

Utjecaj ekstrakcije superkričnim CO₂ na sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa

Petrić, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:144455>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023

Melita Petrić

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE
SUPERKRITIČNIM CO₂ NA
SASTAV MASNIH KISELINA U
ULJU SJEMENKE GROŽĐA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Tomašević

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“ (KK.01.1.1.07.0007) sufinanciranom od strane Europske Unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj Konkurentnost i kohezija 2014. – 2020., Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije.



Za početak želim se zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Tomašević na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti prijateljima i Ivanu koji su mi bili uz mene i bez kojih studentski dani ne bi bili ovako lijepi.

Posebno se želim se zahvaliti svojim roditeljima i bratu na neizmjernoj podršci tijekom cijelog obrazovanja.

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 EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO₂ NA SASTAV MASNIH KISELINA U ULJU
SJEMENKI GROŽĐA

Melita Petrić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210268

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj parametara ekstrakcije ulja superkričnim CO₂ (tlak 300 i 500 bara, temperatura 35, 45, 55 °C i protok CO₂ 15, 30, 45 g/min) u usporedbi s hladnim prešanjem na sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa sorte Graševina. Sastav masnih kiselina analiziran je GC-FID metodom prema ISO 5509:2000. Najzastupljenije masne kiseline u analiziranim uljima su linolna, oleinska te palmitinska kiselina. Hladno prešano ulje sadrži veći udio linolne, dok ulja ekstrahirana SC (*supercritical*) CO₂ sadrže veći udio oleinske i palmitinske kiseline. Od primijenjenih procesnih parametara SC CO₂ najznačajniji utjecaj na udio masnih kiselina su imali temperatura i protok CO₂. Također, istražen je i utjecaj skladištenja ulja sjemenki grožđa pri sobnoj (25 °C) i sniženoj temperaturi (4 °C) na stabilnost linolne kiseline te su dobiveni rezultati pokazali da se ulja mogu skladištiti i duže od 6 mjeseci jer nije došlo do značajnog smanjenja linolne kiseline.

Ključne riječi: *ulje sjemenki grožđa, sastav masnih kiselina, ekstrakcija superkričnim CO₂, stabilnost tijekom skladištenja*

Rad sadrži: 50 stranica, 19 slika, 6 tablica, 83 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Tomašević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Marina Tomašević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (zamjenski član)

Datum obrane: 20. srpnja 2023.

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

IMPACT OF SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION ON THE FATTY ACID COMPOSITION IN
GRAPE SEED OIL

Melita Petrić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210268

Abstract:

The aim of this study was to investigate the influence of supercritical CO₂ extraction parameters (pressure at 300 and 500 bar, temperature at 35, 45, 55 °C, and CO₂ flow rate at 15, 30, 45 g/min) compared to cold pressing on the fatty acid composition of Graševina grape seed oil. The fatty acid composition was analyzed by GC-FID method according to ISO 5509:2000. The most abundant fatty acids in analyzed oils were linoleic, oleic acid and palmitic acids. Cold-pressed oil contained higher content of linoleic acid, while SC CO₂-extracted oils contained a higher content of oleic and palmitic acids. Among applied SC CO₂ process parameters, temperature and CO₂ flow rate had the most significant influence on the content of fatty acids. Additionally, the influence of storage at room (25 °C) and reduced temperature (4 °C) on the stability of linoleic acid in extracted oils was investigated, and the results showed that the oils can be stored for longer period than 6 months because there was no significant reduction in linoleic acid content.

Keywords: *grape seed oil, fatty acid composition, supercritical CO₂ extraction, stability during storage*

Thesis contains: 50 pages, 19 figures, 6 tables, 83 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Marina Tomašević, PhD

Reviewers:

1. Natka Ćurko, PhD, Associate professor (president)
2. Marina Tomašević, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Marko Obranović, PhD, Associate professor (member)
4. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 20th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOMINA GROŽĐA.....	2
2.1.2. Ulje sjemenki grožđa	4
2.2.1. Masne kiseline	5
2.2.2. Steroli	7
2.2.3. Tokoferoli	8
2.2.4. Polifenolni spojevi	8
2.3.1. Hladno prešanje.....	9
2.4. STABILNOST ULJA SJEMENKI GROŽĐA TIJEKOM SKLADIŠTENJA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1 MATERIJAL	14
3.1.1. Sjemenka grožđa	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Hladno prešanje (HP)	16
3.2.2. Superkrična ekstrakcija CO ₂ (SC CO ₂)	16
3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina	17
3.2.5. Praćenje stabilnosti ulja tijekom skladištenja	18
3.2.6. Obrada podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. UTJECAJ TEHNIKE EKSTRAKCIJE ULJA NA SASTAV MASNIH KISELINA	20
4.2. PRAĆENJE STABILNOSTI ULJA TIJEKOM SKLADIŠTENJA	38
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Tijekom proizvodnje vina nastaju velike količine komine kao nusproizvoda koju ju je potrebno zbrinuti na adekvatan način, što dodatno povećava cijenu finalnog proizvoda. Zbog toga se u novije vrijeme sve više istražuju mogućnosti valorizacije ovog nusproizvoda, s ciljem pronalaska ekološki i ekonomski prihvatljivog rješenja.

Općenito, komina grožđa predstavlja izrazito vrijednu frakciju koja nastaje tijekom proizvodnje vina, a čine ju peteljke, pokožica te sjemenke. Sama frakcija sjemenki grožđa predstavlja visokovrijedan nusproizvod, ne samo kao izvor polifenolnih spojeva, prvenstveno monomernih i oligomernih procijanidina, već i ulja sjemenki grožđa te proteina. Ulje sjemenki grožđa bogat je izvor esencijalnih nezasićenih masnih kiselina (oko 90 %), posebice linolne kiseline, kao i drugih bioaktivnih spojeva s jakim antioksidativnim djelovanjem: aktivnih spojeva vitamina E (tokoferoli i tokotrienoli), fitosterola i polifenolnih spojeva. Osim toga, ulje sjemenki grožđa predstavlja vrlo zanimljivo biljno ulje, ne samo s nutritivnog, već i senzorskog aspekta zbog svoje „vinske“ i voćne arome, u kojoj dominiraju note grožđica.

Najčešći načini ekstrakcije ulja sjemenki grožđa su hladno prešanje i ekstrakcija otapalima, a s obzirom da se u zadnje vrijeme stavlja naglasak na zaštitu prirode dolazi do razmatranja novijih tehnika ekstrakcije koje uključuju primjenu netoksičnih kemikalija. Pritom se posebno ističe ugljikov dioksid (CO₂) kao superkrično otapalo, koji se smatra ekološki prihvatljivim i sigurnim za primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti utjecaj ekstrakcije superkričnim CO₂ kao zelenim otapalom na sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa, u usporedbi s hladnim prešanjem. Pritom je istražen utjecaj različitih parametara ekstrakcije: (i) tlaka (300 i 500 bara), (ii) temperature (35, 45 i 55 °C) i (iii) protoka CO₂ (15, 30 i 45 g CO₂/min). Nadalje, ovim istraživanjem je praćena i stabilnost ulja, odnosno linolne kiseline tijekom skladištenja pri sobnoj (25 °C) i sniženoj temperaturi (4 °C).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMINA GROŽĐA

Komina grožđa čini do 60 % krutog nusproizvoda u proizvodnji vina i 20-25 % prerađenog grožđa te predstavlja glavnu frakciju među nusproizvodima tijekom proizvodnje vina. Sastoji se od sjemenki (25 %), pokožice (50 %) i u nekim slučajevima peteljke (25 %) (Nanni i sur., 2017). U tablici 1 su prikazani postotci pojedinih dijelova komine ovisno o sortama grožđa. Općenito, komina može nastati tijekom prerade crnog ili bijelog grožđa, odnosno tijekom različitih tehnoloških procesa proizvodnje bijelog ili crnog vina. U slučaju proizvodnje crnog vina, komina predstavlja fermentirani otpad u kojem se nalazi malo šećera i polifenolih spojeva dok je komina grožđa nastala tijekom proizvodnje bijelog vina neprevrela i bogatija šećerima i polifenolnim spojevima (Nanni i sur., 2017). Općenito, komina grožđa sadržava 55-75 % vode, što znači da je vrlo podložna razvoju mikroorganizama. Sadrži i prehrambena vlakna (43-75 %), od kojih su najznačajniji polisaharidi stanične stijenke, odnosno celuloza, hemiceluloza, pektin i lignin. Općenito, komina crnog grožđa je bogatija vlaknima od komine bijelog grožđa. Nadalje, udio proteina u rasponu je od 6 do 15 % (suha tvar) ovisno o sorti grožđa. Aminokiselinski profil komine sličan je žitaricama jer ima visok udio glutamina i asparaginske kiseline, a manje triptofana i aminokiselina koje sadrže sumpor. Kalij, fosfor, sumpor i magnezij su najčešći minerali prisutni u komini grožđa, a osim minerala prisutne su i kalijeve soli te tartarati (4 i 14 % s. tv.), ovisno o uzgoju grožđa i fazama zrenja. Komina grožđa također je bogata i polifenolnim spojevima. Pokožica je bogata hidroksicimetnim kiselinama, a sjemenke galnom i protokatehinskom kiselinom. Od flavonoida najzastupljeniji su antocijani u komini crnog grožđa, dok su u komini bijelog grožđa najzastupljeniji flavanoli (većinom u sjemenkama). Uz polifenolnu frakciju koja se lako ekstrahira, komina grožđa sadrži i polifenole koji se ne mogu ekstrahirati (neekstrahibilni proantocijanidi) koji su najčešće vezani na vlakna. S obzirom da ta frakcija ima nisku topljivost ne ekstrahira se tijekom proizvodnje vina i zaostaje u komini grožđa (Garcia-Lomilo i Gonzalez-SanJose, 2017).

Obzirom na sve navedeno, komina grožđa ima veliki potencijal kao sastojak funkcionalne hrane. Ekstrakti komine grožđa mogu se primijeniti u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u obliku tekućih ekstrakata, praha ili koncentrata. Također, može se koristiti i kao zamjena za sintetičke antioksidanse te kao zamjena za konzervanse u mesnoj industriji (Yu i Ahmedna, 2012).

Tablica 1. Sastav komine dobivene od 5 različitih sorata grožđa (Dwyer i sur., 2014)

Sorta grožđa	Pokožica (%)	Sjemenka (%)	Peteljke (%)	USTK* (%)
Muller Thargau	90,67	7,84	1,49	72,4
Morio muškat	85,99	12,77	1,25	83,9
Merlot	83,18	14,98	1,84	22,2
Cab. Sauvignon	77,41	20,91	1,68	28,2
Pinot Noir	73,55	12,34	0,54	27,7

* ukupno otopljene krute tvari

2.1.1. Sjemenka grožđa

Sjemenke grožđa sadrže oko 28-40 % vode, 0,8-1,2 % dušičnih spojeva, 4-6 % tanina, te 2-4 % minerala (Mironeasa i sur., 2010). Sadrže još i oko 11 % proteina te 35 % vlakana. Sadržaj lipida u rasponu je od 7-20 %. Glavni polifenolni spojevi su antocijani, flavan-3-oli, flavonoli, stilbeni i fenolne kiseline. Najzastupljenije hidroskicimetne kiseline su klorogenska, kaftarinska i kafeinska kiselina. Od flavonola najvažniji su derivati kvercetina i kamferola, a cijanidin-3-glukozid je glavni predstavnik antocijana. Ekstrakti sjemenke grožđa sadrže najviše proantocijanida (procijanidin B1, procijanidin B2, procijanidin B3 i procijanidin B4) koji imaju snažno antioksidacijsko djelovanje te uz njega još i katehin, epikatehin, epikatehin galat i protokatehinsku kiselinu. Pokazalo se da ekstrakti sjemenke grožđa imaju i antitrombocitno djelovanje te su dobar izvor polifenola (Ma i Zhang, 2017).

Sjemenke grožđa mogu se koristiti kao sirovina za razvoj novih proizvoda s dodanom prehranbenom vrijednošću i potencijalnim zdravstvenim dobrobitima. Jedan od primjera su kapsule s ekstraktom sjemenki grožđa kao prehranbeni dodatak prehrani za zaštitu ljudi od oksidativnog oštećenja i za održavanje zdravlja (Zhou i sur., 2022). Ekstrakti sjemenke grožđa, primjenom modela staničnih linija, su pokazali značajno antitumorsko djelovanje na tumore pluća, debelog crijeva, dojke, mokraćnog mjehura, leukemije i prostate kroz nekoliko mehanizama (Kalli i sur., 2018). Uz ekstrakte sjemenki grožđa, važan proizvod je i brašno sjemenki grožđa zbog visokog udjela polifenola, odnosno proantocijanidina. Osim visokog sadržaja antioksidansa brašno sadrži i visok udio dijetalnih vlakana te može biti alternativni materijal za upotrebu u raznim prehranbenim proizvodima (Özvural i Vural, 2011).

2.1.2. Ulje sjemenki grožđa

Prema Pravilniku Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) ulja biljnog podrijetla označavaju proizvode dobivene iz sjemenki ili plodova biljaka, a sastoje se od triglicerida masnih kiselina te mogu sadržavati i neznatne količine drugih lipida kao što su fosfolipidi, voskovi, neosapunjive tvari, mono- i di-gliceridi i slobodne masne kiseline. Ulje sjemenki grožđa je ulje koje je dobiveno iz sjemenki grožđa (*Vitis vinifera* L.) s gustoćom 0,920-0,926; jodnim brojem 128-150; brojem osapunjenja (mg KOH/g ulja) 188-194 te neosapunjivim dijelom manjim od 2,0 %. Najzastupljenije masne kiseline u ovim uljima su linolna (58,0-78,0 %), oleinska (12,0-28,0 %) i palmitinska (5,5-11,0 %). Sjemenke grožđa mogu sadržavati 10-15 % ulja. Udio polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids* - PUFA) u uljima sjemenki grožđa je u rasponu 85-90 %, pri čemu je linolna kiselina (C18:2) najzastupljenija. Nadalje, ulje sjemenki grožđa je bogat izvor spojeva s antioksidacijskim djelovanjem poput karotenoida, tokoferola, tokotrienola, flavonoida i fenolnih kiselina. Sadrži i fitosterole od kojih je najzastupljeniji β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol (Shinagawa i sur., 2015). Ulje sjemenki grožđa ima ugodan, neutralan okus i sadrži visoku razinu vitamina E čime je osigurana oksidacijska stabilnost (Beveridge i sur., 2005). Sadrži i veliku količinu tanina, tj. oligomernih proantocijanidina u koncentracijama 1000 puta većim nego kod drugih sjemenskih ulja što ga čini otpornijim na peroksidaciju.

Smatra se da ovo ulje se da ima veliki potencijal za iskorištenje u farmaceutskoj industriji te pomaže pri sprječavanju oksidacije lipoproteina niske gustoće, prevencije tromboze, prevencije širenja krvnih žila i slično. Također, koristi se i kao prehrambeno ulje za dojenčad i starije osobe. Može se koristiti i za proizvodnju konjugirane linolne kiseline koja je učinkovito sredstvo u inhibiranju karcinogeneze dojke, debelog crijeva, želuca i kože. Konjugirana linolna kiselina se može koristiti kao dodatak prehrani u kombinaciji s drugim antioksidansima iz hrane (Cao i Ito, 2003). Prilikom istraživanja ulja sjemenki grožđa utvrđena je i antimikrobna aktivnost jer djeluje na određene patogene poput *Staphylococcus aureus* i *Escherichie coli*, a pritom ključnu ulogu imaju polifenolni spojevi (resveratrol) jer sudjeluje u procesu oksidativnog oštećenja plazme membrane bakterija (Martin i sur., 2020). Nadalje, ovo ulje se upotrebljava u proizvodnji sapuna i kao jestivo ulje ili zamjena za ulje lanenih sjemenki. Ima visoku točku dimljenja pa se koristi i za duboko prženje (Vanhanen i Savagen, 2000). Koristi se i kao sastojak proizvoda za hidrataciju kože, zatezanje kože, zacjeljivanje ožiljaka, androgenu alopeciju i sl. (Martin i sur., 2020).

2.2. PARAMETRI KVALITETE ULJA SJEMENKE GROŽĐA

2.2.1. Masne kiseline

Masne kiseline građene su od ugljikovog lanca s terminalnom metilnom (-CH₃) grupom na jednom i karboksilnom (-COOH) grupom na drugom kraju lanca. Zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids* - SFA) imaju sve atome ugljika povezane jednostrukim vezama, mononezasićene (engl. *monounsaturated fatty acids* - MUFA) masne kiseline sadrže jednu dvostruku ugljikovu vezu, dok polinezasićene (engl. *polyunsaturated fatty acids* - PUFA) u ugljikovom lancu sadrže više od jedne dvostruke veze (Károlyi, 2007). U tablici 2 je prikazan udio tri najzastupljenije masne kiseline u uljima crnih (Alphonse Lavallee, Ekşi kara, Pinot noir) i bijelih sorti grožđa (Razaki, Perle de Csaba, Narince), pri čemu je udio linolne najveći, zatim slijedi oleinska te palmitinska kiselina.

Tablica 2. Udio (%) tri najzastupljenije masne kiseline u različitim sortama crnog i bijelog grožđa

MASNA						
KISELINA	Tangolar i sur., 2009		Sabir i sur., 2012		Baydar i Akkurt. 2001	
(%)						
sorta grožđa	Alphonse Lavallee	Razaki	Ekşi kara	Perle de Csaba	Pinot noir	Narince
Linolna C18:2	67,34±0,70	66,4±0,49	68,4±0,22	69,4±0,23	64,9±4,36	8,4±0,30
Oleinska C18:1	19,72±0,07	19,06±0,18	18,3±0,03	16,2±0,03	22,6±1,06	18,7±1,35
Palmitinska C16:0	8,71±0,35	9,53±0,38	10,2±0,07	9,0±0,07	9,0±0,28	68,8±6,15

U tablici 3 prikazana je usporedba udjela linolne, oleinske i palmitinske kiseline u ulju sjemenke grožđa sa drugim biljnim uljima (suncokretovo ulje, ulje šafranike, kokosovo, maslinovo, laneno i repičinom ulje). Ulje sjemenki grožđa po sastavu masnih kiselina je najsljednije ulju šafranike i suncokretovom ulju.

Tablica 3. Udio linolne, oleinske i palmitinske masne kiseline u različitim vrstama ulja (%)

	Linolna kiselina (C18:2)	Oleinska kiselina (C18:1)	Palmitinska kiselina (C16:0)
Ulje sjemenki grožđa (Goronas i sur., 2018)	72,5-83,1	6,2-15,5	5,4-13,2
Suncokretovo ulje (Monfreda i sur., 2012)	40-74	15-40	5-8
Ulje šafranike (Coşge i sur., 2007)	54,2-81,54	9,98-36,63	5,62-6,87
Kokosovo ulje (Samman i sur., 2008)	2,63-3,86	11,7-15,44	14,3-16,2
Maslinovo ulje (Sakar i Gharby, 2022)	11,5–15	43,0–49,1	29,3–36,0
Laneno ulje (Gambus i sur., 2003)	12,3–16,0	18,5–27,9	5,8–9,2
Repičino ulje (Beyzi i sur., 2019)	4,24-6,00	53,95-60,98	20,42-25,02

2.2.1.1. Linolna kiselina

Najzastupljenija kiselina u ulju sjemenki grožđa je linolna kiselina (omega-6 masna kiselina). To je višestruko nezasićena masna kiselina molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ (PubChem, 2023). Riječ je o esencijalnoj masnoj kiselini koja sadrži dvije dvostruke veze na devetom i dvanaestom ugljikovom atomu. Ne može se sintetizirati u tijelu, odnosno potrebno ju unositi u organizam putem raznih prehrambenih izvora. Glavni izvori linolne kiseline su biljna ulja, orašasti plodovi, sjemenke, meso i jaja. Linolna kiselina nakon unosa u tijelo ima višestruke aktivnosti: (i) može se koristiti kao izvor energije; (ii) može se esterificirati u neutralne i polarne lipide kao što su fosfolipidi, triacilgliceroli i esteri kolesterola; (iii) djeluje kao strukturna komponenta za održavanje određene razine membranske fluidnosti transdermalne vodene barijere epidermisa, a (iv) kada se otpusti iz membranskih fosfolipida, može se enzimatski oksidirati u razne derivate bitne za staničnu signalizaciju (Whelan i Fritsche, 2013).

2.2.1.2. Oleinska kiselina

Oleinska kiselina je mononezasićena omega-9 masna kiselina molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, koja se nalazi u raznim životinjskim i biljnim izvorima (najviše u maslinovom ulju). Koristi kao pomoćna tvar u lijekovima i kao emulgator i solubilizator u aerosolnim proizvodima. Može spriječiti napredovanje adrenoleukodistrofije, smrtonosne bolesti koja zahvaća mozak i nadbubrežne žlijezde, a može pomoći u jačanju pamćenja (Choulis, 2011). Oleinska kiselina povećava razinu lipoproteina visoke gustoće (HDL) i apoproteina A1 i smanjuje razinu lipoproteina niske gustoće (LDL) i apoproteina B pa se smatra da ova kiselina može spriječiti razne kardiovaskularne bolesti (Šarolić i sur., 2014). Sastavni je dio tkiva i membrana te je glavna komponenta fosfolipida mijelinske ovojnice u mozgu, koji se uglavnom stvara tijekom prve dvije godine života djeteta. Oleinska kiselina se brzo troši tijekom mijelinizacije pa je njen unos iznimno važan u postnatalnom razdoblju (Arsić i sur., 2019).

2.2.1.3. Palmitinska kiselina

Palmitinska kiselina je zasićena masna kiselina dugog lanca koji se sastoji od 16 ugljikovih atoma molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$. Jedna je od najčešćih masnih kiselina pronađenih u životinjama, biljkama, mastima i voskovima. Osim u ulju sjemenki grožđa, palmitinska kiselina se prirodno nalazi u palminom ulju i ulju palminih koštica, kao i u maslacu, siru, mlijeku i mesu. Važna je komponenta membranskih, sekretornih i transportnih lipida, s ključnom ulogom u palmitoilaciji proteina i signalnih molekula (PubChem, 2023).

2.2.2. Steroli

Steroli su derivati izoprenoida te su strukturne komponente bioloških membrana. Prekursori su skupine biljnih hormona (brasinosteroida) koji reguliraju rast i razvoj biljaka. Sudjeluju u transmembranskom prijenosu signala stvaranjem lipidnih mikrodomena (Valitova i sur., 2016). Prema Pravilniku Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) najzastupljeniji steroli u ulju sjemenki grožđa su: kampesterol (7,5-14 %), stigmasterol (7,5-12 %) i β -sitosterol (64,0-70,0). β -sitosterol je učinkovit antidijabetik, neuroprotektivno i kemoprotektivno sredstvo (Saeidnia i sur., 2014). Kampesterol ima sposobnost smanjenja kolesterola i pomaže u prevenciji bolesti povezanih s angiogenezom (Bjelica, 2019). Stigmasterol je uključen je u sintezu mnogih hormona (progesterona, androgena, estrogena, kortikoida) (Kaur i sur., 2011).

2.2.3. Tokoferoli

Tokoferoli i tokotrienoli se nalaze gotovo u svim biljnim uljima, a glavna razlika između njih je zasićenost bočnog lanca. S obzirom da pripadaju skupini antioksidansa fenolnog tipa utječu na usporavanje procesa oksidacije ulja (Malićanin, 2014). Upravo zbog toga imaju važnu ulogu u proizvodnji i komercijalizaciji hrane koja sadrže lipide, doprinose produljenju stabilnosti i roka trajanja tih proizvoda. Vitamin E je glavni lipofilni antioksidans te hvatač alkoksilnih i peroksilnih radikala. Ima ulogu zaštite membrane od fotoinhibicije i drugih fotooksidativnih stresova u biljkama (Gliszczynska-Swiglo i sur., 2007). Također, vitamin E ima visoku antioksidativnu aktivnost te neuroprotektivna i antitumorska svojstva. Osim vitamina E, ulje sjemenki grožđa sadrži još i α -, β -, γ - i δ -tokoferole. Ulje je bogatije tokotrienolima (nezasićeni oblik vitamina E) nego tokoferolima među kojima je γ -tokotrienol najzastupljeniji, a nakon njega slijedi α -tokotrienol (Garavaglia i sur., 2016). Glavna funkcija α -tokoferola je razbijanje lanaca radikala u lipoproteinima i membranama, a smatra se da smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i određenih vrsta raka upravo zbog svog antioksidativnog potencijala te različitih funkcija na molekularnoj razini (Schwartz i sur., 2008).

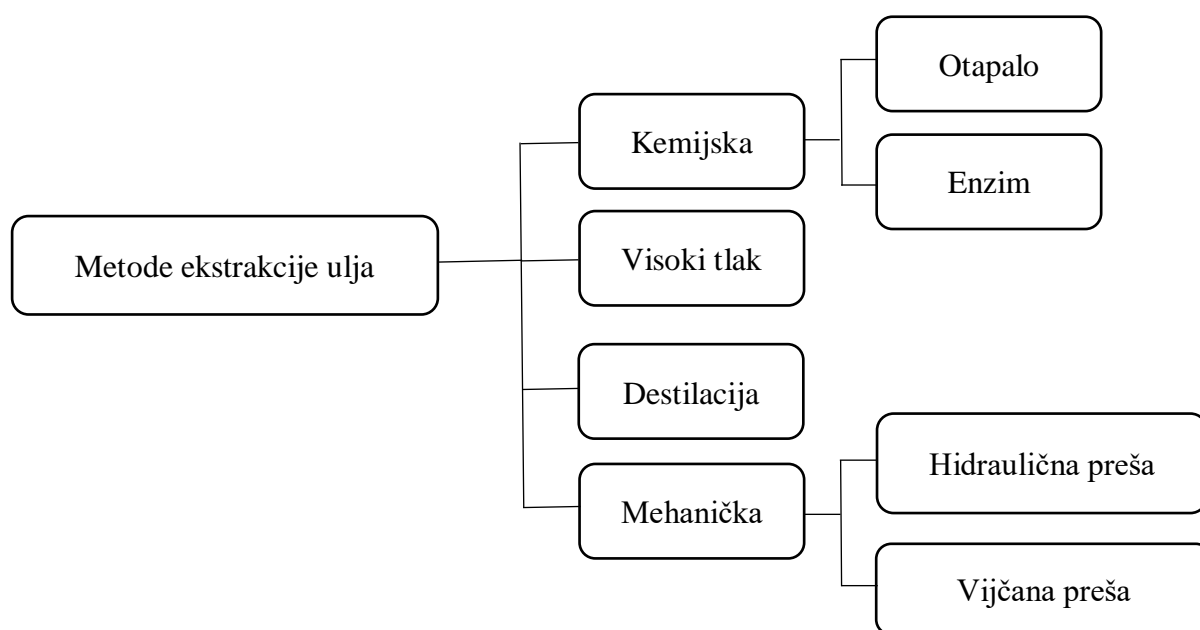
2.2.4. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su velika skupina sekundarnih metabolita koji se dijele na flavonoide (antocijani, flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavonoli) i neflavonoide [(fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), stilbeni, lignani)] (Riedel i sur., 2012). Polifenolni spojevi su prisutni u ulju sjemenke grožđa su katehin, epikatehin, galna kiselina, procijanidini i proantocijanidini. Veći sadržaj polifenolnih spojeva nalazi se u sjemenki grožđa nego u samom ulju (Martin i sur., 2020). Usporedno s lanenim ili repičinim uljem, ulje sjemenki grožđa ima neznatno više polifenolnih spojeva. Ovi spojevi djeluju kao hvatači slobodnih radikala te imaju ulogu u smanjenju oksidativnog stresa (Matthäus, 2008).

2.3. METODE EKSTRAKCIJE ULJA IZ SJEMENKI GROŽĐA

Ekstrakcija je jedan od glavnih separacijskih procesa u prehrambenoj industriji, a definira se kao proces izdvajanja tvari iz čvrste ili tekuće smjese odgovarajućim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese (Lovrić, 2003).

Najčešća podjela postupaka ekstrakcije ulja je na fizikalne i kemijske (slika 1). Fizikalni postupci uključuju proizvodnju ulja pomoću mehaničke energije, a najčešće korišteni su kontinuirano prešanje pomoću pužne preše te diskontinuirano prešanje pomoću hidraulične klipne preše. Kemijski procesi se uglavnom temelje na ekstrakciji s otapalima, pomoću enzima ili pomoću superkritičnih fluida (Aladić, 2015).



Slika 1. Osnovne metode ekstrakcije ulja (Çakaloğlu i sur., 2018)

2.3.1. Hladno prešanje

Ekstrakcija hladnim prešanjem je metoda mehaničke ekstrakcije, a zahtjeva manje energije od drugih tehnika ekstrakcije ulja. Metoda je ekološki prihvatljiva, provodi se bez upotrebe otapala čime se mogu dobiti visokokvalitetna ulja s obzirom da ova metoda ne uključuje ni toplinsku ni kemijsku ekstrakciju (Çakaloğlu i sur., 2018). Uključuje dvije faze, a to su priprema sirovine za izdvajanje ulja i samo izdvajanje ulja. Priprema sirovine u pravilu podrazumijeva

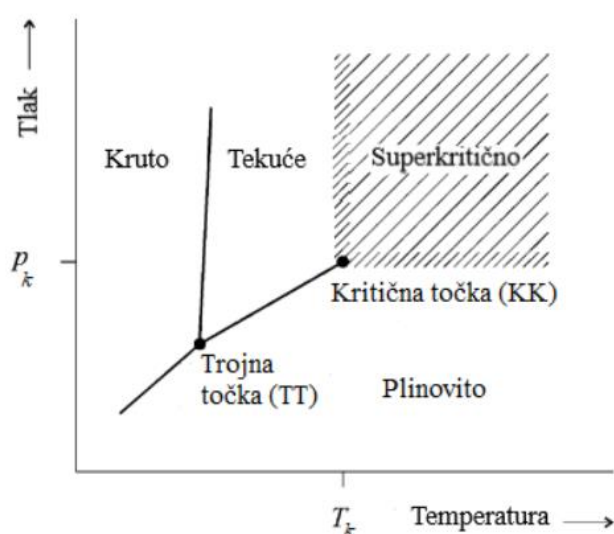
uklanjanje potencijalnih nečistoća te sušenje sjemenki na odgovarajuću razinu vlažnosti (idealno 8-10 %). Kad se ulje proizvodi metodom hladnog prešanja važno je obratiti pažnju da temperatura sirovog ulja na izlazu iz preše ne prelazi 50 °C (Aladić, 2015). Hladno prešanje se može provesti hidrauličnom ili pužnom prešom sa ili bez sustava za hlađenje (Chin Chew, 2020). Hidraulične preše mogu biti otvorene i zatvorene, ovisno o načinu punjenja materijala. Kod otvorenih preša materijal se puni u tekstilne vreće, one se slažu jedna na drugu i između njih se stavlja čelična ploča. Kod zatvorenih hidrauličnih preša između dvije glave se nalazi cilindar u koji se puni materijal koji se ravnomjerno raspoređuje na situ. Zatim se stavlja čelična ploča, ponovno materijal pa opet ploča i tako naizmjenično. Hidraulične preše mogu ostvariti tlak od 300-360 bara, a ukoliko se radi o prešama manjih kapaciteta i do 600 bara. Rad je diskontinuiran i zahtjeva dodatnu opremu, a potrebno je i dosta ručnog rada (Malićanin, 2014). Upotreba hidrauličnih preša danas je rijetka i isključivo se koriste u proizvodnji bučinog i maslinovog ulja (Aladić, 2015). Pužne preše se puno češće koriste za izdvajanje ulja. Rade na principu da dolazi do guranja materijala iz većeg prostora u manji pomoću puža i na taj način dolazi do sabijanja materijala i stvaranja tlaka (Malićanin, 2014). Ovim načinom se dobije proizvod visoke kvalitete, niska je cijena opreme, ali iskorištenje nije potpuno jer dio ulja zaostaje u pogači prilikom prešanja (Aladić, 2015).

Dobiveno hladno prešano ulje se dalje pročišćava filtracijom, centrifugiranjem ili sedimentacijom (Chin Chew, 2020). Na samu efikasnost prešanja utječe vrsta i karakteristike sirovine, način pripreme materijala za prešanje, konstrukcija i snaga preše, temperatura, dužina trajanja prešanja i sl. (Bjelica, 2019). Prinos ovisi o brzini punjenja, temperaturi (topla ili hladna), brzini hladne rotacije, predobradi sirovine. Također, veliku ulogu na ekstrakciju komponenti ulja (posebno polifenole) ima sorta grožđa (Çakaloğlu i sur., 2018). Prednosti primjene hladnog prešanja su dobivanje čisteg proizvoda, ulje sadrži izvorna senzorska svojstva, zadržava karakterističnu hranjivu vrijednost. Neki od nedostataka su mali prinos ulja, skuplji proizvod, a prilikom prešanja može doći do razvijanja topline što dovodi do smanjenja kvalitete ulja (Bjelica, 2019).

2.3.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima označava tehniku prijenosa tvari temeljenu na činjenici da pojedini plinovi postaju jako dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Aladić, 2015). Ekstrakcija superkritičnim

fluidima primjenjiva je na tekućine i krutine. Otapalo koje se koristi je plin u uvjetima temperature i tlaka prilikom kojih ne dolazi do kondenzacije (Lovrić, 2003). Postupkom zagrijavanja ili komprimiranja iznad kritične točke plinovi se dovode u superkrično stanje (slika 2) u kojemu nisu niti u agregatnom stanju tekućine niti u stanju plina, ali posjeduju svojstva tekućine i plina (Aladić, 2015). Fluidi koji su u superkričnom stanju imaju veću topljivost i stupanj selektivnosti procesa je veći u odnosu na primjenu klasičnih otapala (Malićanin, 2014). Plinovi koji se mogu koristiti za ekstrakciju u superkričnim uvjetima su ugljikov dioksid, dušikov oksid, etan, propan, butan i neki halogeni ugljikovodici (Lovrić, 2003).



Slika 2. Fazni dijagram (Brunner, 2005)

Proces ekstrakcije superkričnim fluidima provodi se kontinuiranim kontaktom supstrata sa superkričnim otapalom. Čvrsta podloga u većini slučajeva tvori fiksnu podlogu (Brunner, 2005). Fluid se u ekstraktor odvodi preko pumpi s visokim pritiskom te se provodi prvo kroz hladnjak da bi se osiguralo njegovo tekuće stanje, a nakon toga se kroz pumpu odvodi do izmjenjivača topline. Na taj način se, zbog povišenog tlaka i temperature, fluid dovodi u superkrično stanje i transportira do ekstraktora. Fluid izvlači komponente iz supstrata i vrši se regulacija tlaka da bi se smanjio pritisak, a fluid se s ekstrahiranim komponentama odvodi u separator. U separatoru se prevodi u plin zbog pada temperature i tlaka te se izdvaja ekstrakt. Plin se može otpustiti u atmosferu ili se može odvoditi u kondenzator zbog recirkulacije s ciljem

ponovne upotrebe. Ukoliko je supstrat tekući, ekstraktor se modificira u kolonu gdje se materijal i fluid ispuštaju istovremeno (Malićanin, 2014). Čimbenici koji utječu na proces ekstrakcije mogu biti temperatura, tlak, protok otapala te vrijeme ekstrakcije. Na učinkovitost procesa može utjecati i viskoznost, gustoća te difuznost otapala i materijala koji se ekstrahira, dodatak ko-otapala, poroznost sloja i dr. Glavna prednost superkritične ekstrakcije u odnosu na druge vrste ekstrakcija je što se provodi na umjerenim temperaturama i može se primijeniti za separaciju slabo hlapivih i temperaturno osjetljivih komponenti. U odnosu na ekstrakciju s organskim otapalima, superkritični fluidi imaju nižu viskoznost, bolju difuziju i manju površinsku napetost, a razdvajanje ekstrakta od otapala je vrlo brzo i lako. Dodavanjem ko-otapala (etanol, voda i dr.) u CO₂ poboljšava se topljivost polarnih supstanci i tako se postiže veća selektivnost tijekom separacije, a korištena otapala su sigurna za okoliš te ih je moguće reciklirati. Uz to, ekstrakcija je primjenjiva na sustave različitih kapaciteta te se primjenom ove tehnike mogu ekstrahirati i termolabilne komponente (Jokić, 2011). Nedostaci metode su veliki investicijski troškovi te rad na visokim tlakovima (Malićanin, 2014).

2.3.2.1. Ugljikov dioksid (CO₂)

Ugljikov dioksid je plin koji se koristi za ekstrakciju prirodnih tvari u tehnologiji prehrambenih proizvoda s izrazito niskom temperaturom od 31,3 °C pri kritičnom tlaku od 72,9 bara (Lovrić, 2003). Smatra se zelenim otapalom jer je jeftin, lako dostupan, nije toksičan, nezapaljiv je, bez okusa i mirisa te je ekološki prihvatljiv i deklariran je kao GRAS (engl. *Generally Recognized as Safe*- generalno prihvaćeno kao sigurno) otapalo. Ekstrakcija superkritičnim CO₂ smatra se „čistom tehnologijom“ zato što se ne stvaraju sekundarni produkti koji mogu biti štetni za okolinu (Aladić, 2015). Pogodan je za ekstrakciju nepolarnih ili slabo polarnih spojeva niže molekulske mase budući da je i on sam nepolarno otapalo, a spojevi veće molekularne mase slabo su topljivi u superkritičnim fluidima. Poboljšanje topljivosti polarnih spojeva postiže se dodatkom malih količina ko-otapala (Jokić, 2011). Nepolarni spojevi se često ekstrahiraju organskim otapalima poput benzena, toluena itd. te je na taj način CO₂ odlična zelena zamjena za organska otapala (Cvetanović, 2019).

2.4. STABILNOST ULJA SJEMENKI GROŽĐA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

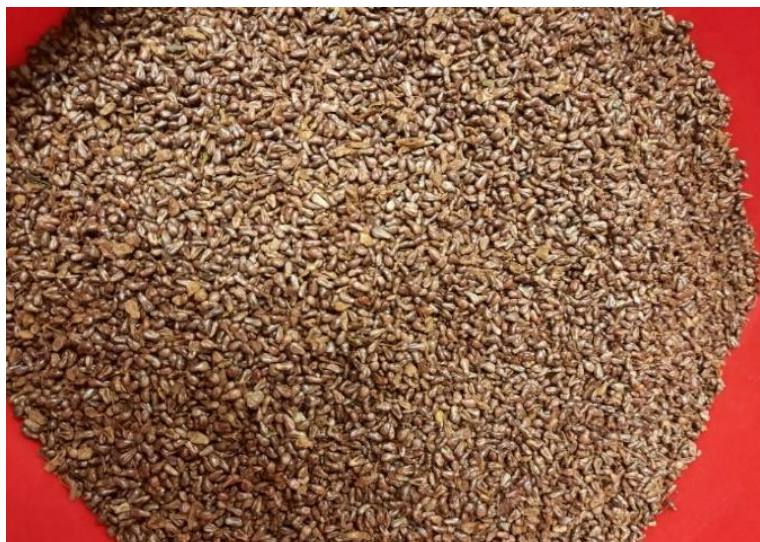
Oksidacijska stabilnost ili održivost biljnih ulja označava vrijeme tijekom kojeg se ulja mogu sačuvati od procesa autooksidacije. Oksidacijsko kvarenje je najčešći tip kvarenja ulja, a to je proces u kojem dolazi do oksidacije nezasićenog lanca masne kiseline. Poznavanje stabilnosti je važno da bi se moglo odrediti vrijeme u kojem se mogu sačuvati biljna ulja od jače oksidacije bez da dođe do promjena kvalitete te da se može odrediti rok upotrebe određenog ulja. Hoće li autooksidacija nastupiti brže ili sporije ovisi o uvjetima skladištenja, sastavu ulja i prisutnosti sastojaka (klorofili i karotenoidi) koji mogu usporiti ili ubrzati sam proces oksidacije (Moslavac i sur., 2010, Koski i sur., 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJAL

3.1.1. Sjemenka grožđa

U ovom radu za istraživanje korištena je komina grožđa sorte Graševina dobivena prešanjem grožđa tijekom berbe 2021. godine (Kutjevo d.d., podregija Slavonija, Hrvatska). Komina je isti dan dopremljena u laboratorij gdje je sjemenka ručno odvojena i smrznuta pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (slika 3).



Slika 3. Odvojene sjemenke (*vlastita fotografija*)

3.1.2. Kemikalije

Za provedbu ovog istraživanja su korištene sljedeće kemikalije:

Natrijev hidrogensulfat monohidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Izooktan (Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Metanol (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)

3.1.3. Instrumenti i pribor

U ovom radu su korišteni sljedeći instrumenti i pribor:

Analitička vaga (Metler Toledo, Columbus, Ohio, SAD)

Laboratorijska pužna preša Komet CA/53 (Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka)

Uređaj za ekstrakciju superkričnim CO_2 (Extratex, Neuves-Maisons, Francuska)

Centrifuga Rotina (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)

Električni mlin (Bühler GmbH, Njemačka)

Vortex (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka)

Plinski kromatograf (Agilent 6890 Network GC System) s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. FID, *flame-ionization detector*) i automatskim injektorom (7683B Series Injector) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Mikropipeta, 10-100 µL (Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju ulja

Prije ekstrakcije sjemenke su bile adekvatno pripremljene, ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije: (i) za hladno prešanje sjemenke su osušene pri 48 °C do 6-9 % vlage, dok su za (ii) superkritičnu CO₂ ekstrakciju osušene do suha pri 48 °C tijekom 48 h. Suho sjeme usitnjeno je (slika 4) pomoću električnog mlina (Bühler GmbH, Njemačka), nakon čega je provedena granulometrijska analiza na standardnoj seriji od sedam sita različitih dimenzija (2,25; 1,12; 0,67; 0,45; 0,369; 0,282 i 0,18 mm). Prosječni promjer čestica (dp) izračunat je na $0,5446 \pm 0,0045$ mm.



Slika 4. Uzorak usitjenih sjemenki grožđa (*vlastita fotografija*)

3.2.1. Hladno prešanje (HP)

Ulje iz djelomično prosušanih sjemenki (vlažnost 6-9 %) ekstrahirano je laboratorijskom pužnom prešom Komet CA/53, bez zagrijavanja. Nakon prešanja, provedeno je centrifugiranje ulja (7800 rpm, 10 min) s ciljem uklanjanja nečistoća. Pročišćeno ulje je do laboratorijskih analiza čuvano u hermetički zatvorenoj boci na -20 °C.

3.2.2. Superkritična ekstrakcija CO₂ (SC CO₂)

U ekstrakcijsku kolonu uređaja za SC CO₂ odvagano je 50 g prethodno usitnjenih sjemenki grožđa nakon čega je provedena ekstrakcija pri različitim uvjetima tlaka, temperature i protoka plina CO₂, prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 4. Postupak ekstrakcije pojedinog SC CO₂ tretmana trajao je 90 min. Ekstrahirano ulje (slika 6) je do laboratorijskih analiza čuvano u hermetički zatvorenoj boci na -20 °C. Uređaj za ekstrakciju SC CO₂ prikazan je na slici 5.

Tablica 4. Procesni parametri SC CO₂

Broj pokusa	Procesni parametri		
	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Protok plina (g/min CO ₂)
SC1	300	35	30
SC2	500	35	30
SC3	300	55	30
SC4	500	55	30
SC5	300	45	15
SC6	500	45	15
SC7	300	45	45
SC8	500	45	45



Slika 5. Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO₂ (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina

Određivanje sastava masnih kiselina ulja sjemenki grožđa dobivenog hladnim prešanjem i ekstrakcijom superkritičnim CO₂ provedeno je primjenom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). Prije same kromatografske analize nužno je masne kiseline prevesti u njihove metilne estere. Metilni esteri pripremljeni su metodom po Bannonu (ISO 5509, 2000).

Priprema metilnih estera masnih kiselina:

U staklenu epruvetu odvagati masu od 60 mg ulja sjemenki grožđa i otopiti u 4 mL izooktana i 200 μ L metanolne otopine kalijevog hidroksida (2 mol/L). Nakon toga smjesu snažno protresti uz pomoću vortexa (oko 30 sekundi) i ostaviti reakciju na sobnoj temperaturi pri čemu se smjesa izbistri, te odvoji gliceridni sloj. Nakon što se gliceridni sloj odvoji na dnu epruvete, dodati 1 g natrij hidrosulfat monohidrata kako bi se smjesa neutralizirala, te potom bistru otopinu prebaciti u vialu. Pripremljene metilne estere injektirati (1 μ L) u GC-FID sustav.

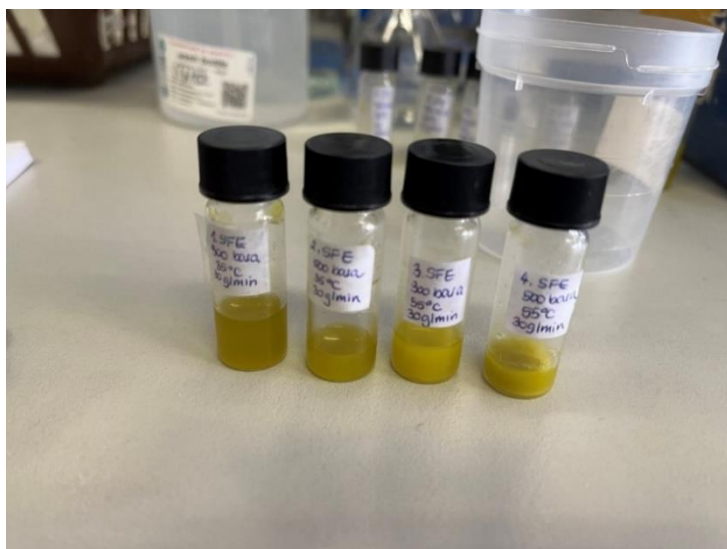
Kromatografski uvjeti:

Metilni esteri masnih kiselina odvojeni su na kapilarnoj koloni DB-23 (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 m; Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) (Kraljić i sur., 2018). Kao plin nosioc korišten je helij protoka 1,5 mL/min. Temperatura injektora bila je 250 °C, a uzorci su injektirani 'split' načinom rada injektora (omjer 50:1). Temperatura FID detektora iznosila je 250 °C, a protoci plinova na detektoru su bili sljedeći: vodik 50 mL/min, sintetski zrak 450 mL/min te

dušik 45 mL/min. Metilni esteri masnih kiselina su razdvojeni primjenom sljedećeg temperaturnog programa: početna temperatura od 60 °C se brzinom 7 °C/min povećava do 220 °C na kojoj se zadržava 17 minuta.

Identifikacija i kvantifikacija:

Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom njihovih retencijskih vremena s onima komercijalnih standarda, primjenom programa Enhanced ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Sadržaj svake masne kiseline izražen je kao postotak ukupnih masnih kiselina, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri paralelna određivanja (ISO 5509, 2000).



Slika 6. Ulje sjemenki grožđa nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂ (*vlastita fotografija*)

3.2.5. Praćenje stabilnosti ulja tijekom skladištenja

Hladno prešanom ulju i ulju ekstrahiranom superkritičnim CO₂ (slika 6) praćena je stabilnost određivanjem linolne kiseline (C18:2n6) tijekom 6 mjeseci skladištenja ulja u različitim uvjetima: (i) 4 °C i (ii) sobna temperatura (25 °C). Određivanje udjela linolne kiseline provedeno je u trenutku stavljanja na starenje (vrijeme 0) te nakon 3 i 6 mjeseci skladištenja pri prethodno navedenim uvjetima.

3.2.6. Obrada podataka

Statistička analiza analitičkih podataka provedena je analizom varijance (ANOVA) korištenjem softvera Statistica v.10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Analiza varijance

(ANOVA) provedena je na svim neovisnim varijablama masnih kiselina. Tukey HSD test korišten je kao usporedni test kada su uzorci bili značajno različiti nakon ANOVA ($p < 0,05$). Analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) provedena je s ciljem utvrđivanja mogućeg grupiranja uzoraka ovisno o primijenjenim postupcima ekstrakcije ulja. Provedena je PCA analiza na korelacijskom matriksu obzirom na udio masnih kiselina. Općenito, PCA je multivarijatna tehnika koja pojednostavljuje i objašnjava odnose između brojnih zavisnih varijabli (u ovom slučaju masne kiseline) i predmeta (uzorci ulja sjemenke grožđa). Primjenom PCA, originalne zavisne varijable se transformiraju u nove, nekorelirane dimenzije koje se nazivaju glavne komponente (engl. *principal components*), što pojednostavljuje strukturu podataka i pomaže pri njihovoj interpretaciji. Općenito, omogućuje jednostavnu, ne-parametarsku metodu izlučivanja bitnih informacija i značajki iz skupova podataka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

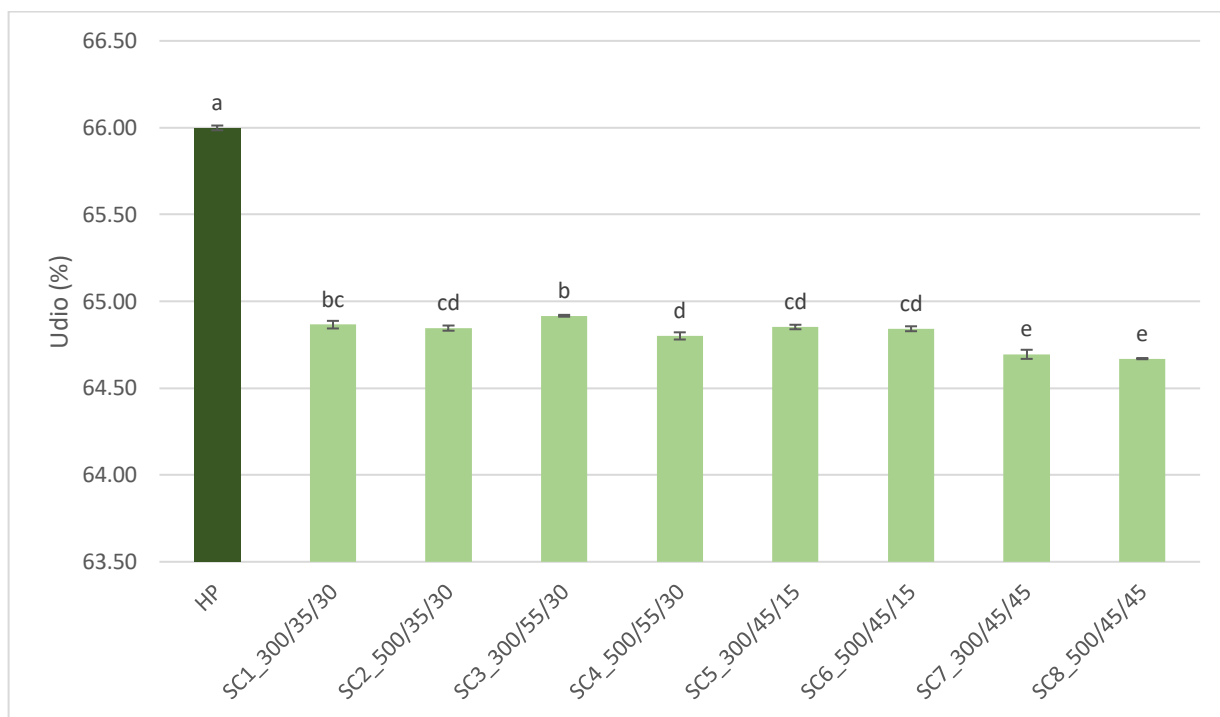
Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sastav masnih kiselina u ulju sjemenke grožđe sorte Graševina te ispitati utjecaj dvije tehnike ekstrakcije ulja na njihov udio. Pritom je istražen utjecaj: (i) hladnog prešanja te (ii) superkritične ekstrakcije pomoću CO₂. Osim toga, cilj je bio ispitati i utjecaj različitih procesnih parametara SC CO₂ ekstrakcije (tlak, temperatura, protok plina) na sastav masnih kiselina u navedenom ulju. U konačnici, ovim istraživanjem se pratila i stabilnost linolne masne kiseline tijekom 6 mjeseci skladištenja ulja pri dvije različite temperature (4 °C i 25 °C). Udjeli pojedinih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima ulja sjemenki grožđa prikazani su kroz slike 7-15 ovisno o tehnici ekstrakcije (HP i SC CO₂). Na slikama 16 i 17 prikazane su projekcije varijabli u prostoru osnovnih komponenata (PC1 i PC2) masnih kiselina u ulju sjemenke grožđa, a na slikama 18 i 19 vidljiv je prikaz stabilnosti linone kiseline na 4 °C i na 25 °C. Tablica 5 prikazuje sumarne vrijednosti pojedinih skupina (zasićene, mononezasićene i polinezasićene kiseline) (hladno prešanje i SC CO₂ ekstrakcija), dok tablica 6 prikazuje sumu *F*- i *p*- vrijednosti utjecaja tlaka, temperature i protoka plina na udio masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa.

4.1. UTJECAJ TEHNIKE EKSTRAKCIJE ULJA NA SASTAV MASNIH KISELINA

Na slikama 7-15 prikazani su udjeli masnih kiselina u ispitivanim uzorcima ulja sjemenki grožđa sorte Graševina. Pritom su ulja ekstrahirana različitim procesnim parametrima superkritičnog CO₂ uspoređena s hladno prešanim uljem (HP). Masne kiseline, identificirane u ulju sjemenke grožđa su linolna, oleinska, palmitinska, stearinska, arahidska, gadoleinska, linolenska, palmitoleinska i miristinska.

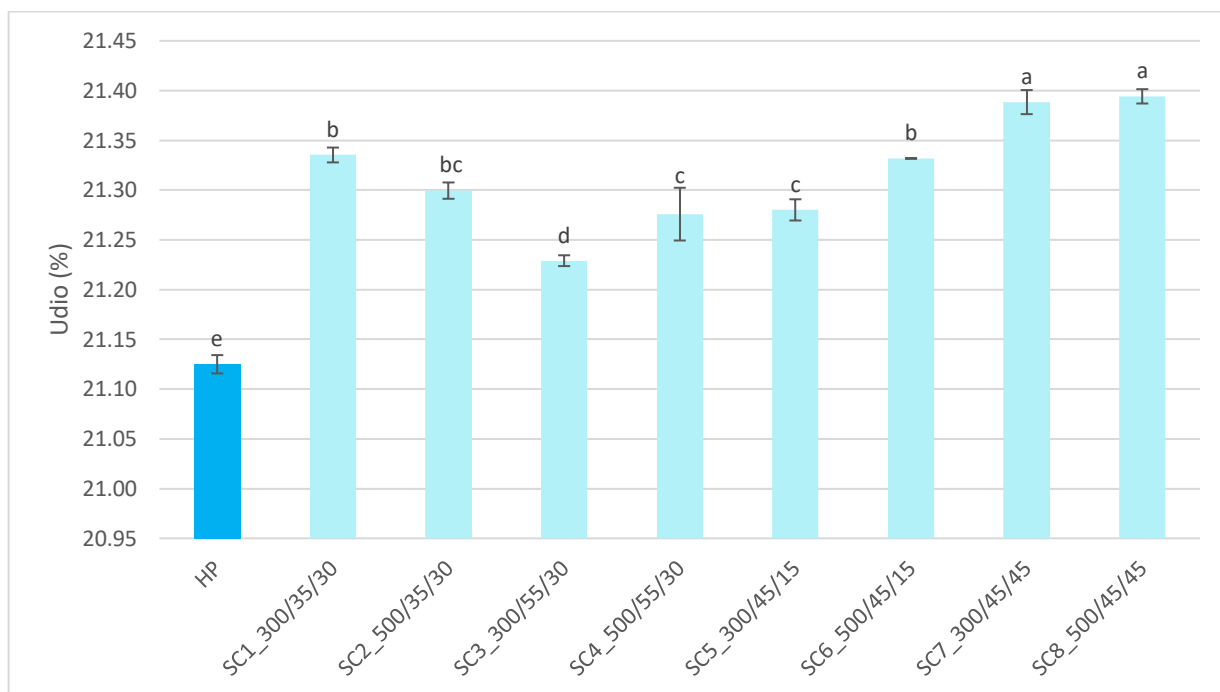
Na slici 7 je prikazan udio (%) linolne kiseline u hladno prešanom te SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa sorte Graševina. Općenito, linolna kiselina je kvantitativno najznačajnija masna kiselina u ulju sjemenki grožđa, a ovisno o sorti grožđa od koje je ulje proizvedeno utvrđena je u rasponu 58-78 % (Malićanin, 2014). Navedeni trend je potvrđen i u slučaju ulja sjemenki sorte Graševina pri čemu je linolna kiselina utvrđena u rasponu 64,67-66,00 %. Pritom je jasno vidljiv i utjecaj tehnike ekstrakcije (slika 7), gdje je postupak hladnog prešanja rezultirao značajno višim udjelom ove kiseline (66,00 %), u usporedbi sa uljima ekstrahiranim SC CO₂ (64,67-64,92 %). Nadalje, različiti trendovi se mogu vidjeti i obzirom na

primijenjene procesne parametre SC CO₂: najvišim postotkom linolne kiseline (64,92 %) rezultirao je postupak sa primjenom tlaka od 300 bara, temperature 55 °C i protoka 30 g/min; dok je najniži postotak linolne kiseline (64,67 %) dobiven primjenom tlakova od 300 i 500 bara, temperature 45 °C i protoka 45 g/min. Botelho i sur. (2014) u istraživanju utjecaja SC CO₂ na ulje crnog sezama utvrdili su suprotan trend gdje povećanjem tlaka pri istoj temperaturi udio linolne kiseline raste. U istraživanju Jokić i sur. (2015) objašnjavaju djelovanje tlaka na prinos ulja te zaključuju da se povećanjem tlaka pri konstantnoj temperaturi povećava i gustoća superkritičnog CO₂ zbog čega dolazi do povećanja njegove moći topljivosti i do boljeg prinosa procesa. Uspoređivanjem temperature od 35 °C i 55 °C pri tlaku od 300 bara uočeno je da dolazi do povećanja udjela linolne kiseline s povećanjem temperature. Isti trend opisali su i Botelho i sur. (2014) gdje je povećanjem temperature s 40 na 60 °C pri tlaku od 300 bara došlo i do povećanja udjela linolne kiseline u ulju sjemenki crnog sezama. Međutim, pri tlaku od 500 bara udio linolne kiseline bio je manji pri višoj temperaturi, a prema Duba i Fiori (2015) to može biti posljedica smanjenja gustoće CO₂ zbog povećanja temperature uslijed čega dolazi do smanjenja topljivosti tvari. Također, može doći do ponovnog povećanja topljivosti tvari zbog povećanog tlaka pare otopljene tvari, a rezultat ovisi o tome koji će učinak prevladati. Usporedbom protoka pri konstantnom tlaku od 300 i 500 bara i temperaturi od 45 °C uočeno je da je pri nižem protoku od 15 g/min udio linolne kiseline veći. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Senyay-Oncel i sur. (2011), gdje je ispitivan utjecaj procesnih parametara SC CO₂ na ulje bobica *Pistacia terebinthus* L. i gdje je utvrđen veći udio linolne kiseline pri nižem protoku CO₂. Nasuprot tome, Duba i Fiori (2015) u svom istraživanju opisuju utjecaj protoka gdje zaključuju da je pri većim protocima, veća i brzina ekstrakcije kao i topljivost zbog povećanja vanjskih i unutarnjih prijenosa mase, a samim time je i bolji prinos procesa.



Slika 7. Udio linolne kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Druga najzastupljenija masna kiselina u ulju sjemenki grožđa je oleinska i njen udio prikazan je na slici 8. Raspon u kojem je ona prisutna u ulju sjemenki grožđa (ovisno o sorti grožđa) iznosi 13,35 - 26,30 % (Juhaimi i Özcan, 2017), dok u analiziranim uljima sjemenki grožđa sorte Graševina taj raspon iznosi 21,13 – 21,39 %. Kao što se može vidjeti na slici, tehnika ekstrakcije značajno je utjecala na udio ove masne kiseline u dobivenim uljima. Pritom su sva ulja ekstrahirana SC CO₂ karakterizirana značajno višim udjelima oleinske kiseline, u usporedbi s hladno prešanim uljem.

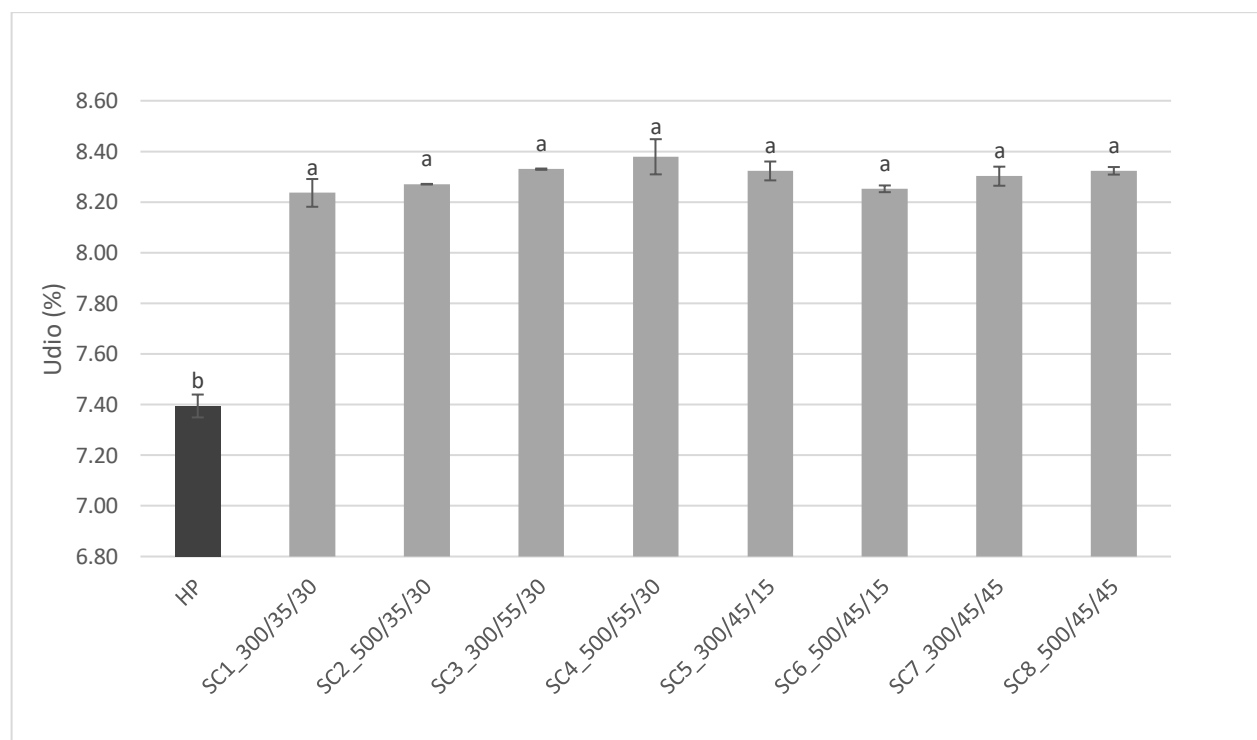


Slika 8. Udio oleinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Osim tehnike ekstrakcije, vidljiv je i značajan utjecaj procesnih parametara SC CO₂ ekstrakcije, gdje primjena tlakova od 300 i 500 bara, temperature 45 °C i protoka 45 g/min rezultirao najvećim udjelom oleinske kiseline (21,39 i 21,40 %) dok je u ulju ekstrahiranom pri tlaku od 300 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min utvrđen najmanji udio ove kiseline (21,23 %). Gustinelli i sur. (2018) su u svom radu istraživali utjecaj tlaka primijenjenog tijekom SC CO₂ ekstrakcije na ulje sjemenki borovnice te su zaključili kako promjenom tlaka s 200 na 500 bar se povećava i udio oleinske kiseline čime se potvrđuje rezultat ovog istraživanja, uz iznimku promjene tlaka s 300 na 500 bara uz konstantnu temperaturu od 35 °C i protok 30 g/min gdje dolazi do smanjenja udjela oleinske kiseline. Pri uvjetima konstantnog tlaka (300 i 500 bara) i protoka (30 g/min) promjena temperature s 35 na 55 °C rezultirala je smanjenjem udjela oleinske kiseline, a Perez i sur. (2015) primjećuju isti trend smanjenja povećanjem temperature s 40 na 60 °C u ulju sjemenki grožđa, kao i Cao i Ito (2003) povećanjem temperature s 35 na 45 °C. Uspoređujući protok pri konstantom tlaku (300 i 500 bara) i temperaturi (45 °C) opaženo je da je pri većem protoku od 45 g/min udio oleinske kiseline viši. Ovaj trend u skladu je s

rezultatima Senyay-Oncel i sur. (2011) koji su veći udio oleinske kiseline odredili u ulju bobice *Pistacia terebinthus* L. dobivenom pri većim protocima.

Palmitinska kiselina kao treća najzastupljenija kiselina u ulju sjemenke grožđa Graševine prikazana je na slici 9. Kao što se može vidjeti, u ulju sjemenki Graševine ova masna kiselina je određena u rasponu od 7,4 – 8,38 %, što odgovara literaturnim podacima koji ističu da je udio oleinske kiseline u ulju sjemenki grožđa 6,9 – 12,9 % (Sabiru i sur., 2012).

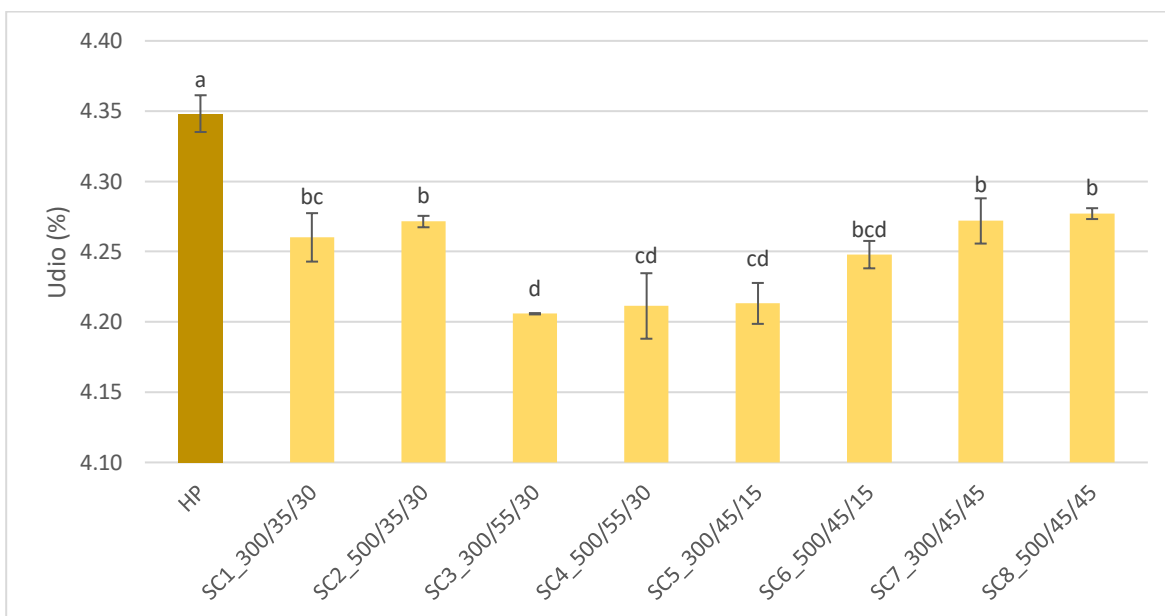


Slika 9. Udio palmitinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Hladno prešanje rezultiralo je značajno nižim udjelom palmitinske kiseline (7,4 %) u odnosu na SC CO₂ ekstrakciju. Kao što se može vidjeti, između procesnih parametara SC CO₂ ekstrakcije nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$), ali su primijenjene varijante ipak rezultirale blagim razlikama u udjelu ove kiseline. Pritom je najveći udio palmitinske kiseline utvrđen u ulju dobivenom ekstrakcijom pri tlaku od 500 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min (8,38 %), a najmanji pri tlaku od 300 bara, temperaturi 35 °C i protoku od 30 g/min (8,24 %). Promatranjem utjecaja tlaka na udio palmitinske kiseline primijećeno je da povećanjem tlaka s 300 na 500 bara (izotermi uvjeti, konstantan protok) dolazi i do blagog povećanja njenog udjela, osim u slučaju tlaka 500 bara, temperature 45 °C i protoka 45 g/min gdje dolazi do

neznatnog smanjenja udjela ove kiseline u odnosu na tlak od 300 bara. Suprotan trend primijetili su Piras i sur. (2009) prilikom istraživanja utjecaja ekstrakcije SC CO₂ na ulje pšenične klice te je vidljivo u rezultatima da povećanjem tlaka s 200 na 300 bara dolazi do smanjenja udjela palmitinske kiseline. Uspoređivanjem primijenjenih temperatura (35 °C i 55 °C) pri tlakovima od 300 i 500 bara te konstantnom protoku opaženo je da se povećanjem temperature blago povećava i udio palmitinske kiseline. Botelho i sur. (2014) opazili su sličan trend u ulju sjemenki crnog sezama gdje povećanjem temperature pri konstantnom tlaku od 250 bara s 40 na 60 °C dolazi do povećanja udjela palmitinske kiseline.

Slika 10 prikazuje udio stearinske kiseline u ulju sjemenke grožđa sorte Graševina čiji je udio u rasponu od 4,21 – 4,35 %, što je u skladu s prethodnim istraživanjem Lampi i Hainonen (2009) gdje je prikazan udio stearinske kiseline ovisno o sorti grožđa u rasponu do 3,6 – 5,4 %. Utjecaj tehnike ekstrakcije vidljiv je kod hladno prešanog ulja gdje je udio stearinske kiseline iznosio 4,35 % što je značajno viši udio od onoga u uljima ekstrahiranim SC CO₂ (4,21-4,28 %). Osim između hladno prešanog i ekstrahiranog ulja, statistički značajna razlika utvrđena je i između uzoraka SC CO₂, ovisno o primijenjenim procesnim varijantama. Tako je značajno najviši udio (4,27 %) stearinske kiseline određen u uzorcima dobivenim primjenom tlaka od 500 bara, temperature 35 °C i protoke 30 g/min te tlakovima od 300 i 500 bara, temperaturi 45 °C i protoku 45 g/min; dok je značajno najniži udio (4,21 %) utvrđen u uzorcima dobivenim pri tlaku od 500 bara, 55 °C i protoku 30 g/min. Pregledom literature utvrđen je nedostatak znanstvenih istraživanja koja obuhvaćaju usporedbu hladno prešanog i SC CO₂ ulja, jedino su dostupni radovi koji opisuju pojedinačne utjecaje ovih tehnika na udio stearinske kiseline. Tako su Bjelica i sur. (2019) u hladno prešanom ulju Talijanskog rizlinga odredili udio stearinske kiseline u iznosu od 2,15 %, dok su Dimić i sur. (2020) udio ove kiseline u vrijednosti 4,29 % odredili u ulju sjemenke grožđa (kombinacija različitih sorti) ekstrahiranom SC CO₂. Navedena istraživanja impliciraju kako je tretman SC CO₂ pogodniji za ekstrakciju višeg udjela stearinske kiseline u usporedbi s hladnim prešanjem, a što je suprotno trendu utvrđenom u ovom istraživanju. Međutim, navedeni zaključak se ne može donijeti obzirom da se radi o dva neovisna istraživanja koja su koristila različite sirovine (Talijanski rizling, Chardonnay, Sauvignon blanc) i koja su provedena tijekom različitih godina (2019. i 2020.), kao i u različitim laboratorijima.

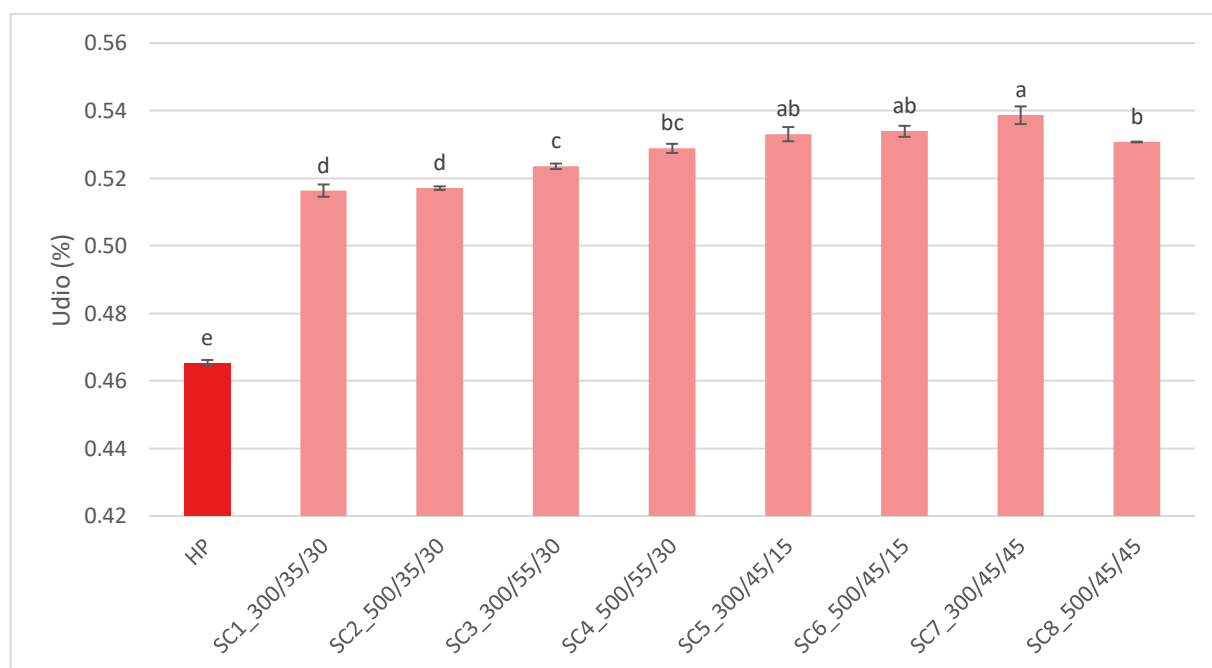


Slika 10. Udio stearinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ilja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Promatranjem utjecaja tlaka na ekstrakciju SC CO₂ u ovom istraživanju, povećanje tlaka s 300 na 500 bara uz konstantni protok i temperaturu rezultiralo je povećanjem udjela stearinske kiseline. Isti trend uočili su Zaidul i sur. (2007) za ulje palminih koštica gdje također povećanjem tlaka dolazi do povećanja udjela stearinske kiseline. Promjena temperature s 35 na 55 °C pri konstantnom tlaku od 300 i 500 bara i protoku od 30 g/min utječe na smanjenje stearinske kiseline što je također potvrđeno istraživanjem Zaidul i sur. (2007), koji su utvrdili niži udio stearinske kiseline u palminom ulju ekstrahiranom pri konstantnom tlaku, a uz povećanje temperature od 40,05 do 80,5 °C. Povećanjem protoka s 15 na 45 g/min došlo je i do povećanja udjela stearinske kiseline, što je vjerojatno posljedica povećanja topljivosti zbog povećanja vanjskih i unutarnjih prijenosa mase (Duba i Fiori, 2015).

Udio linolenske kiseline u ulju sjemenke grožđa sorte Graševina prikazan je na slici 11. Njen udio općenito iznosi 0,3-1,8 % (Lampi i Hainonen, 2009) što odgovara vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju (0,47-0,54 %). Vidljiv je i utjecaj ekstrakcije (slika 11) gdje udio linolenske kiseline u hladno prešanom ulju iznosi 0,47 % što je značajno manje nego u ulju ekstrahiranim SC CO₂. Značajno različiti trendovi očituju se i kroz procesne parametre: najveći udio linolenske kiseline u ulju ekstrahiranim SC CO₂ je određen u ulju dobivenom ekstrakcijom pri tlaku od 300

bara, temperaturi 45 °C i protoku 45 g/min i iznosi 0,54 %, dok je najmanji udio utvrđen u ulju dobivenom pri tlakovima od 300 i 500 bara, temperaturi 35 °C i protoku od 30 g/min. Sličan trend utvrdili su Bjelica i sur. (2019) u hladno prešanom ulju sjemenke grožđa gdje je udio linolenske kiseline iznosio 0,19 %, a Dimić i sur. (2020) u ulju ekstrahiranim SC CO₂ iznose udio linolenske kiseline 0,23 %. Usporedbom utjecaja tlaka pri 300 i 500 bara uz konstantan protok od 30 g/min i temperaturu 35 i 55 °C dolazi do povećanja udjela linolenske kiseline što je potvrđeno u radu Piras i sur. (2009), koji su istraživali utjecaj ekstrakcije SC CO₂ na ulje pšenične klice. Pritom su utvrdili kako povećanjem tlaka s 200 na 300 bara pri temperaturi od 40 °C dolazi do povećanja udjela linolenske kiseline.



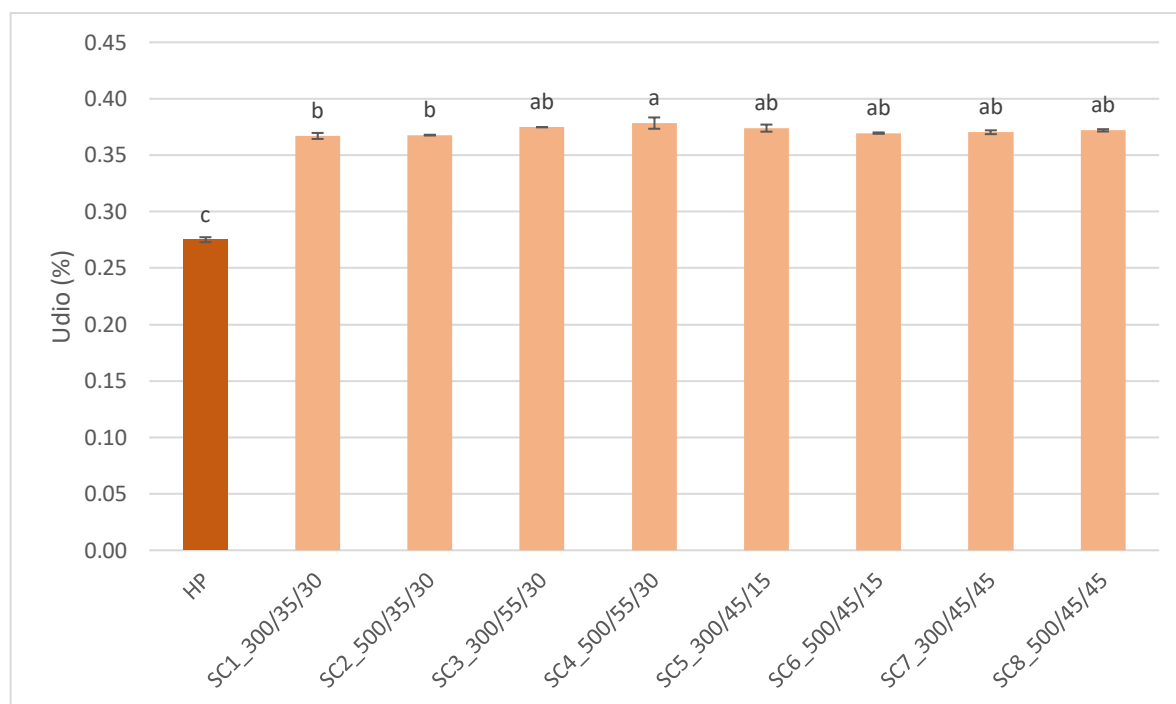
Slika 11. Udio linolenske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Nadalje, na slici 11 je vidljivo kako promjenom temperature s 35 na 55 °C u uvjetima konstantnog tlaka od 300 i 500 bara i protoka od 30 g/min također dolazi do povećanja udjela linolenske kiseline. Suprotan trend primijetili su Coelho i sur. (2017) na ulju sjemenke grožđa gdje je povećanjem temperature 39,85 na 59,85 °C pri tlakovima od 300 i 400 bara došlo do neznatnog smanjenja udjela linolenske kiseline što znači da pri je nižoj temperaturi udio kiseline veći, a Acevedo-Correa i sur. (2018) to objašnjavaju kao povećanje moći otapanja zbog povećane gustoće CO₂ pri nižim temperaturama. Isti trend utvrdili su Santos i sur. (2020) gdje

se pri ekstrakciji ulja iz sjemenki *Cnidoscolus quercifolius* povećanjem temperature s 40 na 60 °C povećao i udio linolenske kiseline. Utjecaj protoka plina na udio ove masne kiseline nije uniforman. Tako je pri tlaku od 500 bara i temperaturi od 45 °C veći udio linolenske kiseline rezultirao primjenom protoka od 15 g/min nego kod protoka od 45 g/min. S druge strane, kod ekstrakcije pri tlaku 300 bara i temperaturi 45 °C veći udio linolenske kiseline utvrđen je pri protoku CO₂ od 45 g/min. Machmuhad i sur. (2007) istražili su utjecaj protoka na ulje sjemenki šipka dobivenog SC CO₂ ekstrakcijom pri protocima od 2, 3 i 4 mL/min, a pri tlaku od 450 bara i temperaturi od 80 °C te su zaključili da se povećanjem protoka povećava i udio linolenske kiseline.

Slika 12 prikazuje udio (%) palmitoleinske kiseline u hladnom prešanom te SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa sorte Graševina. Općenito, prema Kapcsándi i sur. (2012) udio ove kiseline u ulju sjemenke grožđa iznosi od 0,10-0,22 %, a prema Juhaimi i Özcan (2017) od 0,11-47 %, dok u ovom istraživanju nalazi se u rasponu od 0,28-0,38 %. Utjecaj procesa ekstrakcije je vidljiv na samom grafu, pri čemu je hladno prešano ulje karakterizirano nižim udjelom palmitoleinske kiseline (0,28 %) dok je u uljima ekstrahiranim SC CO₂ ova kiselina određena u rasponu 0,37-0,38%. Juhaimi i Özcan (2017) u svom istraživanju navode da je udio palmitoleinske kiseline u hladno prešanom ulju (ovisno o sortama grožđa) od 0,11-0,47 %, dok je u ulju ekstrahiranom SC CO₂ (uz različite procesne parametre) taj udio iznosio 0,21-0,29 % (Pérez i sur., 2015). Razlika među udjelima, iako minimalna, značajna je i kod SC CO₂ ekstrakcije gdje je najmanji udio od 0,37 % određen u uzorcima dobivenim pri tlakovima od 300 i 500 bara, temperaturi 35 °C i protoku 30 g/min, dok je najveći udio od 0,38 % utvrđen u uzorku ekstrahiranom pri tlaku od 500 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min. Također, različiti trendovi mogu se primijetiti i kod utjecaja tlaka na udio palmitoleinske kiseline. Pri konstantnoj temperaturi (35 i 55 °C) i protoku (30 g/min), dolazi do povećanja udjela palmitoleinske kiseline promjenom tlaka s 300 na 500 bara. Suprotan trend su utvrdili Coelho i sur. (2017) u svom istraživanju, gdje se povećanjem tlaka s 200 bara na 400 bara smanjio udjel palmitoleinske kiseline u ulju sjemenke grožđa pri konstantnim uvjetima temperature (35 i 55 °C) i protoka (30 g/min). Nadalje, promatrajući utjecaj temperature može se primijetiti da povećanjem temperature [uz konstantan protok (30 g/min) i tlak (300 i 500 bara)] s 35 na 55 °C također dolazi do povećanja udjela palmitoleinske kiseline. Isti trend primijetili su Botelho i sur. (2014) u ulju sjemenki crnog sezama gdje promjenom temperature s 40 na 60 °C pri konstantnom tlaku od 200 bara i protoku $3,54 \times 10^5$ g/min utvrdili povećanje udjela palmitoleinske kiseline.

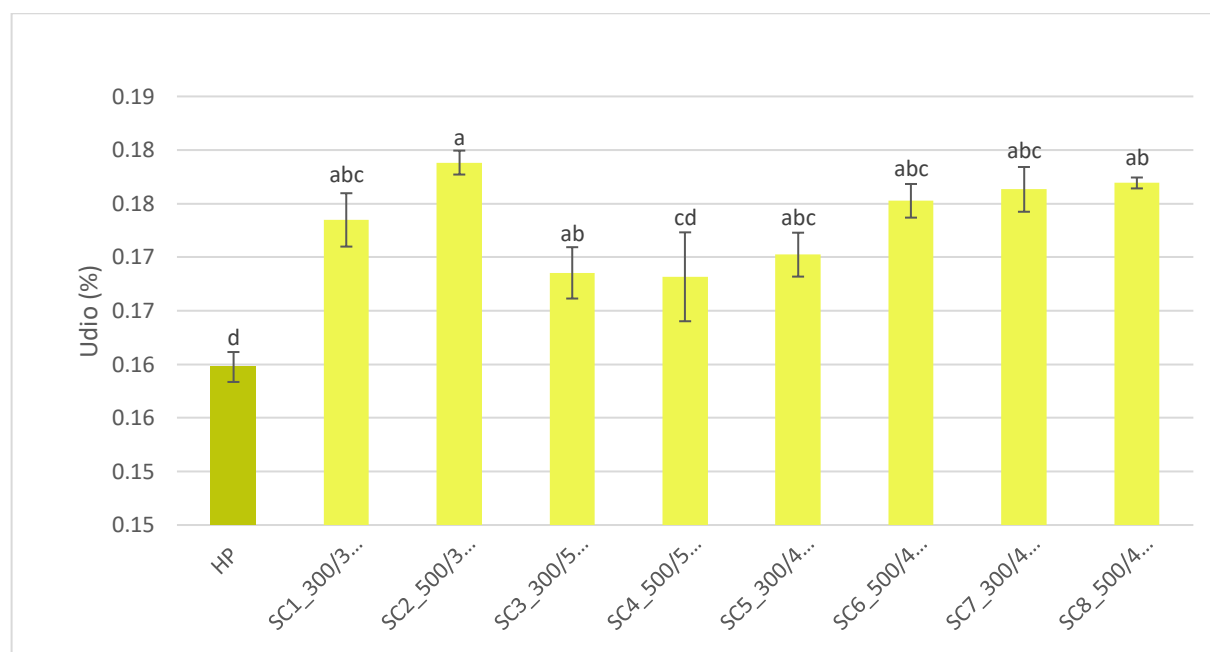
Uspoređujući utjecaj protoka na udio ove kiseline u ulju sjemenke grožđa sorte Graševina trendovi nisu uniformni i ne može se donijeti generalni zaključak. Pri tlaku od 500 bar i temperaturi 45 °C povećanje protoka s 15 na 45 g/min je rezultiralo povećanjem udjela palmitoleinske kiseline, dok povećanje protoka s 15 na 45 g/min pri tlaku od 300 bara i temperaturi od 45 °C je rezultiralo smanjenjem udjela ove kiseline.



Slika 12. Udio palmitoleinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Udio arahidske kiseline u ulju sjemenki grožđa sorte Graševina prikazan je na slici 13. Ovisno o sorti grožđa od koje je proizvedeno ulje, udio arahidske kiseline utvrđen je u rasponu 0,1-1,7 % (Crews i sur., 2006). Prethodno navedene vrijednosti su potvrđene i ovim istraživanjem gdje je udio arahidske kiseline u ulju sjemenki grožđa sorte Graševina utvrđen u rasponu 0,16-0,18 %. Jasno je vidljiv u utjecaj tehnike ekstrakcije pri čemu je hladno prešanje rezultiralo značajno nižim udjelom ove kiseline (0,16 %) nego postupak SC CO₂ ekstrakcije (0,18 %). Različiti trendovi se mogu vidjeti i obzirom na primijenjene procesne parametre SC CO₂: najvišim postotkom arahidske kiseline (0,16 %) rezultirali su eksperimenti primjenom tlaka od 500 bara, temperature 35 °C i protoka 30 g/min. dok je najniži postotak ove kiseline (0,18 %)

određen u uzorku ekstrahiranom primjenom tlaka od 500 bara, temperature 55 °C i protoka 30 g/min. Usporedbom udjela arahidske masne kiseline pri tlakovima od 300 i 500 bara, pri konstantnoj temperaturi od 35 °C i protoku 30 g/min dolazi do povećanja njenog udjela. Međutim, promjenom tlaka s 300 na 500 pri konstantnoj temperaturi od 55 °C i protoku 30 g/min dolazi do neznatnog smanjenja udjela arahidske kiseline. Sličan trend opazili su i Coelho i sur. (2017) usporedbom tlakova od 200 i 300 bara uz konstantan protok od $1,8 \times 10^3$ g/min i temperaturu od 39,85 °C gdje je došlo do povećanja udjela arahidske kiseline u ulju sjemenke grožđa.

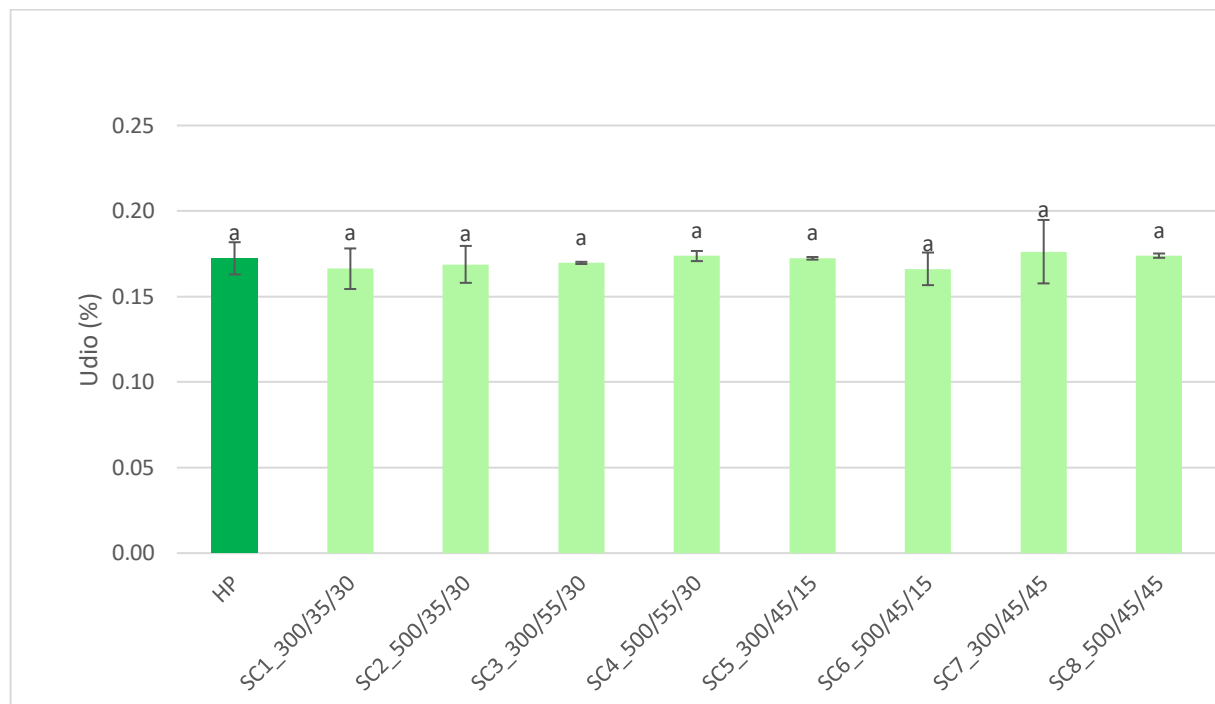


Slika 13. Udio arahidske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Uzimajući u obzir porast temperature s 35 na 55 °C vidljivo je kako pri tlaku od 500 i 300 bara i stalnom protoku od 30 g/min dolazi do povećanja udjela arahidske kiseline. Isti trend primijetili su i Jokić i sur. (2013) na sojinom ulju ekstrahiranom SC CO₂ gdje je porastom temperature s 39,85 na 59,85 °C pri konstantnom tlaku i protoku došlo i do porasta udjela ove kiseline. Osim navedenih procesnih parametara, vidljiv je i utjecaj protoka na udio arahidske masne kiseline. Promjenom protoka s 15 na 30 g/min pri konstantnom tlaku od 300 i 500 bara i temperaturi 45 °C dolazi do povećanja udjela arahidske masne kiseline. Pregledom literature

utvrđeno je kako ne postoje istraživanja koja su ispitivala utjecaj protoka SC CO₂ na udio arahidske kiseline u ekstrahiranom ulju.

Slika 14 prikazuje udio gadoleinske kiseline u ulju sjemenke grožđa sorte Graševina te je utvrđena u rasponu od 0,17-0,18 %. Navedeni trend odgovara istraživanju Crews i sur. (2016) u kojem je raspon gadoleinske kiseline 0,2-0,4 %, ovisno o sorti grožđa.

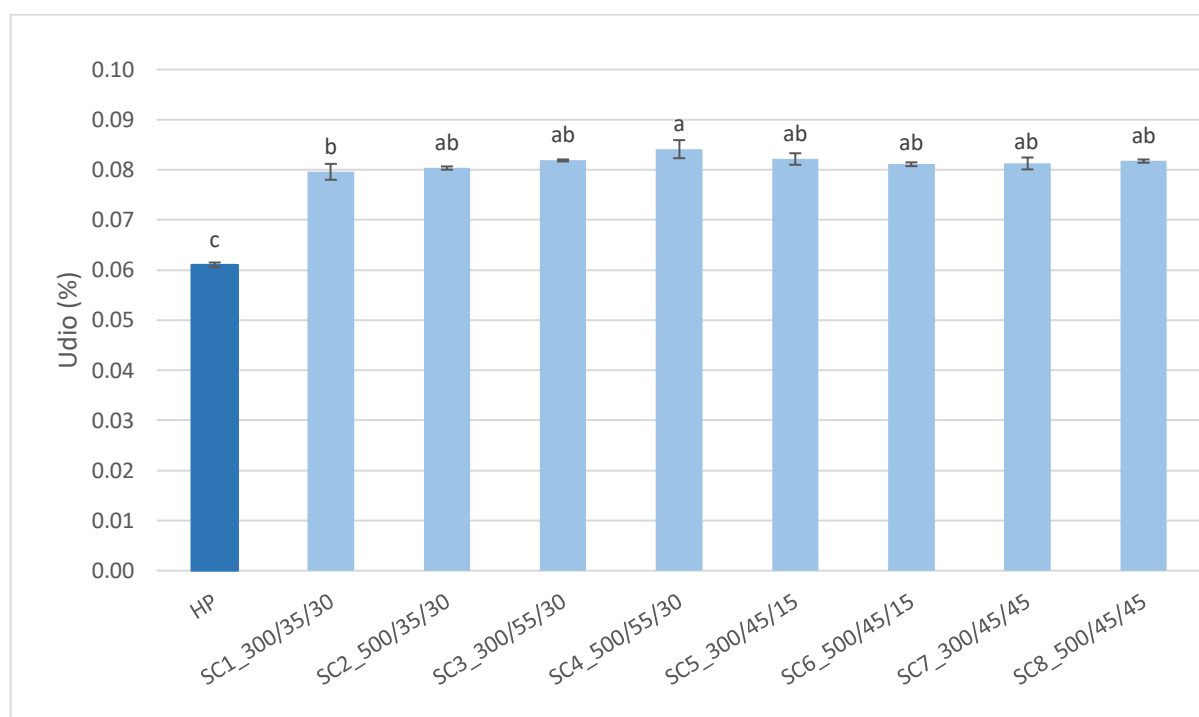


Slika 14. Udio gadoleinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Kao što se može vidjeti na prikazanim rezultatima, između hladno prešanog ulja te ulja dobivenog procesom SC CO₂ nema statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Za razliku od trenda dobivenog u ovom radu, dosadašnja istraživanja ističu kako je promjena određenih procesnih varijanti SC CO₂ tretmana rezultirala i promjenom u udjelu ove kiseline. Tako su npr. Coelho i sur. (2017) utvrdili da promjenom tlaka s 300 na 400 bara pri temperaturi od 39,85 °C i protoku $1,8 \times 10^3$ g/min dolazi do povećanja udjela gadoleinske kiseline. Nadalje, utvrdili su i da povećanjem temperature s 39,85 na 59,85 °C pri konstantnim tlakovima od 300 i 400 bara te protoku $1,8 \times 10^3$ g/min dolazi do smanjenja udjela ove kiseline.

Na slici 15 prikazan je udio miristinske kiseline u ulju sjemenke grožđa sorte Graševina. Njen udio u analiziranim uzorcima je 0,06-0,08 % što je potvrđeno istraživanjem Crews i sur.

(2017) koji su utvrdili udio ove masne kiseline u iznosu od 0,1 %, ovisno o sorti grožđa koja je korištena za proizvodnju ulja. S obzirom na način ekstrakcije ulja, na slici je vidljivo kako je značajno niži udio ove kiseline određen u hladno prešanom ulju (0,06 %), u usporedbi s SC CO₂ ekstrahiranim uzorcima (0,08 %). Nadalje, vidljivo je i kako su primijenjeni procesni parametri SC CO₂ postupka također rezultirali značajnim razlikama u udjelu ove kiseline. Tako je u uzorku ekstrahiranom upotrebom tlaka od 500 bara, temperature 55 °C i protoka 30 g/min utvrđen najviši udio miristinske kiseline (0,084 %), a pri tlaku od 300 bara, temperaturi 35 °C i protoku 30 g/min najmanji udio (0,079 %).



Slika 15. Udio miristinske kiseline (%) u hladno prešanom i SC CO₂ ekstrahiranim uljima sjemenke grožđa. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Povećanje tlaka sa 300 do 500 bara pri konstantnoj temperaturi (35 °C) i protoku (30 g/min) rezultiralo je i povećanjem udjela miristinske kiseline, što je u skladu s istraživanjem Coelho i sur. (2017) koji su također utvrdili povećanje udjela ove kiseline pri promjeni tlaka od 300 na 400 bara, a uz uvjete konstantne temperature od 59,85 °C i protoka $1,8 \times 10^3$ g/min. S druge strane, isti autori su utvrdili i suprotan trend, odnosno smanjenje udjela ove kiseline pri povećanju tlaka s 200 na 300 bara (konstantna temperatura od 39,85 °C i protok $1,8 \times 10^3$ g/min). Nadalje, utjecaj temperature također je vidljiv promjenom temperature s 35 na 55 °C pri

tlakovima od 300 i 500 bara i protoku 30 g/min gdje dolazi do povećanja udjela miristinske kiseline. Isti trend povećanja miristinske kiseline utvrdili su Coelho i sur. (2017) promjenom temperature s 39,85 na 59,85 °C pri tlaku od 400 bara i protoku 1,8 x10³ g/min, međutim ovi autori utvrdili su da promjenom temperature s 39,85 na 59,85 °C pri tlaku od 300 bara i protoku 1,8 x10³ g/min nije došlo do promjene udjela ove kiseline. Uspoređujući utjecaj protoka na udio miristinske kiseline u ulju sjemenki grožđa sorte Graševina uočavaju se različiti trendovi. Pri tlaku od 500 bara, temperaturi 45 °C povećanje protoka s 15 na 45 g/min rezultiralo je povećanjem udjela miristinske kiseline dok je povećanje protoka s 15 na 45 g/min pri tlaku od 300 bara i temperaturi od 45 °C rezultiralo smanjenjem udjela ove kiseline. Kao i u slučaju arahidske kiseline, pregledom literature je utvrđeno kako ne postoje istraživanja koja su ispitivala utjecaj protoka SC CO₂ na udio miristinske kiseline u ekstrahiranom ulju.

Ulje sjemenki grožđa ima veći udio višestruko nezasićenih masnih kiselina u odnosu na mononezasićene i zasićene masne kiseline i kao takvo preporučuje se za konzumaciju s obzirom da posjeduje povoljniji profil masnih kiselina u odnosu na druga ulja (Fernandes i sur., 2013). Konzumacijom ulja koja imaju visok udio zasićenih masnih kiselina (SFA) može doći do povećanja razine ukupnog i LDL kolesterola (LDL kolesterol se smatra "lošim kolesterolom" odgovornim za razvoj masnih naslaga u lumenu arterija, što dovodi do njihovog sužavanja), dok polinezasićene masne kiseline (PUFA) mogu sniziti razinu LDL kolesterola u krvi, ali istovremeno sniziti i HDL kolesterol (HDL kolesterol se naziva "dobar kolesterol" i može spriječiti razvoj opasnih masnih naslaga). Mononezasićene masne kiseline (MUFA) su najbolje vrste masnih kiselina jer snižavaju LDL kolesterol, a povećavaju HDL kolesterol. Za idealan omjer LDL/HDL u krvi potreban je odgovarajući unos i PUFA i SFA, jer ove obje kategorije pridonose regulatornoj ravnoteži u metabolizmu lipoproteina (Mishra i Manchanda, 2012). Tablica 5 prikazuje sumarne vrijednosti pojedinih skupina masnih kiselina: zasićene, mononezasićene i polinezasićene kiseline u uljima proizvedenim hladnim prešanjem te SC CO₂ postupkom. Utjecaj ekstrakcije je vidljiv pri različitim udjelima zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih kiselina gdje je udio zasićenih i mononezasićenih veći kod SC CO₂ ekstrakcije, a udio polinezasićenih kod hladnog prešanja. Najveći udio zasićenih masnih kiselina prisutan je u uzorku ekstrahiranom pri tlaku od 500 bara, temperaturi 45 °C i protoku 45 g/min, a najmanji u onom dobivenom SC CO₂ ekstrakcijom pri tlaku od 300 bara, temperaturi 35 °C i protoku 30 g/min. Najveći udio mononezasićenih masnih kiselina utvrđen je u uzorku ulja ekstrahiranom pri tlaku od pri tlaku od 500 bara, temperaturi 45 °C i protoku 45 g/min, a najmanji u onom

dobivenom primjenom tlaka od 300 bara, temperature 55 °C i protoku 30 g/min. Najveći udio polinezasićenih masnih kiselina u ulju dobivenom SC CO₂ ekstrakcijom je u onom uzorku dobivenom primjenom tlaka od 300 bara, temperature 55 °C i protoka 30 g/min, a najmanji primjenom tlaka od 500 bara, temperature 45 °C i protoka 45 g/min.

Tablica 5. Sumarne vrijednosti pojedinih skupina (zasićene, mononezasićene i polinezasićene kiseline) (hladno prešanje i SC CO₂ ekstrakcija)

	sumSFA	sumMUFA	sumPUFA
HP	2,9909 c	7,1908 d	33,2320 a
SC1	3,1873 b	7,2895 b	32,6910 bc
SC2	3,2002 ab	7,2787 b	32,6815 b
SC3	3,1965 ab	7,2579 c	32,7202 c
SC4	3,2106 ab	7,2760 bc	32,6649 c
SC5	3,1971 ab	7,2755 bc	32,6926 bc
SC6	3,1891 b	7,2892 b	32,6880 bc
SC7	3,2079 ab	7,3117 a	32,6168 d
SC8	3,2148 a	7,3134 a	32,6004 d

SumSFA- suma zasićenih masnih kiselina; sumMUFA- suma mononezasićenih masnih kiselina; sumPUFA- suma polinezasićenih masnih kiselina. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih ulja u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

U tablici 6 su prikazane *F*- i *p*- vrijednosti (ANOVA) utjecaja tlaka, temperature i protoka na sastav masnih kiselina. Kao što se može vidjeti u tablici, tlak je imao najmanji utjecaj na udio masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa. Jedino je značajno utjecao na udio linolne i arahidske kiseline te sumPUFA. Nadalje, od primijenjenih procesnih parametara temperatura je imala najznačajniji utjecaj na većinu masnih kiselina. U tablici je vidljivo kako utjecaj temperature nije signifikantan jedino u slučaju linolne te gadoleinske kiseline, a od sumarnih vrijednosti ovaj parametar ne utječe na sumSFA te na sumPUFA. Nadalje, promjena protoka CO₂ značajno je utjecala na sve sumarne vrijednosti (sumSFA, sumMUFA i sumPUFA), a od pojedinačnih masnih kiselina značajno je utjecao na udio stearinske, oleinske, linolne te arahidske kiseline.

Tablica 6: Suma *F*- i *p*- vrijednosti utjecaja tlaka, temperature i protoka plina na udio masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa

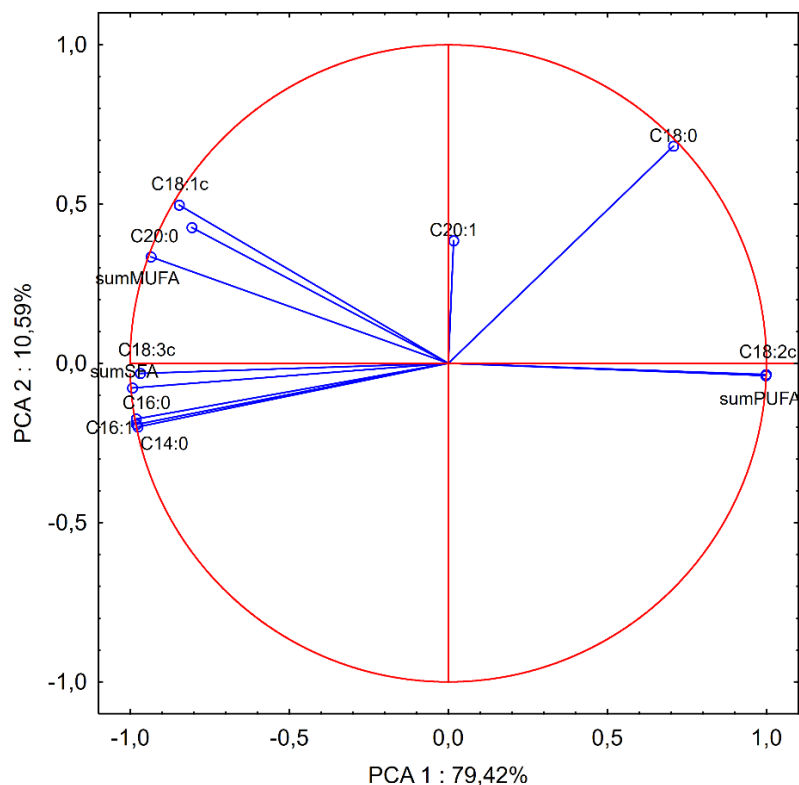
	Tlak (bar)		T (°C)		Protok CO ₂ (g/min)	
	<i>F</i> - vrijednost	<i>p</i> - vrijednost	<i>F</i> - vrijednost	<i>p</i> - vrijednost	<i>F</i> - vrijednost	<i>p</i> - vrijednost
C14:0	1,20291	0,294264	15,03808	0,002196	0,02771	0,870569
C16:0	0,15915	0,696948	11,23387	0,005762	0,69962	0,419255
C16:1	0,08448	0,776274	23,56003	0,000396	0,09857	0,758941
C18:0	4,39950	0,057801	35,77710	0,000064	21,10037	0,000618
C18:1c	2,24598	0,159801	16,17025	0,001696	27,96167	0,000192
C18:2c	9,02362	0,010986	0,02385	0,897826	67,12616	0,000003
C18:3n3	0,02898	0,867659	19,04755	0,000921	0,31802	0,583188
C20:0	4,83090	0,048316	20,90697	0,000641	5,16939	0,042161
C20:1	0,013004	0,911096	0,479073	0,502016	0,941706	0,350993
sumSFA	3,16726	0,100443	3,57910	0,082884	12,50086	0,004103
sumMUFA	2,17096	0,166380	9,97061	0,008257	30,75083	0,000127
sumPUFA	9,95713	0,008290	0,42741	0,525593	72,08661	0,000002

SumSFA- suma zasićenih masnih kiselina; sumMUFA- suma mononezasićenih masnih kiselina; sumPUFA- suma polinezasićenih masnih kiselina. Dva tlaka (300 i 500 bar), tri temperature (35, 45 i 55 °C) te tri protoka CO₂ (15, 30 i 45 g/min).

Nadalje, sva tri procesna parametra su imala značajan utjecaj jedino na udio arahidske kiseline, a istovremeno jedino na udio gadoleinske kiseline nisu značajno utjecali. Iako su temperatura i protok imali značajniji utjecaj na udio masnih kiselina, primjena određenih tlakova je također iznimno bitan procesni parametar jer značajno utječe na udio linolne kiseline, kvantitativno najvažnije masne kiseline u ulju sjemenki grožđa.

S ciljem mogućeg grupiranja uzoraka ovisno o primijenjenoj tehnici ekstrakcije, provedena je PCA (engl *Principal Component Analysis*, analiza glavnih komponenti) masnih kiselina u analiziranim uzorcima ulja. Na slici 16 prikazana je projekcija varijabli u prostoru osnovnih komponenti, pri čemu je vidljivo da prve dvije komponente objašnjavaju 90,01 % ukupne varijance. Na slici je vidljivo kako prva komponenta (PC1) snažno pozitivno korelira sa

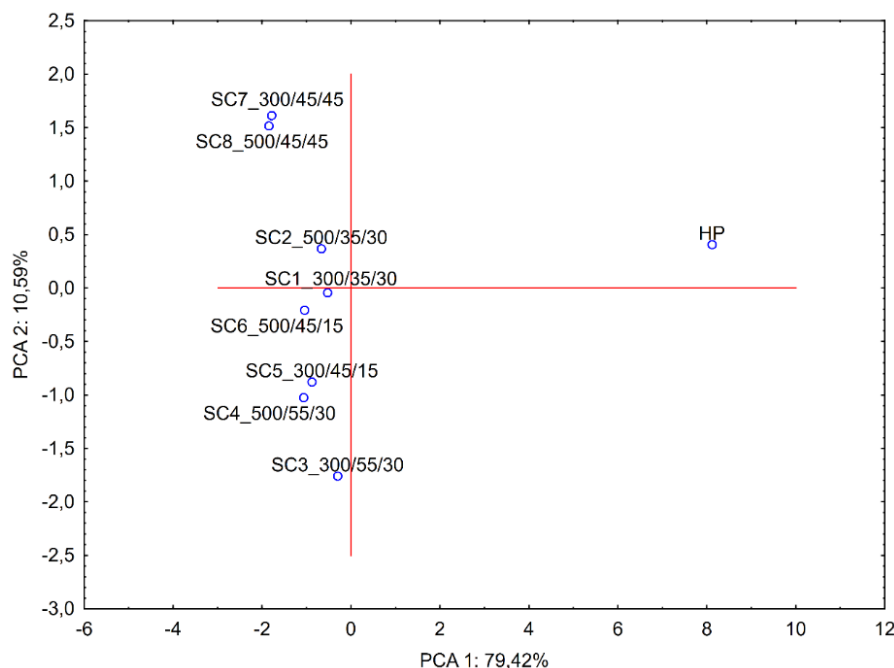
linolnom kiselinom (0,9987), sumPUFA (0,9980) te stearinskom kiselinom (0,7070). Nadalje, ista komponenta snažno negativno korelira sa sumSFA (-0,9929), palmitinskom kiselinom (-0,9809), palmitoleinskom kiselinom (-0,9803), miristinskom kiselinom (-0,9759), linolenskom kiselinom (-0,9682), sumMUFA (-0,9341) te oleinskom (-0,8458) i arahidskom kiselinom (-0,8062).



Slika 16. Projekcija varijabli u prostoru osnovnih komponenata (PC1 i PC2) masnih kiselina u ulju sjemenke grožđa

Slika 17 prikazuje projekciju uzoraka ulja proizvedenih hladnim prešanjem i SC CO₂ ekstrakcijom u prostoru osnovnih komponenata (PC1 i PC2) masnih kiselina u ulju sjemenke grožđa. Jasno je vidljivo razdvajanje uzoraka s obzirom na primijenjeni postupak proizvodnje, odnosno ekstrakcije ulja. Vidljivo je kako je hladno prešano ulje odvojeno od SC CO₂ ekstrahiranih. Hladno prešano ulje je smješteno u prvom kvadrantu, iznad druge komponente, što znači da je u tom uzorku utvrđena viši udio onih masnih kiselina koje pozitivno koreliraju s osi PC1, odnosno linolne i stearinske kiseline te sumPUFA. S druge strane, sva ulja dobivena SC CO₂ ekstrakcijom su smještena s lijeve strane PC1, odnosno te uzorke karakteriziraju viši udjeli onih masnih kiselina koje negativno koreliraju s tom osi, odnosno viši udjeli palmitinske, palmitoleinske, miristinske, linolenske, oleinske i arahidske kiseline te sumSFA i sumMUFA.

Nadalje, osim jasnog razdvajanja hladno prešanog od SC CO₂ ekstrahiranih uzoraka, na grafu je vidljivo kako je došlo i do grupiranja SC CO₂ uzoraka obzirom na primijenjene procesne parametre. Pritom je vidljivo kako su utjecaj temperature i protoka ključni za grupiranje uzoraka, dok primijenjeni tlakovi nisu imali utjecaj. Uzorci ulja dobiveni ekstrakcijom pri temperaturi 45 °C i protoku plina 45 g/min smješteni su u drugom kvadrantu, što znači da te uzorke karakterizira viši udio masnih kiselina koje negativno koreliraju s osi PCA 1, a pozitivno s osi PCA 2. Drugim riječima, ti uzorci su karakterizirani višim udjelima oleinske i arahidske kiseline te sumMUFA.



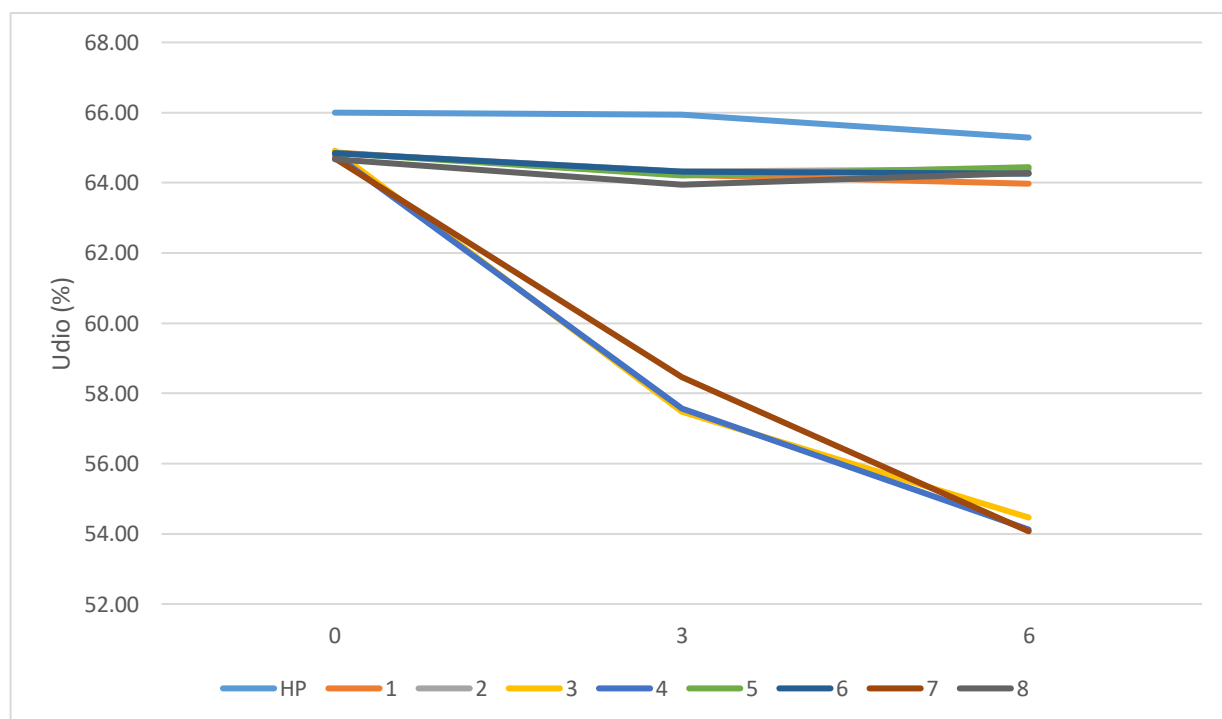
Slika 17. Projekcija varijabli u prostoru osnovnih komponenata (PC1 i PC2) masnih kiselina u ulju sjemenke grožđa

Osim navedenog, vidljivo je grupiranje uzoraka ekstrahiranim pri temperaturi 35 °C i protoku CO₂ 30 g/min, kao i onih dobivenih pri temperaturi 45 °C i protoku 15 g/min ovi uzorci su smješteni relativno blizu jedni drugima. I u konačnici, treća skupina uzoraka, dobivena ekstrakcijom SC CO₂ pri uvjetima temperature 55 °C i protoka 30 g/min je također je smještena u trećem kvadrantu, ispod prethodno spomenute dvije grupe uzoraka. Sve ove tri skupine uzoraka su smještene relativno blizu osi PCA 1, što znači da te uzorke karakteriziraju niži udjeli masnih kiselina koje pozitivno ili negativno vrlo dobro koreliraju s osi PCA 1. U prvom redu se tu radi o onim masnim kiselinama koje karakteriziraju prvu skupinu uzoraka (temperatura 45°C, protok 45 g/min), odnosno o palmitinskoj, palmitoleinskoj, miristinskoj, linolenskoj, oleinskoj i arahidskoj kiselini te sumSFA i sumMUFA.

4.2. PRAĆENJE STABILNOSTI ULJA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

U ovom radu praćena je stabilnost linolne kiseline kroz 6 mjeseci skladištenja pri dvije različite temperature (4 i 25 °C). Oksidacijska stabilnost predstavlja vrijeme u kojem se biljna ulja mogu saćuvati od procesa autooksidacije, a ovisi o vrsti ulja odnosno sastavu masnih kiselina, kao i o udjelu prirodnih antioksidanasa u ulju (Moslavac i Vuković, 2013). Kako se koncentracija nezasićenih dvostrukih veza povećava tako ulje postaje osjetljivije na oksidaciju (Kochhar, 2009).

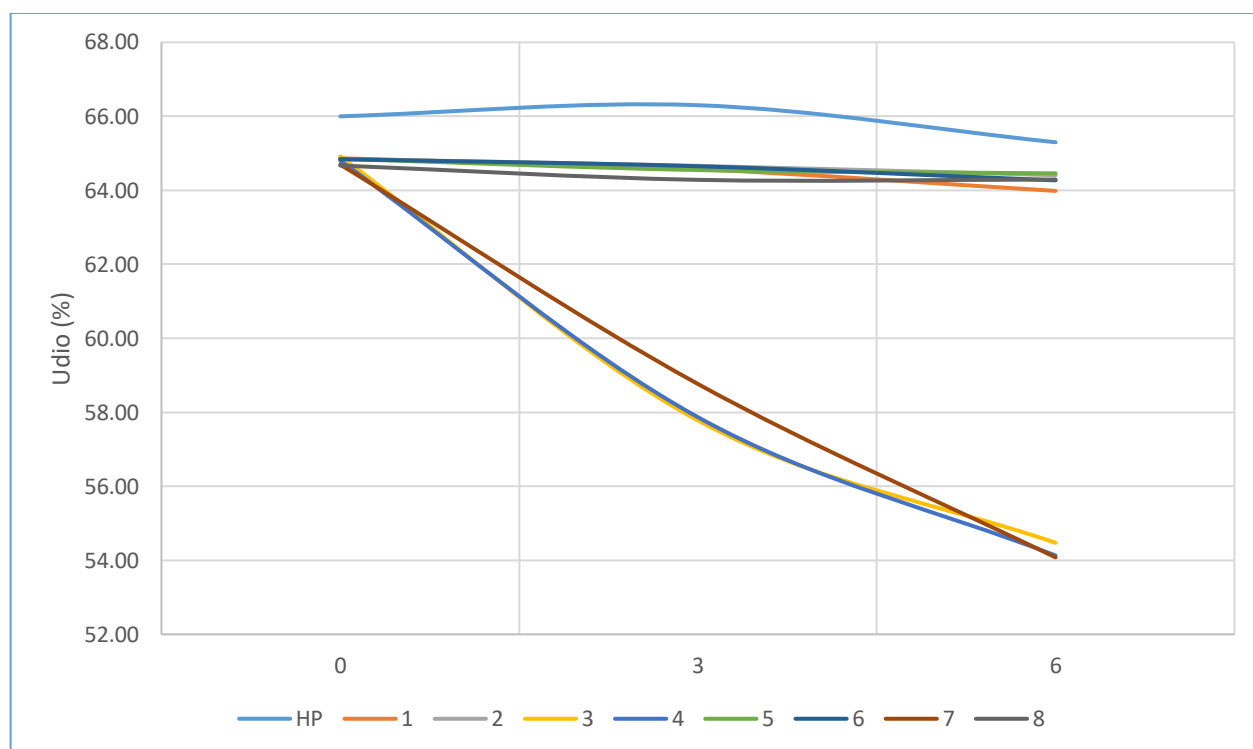
Slika 18 prikazuje udio linolne kiseline skladištene na 4 °C kroz 6 mjeseci. Najveći udio linolne kiseline je u hladno prešanom ulju te nije došlo do velikog smanjenja udjela tijekom 6 mjeseci. Promatrajući ulje ekstrahirano SC CO₂ najveći pad dogodio se pri tlaku od 500 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min. Također, znaćajan pad dogodio se i pri tlaku od 300 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min kao i pri tlaku od 300 bara, temperaturi 45 °C i protoku 45 g/min.



Slika 18. Udio linolne kiseline tijekom skladištenja ulja sjemenki grožđa na sniženoj temperaturi (4 °C)

Nadalje, slika 19 prikazuje udio linolne kiseline skladištene na 25 °C kroz 6 mjeseci te hladno prešano ulje ne pokazuje znaćajan pad udjela linolne kiseline. Najveći pad udjela linolne kiseline dogodio se u uzorku ekstrahiranom pri tlaku od pri tlaku od 300 bara, temperaturi 55 °C

i protoku 30 g/min, zatim u onom dobivenom pri tlaku od 300 bara, temperaturi 55 °C i protoku 30 g/min i tlaku od 300 bara, temperaturi 45 °C i protoku 30 g/min.



Slika 19. Udio linolne kiseline tijekom skladištenja ulja sjemenki grožđa pri sobnoj (25 °C) temperaturi

Uspoređujući udio linolne kiseline pri temperaturi od 4 i 25 °C ne dolazi do značajne promjene. Općenito, Kazaz i sur., 2009 u svom radu o utjecaju temperature i trajanja skladištenja na sastav eteričnog ulja ruže (terpeni) navode da se sastav ulja nije promijenio ovisno o temperaturama skladištenja (0 i 3 °C). Suprotan trend uočili su Mehdizadeh i sur. (2017) u eteričnom ulju kima gdje je došlo do boljeg očuvanja kvalitete ulja (terpeni) pri 4 °C nego pri 25 °C u periodu skladištenja od 6 mjeseci, kao i Clodoveo i sur. (2007) koji navode da je nakon 30 danja čuvanja maslinovog ulja pri sobnoj temperaturi u odnosu na 4 °C došlo do smanjenja kvalitete ulja (slobodne masne kiseline izražene kao % oleinske kiseline).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata nakon provedene ekstrakcije ulja sjemenki grožđa hladnim prešanjem i primjenom superkritičnog CO₂, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U ulju sjemenki grožđa sorte Graševina identificirane su sljedeće masne kiseline: linolna, oleinska, palmitinska, stearinska, arahidska, gadoleinska, linolenska, palmitoleinska i miristinska.
2. Hladno prešanje je rezultiralo višim udjelima linolne, stearinske i gadoleinske masne kiseline, dok je ekstrakcija SC CO₂ rezultirala višim udjelima oleinske, palmitinske, linolenske, palmitoleinske i miristinske kiseline.
3. Ulje sjemenki grožđa ekstrahirano SC CO₂ bogatije je zasićenim (SFA) i mononezasićenim masnim kiselinama (MUFA), dok je hladno prešano ulje bogatije polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA).
4. Promjena parametara SC CO₂ ekstrakcije (tlaka, temperature i protoka CO₂) rezultirala je i različitim udjelima masnih kiselina, pri čemu je promjena temperature i protoka CO₂ imala značajniji utjecaj na njihov udio nego promjena tlaka.
5. Uvjeti SC CO₂ koji su rezultirali najvišim udjelom linolne kiseline u ulju sjemenki grožđa su tlak od 300 bara, temperatura od 55 °C te protok od 30 g/min.
6. Skoro sva ulja, obzirom na udio masnih kiselina, pogodna su za skladištenje i duže od 6 mjeseci s obzirom da nije došlo do značajnog smanjenja linolne kiseline, odnosno procesa oksidacije masnih kiselina.
7. Za donošenje općenitih zaključaka potrebno je provesti sveobuhvatno istraživanje koje će uključiti duži period skladištenja ulja kao i praćenje ostalih parametara kvalitete ulja.

6. LITERATURA

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

AL Juhaimi F, Geçgel Ü, Gülcü M, Hamurcu M, Özcan MM (2017) Bioactive Properties, Fatty Acid Composition and Mineral Contents of Grape Seed and Oils. *S Afr J Enol Vitic* **38**. <https://doi.org/10.21548/38-1-104>

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 Pres*, **42**. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13417>

Aladić K (2015) Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja (doktorska disertacija), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Arsić, A, Stojanović A, Mikić M (2019) Oleic Acid - Health Benefits and Status in Plasma Phospholipids in the Serbian Population. *Ser J Exp Clin Res* **20**, 3-8. <https://doi.org/10.1515/sjecr-2017-0077o>

Baydar NG, Akkur M (2001) Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turk J Agric For* **25**, 163-168.

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

Beveridge THJ, Girard B, Kopp T, Drover JCG (2005) Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *J Agr Food Chem* **53**, 1799–1804. <https://doi.org/10.1021/jf040295q>

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. *Nd Crop Prod* **129**, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.064>

Bjelica M (2019) Uticaj kvaliteta semenki grožđa na bioaktivne komponente i održivost hladno presovanog ulja (doktorska disertacija), Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Botelho JRS, Medeiros NG, Rodrigues AMC, Araújo ME, Machado NT, Guimarães Santos A, i sur. (2014) Black sesame (*Sesamum indicum L.*) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. *J Supercrit Fluid* **93**, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.008>

Brunner G (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J Food Eng* **67**, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>

Çakaloğlu B, Özyurt VH, Ötleş S (2018) Cold press in oil extraction. A review. *Ukr Food J* **7**, 640-654. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2018-7-4-9>

Cao X, i Ito Y (2003) Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **1021**, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.001>

Chin Chew S (2020) Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: Chemistry and functionality. *Food Res Int* **131**. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108997>

Choulis NH (2011) Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions. U: Aronson JK (ured.) Side Effects of Drugs Annual, Elsevier, str. 1009–1029. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53741-6.00049-0>

Clodoveo M, Delcuratolo D, Gomes T, Colelli G (2007) Effect of different temperatures and storage atmospheres on Coratina olive oil quality. *Food Chem* **102**, 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.035>

Coelho JP, Filipe RM, Robalo MP, Stateva RP (2017) Recovering value from organic waste materials: Supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds. *J Supercrit Fluid* **141**, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.008>

Coşge B, Gürbüz B, Kiralan M (2007) Oil Content and Fatty Acid Composition of Some Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Varieties Sown in Spring and Winter. *Int J Nat Eng Sci* **1**, 11-15.

Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, i sur. (2006) Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J Agr Food Chem* **54**, 6261–6265. <https://doi.org/10.1021/jf060338y>

Cvetanović A (2019) Extractions Without Organic Solvents: Advantages and Disadvantages. *Chemistry Africa* **2**, 343–349. <https://doi.org/10.1007/s42250-019-00070-1>

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 Lipophilic. *Antioxidants* **9**, 568. <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>

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

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

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

Europska komisija (2023) Poljoprivredna proizvodnja, Biljna proizvodnja i proizvodi biljnog podrijetla-Vino, https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/wine_hr. Pristupljeno 8. svibnja 2023.

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**, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.039>

Gambuś H, Borowiec F, Zając T (2003) Chemical composition of linseed with different colour of bran layer. *Pol J Food Nutr Sci* **53**, 67-70.

Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A (2016) Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights* **9**, 59-64. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32910>

Garcia-Lomillo J, Gonzalez-SanJose ML (2017) Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Food Sci Food Saf* **16**, 3-22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>

Gliszczynska-Swiglo A, Sikorska E, Khmelinskii I, Sikorski M (2007) Tocopherol content in edible plant oils. *Pol J Food Nutr Sci*, **57**, 157-161.

Górnaś P, Rudzińska M, Grygier A, Lācis G (2018) Diversity of oil yield, fatty acids, tocopherols, tocotrienols, and sterols in the seeds of nineteen interspecific grapes crosses. *J Sci Food Agr* **99**, 2078-2087. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9400>

ISO 5509:2000 Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acid.

Jokić S (2011) Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO₂ prešanja (doktorska disertacija), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Jokić S, Bijuk M, Aladić K, Bilić M, Molnar M (2015) Optimisation of supercritical CO₂ extraction of grape seed oil using response surface methodology. *Int J Food Sci Technol* **51**, 403–410. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12986>

Jokić S, Sudar R, Svilović S, Vidović, Bilić M, Velić D, Jurković V (2013) Fatty acid composition of oil obtained from soybeans by extraction with supercritical carbon dioxide. *Czech J Food Sci* **31**, 116–125. <https://doi.org/10.17221/8/2012-CJFS>

Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E (2018) Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, **5**, 81-88. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>

Kapcsándi V, Hanczné Lakatos E, Sik B, László AL, Székelyhidi R (2021) Characterization of fatty acid, antioxidant, and polyphenol content of grape seed oil from different *Vitis vinifera* L. varieties. *OCL* **28**, 6. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021017>

Karolyi D (2007) Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu **9**, 151-158. <https://hrcak.srce.hr/21310>

Kaur N, Chaudhary J, Jain A, Kishore L (2011) Stigmasterol: A Comprehensive Review. *Int J Pharm Sci Res* **2**, 2259-2265. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(9\).2259-65](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(9).2259-65)

Kazaz S, Erbas S, Baydar H (2009) The effects of storage temperature and duration on essential oil content and composition oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Turkish J Field Crops* **14**, 89-96.

Kochhar SP, Henry CJK (2009) Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. *Int J Food Sci Nutr*, **60**, 289–296. <https://doi.org/10.1080/09637480903103774>

Koski A, Psomiadou E, Tsimidou M, Hopia A, Kefalas P, Wahala K, i sur. (2002) Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur Food Res Technol* **214**, 294-298. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0479-5>

Kraljić K, Stjepanović T, Obranović M, Pospišil M, Balbino S, Škevin D (2018) Influence of conditioning temperature on the quality, nutritional properties and volatile profile of virgin rapeseed oil. *Food Technol Biotechnol* **56**, 562-572. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5738>

Lampi AM i Heinonen M (2009) Berry Seed and Grapeseed Oils. U: RA Moreau, AK Eldin (ured.) *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*, AOCS press str. 215–235. <https://doi.org/10.1016/b978-1-893997-97-4.50012-7>

Lovrić T, *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva* (2003) Hinus, Zagreb.

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>

Machmudah S, Kawahito Y, Sasaki M, Goto M (2007) Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *J Supercrit Fluid* **41**, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.12.011>

Malićanin, MV (2014) *Izolovanje i fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semena crvenih sorti grožđa* (doktorska disertacija), Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

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

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

Riedel H, Saw NMMT, Akumo DN, Kütük O, Smetanska I (2012) Wine as Food and Medicine. U: Valdez B, Schorr M, Zaltev R (ured.) Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, InTech, London, str. 399–418.

Mehdizadeh L, Ghasemi Pirbalouti A, Moghaddam M (2017) Storage stability of essential oil of cumin (*Cuminum Cyminum* L.) as a function of temperature. *Int J Food Prop*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354018>

Mironeasa S, Leahua A, Codină GG, Stroea SG, Mironeasab C (2010) Grape Seed: physico-chemical, structural characteristics and oil content. *J Agroalimnt Processes Technol* **16**, 1-6.

Mishra S, Manchanda S (2012) Cooking oils for heart health. *J Prev Cardiol* **1**

Molavac T, Vuković D (2013) Utjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost biljnih ulja u binarnoj smjesi sa sezamovim uljem. *Glasnik zaštite bilja* **6**, 32-41.

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>

Moslavac T, Pozderović A, Pichler A, Volmut K (2010) Utjecaj propil galata i ekstrakta ružmarina na oksidacijsku stabilnost smjese biljnih ulja. *Croat J Food Sci Technol* **2**, 18-25.

Nanni A, Parisi M, Colonna M (2017) Wine By-Products as Raw Materials for the Production of Biopolymers and of Natural Reinforcing Fillers: A Critical Review. *Food Sci Nutr* **57**, 1646-1661. <https://doi.org/10.3390/polym13030381>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 985, Palmitic Acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-Acid>. Pristupljeno 13.

travnja 2023.

Özvural EB, Vural H (2011) Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Science*, **88**, 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.022>

Perez C, Gil C, Blanch G Flores G (2015) Supercritical Fluid Extraction of grape seeds: Extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Food Funct* **6**. <https://doi.org/10.1039/C5FO00325C>

Pérez C, Ruiz del Castillo ML, Gil C, Blanch GP, Flores G (2015) Supercritical fluid extraction of grape seeds: Extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Food Funct* **6**, 2607-2613. <https://doi.org/10.1039/C5FO00325C>

Piras A, Rosa A, Falconieri D, Porcedda S, Dessì MA, Marongiu B (2009) Extraction of Oil from Wheat Germ by Supercritical CO₂. *Molecules* **14**, 2573-2581. <https://doi.org/10.3390/molecules14072573>

Pravilnik (2019) Pravilnik o jestivim uljima i mastima. Narodne novine 11, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_11_229.html. Pristupljeno 13. travnja 2023.

PubChem (2023) Palmitic Acid, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-Acid>. Pristupljeno 17. svibnja 2023.

PubChem (2023) Linoleic Acid, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linoleic-Acid>. Pristupljeno 17. svibnja 2023.

Rodríguez-Pérez C, García-Villanova B, Guerra-Hernández E, Verardo V (2019) Grape seeds proanthocyanidins: An Overview of In Vivo Bioactivity in Animal Models. *Nutrients* **11**. <https://doi.org/10.3390/nu11102435>

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

Saeidnia S, Manayi A, Gohari AR, Abdollahi M (2014) The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants* **4**, 590-609. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/7764>

Samman S, Chow JWY, Foster MJ, Ahmad ZI, Phuyal JL, Petocz P (2008) Fatty acid composition of edible oils derived from certified organic and conventional agricultural methods. *Food Chem*, **109**, 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.067>

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

Schwartz H, Ollilainen V, Piironen V, Lampi AM (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J Food Compos Anal* **21**, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.07.012>

Senyay-Oncel D, Ertas H, Yesil-Celiktas O (2011) Effects of Supercritical Fluid Extraction Parameters on Unsaturated Fatty Acid Yields of Pistacia terebinthus Berries. *J Am Oil Chem Soc* **88**, 1061–1069. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1753-0>

Shinagawa FB, De Santana FC, Torres LRB, Mancini-Filh J (2015) Grape seed oil: a potential functional food?. *Food Sci Tech* **35**, 399-406. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6826>

Šarolić M, Gugić M, Marijanović Z, Šuste M (2014) Virgin olive oil and nutrition, *Food Health Dis* **3**, 38-43. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/126239> (Datum pristupa: 02.05.2023.)

Tangolar, SG. Özoğul Y, Tangolar S, Torun, A (2009) Evaluation of fatty acid profiles and mineral content of grape seed oil of some grape genotypes. *Int J Food Sci Nutr* **1**, 32–39. <https://doi.org/10.1080/09637480701581551>

Valitova, JN, Sulkarnayeva AG, Minibayeva FV (2016) Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry* **81**, 819–834. <https://doi.org/10.1134/s0006297916080046>

Vanhanen L, Savage GP (2000) The potential of production of grape seed oil in New Zealand. U: Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand, Nutrition Society of New Zealand Annual Conference, Volume 25, New Zealand, str. 26-32.

Whelan J, Fritsche K (2013) Linoleic Acid, *Adv Nutr* **4**, 311–312, <https://doi.org/10.3945/an.113.003772>

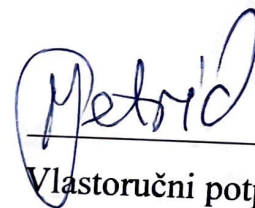
Yu J, .Ahmedna M (2012) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech* **48**, 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Zaidul ISM., Nik Norulain NA., Mohd Omar A K, Smith RL (2007). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *J Food Eng* **79**, 1007-1014. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.021>

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 Melita Petrić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Melita Petrić', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Vlastoručni potpis