

# Utjecaj predtretmana ultrazvukom i hladnog prešanja na sastav polifenolnih spojeva u ulju sjemenki grožđa

---

Đebro, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:380451>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2024.

Matea Đebro

**UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKOM I  
HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV  
POLIFENOLNIH SPOJEVA U ULJU SJEMENKI  
GROŽĐA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo i u Laboratoriju za tehničku termodinamiku na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Natke Ćurko te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Filipa Dujmića i dr. sc. Katarine Perić.

## ZAHVALA

*Veliko i iskreno hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Natki Ćurko, na stručnom vodstvu, svom uloženom vremenu i trudu, strpljenju, prenesenom znanju i vrijednim savjetima tijekom izrade ovoga rada. Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Filipu Dujmiću kao i tehničkom suradniku Darjanu Pipiću na dragocjenoj stručnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnoga dijela ovoga rada kao i na ustupanju laboratorijske opreme. Veliko hvala i mojoj prvoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marini Tomašević, te dr. sc. Katarini Perić na svojoj ukazanoj pomoći još od vremena pisanja završnoga rada. Zahvaljujem i svim ostalim profesorima, docentima i asistentima na Prehrambeno - biotehnološkom fakultetu koji su mi prenijeli potrebna znanja i vještine tijekom studiranja.*

*Hvala svim kolegama koji su sa mnom dijelili ovaj put te moje studentske dane oslikali predivnim uspomenama. Vaša podrška i zajednički trenutci ispunjeni smijehom i ohrabrenjem učinili su svaki izazov lakšim i svaki uspjeh većim. Posebne zahvale idu mojim dragim prijateljima i članovima šire obitelji koji su vjerovali u mene, imali razumijevanja i bili tu kada je to bilo potrebno.*

*Veliko hvala i mojoj obitelji, roditeljima i braći, koji su bili uz mene tokom moga dosadašnjeg obrazovanja i zajedno sa mnom iščekivali ovaj dan, a posebno mome ocu koji je oduvijek vjerovao u mene i bodrio me ka mome cilju.*

*I za kraj, hvala Ti.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKOM I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV POLIFENOLNIH  
SPOJEVA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Matea Đebro, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213051

### Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj ultrazvučnog predtretmana sjemenki komine grožđa sorte Graševina na polifenolni sastav ulja. Uzorci su tretirani u ultrazvučnoj kupelji primjenom frekvencije 37 i 80 kHz tijekom 30 i 90 min. Koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva, ukupnih flavonida i neflavonoida određene su primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC-DAD). Primjena ultrazvučnih predtretmana značajno je utjecala na povećanje koncentracije polifenolnih spojeva ( $p < 0,05$ ). Produljenje vremena tretiranja pri frekvenciji od 80 i 37 kHz značajno je utjecalo na povećanje ukupnih flavonoida i neflavonoida te većine pojedinačnih polifenolnih spojeva. Primjena frekvencije od 37 kHz pokazala se učinkovitijom od frekvencije od 80 kHz. Ultrazvučni predtretman od 37 kHz i 90 min rezultirao je značajno većim koncentracijama ukupnih neflavonoida i flavonoida te hidroksibenzojeve kiseline, ferulinske kiseline, (-)-epikatehina, procijanidina B1, kvercetina i miricetina od predtretmana frekvencije 80 kHz i 90 min ( $p < 0,05$ ).

**Ključne riječi:** ulje sjemenki grožđa, ultrazvuk, polifenolni spojevi, komina grožđa, hladno prešanje

**Rad sadrži:** 43 stranice, 13 slika, 3 tablice, 91 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno - biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Filip Dujmić, dr. sc. Katarina Perić

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Mladen Brnčić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marina Tomašević (član)
4. izv. prof. dr. sc. Filip Dujmić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 31. listopada 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

EFFECT OF ULTRASOUND PRETREATMENT AND COLD PRESSING ON THE COMPOSITION OF  
POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN GRAPE SEED OIL

Matea Đebro, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213051

### **Abstract:**

The aim of this study was to investigate the effect of ultrasonic pretreatment of Graševina grape pomace seeds on the grape seed oil polyphenolic composition. The samples were treated in an ultrasonic bath at frequencies of 37 and 80 kHz for 30 and 90 min. Concentrations of individual polyphenolic compounds, total flavonoids and nonflavonoids were determined using ultra high performance liquid chromatography (UPLC-DAD). The application of ultrasonic pretreatments significantly increased the concentration of polyphenolic compounds ( $p < 0.05$ ). Extending the treatment duration at 80 and 37 kHz significantly increased the total flavonoids, nonflavonoids and most individual polyphenolic compounds. The 37 kHz frequency was found to be more effective than the 80 kHz frequency. Ultrasonic pretreatment at 37 kHz for 90 min resulted in significantly higher concentrations of total nonflavonoids, flavonoids, hydroxybenzoic acid, ferulic acid, (-)-epicatechin, procyanidin B1, quercetin and myricetin compared to pretreatment at 80 kHz for 90 min ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** grape seed oil, ultrasound, phenolic compounds, grape pomace, cold pressing

**Thesis contains:** 43 pages, 13 figures, 3 tables, 91 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Natka Ćurko, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Filip Dujmić, PhD, Associate professor, Katarina Perić, PhD

### **Reviewers:**

1. Mladen Brnčić, PhD, Full professor (president)
2. Natka Ćurko, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marina Tomašević, PhD, Associate professor (member)
4. Filip Dujmić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** October 31<sup>th</sup>, 2024

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. KEMIJSKI SASTAV KOMINE GROŽĐA I MOGUĆNOSTI NJENOG ISKORIŠTENJA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. KEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ULJA SJEMENKI GROŽĐA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE ULJA .....</b>	<b>9</b>
2.3.1. Konvencionalne metode proizvodnje ulja.....	9
2.3.2. Inovativne metode proizvodnje ulja.....	10
2.3.3. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji te proizvodnji ulja .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIJAL .....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Komina sjemenke grožđa .....	15
3.1.2. Kemikalije.....	15
3.1.3. Aparatura i laboratorijski pribor.....	16
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Ultrazvučni predtretman sjemenki komine grožđa.....	17
3.2.2. Hladno prešanje sjemenki grožđa.....	18
3.2.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva ulja sjemenki grožđa.....	19
3.2.4. Određivanje sastava pojedinačnih polifenolnih spojeva (neflavonoida i flavonoida) u ulju sjemenki grožđa primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	19
3.2.5. Obrada podataka.....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU NEFLAVONOIDA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU FLAVONOIDA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA .....</b>	<b>28</b>
<b>5.ZAKLJUČCI.....</b>	<b>34</b>
<b>6.LITERATURA .....</b>	<b>35</b>



## 1. UVOD

Komina grožđa nusproizvod je u proizvodnji vina, a interes za njezino iskorištenje značajno je porastao posljednjih godina. Razlog leži u činjenicama da vinska industrija svake godine generira velike količine ovoga „otpada“ koji je bogat bioaktivnim spojevima. Naime, prema statističkim podacima Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (OIV, engl. *International Organisation of Vine and Wine*) za 2023. godinu vinova loza bila je zasađena na ukupno 7,2 milijuna hektara, dok je proizvodnja vina u svijetu dosegla 237 milijuna hektolitara. Procjenjuje se kako navedena industrija na godišnjoj razini generira oko 5 milijuna tona otpada (komine). Proizvodnja vina jedna je od važnih gospodarskih grana u Republici Hrvatskoj, a prema podacima Vinogradarskog registra za vinsku godinu 2022. (01.08.2022. – 31.07.2023.) na 17 278 hektara od 87 162 978 trsova proizvedeno je 560 789 hektolitara vina. Najzastupljeniji autohtoni kultivar vinove loze bila je Graševina s 4 313 zasađenih hektara.

Valorizacija komine predstavlja ekonomski i ekološki prihvatljivo rješenje zbrinjavanja otpada nastalog tijekom proizvodnje vina. Primjerice, komina kao nusproizvod posebice je bogata polifenolnim spojevima budući da se tijekom vinifikacije tek 40 – 60 % ovih spojeva ekstrahira u samo vino, dok prestali dio zaostaje u pokožici i sjemenki komine. Stoga, komina kao sirovina ima široku primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj, ali i drugim industrijama. U novije vrijeme, komina se sve više koristi i kao sirovina za proizvodnju ulja sjemenki grožđa. Navedeno ulje bogato je hidrofiličnim i lipofilnim antioksidansima s karakterističnim senzorskim karakteristikama, odnosno vinskom i voćnom aromom u kojoj dominiraju note grožđica.

Tema novijih istraživanja usmjerena je ka istraživanju inovativnih metoda proizvodnje ulja kod uljarica, kao i različitih predtretmana kojima se nastoji povećati iskorištenje sirovine, poboljšati nutritivni sastav te oksidacijska stabilnost kao i senzorske karakteristike dobivenoga ulja. Uz navedene čimbenike težnja je postići bolju održivost te smanjiti troškove proizvodnje. Ultrazvuk visokih snaga od ranije je poznat po svojoj sposobnosti poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije uz povećanje koncentracija različitih bioaktivnih spojeva. Međutim, mogućnosti primjene ultrazvuka kao predtretmana u proizvodnji hladno prešanog ulja sjemenki grožđa ranije nisu bile istražene.

Stoga, cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj predtretmana ultrazvukom različitih frekvencija (37 i 80 kHz) i vremena tretiranja (30 i 90 min) na polifenolni sastav hladno prešanog ulja sjemenki grožđa sorte Graševina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KEMIJSKI SASTAV KOMINE GROŽĐA I MOGUĆNOSTI NJENOG ISKORIŠTENJA

Komina grožđa glavni je kruti organski otpad od proizvodnje vina koji čine pokožica (50 %) i sjemenke (25 %), a u nekim slučajevima i peteljka grožđa (25 %) (Nanni i sur., 2021). U kvalitativnom smislu sjemenka grožđa predstavlja najvrjedniji dio komine (Dimić i sur., 2020; Shinagawa i sur., 2017; Bail i sur., 2008; Matthäus, 2008). U sastavu sjemenke dominiraju prehrambena vlakna (40 – 60 %) od kojih se značajem ističu polisaharidi, celuloza, hemiceluloza, pektin i lignin. Nadalje, sjemenke sadrže 7 – 15 % proteina te, ovisno o uvjetima prešanja, 10 – 20 % ulja. Voda čini 28 – 40 % sjemenki grožđa, hlapljive tvari 0,5 – 2 % te mineralne tvari 2 – 4 % (Shinagawa i sur., 2017; Matthäus, 2008). Također, sjemenke sadrže 20 – 30 % izdvojenih bioaktivnih spojeva od kojih se važnošću ističu polifenolni spojevi, vitamin E i fitosteroli. Glavni polifenolni spojevi u sjemenkama grožđa uključuju flavan-3-ol monomere i oligomere te manjim dijelom flavonole, stilbene i fenolne kiseline. Ekstrakti sjemenke grožđa posebno su bogati monomerima poput katehina, epikatehina, epikatehin galata te flavan-3-ol dimerima poput procijanidina B1, B2, B3 i B4 koji posjeduju snažno antioksidacijsko djelovanje (Ma i Zhang, 2017). S druge strane, u pokožici komine dominiraju antocijani gdje je malvidin-3-glukozid glavni predstavnik antocijana, a dominiraju i flavan-3-ol polimeri te hidroksicimetne kiseline (Bordiga i sur., 2019). Uslijed navedenog komina predstavlja važan supstrat za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju (Shinagawa i sur., 2017).

Kominu dobivamo nakon fermentacije i prešanja masulja u proizvodnji crnih vina ili direktno nakon prešanja u proizvodnji bijelih vina, a čini oko 20 – 25 % ukupne mase prerađenog grožđa (Christ i Burrit, 2013; Abarghuei i sur., 2010). Količina koja nastaje ovisi o sorti grožđa, procesu prešanja i koracima fermentacije, a njezino adekvatno i prihvatljivo zbrinjavanje aktualna je tema u vinskoj i srodnim industrijama. Vinska se komina od davnina koristila za proizvodnju jakih alkoholnih pića. Zbog prevelike ponude takve vrste pića na svjetskom tržištu došlo je do znatnog pada cijene što je posljedično proizvođače dovelo do smanjenja prihoda od prerade komine, a povećanja troškova njenog skladištenja (Voća, 2008). Raniji načini zbrinjavanja komine najčešće su uključivali spaljivanje ili zaoravanje u tlo (Licul i Premužić, 1993), no zamijećen je nepogodan utjecaj na okoliš. Primjerice, problem su polifenolni antioksidansi (kojima je komina bogata, a koji su otporni na biološku razgradnju), zatim otežana razgradnja celuloze iz peteljke kao i niska pH vrijednosti (3,5 – 5,4) (Voća, 2008; Bustamante i sur., 2007). Odlaganjem sadržaja u okoliš posljedično dolazi do sve veće otpornosti na biodegradaciju (Bordiga i sur., 2019; Kalli i sur., 2018) što kroz dulji vremenski odmak uzrokuje promjene u ekosustavu. Nadalje, onečišćenje površinskih i podzemnih voda

predstavlja još jednu negativnu posljedicu (Bordiga i sur., 2019). Uz to, na mjestima u prirodi gdje se komina odlaže dolazi i do privlačenja muha i drugih nametnika te se povećava šansa za širenjem neugodnih mirisa, ali i raznih oboljenja u ljudi i životinja (Dwyer i sur., 2014). Vinska komina sadrži približno 0,5 – 3,3 % dušika, 0,2 – 0,7 % fosforne kiseline te 0,5 – 1 % kalija (Voća, 2008). Prema istraživanju iz 2006. (Arvanitoyannis i sur., 2006) visoki udio kalija, fenola i lignina uz slabu probavljivost te malu nutritivnu vrijednost čine kominu lošim izborom za prehranu preživača. Prema navodima iz istraživanja (Abarghuei i sur., 2010) obroci koji su sadržavali veće količine svježih komine grožđa rezultirali su negativnim utjecajem na probavljivost u buragu i iskorištenje dušika u ovaca. Zbog sve strožih regulativa Europske unije postalo je zabranjeno koristiti organski otpad koji ima više od 5 % organskog ugljika kao gnojivo (Pravilnik, 2019). U komini se nalazi više od 20 mg L<sup>-1</sup> organskog ugljika pa je prema propisima Europske unije takav otpad potrebno odložiti na za to predviđena odlagališta što čini cijeli proces neekonomičnim (Voća, 2008). Obzirom na navedeno u posljednje vrijeme ažurno se istražuje iskorištenje komine te pokušava pronaći njezina što praktičnija industrijska primjena.

Nadalje, komina predstavlja značajan izvor organske tvari, kalija, dušika i fosfora te se može koristiti za proizvodnju biogoriva, ali i toplinske energije (Arvanitoyannis i sur., 2006). Postoji nekoliko metoda koje omogućuju njeno iskorištavanje kao održivog izvora energije. Jedan od najzastupljenijih procesa je anaerobna digestija pri kojoj se komina razgrađuje u bioreaktorima bez prisustva kisika. Ovim procesom nastaje bioplina, prvenstveno metan, koji se može koristiti za proizvodnju topline i električne energije. Preostali otpad nakon ovog procesa često se koristi kao visokokvalitetno gnojivo (Song i sur., 2021). Piroliza je druga metoda gdje se organska tvar, a u ovom slučaju vinska komina, izlaže visokim temperaturama bez prisustva kisika što rezultira proizvodnjom plinovitih, tekućih i krutih goriva. Proizvedeni plin koristi se za generiranje energije, dok se tekući proizvodi poput bio ulja mogu primijeniti u različite industrijske svrhe (Laird i sur., 2009). Izravno sagorijevanje je jednostavniji postupak poznat od davnina za dobivanje toplinske energije u kojem se osušena komina spaljuje kao čvrsto gorivo u kotlovima za proizvodnju topline ili električne energije. Ova metoda omogućuje brzo i učinkovito iskorištavanje komine kao izvora energije. Prema istraživanju iz 2008. (Voća, 2008) izgaranjem peletirane komine oslobađaju se zanemarive količine štetnih tvari koje ne zagađuju prirodu te se to gorivo može smatrati ekološki čistim, a doprinosi i energetske učinkovitosti proizvođača vina kao i općem razvitku ruralnih krajeva. Fermentacija je metoda koja omogućuje pretvorbu šećera iz komine u bioetanol koji je popularno biogorivo za vozila. Ova metoda koristi proces fermentacije kako bi se proizveo etanol iz preostalih šećera uz mogućnost povećanja prinosa dodatnim enzimskim ili kiselinskim postupcima (Ivančić Šantek

i sur., 2016). Ipak, zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina, vinska komina je nepogodna za dobivanje biodizela (Ramos i sur., 2009).

Također, kako je ranije spomenuto, industrija proizvodnje alkoholnih pića kroz dodatne procese fermentacije i destilacije uspješno koristi kominu (Teixeira i sur., 2014) te dobivene proizvode čini široko prepoznatljivima. Primjerice, u Italiji se proizvodi rakija pod nazivom Grappa, a riječ je o popularnom destiliranom alkoholnom proizvodu od značajne kulturološke, komercijalne i povijesne važnosti u toj državi. Grappa se dobije tako što se komina ili trop grožđa prerađuju nakon alkoholne fermentacije te nastaje rakija s udjelom alkohola 35 – 60 % (Bordiga i sur., 2019). Brojni su primjeri sličnih proizvoda pa se tako kod nas proizvode loza i komovica. Rakija loza nastaje destilacijom fermentiranog grožđanog masulja, dok se komovica proizvodi isključivo iz fermentirane groždane komine i destilira neposredno s vodenom parom ili nakon dodavanja vode grožđanoj komini (Pravilnik, 2019).

Osim prethodno navedenog, komina sadrži vrijedne komponente, odnosno spojeve kojima je moguće obogatiti razne pripravke. Ekstrakti komine grožđa mogu se koristiti u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u obliku tekućih ekstrakata, praha ili koncentrata. Osim toga, mogu zamijeniti sintetičke antioksidanse te poslužiti kao prirodna alternativa konzervansima u mesnoj industriji (Yu i Ahmedna, 2012). Carpenter i sur. (2006) istraživali su antioksidativne i genoprotektivne učinke niza fitokemikalija i biljnih ekstrakata (ekstrakt sjemenki grožđa, medvjetke i lista masline) u uvjetima oksidativnog stresa izazvanog vodikovim peroksidom i tert-butilhidroperoksidom u humanoj monocitnoj staničnoj liniji. Ekstrakt sjemenki grožđa i medvjetke pokazali su najjača antioksidativna svojstva. Zbog snažnih antioksidacijskih svojstava, ekstrakt sjemenki grožđa bogat proantocijanidinima najčešće se komercijalno koristi kao dodatak prehrani s prirodnim antioksidansima. Njegova primjena uključuje produženje roka trajanja proizvoda i poboljšanje zdravstvenih učinaka hrane (Carpenter i sur., 2007).

Sjemenka komine također je i osnovna sirovina za proizvodnju ulja sjemenki grožđa, koje se osim u prehrani koristi i kao sastojak mnogih kozmetičkih proizvoda budući da pomaže u obnavljanju oštećenih tkiva i njezi kože (Nerantzis i Tataridis, 2006). Zbog svojih hidratantnih svojstava čest je sastojak u kremama i losionima namijenjenim za njegu kože, posebno u proizvodima za tretiranje stanja kao što su suha koža i ekcemi, zatim u proizvodima za zatezanje ili omekšavanje kože, smanjenje oteklina te proizvodima s hipoalergenim djelovanjem (Martin i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019; Kalli i sur., 2018). Proantocijanidini u ulju sjemenki grožđa pomažu u neutraliziranju slobodnih radikala smanjujući oksidativni stres i upalne procese te pokazuju antioksidacijsku aktivnost koja je 20 puta veća od vitamina E i 50 puta veća od aktivnosti vitamina C (Yu i Ahmedna, 2012). Istraživanja su pokazala kako

antioksidativni učinci ulja sjemenki grožđa mogu pomoći u prevenciji i liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom, uključujući kardiovaskularne bolesti i neurodegenerativne poremećaje (Zhou i sur., 2022). Nadalje, ekstrakt sjemenki grožđa zbog inhibicijske enzimske aktivnosti glukozil transferaze ima antibakterijski učinak koji osobit učinak ima na gram pozitivne bakterije. Glukozil transferaza je enzim neophodan u sintezi glukana koji je sadržan u biofilmu bakterija te djeluje bakteriostatski (Provenza i Villalba, 2010). Dakle, aktivne komponente ulja mogu inhibirati rast određenih patogenih mikroorganizama kao što su sojevi *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Dabetić i sur., 2020; Kalli i sur., 2018) što može biti korisno u razvoju antiseptičkih i antibakterijskih lijekova. Zbog specifičnog sastava masnih kiselina i visokog udjela vrijednih polifenola implementacija komponenti ovoga ulja smanjuje incidenciju ateroskleroze i koronarnih bolesti (Bail i sur., 2008).

## 2.2. KEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Prema Pravilniku Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske iz 2019. godine ulje sjemenki grožđa je ulje dobiveno iz sjemenki *Vitis vinifera* L. grožđa, gustoće 0,920 – 0,926, jednog broja 128 – 150 te broja osapunjenja 188 – 194 mg KOH kg<sup>-1</sup> ulja. Autentičnost ulja sjemenki grožđa utvrđuje se obzirom na sastav masnih kiselina te sastav i udio sterola definiranih istim Pravilnikom. Ono predstavlja alternativu tradicionalno korištenim jestivim biljnim uljima obzirom da proizvodnjom ovog ulja dolazi do iskorištenja komine, smanjenja količine otpada te stvaranja novog proizvoda i dodane vrijednosti.

Koncentracija i sastav hlapivih spojeva ulja sjemenki grožđa u izravnoj su ovisnosti o karakteristikama sorte, prethodnim vinogradarskim postupcima, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima i postupku ekstrakcije ulja (Martin i sur., 2020; Bombai i sur., 2017; Matthäus, 2008). Ulje karakterizira vinska i voćna aroma s notama grožđica i orašastim notama te specifičnost okusa (Matthäus, 2008) zbog čega se nameće kao zanimljiva alternativa konvencionalnim uljima. Ranija istraživanja također upućuju i na razlike u senzorskim karakteristikama između ulja proizvedenih od bijelih i crnih sorti grožđa, pri čemu je boja ulja sjemenki crnog grožđa slična boji djevičanskog maslinovog ulja (tamnija i izrazito zelena), dok je boja ulja sjemenki bijelog grožđa znatno svjetlije i žućkasto-zelene boje (Bjelica i sur., 2019). Također, ulja proizvedena iz grožđa crnih sorti imaju izraženiju vinsku notu te intenzivniji vinsko-orašasti okus od ulja proizvedenih od bijelih sorti grožđa koja karakterizira blaži okus i izraženija voćna aroma. Nadalje, osim sorte grožđa i tehnologija proizvodnje predstavlja važan čimbenik u definiraju senzorskih karakteristika ulja pa tako hladno prešano ulje karakterizira intenzivna boja, miris i okus, dok je rafinirano ulje neutralnog mirisa i okusa te zamjetno svjetlije boje (Bjelica, 2019). Također, metoda mikrobiološke stabilizacije/sušenja sjemenki nakon prešanja masulja definira ključnu ulogu za očuvanje kvalitete ulja, a posebice njegove arome (Bail i sur., 2008). Zanimljivo je kako ovo ulje ima neobično visoku točku dimljenja (oko 190 – 230 °C) što ga čini prikladnim za prženje na visokim temperaturama (Bail i sur., 2008).

Triacilgliceroli i masne kiseline čine oko 98 % ulja, dok ostatak čini negliceridni dio ( $\leq 2$  %) (Malićanin, 2014). Ulje sjemenki grožđa spada u biljna ulja sa visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina pa se tako sastoji u prosjeku od 90 % polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, a preostalih 10 % otpada na zasićene kiseline (Bail i sur., 2008). Najzastupljenija masna kiselina je linolna kiselina (C18:2) s udjelom 58 – 78 % (Bail i sur., 2008). Ulje sjemenki grožđa karakterizira značajno veći udio ove masne kiseline nego ulje suncokreta koje sadrži 40 – 74 % linolne kiseline (Monfreda i sur., 2012), ulje repice s 4,24 – 6,00 % (Beyzi i sur., 2019) ili masline s 11,5 – 15 % (Sakar i Gharby, 2022). Mononezasićena oleinska ili omega-9 masna kiselina (C18:1) s udjelom 3 – 15 % druga je masna kiselina po

zastupljenosti (Bail i sur., 2008). U literaturi su zabilježena značajna odstupanja u udjelu identificiranih spomenutih masnih kiselina pri čemu sorta, način uzgoja, vrijeme berbe ili metoda ekstrakcije ulja imaju važnu ulogu (Martin i sur., 2020; Bombai i sur., 2017; Matthäus, 2008).

Fitosteroli ili biljni steroli lipofilni su biološki važni spojevi s ključnom ulogom u metabolizmu kolesterola (Shinagawa i sur., 2017). Prema njihovom sastavu definiranim Pravilnikom iz 2019. godine primjenom tehnika poput plinske kromatografije moguće je odrediti autentičnost svih jestivih ulja pa tako i ovoga. Prema tamo dostupnim podacima ulje sjemenki grožđa sadrži najviše  $\beta$ -sitosterola s rasponom udjela 64,0 – 70,0 %, a slijede ga kampesterol s udjelom 7,5 – 14 % i sigmasterol čiji je detektirani raspon 7,5 – 12,0 %. Isti izvor navodi kako ulje sjemenki grožđa smije sadržavati 2000 – 7000 mg kg<sup>-1</sup> ukupnih sterola.

Tokokromanoli su skupni naziv za tokoferole i tokotrienole, a navedeni spojevi uz fitosterole čine lipofilnu frakciju ulja (Wu i sur., 2004). Tokokromanoli obuhvaćaju četiri tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol) i četiri tokotrienola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienol) te su svi sastavne komponente biološki značajnog vitamina E (Matthäus, 2008). Tokoferoli se međusobno razlikuju po položaju metilnih skupina. Tokotrienole od tokofenola razlikuje zasićenost bočnoga lanca, odnosno tri nezasićene veze u lancu (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Obje skupine spojeva mogu se pronaći u gotovo svim biljnim uljima te imaju snažno antioksidacijsko djelovanje kojim štite stanicu od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima (Ćurko i sur., 2023; Bail i sur., 2008) pri čemu tokotrienoli imaju nešto snažniji učinak (Shahidi i Zhong, 2005).  $\alpha$ -tokoferol najaktivniji je spoj u borbi protiv oksidativnog stresa u stanicama, međutim njegovo antioksidacijsko djelovanje kojim štiti ulje od oksidacijskog kvarenja je slabo (Matthäus, 2008). Literaturni podaci pokazuju kako koncentracije tokokromanola u uljima sjemenki grožđa mogu značajno varirati. Primjerice, prema istraživanju Fernandes i sur. (2013) koncentracija  $\alpha$ -tokoferola varirala je između 85,5 i 244 mg kg<sup>-1</sup>, dok se prema drugom istraživanju (Bjelica i sur., 2019) ovaj raspon kretao od 22,1 do 76,6 mg kg<sup>-1</sup>. Neovisno o različitim koncentracijama,  $\alpha$ -tokoferol je bio najzastupljeniji tokoferol, dok je  $\gamma$ -tokotrienol bio najzastupljeniji tokotrienol u ulju sjemenki grožđa (Fernandes i sur., 2013; Matthäus, 2008). Nadalje, ukupna se koncentracija tokokromanola smanjuje rafinacijom (Bjelica i sur., 2019).

Polifenolni spojevi sekundarni su biljni metaboliti koji predstavljaju hidrofilnu komponentu u ulju sjemenki grožđa te inhibiraju oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina (Al Juhaimi i Özcan, 2017). Koncentracija polifenolnih spojeva u ulju sjemenki grožđa može se usporediti s koncentracijama u ulju repice ili lana, ali je ipak niža od koncentracija karakterističnih za maslinovo ulje (Matthäus, 2008). Navedeni spojevi doprinose antioksidacijskoj aktivnosti te imaju povoljan učinak na zdravlje (Hassan i sur., 2019; Manach

i sur., 2005). Ova skupina spojeva prema svojoj strukturi dijeli se na dvije podskupine: flavonoide (antocijani, flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, proantocijanidini i tanini) i neflavonoide [fenolne kiseline (hidroksicimetna i hidroksibenzojeva), stilbeni]. U komini grožđa identificirano je mnogo fenolnih spojeva, pri čemu su od flavonoida najzastupljeniji antocijani, flavan-3-oli, flavonoli, dok su predstavnici neflavonoida hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina te stilbeni (Soto i sur., 2015). U samoj sjemenici komine i u ulju sjemenki grožđa dominiraju flavan-3-oli (Ćurko i sur., 2024; Ćurko i sur. 2023; Jackson, 2008).

U skladu sa svime prethodno navedenim, moguće je zaključiti kako ulje sjemenki grožđa sadrži nekoliko bioaktivnih antioksidativnih spojeva, uključujući fitosteroles, tokoferoles i fenolne spojeve, koji štite od oštećenja slobodnih radikala (Bail i sur., 2008). Oksidacija ulja složen je proces koji uključuje niz reakcija i rezultira stvaranjem različitih produkata razgradnje u različitim fazama. Budući da primarni oksidacijski procesi u ulju uglavnom stvaraju hidroperokside, najčešći način procjene stupnja oksidacije ulja je određivanje tzv. peroksidnog broja, no dobivene vrijednosti mogu biti pogrešno protumačene jer peroksidni broj opada pojavom sekundarnih oksidacijskih produkata. U uporabi su i druge metode, primjerice, anisidinski broj primjenu pronalazi pri određivanju opsega sekundarne faze, dok Totox vrijednost prikazuje ukupan opseg oksidacije (Midhun i sur., 2023).

Antioksidacijska aktivnost može se definirati kao sposobnost antioksidansa da spriječi lančane reakcije slobodnih radikala. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ulja predstavlja analitički izazov jer je većina metoda razvijena za hidrofilne antioksidativne spojeve u vodenom, odnosno hidrofilnom mediju (Ninfani i sur., 2001). Kemijski sastavi hidrofilnih razlikuju se od lipofilnih frakcija ulja. Na antioksidativni kapacitet može utjecati povezanost antioksidativnih komponenti, ali i njihov afinitet sa površinama zrak – ulje, zrak – voda i/ili ulje – voda (Frankel i sur., 1994). Razvijen je širok spektar metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala. Ove metode dijele se na direktne kao što su ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda i određivanja antioksidacijskog kapaciteta s  $\beta$ -karotenom te indirektno metode kao što su DPPH (2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Otpornost na oksidaciju (ili oksidativna stabilnost) posebno je važna karakteristika svakog biljnog ulja jer oksidacija ulja umanjuje nutritivnu vrijednost, doprinosi razvoju neugodnih senzorskih svojstava (okusa i mirisa), nosi zdravstvene rizike te loše djeluje na opću kvalitetu svakoga ulja. Definira se kao vrijeme potrebno da se postigne točka u kojoj se jedan oksidacijski indeks, kao što je peroksidni ili karbonilni broj, naglo poveća i uzrokuje nepoželjan okus i aromu u ulju (Bakhshabadi i sur., 2017). Prisustvo prirodnih antioksidansa



kao što su polifenolni spojevi i tokoferoli, a ponekad i masnih kiselina štiti biljna ulja od autooksidacije, užeglosti i promjena pri visokim temperaturama (Malićanin i sur., 2014). Kako bi se procijenila oksidativna stabilnost, ulje se obično izlaže visokim temperaturama u prisutnosti velikih količina zraka ili kisika (Malićanin i sur., 2014).

## **2.3. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE ULJA**

### **2.3.1. Konvencionalne metode proizvodnje ulja**

Ekstrakcija je metoda odvajanja spojeva iz otopine, suspenzije ili krutine pomoću nekog otapala u kojem je željeni spoj topljiviji. Tehnika ekstrakcije i njezini uvjeti poput temperature, tlaka, protoka otapala, veličine čestica i vremena ekstrakcije igraju ključnu ulogu u očuvanju visokokvalitetnog ulja (Sevindik i sur., 2022; Blekić i sur., 2011; Lovrić, 2003).

Ekstrakcijske metode koje se mogu primjenjivati u proizvodnji biljnih ulja su ekstrakcija otapalom, ekstrakcija na čvrstoj fazi, ekstrakcija tekuće - tekuće, ekstrakcija po Soxhletu, ubrzana ekstrakcija otapalom, ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Najčešće se ulje sjemenki grožđa ekstrahira konvencionalnim metodama - hladnim prešanjem ili organskim otapalima (Duba i Fiori, 2015). Odabir metode ekstrakcije ovisi da li je cilj kvantiteta ili kvaliteta ekstrahiranog ulja.

Ulje sjemenki grožđa koje se koristi u prehrambene svrhe najčešće se ekstrahira hladnim prešanjem (bez otapala) kako bi se očuvala njegova visoka nutritivna kvaliteta i jestivost (Dimić i sur., 2020; Kornsteiner i sur., 2006). Poznato je kako hladno prešanje rezultira nižim prinosima (Crews i sur., 2006), ali hladno prešana/djevičanska ulja, za razliku od ekstrahiranih/rafiniranih ulja visokog prinosa, imaju veći sadržaj antioksidansa i aromatsku kompleksnost s višim koncentracijama estera i alkohola (Sevindik i Selli., 2017; Bail i sur., 2008). Posljednji tržišni trendovi ukazuju na povećanja potrošnje hladno prešanih biljnih ulja zbog njihovih boljih nutritivnih svojstava koja proizvođači, ali i potrošači sve više cijene (Dimić i sur., 2020). Također, hladno prešanje ima nekoliko prednosti naspram visoke cijene dobivenih proizvoda kao što su okolišna prihvatljivost i manja potreba za korištenjem energije (Al Juhaimi i Özcan, 2017).

S druge strane, industrija (primjerice kozmetička) je zainteresirana za veće prinose ekstrakcije zbog ekonomske profitabilnosti. U konvencionalnim postupcima ekstrakcije najčešće se koriste otapala poput petroletera, heksana, kloroforma i acetona (Beres i sur., 2017) od kojih je najčešće korišten *n*-heksan. Ekstrakcija po Soxhletu predstavlja najtradicionalniju tehniku ekstrakcije pomoću otapala uz iskorištenje od 95 % (Kalli i sur., 2018; Beres i sur., 2017).

### 2.3.2. Inovativne metode proizvodnje ulja

U novije vrijeme, kako bi se povećalo iskorištenje ekstrakcije ulja te njegova kvaliteta, sve veća pozornost usmjerena je ka inovativnim metodama ekstrakcije. Ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvukom ili enzimskim predtretmanom neke su od novijih metoda ekstrakcije koje se mogu primijeniti u proizvodnji ulja sjemenki grožđa (Sevindik i Selli, 2017). Naime, ograničenja konvencionalnih metoda kao što su niski prinos, duljina vremena provođenja, velike količine utrošenog otapala te ostatci koji su toksični mogu se uspješno prevladati primjenom inovativnih metoda ekstrakcije pri sobnim ili niskim temperaturama (Dimić i sur., 2022; Martin i sur., 2020), a navedene metode mogu u potpunosti zamijeniti konvencionalne metode (poput ekstrakcije superkritičnim tekućinama) ili mogu biti primijenjene kao predtretmani konvencionalnim postupcima.

Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima omogućuje proizvodnju visokokvalitetnoga ulja. Naime, pri tlaku i temperaturi iznad svojih kritičnih vrijednosti superkritični fluid ima gustoću tekućine i viskoznost plina te pokazuje odlična ekstrakcijska svojstva. Superkritični fluidi svojim svojstvima zamjenjuju organska otapala kao što su *n*-heksan, diklormetan i kloroform. Prednost ove tehnike je postizanje selektivne ekstrakcije analita podešavanjem temperature, tlaka i polarnosti. Najučestaliji izbor je ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) zbog svoje nezapaljivosti, kemijske stabilnosti te niske toksičnosti čije je superkritične uvjete lako postići ( $T_c = 31\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_c = 7,4\text{ Pa}$ ) (Jokić i sur; 2011).

Ekstrakcija uz pomoć mikrovalova je proces u kojem se mješavina krutog uzorka i otapala zagrijava mikrovalnom energijom, a zatim se iz otapala izdvaja željeni spoj. Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju, a to su ekstrakcija u zatvorenim sustavima pri kontroliranom tlaku i temperaturi te u otvorenim sustavima pri atmosferskom tlaku. Mikrovalno zagrijavanje koristi neionizirajuće elektromagnetske valove (Sirohi i sur., 2020). Elektromagnetski valovi prodiru u materijal i pretvaraju se u toplinsku energiju koja, kada je dovoljno snažna, oštećuje stanične stijenke biljaka omogućujući ispuštanje ciljanih spojeva u otapalo. Smanjenje veličine čestica komine grožđa povećava površinski kontakt između krutih tvari komine i otapala čime se dodatno poboljšava učinkovitost ekstrakcije (Kalli i sur., 2018). Metoda se pokazala korisnom pri ekstrakciji termolabilnih spojeva poput eteričnih ulja, biološki aktivnih tvari s antioksidacijskim djelovanjem, pigmenta, pesticida, metala i nekih polimera (Cardoso-Ugarte i sur., 2013; Blekić i sur., 2011). Istraživanje Sanchez i sur. (2019) pokazalo je kako ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima utječe na povećanje prinosa ulja uljane repice kao i smanjenje vremena ekstrakcije za čak 75 % u odnosu na ekstrakciju po Soxhletu heksanom te je dobiveno ulje s višim udjelom tokoferola i kanolola.

Ekstrakcija ulja potpomognuta enzimima (EAE, engl. *enzyme-assisted extraction*) koristi se za olakšavanje procesa izdvajanja ulja iz biljnih stanica pri čemu enzimi hidroliziraju stanične strukture oslobađajući bioaktivne spojeve. Ova metoda funkcionira razgradnjom staničnih stijenki biljaka te omogućuje oslobađanje fenolnih spojeva, bilo da su vezani za stanične komponente ili da se nalaze u vakuolama odakle se oslobađaju difuzijom (Cascaes Teles i sur., 2020). Prema provedenim istraživanjima zaključeno je kako enzimski predtretman sjemenki grožđa može unaprijediti učinkovitost mehaničkog prešanja jer se uslijed enzimske hidrolize stijenke sjemenki oslobađaju vezani spojevi te se povećava prinos ulja (Beres i sur., 2017). EAE je moguće koristiti u kombinaciji s ultrazvukom, mikrovalovima ili superkritičnim fluidom, a te tehnike mogu se primijeniti za vrijeme, prije ili nakon EAE. Takva kombinacija tehnika smanjuje trajanje ekstrakcije, omogućava uporabu sigurnih, netoksičnih i nezapaljivih otapala koja su često pogodna za recikliranje te pojednostavljuje postupak i prilagodbu procesnih parametara (Gligor i sur., 2019).

### 2.3.3. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji te proizvodnji ulja

Ultrazvučna energija oblik je energije dobiven iz zvučnih valova frekvencija koje su previsoke da bi se detektirale ljudskim uhom (Jayasooriya i sur., 2004), a to su frekvencije jednake ili više od 20 kHz. Prolaskom ultrazvučnih valova kroz medij dolazi do naglog opadanja i porasta tlaka u izravnoj ovisnosti o frekvenciji ultrazvuka. Formiraju se ekspanzijski vrtlozi u kojima dolazi do nastanka i rasta mikroskopski sitnih mjehurića. Nakon što mjehurići postignu kritičnu veličinu dolazi do njihove implozije što je poznato kao pojava kavitacije (Mason, 2003). Tijekom raspada tako nastalog velikog broja kavitacijskih mjehurića lokalno se oslobađaju visoke temperature i tlakovi. Ukoliko se raspad dogodi unutar ili oko stanice mikroba stvoriti će se gradijent tlaka koji će mehanički oštetiti stanicu. Ultrazvukom se zbog agitacije otapala povećava kontaktna površina između čvrste tvari i otapala što omogućava bolje prodiranje otapala u materijal. To ujedno čini i bitnu primjenu ultrazvuka prilikom ekstrakcije organskih spojeva iz biljaka i sjemenki jer mehanički efekti ultrazvuka osiguravaju jaču penetraciju otapala u stanične materijale te time poboljšavaju prijenos mase. Najvažniji procesni parametri koji se u industrijskim ili laboratorijskim istraživanjima optimiziraju kod obrade ultrazvukom su frekvencija ( $f$ , Hz), amplituda ( $A$ , 0 – 100 %), snaga ( $P$ ,  $W$ ) ili intenzitet, ( $I$ ,  $Wm^{-2}$ ), promjer ultrazvučne sonde ( $d$ , mm), vrijeme tretiranja ( $t$ , s), distribucija ultrazvučnih valova, tlak ( $p$ , Pa), temperatura ( $T$ , °C) kao i odabir prigodnog otapala (Astráin-Redín i sur., 2019).

Postoje ultrazvuk niske i ultrazvuk visoke energije, odnosno intenziteta, a razlikuju se prema gustoći energije zvuka ( $W\ sm^{-3}$ ), snazi ( $W$ ) te intenzitetu zvučnih valova ( $Wm^{-2}$ ) (Ercan i Soysal, 2013). Ultrazvuk niskog intenziteta podrazumijeva frekvencije više od 100 kHz i intenzitete ispod  $1\ Wm^{-2}$ . Ultrazvuk visokog intenziteta podrazumijeva raspon frekvencija 20 – 100 kHz te intenzitet zvučnih valova viši od  $1\ Wm^{-2}$  (McClements, 1995). Ultrazvuk niskog intenziteta koristi se u analitičke svrhe (primjerice u prehrambenoj industriji za ispitivanja fizikalno - kemijskih svojstava hrane poput sastava, strukture, teksture i sl.) jer ne utječe na fizikalna i kemijska svojstva materijala (Jayasooriya i sur., 2004). Pri ultrazvuku niskoga intenziteta broj nastalih kavitacijskih mjehurića je mali, ali je energija povezana s njima veća. Nasuprot tomu, primjenom ultrazvuka visokog intenziteta broj kavitacijskih mjehurića je veći, ali je njihova energija manja pa je i oslobođena energija manja. Primjenom ovakve vrste ultrazvuka dolazi do fizikalnih i kemijskih promjena, a prevladavajući učinci su uglavnom kemijski (Astráin-Redín i sur., 2019).

Ultrazvučni reaktori mogu biti dizajnirani kao sonde koje se sastoje od generatora koji pretvara električnu energiju u visoku frekvenciju izmjenične struje i pretvornika koji visoku frekvenciju izmjenične struje pretvara u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitaciju (Brnčić i sur., 2009). Zbog svoje dostupnosti i prihvatljive cijene u laboratorijskim uvjetima češće se primjenjuju ultrazvučne kupelji kod kojih su elementi pretvornika smješteni na dno spremnika.

Iako se u praksi nešto rjeđe koriste one pri radu na višim frekvencijama, većina ih radi u rasponu frekvencija 20 – 40 kHz (Brnčić i sur., 2009). Standardne ultrazvučne kupelji obično rade pri nižim intenzitetima kako bi se spriječilo oštećenje stijenki spremnika koje može nastati zbog kavitacije. Također, koriste se niže akustičke snage jer se u spremnicima najčešće tretiraju veći volumeni tekućina (Brnčić i sur., 2009). Ultrazvuk ima široku primjenu u prehrambenoj industriji pa se tako koristi pri procesima ekstrakcije, sušenja, homogenizacije, sterilizacije, inaktivacije enzima, filtracije i emulgiranja (Midhun i sur., 2023).

Primjena ultrazvuka visokoga intenziteta u tehnologiji vina do sad je pokazala velike pomake u ekstrakciji bioaktivnih fenolnih i hlapivih spojeva, ubrzavanju procesa starenja vina te poboljšavanju fermentacije i sanacije bačvi (Lukić i sur., 2020; Ćurko i sur., 2017; García Martín i sur., 2013; Rastogi, 2011). Također, doprinosi inaktivaciji mikroorganizama i enzima jer jako brze lokalizirane promjene u tlaku i temperaturi uzrokuju promjene sila smicanja, kavitaciju, stanjivanje staničnih membrana, lokalizirano zagrijavanje te produkciju slobodnih radikala što ima letalan učinak na mikroorganizme (Rastogi, 2011).

Primjena različitih predtretmana, pa tako i ultrazvuka, u proizvodnji hladno prešanih ulja može utjecati na povećanje prinosa ulja i koncentraciju bioaktivnih spojeva, formiranje novih hlapivih spojeva (koji posljedično mogu utjecati na aromu hladno prešanoga ulja) kao i povećanje oksidacijske stabilnosti (McDowel i sur., 2017). Primjerice, prema istraživanju Malićanin i sur. (2014) prinos ulja dobivenog predtretmanom ultrazvukom (UZV) sličan je onome postignutome Soxhlet ekstrakcijom koju karakterizira visoko iskorištenje. Nadalje, u istraživanju na sjemenkama moringe, ultrazvučni predtretman intenziteta 50 W i trajanja 1 h povećao je prinos ulja za 1,24 % u usporedbi s kontrolnim uzorcima koji nisu bili tretirani ultrazvukom (Kayanan i Sagum, 2021). Također, prema istome istraživanju predtretman ultrazvukom rezultiralo je bržom ekstrakcijom u odnosu na kontrolni uzorak. Nadalje, ranija istraživanja pokazala su kako snaga ultrazvuka ima izravan i bitan utjecaj na prinos pri čemu je zaključeno kako povećanje ultrazvučne snage izravno rezultira većim prinosom ulja (Malićanin i sur., 2014). Naime, ultrazvuk može utjecati na promjenu strukture sjemena pa je zadržavanje ulja smanjeno te se ono lakše ekstrahira. Na važnost odabira adekvatnih parametara ultrazvuka u svom istraživanju ukazali su i McDowel i sur. (2017). Naime, navedeni autori proveli su istraživanje u kojem su ultrazvučnom sondom tretirali sjemenke uljane repice pri amplitudama 20 i 100 % uređajem snage 1 kW tijekom 10 min. Dobiveni rezultati pokazali su kako pri navedenim uvjetima nije došlo do promjene u sastavu fenolnih spojeva u ulju, ukazujući na potrebu za daljnjom modifikacijom vremena tretiranja ili snage s ciljem povećanja učinkovitosti navedenog predtretmana kod sjemenki uljane repice.

Nadalje, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom utječe na povećanje ekstrakcije različitih bioaktivnih tvari pri čemu je osigurana zdravstvena, odnosno mikrobiološka ispravnost gotovih proizvoda uz produžen rok trajanja (Midhun i sur., 2023). Primjerice, Kayanan i Sagum (2021) pokazali su da je ultrazvučni predtretman doveo do povećanja udjela fitosterola u ulju sjemenki moringe što je rezultiralo i poboljšanom oksidativnom stabilnošću ekstrahiranog ulja. Jiménez i sur. (2007) naveli su da primjena ultrazvuka može povećati sadržaj tokoferola, klorofila i karotenoida u ekstrahiranom maslinovom ulju, dok su Corrales i sur. (2008) zaključili kako je primjenom ultrazvuka snage 35 kHz kroz 1 h kao predtretmana toplinskoj obradi nusproizvoda grožđa povećao udio ukupnih fenola za 50 % u odnosu na kontrolni uzorak. Istim je istraživanjem zaključeno kako je provedeni predtretman uzrokovao dva puta veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak. U drugoj studiji, predtretman sjemenki konoplje ultrazvukom (20 kHz, 200 W) značajno je smanjio antioksidacijski kapacitet ulja za 57, 25 i 26 % nakon prethodne obrade sjemenki ultrazvučnim valovima u trajanju od 10, 20 i 40 min (Da Porto i sur., 2015). Zdanowska i sur. (2019) došli su do zaključka kako je energetska učinkovitost prešanja nakon provedenog ultrazvučnog predtretmana i namakanja sjemenki uljane repice bila za 26 % veća u odnosu na kontrolni uzorak što je omogućilo nižu potrošnju energije. Utjecaj ovoga predtretmana također je zabilježen i na indeks boje ulja crnoga kima što je objašnjeno njegovim utjecajem na sastav klorofila i fosfolipida tijekom predtretmana (Moghimi i sur., 2018). Autori su naveli kako povećanje snage ultrazvuka s 30 na 90 W i vremena tretiranja s 30 na 60 min značajno povećava indeks boje ulja za 7, odnosno 19 % iz čega slijedi kako je promjena vremena ultrazvučnog tretmana imala veći utjecaj na indeks boje ulja nego promjena snage ultrazvuka.

Uslijed svega navedenog, jasno je kako ultrazvuk ima vrlo široku mogućnosti primjene. Ipak, utjecaj ultrazvuka kao predtretmana hladnom prešanju u proizvodnji ulja sjemenki grožđa ranije nije bilo istražen.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Komina sjemenke grožđa

Istraživanje je provedeno na komini sjemenke bijelog grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina iz 2023. godine berbe. Grožđe je uzgojeno u Kravarskom (Hrvatska) te potom ubrano u fazi tehnološke zrelosti. Komina sjemenke grožđa, dobivena nakon primarne prerade grožđa u vino i prešanja, ručno je odvojena od pokožice i pulpe i direktno transportirana u laboratorij gdje je skladištena na - 18 °C do kasnije uporabe.

##### 3.1.2. Kemikalije

Za analizu određivanja sastava polifenola korišteni su standardi i reagensi HPLC čistoće.

- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- (-)-epikatehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Ferulinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Galna kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- (+)-katehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Kvercetin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Metanol, HPLC čistoće J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Miricetin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Mravlja kiselina (98 - 100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- *n*-heksan, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- *p*-kumarinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin B1, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- 2-propanol, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska

### 3.1.3. Aparatura i laboratorijski pribor

- Ultrazvučna kupelj, Elmasonic P 300 H, Elma Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Njemačka
- Laboratorijska pužna preša Komet, model PR-F100, Oilpressparts GmbH & Co. KG, Niederkrüchten, Njemačka
- UPLC uređaj (Agilent Technologies 1290 Infinity II LC System, Agilent, Santa Clara, CA, SAD) opremljen s DAD detektorom (model G7117A, Serial No. DEAEJ02807), modulom pumpe (model G7104A, Serial No. DEBAX04463), autosemplerom (model G7129B, Serial No. DEBA906617), modulom za kontrolu temperature (model G7116B, Serial No. DEBAZ07584)
- Kolona za UPLC/HPLC Gemini C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Analitička vaga, Metler Toledo (± 0,0001 g), Columbus, OH, SAD
- Laboratorijske vaga, Sartorius GP 4102, Zaprešić, Hrvatska
- Centrifuga, Hettich EBA 20 centrifuge, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Sušionik, Instrumentaria Zagreb, Hrvatska
- Vortex, Benchmark Scientific, BenchMixer V2, Taiwan
- Mikropipete volumena 100 i 1000 µl, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Laboratorijski termometar, Inkolab, Zagreb, Hrvatska
- Aluminijska folija
- Metalno sito
- HPLC bočice
- Laboratorijske boce štrcaljke
- Laboratorijske čaše volumena 250 i 400 mL
- Epruvete
- Lijeenci
- Nastavci za pipete i mikropipete
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ultrazvučni predtretman sjemenki komine grožđa

Odvagano je 1200 g sjemenki komine grožđa sorte Graševina koje su neposredno prije ultrazvučnog predtretmana tretirane suhim ledom u omjeru 2:1. Nadalje, po 50 g ovako tretiranih sjemenki odvagano je u svaku od osam čašu, koje su potom smještene u ultrazvučnu kupelj (UZV) (slika 1). U svaku čašu potom je dodano 300 mL destilirane vode nakon čega su sjemenke komine grožđa tretirane različitim frekvencijama (80 i 37 kHz) kroz različito vrijeme (30 i 90 min) (tablica 1). Nakon provedenih predtretmana sjemenke su osušene te je provedeno hladno prešanje. Kontrolni uzorak bio je uzorak prethodno netretiran ultrazvukom (HP).



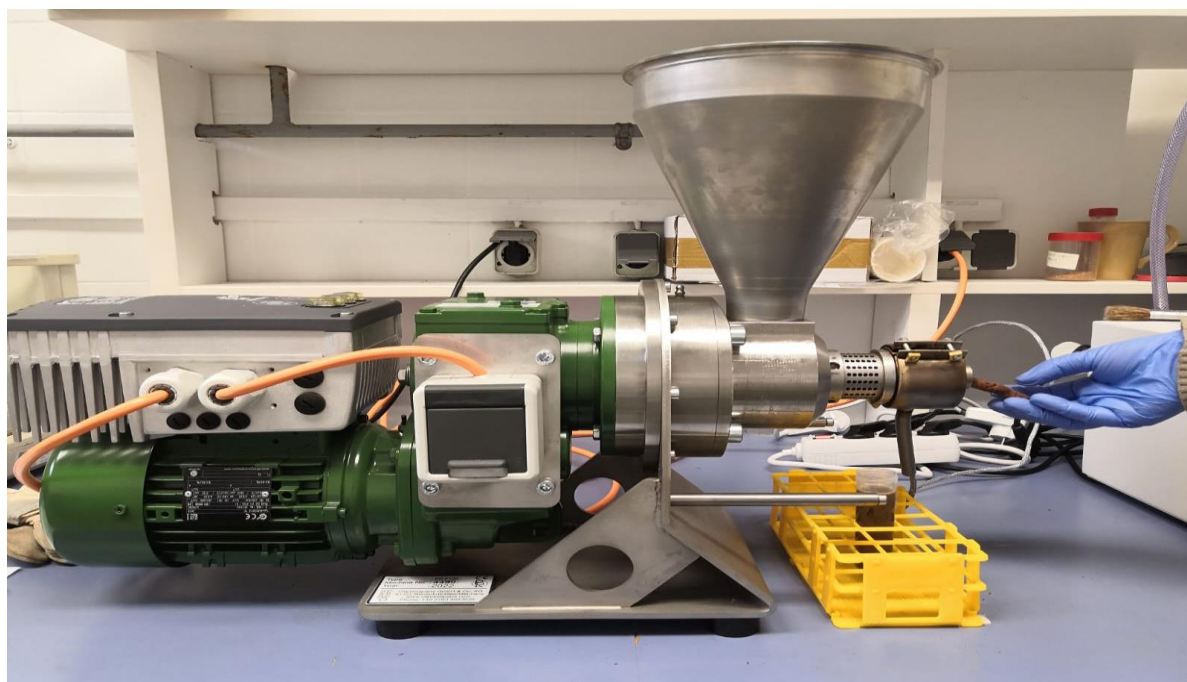
**Slika 1.** Predtretman sjemenki u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic P, (*vlastita fotografija, 2024*)

**Tablica 1.** Popis tretiranih uzoraka i parametri pretretmana ultrazvukom (UZV) (frekvencija i vrijeme tretiranja)

Naziv uzorka	Frekvencija (kHz)	Vrijeme tretiranja (min)
UZV1_30	80	30
UZV1_90	80	90
UZV2_30	37	30
UZV2_90	37	90

### 3.2.2. Hladno prešanje sjemenki grožđa

Sjemenke su prvo osušene u sušioniku s ventilacijom (35 °C, 24 h) kako bi se postigao optimalni udio vlage od 8 %, nakon čega su prešane bez mljevenja ili kondicioniranja (Cecchi i sur., 2019). Hladno prešano ulje sjemenki grožđa proizvedeno je pomoću laboratorijske preše Komet PR-F100 (Oilpressparts GmbH & Co. KG, Niederkrüchten, Njemačka) (slika 2).



**Slika 2.** Prešanje sjemenki komine grožđa pomoću laboratorijske pužne preše (*vlastita fotografija, 2024*)

U svakom ciklusu ekstrakcije prešano je 1 kg sjemenki, a ekstrakcija je provedena u tri ponavljanja. Dobiveni uzorci nakon prešanja centrifugirani su pri 5000 rpm tijekom 10 min, nakon čega je ulje pohranjeno u tamnim staklenim bocama pod dušikom na - 18 °C do daljnje analize.

### 3.2.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva ulja sjemenki grožđa

Ekstrakcije hidrofilne polifenolne frakcije ulja provedena je prema metodi Bail i sur. (2008). U epruvetu je odvagano 6 g ulja koje je potom otopljeno u 10 mL *n*-heksana. Ekstrakcija je dalje provedena s 12 mL otopine metanol:voda (80:20 v/v) uz primjenu *vorteks* miješanja tijekom 4 min. Navedeni postupak proveden je u 3 navrata na način da je hidrofilna polifenolna frakcija (donja frakcija) nakon ekstrakcije odvojena centrifugiranjem pri 5000 o min<sup>-1</sup> tijekom 5 min nakon čega je u nju dodano ekstrakcijsko otapalo. Tri dobivene hidrofilne polifenolne frakcije objedinjene su te dalje uparene do suhog pod sniženim tlakom i temperaturi od 35 °C. Upareni polifenolni ekstrakt rekonstruiran je u 700 µL metanola i dalje analiziran primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti.

### 3.2.4. Određivanje sastava pojedinačnih polifenolnih spojeva (neflavonoida i flavonoida) u ulju sjemenki grožđa primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Analiza polifenolnog sastava u hidrofilnom ekstraktu ulja sjemenki grožđa provedena je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC) na Agilent Technologies 1290 Infinity II LC uređaju (Santa Clara, CA, SAD) opremljenim s DAD detektorom (model G7117A). Provedena je analiza neflavonoida (galna kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina) i flavonoida [(+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin dimer B1, kvercetin i miricetin]. Injektirani volumen uzoraka bio je 20 µL, a razdvajanje je provedeno na Phenomenex Gemini C18 koloni (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD), pri čemu je korištena 3 % mravlja kiselina kao mobilna faza A te 100 % metanol kao mobilna faza B pri protoku 1 mL min<sup>-1</sup>, prema metodi opisanoj u radu (Lukić i sur., 2020). Uvjeti HPLC analize te gradijent mobilnih faza korišten za razdvajanje polifenolnih spojeva prikazani su redom u tablicama 2 i 3.

**Tablica 2.** Parametri UPLC - DAD metode za određivanje sastava neflavonoida i flavonoida u hidrofilnom ekstraktu ulja sjemenki grožđa

<b>Kolona</b>	C18 Phenomenex Gemini (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
<b>Detektor</b>	DAD detektor
<b>Temperatura detektora</b>	25 °C
<b>Volumen injektiranja</b>	20 μL
<b>Protok</b>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Vrijeme trajanja</b>	70 min

**Tablica 3.** Gradijent mobilnih faza korišten za razdvajanje neflavonoida i flavonoida u hidrofilnom ekstraktu ulja sjemenki grožđa primjenom UPLC-DAD metode

<b>Vrijeme t (min)</b>	<b>Mobilna faza A (%)</b>	<b>Mobilna faza B (%)</b>	<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>
0	98	2	1
15	75	25	1
25	70	30	1
33	68	32	1
40	60	40	1
50	50	50	1
65	50	50	1
68	98	2	1
70	98	2	1

Detekcija i identifikacija polifenolnih spojeva provedena je na sljedećim valnim duljinama: 280 nm [galna kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, (+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin dimer B1], 320 nm (*p*-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina) i 360 nm (kvercetin i miricetin). Identifikacija polifenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva s vremenima zadržavanja gore navedenih standarda. Koncentracije polifenolnih spojeva (neflavonoida i flavonoida) u polifenolnim ekstraktima ulja određene su pomoću kalibracijskih krivulja metodom vanjskog standarda pri valnim duljinama maksimalne

apsorbancije (280, 320 i 360 nm). Analiza svakog uzorka provedena je u triplikatu. Rezultati su izraženi u  $\mu\text{g kg}^{-1}$  uzorka ulja.

### 3.2.5. Obrada podataka

Statistička analiza analitičkih podataka u ovome je radu provedena analizom varijance (ANOVA) korištenjem softvera Statistica v.10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, SAD). ANOVA je provedena na svim nezavisnim varijablama (rezultatima koncentracije neflavonoida i flavonoida). Tukey HSD test korišten je kao usporedni test kada su uzorci bili značajno različiti nakon ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

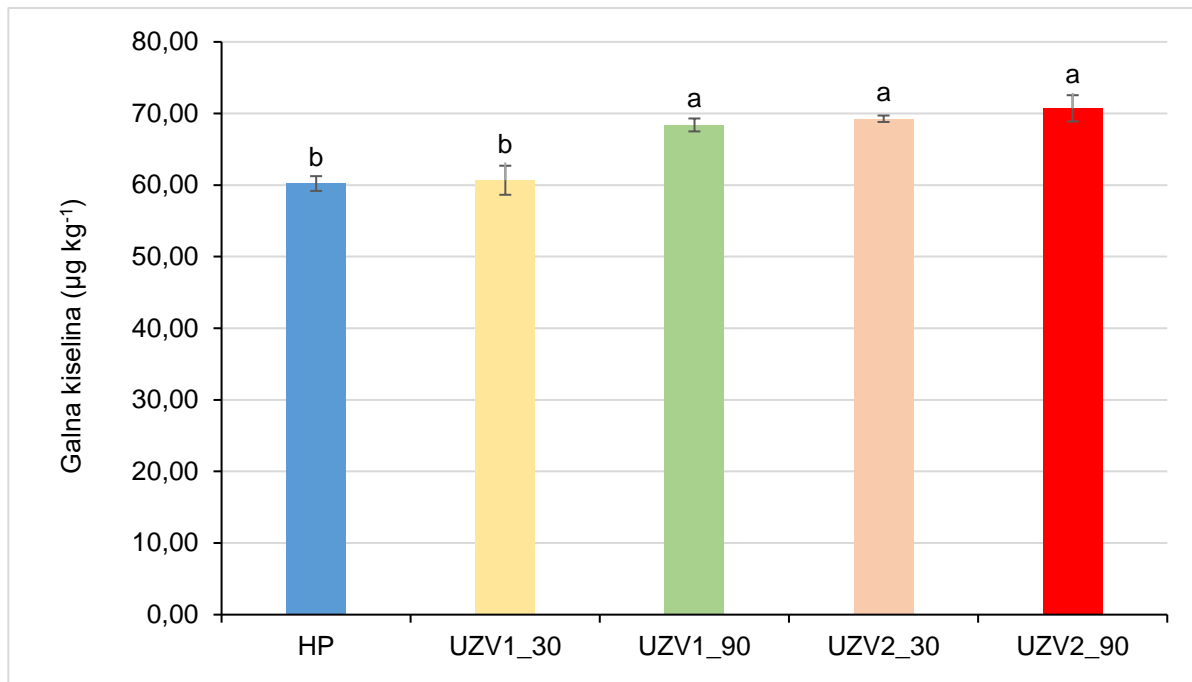
Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinke ultrazvučnog predtretmana sjemenki komine bijeloga grožđa sorte Graševina (*Vitis vinifera* L.) na polifenolni sastav hladno prešanog ulja navedene sorte. Kako bi su utvrdio utjecaj frekvencija i trajanja ultrazvučnog tretmana, ultrazvučni predtretmani obuhvatili su primjenu frekvencije 80 kHz te 37 kHz tijekom 30 i 90 min. Analiza sastava i koncentracije neflavonoida i flavonoida u tretiranim uzorcima, kao i kontrolnom (netretiranom) uzorku, provedena je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC-DAD), a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 3 - 13.

### 4.1. UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU NEFLAVONOIDA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Analiza neflavonoida u ovom istraživanju obuhvatila je analizu sastava hidroksibenzojevih kiselina (galne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline), hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinske kiseline i ferulinske kiseline) te ukupnih neflavonoida.

Utjecaj ultrazvučnog predtretmana na koncentraciju galne kiseline u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je na slici 3. Dobiveni rezultati bili su u skladu s ranije provedenim istraživanjima na navedenoj sorti prema kojima je koncentracija galne kiseline u hladno prešanom ulju varirala od 147,3 do 285,4 mg kg<sup>-1</sup> (Ćurko i sur. 2024; Ćurko i sur. 2023), kao i u istraživanjima provedenim na ulju sjemenki grožđa drugih sorti (Bjelica i sur., 2019; Cecchi i sur. 2019).

Iz trendova prikazanih na slici 3 vidljivo je kako su i frekvencija tretiranja i duljina tretiranja komine sjemenke grožđa imale značajnu ulogu na ekstrakciju galne kiseline. Naime, svi uzorci tretirani frekvencijom 37 kHz (UZV2\_30 te UZV2\_90) pokazali su značajno veće koncentracije od kontrolnog uzorka (HP). Identičan trend uočen je i za uzorak tretiran frekvencijom od 80 kHz tijekom 90 min (UZV1\_90). S druge strane, primjena više frekvencije (80 kHz) i kraćeg vremena tretiranja (30 min) nije rezultirala značajno većom koncentracijom u odnosu na kontrolni HP uzorak (netretiran ultrazvukom). Također, između uzorka UZV1\_90, UZV2\_30 te UZV2\_90 nisu utvrđene značajne razlike, pokazujući kako je, u slučaju galne kiseline predtretman ultrazvukom od 80 kHz tijekom 90 min imao identičan utjecaj kao i predtretmani od 37 kHz tijekom 30 i 90 min.

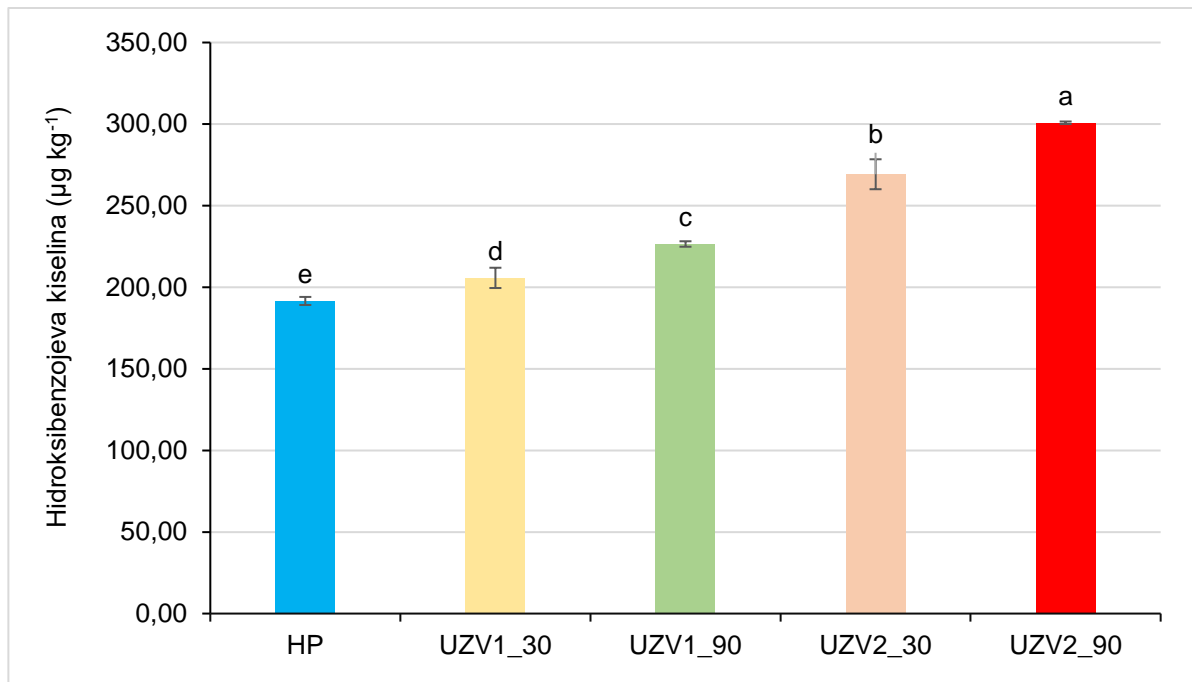


**Slika 3.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju galne kiseline u ulju sjemenki grožđa

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

Ranije istraživanje Novak i sur. (2008) pokazalo je kako je produljenje vremena tretiranja ultrazvukom utjecalo na povećanje ekstrakcije polifenolnih spojeva, dok je najveći prinos ekstrakcije dobiven kod duljine ultrazvučnog tretmana u rasponu 45 – 90 min, što je u skladu s prikazanim rezultatima. Također, odabir adekvatnih parametara sonifikacije ključan je kako bi se očuvala kvaliteta tretiranog proizvoda.

Rezultati utjecaja ultrazvučnog predtretmana sjemenki komine grožđa na koncentraciju hidroksibenzojeve kiseline prikazani su na slici 4. U skladu s ranijim istraživanjima, hidroksibenzojeva kiselina bila je i najzastupljenija fenolna kiselina u analiziranim uzorcima ulja (Ćurko i sur., 2023), a navedeni spoj pokazao je izuzetnu osjetljivost na djelovanje ultrazvuka. Naime, u svim uzorcima predtretiranim ultrazvukom (UZV1\_30, UZV1\_90, UZV2\_30 te UZV2\_90) utvrđene su značajno veće koncentracije hidroksibenzojeve kiseline upućujući na važnost kako frekvencije, tako i duljine ultrazvučnog predtretmana. U uzorku UZV1\_90 utvrđene su značajno veće koncentracije od onih u uzorku UZV1\_30, a identičan trend može se uočiti i između uzoraka UZV2\_90 i UZV2\_30. Drugim riječima, povećanje duljine tretiranja s 30 na 90 min i kod frekvencije od 80 kHz te 37 kHz značajno je utjecalo na povećanje koncentracije hidroksibenzojeve kiseline. Također, značajno više koncentracije ove fenolne kiseline ekstrahirane su u uzorcima predtretiranim ultrazvukom niže frekvencije (37



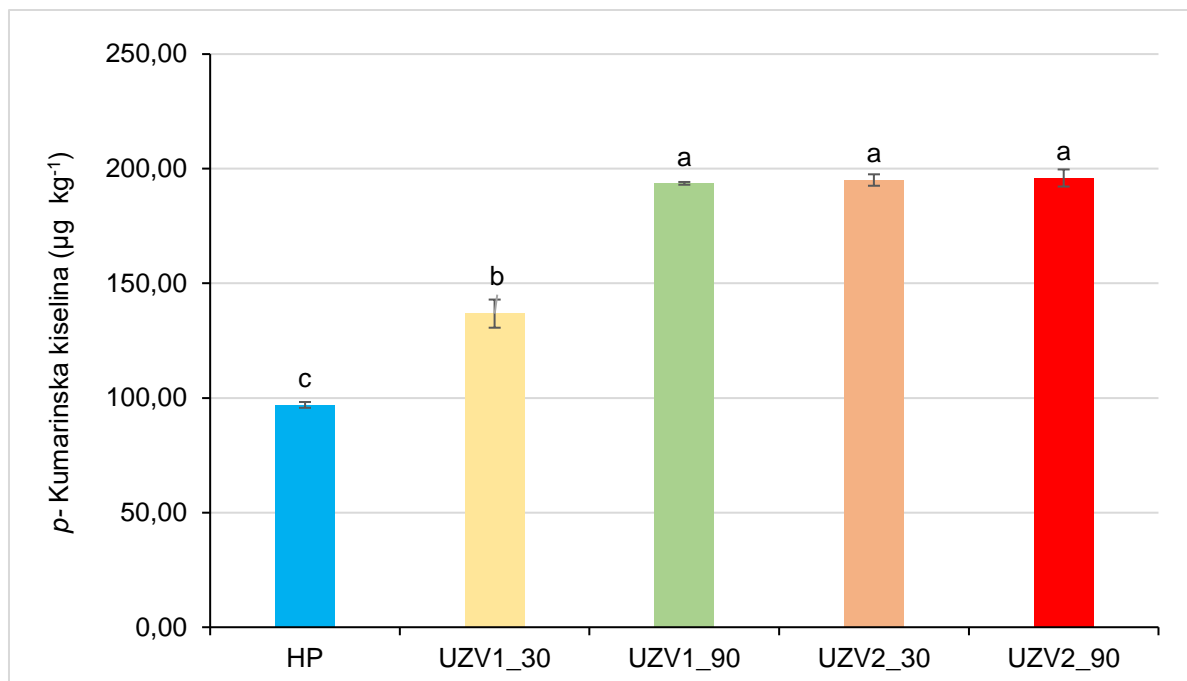
**Slika 4.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju hidroksibenzojeve kiseline u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

kHz) od onih više frekvencije (80 kHz), pri čemu su najviše koncentracije utvrđene u uzorku predtretiranom 90 min (UZV2\_90).

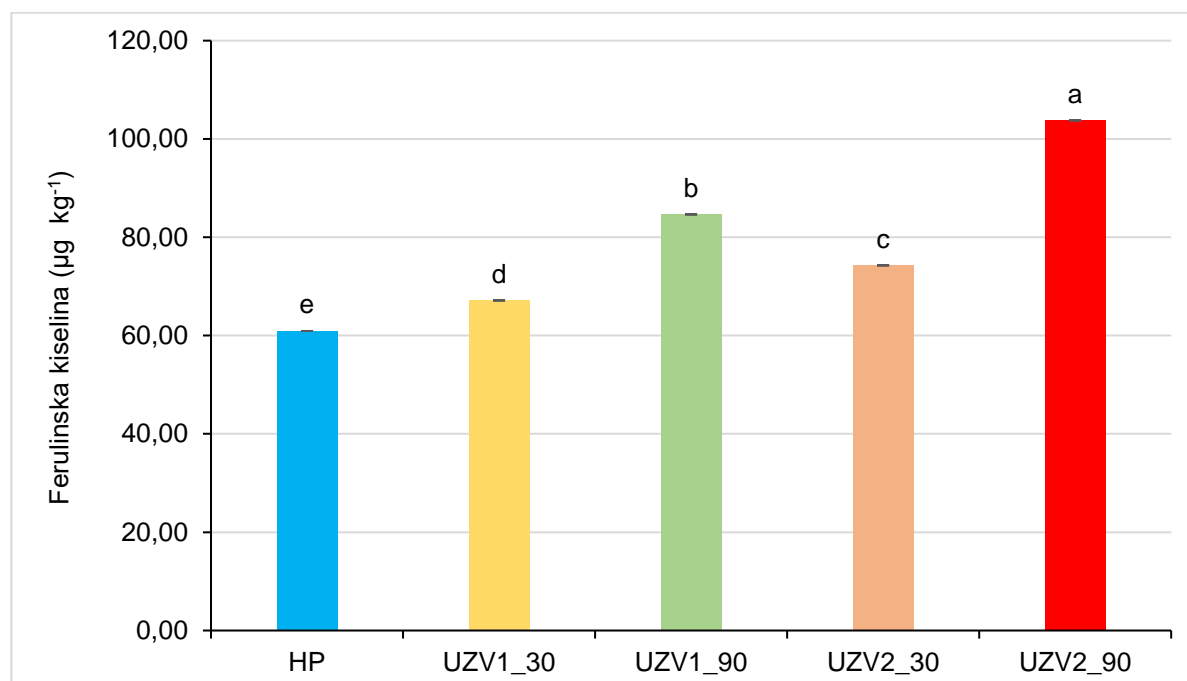
Nadalje, u skladu s ranijim istraživanjima (Ćurko i sur., 2024) *p*-kumarinska kiselina bila je druga najzastupljenija fenolna kiselina u analiziranim uzorcima hladno prešanog ulja sorte Graševina (slika 5). Svi uzorci predtretirani ultrazvukom (UZV1\_30, UZV1\_90, UZV2\_30 te UZV2\_90) pokazali su značajno veće koncentracije *p*-kumarinske kiseline u odnosu na kontrolni uzorak (HP). Međutim, slično kako je ranije zabilježeno kod galne kiseline, između uzoraka UZV1\_90, UZV2\_30 te UZV2\_90 nisu utvrđene značajne razlike pokazujući kako je, u slučaju galne kiseline, predtretman ultrazvukom od 80 kHz tijekom 90 min imao identičan utjecaj kao i predtretmani od 37 kHz tijekom 30 i 90 min. S druge strane, za razliku od galne kiseline, predtretman ultrazvukom od 80 kHz tijekom 30 min rezultirao je značajno većim koncentracijama *p*-kumarinske kiseline u odnosu na kontrolni uzorak.

Utjecaj ultrazvučnog predtretmana na koncentraciju ferulinske kiseline u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je na slici 6. Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima provedenim na navedenoj sorti, prema kojima je koncentracija navedene fenolne kiseline u hladno prešanom ulju varirala od 84,7 do 159,2 mg kg<sup>-1</sup> (Ćurko i sur. 2024; Ćurko i sur. 2023). Parametri ultrazvučnog predtretmana značajno su utjecali i na





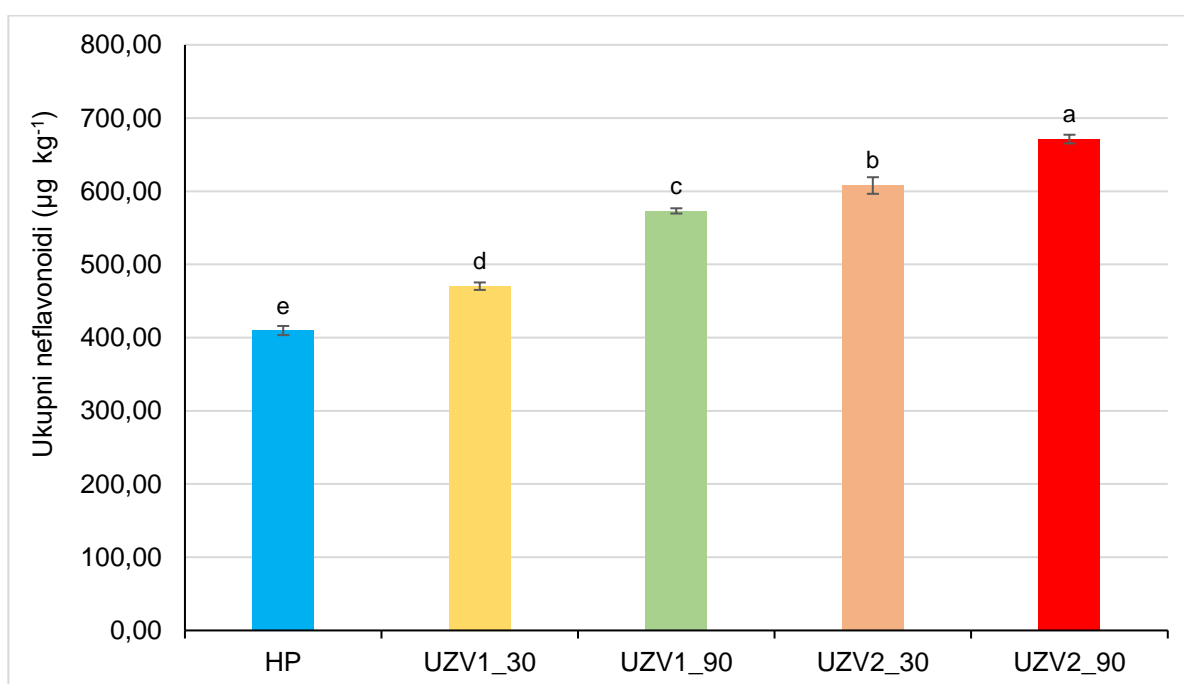
**Slika 5.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju *p*-kumarinske kiseline u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 6.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju ferulinske kiseline u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

koncentraciju ferulinske kiseline. Značajno veće koncentracije ove fenolne kiseline analizirane se u uzorku UZV1\_90 nego uzorku UZV1\_30 te u uzorku UZV2\_90 nego uzorku UZV2\_30. Dobiveni trendovi mogu se usporediti s onima ranije uočenim u koncentraciji hidroksibenzojeve kiseline, obzirom da je povećanje duljine tretiranja s 30 na 90 min i kod frekvencije od 80 kHz te 37 kHz značajno utjecalo na povećanje koncentracije ferulinske kiseline. Međutim, za razliku od hidroksibenzojeve kiseline gdje je ultrazvučni predtretman frekvencijom od 37 kHz rezultirao značajno većim koncentracijama od predtretmana od 80 kHz, kod ferulinske kiseline koncentracije ekstrahirane nakon primjene 80 kHz tijekom 90 min bile su značajno veće od onih ekstrahiranih nakon primjene 37 kHz tijekom 30 min. Dobiveni rezultati u slučaju ferulinske kiseline upućuju na važnost duljine tretiranja i pri primjeni viših frekvencija. Ipak, najviše koncentracije ferulinske kiseline, kao i u slučaju hidroksibenzojeve kiseline, ekstrahirane su primjenom ultrazvučnog predtretmana niže frekvencije (37 kHz) i duljeg vremena tretiranja (90 min) (uzorak UZV2\_90).

Na slici 7 prikazan je utjecaj ultrazvučnog predtretmana na koncentraciju neflavonoida u hladno prešanom ulju sorte Graševina. Dobiveni rezultati upućuju na važnost kako frekvencije, tako i duljine ultrazvučnog predtretmana.



**Slika 7.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju ukupnih neflavonoida u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

Naime, svi uzorci predtretirani ultrazvukom pokazali su značajno više koncentracije neflavonoida od kontrolnog (netretiranog) uzorka. Također, trendovi uočeni između pojedinih uzoraka bili su identični onima ranije uočenim u sastavu najzastupljenije fenolne kiseline - hidroksibenzojeve kiseline. Dakle, koncentracije neflavonoida ekstrahirane nakon primjene ultrazvuka frekvencije 37 kHz bile su veće od onih dobivenih primjenom 80 kHz, dok su dulji tretmani također rezultirali značajno većom koncentracijom ekstrahiranih ukupnih neflavonoida. Nadalje, najviše koncentracije ukupnih neflavonoida analizirane su u uzorku UZV2\_90, odnosno nakon primjene niže frekvencije (37 kHz) i duljeg vremena tretiranja (90 min).

González-Centeno i sur. (2013) te Da Porto i sur. (2013) proveli su analizu polifenolnog sastava ekstrakata dobivenih iz sjemenki grožđa primjenom konvencionalne i ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (UAE). Njihovi rezultati ističu UAE kao iznimno učinkovitu metodu za izdvajanje fenolnih spojeva, s obzirom na to da su zabilježili značajno veći udio ukupnih fenola u usporedbi s konvencionalnim/tradicionalnim tehnikama ekstrakcije, no nisu primijećene i značajne razlike u koncentracijama značajnijih masnih kiselina (Da Porto i sur., 2013). Identičan trend utjecaja ultrazvučnog predtretmana na sastav masnih kiselina zabilježen je i u istraživanju Malićanin i sur. (2004), a navedeno istraživanje pokazalo je i značajan utjecaj ultrazvučnog predtretmana na povećanje koncentracije  $\alpha$ -tokoferola.

## 4.2. UTJECAJ PREDTRETMANA ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU FLAVONOIDA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

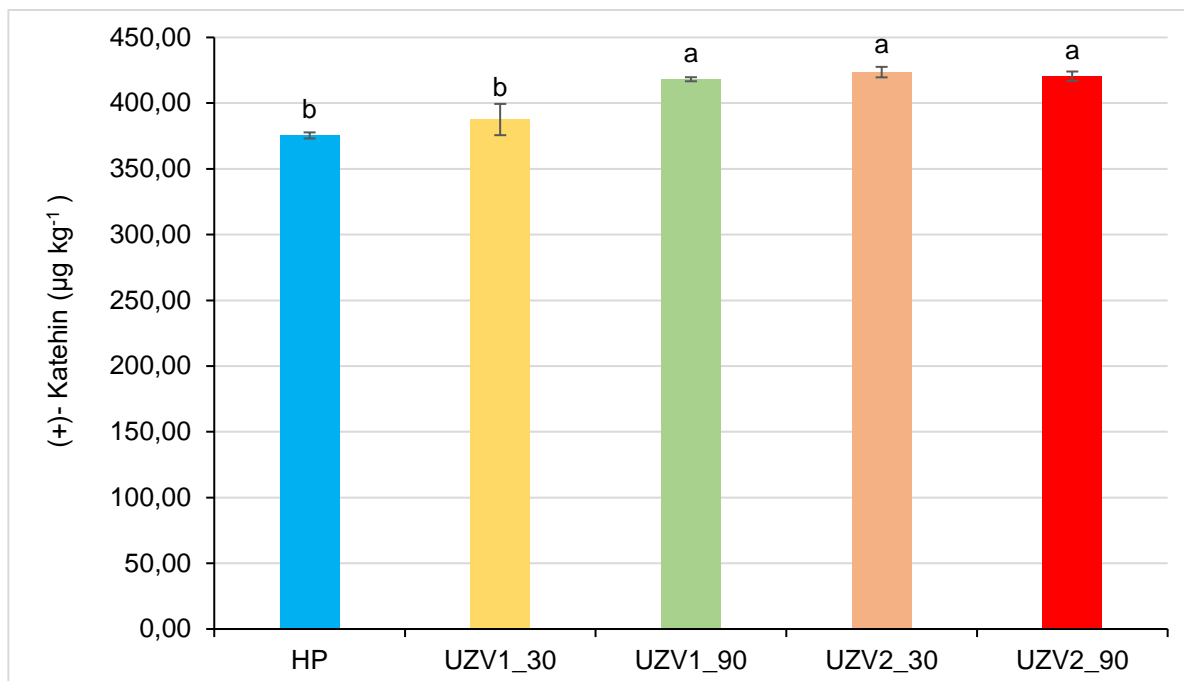
Analiza flavonoida u ovom istraživanju obuhvatila je analizu sastava flavan-3-ola [(+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin dimer B1], flavonola (kvercetin i miricetin) te ukupnih flavonoida.

Utjecaj ultrazvučnog predtretmana na koncentraciju flavan-3-ol monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je redom na slikama 8 i 9. Ranija istraživanja provedena na hladno prešanom ulju navedene sorte pokazala su zastupljenost (+)-katehina u koncentraciji 637,3 – 1000,0 mg kg<sup>-1</sup>, a (-)-epikatehina 200,2 – 428,5 mg kg<sup>-1</sup> (Ćurko i sur., 2024; Ćurko i sur., 2023), što je u suglasnosti s dobivenim rezultatima (slike 8 i 9). Također, sličan profil flavan-3-ol monomera utvrđen je i u uljima sjemenki različitih sorti grožđa, pri čemu su najviše koncentracije navedenih spojeva analizirane upravo u hladno prešanim uljima (Cecchi i sur., 2019; Garavaglia i sur., 2016).

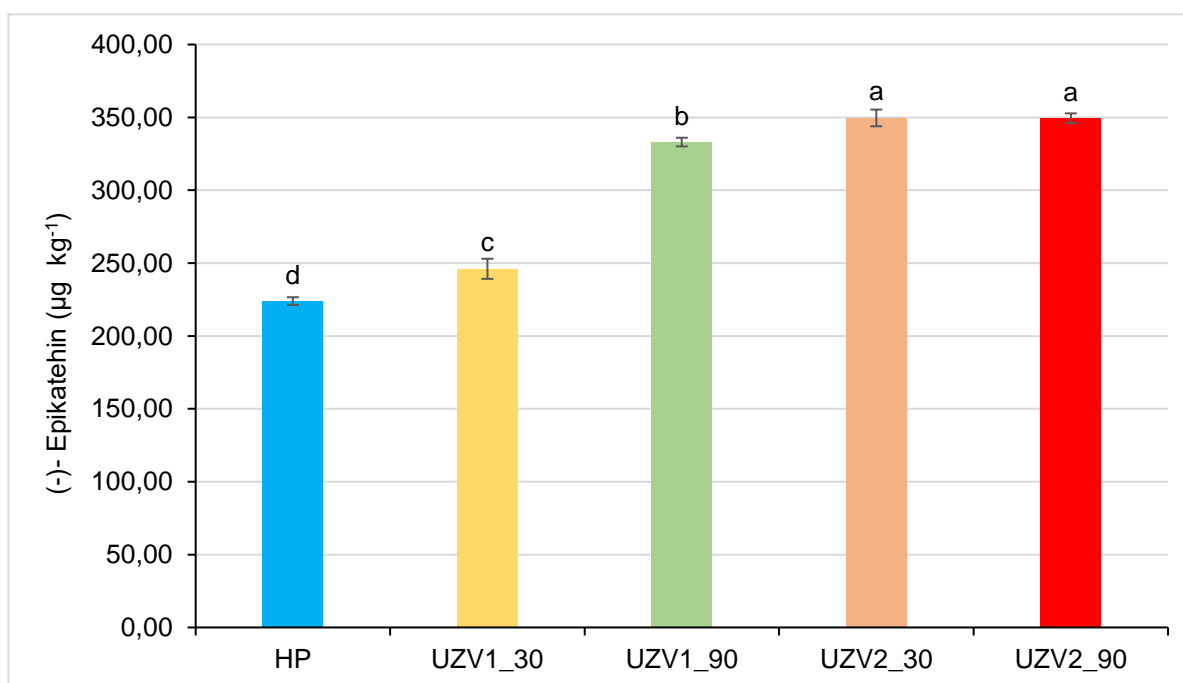
Rezultati prikazani na slici 8 pokazuju kako primjena ultrazvuka frekvencije 80 kHz tijekom 30 min nije utjecala na povećanje koncentracije (+)-katehina. S druge strane, povećanje duljine tretiranja (s 30 na 90 min) pri istoj frekvenciji (80 kHz) te primjena frekvencije od 37 kHz rezultirala je značajno većom koncentracijom navedenog flavan-3-ola u ulju sjemenki grožđa. Ipak, između uzoraka UZV1\_90, UZV2\_30 te UZV2\_90 nisu utvrđene značajne razlike, pokazujući kako je predtretman ultrazvukom od 80 kHz tijekom 90 min imao identičan utjecaj kao i predtretmani od 37 kHz tijekom 30 i 90 min. Identični trendovi između uzoraka ranije su zamijećeni u sastavu galne kiseline.

Nadalje, svi primijenjeni ultrazvučni predtretmani rezultirali su povećanjem koncentracije (-)-epikatehina. Produljenje vremena tretiranja s 30 na 90 min pri frekvenciji od 80 kHz pridonijelo je značajnom povećanju koncentracije (-)-epikatehina, dok navedeni trend nije zamijećen pri frekvenciji od 37 kHz. Ipak, primjena niže frekvencije (37 kHz) rezultirala je višim vrijednostima ovog flavan-3-ola.

Prikazani rezultati u skladu su s ranijem istraživanjima koja su također pokazala kako primjena ultrazvuka ili drugih inovativnih tehnika kao predtretmana u proizvodnji različitih biljnih ulja može utjecati na poboljšanje proizvodnog procesa te povećanje ekstrakcije različitih bioaktivnih komponenti (Ćurko i sur., 2023; Bakhshabadi i sur., 2017; Da Porto i sur., 2013).



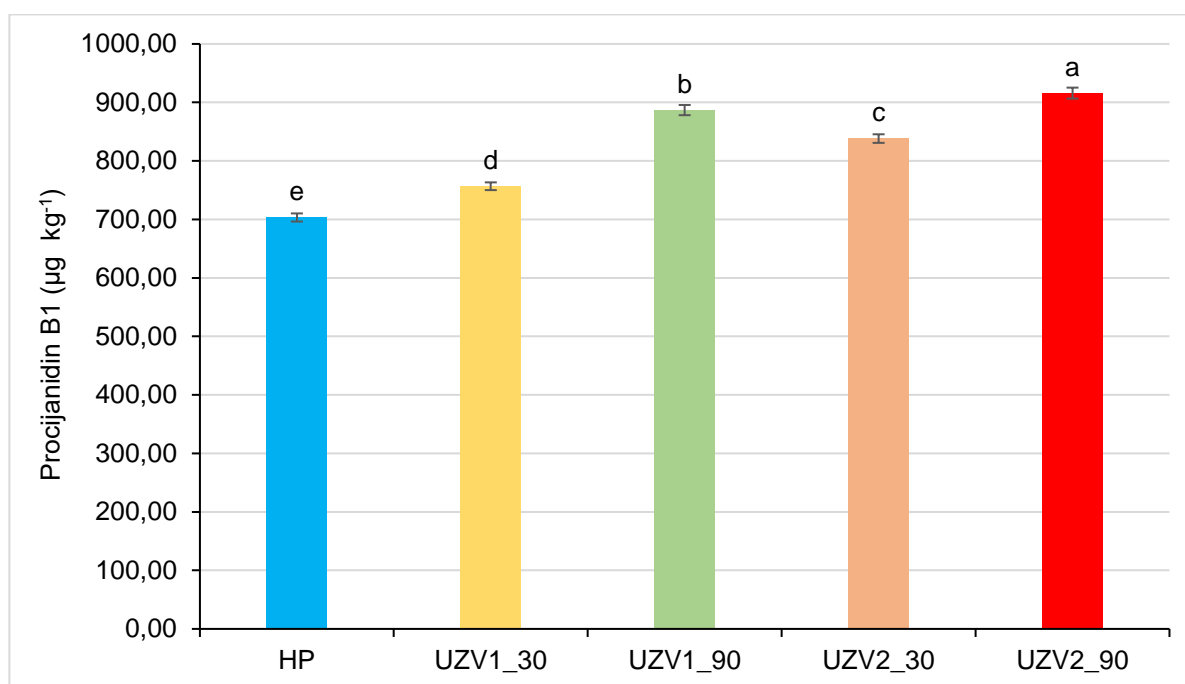
**Slika 8.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju (+)-katehina u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 9.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju (-)-epikatehina u ulju sjemenki grožđa  
ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

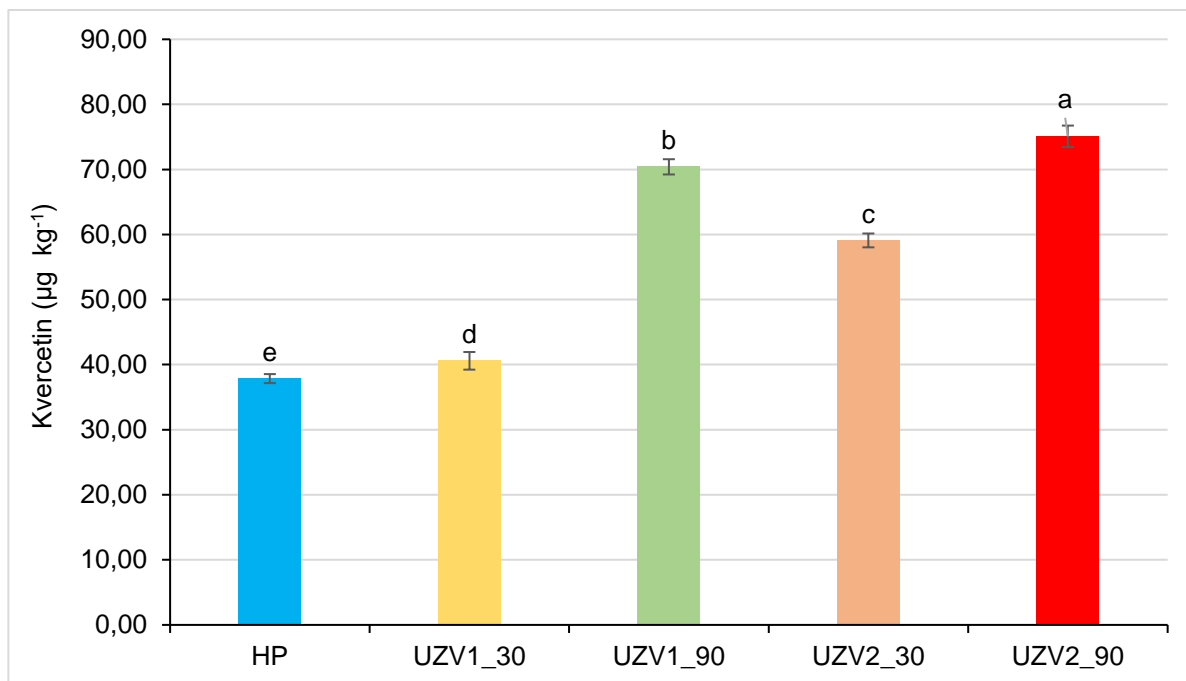
Kvantitativno najzastupljeniji polifenolni spoj u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina bio je procijanidin B1 (slika 10), a prema literaturnim podacima koncentracija ovog spoja najčešće varira od 1388,1 do 2540,1 mg kg<sup>-1</sup> (Ćurko i sur. 2024; Ćurko i sur. 2023). Parametri ultrazvučnog predtretmana značajno su utjecali i na koncentraciju procijanidina B1. Značajno veće koncentracije ovog flavan-3-ola analizirane se u uzorku UZV1\_90 nego uzorku UZV1\_30 te u uzorku UZV2\_90 nego uzorku UZV2\_30. Dobiveni trendovi mogu se usporediti s onima ranije uočenim u koncentraciji ferulinske kiseline, gdje je također produljenje vremena tretiranja kod obje frekvencije rezultiralo povećanjem koncentracije procijanidina B1 u ulju sjemenki grožđa. Također, identično kao i kod ferulinske kiseline, koncentracije ekstrahirane nakon primjene 80 kHz tijekom 90 min bile su značajno veće od onih ekstrahiranih nakon primjene 37 kHz tijekom 30 min, dok su najviše koncentracije ekstrahirane uz primjenu ultrazvučnog predtretmana niže frekvencije (37 kHz) i duljeg vremena tretiranja (90 min) (uzorak UZV2\_90).

Primjena ultrazvučnog predtretmana na sjemenkama komine grožđa sorte Graševina rezultirala je identičnim trendovima u sastavu dvaju analiziranih flavonola, kvercetina i miricetina (slike 11 i 12), komparabilnim s prethodno uočenim u sastavu procijanidina B1.



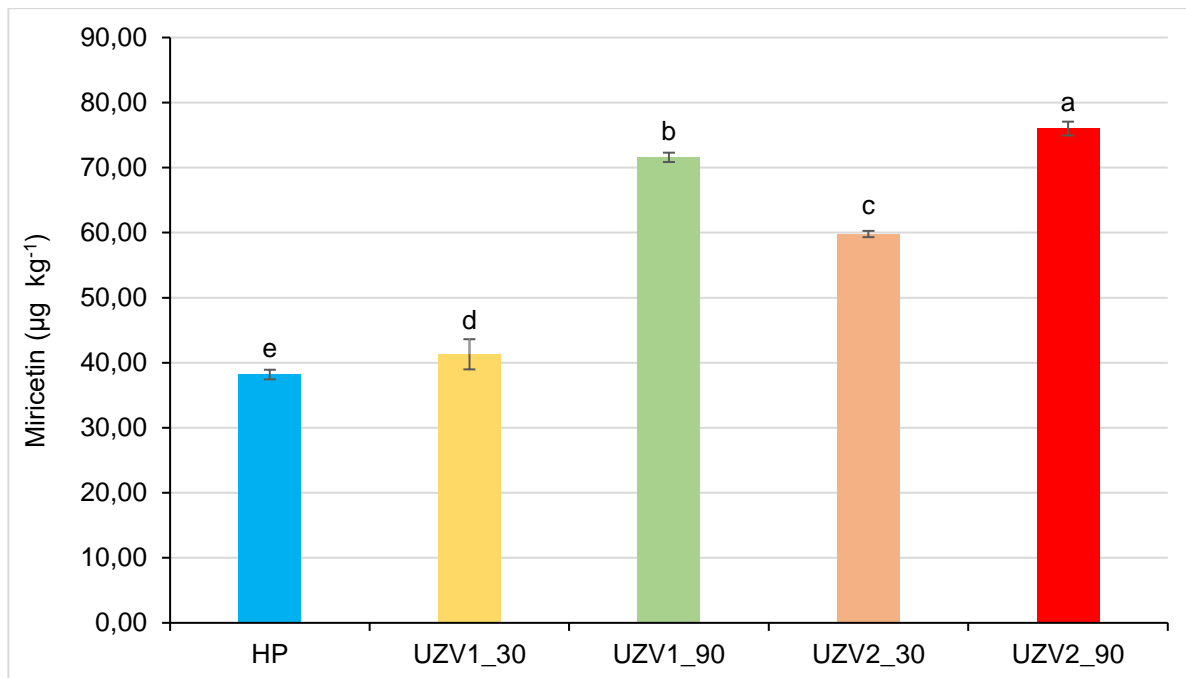
**Slika 10.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju procijanidina B1 u ulju sjemenki grožđa

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 11.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju kvercetina u ulju sjemenki grožđa

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

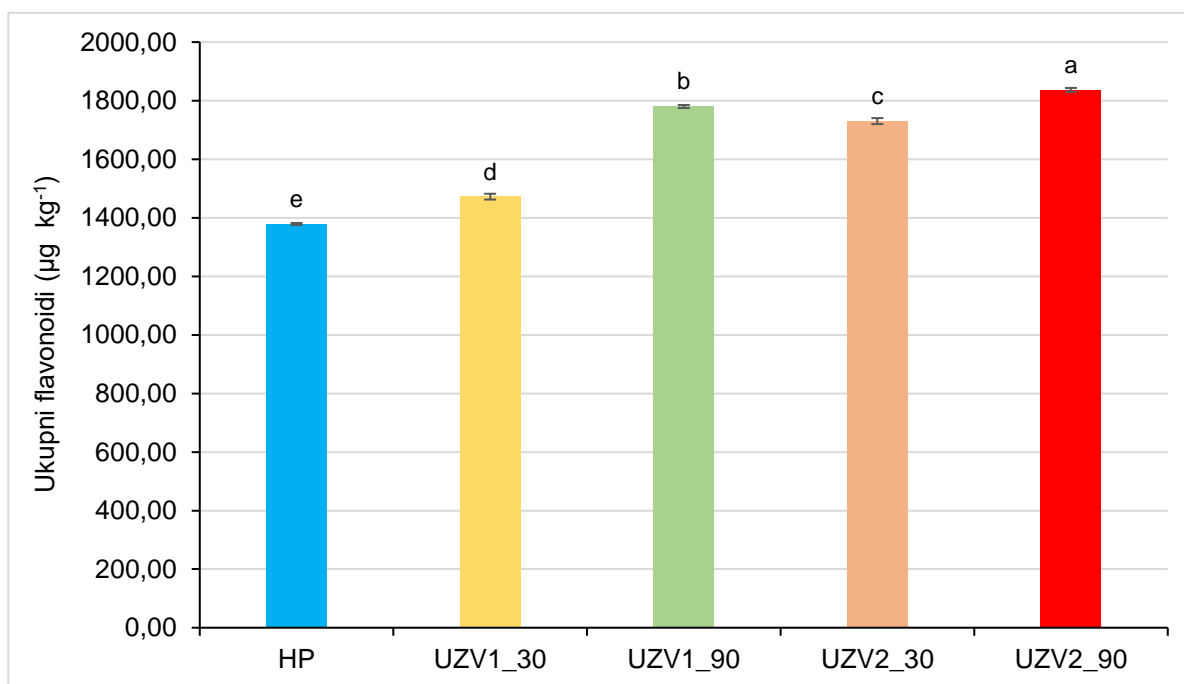


**Slika 12.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju miricetina u ulju sjemenki grožđa

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).

Naime, svi primijenjeni ultrazvučni predtretmani rezultirali su značajnim povećanjem koncentracije kvercetina i miricetina. Također, povećanje duljine tretiranja pokazalo se važnim parametrom tretiranja pri frekvenciji od 80 kHz, kao i pri frekvenciji od 37 kHz, obzirom da su u uzorcima UZV1\_90 te UZV2\_90 tretiranim 90 min utvrđene značajno veće koncentracije analiziranih flavonola u odnosu na njihove parove tretirane 30 min (UZV1\_30 te UZV2\_30). Drugim riječima, produljenje vremena tretiranja rezultira intenzivnijim promjenama strukture (membrane) materijala koji se tretira, što u konačnici povećava ekstraktibilnost različitih polifenolnih spojeva (Moghimi i sur., 2018). Ipak, kako je ranije primijećeno i u sastavu procijanidina B1, veće koncentracije oba flavonola (kvercetina i miricetina) ekstrahirane su nakon primjene niže frekvencije tijekom duljeg perioda tretiranja (37 kHz, 90 min), nego više frekvencije i kraćeg perioda tretiranja (80 kHz, 30 min). Kao i u sastavu najzastupljenijeg polifenola (procijanidina B1), najviše koncentracije kvercetina i miricetina analizirane su u uzorku tretiranom frekvencijom od 37 kHz tijekom 90 min.

Utjecaj ultrazvučnog predtretmana na koncentraciju ukupnih flavonoida u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je na slici 13, a dobiveni rezultati, kako je i ranije



**Slika 13.** Utjecaj ultrazvučnog predtretmana i hladnog prešanja na koncentraciju ukupnih flavonoida u ulju sjemenki grožđa

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih uzoraka ulja ( $p \leq 0,05$ ).



istaknuto, upućuju na važnost kako frekvencije, tako i duljine ultrazvučnog predtretmana. Naime, svi uzorci predtretirani ultrazvukom pokazali su značajno više koncentracije flavonoida od kontrolnog (netretiranog) uzorka, dok su trendovi uočeni između pojedinih uzoraka bili identični onima ranije uočenim u sastavu najzastupljenijeg flavonoida - procijanidina B1 te kvercetina i miricetina. Zaključno, najniže koncentracije ukupnih flavonoida dobivene su u uzorcima tretiranim frekvencijom od 80 kHz tijekom 30 min, dok su najviše koncentracije ekstrahirane primjenom predtretmana frekvencije 37 kHz u trajanju od 90 min.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima ranijih istraživanja gdje je također utvrđeno kako predtretman ultrazvukom može značajno utjecati na povećanje koncentracije polifenolnih/bioaktivnih spojeva različitih uljarica (Böger i sur., 2018; Roselló-Soto i sur., 2014; Malićanin i sur., 2014). Nadalje, Roselló-Soto i sur. (2014) pokazali su kako vodeni ekstrakti nusproizvoda maslinovih koštica pri unosu ultrazvučne energije od 18, odnosno 55 kJ kg<sup>-1</sup> imaju višu razinu karotenoida, klorofila (a i b) kao i antioksidacijski kapacitet u usporedbi s netretiranim uzorcima. Također, ranija istraživanja pokazala su i uspješnu primjenu ultrazvuka u kombinaciji s drugim inovativnim tehnikama za ekstrakciju bioaktivnih spojeva uljarica. Primjerice, Teh i sur. (2015) upotrijebili su predtretman pulsirajućim električnim poljem u kombinaciji s ultrazvukom za ekstrakciju polifenola iz odmašćene pogače sjemena uljane repice što je rezultiralo značajno većom koncentracijom ukupnih fenola kao i koncentracijom flavonoida u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije. Gore razmotreni primjeri pokazuju kako ultrazvuk može biti učinkovita tehnika u valorizaciji brojnih agroindustrijskih nusproizvoda i ekstrakciji različitih bioaktivnih spojeva.

## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata o utjecaju ultrazvučnih predtretmana sjemenki komine grožđa pri frekvenciji od 37 kHz i 80 kHz tijekom 30 i 90 min i hladnog prešanja na koncentracije polifenolnih spojeva [galna kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, (+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin B1, kvercetin, miricetin, ukupni neflavonoidi i ukupni flavonoidi] u ulju sjemenki grožđa Graševine možemo zaključiti sljedeće:

1. Primjena ultrazvučnog predtretmana frekvencije 37 i 80 kHz i tijekom 30 i 90 min značajno je utjecala na povećanje koncentracije ukupnih neflavonoida, ukupnih flavonoida te analiziranih pojedinačnih polifenolnih spojeva.
2. Produljenje vremena tretiranja (s 30 na 90 min) pri frekvenciji od 80 kHz značajno je utjecalo na povećanje ukupnih flavonoida i neflavonoida te svih analiziranih pojedinačnih polifenolnih spojeva.
3. Produljenje vremena tretiranja (s 30 na 90 min) pri frekvenciji od 37 kHz značajno je utjecalo na povećanje ukupnih flavonoida i neflavonoida te hidroksibenzojeve kiseline, ferulinske kiseline, procijanidina B1, kvercetina i miricetina.
4. Najmanje učinkovitim pokazao se predtretman frekvencije 80 kHz i 30 min, a najučinkovitijim predtretman frekvencije 37 kHz i 90 min tretiranja.
5. Primjena frekvencije od 37 kHz pokazala se učinkovitijom od frekvencije od 80 kHz.
6. Ultrazvučni predtretman od 37 kHz i 90 min utjecao je na značajno veće koncentracije ukupnih neflavonoida i flavonoida te hidroksibenzojeve kiseline, ferulinske kiseline, (-)-epikatehina, procijanidina B1, kvercetina i miricetina od predtretmana frekvencije 80 kHz i 90 min.

## 6. LITERATURA

Abarghuei JM, Rouzbehan Y, Alipour D (2010) The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livest Sci* **132**, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.002>

Al Juhaimi F, Özcan MM (2017) Effect of cold press and soxhlet extraction systems on fatty acid, tocopherol contents, and phenolic compounds of various grape seed oils. *J Food Process Preserv* **42**, 13417. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13417>

Arvanitoyannis IS, Ladas D, Mavromatis A (2006) Wine waste treatment methodology. *Int J Food Sci Tech* **41**, 1117–1151.

Astráin-Redín L, Ciudad-Hidalgo S, Raso J, Condón S, Cebrián G, Álvarez I (2019) Sonochemical reactions: Application of high-power ultrasound in the food industry, 2. izdanje Intechopen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90444>

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>

Bakhshabadi H, Mirzaei H, Ghodsvali A, Jafari SM, Ziiaifan AM (2017) The influence of pulsed electric fields and microwave pretreatments on some selected physicochemical properties of oil extracted from black cumin seed. *Food Sci Nutr* **6**, 111–118. <https://doi.org/10.1002/fsn3.535>

Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG i sur. (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>

Beyzi E, Gunes A, Buyukkilic Beyzi S, Konca Y (2019) Changes in fatty acid and mineral composition of rapeseed (*Brassica napus ssp. oleifera L.*) oil with seed sizes. *Ind Crop Prod* **129**, 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.064>

Bjelica M, Vujasinović V, Rabrenović B, Dimić S (2019) Some chemical characteristics and oxidative stability of cold pressed grape seed oils obtained from different winery waste. *Eur J Lipid Sci Tech* **121**, 1800416. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800416>

Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 32–47.

- Böger BR, Salviato A, Valezi DF, Di Mauro E, Georgetti SR, Kurozawa LE (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of grape-seed oil to enhance process yield and minimize free radical formation. *J Sci Food Agric* **98**, 5019–5026. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9036>
- Bombai G, Pasini F, Verardo V, Sevindik O, Di Foggia M, Tessarin P i sur. (2017) Monitoring of compositional changes during berry ripening in grape seed extracts of cv. Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *J Sci Food Agric* **97**, 3058–3064.
- Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M (2019) Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity: a review. *Int J Food Sci Tech* **54**, 933–939.
- Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karlović D, Ježek D, Vikić-Topić D, Karlović S, Bosiljkov T (2009) Applications of power ultrasound for foodstuffs processing. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr* **4**, 32–37. <https://hrcak.srce.hr/49942>.
- Bustamante MA, Pérez-Murcia MD, Paredes C, Moral R, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J (2007) Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes *Bioresource Technol.* **98**, 3269–3277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.013>
- Cardoso-Ugarte GA, Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME, López-Malo A (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *J Microw Power Electromagn Energy* **47**, 63–72. <https://doi.org/10.1080/08327823.2013.11689846>
- Carpenter R, O’Callaghan YC, O’Grady MN, Kerry JP, O’Brien NM (2006) Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant-derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *J Med Food* **9**, 187–195. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.187>
- Carpenter R, O’Grady MN, O’Callaghan YC, O’Brien NM, Kerry JP (2007) Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Sci*, **76**, 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.021>
- Cascaes Teles AS, Hidalgo Chavéz DW, Zarur Coelho MA, Rosenthal A, Fortes Gottschalk LM, Tonon RV (2020) Combination of enzyme-assisted extraction and high hydrostatic pressure for phenolic compounds recovery from grape pomace. *J Food Eng* **288**, 110128. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.11012
- Cecchi L, Innocenti M, Urciuoli S, Arlorio M, Paoli P, Mulinacci N (2019) In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. *Food Chem* **271**, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.140>
- Christ K, Burritt RL (2013) Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *J Clean Prod* **53**, 232–242 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.007>

- Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov Food Sci Emerg Technol* **9**, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>.
- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W (2006) Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J Agric Food Chem* **54**, 6261–6265. <https://doi.org/10.1021/jf060338y>
- Ćurko N, Kelšin K, Jambrak RA, Tomašević M, Gracin L, Poturica, V, Ružman E, Kovačević Ganić K (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croat J Food Sci Technol* **9**, 136–144. <https://hrcak.srce.hr/191220>
- Ćurko N, Lukić K, Jurinjak-Tušek A, Balbino S, Vukušić-Pavičić T, Tomašević M i sur. (2023) Effect of cold pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction assisted with pulsed electric fields pretreatment on grape seed oil yield, composition and antioxidant characteristics. *LWT – Food Sci Technol* **184**, 114974. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114974>
- Ćurko N, Perić K, Vukušić Pavičić T, Balbino S, Tomašević M, Iveković D i sur. (2024) Effect of pulsed electric field pretreatment on the concentration of lipophilic and hydrophilic compounds in cold-pressed grape seed oil produced from wine waste. *Foods*, **13**, 2299–2299. <https://doi.org/10.3390/foods13142299>
- Da Porto C, Da Natolino A, Decorti D (2015) Effect of ultrasound pre-treatment of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil. *J Food Sci Technol* **52**, 1748–1753.
- 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>
- Dabetić NM, Todorović VM, Đuričić ID, Antić Stanković JA, Bašić ZN, Vujović DS i sur. (2020) Grape oil seed characterization: A novel approach for oil quality assessment. *Eur J Lipid Sci Tech* **122**, 1900447. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900447>
- Dimić I, Pavlić B, Rakita S, Kljakić AC, Zeković Z, Teslić N (2022) Isolation of cherry seed oil using conventional techniques and supercritical fluid extraction. *Foods* **12**, 11 <https://doi.org/10.3390/foods12010011>

- Dimić I, Teslić N, Putnik P, Bursać Kovačević D, Zeković Z, Šojić B i sur. (2020) Innovative and conventional valorizations of grape seeds from winery by-products as sustainable source of siphophilic *antioxidants*. *Antioxidants* **9**, 568. <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>
- Duba KS, Fiori L (2015) Supercritical CO<sub>2</sub> 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**, 99-103, <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>
- Ercan SS, Soysal Ç (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Nat Sci* **5**, 5–13. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.58A2002>
- Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira JA, Ramalhosa E (2013) Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties, *Food Res Int* **50**, 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.039>
- Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem* **42**, 1054–1059.
- Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A (2016) Grape seed oil compounds: biological and chemical actions for health. *Nutr Metab Insights* **16**, 59–64. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32910>
- García Martín JF, Sun D-W (2013) Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-art research. *Trends Food Sci Technol* **33**, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.005>
- Gligor O, Mocan A, Moldovan C, Locatelli M, Crişan G, Ferreira ICFR (2019) Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol* **88**, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029>.
- González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C, Teissedre PL (2013) Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.) *J Agric Food Chem* **61**, 11579–11587. <https://doi.org/10.1021/jf403168k>
- Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS (2019) Grape pomace as a promising antimicrobial alternative in feed: A critical review. *J Agric Food Chem* **67**, 9705–9718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02861>
- Ivančić Šantek M, Miškulin E, Beluhan S, Šantek B (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u industriji*, **65** (1-2), 25–38. doi:<https://doi.org/10.15255/kui.2014.032>.

Jackson SR (2008) Wine science, principles and application, 3. izd., Elsevier Inc., London, str. 281–300.

Jayasooriya SD, Bhandari BR, Torley P, D'Arcy BR (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat. *Int J Food Prop* **7**, 301–315. <https://doi.org/10.1081/JFP-120030039>

Jiménez A, Beltrán G, Uceda M (2007) High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrason Sonochem*. **14**, 725–31. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.006>

Jokić S, Nagy B, Velić D, Bucić-Kojić A, Bilić M. (2011) Kinetic models for supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds - a review. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 39–54. <https://hrcak.srce.hr/clanak/113133>

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>

Kamal-Eldin A, Appelqvist, LÅ (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671–701. <https://doi.org/10.1007/bf02522884>.

Kayanan BUR, Sagum RS (2021) Microwave and ultrasound pretreatment of *Moringa oleifera* Lam. seeds: Effects on oil expression, oil quality, and bioactive component. *J Oleo Sci* **70**, 875–884. <https://doi.org/10.5650/jos.ess20357>

Kornsteiner M, Wagner KH, Elmadfa I (2006) Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem* **98**, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.033>

Laird DA, Brown RC, Amonette JE, Lehmann J (2009) Review of pyrolysis platform for coproducing bio-oil and biochar. *Bioprod Bioref* **3**, 547–562. <https://doi.org/10.1002/bbb.169>

Licul R, Premužić D (1993) Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo, 5. dopunjeno izdanje, Znanje, Zagreb, str. 230–243.

Lovrić T (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str. 299–305.

Lukić K, Brnčić M, Čurko N, Tomašević M, Jurinjak-Tušek A, Kovačević Ganić K (2020) Quality characteristics of white wine: The short- and long-term impact of high power ultrasound processing. *Ultrason Sonochem* **68**, 105194. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105194>

Ma ZF, Zhang H (2017) Phytochemical constituents, health benefits, and industrial applications of grape seeds: A Mini-Review. *Antioxidants* **6**, 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox6030071>

Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade LM, Kefalas P i sur. (2014) Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 989–999. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2441-2>

Manach C, Mazur A, Scalbert A (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* **16**, 77–84. <https://doi.org/10.1097/00041433-200502000-00013>.

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**, 8–17. <https://doi.org/10.3390/foods9101360>

Mason TJ (2003) Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrason Sonochem* **10**, 175–179.

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>

McClements DJ (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci Technol* **6**, 293-299.

McDowell D, Elliott CT, Koidis A (2017) Pre-processing effects on cold pressed rapeseed oil quality indicators and phenolic compounds. *Eur J Lipid Sci Technol* **119**, 1600357. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600357>.

Midhun J, Stephi D, Muthamil Selvi K, Kameshwari Y, Swatika SK, Sunil CK (2023) Effect of emerging pretreatment methods on extraction and quality of edible oils: A review. *Food Hum* **1**,1511–1522. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.10.018>.

Moghimi M, Farzaneh V, Bakhshabadi H (2018). The effect of ultrasound pretreatment on some selected physicochemical properties of black cumin (*Nigella sativa*). *Nutrire* **43**, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0077-y>.

Monfreda M, Gobbi L, Grippa A (2012) Blends of olive oil and sunflower oil: Characterisation and olive oil quantification using fatty acid composition and chemometric tools. *Food Chem* **134**, 2283–2290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.122>.

Nanni A, Parisi M, Colonna M (2021) Wine by-products as raw materials for the production of biopolymers and of natural reinforcing fillers: A critical review. *Polymers* **13**, 381. <https://doi.org/10.3390/polym13030381>

Nerantzis E, Tataridis P (2006) Integrated Enology - Utilization of winery by-products into high added value products. *J Sci Tech* **3**, 1–12.



Ninfani P, Aluigi G, Bacchiocca M, Magnani M (2001) Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc* **78**, 243–247.

Novak I, Janeiro P, Šeruga M, Oliveira-Brett AM (2008) Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* **630**, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.002>.

OIV (2023) State of the world vine and wine sector in 2023 by International Organisation of Vine and Wine (OIV). <https://www.oiv.int/sites/default/files/2024>. Pristupljeno 5. srpnja 2024.

Pravilnik (2019) Pravilnik o jestivim uljima i mastima. Narodne novine 11, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019\\_01\\_11\\_229.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_11_229.html) Pristupljeno 18. kolovoza 2024.

Provenza FD, Villalba JJ (2010) The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Res* **89**, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.035>.

Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* **100**, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.039>.

Rastogi KN (2011) Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **51**, 705–722. <https://doi.org/10.1080/10408391003770583>

Roselló-Soto E, Barba FJ, Parniakov O, Galanakis CM, Lebovka N, Grimi N, Vorobiev E (2014) High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food Bioprocess Technol* **8**, 885–894. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1456-x>.

Sakar EH, Said Gharby S (2022) Olive Oil: Extraction Technology, Chemical Composition, and Enrichment Using Natural Additives. U: Yonar T (ured.) Olive Cultivation, IntechOpen, London, str. 7–18.

Sanchez RJ, Fernández MB, Nolasco SM (2019) Canola oil with high antioxidant content obtained by combining emerging technologies: Microwave, ultrasound, and a green solvent. *Eur J Lipid Sci Technol* **121**, 1–9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900152>

Sevindik O, Selli S (2017) The extraction methods of grape seed oil. *Gida-J Food* **42**, 95–103.

- Sevindik O, Kelebek H, Rombola AD, Selli S (2022) Grape seed oil volatiles and odour activity values: a comparison with Turkish and Italian cultivars and extraction methods. *J Food Sci Technol* **59**, 1968–1981. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05212-3>
- Shahidi F, Zhong Y (2005) Bailey's Industrial Oil & Fat Products: Citrus oils and essences, 6. izd., John Wiley & Sons, New Jersey, str. 269–513.
- Shinagawa FB, de Santana FC, Araujo E, Purgatto E, Mancini-Filho J (2017) Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *J Food Sci Technol* **38**, 164–171. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.08317>
- 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>
- Song S, Lim JW, Lee JT, Cheong JC, Hoy SH, Hu Q, Tan JK, Chiam Z, Arora S, Lum TQ, Lim EY (2021) Food-waste anaerobic digestate as a fertilizer: The agronomic properties of untreated digestate and biochar-filtered digestate residue. *Waste Manag*, **136**, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.10.011>
- Soto M, Falqué E, Domínguez H (2015) Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* **2**, 259–276. <https://doi:10.3390/cosmetics2030259>
- Teh S-S, Niven BE, Alaa El-Din AB, Carne A, Birch EJ (2015) Microwave and pulsed electric field assisted extractions of polyphenols from defatted canola seed cake. *Int J Food Sci Tech* **50**, 1109–1115. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12749>.
- Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, Garcia Viguera C (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *Int J Mol Sci* **15**, 15638-15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Voća N (2008). Vinska komina kao izvor toplinske energije. *Glasnik zaštite bilja*, 31,91–99. <https://hrcak.srce.hr/163989>
- Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G i sur. (2004) Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *J Food Compos Anal* **17**, 407–422. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.03.001>
- Yu A, Ahmedna M (2012) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech* **48**, 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Zdanowska P, Drózd B, Janakowski S, Derewiaka D (2019) Impact of preliminary ultrasound treatment of rape seeds on the pressing process and selected oil characteristics. *Ind Crop Prod* **138**, 111572–111572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111572>.

Zhou DD, Li J, Xiong RG, Saimaiti A, Huang SY, Wu SX i sur. (2022) Bioactive Compounds, Health Benefits and Food Applications of Grape. *Foods* **11**, 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods11182755>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Handwritten signature of Matea Đebro in blue ink, written in a cursive style.

---

Vlastoručni potpis