

Kemijski sastav ulja iz sjemenki grožđa

Radić, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:406731>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ines Radić

7422/PT

KEMIJSKI SASTAV ULJA IZ SJEMENKI GROŽĐA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ulja i masti

Mentor: Prof. dr. sc. Dubravka Škevin

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Kemijski sastav ulja iz sjemenki grožđa

Ines Radić, 0058210850

Sažetak:

Vinova loza, *Vitis vinifera* L., značajna je kultura Hrvatske, a proizvodi se na 19.824 hektara zemlje. Glavni proizvod ploda vinove loze je vino, a prilikom proizvodnje nastaje nekoliko nusprodukata uključujući sjemenke. Jedan od načina zbrinjavanja sjemenki je izdvajanje ulja, stoga je cilj ovog rada odrediti postoje li statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina i sterola takvog ulja između pojedinih sorti. Rezultati istraživanja pokazali su da sjeme sadrži 9,6-11,9 % vode, a ulja 8,3-12,8 %. Najzastupljenijemasne kiseline od svih uzoraka bile su linolna masna kiselina detektirana u udjelu od 61,5-67,8 %, zatim oleinska u udjelu 17,1-21,1 % te palmitinska s udjelom 8,9-11,9 %. Od fitosterola, u svim uzorcima detektiran je najveći udio β -sitosterola (74,36-81,14 %), zatim kampesterola (8,10-9,31 %) te stigmasterola (6,58-8,05 %). Između ispitivanih ulja iz sjemenki različitih sorti detektirana je statistički značajna razlika u udjelima masnih kiselina i fitosterola.

Ključne riječi: fitosteroli, sastav masnih kiselina, ulje iz sjemenki grožđa

Rad sadrži: 30 stranica, 1 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof.dr.sc. Dubravka Škevin

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Marko Obranić

Datum obrane: 1. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Chemical composition of grapeseed oil

Ines Radić, 0058210858

Abstract:

Grape vine, *Vitis vinifera* L., is a significant agro-culture of Croatia, and is produced on 19.824 hectares of a land. Main product of vine is wine, and during its production occur several byproducts, including seeds. One method of seed treatment is oil extraction, therefore, purpose of this work was to determine statistically significant differences in fatty acid composition and phytosterols among oils produced from different varieties of grape. The results have shown that grape seed contains 9,6-11,9 % moisture and 8,3-12,8 % oil. The most common fatty acid among samples was linoleic fatty acid detected in the range of 61,5-67,8 %, followed by oleic fatty acid in the range of 17,1-21,1 % and palmitic fatty acid in the range of 8,9-11,9 %. Regarding sterols, β -sitosterol was detected in the greatest content among all samples (74,36-81,14 %), followed by campesterol (8,10-9,31 %) and stigmasterol (6,58-8,05 %). The statistically significant difference was found between all samples of grapeseed oil from different sortiments in the amount of fatty acids and phytosterols.

Keywords: Fatty acid composition, grapeseed oil, phytosterols

Thesis contains: 30 pages, 1 figure, 4 tables, 45 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Dubravka Škevin, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Marko Obranović, Assistant professor

Decence date: September 1st2020

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1.UVOD..... | 6 |
| 2.TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. STRUKTURA I KEMIJSKI SASTAV GROŽĐA | 2 |
| 2.1.1. Struktura grozda | 2 |
| 2.1.2. Kemijski sastav grozda | 2 |
| 2.2. KOMINA | 5 |
| 2.3. DOBIVANJE SJEMENKI GROŽĐA | 6 |
| 2.5. ULJE SJEMENKI GROŽĐA..... | 9 |
| 2.5.1. Masne kiseline i lipidi | 10 |
| 2.5.2. Tokoferoli..... | 11 |
| 2.5.3. Fenoli | 12 |
| 2.5.4. Steroli..... | 13 |
| 2.6. PRIMJENA ULJA IZ KOŠTICA GROŽĐA | 14 |
| 3.EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1.MATERIJAL | 15 |
| 3.2. ANALIZA SJEMENKI | 15 |
| 3.2.1 Određivanje udjela vode | 15 |
| 3.2.2. Određivanje udjela ulja | 15 |
| 3.3. ANALIZA ULJA | 16 |
| 3.3.1. Određivanje sastava masnih kiselina | 16 |
| 3.3.2. Određivanje sastava sterola..... | 17 |
| 4.REZULTATI I RASPRAVA..... | 20 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 25 |
| 6. LITERATURA..... | 26 |

1.UVOD

Vinova loza, (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najraširenijih biljnih vrsta na cijelom svijetu te je uz neke žitarice najstarije uzgajana biljna kultura. Nagađa se da je južnoeuropska ili zapadnoazijska autohtona vrsta. Plod vinove loze je grozd, a glavni proizvod grožđa, uz marmelade, sokove, destilate, je vino. Na globalnoj razini oko 65 % svog grožđa se preradi u vino, 24 % se suši, a 11 % se konzumira svježe (Kranjčec, 2016). S obzirom na to da tijekom izdvajanja voćnog soka iz pulpe prešanjem zaostaje komina, čija masa iznosi 13,5 - 14,5 % pa i do 20 % ukupne mase priroda (ovisno i uvjetima proizvodnje i primijenjenom pritisku prilikom prešanja), nju je potrebno zbrinuti. Neodgovornim odlaganjem u okoliš može doći do niza nuspojava; emisijom bioaktivnih sastojaka može doći do zagađenja tla, kao i podzemnih voda, uslijed spontane fermentacije namnoženih bakterijskih i kvašćevih kultura može doći do razvijanja plinova neugodnog mirisa koji mogu privući razne insekte teštetočine i uzrokovati širenje bolesti. Oko 20 – 26 % komine čine sjemenke koje su bogate proteinima (Baydar i Akkur, 2001) te sadrže od 7 do 20 % ulja (Matthäus, 2008). Nekoliko faktora utječe na udio ulja u sjemenkama kao što je kultivar, lokacija uzgoja, zrelost, sastav tla (Crews, 2006).

U Republici Hrvatskoj je 2018. godine prema službenim podacima Državnog zavoda za statistiku (Statistički ljetopis, 2018) pod nasadima vinograda bilo zasađeno 19.824 hektara s prirodom od 5,5 t / ha. Prema Dimić (2005), ako je prosječan prinos grožđa 6 t / ha, dobiva se prosječno 300 kg koštica po hektaru, od čega se pak može dobiti 35 - 40 kg ulja. Računamo li s cijenom ulja iz koštica grožđa na svjetskom tržištu to iznosi oko 150 €, ovaj način zbrinjavanja nusprodukta predstavlja ne samo ekološko već i financijski isplativo rješenje.

Cilj ovog rada je predstaviti sjemenke grožđa kao sirovinu za proizvodnju ulja i odrediti postoje li statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina i fitosterola takvog ulja između pojedinih sorti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STRUKTURA I KEMIJSKI SASTAV GROŽĐA

2.1.1. Struktura grozda

Struktura grozda predstavlja postotni udio pojedinih dijelova grozda. Karakteristična je za svaku pojedinu sortu vinove loze, pa je prema tome i njezino ampelografsko i tehnološko obilježje. Pod utjecajem je klimatskih uvjeta i primjene agrotehnike, koji djeluju na prinos i kakvoću grožđa.

Grozđ vinove loze se sastoji od dva osnovna dijela: peteljke i bobice. Kod zdravog grožđa u stadiju pune zrelosti na peteljku otpada 3 – 8 %, dok na bobice otpada 92 – 97 % od ukupne težine grozda. Grozđ je iste građe kao cvat. Sastoji se od glavne osi i ogranaka, a završava s peteljčicama koje nose bobice (Kranjčec, 2016).

2.1.2. Kemijski sastav grozda

Peteljka

Peteljka predstavlja skelet grozda. Sastoji se od osnovnog dijela koji se više ili manje grana. Završava s peteljčicama koje nose cvijet, a nakon oplodnje i bobicu. U toku vegetacije peteljka je zeljasta i kao takva provodi hranjive tvari, koje dolaze iz mladica i lišća u bobicu. U stadiju pune zrelosti grožđa peteljka je više ili manje lignificirana, što otežava njeno odvajanje od izboja. Udio peteljke u grozđu vinskih sorata kreće se između 2 - 8 %, dok kod stolnih sorata može biti i 1,5 %. Takav odnos peteljke prema bobicama u grozđu može imati utjecaja na randman mošta i vina. Sorte s manjom zastupljenošću peteljke u grozđu imaju veći randman i obrnuto. Po kemijskom sastavu peteljka je slična listu i vitici vinove loze. Siromašna je šećerom i ne sadrži više od 10 grama šećera na kg peteljke. Na mineralni dio otpada 5 – 6 % suhe tvari, dok kalij čini polovinu toga. Kod vinifikacije crnih vina, maceracijom masulja s peteljkom, dolazi do smanjenja kiselosti. Peteljka je bogata polifenolima, naročito kod crnih sorata. Ako se tijekom prerade peteljka ne odvaja, ukupna količina polifenola u budućem vinu, osobito tanina, može biti povećana i do 25 % pa tako do 1/3 ukupnog leukocijanidola u crnim vinima potječe iz dodane peteljke u maceraciji masulja (Kranjčec, 2016).

Bobica

Glavni dio grozda čini bobica kao plod vinove loze, dok je grozd zapravo skup plodova. U toku vegetacije bobica je kod većine sorata zelene boje i obavlja proces fotosinteze. S pojavom šare, zelena se boja gubi i prelazi u zeleno žutu, crvenkastu ili tamno crvenu, čiji intenzitet postaje sve jači prema periodu pune zrelosti. Osim po obliku, veličini i boji bobica, pojedine se sorte međusobno razlikuju i po krupnoći svojih bobica kao i po većoj ili manjoj zbijenosti na grozdu. Rast bobice traje od završene oplodnje pa do fiziološke zrelosti, tj. kad su sjemenke sposobne za klijanje. Težina bobice u grozdu se povećava u toku vegetacije i dostiže najveću vrijednost u punoj zrelosti, kada čini 92 – 97 % težine grozda. Poslije ove faze odnos se mijenja, jer se prestankom dotoka hranjivih tvari kroz odrvenjelu peteljku izvjestan dio vode gubi isparavanjem, a samim time smanjuje se i težina bobice. Bobicu čine sjemenke, kožica i meso s groždanim sokom. Količinski odnos navedenih dijelova bobice različit je za različite sorte, ali ima razlika i kod iste sorte, npr. ovisno o vremenskim prilikama naročito u doba cvatnje, oplodnje, razvoja i dozrijevanja bobica (Kranjčec, 2016).

Sjemenka

Svaka bobica bi trebala imati 4 sjemenke. Međutim, uslijed nepotpune oplodnje broj sjemenki kod pojedinih sorti varira od 1 – 4. Postoje i besjemene sorte, kod kojih se ne razvija sjemenka, a namijenjene su za sušenje (grožđice) i za jelo u svježem stanju (stolno grožđe). Razvoj i veličina sjemenke utječu na veličinu i sastav bobice. Broj sjemenki u međuodnosu je s težinom bobice, sadržajem šećera i kiselina (Kranjčec, 2016). Sjeme dostigne svoju punu veličinu prije početka zrenja. U to vrijeme, ono je već dostiglo fiziološku zrelost. Najveći dio sastojaka u sjemenci su rezervni sastojci potrebni za ishranu klice, a značajni su i za tehnologiju vina. Sjemenka se sastoji od masne jezgre, koju okružuje drvena ljuska prekrivena taninskom kutikulom. Za sjemenke grožđa je karakterističan veoma velik udio čvrste ljuske, čak 75 %, dok udio jezgre iznosi 25 %. Prešani kom sadrži 20 do 30 % sjemenki (Baydar i Akkur, 2001;Kranjčec, 2016). Osim vode i ugljikohidrata, od kojih ima najviše celuloze, u kemijskom sastavu sjemenke potom ima najviše ulja do prosječno 16 %, dok neki autori (Domokos i Kiss, 2002) navode da je sadržaj ulja u sjemenkama europskih sorti 12 - 18 %, a domaćih 13 %. Drugi pak izvori (Matthäus, 2008) tvrde da suhe sjemenke sadrže oko 35 % vlakana, 29 % sastojaka koji se mogu ekstrahirati, uključujući fenole, 11 % proteina, 3 % minerala i 7 % vode. Najviše tanina, od svih čvrstih dijelova grozda, nalazi se

u sjemenci. Tijekom zrenja, koncentracija tanina pada dok stupanj njihove polimerizacije raste. Sjeme može prenijeti do petine svog dušika u pulpu, a i dalje će ostati bogatije dušikom od ostalih čvrstih dijelova grozda. Neki od sastojaka kutikule sjemenke, fenolni sastojci, dušični spojevi i fosfati djelomično su topivi u procesu vinifikacije, naročito kod crnih vina. O jačini gnječenja ovisi u kojoj će mjeri određeni sastojci prijeći u mošt. Oštete li se pritom sjemenke, počinje ekstrakcija tanina, pa dobivamo opora i gorka vina (Kranjčec, 2016).

Kožica

Kožica predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji 6 – 10 slojeva stanica. Na vanjskom su dijelu stanice manje, a prema unutrašnjosti veće dok su im pregrade vrlo tanke. U punoj zrelosti čini 8 – 11 % težine bobice. Prekrivena je kutikulom koja ima značajnu ulogu u burnoj fermentaciji. Voštani sloj čini pretežito oleinska kiselina (2/3) dok ostatak (1/3) čine esteri, masne kiseline i aldehidi. Karakteristične je boje, a naziva se i voštani mašak. Ova voštana prevlaka sprječava prodiranje vode i čuva bobicu od evaporacije, a s dozrijevanjem joj propusnost opada. Po kemijskom sastavu kožica je siromašna šećerom, 0,7 – 3,0 g / 1000 bobica dok meso bobice sadrži od 140 do 175 g šećera. Bogata je celulozom (1/4 do 1/5 suhe težine), netopljivim pektinima i proteinima (10 – 15 %). U zelenoj kožici ima puno jabučne kiseline, a bogata je i polifenolima (kod crnih sorata duplo više), ali još uvijek količina je znatno manja nego u peteljci. Sadrži i taninske spojeve, čiju količinu u velikoj mjeri može smanjiti pojava plijesni na grožđu. Kod većine sorti kožica je jedino mjesto gdje se nalaze tvari boje (od crnih sorti može se dobiti bijelo vino), osim kod bojadisara i nekih direktno rodnih hibrida koji imaju obojeni sok. Uz stvoreni alkohol i povišenu temperaturu prilikom alkoholne fermentacije prelaze u vino. U kemijskom sastavu kožice značajno mjesto zauzimaju i mineralni spojevi. Prijelaz istih u vino dijelom ovisi o načinu prerade, a najviše o načinu vinifikacije. Ukoliko kožica ostaje duže u kontaktu s vinom, utoliko će vino biti bogatije u mineralnim sastojcima (bijelo vino je siromašnije od rosé i crnih vina). Kožica sadrži dosta aromatskih spojeva, a bogata je i pigmentima (Kranjčec, 2016).

Meso

Glavni dio bobice grožđa je meso s grožđanim sokom. Meso bobice čine velike stanice čiju unutrašnjost ispunjava sok – mošt. Rast bobice je rezultat povećanja volumena stanica, a ne njihovog udvostručenja. U punoj zrelosti meso predstavlja 75–85 % težine bobice. Anatomski je bobica putem provodnih snopova povezana preko peteljke s lišćem odnosno korijenovim sustavom. Pomoću njih se grožđe snabdijeva asimilatima i mineralnim tvarima. Peteljčica koja nosi bobicu, nastavlja se u bobici snopom zvanim metlica, sastavljenim od 10 – 12

snopova lika. Tim putem u bobicu dolaze asimilati. Ti se snopovi granaju po unutrašnjosti bobice u pravcu pojedinih zona bobice. Kod bijelih sorata sok je žuto zelen do zlatno žut, kod crnih malo obojen (Kranjčec, 2016).

2.2. KOMINA

Kruti dio što zaostaje nakon cijedenja ili tiještenja masulja grožđa ili drugog voća, odnosno slada (u proizvodnji piva) naziva se komina. Komina može biti neprevrela (u pravilu takva se komina dobije neposredno nakon tiještenja grožđa odnosno masulja bijelog grožđa), djelomice prevrela (npr. neposredno nakon otakanja mošta u vrenju s masulja crnog grožđa) ili prevrela (Anonymous 1, 2020).

Komina sadrži kožicu, sjemenke, razorene stanice pulpe, te dijelove peteljke. Način proizvodnje i uvjeti proizvodnje vina uvelike utječu na sastav vinske komine. Ovisno o podrijetlu i sili pritiska primijenjenoj prilikom prešanja, vinska komina pokazivat će značajne razlike u količini vode, između 55 % i 75 %. Usprkos razlikama u količini vode, ona je dovoljna za mikrobiološku i enzimatsku razgradnju, što može ograničiti upotrebu svježe vinske komine. Vlakna su glavni sastojak suhe komine te njihova koncentracija iznosi 43 % - 75 %. Vlakna se većinski sastoje od polisaharida staničnih stijenki i lignana (García-Lomillo i González-SanJosé, 2016). Vinska komina dobivena od bijelih sorti grožđa sadrži manji udio lignana od vinske komine crnog grožđa. Zbog slabe ekstrakcije prilikom prešanja komina sadrži visok udio polifenola, koji se obradom komine, prvenstveno sušenjem, značajno smanjuje. Najveći udio lipida u komini dolazi od sjemenki. Sjemenke sadrže velik udio polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), zatim mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) te nizak udio zasićenih masnih kiselina (Fernandes i sur., 2013).

Prerada komine u razvijenim zemljama se usmjerava u pravcu proizvodnje ulja iz sjemenki i proizvodnje bioaktivnih komponenti, kako iz kožice, tako i iz sjemenki. U zemljama s najvećom proizvodnjom grožđa u Europi: Francuska, Španjolska, Portugal i Švicarska, izdvajanje sjemenki i njihova prerada datiraju još od 1935. godine. Danas su vodeće zemlje proizvođača ulja od sjemenki grožđa Italija i Francuska (Dimić, 2005). Osim ulja, izdvojene sjemenke koriste se za proizvodnju lignana te lakaze, vinske kiseline, kao biomasa za dobivanje energije, kao proteinski dodaci ljudskoj i životinjskoj prehrani te za gnojidbu. Najpopularniji proizvod iz izdvojene kožice su prirodna bojila koja se koriste u slastičarskoj industriji dok se komina kao takva najčešće koristi u smjesi za proizvodnju komposta ili kao dodatak stočnoj hrani. Zbog visokog udjela vlakna (posebno lignina) i prisutnosti fenolnih spojeva, vinska komina je slabo probavljiva. Može se koristiti za prehranu preživača, konja i zečeva u kombinaciji s hranom koja ima bolju hranjivu vrijednost, ali se ne preporučuje

svinjama i peradi kao izvor energije i proteina (NRC, 1983; Demarquilly i sur., 1976). Između ostalog, vinska komina se već koristi u industriji za ekstrakciju antocijana (Ye ZhiJing et al., 2016; Letaief, 2016).

2.3. DOBIVANJE SJEMENKI GROŽĐA

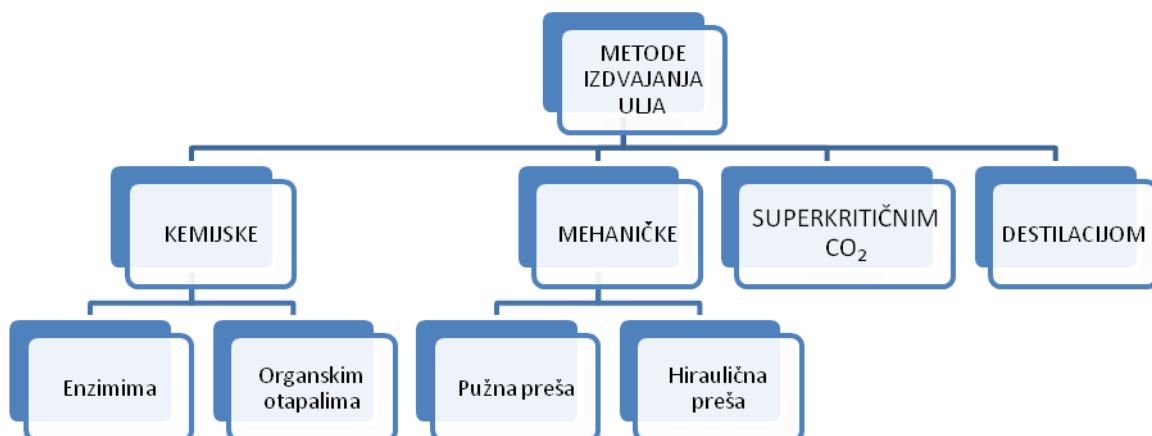
Za izdvajanje sjemenki iz komine dobivene prešanjem bijelog grožđa, komina se mora čim prije obraditi kako ne bi došlo do kvarenja ili spontane fermentacije. Visok udio vode u komini (55 - 75 %) pogoduje enzimskoj aktivnosti te stvara idealne uvjete za rast plijesni. Rezultat aktivnosti enzima i mikroorganizama je razvoj neugodne arome koja se može prenijeti u ulje tijekom prešanja, jer je ulje veoma dobar nosioc arome, odnosno hlapljivih spojeva. Već je nekoliko sati između proizvodnje soka i sušenja dovoljno za razvoj tih aroma, koje se sastoje uglavnom od etil-acetata, octene kiseline i etanola (Matthäus, 2008). Kako bi izdvajanje sjemenki od pulpe i ljuske bilo čim učinkovitije, za polazni materijal bi bilo idealno kada bi sadržavao maksimalno 30 % vlage. Takav materijal se prerađuje na uređaju s rotirajućim perforiranim bubnjem, pri čemu se tako vrši grubo razdvajanje sjemenki grožđa i ljuske. Nakon odvajanja sjemenki, one odlaze na prvo pročišćavanje pomoću struje zraka kojom se odvoji zaostala ljuska, lagane nečistoće i nerazvijene sjemenke od zdravih sjemenki. S obzirom na to da je materijal nakon ovakvog pročišćavanja još uvijek vlažan te da nije dobiveno čisto sjemenje, takav materijal odlazi na sušenje. Sušenje se provodi na zraku te se, nakon što udio vlage padne na oko 10 %, provodi konačno pročišćavanje. Ono se provodi u uređaju za selekciju koji odvaja zdrave od zakržljalih sjemenki na sistemu sita, dok se sitne nečistoće odvajaju strujom zraka. Takvo pročišćeno sjeme se suši do oko 7 % vlage i skladišti do daljnje prerade (Bjelica, 2019).

Kod crnog grožđa, proces dobivanja vina teče drugačije nego za bijelo vino, te je stoga proces odvajanja sjemenki za dobivanje ulja također drugačiji. Izdvajanje sjemenki moguće je u drugoj fazi fermentacije. Tijekom fermentacije u fermentacijskom tanku dolazi do odvajanja dijelova bobica grožđa tako da sjemenke koje su teže padaju na dno tanka, dok kožica i perikarp isplivaju na površinu. U ovoj je fazi moguće odvajanje sjemenki. Sjemenke se pumpom s dna tanka izdvajaju preko sita, a ostatak se prebacuje u prešu na prešanje. Tako sakupljene sjemenke se peru vodom kako bi se odvojila zaostala kožica i ispralo vino, a zatim slijedi postupak sušenja i finalnog pročišćavanja opisan za sjemenke bijelog grožđa. Drugi način odvajanja sjemenki crnog grožđa je da se, nakon prešanja masulja, iz dobivene fermentirane komine one izdvoje prema postupku opisanom za izdvajanje sjemenki iz komine bijelog grožđa (Bjelica, 2019).

Sjemenke grožđa mogu se dobiti i nakon postupka destilacije vinske komine tako da se predestilirana komina ubaci u vodu te miješa prilikom čega dolazi do odvajanja sjemenki i ostalih dijelova bobice ili se predestilirana komina sipa na beton te se vrši prirodno cijedenje. Nakon izdvajanja sjemenki na rotacionom bubnju i prvog čišćenja, prije sušenja se ponekad provodi pranje u svrhu ispiranja neugodnog mirisa ili nepoželjnih sastojaka koji bi mogli utjecati na kvalitetu sjemenki. Nakon prvog sušenja i čišćenja, završno se čišćenje provodi u uređaju za selekciju, zatim se sjeme suši do vlage od oko 7 %, pakira i skladišti do prerade (Bjelica, 2019). Valja napomenuti da iz predestilirane komine ne postoji praksa izdvajanja sjemenki već se ona koristi uglavnom kao gnojivo ili se spaljuje za dobivanje energije.

2.4.METODE IZDVAJANJA ULJA IZ SJEMENKI

Ulje iz sjemenki grožđa može se izdvojiti svim postupcima izdvajanja ulja iz biljnog materijala te su na shemi prikazani neki od najčešćih.



Slika 1. Postupci izdvajanja ulja

Ipak, prvenstveno zbog niskog udjela ulja u sjemenu, prevladavaju ekstrakcija organskim otapalima te, zbog potražnje potrošača za hladno prešanim uljima, mehaničko izdvajanje. Najčešći i najstariji način dobivanja jestivog ulja jest mehaničko prešanje sjemenki uljarica. Izdvajanje ulja prešanjem odvija se pomoću tlaka koji može, ovisno o izvedbi uređaja, biti posljedica dovođenja pripremljenog materijala iz šireg u užu zatvoreni prostor (pužne preše) ili je posljedica tlačenja tekućine u hidrauličkoj preši. Glavni nedostatak metode prešanjem je mala efikasnost, odnosno visok udio ulja koji zaostaje u pogači. Odvajanje ulja na pužnim prešama uglavnom ne zahtijeva nikakve posebne pripreme sjemenki, pored čišćenja i

sušenja. Takvim izdvajanjem proizvode se hladno prešana ulja, što znači da tijekom postupka izdvajanja ulja temperatura sjemena odnosno ulja nije prešla 50 °C. Ponekad je pužnu prešu potrebno hladiti kako bi se ispunio taj zahtjev. Kako bi se neko ulje moglo proizvoditi kao hladno prešano i kao takvo staviti na tržište, ono zahtjeva da bude proizvedeno iz visokokvalitetne, netretirane sirovine visokog stupnja čistoće jer se eventualno prisutne nečistoće nemaju prilike izdvojiti. Također, tijekom proizvodnje moraju se poštivati stroga pravila struke, te takvo ulje mora biti podvrgnuto analizama da se potvrdi da je zdravstveno ispravno i kvalitetno. Ukoliko se koristi hidraulična preša, sjeme mora biti prethodno samljeveno, kondicionirano te se takva pripremljena masa podvrgava prešanju.

Ekstrakcija organskim otapalima proces je izdvajanja tekućine iz sustava čvrsto-tekuće pomoću organskih otapala. Najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju je tehnički heksan s vrelištem pri temperaturi od 65 °C do 68 °C. Nakon izdvajanja ulja pomoću organskih otapala, dobivenu miscelu je potrebno profiltrirati te izdvojiti otapalo destilacijom. Tako dobiveno sirovo ulje potrebno je pročititi u postupku rafinacije. Osim toga, nedostaci ove metode izdvajanja ulja su što je postrojenje skupo i složeno, troši se puno energije, nastaje puno više otpadnih tvari nego kod izdvajanja ulja prešanjem te je ulje niže kvalitete od onog dobivenog prešanjem. Ipak, u dobivenoj sačmi zaostaje manje od 1 % ulja te je stoga ovo najefikasnija metoda izdvajanja ulja te se koristi kod uljarica s niskim sadržajem ulja i kod velikih kapaciteta.

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) slična je ekstrakciji organskim otapalima, s time da otapalo nije tekućina već plin u superkritičnom stanju. Da je neki plin u superkritičnom stanju znači da je taj plin u fazi koja nije tekućina ni plin. U tim uvjetima plin ima gustoću približno kao kapljevina, iako nije u kapljevitom stanju, topljivost topljivih tvari je vrlo velika, skoro kao u kapljevini. Viskoznost se približava viskoznosti normalnih plinova, a difuzija je dva reda veličine veća nego kod tipičnih tekućina (Bijuk, 2015). SFE se bazira na činjenici da pojedini plinovi blizu svoje superkritične točke postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva. Najčešće korištena tekućina koja se koristi za ekstrakciju ulja je CO₂, takozvano „zeleno otapalo“. Efikasnost ekstrakcije ovisi o temperaturi, tlaku i vremenu kontakta tekućine za ekstrahiranje i materijala, kao i topljivosti ulja u tekućini za ekstrakciju (Bjelica, 2019). Prednosti SFE u odnosu na tehniku ekstrakcije s organskim otapalima su brojne. Superkritični fluidi imaju sposobnost otapanja istovjetnu organskim otapalima, ali uz bolju difuziju, nižu viskoznost i manju površinsku napetost fluida, separacija ekstrakta od otapala je brza i laka jer je promjenom temperature i tlaka moguće regulirati topljivost tvari, topljivost polarnih tvari je moguće poboljšati dodatkom kootapala (metanola, etanola, vode i dr.) čime se postiže veća selektivnost tijekom separacije (Jokić, 2011). Nadalje, otapala

korištena za SFE su jeftina i sigurna za okoliš, a u industrijskim procesima ih je moguće reciklirati, termolabilne tvari se ekstrahiraju s minimalnim deformacijama. Osim toga, SFE se može primijeniti na sustave različitog kapaciteta-od analitičkih, preparativnih, poluindustrijskih do velikih industrijskih postrojenja (Jokić, 2011).

Ostale metode koje se koriste za izdvajanje ulja su destilacija parom koja se koristi najčešće za ekstrakciju eteričnih ulja i to uglavnom u farmaceutske svrhe (Bjelica, 2019).

Korištenje enzima za razgradnju sjemena koje sadrži ulje je zapravo optimirana tehnika izdvajanja ulja vodom, koja se sastoji u korištenju vruće vode za izdvajanje ulja iz sjemena i njegovog odvajanja ne temelju netopljivosti u vodi. Enzimi su ekološki prihvatljiviji i zahtijevaju manje topline što pridonosi očuvanju zdravih spojeva u ulju (Wada i sur., 2018). Samljeveni materijal se tretira koktelom enzima pri optimalnim uvjetima za aktivnost enzima te se nakon određenog vremena odvaja enzimski dio od uljnog, najčešće na centrifugalnim separatorima (Bjelica, 2019). Passos i suradnici su 2009. godine proveli eksperiment u kojem je tretiranje enzimima prethodilo ekstrakciji heksanom. Samljeveno sjeme tretirali su koktelom enzima-celulaze, proteaze, ksilanaze i pektinaze, utvrdili su optimalne uvjete te za iskorištenje ekstrakcije dobili 13,7 %, što je 106 % veće iskorištenje od onog netretiranih uzoraka. Ovaj eksperiment pokazuje da se enzimska obrada može prihvatiti kao predtretman za poboljšanje kvantitativnog izdvajanja ulja.

2.5. ULJE SJEMENKI GROŽĐA

Prema pravilniku Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (NN 11/19) ulje koštica grožđa je ulje dobiveno iz groždanih sjemenki (*Vitis vinifera* L.) gustoće 0,920 - 0,926, jodnog broja 128 - 150, te broja osapunjenja 188 - 194 mg KOH/kg ulja. Zanimljiva fizikalna karakteristika ovog ulja je neobično visoka točka dimljenja, 190 - 230 °C, što ga čini pogodnim za primjenu u kulinarstvu (Wada i sur., 2018). Istraživanjem iz 2019. godine (Bjelica, 2019) utvrđeno je da postoje značajne razlike u senzorskim karakteristikama hladno prešanog i rafiniranog ulja sjemenki grožđa bijelih i crnih sorti. Ustanovljeno je da hladno prešana ulja karakteriziraju intenzivna boja, miris i okus, dok je rafinirano ulje neutralnog mirisa i okusa i znatno svjetlije. Također, boja ulja od sjemenki bijelog grožđa bila je tamnija i izrazito zelena, slično boji djevičanskog maslinovog ulja, dok je boja ulja od sjemenki crnog grožđa bila znatno svjetlija i žućkasto-zelena. Miris ulja dobivenog od sjemenki bijelog grožđa imalo je voćnu aromu, dok je ulje od sjemenki crnog grožđa bilo intenzivnijeg mirisa s vinskom aromom (Bjelica, 2019). Većinu svih ulja (oko 98 %), pa tako i ovog, čine triacilgliceroli i masne kiseline, dok ostatak čini negliceridni dio (≤ 2 %)(Malićanin, 2014).

Autentičnost ulja sjemenki grožđa utvrđuje se s obzirom na sastav masnih kiselina i sastav i udio sterola definiranih Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/19).

2.5.1. Masne kiseline i lipidi

Sastojci ulja i masti, odnosno lipida se mogu podijeliti na osapunjivi i neosapunjivi dio. Osapunjivi dio čine oni sastojci koji u reakciji s lužinom daju sapune, odnosno soli lužine (najčešće NaOH). Prema literaturi, glavninu triacilglicerola čini trilinolein (LLL) s udjelom od 41,8 %, zatim palmitodilinolein (LLP) s udjelom od 24,3 %, oleodilinolein (LLO) s 16,3 %, dioleolinolein (LOO) do 11,7 %, palmitooleolinolein (LOP) s udjelom do 9,3 % i stearooleolinolein/triolein (LOS/OOO) s udjelom do 4,3 % (Malićanin, 2014). Od masnih kiselina više od 90 % čine polinezasićene kiseline (Bjelica, 2019). U tablici 1 nalaze se udjeli 3 najzastupljenije masne kiseline u ulju sjemenki grožđa prema nekim autorima.

Tablica 1. Najzastupljenije masne kiseline u ulju sjemenki grožđa prema nekim autorima

| MASNA KISELINA | Górnaš, P. i sur., 2018 (Latvija) | Ovcharova, T. N. i sur., 2014 (Bugarska) | Zhao, B. i sur. 2019(Kina) | Banjanin, T i sur. 2019 (BiH) |
|---------------------------|--|---|---------------------------------------|--|
| Linolna (18:2) | 72,5-83,1% | 40,7-44,6% | 64,11% | 61,3-67,84% |
| Oleinska (18:1) | 6,3-15,5% | 32,1-35,5% | 21,85% | 19,87-24,53% |
| Palmitinska (16:0) | 5,4-13,2% | 13,0-16,7% | 6,69% | 7,08-10,60% |

Svim je uzorcima s tablice 1 zajedničko da sadrže najveći udio linolne (C18:2) masne kiseline, koja je polinezasićena, a zatim slijede oleinska (C18:1) te palmitinska (16:0).

Linolna kiselina

Linolna kiselina je dvostruko nezasićena, ω - 6 masna kiselina, molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$. Uz linolensku masnu kiselinu, ona spada u esencijalne masne kiseline što znači da ju ljudsko tijelo ne može sintetizirati, već mora biti unijeta putem hrane. Dominantna je masna kiselina u suncokretovom, sojinom, bučinom te hladno prešanom ulju sjemenki konoplje i oraha.

Oleinska kiselina

Druga po zastupljenosti u ulju koštica grožđa je oleinska kiselina, također nezasićena (jednostruko), molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$. Dominantna je masna kiselina maslinovog ulja, a kada se nalazi vezana s glicerolom u ester triolein, dio je gotovo svih masti i ulja. Njezine soli i esteri nazivaju se oleati.

Palmitinska kiselina

Palmitinska kiselina je zasićena masna kiselina, najzastupljenija u prirodi, molekulske formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$. U većini ulja i masti nalazi se u udjelu od 20 do 30 %. Dominantna je masna kiselina palminog ulja. Dobiva se hidrolizom iz biljnih i životinjskih lipida, u obliku je bijele krutine, netopljive u vodi te ima široku primjenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

2.5.2. Tokoferoli

Tokoli (tokoferoli i tokotrienoli) su najčešće korišteni antioksidansi u uljima i mastima. Osim toga, stabiliziraju stanične membrane, enzime, hormone, ubikinone, vitamin A. Najvažniji tokoferoli su α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol i δ -tokoferol, a razlikuju se po svom antioksidacijskom i biološkom djelovanju. Najsnažnije biološko djelovanje ima α -tokoferol, koji je zapravo vitamin E. Biološki učinak proizlazi iz inhibicijskog učinka aktivnih spojeva vitamina E na oksidaciju lipoproteina niske gustoće koji mogu biti odgovorni za nastanak aterosklerotskog plaka, jedan od razloga za infarkt miokarda i kardiovaskularnu smrt (Stephens i sur., 1996). Biološko djelovanje pada prema β -, γ -, δ -tokoferolu. Najjače antioksidacijsko djelovanje ima δ -tokoferol te ono opada prema α -tokoferolu. Pokazalo se da u sustavima hrane ipak γ -tokoferol ima najjače antioksidacijsko djelovanje.

U usporedbi s drugim uljima, ulje koštica grožđa sadrži dosta tokoferola i tokotrienola. Ukupan sadržaj ovih spojeva znatno je veći u hladno prešanim uljima nego u rafiniranim, gdje se njihov sadržaj reducira tijekom rafinacije. Visoki nivo tokoferola, koji osigurava značajnu oksidacijsku stabilnost ulja sjemenki grožđa ovisi o klimatskim uvjetima, uvjetima uzgoja, prerade i skladištenja sirovine (Assumpção i sur., 2016).

Prema Baydar i Akkur (2001), ukupni tokoferoli su iznosili 328 - 578 mg kg^{-1} , odnosno 454 mg kg^{-1} u prosjeku. Harbeoui i sur. (2018) pak navode da udio tokoferola varira između 13,89 - 181,35 mg kg^{-1} što su značajno niži iznosi nego što to navode Baydar i Akkur.

Sastav i postotak pojedinih tokoferola i tokotrienola u sjemenkama grožđa prema nekim autorima prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sadržaj tokoferola i tokotrienola ulja sjemenki grožđa prema nekim autorima

| Sadržaj mg/kg | Fernandes i sur., 2013. | Bjelica i sur., 2019. | Crews i sur., 2006. | | |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------|---------|------------|
| | | | Francuska | Italija | Španjolska |
| α- tokoferol | 85,5-244 | 22,1-76,6 | 18-229 | 14-160 | nd-75 |
| β -tokoferol | nd* | 3,0-10,1 | nd-109 | nd-133 | nd-127 |
| γ-tokoferol | 4,5-45 | | nd-61 | nd-119 | nd-168 |
| δ-tokoferol | trag-1 | 0,5-15,3 | nd-47 | nd | nd-69 |
| α-tokotrienol | 69-319 | | nd-163 | nd-352 | nd-60 |
| β-tokotrienol | 4-23 | | nd-67 | nd-22 | nd-125 |
| γ-tokotrienol | 499-1575 | | nd-500 | nd-785 | nd-399 |
| δ-tokotrienol | 6-17,5 | | nd | nd | nd-82 |
| Ukupni (mg/kg) | 749-2192 | 333,81- 575,23 | 127-706 | 63-1208 | 240-542 |

*nd-„not detected“

Iako se rezultati značajno razlikuju, svima im je zajedničko da od 4 tokoferola, α-tokoferol zauzima najveći udio. Najzastupljeniji od tokotrienola jest prema svim uzorcima γ-tokotrienol, a nakon njega α-tokotrienol. U nedavnim istraživanjima pokazalo se da γ-tokotrienol uz 8-plastokromanol ima jače antioksidacijsko djelovanje čak i od γ-tokoferola.

2.5.3. Fenoli

Posljednjih nekoliko godina, sjemenke su sve više i više u središtu pažnje jer sadrže značajan udio fenolnih spojeva. Ova skupina spojeva je poznata po svojim antioksidacijskim svojstvima, kao hvatači radikala koji imaju pozitivan učinak na bolesti uzrokovane oksidacijskim stresom (Matthäus, 2008). Pored toga što doprinose boji i senzorskim karakteristikama imaju antioksidativna i druga važna svojstva, kao što su hormonska, antikancerogena, kardioprotektivna, antimikrobna i antivirusna (Berend i Grabarić, 2008).

Velike količine ovih spojeva mogu se naći u sjemenkama. Njihov sastav je veoma kompleksan te sadrže neke monomerne flavanole kao što su katehin, epikatehin i epikatehin-3-O-galat, a također razne oligomerne procijanide. Tijekom prešanja ulja, glavni dio ovih spojeva zaostaje u pogači zbog ograničene topljivosti u ulju. Određivanje sadržaja fenola

pomoću Folin-Chiocalteau reagensa pokazalo je da je pogača bogata fenolnim spojevima, dok ulje sadrži 0,01 mg g⁻¹ ovih spojeva. Za usporedbu, koncentracija fenola određena u pogači dobivenoj nakon prešanja je oko 2000 puta veća (Matthäus, 2008). Sadržaj ukupnih fenola prešanih ulja (31,97 ± 1,55 mg GAEg⁻¹) značajno je veći od udjela fenola iz ulja dobivenog ekstrakcijom otapalima (68,74 ± 0,72 mg GAEg⁻¹) i od sadržaja fenola u hladno prešanim uljima (69,32 ± 0,75 mg GAEg⁻¹). Ovo je objašnjeno time da prethodna obrada toplinom može reducirati veze između fenola i celuloze, proteina ili polisaharida, povećavajući sadržaj fenola u ulju (Zhao i sur., 2019). Sastav pojedinih fenola određivanih u sjemenu nakon destilacije pokazao je da najveći udio u fenolnim spojevima ima ursolična kiselina sa sadržajem 34,1 mg kg⁻¹ u rafiniranom ulju, odnosno 247 mg kg⁻¹ u ulju dobivenom iz sjemenki nakon destilacije vinskog tropa. Viši udio ursolične kiseline detektiran je u ulju sjemenki bijelih sorti te u uzorcima ulja iz sjemenki nakon fermentacije i destilacije, dok rafinacija ima negativan utjecaj na sadržaj ursolične kiseline u ulju iz sjemenki grožđa. Ostali fenolni spojevi u ulju sjemenki grožđa koji su detektirani u većim količinama su resveratrol, kempferol, vanilinska kiselina, iako je njihov udio znatno niži u usporedbi s ursoličnom kiselinom (Bjelica i sur., 2019).

2.5.4. Steroli

Steroli su po kemijskom sastavu visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena, te su dio negliceridne frakcije ulja. Sastoje se od fenantrenske skupine-3 prstena cikloheksana i 1 prsten ciklopentana. U stanicama se nalaze kao dio stanične membrane te su odgovorne za njen integritet, regulaciju propusnosti stanične membrane, kao i membrane stanične jezgre, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, Golgi-evog tijela i lizosoma. Uz to, iako zasad nisu poznati točni mehanizmi, dokazano je da fitosteroli imaju učinke koji izravno inhibiraju rast tumora, uključujući usporavanje staničnog ciklusa, indukciju apoptoze i inhibiciju metastazi tumora (Bradford i Awad, 2007). Gradivni su elementi spolnih hormona i hormona kore nadbubrežne žlijezde. Glavni predstavnici u biljnim uljima i mastima su β-sitosterol, kampesterol i stigmasterol.

Prema pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) ulje iz koštica grožđa smije sadržavati 2000 - 7000 mg kg⁻¹ sterola, od čega najviše β-sitosterola (64,0 - 70,0 %), zatim kampesterola (7,5 - 14,0 %) te stigmasterola (7,5 - 12,0 %). S obzirom na nizak udio kolesterola, ovo se ulje pokazalo kao dobra namirnica za osobe s kardiovaskularnim poremećajima i s poremećajima cirkulacije.

2.6. PRIMJENA ULJA IZ KOŠTICA GROŽĐA

Ulje koštica grožđa ima najveću primjenu u kulinarstvu i kozmetici. Zbog veoma visokog udjela polinezasićenih masnih kiselina, te veoma niskog udjela kolesterola, može pomoći u liječenju stanja kao što su visoki kolesterol, ateroskleroze, makularna degeneracija, loša cirkulacija i oštećenje živaca (Kranječec, 2016). U gastronomiji se najviše koristi kao salatno ulje, ali i za izradu majoneze. Također, zbog već spomenute visoke točke dimljenja, ovo je ulje idealan prijenosnik topline prilikom toplinske obrade hrane. Ovo se ulje također koristi u kozmetici zbog svoje hidrofobne prirode i antioksidacijskih spojeva i to najčešće u proizvodima za njegu kože (Wada i sur., 2018). Prisutnost antocijana piknogenola pomaže u poboljšanju noćnog vida. Nerafinirano ulje sadrži visok udio tokoferola i tokotrienola za koje se pokazalo da imaju antiadipogene i antiupalne sposobnosti. U istraživanju provedenom 2014. godine Simonetti i suradnici su potvrdili da ekstrakt koštica grožđa dobiven iz biljke *Vitis vinifera* uzgajane pod vodenim stresom ima visok sadržaj polimernih flavan-3-ola, sa stupnjem polimerizacije ≥ 4 i antifungalnim svojstvima, te se može koristiti za liječenje sluznih infekcija kao što je vaginalna kandidaza. Khanna i suradnici su 2002. godine istraživali primjenu proantocijanidina iz sjemenki grožđa (GSPE) na zarastanje rana. Pokusi na miševima su potvrdili da GSPE ima sposobnost inducirati i regulirati transkripciju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), odnosno spoja zaduženog za zarastanje rana. Provedeno je niz istraživanja u kojima su potvrđeni blagotvorni utjecaji GSPE na zdravlje. Katiyar svojim istraživanjem iz 2008. godine potvrđuje da proantocijanidini iz sjemenki grožđa imaju svojstvo sprječavanja raka kože. U pokusu su korišteni miševi bez dlake te je testirana sposobnost proantocijanidina na usporavanje razvoja nastanka tumora kože. On smatra da upravo zaštitna priroda proantocijanidina utječe na smanjenje oksidativnog stresa te da bi mogli imati primjenu u smanjenju štetnog utjecaja UV zračenja na zdravlje ljudske kože. GSPE ima akariogeno djelovanje, pozitivno djeluje na liječenje Alzheimerove bolesti te ima pozitivna svojstva na starenje kože (Nordqvist, 2016). U istraživanju iz 2011. godine promatran je učinak GSPE u liječenju posljedica oksidativnog stresa i akumulacije lipofuscina na kognitivne sposobnosti štakora. Rezultati su pokazali da se opseg akumulacije lipofuscina smanjuje pomoću GSPE, da on ima važnu ulogu kao neuroprotektor u hipokampusu i da sprečava kognitivni gubitak starenjem (Asha Devi i sur., 2011).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu korišteno je 6 uzoraka sjemenki različitih sorti crnog grožđa uzgajanih na području Hrvatske, a koje je kao očišćeno sjeme proslijeđen od strane Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su redom Portugizac-Ciban, Portugizac-Gregorić, Babić-Jadrtovac, Plavac-Vis, Plavac-Korčula/ 4 dana (proces fermentacije je trajao 4 dana) te Plavac-Korčula/8 dana (proces fermentacije je trajao 8 dana).

3.2. ANALIZA SJEMENKI

3.2.1 Određivanje udjela vode

Za određivanje udjela vode u sjemenkama grožđa korištena je standardna metoda (ISO 665:2000) sušenjem uzorka u sušioniku do konstantne mase pri atmosferskom tlaku na temperaturi 103 ± 2 °C. U prethodno osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu odvagano je $10 \pm 0,001$ g sjemenki. Posudica s uzorkom suši se do postizanja konstantne mase, odnosno sve dok razlika između dva uzastopna mjerenja ne iznosi 0,005 g ili manje. Iz razlika mase prije i nakon sušenja određuje se udio vode i hlapljivih tvari prema formuli:

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

m_0 - masa, u gramima, posudice

m_1 - masa, u gramima, posudice i uzorka prije sušenja

m_2 - masa, u gramima, posudice i uzorka poslije sušenja

Rezultat se izražava kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, ukoliko razlika između mjerenja iznosi manje od 0,2 %.

3.2.2. Određivanje udjela ulja

Udio ulja određivan je standardnom metodom (ISO 659:2009), ekstrakcijom po Soxhletu. Osušeno sjeme samljeveno je na mehaničkom mlinu (mlinu za kavu) tako da ne ostane cijelih sjemenki, da je uzorak ravnomjerno samljeven te da ne dođe do pregrijavanja sjemena. Masa od $10 \pm 0,5$ g samljevenih sjemenki odvagana je u čahuru za ekstrakciju koja je zatvorena vatom te je zatim postavljena u aparaturu za ekstrakciju po Soxhletu. U ekstraktor se ulijeva dva volumena ekstraktora tehničkog heksana koji je korišten kao otapalo za ekstrakciju ulja iz sjemenki. Ekstrakt je sakupljan u prethodno izvaganu tikvicu s 2-3 kamenčića za vrenje. Sama ekstrakcija trajala je 8 sati. Nakon 8 sati većina otapala se uklanja destilacijom na električnoj kupelji, dok se ostatak uklanja sušenjem tikvice s ekstraktom na 130 ± 2 °C do konstantne mase. Na nekim je uzorcima prilikom sušenja do konstantne mase zabilježen porast mase što se pripisuje oksidaciji ulja, odnosno vezanju kisika na nezasićene veze masnih kiselina ulja. Udio ulja izračunava se na temelju mase samljevenog uzorka te mase ekstrakta nakon ekstrakcije pomoću formule:

$$w = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

gdje je

m_1 -masa, u gramima, uzorka

m_2 -masa, u gramima, osušenog ekstrakta

Udio ulja je za svaki uzorak određivan u 2 paralele te je stoga rezultat izražen kao aritmetička sredina dvaju određivanja, ukoliko razlika između mjerenja iznosi manje od 0,2%.

3.3. ANALIZA ULJA

3.3.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina ulja dobivenog ekstrakcijom određen je plinskom kromatografijom. Prije same analize, bilo je potrebno masne kiseline prevesti u metil-estere masnih kiselina.

Priprema metil estera masnih kiselina

U dobivenom ulju provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere prema normi HR EN ISO 12966-2:2017. U staklenu epruvetu s čepom odvagano je 60 mg uzorka sirovog ulja sjemenki grožđa te je dodano 4 mL izooktana u kojem smo otopili uzorak. Zatim je u otopinu dodano 200 µL metanolne otopine kalijevog hidroksida. Smjesa je zatim snažno protresena 30 sekundi te je ostavljena na sobnoj temperaturi da dođe do odvajanja

gliceridnog sloja. Gliceridni sloj je odvojen od taloga te je u njega dodano 1 g natrijevog sulfata monohidrata kako bismo neutralizirali moguć višak kalijevog hidroksida. Nakon što se natrijeva sol istaložila, bistra otopina metilnih estera je injektirana u plinski kromatograf.

Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

Analiza metilnih estera provedena je prema normi HR EN ISO 5508:1999 na plinskom kromatografu Unicam 610 (Cambridge, Engleska), te je korišten plameno-ionizacijski detektor (FID). Korištena je kapilarna kolona TR-FAME (Thermo) (30m x 0,22 mm, debljina filma 0,25 μm) ispunjena stacionarnom fazom sa 70 % cijanopropil-polisilfenilensiloksana. Kao plin nosioc korišten je helij protoka 0,7 mL min⁻¹. Temperatura injektora bila je 250 °C, a detektora 280 °C.

3.3.2. Određivanje sastava sterola

Sastav sterola ulja iz sjemenki grožđa određen je plinskom kromatografijom, prema metodi HR EN ISO 12228:2004. Metoda se temelji na dodatku unutarnjeg standarda, α -kolestanola lipidnom ekstraktu te podvrgavanje saponifikaciji s etanolnom otopinom KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$, otopi se 3 g KOH u 5 mL destilirane vode te razrijedi etanolom do 100 mL). Prije analize bilo je potrebno iz lipidnog ekstrakta izdvojiti neosapunjivu frakciju na koloni ispunjenoj aluminijskim oksidom pomoću dietiletera, a zatim izolirati sterolnu frakciju tankoslojnom kromatografijom na bazičnom silikagelu. Iz tako dobivene sterolne frakcije se zatim pripremaju trimetilsilileteri uzoraka koji se analiziraju plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom.

Priprema neosapunjive frakcije

U okruglu tikvicu s ravnim dnom izvaže se $0,25 \pm 0,001$ g lipidnog ekstrakta te se doda 1 mL prethodno pripremljenog α -kolestanola ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$, u acetonu), 5 mL KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$) te 2-3 kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo te se preko azbestne mrežice zagrijava do vrenja. Nakon točno 15 min vrenja, tikvica se odvoji od zračnog hladila te se doda 5 mL etanola. Kad je sadržaj tikvice potpuno ohlađen, slijedi odvajanje neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu.

Priprema kolone za kromatografiju na stupcu

Kolona za kromatografiju (dugačka 25 cm, sa sinterom na dnu, unutarnjeg promjera 1,5 cm) se pričvrsti za metalni stalak. Na dno kolne se stavi malo vate te se natopi etanolom kako bi što bolje prionula za sinter. Iz vate se pomoću staklenog štapića istisne zrak. U kolonu se

kvantitativno uz 2 x 10 mL etanola preko štapića prenese 10 g prethodno odvagane aluminijevog oksida. Aluminijev oksid se dodaje uz lagano protresanje kolone kako bi se uklonile pukotine zraka u stupcu. Višak etanola se ispušta iz kolone tako da nivo etanola bude pola centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida.

Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu

Ohlađeni uzorak se prenese u prethodno pripremljenu kolonu, a eluat se skuplja u tikvicu od 100 mL okruglog dna. Nakon eluiranja na kolonu se dodaje 5 mL etanola te se nastavi proces eluiranja. Tikvica u kojoj se nalazio uzorak se ispere s 10 mL dietiletera te se prenese na kolonu. Nakon što dietileter dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, u kolonu se dodaje još 2 x 10 mL dietiletera te se prenese u kolonu, te se time dovršava proces eluiranja. Dobiveni eluat se otpari do suhog u rotavaporu pri 40 °C.

Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

Uzorak neosapunjive frakcije se otopi u 3 mL dietiletera i nanese mikropipetom (2 x 1,5 mL) na gotovu ploču sa silikagelom u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče. Na istoj se visini ispred linije s uzorkom nanese 2-3 µL referentne otopine α -kolestanola i kolesterola ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$, u acetonu) kako bi se nakon razvitka kromatograma mogli identificirati steroli. Ploča se postavlja u kadu za razvijanje u digestoru u kojoj se nalazi 100 mL otopine heksan:dietileter u volumnom odnosu 1:1, te se zatvori poklopcem.

Kromatogram se razvija na sobnoj temperaturi sve dok linija otapala ne dosegne visinu od 1 cm od ruba ploče. Ploča se osuši u digestoru, a zatim ravnomjerno poprska metanolom. Traka sterola prepoznaje se prema referentnoj mrlji. Rubovi mrlje se is crtaju olovkom, a označeni dio silikagela se ostruže metalnom špatulicom i prebaci u lijevak s filterpapirom. Doda se 0,5 mL 96 %-tne otopine etanola, a zatim ispire u 3 navrata s 5 mL dietiletera. Filtrat sterolne frakcije se skupi u tikvicu s okruglim dnom, a zatim otpari u rotavaporu pri 40 °C do volumena od 1 mL. Koncentrat se prenese u epruvetu i osuši do suha pod strujom dušika. Tikvica koja je sadržavala sterolnu frakciju se ispere s 0,5 mL dietiletera, a sadržaj prebaci u epruvetu i ponovo suši pod strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.

Priprema timetilsililetera

U epruvetu sa sterolnom frakcijom doda se 50 µL reagensa za siliranje po svakom miligramu frakcije. Reagens za siliranje zapravo je mješavina piridina, heksametilidisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 5:2:1. Epruveta se začepi i protrese na Vortexu do potpunog

otapanja sterola i stavi se u sušionik na temperaturu od 105 °C na 15 minuta. Nakon sušenja, epruveta se ohladi u eksikatoru i centrifugira 10 min na 3000 o min⁻¹. Bistri supernatant se potom odvoji od taloga te prenese u vijalice od 2 mL s insertom od 100μL.

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Pripremljeni uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System s plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Korištena je kapilarna kolona DB-17 MS (Agilent) (30 m X 0,32 mm, debljine filma 0,25 μm) ispunjena stacionarnom fazom s 50 % fenil-metilpolioksana. Kao plin nosioc korišten je helij protoka 1,5 mL min⁻¹. Temperatura injektora bila je 290 °C, a detektora 280 °C.

Identifikacija i kvantifikacija pikova

Pojedinačni pikovi sterola raspoznaju se na osnovu poznatih retencijskih vremena te usporedbom s retencijskim vremenima trimetilsililetera standardnih mješavina sterola analiziranih pod jednakim uvjetima.

Udio ukupnih sterola izražava se u mg kg⁻¹ i izračunava po formuli (1):

$$Ukupni\ steroli = \frac{\sum A_s \times 1000}{A_G \times m} \quad (1)$$

A_s- površina svakog pojedinačnog pika sterola

A_G-površina pika ispod pika α-kolestanola

m -masa uzroka ulja

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat prema formuli (2):

$$\% \text{ od ukupnih sterola} \equiv \frac{A \times 100\%}{\sum A_i} \quad (2)$$

A-površina ispod pika određenog sterola (mg kg⁻¹)

A_i- površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost najmanje dva ponavljanja. Provedena je analiza varijance kako bi se odredio utjecaj sorti grožđa na sastav masnih kiselina te sastav i udjel

sterola u sirovom ulju iz sjemenki grožđa. Prisutnost statistički značajnih razlika u grupi uzoraka određeno je ANOVA testom u operativnom sustavu Office Excel.

4.REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem željeli smo utvrditi postoji li razlika u kemijskom sastavu ulja dobivenog iz koštica grožđa različitih sorti. Svi rezultati izraženi su kao srednje vrijednosti dvaju mjerenja. Prisutnost statistički značajnih razlika u grupi uzoraka određeno je ANOVA testom, a P vrijednost iznosila je $\leq 0,05$.

Za učinkovitu ekstrakciju je potreban srednji udio vlage. Nizak udio obično rezultira niskom učinkovitošću uzrokovanom niskom topljivošću fosfatida, dok visok udio vlage može rezultirati bubrenjem proteina s naknadnim smanjenjem poroznosti listića i difuzijom otapala (Miles, 2020). Ukoliko je pak udio vode prevelik, bit će otežana difuzija otapala. Na uspješnost ekstrakcije utječe i kemijski sastav, odnosno viskoznost i topljivost lipida sjemenki, zatim udio razorenih stanica, o veličini stanica i debljini stanične stijenke.

Udio vode i ulja u ispitivanim košticama prikazan je u tablici 3 i te je udio vode iznosio 9,6-11,9 %. Ovi rezultati nešto su viši od onih detektiranih u kineskim i francuskim sortama, a slažu se s onima brazilskih sorti čija srednja vrijednost iznosi 11,15 % (Zhao i sur., 2019). Najveći udio vode u košticama zabilježen je kod uzorka 3-Babića, a najniži kod uzorka 2-Portugizca.

Tablica 3. Udio vode, ulja i ulja na suhu tvar sjemenki grožđa (%)

| Uzorak | Voda (%) | Suha tvar (%) | Ulje (%) | Ulje na suhu tvar (%) |
|---------------------------|----------|---------------|----------|-----------------------|
| 1 (Portugizac-Ciban) | 9,8 | 90,2 | 11,3 | 12,5 |
| 2 (Portugizac-Gregorić) | 9,6 | 90,4 | 11,6 | 12,8 |
| 3 (Babić-Jadrtovac) | 11,9 | 80,1 | 9,7 | 11,0 |
| 4 (Plavac-Vis) | 10,2 | 89,8 | 7,5 | 8,3 |
| 5 (Plavac-Korčula/4 dana) | 10,4 | 89,6 | 8,0 | 8,9 |
| 6 (Plavac-Korčula/8 dana) | 11,1 | 88,9 | 8,1 | 9,1 |

Udio ulja u sjemenu jedan je od osnovnih parametara kvalitete sjemena uljarica, ali i igra značajnu ulogu u određivanju tržišne cijene. U tablici 3 prikazani su dobiveni rezultati u rasponu vrijednosti 7,5 - 11,6 % ulja u sjemenu, odnosno 8,3 - 12,8 % ulja na suhu tvar. Udio ulja manji je od udjela kineskih kultivara te uzoraka iz Brazila i Francuske (Zhao i sur., 2019). Dobiveni rezultati djelomično se preklapaju s rezultatima iz literature (3,95 - 12,06 %) dobivenih iz sjemenki portugalskih kultivara (Fernandes i sur., 2013).

Uz udio ulja i vode analiziran je i sastav masnih kiselina sirovog ulja. Plinskom kromatografijom analiziran je sastav metilnih estera masnih kiselina, jer one kao takve zbog svoje polarnosti, malog tlaka para i tendencije stvaranja vodikovih veza nisu pogodne za izravno određivanje plinskom kromatografijom (Ivanov, 2016). Rezultati su na osnovu snimljenih kromatograma prikazani u tablici 4.

Ukupno je u sirovom ulju detektirano 10 slobodnih masnih kiselina i to linolna, oleinska, palmitinska, stearinska, miristinska, palmitooleinska, α - i γ -linolenska, heptadecdenska, eikosaenska.

Iz dobivenih vrijednosti je vidljivo kako ulje koštica grožđa sadrži najveći udio, ω -6, esencijalne, linolne kiseline (C18:2), u udjelu od 61,5 % do 67,8 %. Najveći udio linolne kiseline zabilježen je kod uzorka 1 i 2, oboje sorte Portugizac. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Zhao i suradnika iz 2016. godine, a nešto su niži od ostalih podataka u literaturi (Górnaś i sur., 2018; Crews i sur., 2006; Bjelica i sur., 2019). Najniži udio linolne kiseline pokazao je uzorak 4.

Oleinska kiselina (C18:1) prisutna je u rasponu od 17,1 % u uzorku 2, do 21,1 % u uzorku 4. Detektirani raspon vrijednosti nešto je većih vrijednosti od raspona datog u literaturi koji iznosi 6,2 - 15,5 % (Górnaś i sur., 2018), a nešto niži od srednje vrijednosti (21,85 %) koje su dobili Zhao i sur. (2019). Detektirani sadržaj oleinske kiseline gotovo u potpunosti se slaže sa sadržajem oleinske kiseline detektirane u uljima sjemenki grožđa Italije (17,0 - 20,1 %) te Španjolske (16,2 - 20,0 %), dok je u ulju iz Francuske detektiran nešto niži sadržaj (14,0 - 17,6 %) (Crews i sur., 2006).

U analiziranom ulju prisutna je i palmitinska kiselina, i to u rasponu od 8,9 % do 11,9 % što upada u raspon vrijednosti kojeg su detektirali Górnaś i suradnici (2018): 5,4 - 13,2 %. Najviši udio detektiran je u uzorku broj 4 (Plavac s Visa), a najniži u uzorku broj 1 (Portugizac). Veoma slične vrijednosti zabilježene su kod uzoraka 5 i 6, što je i za očekivati jer su oba uzorka dobivena iz grožđa uzgajanog u istoj vinskoj regiji te su iste sorte. Srednja vrijednost koju su detektirali Zhao i sur. (2009) u iznosu od 6,69 % nešto je niža od vrijednosti dobivene u ovom radu.

U nešto nižem udjelu od palmitinske detektirana je i stearinska kiselina (C18:0), u rasponu 3,4 – 4,3 %. Ovaj raspon odgovara srednjoj vrijednosti od 3,80 % koju su dobili Zhao i sur. (2019), dok je dobiveni raspon nešto uži nego što su to dobili Górnaši suradnici (2018).

U svim analiziranim uzorcima, detektiran je veoma nizak udio esencijalne, ω -3, α -linolenske kiseline, točnije raspon od 0,1 do 0,7 %. Ukoliko uzmemo da je prosječni udio α -linolenske kiseline 0,4 %, tada omjer ω -6 i ω -3 masnih kiselina u sirovom ulju sjemenki grožđa iznosi 154-170:1 što s nutritivnog aspekta nikako nije povoljno. Preporučeni omjer masnih kiselina u mastima koje unosimo jest 2-4:1 u korist ω -6 masnih kiselina. Omjer koji unosimo današnjim načinom prehrane iznosi 20-30:1. Prema Matthäusu (2002), unos linolne kiseline uzrokuje upalne procese, dok ih unos α -linolenske kiseline reducira, što je veoma važno kod liječenja upalnih bolesti. Također, neka istraživanja s pokusnim životinjama pokazala su da pretjeran unos linolne kiseline može potaknuti karcinogenezu. Uz ove navedene, detektirane su još i miristinska (C14:0), palmitoleinska (C16:1), heptadecenska (C17:0), γ -linolenska (C18:3n6) te eikosaenska (C20:0) masna kiselina, sve u udjelu manjem od 1 %. γ -linolenska (C18:3n6) je u uzorcima 1, 2 i 4 nađena u udjelu manjem od 0,05 %, isto kao i heptadecenska u uzorcima 1, 2, 3 i 5. Dobiveni rezultati poklapaju se s rezultatima iz literature (Górnaš i sur., 2018; Bjelica i sur., 2019; Crews i sur., 2006). Sastav masnih kiselina ispitivanog sirovog ulja te njihove vrijednosti odgovaraju vrijednostima propisanim Pravilnikom (NN 11/19).

Analiza varijance pokazala je da sorta grožđa ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na sastav masnih kiselina, i to na udjel miristinske, palmitinske, palmitoleinske, stearinske, oleinske i linolne masne kiseline (Tablica 4).

Tablica 4. Sastav masnih kiselina sirovog ulja sjemenki grožđa

| masna kiselina (% od ukupnih) | uzorak | | | | | |
|--|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|--|--|
| | 1 (Portugizac -Ciban) | 2 (Portugizac -Gregorić) | 3 (Babić - Jadrtovac) | 4 (Plavac -Vis) | 5 (Plavac -Korčula/4 dana) | 6 (Plavac -Korčula/8 dana) |
| C14:0* | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| C16:0* | 8,9 | 9,0 | 9,4 | 11,9 | 10,1 | 10,6 |
| 16:01* | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,6 | 0,4 | 0,4 |
| C17:0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 |
| C18:0* | 4,3 | 4,2 | 3,8 | 3,4 | 3,6 | 3,7 |

| | | | | | | |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| C18:1* | 18,2 | 17,1 | 19,6 | 21,1 | 17,9 | 18,3 |
| C18:2* | 67,2 | 67,8 | 65,3 | 61,5 | 66,6 | 65,3 |
| C18:3n6 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,3 | 0,1 |
| C18:3n3 | 0,5 | 0,4 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,5 |
| C20:0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| N.I. | 0,4 | 1,0 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,8 |

*statistički značajan utjecaj sorte na masne kiseline ($p \leq 0,05$)

Određivan je i sastav sterola te ukupni steroli u sirovom ulju iz sjemenki grožđa. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Sastav i udio sterolau sirovom ulju sjemenki grožđa

| Sterol (% od ukupnih) | uzorak | | | | | |
|--|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|--|--|
| | 1 (Portugizac -Ciban) | 2 (Portugizac -Gregorić) | 3 (Babić - Jadrtovac) | 4 (Plavac -Vis) | 5 (Plavac -Korčula/4 dana) | 6 (Plavac -Korčula/8 dana) |
| Kampesterol* | 9,31 | 8,91 | 9,15 | 8,40 | 8,39 | 8,10 |
| Kampestanol* | 0,67 | 0,36 | 1,50 | 0,71 | 1,09 | 0,89 |
| Stigmasterol* | 7,65 | 8,05 | 7,57 | 6,98 | 6,64 | 6,58 |
| β -sitosterol* | 74,36 | 74,79 | 77,63 | 80,09 | 80,68 | 81,14 |
| Sitostanol* | 2,58 | 3,25 | 3,36 | 2,89 | 2,52 | 2,59 |
| Δ^5 - avenasterol* | 2,03 | 2,66 | 0,15 | 0,13 | 0,12 | 0,09 |
| Cikloartenol* | 1,19 | 1,85 | 0,38 | 0,32 | 0,24 | 0,29 |
| Δ^7 - stigmastenol | 2,23 | 0,15 | 0,27 | 0,50 | 0,33 | 0,33 |
| Ukupni steroli*(mg kg ⁻¹) | 4929,18 | 4662,40 | 4977,20 | 6189,07 | 5563,83 | 5793,52 |

*statistički značajan utjecaj sorte na sterole($p \leq 0,05$)

U sirovom ulju detektirano je ukupno 8 sterola, a u najvećem udjelu u svim uzorcima detektiran je β -sitosteroli to u rasponu 74,36 - 81,14 %. Zatim slijede kampesterol s udjelom 8,10 - 9,31 %, stigmasterol s udjelom 6,58 - 8,05 % te sitostanol, kampestanol, Δ^5 -

avenasterol, cikloartenol, $\Delta 7$ -stigmastenol. Górnaš i suradnici (2018) su iz ulja dobivenog ekstrakcijom heksanom detektirali 7 sterola, od kojih su β -sitosterol, kampesterol i $\Delta 5$ -stigmasterol (koji u uzorcima ispitivanim u ovom radu nije detektiran) s udjelom od 80 %, 8 % i 8 % činili glavninu detektiranih sterola, dok su Pardo i sur. (2009) uz β -sitosterol (62,86 - 67,37 %) i kampesterol (6,73 - 11,47 %) u svojim uzorcima ulja detektirali stigmasterol s udjelom od 10,53 % do 14,81 %.

Sadržaj ukupnih sterola bio je u rasponu 4662,40 - 6189,07 mg kg⁻¹. Ukupni steroli tuniških sorti pokazuju nešto niže vrijednosti ukupnih sterola od detektiranih u ispitivanim uzorcima: 1609,87 - 3814,55 mg kg⁻¹ (Harbeoui i sur., 2018). Najviši udio ukupnih sterola detektiran je u uzorku 4, a najniži u uzorku 2. Udio ukupnih sterola nalazi se u rasponu definiranom Pravilnikom (NN 11/19).

Među analiziranim uzorcima, u uzorku 6 detektiran je najviši udio β -sitosterola, 81,14 % od ukupnih, a najniži udio je detektiran u uzorku 1. Dobiveni rezultati nešto su viši od onih za β -sitosterol koji su detektirali Crews i suradnici (2006) u sortama iz Italije (66,9 - 74,7 %), Francuske (68,9 - 76,0 %) i Španjolske (69,7 - 77,4 %), a također su više i od vrijedosti propisanih Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/19).

Što se tiče kampesterola, najviši udio je detektiran u uzorku 1 - 9,31 %, a najniži u uzorku 6 - 8,10 %, što se slaže s rezultatima Górnaša i suradnika (2018) i ulazi u raspon vrijednosti definiran Pravilnikom (NN 11/19). Najniži udio stigmasterola detektiran je u uzorku 6 - 6,58 %, a najviši u uzorku 2 - 8,05 % te vrijednosti ulaze u raspon detektiran u talijanskim sortama gdje je njihov udio iznosio 5,4 - 11,0 % (Crews i sur., 2006). Kod uzoraka 4, 5 i 6 - svi sortimenta Plavac - detektiran je nešto niži udio stigmasterola od onog definiranog Pravilnikom (NN 11/19), dok uzorci 1, 2 i 3 ulaze u definirani raspon.

Kod svih uzoraka dokazana je statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$) u udjelu pojedinih sterola te u ukupnom sadržaju sterola, osim kod $\Delta 7$ -stigmastenola, što znači da je udio prisutnog $\Delta 7$ -stigmastenola u svim uzorcima približno jednak. Kod uzoraka 3, 4, 5 i 6 $\Delta 7$ -stigmastenol se nalazi u vrijednostima nižima od onih propisanih Pravilnikom (NN 11/19) isto kao i količine detektiranog $\Delta 5$ -avenasterola, dok su vrijednosti ovih sterola u uzorcima 1 i 2 prisutne u propisanim količinama. U sirovom ulju svih uzoraka nisu detektirani brasikasterol ni kolesterol, ali ni $\Delta 7$ -avenasterol koji se prema Pravilniku (NN 11/19) nalazi u ulju, a detektirani su kampestanol u rasponu od 0,36 % kod uzorka 2 do 1,09 % kod uzorka 5, zatim sitostanol u rasponu koncentracija od 2,52 % kod uzorka 5 do 3,36 % kod uzorka 3 i cikloartenol u rasponu od 0,24 % kod uzorka 4 do 1,85 % kod uzorka 2, a koji se prema Pravilniku (NN 11/19) ne nalaze u ulju.

Iskorištavanje poljoprivredno-industrijskih nusproizvoda kao sirovine za nove proizvode odličan je i održiv način za dobivanje još veće vrijednosti usjeva/nasada, a ujedno predstavlja i rješenje problema odlaganja otpada. Vinogradarska grana poljoprivrede godišnje proizvodi na tone sjemenki kao nusproizvoda koje ne moraju predstavljati još jedan ekonomski izdatak, već naprotiv, prerađene u ulje predstavljaju izvor zarade.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata dobivenih u ovom istraživanju, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Određivanjem sadržaja vlage i ulja na suhu tvar u uzorcima dokazana je statistički značajna razlika između sorti. Na temelju udjela ulja u sjemenu može se zaključiti da bi sjeme kao sirovina za dobivanje ulja postiglo dobru cijenu na tržištu.
2. Određivanjem sastava masnih kiselina ispitivanog ulja, detektirano je 10 masnih kiselina te je utvrđeno da sastav odgovara sastavu propisanom Pravilnikom (NN 11/19). Sastav masnih kiselina je statistički značajno različit za sve ispitane uzorke.
3. Analizom sastava i udjela ukupnih sterola dobivenog sirovog ulja izdvojeno je 8 sterola. Kod svih uzoraka dokazana je statistički značajna razlika u udjelu pojedinih sterola te u ukupnom sadržaju sterola, osim kod Δ^7 -stigmastenola koji se nalazi u približno jednakim količinama u svim uzorcima, dakle neovisno o sorti.

6. LITERATURA

Anonymous (2020) Vinopedia-riznica znanja o lozi i vinu <<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=komina>> Pristupljeno 7. svibnja 2020.

Asha Devi, S., Sagar Chandrasekar, B. K., Manjula, K. R., Ishii, N. (2011) Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Experimental Gerontology***46**: 958–964.

Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology***41**: 475-487.

Assumpção, C. F., Nunes, I. L., Mendonça, T. A., Bortolin, R. C., Jablonski, A., Flôres, S. H., de Oliveira Rios, A. (2015) Bioactive Compounds and Stability of Organic and Conventional *Vitis labrusca* Grape Seed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society***93**: 115–124.

Banjanin T., Özcan M.M., Al Juhaimi F., Ranković-Vasić, Z., Uslu, N., Mohamed, I.A., Ghafoor, K., Babiker, E.E., Osman, M.A., Gassem, M. A., Salih, H. A. A. (2019) Effect of varieties on bioactive compounds, fatty acids, and mineral contents in different grape seed and oils from Bosnia and Herzegovina. *Journal of Food Processing and Preservation***43**, 1-8, <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13981>> Pristupljeno 7. svibnja 2020.

Baydar, N.G., Akkur, M. (2001) Oil content and oil quality properties of some grape seeds, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry***25**: 163-168.

Berend, S., Z. Grabarić (2008) Determination of Total Polyphenol Content in Food with the Flow-Injection Method. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology***59**: 205–212.

Bijuk, M. (2015) Optimizacija procesa ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa superkričnim CO₂ primjenom metode odzivnih površina (diplomski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

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

Bradford, P. G., Awad, A. B. (2007) Phytosterols as anticancer compounds. *Molecular Nutrition & Food Research***51**: 161–170.

Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W. (2006) Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***54**: 6261–6265.

Demarquilly, C., Petit, M. (1976) Utilisation of straws and other cellulosic plant by-products in intensive animal production systems: comparison with traditional systems. U: New feed resources. Proceedings of a FAO technical consultation, Rome, 22.–24. November 1976.

Dimić, E. (2005) Hladno ceđena ulja, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Domokos, J., Kiss, B. (2002) Néhány szempont a szőlőfeldolgozás melléktermékeinek hasznosításához, *Olaj Szappan Kozmetika***51**: 113-115.

Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., Ramalhosa, E. (2013) Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International***50**: 161–166.

García-Lomillo, J., i González-SanJosé, M. L. (2016). Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety***16**(1): 3–22 <<https://sci-hub.st/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>> Pristupljeno 17. svibnja 2020.

Górnaś, P., Rudzińska, M., Grygier, A., & Lācis, G. (2018) Diversity of oil yield, fatty acids, tocopherols, tocotrienols, and sterols in the seeds of nineteen interspecific grapes crosses. *Journal of the Science of Food and Agriculture***99**: 2078-2087.

Harbeoui, H., Bettaieb Rebey, I., Ouerghemmi, I., Aidi Wannas, W., Zemni, H., Zoghalmi, N., Akhtar Khan, N., Ksouri, R., Tounsi, M. S. (2018) Biochemical characterization and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oils from nine Tunisian varieties. *Journal of Food Biochemistry***42**: 1 – 12, <<https://doi.org/10.1111/jfbc.12595>> Pristupljeno 7. svibnja 2020.

Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2020) Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje < <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=46326> > Pristupljeno 12. travnja 2020.

HRN EN ISO 12966-2:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (osnovna referentna metoda)

HRN EN ISO 5508:1999 Životinjske i biljne masti i ulja - Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

ISO 659:2009 Uljarice - određivanje udjela ulja (Referentna metoda)

ISO 665:2000 Uljarice - određivanje količine vode i hlapljivih tvari

Ivanov, M. (2016) Osnovni parametri kvalitete i sastav masnih kiselina uljane repice (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Katiyar, S. K. (2008) Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition & Food Research***52**: 71-76.

Khanna, S., Venojarvi, M., Roy, S., Sharma, N., Trikha, P., Bagchi, D., Sen, C. K. (2002) Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology and Medicine***33**: 1089–1096.

Kranjčec, I. (2016) Proizvodnja ulja iz sjemenki vinove loze na OPG Ivan Čmrečnjak (završni rad), Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.

Letaief, H., (2016) Wine making process. U: Valorization of wine making by-products, (Bordiga, M. ured.) CRC Press, Boca Raton, str. 27-72.

Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., Yu, L. (2011) Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry***128**: 391–399.

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

Matthäus, B. (2002) Antioxidant activity of extracts obtained from residues of Different Oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***50**: 3444-3452.

Matthäus, B. (2008) Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology***110**: 645–650.

Miles, D. R. (2020) Recovery of Oils and Fats from Oilseeds and Fatty Materials. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, (Shahidi, F. ured.), John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, str. 1–51.

National Research Council (1983) Underutilized Resources as Animal Feedstuffs, The National Academies Press, Washington, DC, str. 13-15.

Nordqvist, J. (2016) Grape seed extract, *Medical news today* <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/263332#benefits>> Pristupljeno 15. travnja 2020.

Ovcharova, T., Zlatanov, M., Ivanov, A. (2014) Sterol and fatty acid composition of grape seed oils. *Izvestiya po Khimiya Bulgarska Akademiya na Naukite***46**: 106-110.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) Narodne novine **11** (NN 11/19).

Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., Alonso, G. L. (2009) Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology***111**: 188–193.

Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., Coimbra, M. A. (2009) Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry***115**: 48–53.

Simonetti, G., Santamaria, A. R., D'Auria, F. D., Mulinacci, N., Innocenti, M., Cecchini, F., Pasqua, G. (2014) Evaluation of anti-candida activity of *Vitis vinifera* L. seed extracts obtained from wine and table cultivars. *BioMed Research International***2014**: 1-111 < <https://doi.org/10.1155/2014/127021> > Pristupljeno 15. travnja 2020.

Statistički ljetopis (2018) Državni Zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb.

Stephens, N.G., Parsons, A., Schofield, P.M., Kelly, F., Cheeseman, K., Mitchinson, M.J. (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS), *The Lancet***347**(9004): 781–786.

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. *European Journal of Lipid Science and Technology***120**: 1-10 < <https://sci-hub.st/10.1002/ejlt.201800166> > Pristupljeno 20. svibnja 2020.

Ye ZhiJing, Harrison, R., Cheng, V. J., Bekhit, A. E. A., (2016) Wine making by-products. In: Bordiga, M. (Ed.), Valorization of wine making by-products. CRC Press, Boca Raton, str. 73-116.

Zhao, B., Gong, H., Li, H., Zhang, Y., Lan, T., & Chen, Z. (2019) Characterization of Chinese Grape Seed Oil by Physicochemical Properties, Fatty Acid Composition, Triacylglycerol Profiles, and Sterols and Squalene Composition. *International Journal of Food Engineering***5**: 1-15.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ines Radić

ime i prezime studenta