sastava kako masnih kiselina, tako i lipofilnih te hidrofilnih antioksidansa (Decean i sur., 2018; Gurger i sur., 2019; Hao i sur., 2018; Ismail i sur., 2015, 2016). Naime, linolna kiselina je esencijalna masna kiselina i nedostatak ove masne kiseline u prehrani negativno utječe na zdravlje. Također, pokazalo se kako linolna kiselina, u komparaciji sa zasićenim masnim kiselinama, smanjuje udio LDL-kolesterola u krvnom serumu (Dhvamani i sur., 2014; Siguel, 1996). Nadalje, visok udio tokoferola, tokotrienola i polifenola povezan je s hipokolesterolemijskim,

antitumorskim, neuroprotektivnim i antioksidacijskim djelovanjem (Sabir i sur., 2012). Kako je ranije istaknuto, ulje sjemenki grožđa ima primjenu i kao kulinarsko ulje zbog svojih organoleptičkih svojstava. Iako se može koristiti za prženje hrane, najčešće se koristi kao preljev ili umak ili dio *dresinga* za salate (Martin i sur., 2020). Dok je rafinirano ulje sjemenki grožđa neutralnog okusa i mirisa, visokokvalitetno djevičansko ulje sjemenki grožđa odlikuje se ugodnim vinskim i voćnim mirisom te okusom koji podsjeća na grožđice. U sastavu arome ulja sjemenki grožđa dominiraju alkoholi i esteri, a utvrđeno je kako najznačajniji doprinos imaju etil oktanoat, nonanal i 1-okten-3-ol. Također, crne sorte grožđa najčešće karakterizira viši udio estera, dok su u uljima bijelih sorti grožđa utvrđene više koncentracije terpena; gdje su veće koncentracije navedenih spojeva arome utvrđene u hladno prešanim uljima sjemenke grožđa (Bail i sur., 2008). Ipak, potrebno je voditi računa da se ova ugodna aroma može tijekom skladištenja promijeniti u oksidiranu, uz pratnju trpkocje i gorčine, kao rezultat metabolizma mikroorganizama ili oksidacijskih procesa kojima je ovo ulje podložno zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina (Matthäus, 2008). Nadalje, ovo ulje moguće je dodati i kao funkcionalni sastojak različitim prehrambenim proizvodima, gdje se posebno uspješnom pokazala primjena u različitim pekarskim i mesnim proizvodima (Shinagawa i sur., 2015).

2.3. KONVENCIONALNE I INOVATIVNE METODE EKSTRAKCIJE ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Tradicionalno, ulje sjemenki grožđa najčešće se proizvodi postupkom prešanja ili procesima koji koriste organska otapala (Bligh i Dyer ili Soxhlet) (De Souza i sur., 2020). Obzirom da sjemenka grožđa sadrži mali udio ulja (7-20 %) u komparaciji s drugim uljaricama, ekstrakcija ulja iz komine primjenom otapala predstavlja ekonomski najisplativiji postupak te ujedno i najrašireniji postupak na razini industrije. Klasične tehnike ekstrakcije zasnivaju se na ekstrakcijskoj učinkovitosti različitih otapala. Najčešće korištena otapala u konvencionalnim postupcima ekstrakcije uključuju petroleter, heksan, kloroform, aceton (Beres i sur., 2017). Pritom, najčešće korišteno otapalo je *n*-heksan, a najtradicionalnija tehnika je ekstrakcija po Soxhletu (Kalli i sur., 2018). Ovu tehniku karakterizira visoko iskorištenje (iznad 95 %) (Beres i sur., 2017), međutim dobiveno ulje potrebno je rafinirati (postupak uključuje degumiranje/neutralizaciju, uklanjanje voskova, izbjeljivanje i deodorizaciju) čime se iz ulja uklanjaju sve nepoželjne komponente kako bi se održala

stabilnost ulja te da bi se u konačnici dobio neutralan do lagano „orašast“ miris i okus. Općenito, glavni nedostaci ekstrakcija organskim otapalima su dugo trajanje ekstrakcije, cijena otapala, niska selektivnost ekstrakcije, isparavanje i toksičnost otapala, štetnost za okoliš te razgradnja termolabilnih spojeva.

Sljedeća konvencionalna metoda ekstrakcije ulja je mehaničko hladno prešanje. Ekstrakcija ulja pužnom prešom s naknadnim pročišćavanjem taloženjem ili filtracijom postaje sve popularnija tehnika proizvodnje ulja sjemenki grožđa. Kvaliteta dobivenog ulja je veća od ulja dobivenog ekstrakcijom organskim otapalom, no prinos ulja je znatno manji, a proizvodnja je teža jer proizvođač mora voditi računa o kvaliteti sirovine (Matthäus, 2008). Također, komina koja sadrži visoki udio vlage sklona je mikrobiološkom kvarenju te prilikom djelovanja mikroorganizama i različitih enzima može doći do razvoja nepoželjnih aroma kao što su etil acetat, octena kiselina ili etanol, koje kasnije tijekom prešanja prelaze u ulje. Proces mikrobiološkog kvarenja i stvaranja nepoželjnih aroma se obično odvija brzo i zbog tog razloga proces sušenja komine mora uslijediti neposredno nakon prešanja grožđa ili masulja kako bi proizvodnja visokokvalitetnog djevičanskog ulja sjemenki grožđa bila moguća. Nadalje, sjemenka tijekom sušenja ne smije biti izložena visokim temperaturama jer upotreba visokih temperatura kod sušenja i pripreme sjemena može rezultirati formiranjem sigmastadiena (Matthäus, 2008). Ipak, ekstrakcija hladnim prešanjem temeljna je metoda za dobivanje visokokvalitetnog ulja u kojoj ekološki prihvatljiv aspekt nastoji prevladati ograničenja uporabe kemikalija i temperature tijekom procesa ekstrakcije (Martin i sur., 2020). Također, u usporedbi s ekstrakcijom po Soxhletu, ekstrakcija hladnim prešanjem ima potencijal za veći prinos masnih kiselina i tokoferola i to bez toplinske i kemijske obrade (Dimić i sur., 2020), dok dobivena ulja imaju izraženiju aromatsku kompleksnost s naglašenim voćnim i vinskim notama (Matthäus, 2008).

U posljednje vrijeme, sve veću primjenu imaju i nekonvencionalne, „zelenije“ metode ekstrakcije koje za prednost imaju smanjenje ili eliminaciju organskog otapala, smanjenje vremena ekstrakcije te povećanje iskorištenja i postizanje adekvatne kvalitete ulja. Ove tehnike primjenjuju se umjesto konvencionalnih postupaka ili kao predtretmani konvencionalnim postupcima. Konvencionalni procesi ekstrakcije najčešće su potpomognuti enzimima, visokonaponskim električnim pražnjenjem, ultrazvukom i mikrovalovima (Kalli i sur, 2018).

Jedna od tehnika ekstrakcije koja se primjenjuje kao predtretman je ekstrakcija uz pomoć

enzima, a temelji se na sposobnosti enzima da kataliziraju reakcije u blagim uvjetima obrade u vodenoj otopini. Enzimi kao što su celulaza, β -glukozidaza, ksilanaza, β -glukonaza i pektinaza depolimeriziraju polisaharide prisutne u staničnoj stijenci i tako oslobađaju vezane spojeve (Sirohi i sur., 2020). Enzimski predtretman sjemenki grožđa može poboljšati mehanički proces prešanja jer enzimi hidroliziraju stanične stijenke sjemenki, oslobađajući vezane spojeve i tako poboljšavaju prinos ulja (Beres i sur., 2017).

Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED) je također ekološki prihvatljiva i nova tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva, a kod ekstrakcije ulja sjemenki grožđa najčešće se primjenjuje kao predtretman hladnom prešanju. Temelji se na primjeni visokog napona koja rezultira fragmentacijom čestica i oštećenjem strukture stanice, što ubrzava ekstrakciju intracelularnih spojeva (Kalli i sur., 2018).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) sastoji se od ultrazvučnih valova koji prolaskom kroz tekući medij stvaraju kompresiju i ekspanziju. To stvara kavitaciju zbog nestabilnog stvaranja mjehurića blizu površine materijala koji se skupi tijekom ciklusa kompresije, dok kolaps mjehurića rezultira formiranjem topline s temperaturama koje dosežu 5000 K što je dovoljno za ciljanje staničnih spojeva (Sirohi i sur., 2020). Veća ekspanzija uzrokuje bolje prodiranje otapala u stanice, što rezultira oštećenjem staničnih stijenki te otpuštanjem staničnog sadržaja. Povećanje amplitude također utječe na povećavanje broja ciklusa kompresije i ekspanzije ultrazvučnih valova, što dovodi do povećanja iskorištenja ekstrakcije (Kalli i sur., 2018). Kavitacija UAE uglavnom ovisi o četiri parametra, odnosno frekvenciji, temperaturi, tlaku i snazi valova (Sirohi i sur., 2020). Utvrđeno je kako povećanje snage ultrazvučnih valova povoljno djeluje na povećanje iskorištenja ekstrakcije, uz smanjenje vremena ekstrakcije, kao i nižu potrošnju otapala (Da Porto i sur., 2013). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) poznata je po dobivanju spojeva visoke vrijednosti, učinkovitoj ekstrakciji i obično radi na umjereno niskim temperaturama koje su korisne za spojeve osjetljive na toplinu (Sirohi i sur., 2020). Navedena tehnika najčešće se primjenjuje kao predtretman konvencionalnim postupcima ekstrakcije ulja sjemenki grožđa, a ovaj predtretman pokazao je značajan utjecaj na povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja po Soxhletu te kod Bligh Dyer ekstrakcije i ekstrakcije superkritičnim CO₂, kao i na povećanje udjela polifenola i α -tokoferola u tretiranim uzorcima (De Souza i sur., 2020).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je proces zagrijavanja mješavine krutog uzorka i otapala mikrovalnom energijom i naknadnog odjeljivanja ciljanog spoja od

otapala. Mikrovalno grijanje temelji se na neionizirajućim elektromagnetskim valovima (Sirohi i sur., 2020). Elektromagnetski valovi prodiru u materijal i pretvaraju se u toplinsku energiju, gdje pri stvaranju dovoljne količine toplinske energije, grijanje oštećuje biljnu staničnu stijenku i rezultira istjecanjem ciljanih spojeva u otapalo. Redukcija veličine čestica komine grožđa potiče povećanje površinskog kontakta između krutih tvari komine grožđa i otapala i također povećava učinkovitost ekstrakcije (Kalli i sur., 2018). Od konvencionalnih tehnika ekstrakcije, za kombinaciju sa MAE, preporuča se ekstrakcija organskim otapalom. Takva kombinacija rezultira poboljšanjem selektivnosti i iskorištenja.

Ubrzana ekstrakcija otapalom (ASE) poznata je kao ekstrakcija tekućine pod tlakom (PLE) te koristi konvencionalna otapala na temperaturama od 100-180 °C i pri visokom tlaku (1500-2000 psi) (Fontana i sur. 2013). Subkritična voda (SW) je voda temperature između 100 do 374 °C i pod tlakom ispod kritičnog tlaka od 22 MPa. Struktura vodikove veze u subkritičnim uvjetima polako se počinje otapati, što rezultira smanjenjem polariteta, viskoznosti i površinske napetosti te povećanjem brzine difuzije i dielektrične konstante (Beres i sur., 2017). Ekstrakcija pomoću tekućine pod tlakom kao što je subkritična voda omogućava brzu ekstrakciju i smanjenu potrošnju otapala, a smanjenje gustoće i povećanje dielektrične konstante rezultiraju većom topljivosti nepolarnih spojeva u vodi te zbog ovih razloga predstavlja poželjnu tehniku ekstrakcije. Što se tiče primjene u industriji, korištenje vode niskog polariteta pod pritiskom pruža niz prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije poput visoko kvalitetnih ekstrakta, kraćeg vremena ekstrakcije, nižih troškova agensa za ekstrakciju i ekološke kompatibilnosti (Kalli i sur., 2018). Iako je ulje sjemenki grožđa uspješno ekstrahirano korištenjem ove metode, naredna istraživanja trebaju pronaći odgovarajuće parametre koji bi ovaj proces učinili šire aplikativnim (Beres i sur., 2017).

Jedna od alternativnih metoda obzirom na konvencionalne metode ekstrakcije je i ekstrakcija superkritičnom tekućinom (SFE), gdje se superkritični ugljikov dioksid najčešće koristi kao ekološki prihvatljivo otapalo koje zamjenjuje za okoliš štetna organska otapala. Postupak ekstrakcije uključuje pripremu sjemenki sušenjem, čišćenjem i mljevenjem do određene veličine i sam proces ekstrakcije koji obično traje do 90 min. Korištenjem ekstrakcije superkritičnom tekućinom (SFE) postiže se sličan prinos ulja u odnosu na ekstrakciju organskim otapalom te bolja kvaliteta ulja, gotovo identična kao kod mehaničkog prešanja. Ekstrakcija superkritičnom tekućinom (SFE) kao novija tehnika, polako postaje obećavajuća opcija posebno u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji zbog

izražene kvalitete dobivenih proizvoda (De Souza i sur., 2020). Ranija istraživanja pokazala su visoku učinkovitost ove metode ekstrakcije. Primjerice usporedba uzoraka ulja ekstrahiranih uz pomoć ultrazvuka (UAE), mikrovalova (MAE) i superkritičnog CO₂ (SC CO₂) te ekstrakcijom po Soxhletu, pokazala je kako su najveći prinosi ostvareni sa SC CO₂ metodom pri optimalnim uvjetima: 350 bara, 60 °C, 0,4 kg h⁻¹ CO₂ (Dimić i sur., 2020).

2.4. EKSTRAKCIJA ULJA SJEMENKI GROŽĐA SUPERKRITIČNIM CO₂

Ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SC CO₂) ekološka je alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije. Ova ekstrakcija temelji se na prelasku spojeva iz početnog materijala u superkritični fluid, a izdvajanje željenih spojeva iz superkritičnog fluida postiže se snižavanjem tlaka i/ili temperature radnog fluida. Odnosno, variranjem temperature i tlaka, superkritični CO₂ omogućava selektivnost u ekstrakciji određenih ciljanih spojeva (Khaw i sur., 2017). Dakle, pri temperaturi većoj od 31,2 °C i pri tlaku iznad 73,8 bara, pri kojima je CO₂ u superkritičnom stanju, njegova sposobnost otapanja varira u širokim granicama s promjenama tlaka i temperature. Također, zbog umjerene kritične temperature, CO₂ je idealan za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Kalli i sur., 2018). Ugljikov dioksid posjeduje jedinstvena i poželjna svojstva od kojih se ističu gustoća i moć otapanja nalik tekućini, sposobnost transporta i viskoznost slična plinu, zanemariva površinska napetost te selektivna odsutnost toksičnih ostataka u ekstraktima. Ugljikov dioksid posebno je prihvaćen kao zeleno otapalo zbog netoksičnosti, nezapaljivosti, povoljne cijene, mogućnosti recikliranja, potpune raspršenosti iz ekstrakata pri atmosferskom tlaku i lako dostupnih kritičnih uvjeta (Passos i sur., 2009). Nadalje, lako je dostupan u velikim količinama, ne posjeduje okus ni miris, a karakterizira ga i visoka čistoća te posjeduje oznaku GRAS (općenito prepoznat kao siguran) otapala. Kod ekstrakcije ulja sjemenki grožđa može se izostaviti korak faze destilacije jer je CO₂ potpuno uklonjen iz ekstrakta što smanjuje troškove ekstrakcije. Nakon korištenja superkritičnog ugljikovog dioksida kao otapala u procesu ekstrakcije, dobiva se visokokvalitetno ulje. Iako pruža mnogo prednosti, superkritični ugljikov dioksid ima i svojih nedostataka. Nedostaci ugljikovog dioksida uključuju poteškoće u izdvajanju polarnih spojeva i rad na visokim tlakovima. Njegovi nedostaci obično se prevladavaju pristupima poboljšanja visoke učinkovitosti ekstrakcije (Kalli i sur., 2018). Ko-otapala i modifikatori (npr. etanol, metanol, aceton) mogu se dodati kako bi se poboljšala topljivost polarnih fitokemikalija ugrađenih u staničnu stijenku (Khaw i sur., 2017).

Ekstrakcija SC CO₂ sastoji se od dvije faze ekstrakcije, prva faza uključuje brzu ekstrakciju ulja, a druga faza spori do vrlo spori dodatni prinos ulja (Passos i sur., 2009). Proces ekstrakcije SC CO₂ iz čvrstih supstrata izvodi se u polu-kontinuiranom načinu rada gdje je supstrat, u obliku sloja čestica, nepomičan, odnosno sadržan u jednom ili nizu posuda za ekstrakciju, dok CO₂ teče kroz njega do iscrpljenja krutine (Fiori, 2010). Prilikom provođenja ekstrakcije, u obzir se trebaju uzeti vrijednosti procesnih varijabli (tlak, temperatura, brzina protoka CO₂), zatim veličina čestica, stupanj zbijenosti sloja čestica te omjer promjera i duljine ekstraktora (D/L). Ekstrakcija se postiže pod visokim pritiskom i niskom temperaturom. Vrijednosti tlaka i temperature otapala (CO₂) tijekom ekstrakcije održavaju se iznad kritičnih.

Kako je ranije spomenuto, neke od najvažnijih prednosti ekstrakcije SC CO₂ su izbjegavanje korištenja velike količine organskih otapala, brza ekstrakcija, automatiziran sustav, odsutnost svjetlosti i zraka tijekom ekstrakcije (smanjeni procesi oksidacije i razgradnje koji se mogu pojaviti tijekom ekstrakcije organskim otapalom). Također, prednost ove zelene tehnologije je da se odmašćeni kolač koji ostaje nakon ekstrakcije SC CO₂, za razliku od ekstrakcije organskim otapalima gdje su prisutni tragovi zaostalog otapala u konačnom proizvodu, može dalje koristiti u drugim procesima, npr. u razvoju novih funkcionalnih i obogaćenih proizvoda zbog velikih zaostalih količina fenolnih spojeva u kolaču (Jokić i sur., 2016). Moguća je i modulacija snage ugljikovog dioksida kako bi se provela selektivna ekstrakcija (Sirohi i sur., 2020). Primjenom ove zelene ekstrakcije ulje iz sjemenki grožđa može se u potpunosti ekstrahirati (Jokić i sur., 2016). Također, kod ekstrakcije SC CO₂, korak procesa destilacije za obnavljanje otapala može biti isključen (Sirohi i sur., 2020). S druge strane, nedostaci ovog postupka su visoki energetske troškovi te visoki investicijski troškovi u procesnoj opremi.

Na kvalitetu ulja sjemenki grožđa dobivenog ekstrakcijom SC CO₂ utječu mnogi faktori, a među najvažnijima su tlak i temperatura. Istraženi su učinci različitih parametara procesa ekstrakcije na prinos ulja i njegov antioksidacijski kapacitet pri čemu se tlak ekstrakcije pokazao najznačajnijim čimbenikom, a utvrđena je i pozitivna korelacija između navedenih ulaznih i izlaznih varijabli (Dimić i sur., 2020; Jokić i sur., 2016). Naime, povećanje tlaka u izotermnim uvjetima uzrokuje povećanje gustoće superkritičnog CO₂, što rezultira poboljšanjem njegove solvativajuće moći i brzine otapanja, čime se poboljšava cjelokupna učinkovitost ekstrakcije (Dimić i sur., 2020). Tlak i temperatura dva su čimbenika koja

najviše utječu na prinos ulja ekstrakcije jer određuju gustoću otapala (superkričnog CO₂) koja utječe na moć ekstrakcije, tako da veća gustoća otapala uzrokuje veći prinos ulja (Jokić i sur., 2016). Također, povećana brzina ekstrakcije dobivena je pri uvjetima visokog tlaka i snižene temperature (Dimić i sur., 2020). Naime, povećanje temperature uzrokuje smanjenje gustoće CO₂ što negativno utječe na brzinu ekstrakcije (Sovilj, 2010), no istovremeno, tlak pare otopljene tvari povećava topljivost i pozitivno utječe na prinose ekstrakcije (Dimić i sur., 2020). Pri porastu temperature, brzina ekstrakcije lagano se povećavala, a isto tako i topljivost (Duba i Fiori, 2015). Nadalje, utvrđeno je kako povećanje temperature može utjecati na povećanje koncentracije tokoferola (Dimić i sur., 2020), kao i da su hlapljivi spojevi i oni s nižom molekulskom masom topljiviji u superkričnom CO₂ (Jokić i sur., 2016).

Osim navedenih, važni parametri koji također utječu na ekstrakciju SC CO₂ uključuju veličinu čestica, poroznost sloja, protok CO₂, omjer promjera i duljine ekstraktora (D/L) i predtretman drugim tehnikama.

Veličina čestica mljevenih sjemenki grožđa može utjecati na prinos ulja na način da je ukupan prinos ekstrakcije veći za manje čestice što je uzrokovano povećanjem količine ulja izvan čestice, uslijed povećanja površine (Jokić i sur., 2016). Naime, fine čestice je lakše izdvojiti jer imaju veliku površinu po jedinici volumena te sadrže visok postotak “nevezanog ulja” i zahtijevaju manju udaljenost da bi “vezano ulje” doseglo površinu, što smanjuje unutarnji otpor prijenosu mase (Duba i Fiori, 2015).

Nadalje, istražen je učinak poroznosti sloja na kinetiku ekstrakcije, pri čemu je utvrđeno kako smanjenje poroznosti sloja ima negativan učinak na brzinu ekstrakcije zbog visokog stupnja zbijenosti (Duba i Fiori, 2015). Mljevenje uzoraka omogućilo je veće oslobađanje ulja iz sjemenskih stanica i kraću difuziju u čvrstom matriksu (Sovilj, 2010).

Također, ranija istraživanja su pokazala kako se brzina ekstrakcije povećava s povećanjem tlaka, temperature i brzine protoka otapala, čime raste i specifična potrošnja CO₂, a povećanje brzine ekstrakcije rezultiralo je povećanjem topljivosti ulja (Duba i Fiori, 2015). Potvrđeno je da se pri najvećem primijenjenom protoku postiže najveći prinos (Dimić i sur., 2020). Naime, veći protok uzrokuje veću brzinu ekstrakcije, a posljedično i smanjeno vrijeme ekstrakcije (Duba i Fiori, 2015).

Nadalje, pokazalo se kako smanjenje omjera promjera i duljine ekstraktora (D/L)

povećava brzinu ekstrakcije tj. što je bila duža ekstrakcijska posuda, to je bila niža specifična potrošnja otapala (CO₂) (Duba i Fiori, 2015).

Ulje sjemenki grožđa dobiveno ekstrakcijom superkričnim CO₂ karakterizira blago zeleno-žuta boja i specifičan okus (Jokić i sur., 2016), a komparacijom s ostalim inovativnim tehnikama ekstrakcije, ovom metodom ostvareni su najviši prinosi (Dimić i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Istraživanje je provedeno na komini sjemenke grožđa sorte Graševina, godina berbe 2021. (vinarija Kutjevo d.d, Kutjevo, Hrvatska). Komina sjemenke grožđa, dobivena nakon primarne prerade grožđa u vino i prešanja, ručno je odvojena od pokožice i pulpe te je potom skladištena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do kasnije uporabe.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkritičnim CO_2

Sjemenke komine su osušene u laboratorijskom sušioniku pri temperaturi od $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 48 h, a potom su usitnjene uporabom električnog mlina. Nakon što su sjemenke usitnjene, izvršena je granulometrijska analiza na standardnoj seriji od 8 sita (veličine 2,25; 1,12; 0,67; 0,45; 0,37; 0,25; 0,18 i 0,075 mm) te je definirana prosječna veličina čestica uzorka, koja je iznosila $0,545 \pm 0,004\text{ mm}$.

3.2.2. Ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO_2

Postupak ekstrakcije ulja iz sjemenki komine grožđa izvršen je na uređaju za ekstrakciju superkritičnim CO_2 prikazanom na slici 1 (Extratex, Neuves-Maisons, Francuska). U ekstrakcijsku kolonu stavljeno je 50 g prethodno usitnjenih sjemenki, nakon čega je provedena ekstrakcija tijekom 90 min pri različitim uvjetima tlaka (300 i 500 bara), temperature (35, 45 i $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) i protoka CO_2 (15, 30 i 45 g min^{-1}) prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1.



Slika 1. Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO₂

Kako bi se utvrdila dinamika ekstrakcije za različite procesne parametre, količine ekstrahiranog ulja izuzete nakon separacije ulja i CO₂ izmjerene su svakih 10 min (ukupno 9 točaka mjerenja). Izuzetim uzorcima ulja određena je masa pomoću vage preciznosti $\pm 0,0001$ g.

Tablica 1. Plan eksperimenata za ekstrakciju ulja iz sjemenki komine grožđa superkritičnim CO₂

Broj pokusa	Procesni parametri		
	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Protok plina (g CO ₂ min ⁻¹)
1	300	45	15
2	500	45	15
3	300	35	30
4	500	35	30
5	300	55	30
6	500	55	30
7	300	45	45
8	500	45	45

Temeljem ukupne dobivene mase ekstrahiranog ulja, izračunato je iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO₂ prema formuli [1]:

$$\text{Iskorištenje ekstrakcije (\%)} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_1 – ukupna masa ekstrahiranog ulja (g)

m_2 – masa uzorka komine sjemenke grožđa (g)

Uzorci ekstrahiranih ulja skladišteni su na – 20 °C do daljnjih analiza.

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ulja sjemenke grožđa ORAC metodom

ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti pripada skupini HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metoda kojom se mjeri inhibicija AAPH radikala (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se raspada stalnom brzinom pri temperaturi od 37° C stvarajući peroksil radikale. Za standardnu otopinu u metodi uzima se Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Peroksil radikal oksidira fluorescein i pritom dolazi do pada intenziteta fluorescencije ili njenog potpunog nestanka. Antioksidacijska aktivnost se određuje sposobnošću antioksidansa da inhibira provedbu lančanih reakcija radikala. Ako je u uzorku prisutan antioksidans poput polifenola, dolazi do inhibicije radikala i oksidacije fluoresceina, što rezultira sporijim padom fluorescencije (Cao i sur., 1993).

Hidrofilni ekstrakt ulja za određivanje antioksidacijske vrijednosti pripremljen je prema metodi Rincón-Cervera i sur. (2020) te Zhao i sur. (2017). Ulje sjemenke grožđa dobiveno SC CO₂ ekstrakcijom (1,5 g) prvo je otopljeno u 2,5 mL *n*-heksana. Potom je u smjesu dodano 2,5 mL otopine metanol/voda (80:20, v/v) s ciljem ekstrakcije hidrofilne frakcije ulja u navedenoj otopini. Dobivena smjesa je prvo vorteksirana (2 min), a potom centrifugirana (5 min, 5000 rpm). Nakon centrifugiranja, gornja heksanska faza je odvojena te je iz navedene heksanske faze ponovljena ekstrakcija hidrofilnih spojeva dodatak 2,5 mL otopine metanol/voda (80:20, v/v) u još dva navrata. Tri dobivene hidrofilne frakcije ulja su objedinjene te je dodano 2,5 mL *n*-heksana. Dobivena smjesa je prvo vorteksirana (2 min), a potom centrifugirana (5 min, 5000 rpm), a ispiranje hidrofilnih frakcija s 2,5 mL *n*-heksana

ponovljeno je u još dva navrata. Nakon ispiranja hidrofилnih frakcija *n*-heksanom, ove frakcije su uparene korištenjem vakuum uparivača, a dobiveni ekstrakt je kvantitativno rekonstruiran u 1,5 mL metanola.

U kivetu za analizu dodano je 2,250 mL otopine fluoresceina i 0,375 mL uzorka. Kivete s pripremljenim uzorcima prvo su termostatirane na 37 °C tijekom 30 minuta., nakon čega je dodano 0,375 mL otopine AAPH te je provedeno mjerenje. Mjerenje se provodi pomoću fluorescentnog spektrofotometra pri 37 °C tijekom 30 minuta. Valna duljina ekscitacije (λ_{eks}) je 485 nm, a valna duljina emisije (λ_{em}) 520 nm. Za pripremu slijepe probe, umjesto 0,375 mL uzorka, dodano je 0,375 mL 0,075 M fosfatnog pufera, a istim postupkom određena je i ORAC vrijednost standarda (500 μM Trolox) (Panić i sur., 2021).

ORAC vrijednost je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\text{ORAC vrijednost} = \left(\frac{\text{AUC}_{\text{uz}} - \text{AUC}_{\text{sp}}}{\text{AUC}_{\text{trx}} - \text{AUC}_{\text{sp}}} \right) k \times \alpha \times h \quad [\mu\text{mol Trolox ekvivalenta g}^{-1} \text{ ulja}] \quad [2]$$

gdje je:

AUC_{uz} – antioksidacijski kapacitet ulja

AUC_{sp} – antioksidacijski kapacitet slijepe probe

AUC_{trx} – antioksidacijski kapacitet Troloxa

k – faktor razrjeđenja

α – molarna koncentracija Troloxa

h – $V_{\text{metanola}} \text{ g}^{-1} \text{ ulja}$ ($\text{L g}^{-1} \text{ ulja}$)

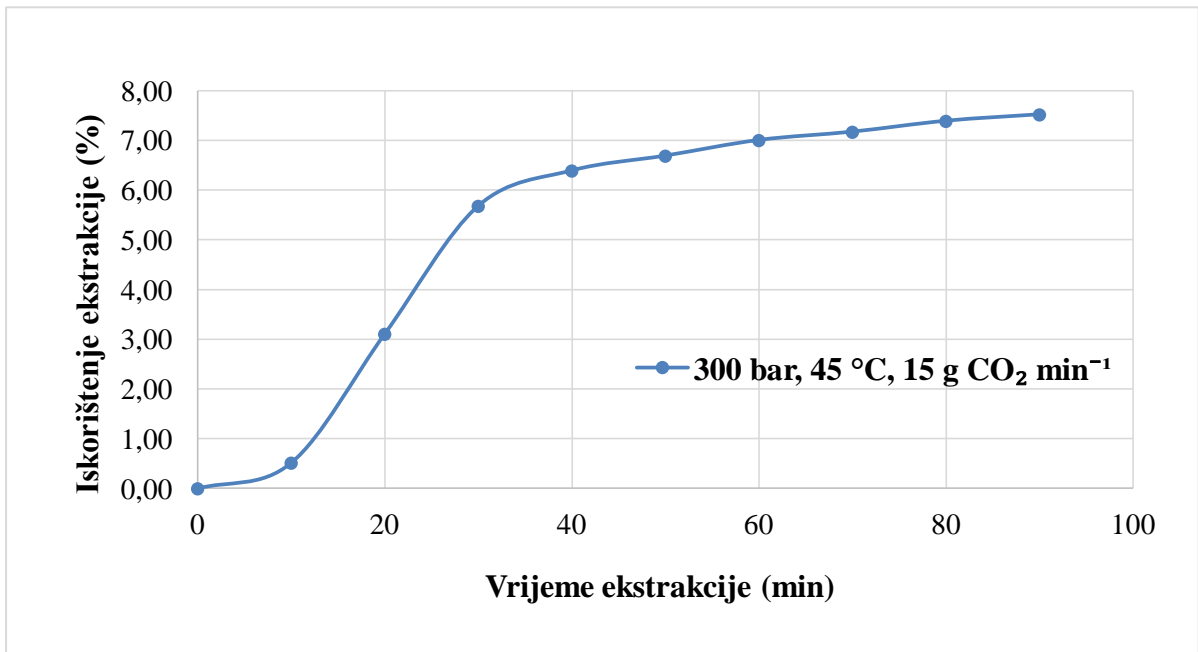
4. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon sušenja i mljevenja, sjemenka komine grožđa podvrgnuta je ekstrakciji ulja superkritičnim CO₂. Ekstrakcija ulja iz sjemenki komine grožđa provedena je kroz osam eksperimenata pri kojima su za svaki uzorak korišteni različiti procesni uvjeti tlaka, temperature te protoka plina CO₂, pri konstantnim uvjetima vremena ekstrakcije (90 minuta). Dinamika ekstrakcije ulja sjemenki grožđa praćena je mjerenjem količine ekstrahiranog ulja (% iskorištenje ekstrakcije) svakih 10 min ekstrakcije, tijekom 90 min za svaki pojedini eksperiment (slike 2-9), te su rezultati ukupnog iskorištenja ekstrakcije (%) različitih eksperimenata međusobno uspoređeni (slika 10). Također, iz ulja dobivenih pri različitim uvjetima ekstrakcije, pripremljeni su hidrofilni ekstrakti ulja koji su podvrgnuti određivanju antioksidacijske aktivnosti korištenjem ORAC metode. Slijedom toga, promatran je utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata ulja (slika 11).

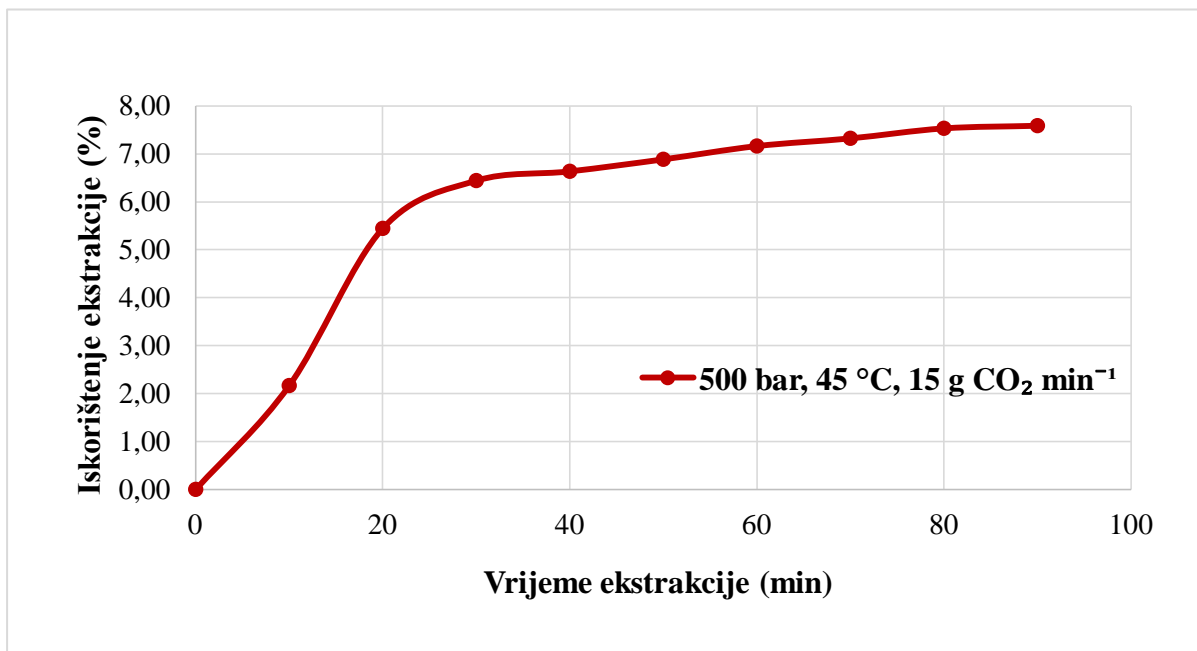
4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO₂ NA PRINOS ULJA

4.1.1. Utjecaj tlaka na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO₂

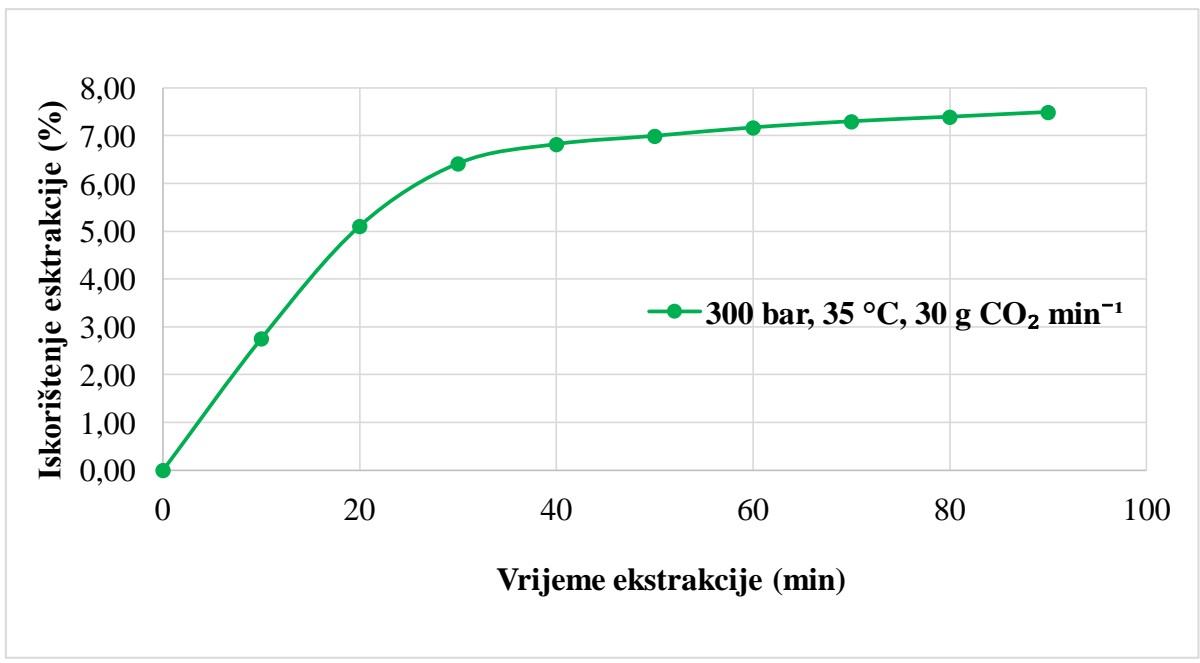
Primijenjeni tlak imao je značajan utjecaj na iskorištenje ekstrakcije. Za provođenje ekstrakcije korišteni su tlakovi od 300 i 500 bara. Usporedbom ukupnih iskorištenja ekstrakcija koja su dobivena pri tlaku od 500 bara s onima dobivenima pri tlaku od 300 bara, uočeno je da je tlak od 500 bara rezultirao većim iskorištenjima ekstrakcije u svim slučajevima, s iznimkom ekstrakcije pri uvjetima temperature od 55 °C i protoku od 30 g CO₂ min⁻¹ gdje je tlak od 300 bara rezultirao većim iskorištenjem (slike 2-10). Promatranjem povećanja tlaka pri izotermnim uvjetima, tlak od 500 bara rezultirao je većim iskorištenjem od tlaka od 300 bara, uz već spomenutu iznimku (slike 6 i 7). Postignuti rezultati su u skladu sa već provedenim istraživanjima gdje je povećanje tlaka uzrokovalo povećanje prinosa procesa ekstrakcije. Jokić i sur. (2016) te Dimić i sur. (2020) objašnjavaju utjecaj povećanog tlaka na bolji prinos ulja u svojim istraživanjima na način da povećanje tlaka (pri konstantnoj temperaturi) povećava gustoću superkritičnog CO₂, što potom povećava solvativajuću moć i brzinu otapanja superkritičnog CO₂ i omogućuje povećanje prinosa procesa.



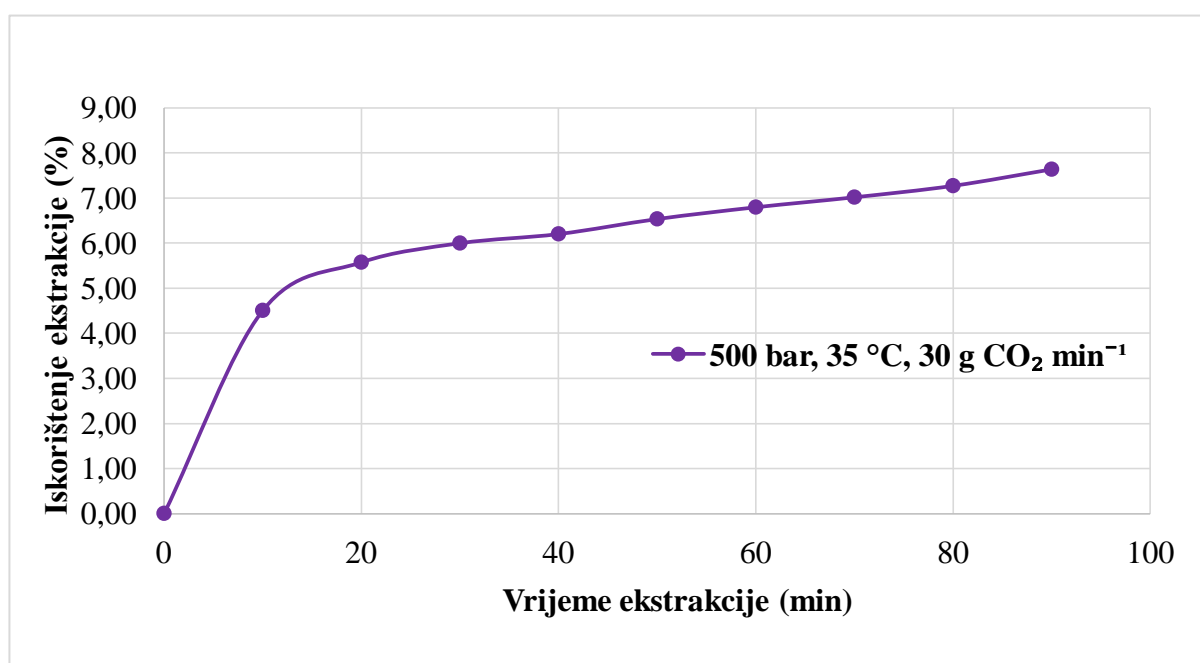
Slika 2. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 300 bara, 45 °C, 15 g CO₂ min⁻¹



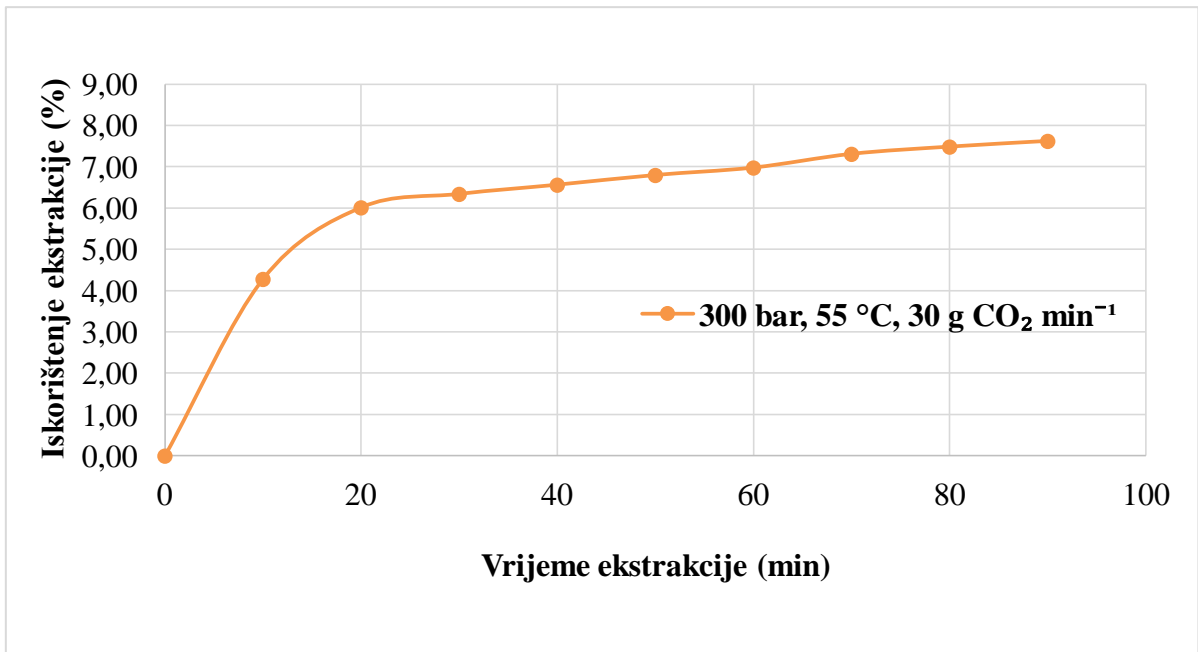
Slika 3. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 500 bara, 45 °C, 15 g CO₂ min⁻¹



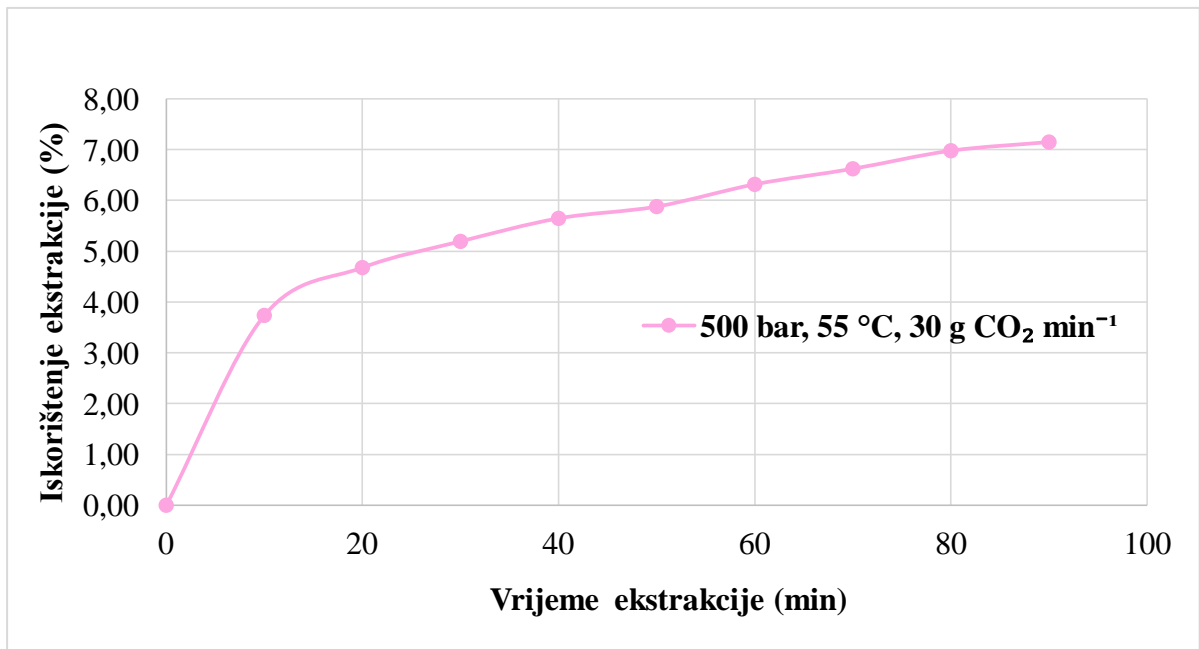
Slika 4. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 300 bara, 35 °C, 30 g CO₂ min⁻¹



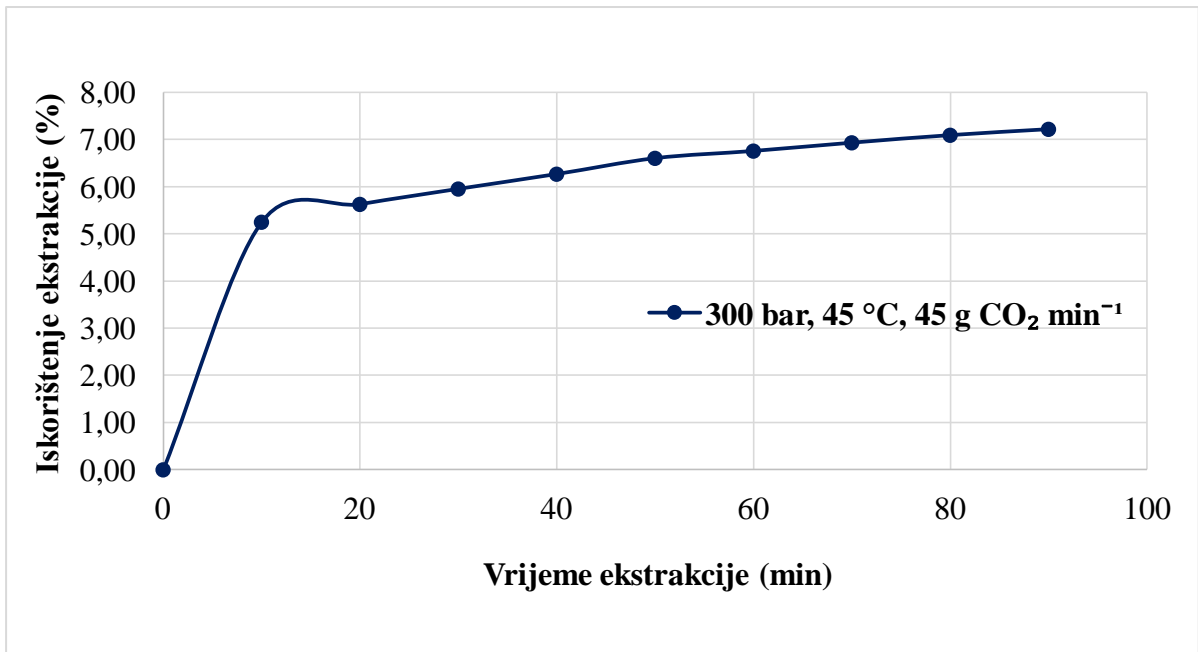
Slika 5. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 500 bara, 35 °C, 30 g CO₂ min⁻¹



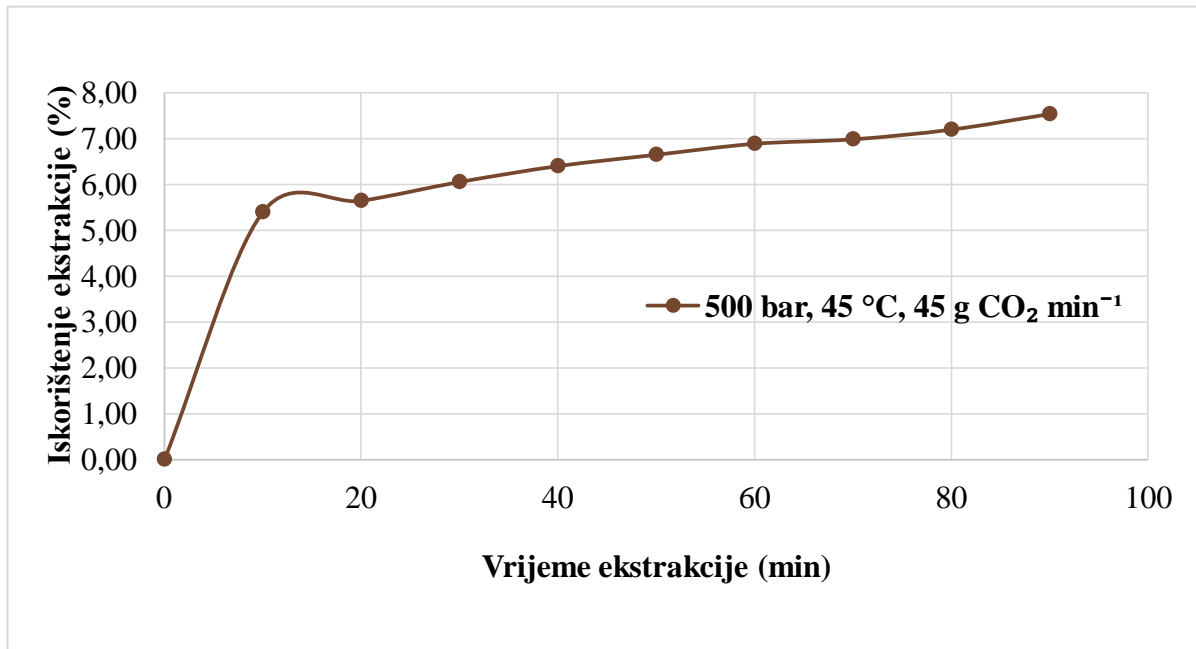
Slika 6. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 300 bara, 55 °C, 30 g CO₂ min⁻¹



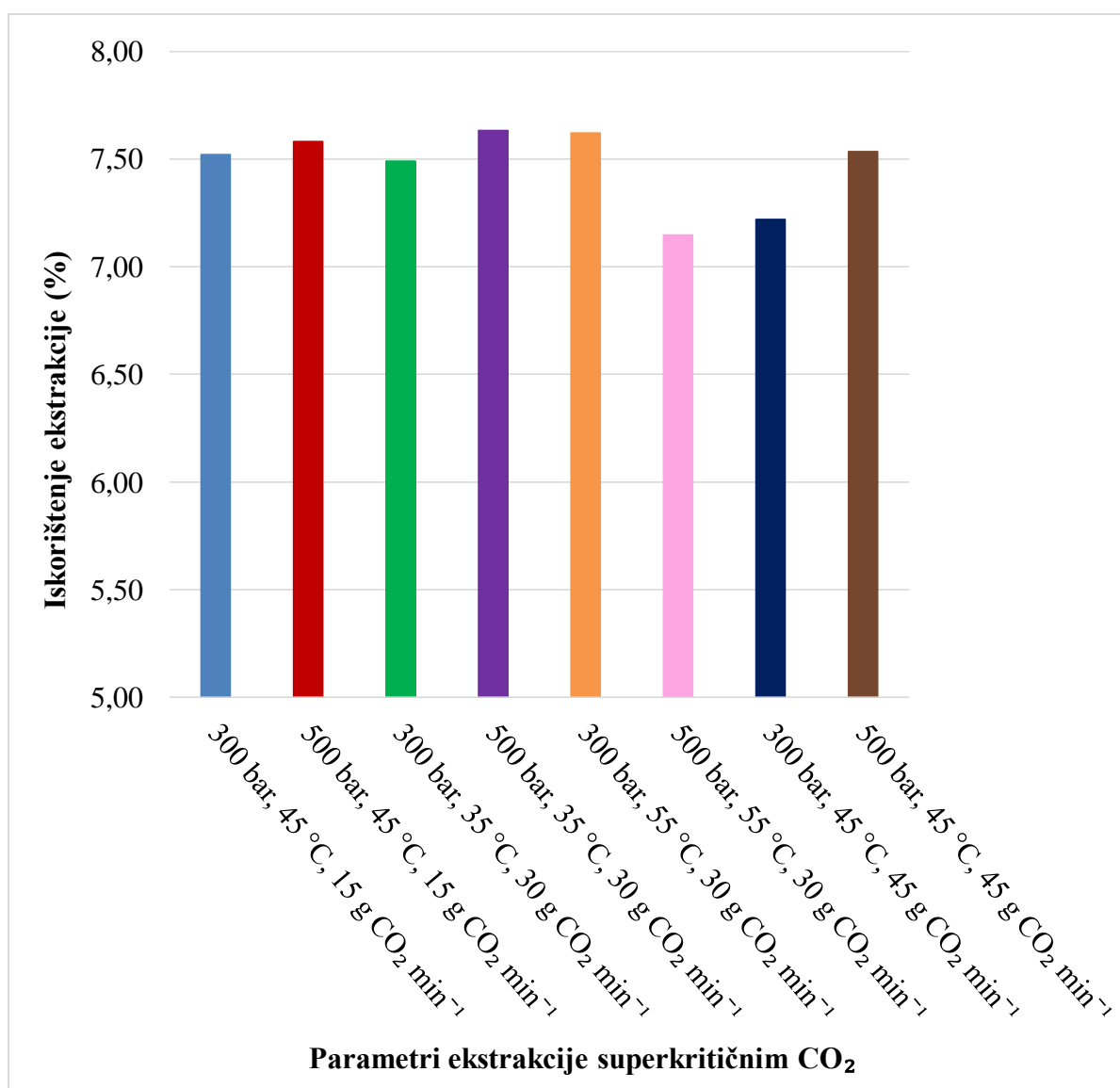
Slika 7. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 500 bara, 55 °C, 30 g CO₂ min⁻¹



Slika 8. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 300 bara, 45 °C, 45 g CO₂ min⁻¹



Slika 9. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o vremenu ekstrakcije (min) za procesne parametre tlaka, temperature i protoka: 500 bara, 45 °C, 45 g CO₂ min⁻¹



Slika 10. Dijagram ovisnosti iskorištenja ekstrakcije (%) o različitim parametrima ekstrakcije superkritičnim CO₂

Isti trend, uz iznimku pri tlaku od 400 bara, opazili su Duba i Fiori (2015) u svojem istraživanju, gdje su temperatura od 45 °C i protok CO₂ od $8,46 \pm 0,12$ g CO₂ min⁻¹ održavani konstantnim, a tlak je varirao u rasponu od 200-500 bara. Acevedo-Correa i sur. (2018) istražili su utjecaj tlaka na ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂ pri tlakovima od 20 MPa i 30 MPa pri čemu su temperatura i protok CO₂ održavani konstantnima na 313 K i 5 g CO₂ min⁻¹, uočeno je da je prinos ekstrakcije povećan s tlakom

(6,6 % i 10,5 % pri 20 MPa i 30 MPa). Santos i sur. (2020) opazili su smanjenje ekstrahiranog prinosa ulja pod najnižim uvjetima tlaka (20 MPa) što su objasnili smanjenjem solvativajuće moći otapala (superkritičnog CO₂) smanjenjem gustoće od 0,840 do 0,724 g cm⁻³. Nadalje, promatranjem dobivenih dijagrama opažena je najmanja razlika iskorištenja između tlakova od 300 i 500 bara pri uvjetima temperature od 45 °C i protoka od 45 g CO₂ min⁻¹ (slike 8 i 9).

4.1.2. Utjecaj temperature na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO₂

Uspoređivanjem temperature od 55 °C i temperature od 35 °C, uočeno je da je pri tlaku od 300 bara (slika 2) iskorištenje bilo veće kod 55 °C gdje se s povećanjem temperature brzina ekstrakcije lagano povećavala, a isto tako i topljivost (Duba i Fiori, 2015). Suprotno tome, pri tlaku od 500 bara iskorištenje je bilo veće kod temperature od 35 °C (slika 3). Sličan trend primjetili su i Coelho i sur. (2018) u svom istraživanju gdje je s povećanjem tlaka (30 odnosno 40 MPa) utjecaj temperature na prinos ulja bio gotovo zanemariv. Također su primijetili da se veći prinosi mogu postići i kod nižih tlakova (20 MPa) i temperatura (313 K) što potvrđuju i rezultati ovog rada gdje su iskorištenja ekstrakcija provedenih pri uvjetima tlaka od 300 bara te temperatura od 35 i 45 °C veća od iskorištenja ekstrakcije provedene pri uvjetima tlaka od 500 bara i 55 °C (slika 10). Temperatura od 45 °C uzrokovala je veće iskorištenje od temperature od 35 °C i to s manjim protokom (slike 2 i 4), ali suprotno je primijećeno pri većem tlaku i protoku kod 35 °C (slike 2 i 5) što je opet u skladu s opažanjima Coelho i sur. (2018). Nadalje, pri temperaturama od 45 °C dobiveno je veće iskorištenje u usporedbi s uvjetima ekstrakcije pri temperaturi od 55 °C, tlaku od 500 bara i protoku 30 g CO₂ min⁻¹ (slika 10). Takav rezultat može biti posljedica visoke temperature od 55 °C pri kojoj se gustoća superkritičnog CO₂ smanjuje, a to rezultira učinkom smanjene moći otapanja, što su objasnili Duba i Fiori (2015). Međutim, važno je istaknuti kako se topljivost otopljene tvari može ponovo povećati kao rezultat učinka povećanog tlaka pare otopljene tvari, a iskorištenje ovisi samo o tome koji će učinak prevladati. Isti trend uočili su Dimić i sur. (2020) pri konstantnom tlaku i brzini protoka CO₂ za različite vrijednosti temperature (40, 50 i 60 °C) te Yin i sur. (2005), gdje se pri ekstrakciji ulja sjemenki *Hippophae rhamnoides* L. korištenjem superkritičnog CO₂, prinos ulja najprije povećavao s porastom temperature i dostigao maksimalnu vrijednost na temperaturi od 40 °C, a zatim se smanjio sa daljnjim povećanjem temperature.

4.1.3. Utjecaj protoka CO₂ na iskorištenje ekstrakcije superkritičnim CO₂

Promatranjem utjecaja protoka CO₂ na iskorištenja ekstrakcija, uočeno je da najveći protok od 45 g CO₂ min⁻¹ nije rezultirao najvećim iskorištenjima ekstrakcija što je vidljivo usporedbom protoka od 45 g CO₂ min⁻¹ i protoka od 30 g CO₂ min⁻¹ (slika 10) gdje su protoci od 30 g CO₂ min⁻¹ dali najveća iskorištenja (slike 5 i 6). Suprotno tome, Duba i Fiori (2015) zaključili su da povećane brzine protoka superkritičnog CO₂ pozitivno utječu na prinose ekstrakcije te što je bio veći protok, veća je bila i brzina ekstrakcije te topljivost, u skladu s povećanjem vanjskih i unutarnjih parametara prijenosa mase. Usporedbom protoka od 15 g CO₂ min⁻¹ i 45 g CO₂ min⁻¹, opaženo je da pri istom tlaku od 300 bara i temperaturi od 45 °C (slike 2 i 8), kao i pri istom tlaku od 500 bara i temperaturi od 45 °C (slike 3 i 9), manji protok od 15 g CO₂ min⁻¹ daje veće iskorištenje. Ovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima koje su dobili Dimić i sur. (2020). Oni su proučavali utjecaj brzina protoka CO₂ na ukupni prinos SFE pri konstantnom tlaku (350 bara) i temperaturi (60 °C) i ustanovili da je najveći prinos (12,23 %) postignut pri najvećem primijenjenom protoku. Uočeno je da niži protok CO₂ (15 g CO₂ min⁻¹) pridonosi znatno manjem iskorištenju ekstrakcije, pogotovo prvih 10 minuta provođenja ekstrakcije (slike 2 i 3). Ovo opažanje je u skladu s rezultatima koje su dobili Acevedo-Correa i sur. (2018) gdje je vidljivo da što je bio veći protok, veći je bio i prinos ekstrakcije ulja (9,8 % i 10,5 % pri 1 g CO₂ min⁻¹ odnosno 5 g CO₂ min⁻¹). Slične rezultate dobili su Yin i sur. (2005) ekstrakcijom ulja sjemenki *Hippophae rhamnoides* L. korištenjem superkritičnog CO₂ gdje je veća brzina protoka CO₂ pokazala pozitivan utjecaj na prinos ulja što je posljedica smanjenja otpora prijenosu mase.

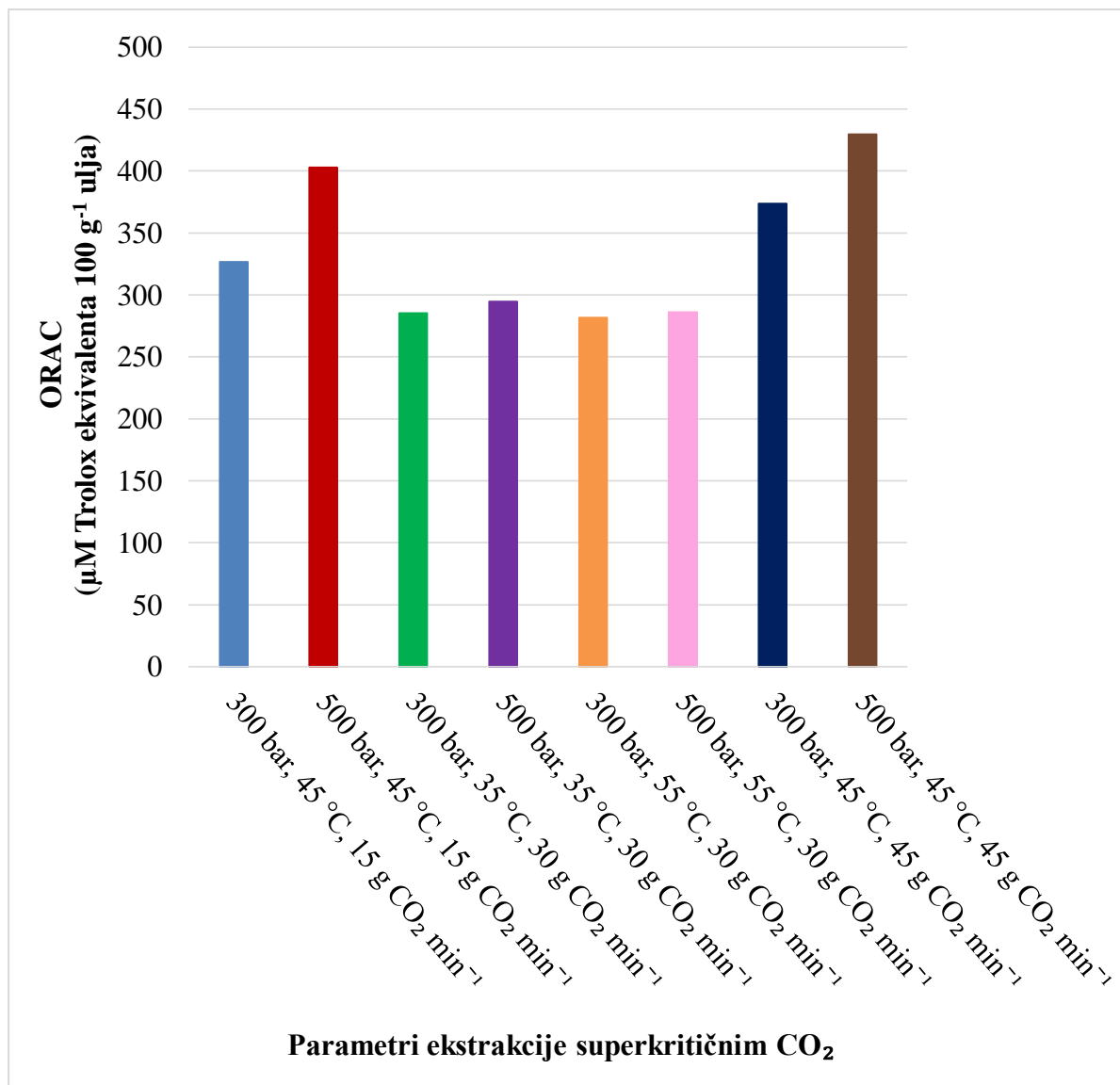
Nadalje, usporedbom utjecaja svih parametara (tlaka, temperature i protoka CO₂) na ukupna iskorištenja ekstrakcija (slika 10) opaženi su sljedeći trendovi. Najveće iskorištenje ekstrakcije nakon vremena provođenja od 90 minuta postignuto je kod uvjeta najvećeg tlaka od 500 bara, najmanje temperature od 35 °C te protoka od 30 g CO₂ min⁻¹ (7,63 %), a blizu je i iskorištenje postignuto pri tlaku od 300 bara, temperaturi od 55 °C i protoku od 30 g CO₂ min⁻¹ (7,62 %). Acevedo-Correa i sur. (2018) su također najveći prinos ekstrakta opazili pri najmanjoj temperaturi (10,5 % pri temperaturi od 313 K, u odnosu na 8,7 % pri temperaturi od 333 K), što je vjerojatno posljedica veće solvatirajuće moći superkritičnog CO₂ zbog njegove veće gustoće na nižoj temperaturi, ali i pri višem tlaku. Dimić i sur. (2020) su najveći prinos ulja ostvarili pri uvjetima tlaka od 350 bara, temperature od 60 °C i brzine

protoka CO₂ od 0,4 kg h⁻¹ što je bliže drugom najvećem iskorištenju postignutom u ovom radu. Pérez i sur. (2015) ostvarili su slične rezultate onima ostvarenim u ovom radu tako što su najveći prinos postigli pri manjoj temperaturi od 40 °C i većem tlaku od 300 bara, a drugi najveći prinos pri većoj temperaturi od 60 °C i manjem tlaku od 250 bara. Jokić i sur. (2016) ustanovili su da su za postizanje najvećeg prinosa ulja optimalni uvjeti ostvareni pri tlaku ekstrakcije od 400 bara i temperaturi od 41 °C, u tim uvjetima, predviđeni prinos ekstrahiranog ulja bio je 14,49 %. Najmanje iskorištenje postignuto je kod tlaka od 500 bara, temperature od 55 °C i protoka od 30 g CO₂ min⁻¹ (7,15 %), što je zanimljivo jer je pri ovim uvjetima korišten najveći tlak i najveća temperatura, uz iznimku protoka koji nije bio najveći. Ovakav rezultat može biti posljedica visoke temperature od 55 °C koja rezultira smanjenom gustoćom superkritičnog CO₂, a posljedica toga je smanjena moć otapanja. Za usporedbu, Pérez i sur. (2015) uočili su najmanji prinos ulja pri najmanjoj temperaturi od 40 °C i najmanjem tlaku od 200 bara. Manje iskorištenje je uočeno i kod tlaka od 300 bara, temperature od 45 °C i protoka od 45 g CO₂ min⁻¹ (7,22 %) što može biti posljedica smanjene topljivosti zbog smanjene gustoće CO₂ na višim temperaturama pri niskim razinama tlaka. Ostali uvjeti tlaka, temperature i protoka CO₂ dali su slične rezultate iskorištenja.

4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO₂ NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA

Promatrajući utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata ulja (slika 11), uočeno je da najveći antioksidacijski kapacitet (429,62 μM Trolox ekvivalenta 100 g⁻¹ ulja) ima ulje ekstrahirano pri uvjetima tlaka od 500 bara, temperature od 45 °C i protoka od 45 g CO₂ min⁻¹, što uključuje najveći korišteni tlak te protok CO₂. Također, sljedeći najveći antioksidacijski kapacitet (403,09 μM Trolox ekvivalenta 100 g⁻¹ ulja) uočen je kod tlaka od 500 bara, temperature od 45 °C i protoka od 15 g CO₂ min⁻¹. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Jokić i sur. (2016) prema kojima je ulje sjemenki grožđa ekstrahirano na većem tlaku imalo veću antioksidativnu aktivnost. Passos i sur. (2010) uočili su da se antioksidativni kapacitet ulja sjemenki grožđa povećava s povećanjem tlaka i temperature. Takva opažanja mogu se objasniti utjecajem tlaka i temperature na gustoću CO₂, a posljedično i na topljivost, odnosno i na učinak tlaka pare otopljenih tvari. Povećanje tlaka povećava gustoću otapala, što uzrokuje povećanje topljivosti, kako je i ranije spomenuto. Dimić i sur. (2020) zaključili su

da su najveći antioksidativni kapaciteti ulja sjemenki grožđa ostvareni pri najmanjem tlaku od 250 bara, najvećoj temperaturi od 60 °C te najvećem protoku od 0,4 kg CO₂ h⁻¹. Kod temperature od 45 °C uočeni su najveći antioksidacijski kapaciteti ulja, a kod protoka od 30 g CO₂ min⁻¹ najmanji antioksidacijski kapaciteti ulja.



Slika 11. Dijagram ovisnosti antioksidacijske aktivnosti ulja sjemenki grožđa (ORAC) o različitim parametrima ekstrakcije superkritičnim CO₂

Najmanji antioksidacijski kapacitet ulja (281,87 μM Trolox ekvivalenta 100 g^{-1} ulja) uočen je pri najmanjem tlaku od 300 bara, najvećoj temperaturi od 55 $^{\circ}\text{C}$ te protoku od 30 $\text{g CO}_2 \text{ min}^{-1}$. Suprotno tome, Santos i sur. (2020) opazili su da je najveću antioksidativnu aktivnost imalo ulje ekstrahirano na najvećoj temperaturi od 60 $^{\circ}\text{C}$ i najmanjem tlaku od 20 MPa. Navedeni autori istraživali su antioksidacijski kapacitet ulja sjemenki favele (*Cnidoscolus quercifolius*) dobivenog ekstrakcijom superkritičnim CO_2 te je ekstrakcija ulja provedena pri uvjetima temperature od 40, 50 i 60 $^{\circ}\text{C}$ te tlakova od 20, 25 i 30 MPa tijekom 120 min pri 5 $\text{g CO}_2 \text{ min}^{-1}$. Muangrat i Jirarattanarangsri (2020) istraživali su antioksidativnu aktivnost ulja ekstrahiranog iz sjemenki Assam čaja (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) ekstrakcijom superkritičnim CO_2 te je najmanja antioksidativna aktivnost opažena pri najvećoj temperaturi ekstrakcije (60 $^{\circ}\text{C}$), a najveća antioksidativna aktivnost pri najmanjem tlaku ekstrakcije (175 bara). Nadalje, niske vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta imalo je i ulje dobiveno pri uvjetima od 300 bara, 35 $^{\circ}\text{C}$ te 30 $\text{g CO}_2 \text{ min}^{-1}$ (285,41 μM Trolox ekvivalenta 100 g^{-1} ulja), kao i ulje dobiveno pri uvjetima od 500 bara, 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 $\text{g CO}_2 \text{ min}^{-1}$ (286,38 μM Trolox ekvivalenta 100 g^{-1} ulja). Ovakvi rezultati dobivenih najmanjih antioksidacijskih kapaciteta ulja opet se mogu objasniti kao posljedica smanjene topljivosti zbog smanjene gustoće CO_2 na višim temperaturama pri nižim uvjetima tlaka.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata provedene ekstrakcije ulja sjemenki komine grožđa primjenom superkritičnog CO₂, može se zaključiti sljedeće:

1. Metoda ekstrakcije primjenom superkritičnog CO₂ pokazala se pouzdanom i efikasnom metodom za ekstrakciju ulja sjemenki komine grožđa, kao i za očuvanje antioksidacijske aktivnosti ekstrahiranog ulja.
2. Na ukupno iskorištenje ekstrakcije, kao i na antioksidacijski kapacitet ekstrahiranog ulja, moguće je utjecati podešavanjem parametara ekstrakcije: tlaka, temperature i protoka superkritičnog CO₂.
3. Primjena viših tlakova utjecala je na povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja superkritičnim CO₂, a također i na antioksidacijski kapacitet ekstrahiranog ulja.
4. Utjecaj temperature na iskorištenje i antioksidacijski kapacitet ekstrahiranog ulja superkritičnim CO₂ gotovo je zanemariv s povećanjem tlaka.
5. Niži protok CO₂ (15 g CO₂ min⁻¹) pridonio je znatno manjem iskorištenju ekstrakcije, pogotovo na početku provođenja ekstrakcije ulja superkritičnim CO₂.
6. Optimalni uvjeti za dobivanje najvećeg iskorištenja ekstrakcije ulja sjemenki komine grožđa primjenom superkritičnog CO₂ (7,63 %) uključuju tlak od 500 bara, temperaturu od 35 °C te protok od 30 g CO₂ min⁻¹.
7. Najveći antioksidacijski kapacitet (429,62 μM Trolox ekvivalenta 100 g⁻¹ ulja) opažen je kod ulja ekstrahiranog pri uvjetima tlaka od 500 bara, temperature od 45 °C i protoka od 45 g CO₂ min⁻¹, što uključuje najveći korišteni tlak te protok CO₂.

6. POPIS LITERATURE

Acevedo-Correa D, Montero Castillo P, Jose Martelo R (2018) Effect of the process parameters on the oil extraction yield during supercritical fluid extraction from grape seed. *Contemp Eng Sci* **11**, 611–617. <https://doi.org/10.12988/ces.2018.8250>

Amienyo D, Camilleri C, Azapagic A (2014) Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *J Clean Prod* **72**, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.02.044>

Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G (2008) Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem* **108**, 1122–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>

Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, Mellinger-Silva C, Tonon RV, Cabral LMC, Freitas SP (2017) Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag* **68**, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>

Beveridge THJ, Girard B, Kopp T, Drover JCG (2005) Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. *J Agric Food Chem* **53**, 1799– 1804. <https://doi.org/10.1021/jf040295q>

Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* **14**, 303-311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)

Coelho JP, Filipe RM, Robalo MP, Stateva RP (2018) Recovering value from organic waste materials: supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds. *J Supercrit Fluids* **141**, 68-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.008>

Da Porto C, Porretto E, Decorti D (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem* **20**, 1076-1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>

Decean HP, Brie IC, Tatomir CB, Perde-Schrepler M, Fischer-Fodor E, Virag P (2018) Targeting MAPK (p38, ERK, JNK) and inflammatory CK (GDF-15, GM-CSF) in UVB-

Activated Human Skin Cells with *Vitis vinifera* Seed Extract. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **37**, 261–272. <https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2018027009>

De Souza RC, Machado BAS, Barreto GA, Leal IL, Anjos JP, Umsza-Guez MA (2020) Effect of experimental parameters on the extraction of grape seed oil obtained by low pressure and supercritical fluid extraction. *Molecules* **25**, 1634. <https://doi.org/10.3390/molecules25071634>

Dhvamani S, Rao YPC, Lokesh BR (2014) Total antioxidant activity of selected vegetable oils and their influence on total antioxidant values in vivo: a photochemiluminescence based analysis. *Food Chem* **164**, 551-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.064>

Dimić I, Teslić N, Putnik P, Bursać Kovačević D, Zeković Z, Šojić B, Mrkonjić Ž, Čolović D, Montesano D, Pavlić B (2020) Innovative and Conventional Valorizations of Grape Seeds from Winery By-Products as Sustainable Source of Lipophilic. *Antioxidants* **9**, 568. <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>

Duba KS, Fiori L (2015) Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *J Supercrit Fluid* **98**, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.021>

Dwyer K, Hosseinian F, Rod M (2014) The market potential of grape waste alternatives. *J Food Res* **3**, 91-106. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>

Fiori L (2010) Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chem Eng Process* **49**, 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.06.001>

Fontana AR, Antonioli A, Bottini R (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* **61**, 8987. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>

Gurger M, Yilmaz E, Yilmaz S, Once GK, Konuk M, Kaya E, Say Y, Artas G, Artas H (2019) Grape seed extract supplement increases bone callus formation and mechanical strength: An animal study. *J Orthop Surg Res* **14**, 206. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1251-5>

Haminiuk CW, Maciel GM, Plata-Oviedo MS, Peralta RM (2012) Phenolic compounds in fruits—an overview. *Int J Food Sci Technol* **47**, 2023-2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2621.2012.03067.x

Hao JP, Shi H, Zhang J, Zhang CM, Feng YM, Qie LY, Dong M, Ji X (2018) Role of GSPE in improving early cerebral vascular damage by inhibition of Profilin-1 expression in a ouabain-induced hypertension model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**, 6999–7012. https://doi.org/10.26355/eurrev_201810_16171

Ismail AFM, Moawed FSM, Mohamed MA (2015) Protective mechanism of grape seed oil on carbon tetrachloride-induced brain damage in γ -irradiated rats. *J Photoch Photobio* **153**, 317–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.005>

Ismail AFM, Salem AAM, Eassawy MMT (2016) Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of γ -irradiated rat. *J Photoch Photobio* **160**, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.027>

Jokić S, Bijuk M, Aladić K, Bilić M, Molnar M (2016) Optimisation of supercritical CO₂ extraction of grape seed oil using response surface methodology. *Int J Food Sci Technol* **51**, 403–410. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12986>

Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E (2018) Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess* **5**, 46. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>

Khaw K-Y, Parat M-O, Shaw PN, Falconer JR (2017) Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules* **22**, 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules22071186>

Martin ME, Grao-Cruces E, Millan-Linares MC, Montserrat-de la Paz S (2020) Grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil: A functional food from the winemaking industry. *Foods* **9**, 2-20. <https://doi.org/10.3390/foods9101360>

Matthäus B (2008) Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *Eur J Lipid Sci Technol* **110**, 645-650. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700276>

Muangrat R, Jirarattanarangsri W (2020) Physicochemical properties and antioxidant activity of oil extracted from Assam tea seeds (*Camellia sinensis* var. *assamica*) by supercritical CO₂ extraction. *J Food Process Preserv* **44**. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14364>

Özvural EB, Vural H (2011) Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Sci* **88**, 179–183.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.022>

Panić M, Gunjević V, Radošević K, Bubalo MC, Ganić K, Redovniković I (2021) COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Graševina Grape Pomace. *Molecules* **26**, 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA, Silva CM (2009) Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *J Supercrit Fluids* **48**, 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.001>

Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA, Silva CM (2010) Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chem Eng J* **160**, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.087>

Pérez C, Ruiz del Castillo ML, Gil C, Blanch GP, Flores G (2015) Supercritical fluid extraction of grape seeds: Extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Food Funct* **6**, 2607. <https://doi.org/10.1039/C5FO00325C>

Rincón-Cervera MÁ, Galleguillos-Fernández R, González-Barriga V, Valenzuela R, Speisky H, Fuentes J, Valenzuela A (2020) Fatty acid profile and bioactive compound extraction in purple viper's bugloss seed oil extracted with green solvents. *J Am Oil Chem Soc* **97**, 319–327. <https://doi.org/10.1002/aocs.12328>

Rubio M, Alvarez-Ortí M, Fernández E, Pardo JE (2009) Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *J Agric Food Chem* **57**, 2812–2815. <https://doi.org/10.1021/jf803627t>


Sabir A, Unver A, Kara Z (2012) The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agric* **92**, 1982–1987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5571>

Santos KA, da Silva EA, da Silva C (2020) Supercritical CO₂ extraction of favela (*Cnidocolus quercifolius*) seed oil: Yield, composition, antioxidant activity, and mathematical modeling. *J Supercrit Fluids* **165**, 104981. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104981>

- Scoma A, Rebecchi S, Bertin L, Fava F (2016) High impact biowastes from South European agro-industries as feedstock for second-generation biorefineries. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 175-189. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.947238>
- Shinagawa FB, De Santana FC, Torres LRO, Mancini-Filho J (2015) Grape seed oil: A potential functional food? *Food Sci Technol* **35**, 399–406. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6826>
- Siguel E (1996) A new relationship between total/high density lipoprotein cholesterol and polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **31**, S51-S56. <https://doi.org/10.1007/bf02637051>
- Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Kumar Gaur V, Gnansounou E, Bhartiraja B (2020) Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresour Technol* **314**, 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- Sovilj M (2010) Critical review of supercritical carbon dioxide extraction of selected oil seeds. *Acta Period Technol* **10**, 105–120. <http://dx.doi.org/10.2298/APT1041105S>
- Zhao L, Yagiz Y, Xu C, Fang X, Marshall MR (2017) Identification and characterization of vitamin E isomers, phenolic compounds, fatty acid composition, and antioxidant activity in seed oils from different muscadine grape cultivars. *J Food Biochem* **41**, e12384. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12384>
- Yin J, Wang A, Wei W, Liu Y, Shi W (2005) Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. *Sep Purif Technol* **43**, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.10.016>
- Yu J, Ahmedna M (2013) Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol* **48**, 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Izjava o izvornosti

Ja, Mihaela Šmic, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis