

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Petra Roksandić

**UTJECAJ ULTRAZVUKA I HLADNOG
PREŠANJA NA SASTAV TOKOFEROLA I
TOKOTRIENOLA U ULJU SJEMENKI
GROŽĐA**

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

ZAHVALA

Prije svega, želim izraziti duboku zahvalnost svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Natki Ćurko, na stručnoj pomoći, podršci i vrijednim savjetima tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Filipu Dujmiću i dr. sc. Katarini Lukić na dragocjenoj pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela istraživanja.

Zahvaljujem se također i svojoj obitelji, a posebno majci i pokojnoj baki bez kojih moj završetak ovog studija ne bi bio moguć.

Na kraju, zahvaljujem svim profesorima, docentima i asistentima na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu koji su mi pružili potrebna znanja i vještine tijekom studiranja, što mi je omogućilo uspješno završavanje ovog diplomskog rada.

Hvala svima!

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 ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV TOKOFEROLA I TOKOTRIENOLA U
ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Petra Roksandić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0066264403

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ultrazvučnog predtretmana sjemenki komine grožđa sorte Graševina na sastav tokoferola i tokotrienola te antioksidacijski kapacitet hladno prešanog ulja. Parametri ultrazvučnog predtretmana sjemenki komine grožđa uključili su primjenu frekvencije od 37 i 80 kHz tijekom 30 i 90 minuta. Koncentracija tokoferola i tokotrienola u ulju određena je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz primjenu fluorescentnog detektora (UPLC-FLUO). Antioksidacijski kapacitet ulja određen je u lipofilnoj frakciji ulja L-ORAC metodom. Rezultati istraživanja pokazali su kako je primjena ultrazvučnog predtretmana rezultirala povećanjem koncentracije tokokromanola te povećanjem L-ORAC vrijednosti. Primjena ultrazvučnog predtretmana od 37 kHz rezultirala je značajno višim koncentracijama ukupnih tokoromanola, tokoferola, tokotrienola i antioksidacijskog kapaciteta od predtretmana frekvencije 80 kHz ($p < 0,05$). Najviše koncentracije tokokromanola ekstrahirane su u ulju sjemenki predtretiranih ultrazvukom frekvencije 37 kHz tijekom 30 minuta ($p < 0,05$).

Ključne riječi: ulje sjemenki grožđa, tokoferoli, tokotrienoli, predtretman ultrazvukom, hladno prešanje

Rad sadrži: 45 stranica, 15 slika, 2 tablice, 99 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 25. rujan 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

INFLUENCE OF ULTRASOUND AND COLD PRESSING ON THE COMPOSITION OF TOCOPHEROL AND TOCOTRIENOL IN GRAPE SEED OIL

Petra Roksandić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0066264403

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of ultrasonic pretreatment of Graševina grape pomace seeds on the composition of tocopherols and tocotrienols, as well as the antioxidant capacity of cold-pressed oil. Ultrasonic pretreatment was applied at frequencies of 37 and 80 kHz for 30 and 90 minutes. The concentration of tocopherols and tocotrienols in the grape seed oil was determined using ultra-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (UPLC-FLUO), while antioxidant capacity was determined using the L-ORAC method. The results showed that ultrasonic pretreatment increased the concentrations of tocopherols and L-ORAC values. The application of ultrasonic pretreatment at a frequency of 37 kHz resulted in significantly higher concentrations of total tocopherols, tocopherols, tocotrienols, and antioxidant capacity compared to pretreatment at a frequency of 80 kHz ($p < 0.05$). The highest concentrations of tocopherols were obtained with ultrasound pretreatment of 37 kHz for 30 minutes ($p < 0.05$).

Keywords: grape seed oil, tocopherols, tocotrienols, ultrasound pretreatment, cold pressing

Thesis contains: 45 pages, 15 figures, 2 tables, 99 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Natka Ćurko, PhD, Associate professor

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

Reviewers:

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

Thesis defended: September 25th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEMIJSKI SASTAV KOMINE GROŽĐA	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA	4
2.2.1. Tokoferoli i tokotrienoli ulja sjemenki grožđa.....	5
2.3. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE ULJA	8
2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije ulja	8
2.4 ULTRAZVUK I ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Sjemenke komine grožđa sorte Graševina	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Aparatura i pribor	17
3.2. METODE	19
3.2.1. Primjena ultrazvuka kao predtretmana hladnom prešanju.....	19
3.2.2. Ekstrakcija ulja sjemenki grožđa primjenom hladnog prešanja	20
3.2.3. Određivanje tokokromanola (tokoferola i tokotrienola) u ulju sjemenki grožđa primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)	21
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)	23
3.2.5. Obrada podataka.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1 UTJECAJ ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU TOKOKROMANOLA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA	25
4.2 UTJECAJ ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA SJEMENKI GROŽĐA	33
5.ZAKLJUČCI	35
6.LITERATURA	36

1. UVOD

Proizvodnja vina jedna je od vodećih gospodarskih grana, a prema posljednjim podacima Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (*International Organisation of Vine and Wine*, OIV) ukupna površina pod vinogradima u svijetu u 2023. godini iznosila je 7 201 944 ha te je u navedenoj godini proizvedeno 77 130 000 t grožđa i 237 340 000 hL vina. Industrija vina u Republici Hrvatskoj također je jedna od vodećih gospodarskih grana, a prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS), površine pod vinogradima u 2023. godini iznosile su 19 826 ha te je proizvedeno 94 905 t grožđa i 612 000 hL vina.

Komina grožđa je nusproizvod proizvodnje vina koji dobivamo prilikom prerade grožđa, odnosno nakon prešanja i fermentacije. Navedeni nusproizvod čini otprilike 20-25 % ukupne mase prerađenog grožđa pa vinska industrija na globalnoj razini godišnje stvara oko 5-6 000 000 t ovog otpada. Komina se sastoji uglavnom od pokožice grožđa (~ 75 % čvrstog otpada), te sjemenki grožđa (~ 28 % čvrstog otpada), dok preostali, manji dio čine pulpa i peteljke. Međutim, komina predstavlja visokovrijedni resurs s velikim potencijalom za daljnju upotrebu, zbog čega se danas sve manje tretira kao otpad. Suvremena proizvodnja stoga je usmjerena na pronalaženje održivih načina iskorištenja komine, čime se smanjuje ukupna količina otpada i dodaje vrijednost procesu proizvodnje vina. Stoga, istraživanje metoda za učinkovitu ekstrakciju i upotrebu biološki aktivnih spojeva iz komine postaje sve važnije, kako bi se iskoristio puni potencijal ovog vrijednog nusproizvoda. Jedan od vrijednih proizvoda koji se može dobiti iz sjemenki komine je ulje sjemenki grožđa. Proizvodnja ulja sjemenki grožđa iz komine ne doprinosi samo boljem upravljanju otpadom, već također stvara proizvod s dodanom vrijednošću, čime se potiče održivost i inovativnost u prehrambenoj industriji.

Proizvodnja ulja sjemenki grožđa najčešće uključuje ekstrakciju ulja primjenom hladnog prešanja koja je u usporedbi s ekstrakcijom organskim otapalima ekološki prihvatljivija, a rezultat je ulje s bogatijom aromatskom kompleksnošću te istaknutim voćnim notama. U posljednje vrijeme sve se više istražuju novije tehnike dobivanja ulja ili se primjenjuju različiti predtretmani kako bi se utjecalo na povećanje iskorištenja ekstrakcije te bolju nutritivnu vrijednost samog ulja. Neke od inovativnih tehnika koje su ranije primijenjene uključuju ekstrakciju superkričnim CO₂, kao i primjenu predtretmana pulsirajućim električnim poljem i visokonaponskog električnog pražnjenje, dok je primjena predtretmana ultrazvukom u potpunosti neistražena.

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj različitih predtretmana ultrazvukom (frekvencije 37 i 80 kHz, tijekom 30 i 90 min) na sastav tokoferola i tokotrienola te antioksidacijski kapacitet hladno prešanog ulja sjemenki grožđa sorte Graševina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJSKI SASTAV KOMINE GROŽĐA

Komina grožđa je nusprodukt koji nastaje tijekom procesa proizvodnje vina, a sastoji se u prvom redu od pokožice (do 65 % ukupne mase komine) i sjemenki grožđa (do 20 % ukupne mase komine) te u manjem dijelu od pulpe i/ili peteljki grožđa, čiji međusobni omjer primarno ovisi o sorti grožđa i fazi zrelosti te načinu proizvodnje vina. U proizvodnji crnih vina, kominu dobivamo nakon fermentacije i prešanja, dok se u proizvodnji bijelih vina komina dobiva direktno nakon prešanja, uslijed čega je i udio šećera u komini bijelog grožđa značajno veći (~ 38 % fruktoze i glukoze) (Skračić i sur., 2023).

Komina predstavlja nutritivno vrijednu sirovinu, a njezin kemijski sastav također ovisi o samoj sorti grožđa, godini berbe, fazi zrelosti, klimatskim uvjetima, vinogradarskom položaju te tlu, kao i postupku vinifikacije (Skračić i sur., 2023). Ovaj nusproizvod sadrži niz visokovrijednih sastojaka uključujući prehrambena vlakna, lipide, proteine, polifenolne spojeve i mineralne tvari. Prehrambena vlakna čine glavninu suhe tvari komine (172,8-887,0 g/kg), a sastoje se od celuloze i hemiceluloze odnosno netopivih vlakana (164,4-637,0 g/kg), dok su topiva vlakna prisutna u nižoj koncentraciji (7,2-127,8 g/kg), osobito u komini bijelog grožđa (Deng i sur., 2011). Također, navedena vlakna imaju veću nutritivnu vrijednost u usporedbi s prehrambenim vlaknima prisutnima u žitaricama uslijed prisutnosti polifenolnih antioksidansa (Mildner-Szkudlarz i sur., 2013). Također, udio vlakana u pokožici najčešće je veći od udjela u sjemenci i može doseći do 60 %, pri čemu su netopljiva vlakna dominantna. Pokožica je uglavnom sastavljena od celuloze i hemiceluloze (oko 30 %), pektinskih tvari (20 %), te sadrži lignine i netopljive proantocijanidine (15 %). S druge strane, udio vlakana u sjemenci najčešće nije veći od 35 % (Skračić i sur., 2023). Nadalje, uz vlakna, komina sadrži ugljikohidrate (122,0-405,3 g/kg), uključujući monosaharide poput fruktoze (3,8-89,1 g/kg) i glukoze (2,1-263,4 g/kg).

Lipidi komine smješteni su pretežno u sjemenci grožđa (11,4-139,0 g/kg), a čine ih glavninom polinezasićene i mononezasićene masne kiseline, gdje su najzastupljenije linolna i oleinska masna kiselina (Kammerer i sur., 2004).

Komina grožđa izrazito je bogata polifenolnim spojevima (2,8-87 g/kg), budući da se tijekom proizvodnje vina iz grožđa ekstrahira 40-60 % ovih spojeva. Polifenolni spojevi predstavljaju sekundarne biljne metabolite s bioaktivnim značajkama, koje dijelimo na neflavonoide i flavonoide. U komini grožđa i samom grožđu među neflavonoidima prevladavaju hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i stilbeni, dok su glavni flavonoidi komine i samog grožđa antocijani (pigmenti prisutni samo u crnom grožđu/komini crnog grožđa), flavan-3-oli (odgovorni za gorčinu i trpkocu) te flavonoli (Jackson, 2008). Detaljnijim uvidom u

polifenolni sastav grožđa, uočavaju se sličnosti, ali i razlike u sastavu između pokožice, puple i sjemenki bobice. Pokožica sadrži različite polifenolne spojeve, uključujući fenolne kiseline poput kafeinske, ferulinske, p-kumarinske i kaftarinske kiseline koje pripadaju hidroksicimetnim kiselinama, te galnu kiselinu koja pripada hidroksibenzojevim kiselinama. Među stilbenima se nalazi resveratrol, a antocijani mogu biti prisutni u slobodnom obliku (malvidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin) ili kao polimerni pigmenti. Flavan-3-oli u monomernom obliku uključuju katehin, epikatehin, epikatehin-galat i epigalokatehin, dok prevladavaju oligomeri i polimeri (proantocijanidini tj. tanini). U pokožici se također nalaze i flavonoli poput kvercetin-glukozida i miricetin-glukozida. Poput pokožice i pulpa bobice sadrži navedene hidroksicimetne kiseline, a uz galnu kiselinu među hidroksibenzojevim kiselinama pronalazimo i protokatehinsku, vanilinsku te siringinsku kiselinu. Sjemenka bobice najvećim dijelom sadrži flavan-3-ole, a u monomernom obliku prisutni su katehin, epikatehin i epikatehin-galat, dok su flavan-3-ol oligomeri i polimeri u sjemenci značajno manje zastupljeni nego u pokožici (Jackson, 2008).

Postotak proteina u komini može varirati od 9,28-14,41 %, pri čemu i pokožica i sjemenka imaju približno jednak udio proteina. Nadalje, udio pepela u komini grožđa kreće od 3,21-6,07 %, uz visoku koncentraciju kalija (11,84-27,18 g/kg), željeza (0,05-54,68 g/kg) i cinka (0,013-22,54 g/kg) (Antonić i sur., 2020; Mohamed-Ahmed i sur., 2020)

Vinska industrija na globalnoj razini generira 5-6 000 000 t komine godišnje, uslijed čega je današnja proizvodnja sve više usmjerena prema pronalasku načina za njezino iskorištenje s ciljem smanjenja štetnog utjecaja na okoliš. Naime, velike količine komine grožđa koje se odlažu na odlagališta tijekom sezone berbe mogu imati negativne učinke na biorazgradnju zbog niskog pH i prisutnosti polifenolnih antioksidansa (Bustamante i sur., 2008). Također, iako je komina grožđa bogata proteinima, uslijed visoke koncentracije polifenolnih spojeva se ne može koristiti kao stočna hrana. Mogućnosti iskorištenja komine stoga najčešće uključuju proizvodnju bioplina kao obnovljivog izvora energije te izolaciju brojnih bioaktivnih spojeva i njihovo daljnje uključivanje u proizvodnju fitokemikalija, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda (de Sá i sur., 2014). Najnovija istraživanja istaknula su značajne korisne učinke ulja sjemenki grožđa. Zahvaljujući prisutnosti hidrofobnih i lipofilnih komponenti, ulje sjemenki grožđa pokazuje izvanredan potencijal za poboljšanje zdravlja i prevenciju bolesti (Ismail i sur., 2016). Ovo ulje također može pronaći svoju ulogu kao dodatak u različitim prehrambenim proizvodima zbog visokog udjela polinezasićenih masnih kiselina, što ga čini privlačnim za potrošače koji preferiraju zdravije prehrambene opcije (Özvural i Vural, 2013). S obzirom na sve češću pojavu alergijskih reakcija i iritacija kože uzrokovanih sintetskim konzervansima poput parabena, potrošači sve više preferiraju prirodne proizvode, a kako je ulje sjemenki grožđa bogato prirodnim antioksidansima, ono može doprinijeti očuvanju kvalitete proizvoda. Također, ulje sjemenki grožđa može značajno poboljšati

organoleptičke karakteristike proizvoda, čineći ih privlačnijima potrošačima (Glampedaki i Dutschk, 2014). Surini i sur. (2018) naglašavaju da bi mikrokapsule ulja sjemenki grožđa mogle biti izvrstan kozmetički proizvod za hidrataciju kože, čime se dodatno proširuju mogućnosti njegove primjene. Osim toga, ulje sjemenki grožđa pokazuje potencijalnu primjenu i u akvakulturi. U nedavnom istraživanju, Arslan i sur. (2018) ispitivali su učinak dodatka ulja sjemenki grožđa na rast i razvoj kalifornijske pastrve, pri čemu je dodatak od 1 g/kg pozitivno utjecao na njihov rast. Navedena istraživanja ukazuju na široki potencijal upotrebe ulja sjemenki grožđa, ne samo u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, već i u poljoprivredi i akvakulturi, čime se dodatno povećava vrijednost komine grožđa kao resursa.

2.2. KEMIJSKI SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Sjemenka komine grožđa osnovna je sirovina za proizvodnju ulja sjemenki grožđa te predstavlja vrlo složeni biološki materijal koji sadrži oko 35 % vlakana, 11 % proteina, 3 % mineralnih tvari i 7 % vode te 2 % polifenolnih spojeva (Kammerer i sur., 2004), dok udio ulja najčešće iznosi oko 10-13 %, iako navedena vrijednost može varirati od 6-20 % (Dimić i sur., 2005). Također, ranije su istraživanja pokazala kako udio ulja ovisi o samoj sorti grožđa, dok razlike u udjelu ulja između crnih i bijelih sorti nisu utvrđene. Ulje sjemenki grožđa bogat je izvor nezasićenih masnih kiselina i lipofinih spojeva poput vitamina E te sterola dok su polifenoli hidrofilni antioksidansi u ovom ulju prisutni u nešto nižoj koncentraciji (Lachman i sur., 2015). U senzorskom smislu, rafinirano ulje opisuje se kao ulje s laganim, neutralnim mirisom i okusom, dok djevičansko ulje ima blagi miris s voćnim i orašastim notama, pri čemu boja varira od svijetlo žute do svijetlo zelene (Dimić i sur., 2005). Pardo i sur. (2009) proveli su senzorsko ocjenjivanje ulja koristeći 14 panelista. Nakon ocjenjivanja, zaključeno je da nerafinirano djevičansko ulje ima aromu srednjeg do visokog intenziteta. Posebna karakteristika ovog ulja je visoka točka dimljenja koja se kreće između 190-230 °C (Wada i sur., 2018).

U sastavu sjemenke komine grožđa prevladavaju mono- i polinezasićene masne kiseline, koje čine 90 % ukupnog udjela masnih kiselina, dok zasićene masne kiseline čine preostalih 10 %. Najzastupljenija masna kiselina je linolna kiselina (C18:2 ω -6), esencijalna masna kiselina koju organizam ne može sintetizirati te ju je potrebno unositi putem hrane, a čini 53,6-77,6 % masnih kiselina ulja sjemenki grožđa. Nakon linolne kiseline slijede oleinska kiselina (C18:1 ω -9) (16,2-31,2 %), palmitinska kiselina (C16:0) (6,9-12,9 %) i stearinska kiselina (C18:0) (1,44-4,69 %), dok je linolenska kiselina (C18:3), također esencijalna, prisutna u manjim količinama 0,2-0,91 % (Dabetic i sur., 2020; Sabir i sur., 2012). Ulje sjemenki grožđa obzirom na sastav masnih kiselina slično je suncokretovom ulju koje sadrži 60-70 % linolne i 15-25 % oleinske kiseline. Također, udio linolne kiseline u ulju sjemenki grožđa veći je nego

u ulju soje (48-59 %) i kukuruza (35-65 %) (Matthäus, 2008). Međutim, zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina, ova ulja su sklona oksidaciji, što može negativno utjecati na njihovu stabilnost i kvalitetu. Oksidativna stabilnost ovakvih ulja je niža u usporedbi s uljima koja imaju veći udio zasićenih ili mononezasićenih masnih kiselina, poput oleinske kiseline. Proces oksidacije može dovesti do stvaranja nepoželjnih spojeva, poput peroksida i aldehida, koji ne samo da pogoršavaju senzorske karakteristike ulja, već mogu imati i negativne učinke na zdravlje, uključujući povećani rizik od razvoja ateroskleroze i drugih degenerativnih bolesti. Zbog toga je važno zaštititi ovakva ulja od faktora koji pospješuju oksidaciju, kao što su svjetlost, toplina i prisutnost kisika (Jurić i sur., 2020; Matthäus, 2008). S druge strane, udio zasićenih masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa nešto je viši nego u ulju uljane repice, ali je usporediv s udjelom u većini jestivih biljnih ulja (Matthäus, 2008).

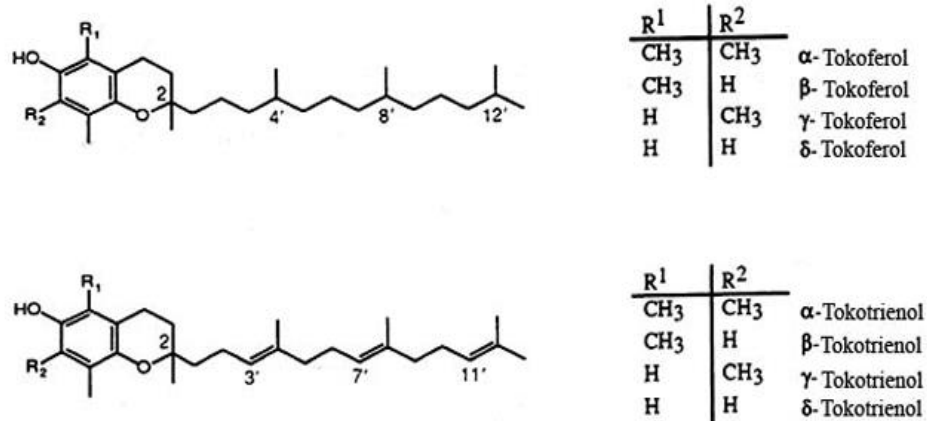
Steroli su lipofilni spojevi koji kominu grožđa čine izuzetno vrijednim nusproizvodom s visokim nutritivnim i zdravstvenim potencijalom (Antonić i sur., 2020). Pripadaju neosapunjivoj frakciji i prisutni su u udjelu od 0,8-1,5 %. Ranija istraživanja pokazala su kako je najzastupljeniji sterol u ulju sjemenki grožđa β -sitosterol, koji čini 68,2-86,3 % ukupnih sterola (Gornas i sur. 2019; Shinagawa i sur., 2018), a slijede ga stigmasterol i sitostanol (Crews i sur., 2006).

Ulje sjemenki grožđa također je bogato vitaminom E, pri čemu je većina u obliku nezasićenih tokotrienola, a manji dio u obliku tokoferola. Koncentracija vitamina E kreće se u rasponu od 0,05 do 0,53 g/kg ulja, a ovisi također o sorti, klimatskim uvjetima i načinu uzgoja (Shinagawa i sur., 2015). Koncentracija vitamina E u ovom ulju je značajno veća od koncentracija u maslinovom ulju (Matthäus, 2008).

2.2.1. Tokoferoli i tokotrienoli ulja sjemenki grožđa

Tokokromanoli su neosapunjivi negliceridni spojevi koje pronalazimo u svim biljnim uljima. Navedene spojeve dijelimo u dva razreda, tokotrienole i tokoferole, koji se međusobno primarno razlikuju u zasićenosti izoprenoidnog bočnog lanca, koji je kod tokoferola zasićen, a kod tokotrienola nezasićen (slika 1) (Dimić, 2005). Nadalje, izomerni oblici tokoferola i tokotrienola se razlikuju po broju i položaju metilnih skupina na fenolnom dijelu prstena, a označavaju kao α (5,7,8-trimetil), β (5,7-dimetil), γ (7,8-dimetil) i δ (8-metil).

Tokoferoli se međusobno razlikuju po biološkom (vitaminskom) i antioksidacijskom djelovanju, a pri tome je biološko djelovanje obrnuto proporcionalno antioksidacijskom djelovanju. Najbolji vitaminski učinak pokazuje α -tokoferol (vitamin E), zatim slijede β -, γ - i δ -tokoferol, a ukupna aktivnost se izražava u ekvivalentima α -tokoferola. Kod antioksidacijskog djelovanja, najjači učinak imaju δ - i γ -tokoferol (Dimić, 2005).



Slika 1. Strukturne formule tokoferola i tokotrienola (Dimić, 2005)

Tokoferoli, su važni sastojci biljnih ulja jer pripadaju skupini prirodnih antioksidansa i sprječavaju oksidaciju ulja kroz nekoliko mehanizama. Lipidne molekule, posebno nezasićene masne kiseline prisutne u biljnim uljima, sklone su oksidaciji zbog svojih dvostrukih veza. Ove veze lako reagiraju sa slobodnim radikalima, stvarajući perokside, aldehide i ketone. Tokoferoli neutraliziraju slobodne radikale tako što im doniraju proton, čime sprječavaju početak oksidacijskih reakcija koje bi oštetile lipidne molekule. Osim toga, tokoferoli imaju sposobnost regeneracije, što im omogućuje da ponovno postanu aktivni antioksidansi i nastave neutralizirati radikale, čime povećavaju svoju učinkovitost u dugotrajnom sprječavanju oksidacije. Također, kroz interakciju s lipidnim molekulama, tokoferoli pomažu stabilizirati njihove strukture. Oni mogu smanjiti reaktivnost dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama, čime se smanjuje njihova sklonost prema daljnjoj oksidaciji. Smanjenjem brzine oksidacije i stabiliziranjem lipidnih struktura, tokoferoli produžuju dulji rok trajanja biljnog ulja. Stabilnija ulja ne samo da duže zadržavaju svoje nutritivne vrijednosti, nego također duže ostaju organoleptički prihvatljiva, što znači da duže zadržavaju svoj okus, miris i boju (Hamm i sur., 2013).

Ranija istraživanja pokazala su varijabilnost u koncentraciji tokokromanola (tokoferola i tokotrienola) ulja sjemenki grožđa ovisno o sorti grožđa i godini berbe grožđa, ali i metodi ekstrakcije ulja (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013; Sabir i sur., 2012). Primjerice, istraživanje Sabir i sur. (2012) provedeno na ulju sjemenki grožđa ekstrahiranom pomoću Soxhlet metode na ukupno 21 sorti grožđa pokazalo je kako je najzastupljeniji tokoferol bio α-tokoferol. Navedeni tokoferol bio je prisutan u koncentraciji od 0,0135-0,2605 g/kg, a slijedio ga je γ-tokoferol u koncentraciji 0,0137-0,0302 g/kg. S druge strane, β-tokoferol i δ-tokoferol bili su prisutni vrlo malim koncentracijama (0,0005-0,175 g/kg i 0,0005-0,00146 g/kg) (Sabir i sur., 2012).

Nadalje, istraživanje Fernandes i sur. (2013) provedeno na ulju sjemenki grožđa 10 različitih sorti grožđa pokazalo je također vrlo slične trendove: α -tokoferol detektiran u koncentraciji od 0,0855-0,244 g/kg, γ -tokoferol od 0,0045-0,045 g/kg, dok je δ -tokoferol pronađen u tragovima, a β -tokoferol nije detektiran. Najzastupljeniji tokokromanol u ulju sjemenki grožđa bio je γ -tokotrienol prisutan u koncentraciji od 0,499-1,575 g/kg, nakon čega su slijedili α -tokotrienol (0,069-0,319 g/kg), δ -tokotrienol (0,006-0,0175 g/kg) i β -tokotrienol (0,004-0,023 g/kg) (Fernandes i sur., 2013).

Također, istraživanje Górnaš i sur. (2019) provedeno na ulju sjemenki 19 različitih sorti grožđa pokazalo je kako je α -tokoferol najzastupljeniji tokoferol (0,0052-0,674 g/kg), nakon čega slijedi γ -tokoferol (0,0001-0,0675 g/kg), dok β -tokoferol i δ -tokoferol nisu detektirani u nekim uzorcima pri čemu je njihova najveća zabilježena koncentracija iznosila 0,0012 g/kg. Među tokotrienolima, najzastupljeniji je bio γ -tokotrienol (0,0287-0,2572 g/kg), zatim α -tokotrienol (0,0084-0,0779 g/kg), δ -tokotrienol (0,0007-0,0136 g/kg) i β -tokotrienol (0,0001-0,0046 g/kg).

Iz navedenih istraživanja vidljivo je kako je najzastupljeniji tokokromanol u ulju sjemenki grožđa γ -tokotrienol, prisutan u širokom rasponu od 0,0287-1,575 g/kg (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013), a dalje ga slijede α -tokotrienol (0,0084-0,319 g/kg) te α -tokoferol 0,0052-0,2605 g/kg (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013; Sabir i sur., 2012).

Prilikom usporedbe ulja sjemenki grožđa s drugim biljnim uljima vidljive su određene razlike u koncentraciji vitamina E. Prema istraživanju Gliszczyńska-Świgło i sur. (2007), ulje sjemenki grožđa, iako sadrži manje ukupnih tokoferola u odnosu na druga ulja, ističe se po visokom udjelu β , γ i δ -tokoferola u odnosu na maslinovo ulje. Uz to, koncentracija α -tokoferola u ulju sjemenki grožđa je veća nego u lanenom ulju, gdje α -tokoferol uopće nije nedetektiran.

S druge strane, istraživanje Matthäus (2008) pokazuje da ulje sjemenki grožđa ima najviši udio tokotrienola među proučavanim uljima, uključujući maslinovo, sojino, suncokretovo, laneno i konopljino ulje, a posebno se ističe visok udio α -tokotrienola.

2.3. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE ULJA

2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije ulja

U konvencionalne metode dobivanja ulja ubrajamo metode prešanja i ekstrakciju organskim otapalima. Odabir odgovarajuće metode ovisi o više čimbenika, a ključni među njima je udio ulja u sjemenu. Kod sjemenki s udjelom ulja od 30 % ili više, preferira se postupak prešanja (ekstrakcijom neće doći do potpune difuzije), dok se za sjemenke s manje od 20 % ulja preporučuje ekstrakcija organskim otapalima tijekom kojeg se postiže termodinamička ravnoteža. Naime, tijekom prešanja u sačmi ostaje 5-10 % od ukupnog udjela ulja te će masa ulja biti 2-3 puta manja od mase pogače, proces je energetski zahtjevniji i skuplji za održavanje u usporedbi s ekstrakcijom otapalima, koja ima više početne troškove, ali se troškovi smanjuju s povećanjem kapaciteta. Ekstrakcija otapalima donosi značajno veći prinos ulja, pri čemu sačma sadrži samo 1 % ulja, a troškovi proizvodnje su manji (Rac, 1964).

S druge strane, kod proizvodnje hladno prešanog ulja važno je paziti na kvalitetu sjemena (tehnološku zrelost, uvjete uzgoja bez pesticida i kontaminanata, adekvatne uvjete skladištenja) (Rac, 1964). Međutim, iako proces hladnog prešanja ima znatno niži prinos ulja, njegova kvaliteta nadmašuje kvalitetu ulja dobivenog metodom ekstrakcije otapalima te je u skladu s ekološkim standardima. Primjerice, ekstrakcija ulja sjemenki grožđa primjenom hladnog prešanja bez toplinske ili kemijske obrade rezultat će višom koncentracijom lipofilnih antioksidansa (tokoferola) te većim intenzitetom aroma s naglašenim voćnim i vinskim notama (Dimić i sur., 2020). Prešanje je također bolji odabir ako se radi o manjim kapacitetima proizvodnje (zbog manjih početnih troškova), a dobivena pogača je veće energetske vrijednosti (Rac, 1964).

Metoda prešanja uključuje kontinuirane preše (pužne ili ekspeler preše), a prešanje se može provoditi u dva stupnja ili jednostruko za manje kapacitete te primjenom hidrauličkih preša otvorenog ili zatvorenog tipa. Ekstrakcija organskim otapalima provodi se u ekstraktorima koji mogu biti diskontinuirani (perkolacioni tzv. baterijska ekstrakcija) i kontinuirani (De-smet, Rotacel). Najčešće korištena otapala su petroleter, heksan i benzin. Dobivena miscela (smjesa ulja i otapala) prolazi kroz pročišćavanje kako bi se odvojilo ulje od otapala, gdje je dobiveno sirovo ulje koje obavezno dalje prolazi proces rafinacije (degumiranje ulja radi uklanjanja sluznih tvari; neutralizaciju radi uklanjanja slobodnih masnih kiselina nastalih hidrolizom triacilglicerola; bijeljenje kako bi se eliminirali pigmenti, hidroperoksidi, tragovi metala, preostali sapuni i kontaminanti; vinterizaciju gdje se uklanjaju voskovi i triacilgliceroli visokog tališta; deodorizaciju kojom se uklanjaju neugodni mirisi) te u konačnici stabilizaciju i bistrenje rafiniranog ulja (Rac, 1964).

2.3.2. Inovativne metode ekstrakcije ulja

Obzirom da konvencionalne metode ekstrakcije ulja imaju svoja ograničenja (poput dugotrajnosti procesa, potrebe za velikom količinom otapalom, nedovoljne selektivnosti te opasnosti od termičke razgradnje osjetljivih spojeva) danas se sve više primjenjuju nove, ekološki prihvatljive metode ekstrakcije čije prednosti su smanjenje ili eliminacija upotrebe organskih otapala, smanjenje vremena potrebnog za ekstrakciju te poboljšanje iskorištenja uz postizanje odgovarajuće kvalitete ulja (Shahid i sur., 2016). Ove tehnike se primjenjuju kao alternativa tradicionalnim metodama (ekstrakcija superkričnom tekućinom) ili kao predtretman ranije navedenim konvencionalnim metodama (ekstrakcija potpomognuta enzimima, mikrovalovima, pulsirajućim električnim poljem i visokonaponskim električnim pražnjenjem (Kalli i sur., 2018).

Alternativna metoda u odnosu na konvencionalne metode je ekstrakcija superkričnom tekućinom (SFE), gdje se umjesto toksičnih otapala ekstrakcija najčešće provodi ugljikovim dioksidom u stanju superkričnog fluida. Navedena metoda zahtjeva adekvatnu pripremu uzorka, odnosno čišćenje i mljevenje sjemena. Prinos ulja ovom metodom je sličan onom kod ekstrakcije organskim otapalima, no kvaliteta ulja je poboljšana (identična kvaliteti hladno prešanog ulja). Iako je ovo relativno nova tehnika, postaje sve popularnija zbog visoke kvalitete dobivenog proizvoda (de Souza i sur., 2020).

Ekstrakcija enzimima najčešće se koristi kao predtretman konvencionalnoj ekstrakciji, a temelji na sposobnosti enzima da kataliziraju reakcije u blagim uvjetima obrade, često u vodenom okruženju. Enzimi poput β -glukozidaze, celulaze, ksilanaze, β -glukonaze i pektinaze razgrađuju polisaharide prisutne u staničnoj stijenci, oslobađajući tako vezane spojeve. Enzimski predtretman sjemenki može poboljšati mehanički proces prešanja jer enzimi hidroliziraju stanične stijenke sjemenki, oslobađajući vezane spojeve i time unapređujući prinos ulja (Beres i sur., 2017).

Ekstrakcija mikrovalovima (MAE) koristi neionizirajuće elektromagnetske valove s frekvencijom u rasponu od 300 MHz do 300 GHz. Ti valovi se pretvaraju u toplinsku energiju koja zagrijava matricu iznutra i izvana, eliminirajući toplinski gradijent. Ovaj proces uzrokuje oštećenje stanične stijenke biljne matrice, što rezultira oslobađanjem spojeva u medij za ekstrakciju. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija smanjuje vrijeme trajanja procesa i potrebnu količinu otapala, a proces je također ekonomičniji i jednostavniji. Nedostatci uključuju ponekad zahtjevno razdvajanje ekstrakta od uzorka, ali na ovaj način mogu se uspješno ekstrahirati biološki aktivne tvari s antioksidacijskim svojstvima iz sjemenki (Dimić i sur., 2020).

Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (PEP) je brza i vrlo učinkovita metoda za ekstrakciju unutarstaničnih spojeva. Djeluje na principu elektroporacije, pri čemu se sirovina provodi kroz komoru i izlaže kratkom impulsu visokog napona. Električni potencijal prolazi kroz

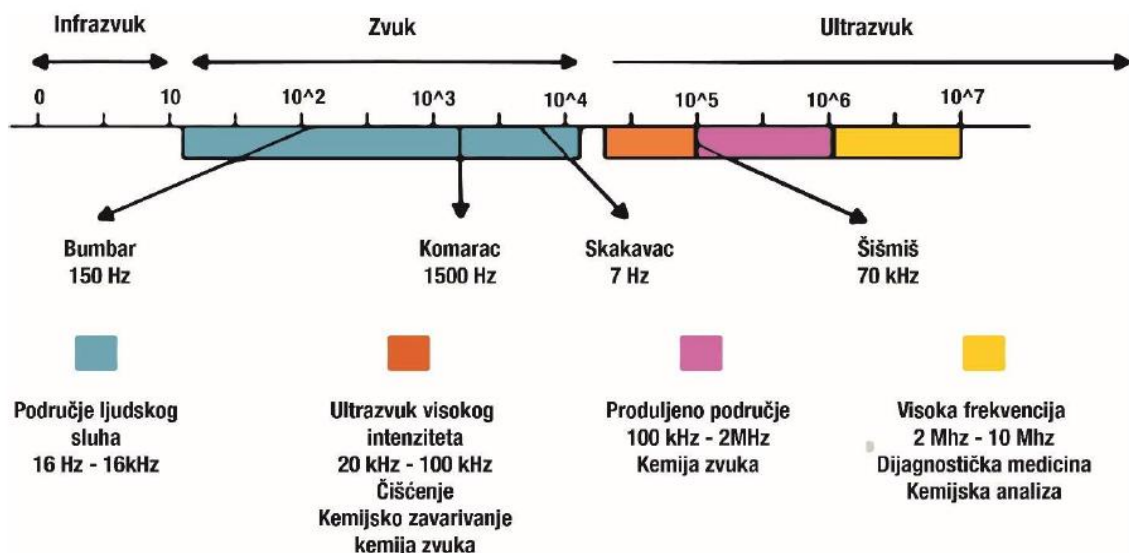
membrane stanica i razdvaja molekule s obzirom na njihov naboj. Prilikom procesa dolazi do prelaska kritične vrijednosti transmembranskog potencijala, molekule u području membrane se počinju odbijati, a posljedično se povećava propusnost membrane odnosno stanica, što rezultira boljom ekstrakcijom ulja iz sjemenki (Shahid i sur., 2016). S obzirom na navedeno, PEF metoda ima pozitivan učinak na brzinu ekstrakcije te omogućujući veći prinos ulja u odnosu na hladno prešanje, upravo zbog spomenute električne razgradnje stanica. Zbog toga PEF ima potencijal da postane superiorna tehnika za ekstrakciju ulja, posebno u industriji koja teži učinkovitijim i ekološki prihvatljivijim metodama (Ćurko i sur., 2023).

Nadalje, jedna od metoda koja se koristi kao predtretman konvencionalnoj ekstrakciji ulja je i visokonaponsko električno pražnjenje (plazma). Naime, učinkovitost ekstrakcije se poboljšava uslijed razaranja stanične strukture materijala tijekom električnog pražnjenja. Također, zbog primjene visokog napona u vodenoj otopini između dvije elektrode dolazi do elektroporacije. Primjena napona uzrokuje usmjereno gibanje elektrona, što dovodi do električnog pražnjenja i otpuštanja energije u okolinu. Kao rezultat toga, plin se ionizira, stvarajući lokaliziranu plazmu koja emitira ultraljubičasto zračenje (UV) visokog intenziteta u vidljivom spektru (Boussetta i Vorobiev, 2014). Ovaj proces, u kontekstu ekstrakcije ulja, povećava prinos ulja iz sjemenki jer visokonaponsko električno pražnjenje razgrađuje stanične membrane i povećava njihovu propusnost, omogućujući učinkovitije oslobađanje ulja iz unutar staničnih prostora (Boussetta i Vorobiev, 2014).

S obzirom na navedene inovativne metode, ultrazvučna obrada (UZV) također predstavlja inovativan pristup koji dodatno poboljšava rezultate ekstrakcije. Međutim, iako ultrazvuk pokazuje obećavajuće mogućnosti u prehrambenoj industriji, njegova primjena kao predtretman kod uljarica još uvijek je nedovoljno istražena. Ovo područje istraživanja pruža značajne prilike za buduće studije koje bi mogle otkriti nove prednosti primjene ultrazvuka u industriji uljarica.

2.4. ULTRAZVUK I ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTA EKSTRAKCIJA

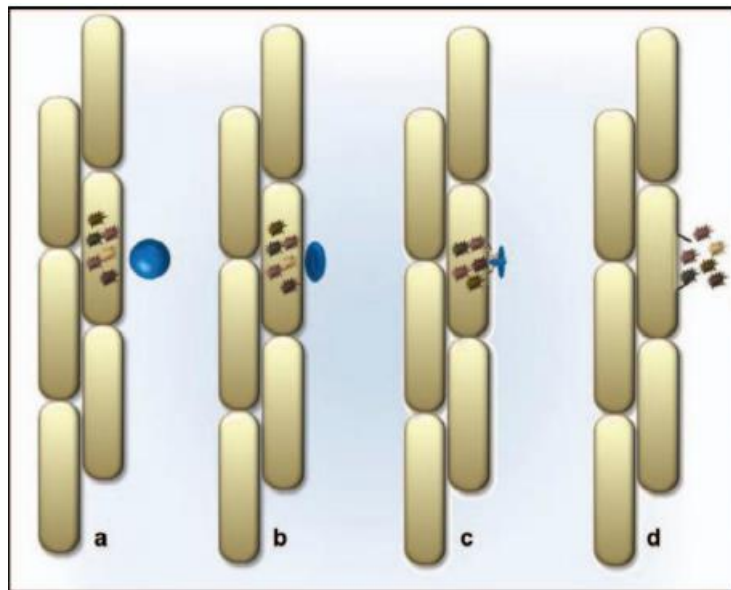
Ultrazvukom se smatra zvučni val s frekvencijama višim od praga osjetljivosti ljudskog uha (16 Hz-16 kHz), a možemo ga podijeliti na dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk visoke snage kao što je vidljivo na slici 2. Dijagnostički ultrazvuk karakteriziraju ultrazvučni valovi niskog intenziteta odnosno, visoke frekvencije (2 MHz-10 MHz, $> 1 \text{ W/cm}^2$) i niske energije. Ove frekvencije male snage ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji prolaze te se rabe u analitičke svrhe (određivanje viskoznosti hrane, sastava, strukture). S druge strane, ultrazvučni valovi visokog intenziteta, niskih frekvencija (20 kHz-100 kHz, $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) i visoke energije, uzrokuju fizičko oštećenje materijala, potiču i ubrzavaju određene kemijske reakcije, povećavaju brzinu difuzije, uništavaju mikroorganizme, utječu na enzime te poboljšavaju kristalizaciju (Mason i Lorimer, 2002).



Slika 2. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason i Lorimer, 2002)

Svaki zvučni val karakteriziraju amplituda (A) i frekvencija (f), valna duljina (λ) i koeficijent atenuacije (α) koji ovisi o karakteristikama materijala kroz koji zvuk prolazi. Zvuk može imati oblik longitudinalnog ili transverzalnog vala. Tijekom obrade hrane ultrazvukom (20-100 kHz), zvučni val koji prolazi kroz tekući medij u obliku je longitudinalnog vala te uzrokuje naizmjenične cikluse širenja i skupljanja materijala, a uslijed povećanja i smanjenja tlaka stvaraju se ekspanzivni vrtlozi koji utječu na stvaranje negativnog tlaka te kada je taj tlak dovoljno nizak da savlada intramolekularne sile formiraju se mali mjehurići. Tijekom narednih kompresija i ekspanzija vrtloga, mjehurići pare se šire i skupljaju, dodirna površina im postaje sve veća. Do povećanja mjehurića dolazi tijekom svakog ciklusa širenja i skupljanja, dok ne postignu kritičnu veličinu (Leighton, 2007). U narednom ciklusu kompresije para kondenzira,

jer energija nije dovoljna da zadrži plinsku fazu unutar mjehurića te dolazi do implozije (slika 3). Kada se kondenzirane molekule uruše u mjehurić stvaraju šok valove visokog tlaka (do 50 MPa) i temperature (do 5000 K), a taj fenomen se naziva kratkotrajna ili prijelazna kavitacija. Takva ekstremna temperatura i tlak nastali kolapsom mjehurića kao posljedica kavitacije uzrokuju disocijaciju vodene pare na OH^- radikale i H^+ ione te upravo ti nastali radikali uzrokuju primjene staničnih membrana. Tijekom prolaska ultrazvuka kroz hranu osim kavitacije može doći i do strukturnih primjena zbog dinamičkog miješanja i smičnog naprežanja, što posebno ima utjecaja na viskoznost (Pingret i sur., 2013).

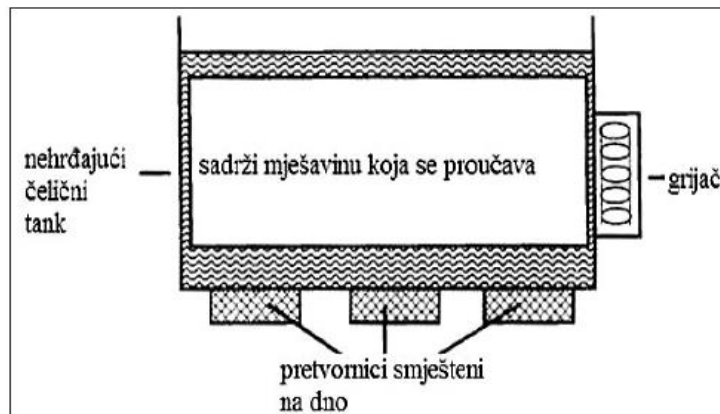


Slika 3. Kolaps kavitacijskog mjehurića i ekstrakcija biljnog materijala (Pingret i sur., 2013)

Sustavi za produkciju ultrazvuka visoke snage temelje se na elektroakustičnim sustavima tj. magnetostruktivnim ili piezoelektričnim pretvaračima. Usporedbom ova dva pretvarača došlo se do zaključka da piezoelektrični pretvarači imaju učinkovitost od 95 % te mogu djelovati u cijelom ultrazvučnom području. Iako su manje izdržljivi zbog toga što se troše s vremenom, malih su dimenzija, laganiji su i jeftiniji te se češće koriste od magnetostruktivnih (Herceg i sur., 2009).

Ultrazvučni sustavi visoke snage mogu biti dizajnirani kao sonde, a sastoje se od generatora koji pretvara električnu energiju u visoku frekvenciju i pretvornika (spojen na dno spremnika) koji visoku frekvenciju izmjenične struje pretvara u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitaciju (Brnčić i sur., 2009). U laboratorijskim uvjetima se najčešće upotrebljavaju ultrazvučne kupelji, zbog lake dostupnosti i pristupačne cijene. Ultrazvučna kupelj (slika 4) spremnik je koji sadrži procesni medij s pretvaračem vezanim za dno, a većina ih radi na frekvencijama od 20-40 kHz (Brnčić i sur., 2009). Unutar kupelji se mogu dodati dijelovi kako

bi ona bila multifunkcionalna.



Slika 4. Ultrazvučna kupelj (Brnčić i sur., 2009)

Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji obuhvaća različite procese kao što su: inaktivacija mikroorganizama i enzima, kristalizacija i zamrzavanje, sušenje, olakšavanje filtracije, homogenizacija i emulgiranje, čišćenje i odzračivanje tekućina kao i ekstrakcija iz različitih supstrata (Brnčić i sur., 2009).

Djelotvornost ultrazvuka (UZV) kod inaktivacije mikroorganizama osim o primijenjenim parametrima ovisi i o vrsti tretiranih mikroorganizama. Primjerice, gram-negativne bakterije, spore i neki virusi su znatno otporniji na djelovanje UZV-a u usporedbi s gram-pozitivnim bakterijama, koje se lako inaktiviraju. Kako bi se izbjeglo relativno dugo djelovanje ultrazvučnih valova za dobivanje mikrobiološki sigurnog proizvoda, ultrazvuk je najbolje kombinirati s nekim drugim tehnikama kao što su primjena tlaka, topline ili promjenom pH (Gallo i sur., 2018).

Nadalje, djelotvornost ultrazvuka prilikom inaktivacije enzima, također ovisi o enzimu koji se tretira. Tako se naprimjer, aktivnost oksidaza uspješno inaktivira djelovanjem ultrazvuka, dok to nije slučaj kod reduktaza i amilaza koje pokazuju puno veću otpornost.

Također, ultrazvuk je svoju primjenu pronašao i u procesu kristalizacije šećera zbog svoje sposobnosti da pospješuje stvaranje centara kristalizacije i rast kristala. Može se također rabiti i prilikom stvaranja kristala leda u procesu zamrzavanja gdje je uočeno kako ultrazvuk djeluje na brže i jednoličnije stvaranje manjih kristala leda i time dolazi do manjih oštećenja stanica (Zhang i sur., 2015).

Primjena ultrazvuka prilikom procesa sušenja utječe na smanjenje vremena sušenja ali omogućava i primjenu nižih temperatura. Takva kombinacija UZV i sušenja može se primijeniti na kristalima šećera ili prilikom sušenja žitarica u ljusci i dr. djelovanje UZV uzrokuje brži prijenos topline između površine čvrste tvari koja se grije i tekućine te se često koristi i kao predtretman za sušenje (Musielak, 2016).

Primjenu ultrazvuka prilikom filtracije (ultrazvučna filtracija) karakterizira veći stupanj

protoka kroz membrane filtra, a UZV može imati 2 načina djelovanja: sonifikacija koja uzrokuje razbijanje aglomerata na sitnije čestice (time se ubrzava filtracija) i sonifikacija koja vibracijskom energijom sprječava nastajanje filtarskog kolača (Herceg i sur., 2009).

Nadalje, primjena ultrazvuka kod emulgiranja, homogenizacije ili čišćenja predstavljaju jedne od najstarijih procesa upotreba UZV u prehrambenoj industriji. Naime, kod emulgiranja kada se kolaps mjehurića odvija blizu granice dvaju tekućina koje se ne miješaju, nastali šok val rezultirat će dobivanjem stabilne emulzije. U procesima homogenizacije, najširu primjenu UZV nalazimo kod homogenizacije mlijeka gdje ultrazvučni homogenizatori pokazuju visoku učinkovitost i znatno niže troškove zbog manje potrošnje energije (Canselier i sur., 2002). S druge strane, prednost ultrazvuka prilikom procesa čišćenja je da može učinkovito očistiti pukotine koje se konvencionalnim metodama teško mogu očistiti (Yusof i sur., 2016).

Mogućnosti primjene ultrazvuka u ekstrakciji različitih komponenti iz biljnih materijala su izuzetno široke i u posljednje vrijeme objavljen je veliki broj radova na ovu temu (Shahid i sur., 2016; Tiwari, 2015; Pingret, 2013; Vilku i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE) ima višestruko pozitivno djelovanje na ekstrakciju biljnih ekstrakata, odnosno različitih komponenti poput ulja, proteina ili biološki aktivnih polifenolnih spojeva. Prepoznata je i mogućnost industrijske primjene ultrazvuka u fitofarmaceutskoj i prehrambenoj industriji za ekstrakciju širokog spektra komponenti iz biljnih materijala (Vilku i sur., 2008). Naime, UAE omogućava brži prijenos energije i skraćivanje vremena procesa, smanjenje temperature ekstrakcije i volumena otapala te povećanje prinosa ekstrakta u usporedbi s konvencionalnim metodama. Kolapsom mjehurića (implozijom) dolazi do stvaranja mehaničkog stresa na stanice biljnog materijala što rezultira njihovim oštećenjem i omogućava otapalu da prođe u stanice te se tako povećava ekstrakcijski prinos (Shahid i sur., 2016). Povećanje amplitude ultrazvučnih valova rezultira većim brojem ciklusa kompresije i ekspanzije, što poboljšava iskorištenje ekstrakcije (Kalli i sur., 2018). Kavitacija također usmjerava brzi tok tekućine kroz površinu materijala, što uzrokuje ljuštenje i eroziju čestica, olakšavajući oslobađanje bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Shahid i sur., 2016). Kavitacija u UAE ovisi o frekvenciji, temperaturi, tlaku i snazi valova. Povećanjem snage ultrazvučnih valova smanjuje se vrijeme ekstrakcije (Sirohi i sur., 2020). Ova tehnika povećava učinkovitost ekstrakcije putem različitih mehanizama prijenosa mase.

Uslijed navedenog, ekstrakcija fitokemikalija, aroma, mirisa i pigmenata iz voća i povrća te različitih biljnih materijala samo su neki od primjera primjene UAE u prehrambenoj industriji. Zbog svoje jednostavnosti, lakoće rukovanja, smanjenih troškova, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija postaje sve popularnija i obećavajuća metoda za ekstrakcije (Shahid i sur., 2016). Andjelković i sur. (2014), González-Centeno i sur. (2013) te Porto i sur. (2013) proveli su detaljnu analizu polifenolnog sastava u ekstraktima dobivenim iz sjemenki grožđa nakon primjene ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (UAE). U svojim zaključcima istaknuli su UAE

kao izuzetno učinkovitu tehniku za ekstrakciju fenolnih spojeva, s obzirom na to da su zabilježili značajno povećanje udjela ukupnih fenola u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Nadalje, UAE je omogućila ostvarenje većeg prinosa ekstrakta u znatno kraćem vremenskom razdoblju, dok su dobiveni ekstrakti pokazali snažnije antioksidativno djelovanje. Slično istraživanje, no na ekstrahiranom bučinom ulju proveli su Massa i sur. (2019), a dobiveno ulje bilo je bogatije polifenolnim spojevima kao što su tokoferoli, fitosteroli i β -karoteni. Ovi rezultati dodatno potvrđuju vrijednost UAE u optimizaciji procesa ekstrakcije fenolnih spojeva i ističu njezin potencijal u daljnjoj primjeni u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Uslijed navedenog, ekstrakcija fitokemikalija, aroma, mirisa i pigmenata iz voća i povrća te različitih biljnog materijala samo su neki od primjera primjene UAE u prehrambenoj industriji.

Nadalje, ultrazvučna tehnologija pokazuje značajan potencijal za primjenu u industriji masti i ulja, u procesu ekstrakcije ulja iz uljarica i drugih perspektivnih kultura. Istraživanja su pokazala da UAE može povećati prinos ulja i potaknuti ekstrakciju fitokemikalija (Stevanato i Silva, 2019; Senrayan i Venkatachalam, 2019; Jalili i sur., 2018). UAE se također može kombinirati s drugim tehnologijama, poput mikrovalne, enzimske ili superkritične ekstrakcije, gdje može izravno sudjelovati u procesu ili djelovati kao predtretman, čime se dodatno poboljšava prinos ulja (Liu i sur., 2020; Goula i sur., 2018; Hu i sur., 2012).

Ranija istraživanja pokazala su kako ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija značajno poboljšava prinos i učinkovitost ekstrakcije kod maslinovog ulja (Rigane i sur., 2020; Iqdiam i sur., 2019; Servili i sur., 2019; Juliano i sur., 2017). Primjerice, istraživanje Rigane i sur. (2020), pokazalo je da tretman maslinove paste ultrazvukom prije malaksacije može povećati prinos ulja do 20 %. Iqdiam i sur. (2019) utvrdili su da UAE značajno povećava prinos ulja i indeks ekstrakcije zahvaljujući akustičnoj kavitaciji koja uzrokuje oštećenje staničnih membrana. Također, Servili i sur. (2019) naglasili su važnost postizanja ultrazvučnog tlaka od 3,5 bara za optimalnu ekstrakciju maslinovog ulja. Ranije, Juliano i sur. (2017) utvrdili su kako primjena dvostrukog ultrazvučnog tretmana, prije i nakon malaksacije, dodatno povećava dobivanje ulja u usporedbi s pojedinačnim tretmanom.

Slično kao kod proizvodnje maslinovog ulja, Riera i sur. (2004) uspjeli su uz UAE povećati prinos ulja iz badema za 30 % uz znatno smanjenje vremena procesa. Nedavno istraživanje koje su proveli Senrayan i Venkatachalam (2020) uspoređivalo je UAE s tradicionalnom i Soxhlet ekstrakcijom za ekstrakciju ulja iz kapoka, pri čemu je zabilježeno značajno smanjenje vremena ekstrakcije i potrošnje energije. Pozitivni učinci UAE na prinos ulja također su potvrđeni u radu Naveenkumara i Baskara (2019) te Hu i sur. (2012) za ricinusovo ulje i ulju sjemenki šafranike. Kombinacija UAE s enzimskom ekstrakcijom korištena je za izdvajanje ulja sjemenki nara, datulja i borovih koštica, pri čemu je zabilježen povećan prinos ulja i smanjenje vremena ekstrakcije (Amigh i Dinani, 2020; Goula i sur., 2018; Chen i

sur., 2016). Osim toga, predtretman ultrazvukom korišten je tijekom enzimske hidrolize za ekstrakciju orahovog ulja i ulja kikirikija, gdje je vrijeme ekstrakcije bilo znatno kraće u usporedbi s konvencionalnim metodama (Ghasemi i Taghian-Dinani, 2018; Haji-Heidari i Taghian-Dinani, 2018). Ultrazvuk je također korišten u kombinaciji sa superkritičnom ekstrakcijom na sjemenkama marakuje, pri čemu je došlo do povećanja prinosa ulja (Barrales i sur., 2015). Sanchez i sur. (2019) izvijestili su da ultrazvučno potpomognuta mikrovalna ekstrakcija doprinosi povećanju prinosa ulja repice. Pored povećanja prinosa ekstrakcije, kvaliteta dobivenog ulja ključna je za prehrambenu industriju. Moradi i sur. (2018) te Cravotto i sur. (2011) primijetili su povećanje udjela linolenske masne kiseline u uljima sjemenki suncokreta i kivija ekstrahiranim pomoću UAE. Također, bučino ulje ekstrahirano uz pomoć UAE pokazalo je visoku oksidacijsku stabilnost (Herández-Santos i sur., 2016). Slični rezultati o visokoj oksidativnoj stabilnosti zabilježeni su i za ulje sjemenki papaje ekstrahirano uz UAE (Zhang i sur., 2019; Samaram i sur., 2014). Unatoč brojnim istraživanjima koja potvrđuju učinkovitost UAE, mogućnosti primjene ultrazvuka u proizvodnji hladnog prešanog ulja sjemenki grožđa ranije nisu bile istražene.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sjemenke komine grožđa sorte Graševina

Ovo istraživanje je provedeno na sjemenkama komine bijelog grožđa sorte Graševina, berbe 2023., Kravarsko, Hrvatska. Grožđe je ubrano u fazi tehnološke zrelosti nakon čega je provedena primarna prerada grožđa. Nakon prešanja dobivena komina grožđa je dostavljena u laboratorij. Sjemenka komine odvojena je ručno od pokožice i pulpe te skladištena na -18 °C do daljnje proizvodnje ulja i kemijskih analiza.

3.1.2. Kemikalije

U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- n-heksan (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD), HPLC čistoće
- 2-propanol (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska), HPLC čistoće
- aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev dihidrogen fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- dinatrijev hidrogen fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- fluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid) -dihidroklorid, 98 %) (Acros, Gell, Belgija)
- metilirani β -ciklodekstrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- trolox standard (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- α -tokoferol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- α -tokotrienol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 300 H, Elma Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Njemačka)
- laboratorijska pužna preša Komet (model PR-F100, Oilpressparts GmbH & Co. KG, Niederkruchten, Njemačka)
- laboratorijski sušionik (model ULE 500, Memmert GmbH & Co., Schwabach, Njemačka)
- laboratorijska centrifuga (Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka)
- laboratorijska vaga (model GP 4102, Sartorius, Zaprešić, Hrvatska)
- analitička vaga (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)

- vodena kupelj (Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK)
- vorteks uređaj (IKA VORTEX 4 basic, IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- fluorimetar (Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian, Palo Alto, CA, SAD)
- UPLC uređaj (Agilent Technologies 1290 Infinity II LC System, Agilent, Santa Clara, CA, SAD) opremljen s FLUO detektorom (model G7121B, Serial No. DEAEJ02807), modulom pumpe (model G7104A, Serial No. DEBAX04463), autosemplerom (model G7129B, Serial No. DEBA906617), modulom za kontrolu temperature (model G7116B, Serial No. DEBAZ07584)
- kolona za UPLC/HPLC LiChroCART, Silica 60 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD)
- mikropipete volumena 100 i 1000 μL (Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD)
- najlonski filter 0,45 μm (Labex Ltd., London, UK)
- odmjerna tikvica volumena 25, 50 i 250 mL
- menzura 1000 mL
- staklene čaše volumena 100 mL, 400 mL i 1000 mL
- kvarcna kiveta
- termometar
- aluminijska folija
- plastična posuda
- plastična žlica
- plastične kivete
- sito
- stalak za epruvete

3.2. METODE

3.2.1. Primjena ultrazvuka kao predtretmana hladnom prešanjju

Predtretman ultrazvučnim valovima proveden je u ultrazvučnoj kupelji (slika 5) Elmasonic P 300 H (Elma Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Njemačka) sa sljedećim karakteristikama: frekvencija 37/80 kHz, volumen spremnika 28 L, dimenzije spremnika 475×270×195 mm te ultrazvučne snage 380 W.



Slika 5. Predtretman sjemenki grožđa ultrazvukom primjenom ultrazvučne kupelji (vlastita fotografija)

Neposredno prije samog predtretmana ultrazvukom sjemenke su podvrgnute tretiranju sa suhim ledom u omjeru 2:1 (1200 g sjemenki tretirano je sa 600 g suhog leda). U staklene čaše od 400 mL s pomoću laboratorijske vage Sartorius GP 4102 (Sartorius, Zaprešić, Hrvatska) odvagano je 50 g ($\pm 0,05$ g) sjemenki te je pomiješano s 300 mL destilirane vode. Parametri ultrazvučnog tretmana uključivali su primjenu frekvencije od 80 kHz (UZV1) te frekvencije od 37 kHz (UZV2) uz amplitudu 100 %, tijekom 30 i 90 min (parametri s nazivima uzoraka prikazani su u tablica 1), uz kontrolu temperature (≤ 40 °C).

Tablica 1. Parametri predtretmana ultrazvukom

Uzorak	Frekvencija (kHz)	Amplituda (%)	Vrijeme (min)
UZV1_30	80	100 %	30
UZV1_90	80	100 %	90
UZV2_30	37	100 %	30
UZV2_90	37	100 %	90

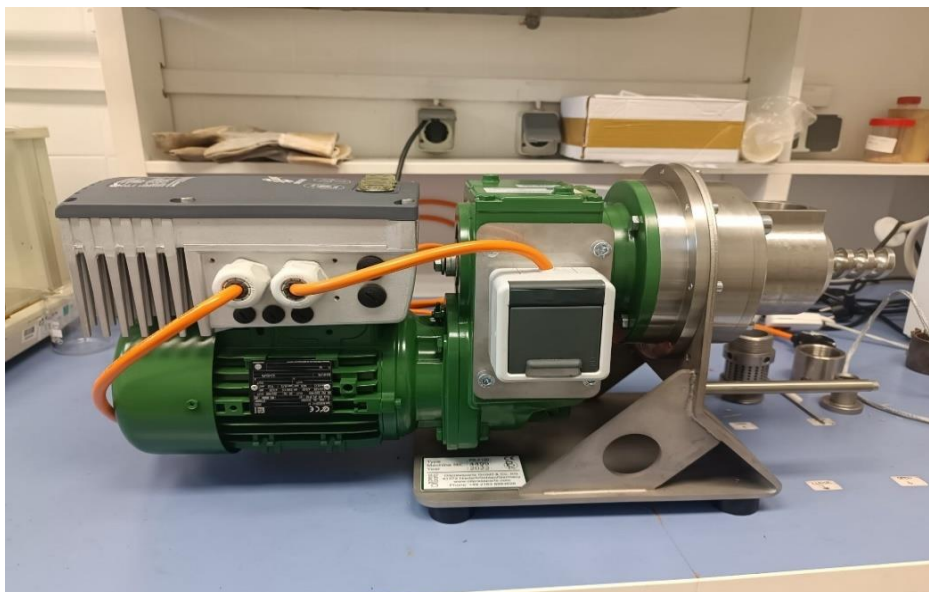
Nakon provedenog predtretmana u ultrazvučnoj kupelji, sjemenke grožđa su ocijeđene, prosušene papirnatim ručnikom i postavljene na aluminijske plitice unutar laboratorijskog sušionika Memmert ULE 500 (Memmert GmbH & Co., Schwabach, Njemačka) (slika 6). Sušenje je provedeno pri 35 °C tijekom 36 h kako bi se postigao udio vlage od 8 %, adekvatan za provedbu hladnog prešanja (Ćurko i sur., 2023).



Slika 6. Sušenje uzoraka u laboratorijskoj sušnici (vlastita fotografija)

3.2.2. Ekstrakcija ulja sjemenki grožđa primjenom hladnog prešanja

Hladno prešano ulje sjemenki grožđa dobiveno je primjenom laboratorijske pužne preše Komet PR-F100 (Oilpressparts GmbH & Co. KG, Niederkruchten, Njemačka) prikazane na slici 7.



Slika 7. Pužna preša (vlastita fotografija)

Masa od 750 g sjemenki komine grožđa s udjelom vlage od 8 % prešana je bez prethodnog kondicioniranja ili zagrijavanja te uz broj okretaja preše od 30 rpm. Dobiveni uzorci nakon prešanja su centrifugirani pri 5000 rpm tijekom 10 minuta, nakon čega su skladišteni u tamnoj staklenoj posudi u struji dušika pri -18 °C do daljnjih analiza.

3.2.3. Određivanje tokokromanola (tokoferola i tokotrienola) u ulju sjemenki grožđa primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Sastav i koncentracija tokokromanola u ulju sjemenki grožđa (α -tokoferola, γ -tokoferola, α -tokotrienola, γ -tokotrienola i plastokromanola-8) analizirana je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz detekciju na fluorescentnom detektoru (UPLC-FLUO) na Agilent Technologies 1290 Infinity II LC System uređaju (Agilent, Santa Clara, CA, SAD) prema standardnoj metodi (ISO 9936, 2012).



Slika 8. Agilent Technologies 1290 Infinity UPLC uređaj (vlastita fotografija)

Uzorak ulja pripremljen je neposredno prije analize na način da je na analitičkoj vagi (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD) odvagano $0,25 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ ulja u odmjernu tikvicu volumena 25 mL, koja je potom nadopunjena n-heksanom do oznake. Uzorak je nakon toga profiltriran kroz najlonski filter s porama veličine $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Labex Ltd., London, UK) te zaštićen od djelovanja svjetlosti. Pripremljen uzorak je analiziran na dan pripreme.

Razdvajanje pojedinačnih tokokromanola provedeno je na LiChroCART, Silica 60 koloni ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) uz mobilnu fazu heksan:2-propanol (99,7:0,7; v/v) pri protoku od $0,9 \text{ mL/min}$ i temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$, kako je navedeno u tablici 2.

Tablica 2. Parametri UPLC-FLUO analize tokokromanola

Kolona	LiChroCART, Silica 60 ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$)
Pokretna faza	Otapalo: heksan:izopropanol (99,3:0,7; v/v)
Temperatura kolone	$25 \text{ }^\circ\text{C}$
Brzina protoka	$0,9 \text{ mL/min}$
Gradijent	Izokratski
Vrijeme analize	25 min
Detektor	Flourescentni detektor (FLUO)
• Valna duljina ekscitacije	295 nm
• Valna duljina emisije	330 nm
Osjetljivost detektora	Srednja
Injektirani volumen uzorka	$20 \text{ }\mu\text{L}$

Detekcija tokokromanola izvršena je pri valnoj duljini ekscitacije od 295 nm i valnoj duljini emisije od 330 nm. Identifikacija tokokromanola provedena je usporedbom vremena zadržavanja uzorka s vremenima zadržavanja standardnih otopina. Koncentracije tokokromanola u ulju sjemenki grožđa određene su pomoću kalibracijskih krivulja α -tokoferola, γ -tokoferola i α -tokotrienola metodom vanjskog standarda, a navedene otopine standarda injektirane se u rasponu od 0,5 do 10 mg/L .

Linearnom regresijom dobivene sljedeće jednadžbe za izračunavanje koncentracije α -tokoferola [1], γ -tokoferola [2] i α -tokotrienola [3] u injektiranim uzorcima:

$$y = 66,712 x - 2,597 \quad [1]$$

gdje je:

y = površina ispod pika; x = koncentracija α -tokoferola (mg/L)

$$y = 82,642 x - 8,087 \quad [2]$$

gdje je:

y = površina ispod pika; x = koncentracija γ -tokoferola (mg/L)

$$y = 69,221 x - 7,934 \quad [3]$$

gdje je:

y = površina ispod pika; x = koncentracija α -tokotrienola (mg/L)

Temeljem dobivenih vrijednosti izračunate su koncentracije tokokromanola u uzorcima ulja u mg/kg. γ -tokotrienol i plastokromanola-8 izraženi su kao ekvivalenti α -tokotrienola, a ukupni tokokromanoli izračunati su kao suma svih određenih tokokromanola (α -tokoferol, γ -tokoferol, α -tokotrienol, γ -tokotrienol i plastokromanol-8).

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Antioksidacijski kapacitet lipofilnih komponenti ulja je određen L-ORAC metodom (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Ou i sur., 2001), koja je provedena u prema ranije opisanom postupku (Shinagawa i sur., 2018; Ou i sur., 2013).

Masa od 15 mg ulja otopljena je u 1 mL acetona, a potom razrijeđena s 7 % otopinom nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RMCD) pripremljenom u 50 % acetonu, radi povećanja topljivosti. Dobivena smjesa homogenizirana je pri 400 rpm tijekom 30 minuta prije analize, nakon čega je u reakcijsku kivetu dodano 0,375 mL ovako pripremljenog uzorka i 2,25 mL otopine fluoresceina (0,04 μ mol/L) ranije pripremljenog u fosfatnom puferu (0,0075 mol/L; pH=7,0). Reakcijska kiveta je termostatirana na 37 °C tijekom 30 min, nakon čega je u nju dodano 0,375 mL otopine AAPH (152 mmol/L) ranije pripremljene u fosfatnom puferu (0,0075 mol/L; pH = 7,0). Potom je provedeno mjerenje pomoću fluorescentnog spektrofotometra pri valnoj duljini emisije od 520 nm i ekscitacije od 485 nm. Slijepa proba pripremljena je na način da je umjesto 0,375 mL lipofilnog uzorka dodano 0,375 mL 7 % otopine RMCD. ORAC vrijednosti standarda, tj. otopine troloxa, određene su dodatkom 0,375 mL otopine troloxa (0,0025-0,05 mmol/L) pripremljene u 7 % otopini RMCD. Relativne ORAC vrijednosti izračunate su prema sljedećoj jednadžbi [4]:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost } (\mu\text{mol TE/g}) = \left(\frac{AUC_{uz} - AUC_{sp}}{AUC_{trx} - AUC_{sp}} \right) \times k \times \alpha \times h \quad [4]$$

gdje je:

$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1)$, AUC vrijednosti uzoraka korištene za izračun ORAC vrijednosti dobivaju se kada se suma relativnih vrijednosti apsorbancija zbroji s 0,5 pri čemu R predstavlja izmjerenu vrijednost apsorbancije u određenoj minuti mjerenja; AUC_{uz} : antioksidacijski kapacitet uzorka; AUC_{sp} : antioksidacijski kapacitet slijepe probe; AUC_{trx} : antioksidacijski kapacitet troloxa; k: faktor razrjeđenja; α : molarna koncentracija troloxa; h: volumen ekstrakta/masa uzorka.

3.2.5. Obrada podataka

Statistička analiza analitičkih podataka provedena je primjenom analize varijance (ANOVA) koristeći softver Statistica v.10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, SAD). ANOVA je provedena na svim nezavisnim varijablama, odnosno rezultatima koncentracije tokokromanola i antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima ulja. Kada su uzorci pokazali značajne razlike nakon ANOVA ($p < 0,05$), korišten je Tukey HSD test za usporednu analizu.

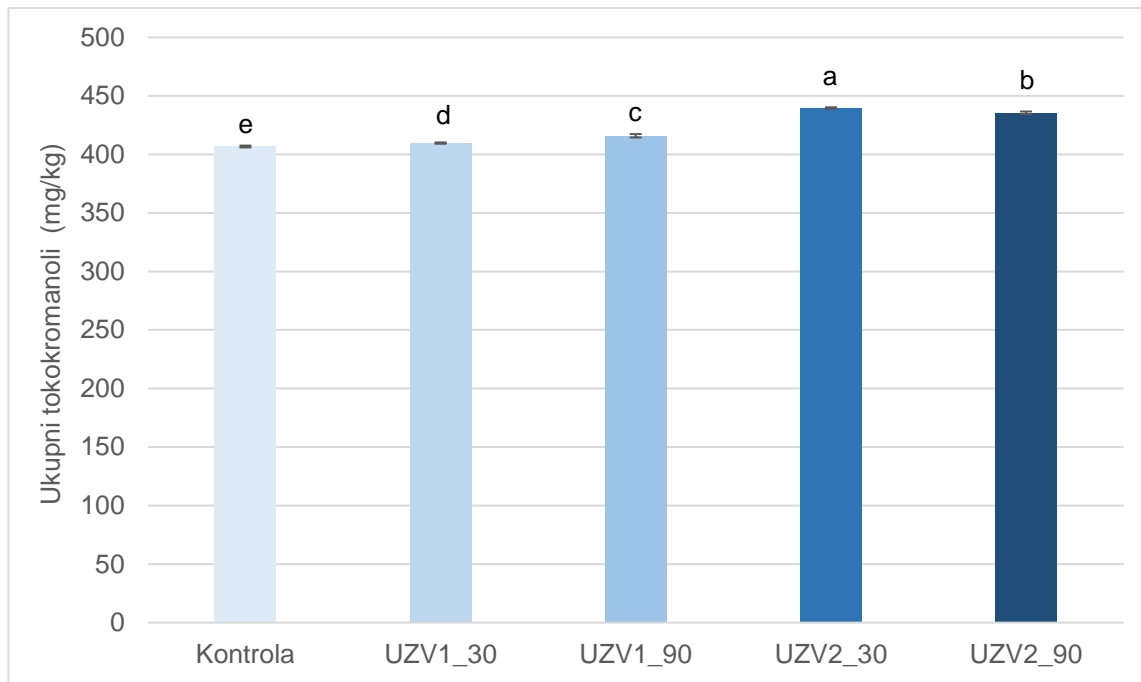
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ranija istraživanja pokazala su uspješnu primjenu različitih predtretmana hladnom prešanju poput primjene mikrovalova, pulsirajućeg električnog polja, hladne plazme ili enzimskih tretmana na povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja kao i povećanje koncentracije pojedinih bioaktivnih spojeva (Ćurko i sur., 2023; Dimić i sur., 2020; Beres i sur., 2017; Shahid i sur., 2016). S druge strane, mogućnosti primjene ultrazvuka kao predtretmana hladnom prešanju su u potpunosti neistražene. Stoga, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj predtretmana ultrazvuka na sastav tokokromanola (tokoferola i tokotrienola) te antioksidacijski kapacitet hladno prešanog ulja sjemenki grožđa, kao važnih parametara kvalitete ovog ulja.

Istraživanje je provedeno na sjemenkama grožđa sorte Graševina (Kravarsko, Hrvatska), godina berbe 2023. Sjemenke grožđa su tretirane ultrazvukom primjenom frekvencija od 80 kHz te 37 kHz tijekom 30 i 90 minuta, kako bi su utvrdio utjecaj frekvencija i trajanja ultrazvučnog tretmana. Analiza sastava i koncentracije tokoferola i tokotrienola u tretiranim uzorcima, kao i kontrolnom (netretiranom) uzorku provedena je primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC-FLUO), a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 9-14. Antioksidacijski kapacitet ulja određene je L-ORAC metodom pomoću fluorescentnog spektrofotometra, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 15.

4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA KONCENTRACIJU TOKOKROMANOLA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju ukupnih tokokromanola (tokoferola i tokotrienola) u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je na slici 9. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su dobivene koncentracije ukupnih tokromanola u skladu s literaturnim podacima, prema kojima ukupna koncentracija tokoferola i tokotrienola može varirati od 63-1208 mg/kg (Matthäus, 2008). Dobivena koncentracija u kontrolnom uzorku ujedno je i najmanja detektirana među analiziranim uzorcima pa možemo zaključiti kako je primjena ultrazvučnog predtretmana kod hladnog prešanja značajno utjecala na povećanje koncentracije ukupnih tokokromanola u dobivenom ulju. Uzorak tretiran ultrazvukom frekvencije 80 kHz tijekom 30 minuta (označen kao UZV1_30), pokazao je najmanju koncentraciju ukupnih tokokromanola među uzorcima predtretiranim ultrazvukom. Međutim, koncentracija ukupnih tokokromanola u navedenom uzorku bila je značajno veće u odnosu na kontrolni uzorak (bez predtretmana ultrazvukom). Također, produljenjem vremena ultrazvučnog predtretmana s 30 na 90 minuta pri istoj frekvenciji (uzorak UZV1_90), koncentracija ukupnih tokokromanola se značajno povećala. Nadalje, uzorci tretirani ultrazvukom frekvencije 37 kHz pokazali su



Slika 9. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju tokokromanola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina

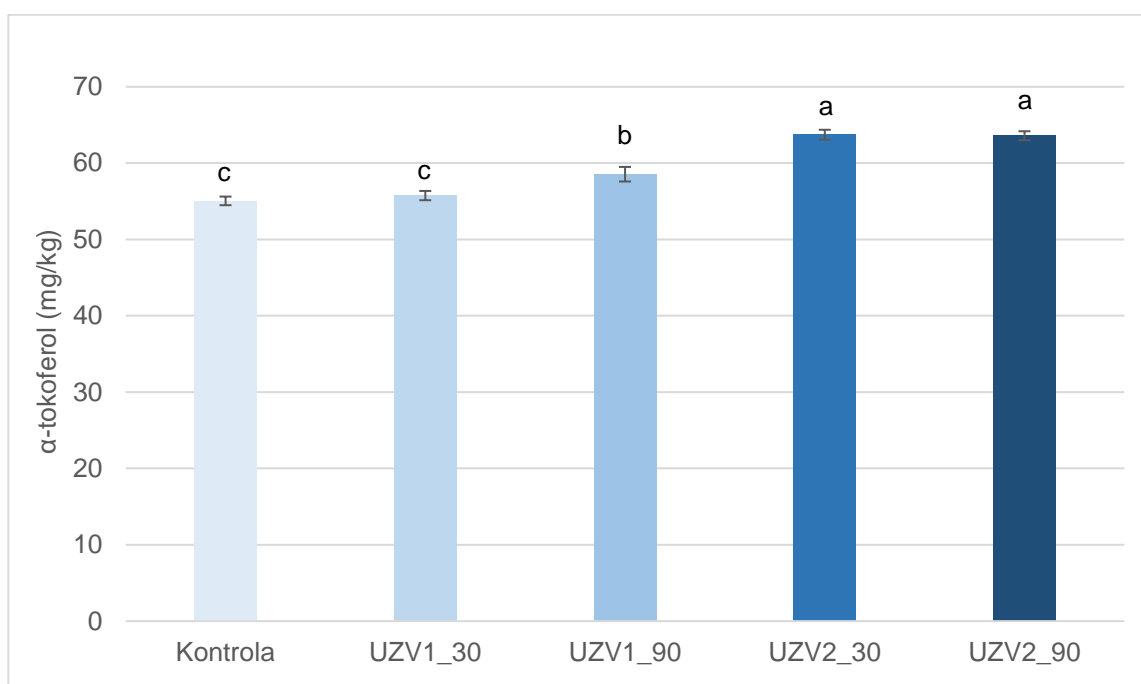
značajno povećanje koncentracije tokokromanola u usporedbi s uzorcima tretiranim frekvencijom od 80 kHz te kontrolnim uzorkom. U uzorku tretiranom frekvencijom od 80 kHz tijekom 30 minuta (UZV2_30), zabilježena je najviša koncentracija tokokromanola, dok je produženje vremena tretmana na 90 minuta (UZV2_90) rezultiralo značajnim smanjenjem koncentracije u odnosu na uzorak UZV2_30. Ipak, koncentracija tokokromanola u uzorku UZV2_90 bila je znatno viša od uzoraka tretiranih frekvencijom od 80 kHz (UZV1_30 i UZV1_90), kao i kontrolnog uzorka. Dobiveni rezultati pokazuju kako odabir frekvencije i duljine predtretmana ultrazvukom imaju značajan utjecaj na ekstrakciju ukupnih tokokromanola kod hladnog prešanja ulja sjemenki grožđa. Također, prilikom primjene nižih frekvencija potrebno je optimizirati samo vrijeme tretiranja, s obzirom na to da produljenje vremena tretiranja ne mora nužno dovesti i do daljnjeg povećanja ekstrakcije navedenih spojeva tijekom hladnog prešanja.

Rezultati prikazani na slici 9 u skladu s onima zabilježenim u literaturi. Primjerice, Clodoveo i sur. (2013) istraživali su utjecaj predtretmana ultrazvukom prilikom ekstrakcije djevičanskog maslinovog ulja koristeći ultrazvučnu kupelj i frekvenciju od 35 kHz tijekom perioda od 0 do 10 minuta. Zaključili su da tretman od 10 minuta povećava ukupne tokoferole za oko 60 % te da svako produljenje tretmana nakon nulte do desete minute dodatno povećava udio ukupnih tokoferola u ulju. Nardella i sur. (2021) utvrdili su kako ultrazvuk utječe na povećanje ukupnih tokoferola u ulju za približno 20 %. Nasuprot tome, Almeida i sur. (2017) primijetili su smanjenje ukupnih tokoferola nakon ultrazvučnog tretmana frekvencije od 25 kHz

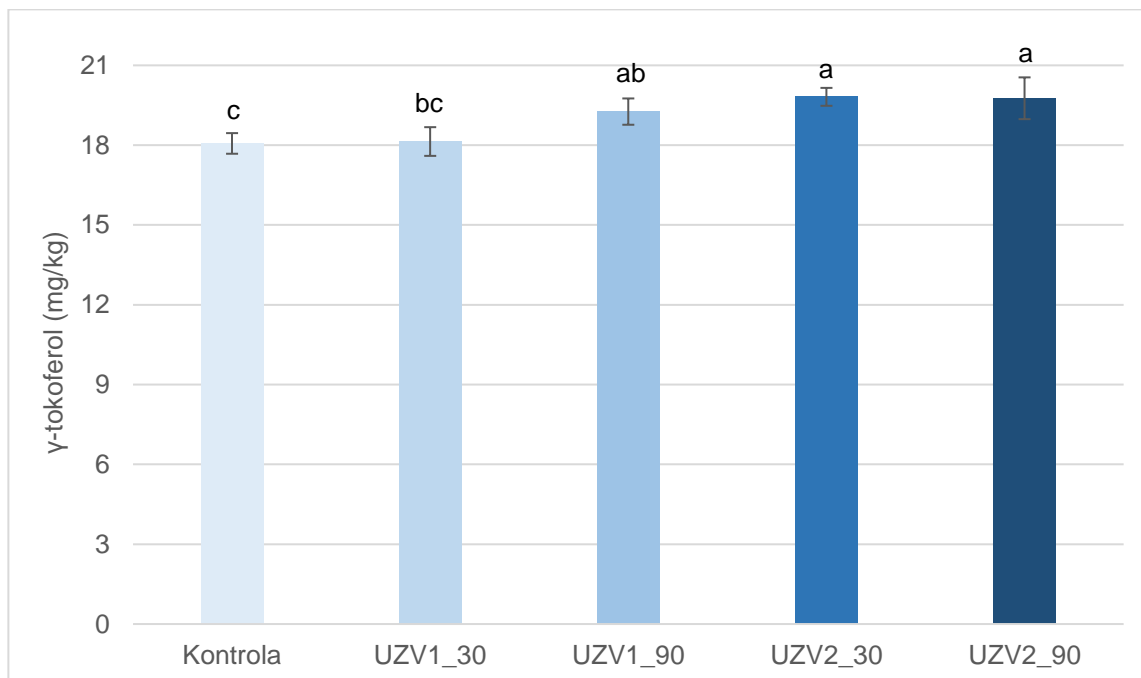
kroz 15 minuta, što su pripisali fenomenu oksidacije izazvanom stvaranjem slobodnih radikala tijekom provedenog tretmana. Thilakarathna i sur. (2023) povezali su povećanje tokoferola u bučinom ulju s ultrazvučnom kavitacijom, dok su Moghimi i sur. (2018) primijetili slične efekte kod sjemenki crnog kima. Kaseke i sur. (2021) istraživali su kombinaciju ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja, pri čemu su zabilježili povećanje ukupnih tokoferola u ulju sjemenki suncokreta.

Nadalje, utjecaj ultrazvuka na koncentraciju tokoferola u hladno prešanom ulju sorte Graševina, odnosno α -tokoferola i γ -tokoferola prikazan je na slikama 10 i 11. Najzastupljeniji tokoferol u ulju sjemenki grožđa bio je α -tokoferol, tokoferol koji pokazuje najbolji vitaminski učinak (Dimić, 2005). Koncentracija α -tokoferola u analiziranim uzorcima kretala se od 55,1 do 63,7 mg/kg ulja (slika 10), što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima koncentracija ovog spoja u ulju sjemenki grožđa može varirati od 5,2-260,5 g/kg (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013; Sabir i sur., 2012). Dobiveni rezultati pokazali su različit utjecaj kako frekvencije tako i duljine tretiranja. Najniže koncentracije α -tokoferola utvrđene su u kontrolnom uzorku hladno prešanog ulja, čije sjemenke nisu bile predtretirane ultrazvukom. Nadalje, za razliku od ranije utvrđenog trenda u sastavu ukupnih tokokromanola, primjena predtretmana ultrazvukom frekvencije 80 kHz tijekom 30 minuta (uzorak UZV1_30) nije rezultirala značajnim povećanjem koncentracije α -tokoferola u odnosu na kontrolni uzorak hladno prešanog ulja. Međutim, uzorak, tretiran ultrazvukom iste frekvencije tijekom 90 minuta (UZV1_90), pokazao je značajno povećanje koncentracije u usporedbi s kontrolnim uzorkom i uzorkom UZV1_30, što upućuje na zaključak da produljenje tretmana pri frekvenciji od 80 kHz može značajno utjecati na koncentraciju α -tokoferola. Ipak, najznačajnije promjene u koncentraciji navedenog spoja zabilježene su kod uzoraka tretiranih ultrazvukom frekvencije 37 kHz. Uzorci UZV2_30 (30 minuta tretmana) i UZV2_90 (90 minuta tretmana) pokazali su značajno povećanje koncentracije α -tokoferola u usporedbi s kontrolnim uzorkom i uzorcima tretiranim frekvencijom 80 kHz (UZV1_30 i UZV1_90). Međutim, nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji između uzoraka UZV2_30 i UZV2_90, sugerirajući kako produljenje predtretmana pri nižoj frekvenciji (37 kHz) nije imalo jednak učinak kao i produljenje pri višoj frekvenciji (80 kHz).

Nardella i sur. (2021) istraživali su utjecaj ultrazvučno potpomognute ekstrakcije na sastav maslinovog ulja i zaključili da primjena ultrazvuka može povećati koncentraciju ukupnih tokoferola za 20 %, a samog α -tokoferola i do 60 %. Slično tome, Malićanin i sur. (2014) koristili su ultrazvuk kao predtretman (pri frekvenciji od 35 kHz uz različito vrijeme predtretmana od 15-135 minuta) kod ekstrakcije ulja sjemenki grožđa Soxhletom uz n-heksan kao otapalo. Njihovi rezultati, u skladu s rezultatima prikazanim na slici 10, pokazali su da produljenje vremena tretmana ultrazvukom povećava koncentraciju α -tokoferola u ulju sjemenki grožđa.



Slika 10. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju α -tokoferola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina



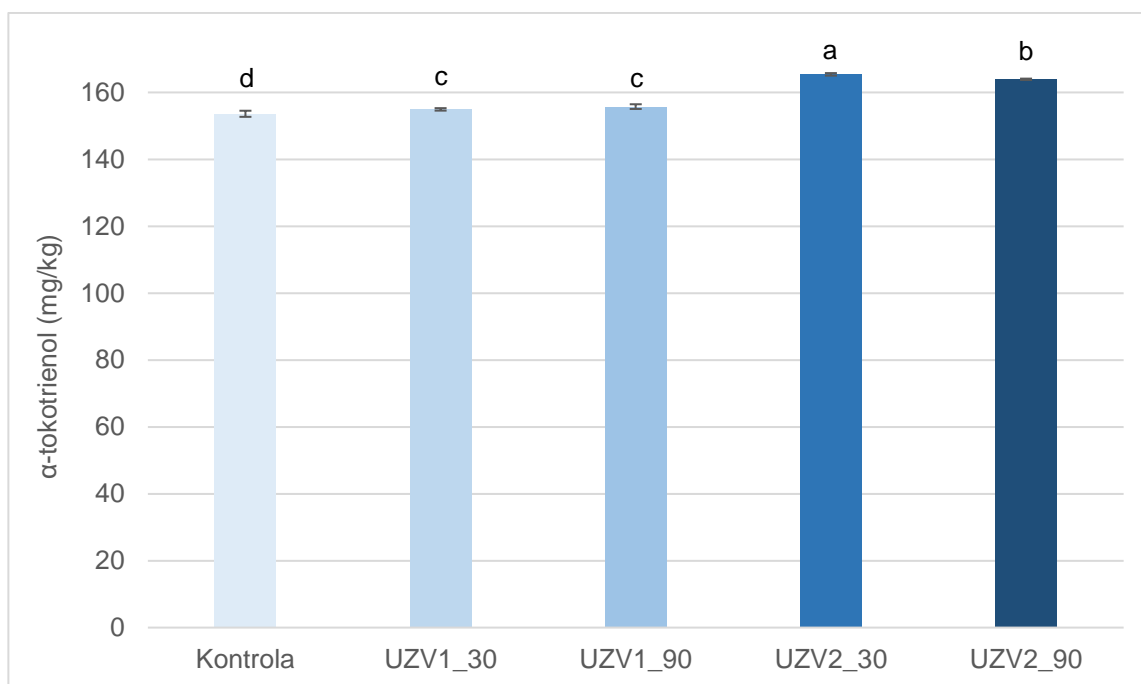
Slika 11. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju γ -tokoferola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina

Thyagarajan (2012) je također utvrdio da ultrazvučni tretman sjemenki brusnica pri frekvencije 20 kHz u trajanju od 5 do 20 minuta može utjecati na povećanje α -tokoferola od 24 do 61 %.

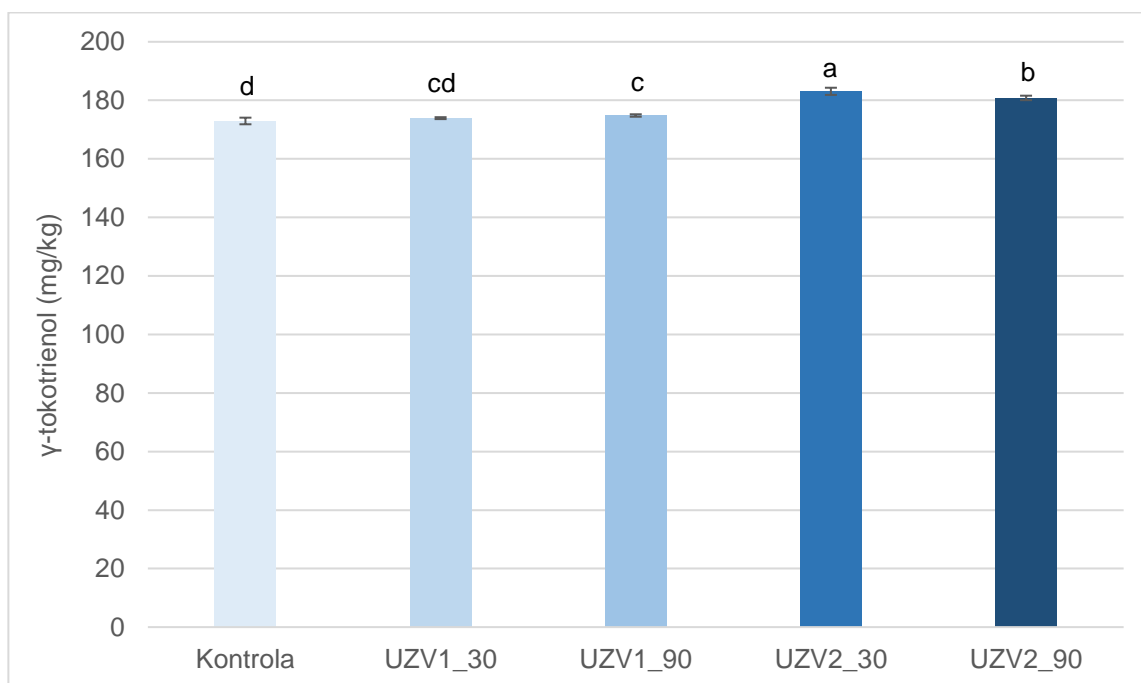
Koncentracija γ -tokoferola u analiziranim uzorcima kretala se od 18,1 do 19,8 mg/kg ulja (slika 11), što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima koncentracija ovog spoja u ulju sjemenki grožđa može varirati od 0,1-67,5 g/kg (Górnaš i sur., 2019). Također, u skladu s istraživanjem Fernandes i sur. (2013), koncentracija γ -tokoferol bila je niža od one α -tokoferola, a navedeni spoj ima i jače antioksidacijsko djelovanje (Dimić, 2005).

Iz rezultata na slici 11 je vidljivo kako je najmanja koncentracija γ -tokoferola zabilježena u kontrolnom uzorku. Uzorak tretiran ultrazvukom frekvencije 80 kHz tijekom 30 minuta (UZV1_30), pokazao je blago povećanje koncentracije γ -tokoferola u usporedbi s kontrolnim uzorkom, iako razlika nije statistički značajna. Dobiveni rezultat nam upućuje na to da kraći tretman na višoj frekvenciji nije imao značajnog utjecaja na koncentraciju γ -tokoferola u uzorku ulja. Uzorak tretiran istom frekvencijom tijekom 90 minuta (UZV1_90), pokazao je nešto višu koncentraciju γ -tokoferola u odnosu na UZV1_30, no značajno veću koncentraciju u odnosu na kontrolni uzorak. Najveće promjene zabilježene su kod uzoraka tretiranih ultrazvukom frekvencije 37 kHz. Uzorak UZV2_30 nije pokazao značajnu razliku u odnosu na UZV2_90, tretiran istom frekvencijom ali tijekom 90 minuta. Bruni i sur. (2002) u istraživanju provedenom na sjemenkama biljke *Amaranthus caudatus* L. utvrdili su značajno povećanja γ -tokoferola nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u usporedbi sa konvencionalnom i SFE ekstrakcijom. Dobivene rezultati pokazuju kako primjena predtretmana ultrazvukom može značajno utjecati na povećanje koncentracije α - i γ -tokoferola, pri čemu odabir frekvencije i duljine tretiranja, odnosno optimalnih parametara ima važnu ulogu. Također, učinkovitost ovog predtretmana može se komparirati i s učinkovitošću različitih predtretmata poput predtretmana mikrovalovima i pulsirajućim električnim poljem provedenim na različitim uljaricama (Mohseni i sur., 2020; Azadmard-Damirchi i sur. 2010; Ko i sur., 2003; Oomah i sur., 2002; Oomah i sur., 1998).

Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju tokotrienola u hladno prešanom ulju sorte Graševina, odnosno α -tokotrienola i γ -tokotrienola prikazan je na slikama 12 i 13. Navedena dva tokotrienola ujedno su i najzastupljeniji tokokromanoli u ulju sjemenki grožđa (Ćurko i sur. 2024; Ćurko i sur., 2023; Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013; Sabir i sur., 2012). Koncentracija α -tokotrienola u analiziranim uzorcima kretala se od 153,6 do 165,4 mg/kg ulja (slika 12), što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima koncentracija ovog spoja u ulju sjemenki grožđa može varirati od 8,4-319,0 mg/kg (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013). Najniža koncentracija α -tokotrienola dobivena je u kontrolnom uzorku hladno prešanog ulja sjemenki grožđa. Između uzorka tretiranog ultrazvukom frekvencije 80 kHz tijekom 30 minuta (UZV1_30) i uzorka tretiranog istom frekvencijom tijekom 90 minuta (UZV1_90), nisu



Slika 12. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju α -tokotrienola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina

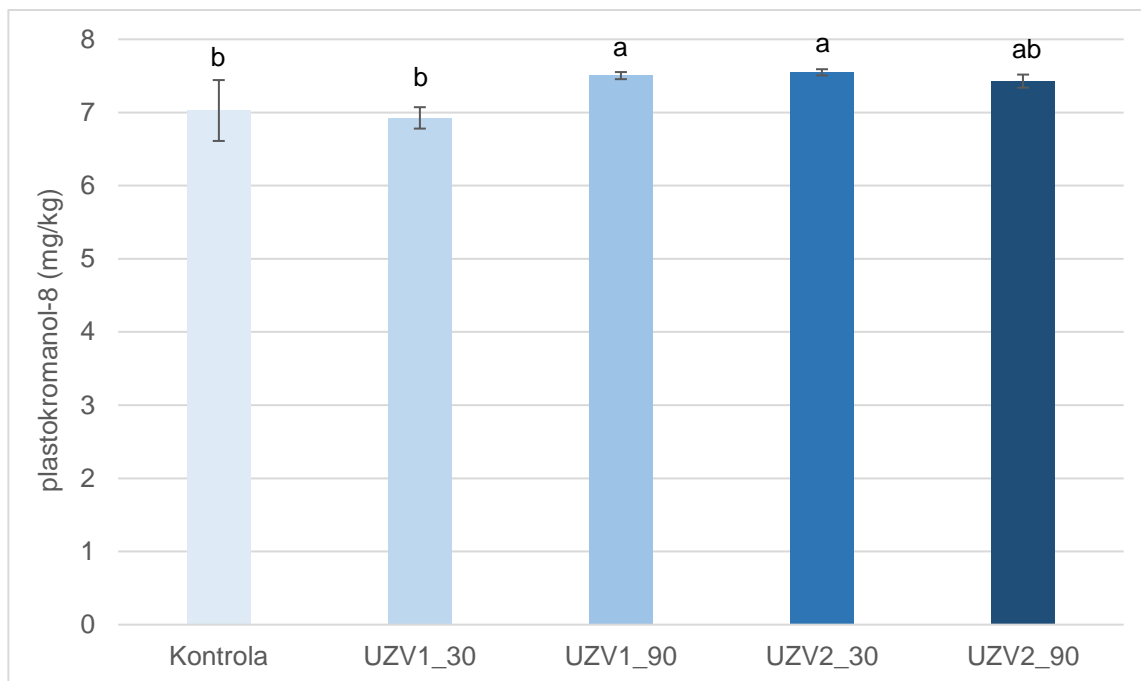


Slika 13. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju γ -tokotrienola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina

utvrđene značajne razlike u koncentraciji α -tokotrienola, što upućuje na to da produljenje vremena predtretmana na ovoj frekvenciji nije imalo značajan utjecaj na povećanje koncentracije navedenog spoja. S druge strane značajno više koncentracije α -tokotrienola zabilježene su kod uzoraka tretiranih ultrazvukom frekvencije 37 kHz. Uzorak UZV2_30, tretiran 30 minuta, imao je najvišu koncentraciju α -tokotrienola u usporedbi sa svim ostalim uzorcima, dok je uzorak UZV2_90, tretiran 90 minuta, imao značajno manju u odnosu na uzorak UZV2_30, ali i značajno veću koncentraciju u odnosu na kontrolni uzorak, kao i uzorke tretirane na 80 kHz (UZV1_30 i UZV1_90).

Najzastupljeniji tokokromanol u ulju sjemenki grožđa bio je γ -tokotrienol pri čemu se koncentracija ovog spoja kretala u rasponu od 173,0 do 183,1 mg/kg ulja (slika 13). Ranija istraživanja također su pokazala kako je γ -tokotrienol najdominantniji tokokromanol ulja sjemenki grožđa s koncentracijom koja može varirati od 287,0 pa sve do 1575,0 mg/kg (Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013), dok je viša koncentracija tokotrienola u odnosu na tokoferole karakteristična za navedeno ulje (Ćurko i sur., 2024; Górnaš i sur., 2019; Fernandes i sur., 2013; Sabir i sur., 2012). Trendovi utjecaja predtretmana ultrazvukom na koncentraciju γ -tokotrienola uočeni kod hladno prešanog ulja sjemenki grožđa (slika 13) bili su vrlo slični onima ranije uočenim kod α -tokotrienola. Naime, kontrolni uzorak ulja imao je najnižu koncentraciju γ -tokotrienola, a primjena ultrazvučnog predtretmana rezultira je značajnim povećanjem koncentracije ovog spoja kako pri višoj (80 kHz) tako i pri nižoj frekvenciji (37 kHz). U uzorku predtretiranom ultrazvukom frekvencije 80 kHz tijekom 90 minuta (UZV1_90) nije detektirana značajno veća koncentracija γ -tokotrienola u odnosu na uzorak UZV1_30. Dakle, produljenje vremena tretiranja, kako je i ranije zamijećeno kod α -tokotrienola, nije značajnije utjecalo na povećanje koncentracije γ -tokotrienola pri frekvenciji od 80 kHz. Također, slično kako je i ranije zamijećeno, produljenje vremena tretiranja pri frekvenciji od 37 kHz nije utjecalo na daljnje povećanje koncentracije γ -tokotrienola, budući da su značajno niže koncentracije ovog spoja dobivene u uzorku UZV2_90 nego u uzorku UZV2_30. Dakle, najviša koncentracija γ -tokotrienola u odnosu na sve uzorke postignuta je nakon primjene ultrazvučnog predtretmana od 37 kHz u trajanju od 30 minuta. Međutim, bez obzira na niže koncentracije dobivene u uzorku UZV2_90 u odnosu na uzorak UZV2_30, primjena ultrazvučnog predtretmana pri 37 kHz, rezultirala je višim koncentracijama γ -tokotrienola u odnosu na predtretman pri 80 kHz. Ranija istraživanja potvrdila su efikasnost primjene ultrazvuka tijekom klasične ekstrakcije ulja otapalima poput n-heksana (Lee i sur., 2012), a rezultati ovog istraživanja upućuju na njegovu efikasnost kao predtretmana kod proizvodnje hladno prešanog ulja.

Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju plastokromanola-8 u hladno prešanom ulju sorte Graševina prikazan je na slici 14. Navedi spoji bio je najmanje zastupljen tokokromanol s koncentracijom od 7,0-7,5 mg/kg ulja, što je u suglasnosti s ranije provedenim istraživanjima



Slika 14. Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju plastokromanola-8 u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa sorte Graševina

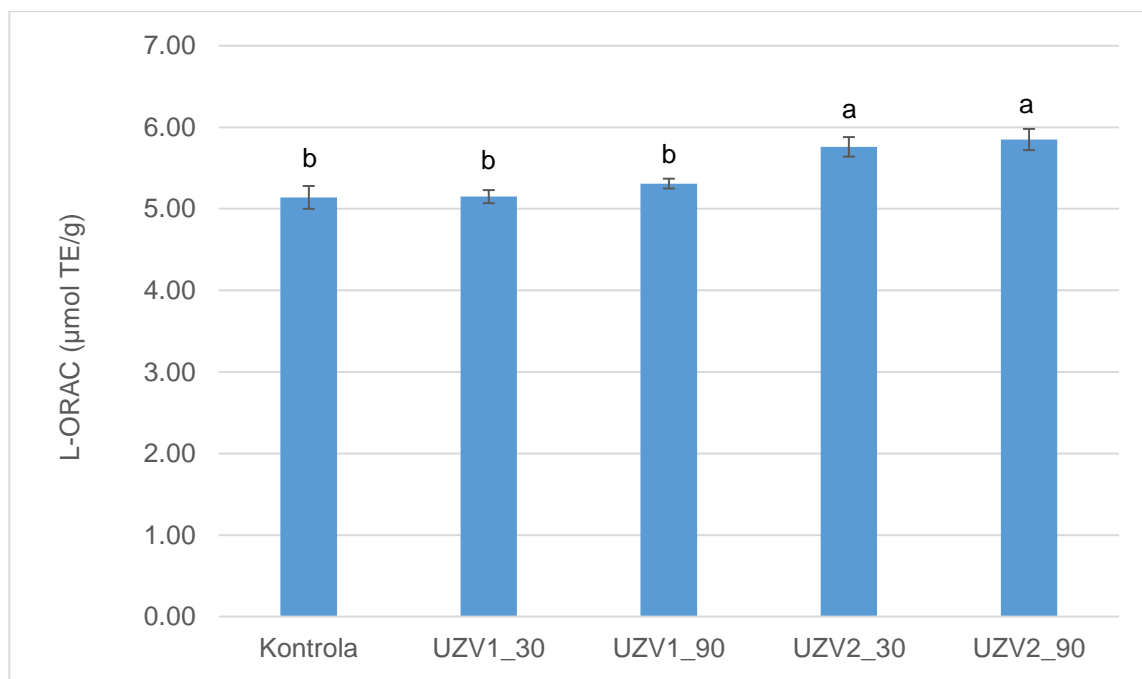
(Ćurko i sur., 2024; Ćurko i sur., 2023). Primjena predtretmana ultrazvukom pri frekvenciji od 80 kHz u trajanju od 30 minuta (UZV1_30) nije značajno utjecala na povećanje koncentracije plastokromanola-8. S druge strane, produljenje vremena tretiranja s 30 na 90 minuta (UZV1_90) rezultiralo je značajnim povećanjem navedene koncentracije. Sličan trend utvrđen je kod ultrazvučnog predtretmana od 37 kHz u trajanju od 30 minuta (UZV2_30), gdje su dobivene koncentracije plastokromanola-8 bile značajno veće od onih u kontrolnom uzorku, ali i usporedne s koncentracijama u uzorku UZV1_90. Produljenje vremena predtretmana s 30 na 90 minuta pri frekvenciji od 37 kHz, slično kao i kod α - i γ -tokoferola nije rezultiralo značajnim povećanjem koncentracije analiziranog spoja.

Dobiveni podatci o koncentraciji pojedinih tokokromanola (α -tokoferoli, γ -tokoferoli, α -tokotrienoli, γ -tokotrienola, plastokromanoli-8) ukazuju na učinkovitost primjene ultrazvuka kao predtretmana hladnom prešanju, pri čemu niža frekvencija ultrazvuka (37 kHz) rezultira većim povećanjem koncentracije tokokromanola u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa u usporedbi s višom frekvencijom (80 kHz). Također, primjetno je da produženje vremena tretmana na nižoj frekvenciji ne rezultira značajnim dodatnim povećanjem koncentracije, sugerirajući da optimalni učinak može biti postignut u kraćem vremenskom periodu na ovoj frekvenciji.

4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA I HLADNOG PREŠANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Utjecaj ultrazvuka na antioksidacijski kapacitet hladno prešanog ulja sorte Graševina određen je L-ORAC metodom i prikazan na slici 15, a dobivene L-ORAC vrijednosti (5,14-5,85 $\mu\text{mol TE/g}$ ulja) bile su skladu s ranije provedenim istraživanjima (Ćurko i sur., 2024; Ćurko i sur., 2023; Shinagawa i sur., 2018). Primjena ultrazvučnog predtretmana frekvencije 80 kHz u trajanju od 30 minuta, kao i 90 minuta nije imala značajan učinak na povećanje antioksidacijskog kapaciteta ulja, što je vidljivo iz međusobne usporedbe uzoraka UZV1_30, UZV1_90, kao i kontrolnog uzorka.

Nasuprot tome, ultrazvuk frekvencije 37 kHz u trajanju od 30 minuta (UZV2_30), kao i 90 minuta (UZV2_90) značajno je povećao antioksidacijski kapacitet ulja, budući da su L-ORAC vrijednosti u uzorcima UZV2_30 i UZV2_90 bile značajno veće od onih u kontrolnom i uzorcima tretiranim pri 80 kHz. S druge strane, usporedbom navedena dva uzorka nisu utvrđene statistički značajne razlike, što ukazuje na to da produljenje tretmana s 30 minuta na 90 minuta nije pokazalo značajan utjecaj na konačni antioksidacijski kapacitet. Ranije istraživanje Sales i Resurreccion (2010) provedeno na kikirikiju također je pokazalo važnost odabira parametara tretmana na antioksidacijski kapacitet. Naime, spomenuti autori utvrdili su kako kombinacija ultrazvuka i UV zračenja linearno povećava antioksidacijski kapacitet do određene snage ultrazvuka (120 mW/cm^3 ; 4 minute). Također, usporedbom uzoraka tretiranih



Slika 15. Utjecaj ultrazvuka na antioksidacijski kapacitet (L-ORAC) hladno prešanog ulja sjemenki grožđa sorte Graševina

samo ultrazvukom i onih tretiranih UV zračenjem, ustanovili su da samostalni tretman ultrazvukom značajnije povećava antioksidacijski kapacitet u odnosu na tretman UV zračenjem (Sales i Resurreccion, 2010).

Usporedbom rezultata dobivenih analizom koncentracije ukupnih tokokromanola (slike 9-14) i rezultata antioksidacijskog kapaciteta ulja (L-ORAC) (slika 15) utvrđena je značajna povezanost između navedenih parametara u istraživanim uzorcima ulja sjemenki grožđa. Na slici 15 koja prikazuje antioksidacijski kapacitet vidljivo je da su uzorci tretirani ultrazvukom snage 37 kHz kroz 30 i 90 minuta (UZV2_30 i UZV2_90) imali najvišu antioksidacijsku aktivnost, a sličan trend primijećen je i kod koncentracije ukupnih tokokromanola. Najviša koncentracija ukupnih tokokromanola, uključujući tokoferole i tokotrienole, zabilježena je u uzorcima UZV2_30 i UZV2_90, dok su u ostala tri uzorka (UZV1_30, UZV1_90 i kontrolni uzorak) koncentracije ovih spojeva bile značajno niže, što je u skladu s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koncentracije tokoferola, tokokromanola i antioksidacijskog kapaciteta ulja sjemenki grožđa proizvodnog primjenom ultrazvučnih predtretmana sjemenki komine grožđa u ultrazvučnoj kupelji pri frekvenciji od 37 kHz i 80 kHz tijekom 30 i 90 minuta i hladnog prešanja, možemo zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvučni predtretmani sjemenki komine grožđa frekvencije 80 kHz i 37 kHz tijekom 30 i 90 minuta značajno su utjecali na povećanje koncentracije ukupnih tokokromanola u hladno prešanom ulju sjemenki.
2. Frekvencija ultrazvuka i duljina predtretmana pokazali su značajan utjecaj na koncentraciju tokoferola, tokotrienola i antioksidacijski kapacitet ulja.
3. Više koncentracije ukupnih tokokromanola, tokoferola, tokotrienola i antioksidacijski kapacitet dobivene su primjenom ultrazvučnog predtretmana frekvencije 37 kHz nego 80 kHz.
4. Najviše koncentracije ukupnih tokokromanola te tokotrienola u hladno prešanom ulju ekstrahirane su primjenom ultrazvučnog predtretmana frekvencije 37 kHz i duljine tretiranja od 30 minuta.
5. Primjena ultrazvuka pokazala se kao efikasan predtretman u proizvodnji hladno prešanog ulja sjemenki grožđa.

6. LITERATURA

- Almeida B, Valli E, Bendini A, Gallina-Toschi T (2017) Semi-industrial ultrasound-assisted virgin olive oil extraction: Impact on quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **118**, 1600230. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600230>
- Amigh S, Dinani ST (2020) Combination of ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction and cooking pretreatment for date seed oil recovery. *Heat Mass Transf* **56**, 2345–2354. <https://doi.org/10.1007/s00231-020-02865-2>
- Andjeloković MZ, Mileković-Andjelković A, Radovanović B, Radovanović AN (2014) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenols from seeds of grape pomace. *Acta Chimica Slovenica* **61**, 858-865. PMID: 25551727
- Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B (2020) Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods* **9**, 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>
- Arslan G, Sönmez AY, Yank T (2018) Effects of *Vitis vinifera* seed oil supplementation on growth, survival, fatty acid profiles, antioxidant contents, and blood parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult Res* **49**, 2256–2266. <https://doi.org/10.1111/are.13686>
- Azadmard-Damirchi S, Habibi-Nodeh F, Hesari J, Nemati M, Achachlouei BF (2010) Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chem* **121**, 1211–1215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.006>
- Barrales FM, Rezende CA, Martínez J (2015) Supercritical CO₂ extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *J Supercrit Fluids* **104**, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.06.006>
- Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG i sur. (2017) Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag* **68**, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Boussetta N, Vorobiev E (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie* **17**, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>

- Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karlović D, Ježek D, Vikić-Topić D, Karlović S, Bosiljkov T (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 32–37. <https://hrcak.srce.hr/49942>. Pristupljeno 07.srpanja 2024.
- Bruni R, Guerrini A, Scalia S, Romagnoli C, Sacchetti G (2002) Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds: Ultrasonic and supercritical fluid extraction. *Phytochemical Analysis* **13**, 257–261. <https://doi.org/10.1002/pca.651>
- Bustamante MA, Moral R, Paredes C, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J, Pérez-Murcia MD (2008) Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag* **28**, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>
- Canselier JP, Delmas H, Wilhelm AM, Abismaïl B (2002) Ultrasound emulsification-An overview. *J Dispersion Sci Technol* **23**, 333–349. <https://doi.org/10.1080/01932690208984209>
- Chen F, Zhang Q, Gu H, Yang L (2016) An approach for extraction of kernel oil from *Pinus pumila* using homogenate-circulating ultrasound in combination with an aqueous enzymatic process and evaluation of its antioxidant activity. *J Chromatogr A* **1471**, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.037>
- Clodoveo ML, Durante V, La Notte D, Punzi R, Gambacorta G (2013) Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur J Lipid Sci Technol* **115**, 1062-1069. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200426>
- Cravotto G, Bicchi C, Mantegna S, Binello A, Tomao V, Chemat F i sur. (2011) Extraction of kiwi seed oil: Soxhlet versus four different non-conventional techniques. *Nat Prod Res* **25**, 974-981. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.524162>
- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guet S i sur. (2006) Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J Agric Food Chem* **54**, 6261-6265. <https://doi.org/10.1021/jf060338y>
- Ćurko N, Perić K, Vukušić-Pavičić T, Balbino S, Tomašević M, Iveković D, Radojčić-Redovniković i sur. (2024) Effect of Pulsed Electric Field Pretreatment on the Concentration of Lipophilic and Hydrophilic Compounds in Cold-Pressed Grape Seed Oil Produced from Wine Waste. *Foods* **13**, 2299. <https://doi.org/10.3390/foods13142299>

- Ćurko N, Lukić K, Tušek AJ, Balbino S, Vukušić-Pavičić T, Tomašević M i sur. (2023) Effect of cold pressing and supercritical CO₂ extraction assisted with pulsed electric fields pretreatment on grape seed oil yield, composition and antioxidant characteristics. *LWT-Food Sci Technol* **184**, 114974. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114974>
- Dabetic NM, Todorovic VM, Djuricic ID, Antic-Stankovic JA, Basic ZN, Vujovic DS i sur. (2020) Grape seed oil characterization: A novel approach for oil quality assessment. *Eur J Lipid Sci Technol* **122**, 1900447. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900447>
- Deng Q, Penner MH, Zhao Y (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res Int* **44**, 2712-2720. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.026>
- Dimić E (2005) *Hladno ceđena ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- 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. *Antioxidants* **9**, 568. <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>
- 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>
- Gallo M, Ferrara L, Naviglio D (2018) Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods* **7**, 164. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- Ghasemi YZ, Taghian-Dinani S (2018) Optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction of walnut kernel oil using response surface methodology. *J Food Process Eng* **41**, e12696. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12696>
- Glampedaki P, Dutschk V (2014) Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **460**, 306-311. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.048>
- Gliszczyńska-Świątło A, Sikorska E, Sikorski M, Khmelinskii I (2007) Tocopherol content in edible plant oils. *Pol J Food Nutr Sci* **57**, 157-161. <https://journal.pan.olsztyn.pl/TOCOPHEROL-CONTENT-IN-EDIBLE-PLANT-OILS,98802,0,2.html>. Pristupljeno 10.srpanja 2024.

- González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C, Teissedre PL (2013) Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem* **61**, 11579-11587. <https://doi.org/10.1021/jf403168k>
- Górnaś P, Rudzińska M, Grygier A, Lācis G (2019) Diversity of oil yield, fatty acids, tocopherols, tocotrienols, and sterols in the seeds of 19 interspecific grapes crosses. *J Sci Food Agric* **99**, 2078-2087. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9400>
- Goula AM, Papatheodorou A, Karasava S, Kaderides K (2018) Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pomegranate seeds. *Waste Biomass Valoriz* **9**, 1-11 <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9740-9>
- Haji-Heidari S, Taghian-Dinani S (2018) The study of ultrasound-assisted enzymatic extraction of oil from peanut seeds using response surface methodology. *Eur J Lipid Sci Technol* **120**, 1-13. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700252>
- Hamm W, Hamilton RJ, Cilliauw G (2013) *Edible oil processing*, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd, UK, str. 26-30.
- Herández-Santos B, Rodríguez-Miranda J, Herman-Lara E, Torrucouco JG, Carmona-García R, Juárez-Barrientos JM i sur. (2016) Effect of oil extraction assisted by ultrasound on the physicochemical properties and fatty acid profile of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*). *Ultrason Sonochem* **31**, 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.029>
- Herceg Z, Režek-Jambrak A, Rimac-Brnčić S, Krešić G (2009) *Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-68.
- Hu AJ, Feng QQ, Zheng J, Hu XH, Wu C, Liu CY (2012) Kinetic model and technology of ultrasound extraction of safflower seed oil. *J Food Process Eng* **35**, 278-294. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00589.x>
- Iqdiām BM, Abuagela MO, Marshall SM, Yagiz Y, Goodrich-Schneider R, Baker GL, Marshall MR (2019) Combining high power ultrasound pre-treatment with malaxation oxygen control to improve quantity and quality of extra virgin olive oil. *J Food Eng* **244**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.013>
- Ismail AFM, Salem AAM, Eassawy MM (2016) Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of γ -irradiated rat. *J Photochem Photobiol B Biol* **160**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.027>

- Jackson SR (2008) Wine science, principles and application, 3. izd., Elsevier Inc., London, str. 281-300.
- Jalili F, Jafari SM, Emam-Djomeh Z, Malekjani N (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from canola seeds with the use of response surface methodology. *Food Anal Methods* **11**, 598-612. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1030-z>
- Juliano P, Bainsczyk F, Swiergon P, Supriyatna MIM, Guillaume C, Ravetti L i sur. (2017) Extraction of olive oil assisted by high-frequency ultrasound standing waves. *Ultrason Sonochem* **38**, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.038>
- Jurić S, Jurić M, Siddique MAB, Fathi M (2020) Vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids: Nanoencapsulation methods and stability enhancement. *Food Rev Int* **38**, 32-69. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1717524>
- Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E (2018) Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess* **5**, 46. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>
- Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* **52**, 4360-4367. <https://doi.org/10.1021/jf049613b>
- Kaseke T, Opara UL, Fawole OA (2021) Novel seeds pretreatment techniques: effect on oil quality and antioxidant properties: a review. *J Food Sci Technol* **58**, 4451-4464. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04981-1>
- Ko S, Kim C, Kim C, Kim H, Chung S, Lee S i sur. (2003) Changes of vitamin E content in rice bran with different heat treatment. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 225-228. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390045>
- Lachman J, Hejtmankova A, Taborsky J, Kotikova Z, Pivec V, Stralkova R i sur. (2015) Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT-Food Sci Technol* **63**, 620-625. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.044>
- Lee YY, Park HM, Lee CK, Kim SL, Hwang TY, Choi MS i sur. (2012) Comparing extraction methods for the determination of tocopherols and tocotrienols in seeds and germinating seeds of soybean transformed with OsHGGT. *J Food Compos Anal* **27**, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.03.010>

- Leighton T (2007) What is ultrasound? *Prog Biophys Mol Biol* **93**, 3-83.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>
- Liu X, Ou H, Xiang Z, Gregersen H (2020) Ultrasound pretreatment combined with supercritical CO₂ extraction of *Iberis amara* seed oil. *J Appl Res Med Aromat Plants* **18**, 100265.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100265>
- Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade LM, Kefalas P i sur. (2014) Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultrasound assisted extraction. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 989-999. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2441-2>
- Mason TJ, Lorimer JP (2002) Applied Sonochemistry. Wiley-VCH, Weinheim, str. 3-5.
<https://doi.org/10.1002/352760054X>
- Massa TB, Stevanato N, Cardozo-Filho L, da Silva C (2019) Pumpkin (*Cucurbita maxima*) by-products: Obtaining seed oil enriched with active compounds from the peel by ultrasonic-assisted extraction. *J Food Process Eng* e13125. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13125>
- Matthäus B (2008) Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *Eur J Lipid Sci Technol* **110**, 645-650. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700276>
- Mildner-Szkudlarz S, Bajerska J, Zawirska-Wojtasiak R, Górecka D (2013) White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *J Sci Food Agric* **93**, 389-395.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.5774>
- MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE (2023) Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede u 2022., <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/poljoprivreda-173/poljoprivredna-politika/agroekonomske-analize/zeleno-izvjesce/189>. Pristupljeno 20. lipanja 2024.
- Moghimi M, Farzaneh V, Bakhshabadi H (2018) The effect of ultrasound pretreatment on some selected physicochemical properties of black cumin (*Nigella Sativa*). *Nutrire* **43**, 18.
<https://doi.org/10.1186/s41110-018-0077-y>
- Mohamed-Ahmed IA, Özcan MM, Al Juhaimi F, Babiker EFE, Ghafoor K, Banjanin T i sur. (2020) Chemical composition, bioactive compounds, mineral contents, and fatty acid composition of pomace powder of different grape varieties. *J Food Process Preserv* **44**, 7.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14539>

- Mohseni NM, Mirzaei H, Moghimi M (2020) Optimized extraction and quality evaluation of Niger seed oil via microwave-pulsed electric field pretreatments. *Food Sci Nutr* **8**, 1383-1393. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1396>
- Moradi N, Rahimi M, Moeini A, Parsamoghadam MA (2018) Impact of ultrasound on oil yield and content of functional food ingredients at the oil extraction from sunflower. *Sep Sci Technol* **53**, 261-276. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1384016>
- Musielak G, Mierzwa D, Kroehnke J (2016) Food drying enhancement by ultrasound-A review. *Trends Food Sci Technol* **56**, 126-141. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.003>
- Nardella M, Moschetti R, Nallan-Chakravartula SS, Bedini G, Massantini R (2021) A review on high-power ultrasound-assisted extraction of olive oils: Effect on oil yield, quality, chemical composition and consumer perception. *Foods* **10**, 2743. <https://doi.org/10.3390/foods10112743>
- Naveenkumar R, Baskar G (2019) Ultrasonic assisted extraction of oil from castor seeds: Optimization using response surface methodology, extraction kinetics and characterization. *Energy Sources Part A: Recov Util Environ Effects* **44**, 2497-2508. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1650136>
- OIV (2024) World statistics. OIV-International organization of Vine and Wine, <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv>. Pristupljeno 20. lipanja 2024.
- Oomah BD, Busson M, Godfrey DV, Drover JCG (2002) Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chem* **76**, 33-43. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00245-X)
- Oomah BD, Liang J, Godfrey D, Mazza G (1998) Microwave heating of grapeseed: Effect on oil quality. *J Agric Food Chem* **46**, 4017-4021. <https://doi.org/10.1021/jf980412f>
- Ou B, Chang T, Huang D, Prior RL (2013) Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescein probe: First action 2012.23. *J AOAC Int* **96**, 1372-1376. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem* **49**, 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Özvural EB, Vural H (2013) Which is the best grape seed additive for frankfurters: Extract, oil or flour? *J Sci Food Agric* **94**, 792-797. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6442>

- Pardo JE, Fernández E, Rubio M, Alvarruiz A, Alonso GL (2009) Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Eur J Lipid Sci Technol* **111**, 188-193. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800052>
- Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F (2013) Natural Product Extraction: Principles and Applications. RSC, str. 89–112. <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00089>
- Porto C, Porretto E, Decorti D (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem* **20**, 1076-1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- Rac M (1964) Ulja i masti. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Industrijska knjiga, Beograd.
- Riera E, Golás Y, Blanco A, Gallego JA, Blasco M, Mulet A (2004) Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrason Sonochem* **11**, 241-244. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.019>
- Rigane G, Yahyaoui A, Acar A, Mnif S, Salem RB, Arslan D (2020) Change in some quality parameters and oxidative stability of olive oils with regard to ultrasound pretreatment, depitting and water addition. *Biotechnol Rep* **26**, 4-9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00442>
- de Sá M, Justino V, Spranger MI, Zhao YQ, Han L, Sun BS (2014) Extraction yields and antioxidant activity of proanthocyanidins from different parts of grape pomace: Effect of mechanical treatments. *Phytochem Anal* **25**, 134-140. <https://doi.org/10.1002/pca.2479>
- Sabir A, Unver A, Kara Z (2012) The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agric* **92**, 1982-1987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5571>
- Sales JM, Resurreccion AVA (2010) Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem* **122**, 795-803. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.058>
- Samaram S, Mirhosseini H, Ping C, Mohd H (2014) Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Ind Crops Prod* **52**, 702-708. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.047>

- Sanchez RJ, Fernández MB, Nolasco SM (2019) Canola oil with high antioxidant content obtained by combining emerging technologies: Microwave, ultrasound, and a green solvent. *Eur J Lipid Sci Technol* **121**, 1-9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900152>
- Senrayan J, Venkatachalam S (2019) A short extraction time of vegetable oil from *Carica papaya* L. seeds using continuous ultrasound acoustic cavitation: Analysis of fatty acid profile and thermal behavior. *J Food Process Eng* **42**, 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12950>
- Senrayan J, Venkatachalam S (2020) Ultrasonic acoustic-cavitation as a novel and emerging energy efficient technique for oil extraction from kapok seeds. *Innov Food Sci Emerg Technol* **62**, 102347. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102347>
- Servili M, Veneziani G, Taticchi A, Romaniello R, Tamborrino A, Leone A (2019) Low-frequency, high-power ultrasound treatment at different pressures for olive paste: Effects on olive oil yield and quality. *Ultrason Sonochem* **59**, 104747. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104747>
- Shahid MKN, Shahid M, Mohammad F (2016) Plant phenolics: A review on modern extraction techniques. U: Govil JN, Pathak M (ured.) *Recent progress in Medicinal Plants*, **41**, Studium Press LLC, USA , str. 365-287. <https://www.researchgate.net/publication/310614780>.
Pristupljeno 09. srpnja 2024.
- Shinagawa FB, de Santana FC, Araujo E, Purgatto E, Mancini-Filho J (2018) Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *J Food Sci Technol* **38**, 164–171. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.08317>
- Shinagawa FB, de Santana FC, Torres LRO, Mancini-Filho J (2015) Grape seed oil: a potential functional food? *Food Sci Technol* **35**, 399–406. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6826>
- Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E i sur. (2020) Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresour Technol* **314**, 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- de Souza RC, Machado BAS, Barreto GA, Leal IL, Anjos JP dos, Umsza-Guez MA (2020) Effect of experimental parameters on the extraction of grape seed oil obtained by low pressure and supercritical fluid extraction. *Molecules* **25**, 1634. <https://doi.org/10.3390/molecules25071634>
- Skračić Ž, Ljubenković I, Mimica N, Generalić-Mekinić I (2023) Valorizacija nusproizvoda proizvodnje vina. *Kem Ind* **72**, 247-255. <https://doi.org/10.15255/KUI.2022.051>

- Stevanato N, da Silva C (2019) Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. *Ind Crops Prod* **132**, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.032>
- Surini S, Nursatyani K, Ramadon D (2018) Gel formulation containing microcapsules of grape seed oil (*Vitis vinifera* L.) for skin moisturizer. *J Young Pharm* **10**, 41–47. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.11>
- Thilakarathna RCN, Siow LF, Tang TK, Lee YY (2023) A review on application of ultrasound and ultrasound assisted technology for seed oil extraction. *J Food Sci Technol* **60**, 1222–1236. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05359-7>
- Thyagarajan P (2012) Evaluation and optimization of cranberry seed oil extraction methods. McGill University, Quebec. <https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/v118rj075> . Pristupljeno 20.lipnja 2024.
- Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal Chem* **71**, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov Food Sci Emerg Technol* **9**, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Wada B, Gordon R, Yagiz Y, Gu L (2018) Comparing the oil extraction and refining methods for muscadine grape seeds of Noble and Carlos cultivar. *Eur J Lipid Sci Technol* **120**, 1800166. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800166>
- Yusof NSM, Babgi B, Alghamdi Y, Aksu M, Madhavan J, Ashokkumar M (2016) Physical and chemical effects of acoustic cavitation in selected ultrasonic cleaning applications. *Ultrason Sonochem* **29**, 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.06.013>
- Zhang W, Pan Y, Huang W, Chen H, Yang H (2019) Optimized ultrasonic-assisted extraction of papaya seed oil from Hainan/Eksotika variety. *Food Sci Nutr* **8**, 2692-2701. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1125>
- Zhang Z, Sun DW, Zhu Z, Cheng L (2015) Enhancement of crystallization processes by power ultrasound: Current state-of-the-art and research advances. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **14**, 303-316. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12132>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Roksandić 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.

Vlastoručni potpis