

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Lucija Sobotinčić

**UTJECAJ PULSIRAJUĆEG
ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I
HLADNOG PREŠANJA NA
ISKORIŠTENJE I KEMIJSKI
SASTAV ULJA SJEMENKI
GROŽĐA**

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

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



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: Nutricionizam

UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE I KEMIJSKI SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Lucija Sobotinčić, univ. bacc. nutr., 0058212348

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tretiranja sjemenki komine grožđa pulsirajućim električnim poljem (PEF) prije hladnog prešanja na iskorištenje, kemijski sastav te antioksidacijski kapacitet ulja sjemenki grožđa sorte Graševina. Primijenjeni su različiti parametri PEF predtretmana jakosti električnog polja 12,5 i 15,6 kV/cm, tijekom 15 i 30 min (uz duljinu trajanja pulsa od 1 μ s i frekvenciju od 100 Hz). Provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenolnih spojeva. Sastav pojedinačnih polifenolnih spojeva određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD/MS). Sastav masnih kiselina određen je primjenom plinske kromatografije (GC-FID). Antioksidacijski kapacitet ulja određen je u hidrofilnoj i lipofilnoj frakciji ulja ORAC metodom (H-ORAC i L-ORAC). Primjena PEF predtretmana utjecala je na povećanje iskorištenja ekstrakcije, povećanje koncentracije ukupnih i pojedinačnih polifenola, kao i povećanje H-ORAC i L-ORAC vrijednosti, posebice kod primjene električnog polja više jakosti te pri duljem vremenu tretiranja. Suprotno, navedeni PEF predtretmani nisu pokazali značajniji utjecaj na sastav masnih kiselina.

Ključne riječi: Graševina, sjemenke komine grožđa, ulje sjemenki grožđa, hladno prešanje, pulsirajuće električno polje (PEF)

Rad sadrži: 45 stranica, 9 slika, 8 tablica, 60 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Marina Tomašević i 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. Tomislava Vukušić Pavičić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Nutrition

THE EFFECT OF PULSED ELECTRIC FIELDS (PEF) AND COLD PRESSING ON EXTRACTION YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF GRAPE SEED OIL

Lucija Sobotinčić, univ. bacc. nutr., 0058212348

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of pulsed electric field (PEF) treatments prior to cold pressing on extraction yield, chemical composition and antioxidant capacity of Graševina grape seed oil. Different PEF pretreatments were applied: electric fields strength of 12.5 and 15.6 kV/cm, during 15 and 30 min (with pulse duration of 1 μ s and pulse frequency of 100 Hz). Concentrations of total and individual polyphenols were determined by spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD/MS), respectively. Fatty acid composition was determined by gas chromatography (GC-FID). Antioxidant capacity was determined in hydrophilic and lipophilic fraction of oil by ORAC method (H-ORAC and L-ORAC). PEF pretreatments increased extraction yield, concentrations of total and individual phenolic compounds, as well as H-ORAC and L-ORAC values; particularly when higher electric fields strength and longer pretreatment time were applied. Contrary, composition of fatty acids was not affected by these pretreatments.

Keywords: Graševina, grape seed pomace, grape seed oil, cold pressing, pulsed electric fields (PEF)

Thesis contains: 45 pages, 9 figures, 8 tables, 60 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Natka Ćurko, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: *Marina Tomašević, PhD, Assistant professor and Katarina Lukić, PhD*

Reviewers:

1. Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor (president)
2. Natka Ćurko, PhD, Associate professor (mentor)
3. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra Balbino, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEMIJSKI SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA.....	2
2.2. METODE EKSTRAKCIJA ULJA SJEMENKI GROŽĐA	5
2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	5
2.2.2. Suvremene metode ekstrakcije.....	7
2.3. PRIMJENA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	10
2.3.1. Mehanizam djelovanja i primjena pulsirajućeg električnog polja (PEF).....	10
2.3.2. Ekstrakcija ulja potpomognuta primjenom pulsirajućeg električnog polja.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJAL	14
3.1.1. Sjemenke komine grožđa	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja (PEF) kao predtretmana hladnom prešanju.....	17
3.2.2. Ekstrakcija ulja hladnim prešanjem	18
3.2.3. Određivanje iskorištenja ekstrakcije ulja hladnim prešanjem.....	18
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva	19
3.2.5. Određivanje sastava pojedinačnih polifenolnih spojeva	20
3.2.6. Određivanje sastava masnih kiselina.....	22
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u hidrofilnoj i lipofilnoj frakciji ulja	23
3.2.8. Obrada podataka.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. UTJECAJ PREDTRETMANA PULSIRAJUĆIM ELEKTRIČNIM POLJEM (PEF) NA ISKORIŠTENJE EKSTRAKCIJE ULJA SJEMENKI GROŽĐA HLADNIM PREŠANJEM	26
4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV UKUPNIH POLIFENOLA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA..	28
4.3. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA.....	30

4.4. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV MASNIH KISELINA ULJA SJEMENKI GROŽĐA	33
4.5. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA SJEMENKI GROŽĐA	35
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Vinska industrija kao gospodarski važan sektor na godišnjoj razini generira oko 30 milijuna tona otpada od proizvodnje vina. Prema podacima Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (OIV, 2022) proizvodnja grožđa 2021. godine iznosila je 69,5 milijuna tona, od kojih je 48,8 % iskorišteno za proizvodnju vina. Nastojanja za smanjenjem ukupne količine otpada od proizvodnje vina dodatno su podržana u činjenici da navedeni otpad predstavlja visokovrijedni nusproizvod. Naime, glavninu otpada od proizvodnje vina čini komina dobivena nakon prešanja, koja zbog visoke koncentracije biološki aktivnih spojeva posjeduje potencijal za razvoj novih, inovativnih proizvoda visoke nutritivne vrijednosti i povoljnog učinka na zdravlje. Jedan od navedenih proizvoda svakako je ulje sjemenki grožđa, čija proizvodnja ne doprinosi samo boljem upravljanju otpadom, već predstavlja i proizvod s dodanom vrijednošću dobiven iz sjemenki komine kao glavnog nusprodukta proizvodnje vina.

Ekstrakcija ulja iz sjemenki komine grožđa najčešće se provodi metodom hladnog prešanja, koja u usporedbi s ekstrakcijom organskim otapalima predstavlja „zelenu metode ekstrakcije“. Također, navedena metoda ekstrakcije rezultira uljem poželjne kvalitete i senzorskih karakteristika s visokom koncentracijom biološki aktivnih spojeva (u prvom redu antioksidansa i fitokemikalija), međutim i značajno nižim prinosima u odnosu na ekstrakciju organskim otapalima. Osim navedenih konvencionalnih metoda, danas sve širu primjenu imaju i suvremene metode ekstrakcije, među kojima i pulsirajuće električno polje (PEF). PEF kao netoplinska metoda obrade namirnice uključuje upotrebu vanjskog električnog polja u obliku impulsa, niskog do umjerenog intenziteta i kratkog trajanja (mikrosekunde), što izaziva formiranje pora u staničnim membranama tretiranog materijala te povećava staničnu propusnost. Ranija istraživanja pokazala su kako je primjenom adekvatnih parametara PEF predtretmana moguće povećati iskorištenje ekstrakcije ulja hladnim prešanjem, međutim utjecaj navedenih metoda ekstrakcije na prinos i kvalitetu ulja sjemenki grožđa je neistražen.

Cilj ovoga diplomskog rada bio je istražiti utjecaj predtretmana pulsirajućim električnim poljem (primjenom intenziteta električnog polja od 12,5 i 15,6 kV/cm te duljine tretiranja predtretmana od 15 i 30 min) na prinos, sastav (koncentraciju ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva, sastav masnih kiselina) te antioksidacijski kapacitet (lipofilni i hidrofilni ORAC) hladno prešanog ulja sjemenki grožđa Graševina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJSKI SASTAV ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Prema literaturnim podacima udio ulja u sjemenci grožđa može varirati od 7 do 20 % (Carmona-Jimenez i sur., 2022; Shinagawa i sur., 2017; Garavaglia i sur., 2016). Ulje karakterizira visok udio hidrofobnih te nizak udio hidrofilnih spojeva (Garavaglia i sur., 2016). Glavne hidrofobne, odnosno lipofilne komponente čine masne kiseline. U sastavu ovog ulja prevladavaju nezasićene masne kiseline (85-90 %) (Bellili i sur., 2018), od kojih otprilike dvije trećine čine polinezasićene masne kiseline (PUFA), dok se preostala trećina odnosi na mononezasićene kiseline (MUFA) (Nikolova i sur., 2021). Najzastupljenija masna kiselina u ulju sjemenki grožđa je linolna kiselina (58-78 %), polinezasićena masna kiselina koja u svojoj kemijskoj strukturi sadrži dvije dvostruke veze, a slijede je oleinska kiselina (12-28 %), palmitinska kiselina (5,5-11 %) (Bellili i sur., 2018; Lutterodt i sur., 2011) te stearinska kiselina (2-4 %) (Nikolova i sur., 2021; Lutterodt i sur., 2011). S druge strane, ovo ulje karakterizira niski udio α -linolenske (0,2-0,91 %) i arahidonske kiseline (0,03-0,18 %). Zastupljenost pojedinih masnih kiselina ovisi o utjecaju različitih faktora, kao što su sorta, geografsko podrijetlo, zrelost grožđa, ali i metoda ekstrakcije ulja (Bellili i sur., 2018). Po sastavu masnih kiselina ulje sjemenki grožđa je najbliži suncokretovom ulju, koje također sadrži viši udio linolne i oleinske kiseline, a vrlo male količine α -linolenske kiseline (Matthäus, 2008).

Vrlo važna lipofilna komponenta ulja sjemenki grožđa je vitamin E, odnosno tokoferoli (α -, β -, γ - i δ - tokoferol) i tokotrienoli (α -, β -, γ - i δ -tokotrienol). Među tokoferolima, najaktivnijim se smatra α -tokoferol (Carmona-Jimenez i sur., 2022), koji je ujedno i najzastupljeniji tokoferol u ovome ulju, dok najjače antioksidacijsko djelovanje pokazuje γ -tokoferol. Ulje sjemenki grožđa u svom sastavu ima i značajnu koncentraciju tokotrienola i to posebno γ - i α -tokotrienola (Garavaglia i sur., 2016). Pojedini autori navode kako je udio vitamina E u ulju između 1 i 53 mg/100 g ulja (Garavaglia i sur., 2016), drugi pak navode ukupnu količinu tokoferola i tokotrienola u ulju, koja odgovara rasponu od 63-1208 mg/kg ulja, odnosno 6,3-120,8 mg/100 g ulja (Matthäus, 2008). Udjeli vitamina E, odnosno tokoferola i tokotrienola također mogu varirati s obzirom na određene čimbenike, primjerice okolišne uvjete kultivacije (Garavaglia i sur., 2016), metodu ekstrakcije (ulja dobivena ekstrakcijom superkritičnim CO₂ pokazuju više udjele tokoferola i tokotrienola u odnosu na ulja dobivena ekstrakcijom heksanom), sortu i geografsko podrijetlo (Bellili i sur., 2018). Relativno visoka koncentracija vitamina E u ulju sjemenki grožđa navodi se kao jedna od njegovih najvećih prednosti, čije koncentracije mogu

biti i više od onih u suncokretovom ili maslinovom ulju (Garavaglia i sur., 2016) ili pak komparabilne s koncentracijama utvrđenim u repičinom ili sojinom ulju (Matthäus, 2008).

Fitosteroli čine 0,2-1,1 % ulja sjemenki grožđa (Nikolova i sur., 2021), čija koncentracija najčešće varira između 87 i 100 mg/kg (Gitea i sur., 2023). Najzastupljeniji fitosterol je β -sitosterol, koji čini od 65 do 80,6 % ukupnog udjela sterola, a slijedi ga stigmasterol s oko 10 % (Gitea i sur., 2023; Nikolova i sur., 2021), dok su kampesterol, sitostanol, klerosterol i brasikasterol prisutni u nešto nižim udjelima. Ranija istraživanja pokazala su kako koncentracija fitosterola u najvećoj mjeri ovisi o samom sastavu grožđa te primijenjenoj metodi ekstrakcije (Gitea i sur., 2023).

Glavne hidrofilne komponente u ulju sjemenki grožđa su polifenolni spojevi, a najzastupljeniji među njima su katehini, epikatehini, *trans*-resveratrol i proantocijanidin B1 (Garavaglia i sur., 2016). Naime, iako sjemenka grožđa sama po sebi sadrži visoke koncentracije polifenolnih spojeva (Bail i sur., 2008), prilikom prešanja, odnosno ekstrakcije ulja, samo maleni udio fenolnih spojeva prelazi u ulje zbog njihove visoke hidrofilnosti. Uslijed navedenog, koncentracije polifenolnih spojeva u ulju sjemenki grožđa su relativno niske (posebice u odnosu na maslinovo, ali i suncokretovo ulje) te iznose oko 0,01 mg/g ulja (Bellili i sur., 2018; Matthäus, 2008). Nadalje, sastav i koncentracija polifenolnih spojeva u ulju sjemenki grožđa također ovise o brojnim faktorima kao što su sorta, geografsko podrijetlo, stupanj zrelosti grožđa, tretman grožđa nakon berbe, metoda ekstrakcije ulja, ali i sami uvjeti tijekom skladištenja (Bellili i sur., 2018).

Nadalje, jedna od važnih stavki koja utječe na preferenciju konzumenta kod ovog ulja je njegova aroma, odnosno interakcija okusa i mirisa, pri kojoj ključnu ulogu imaju hlapljivi spojevi (Sevindik i sur., 2022). Njih čine alkoholi poput 2,3-butandiola, 3-metil butanola, 2-metil butanola ili heksanola, aldehidi poput pentanala i heksanala, ketoni, esteri, kao i različite organske kiseline (Bellili i sur., 2018). Tako primjerice heksanol i izoamilni alkoholi ulju daju začinske, biljne i voćne note, dok su aldehidi (pentanal, heksanal i furfural) i esteri (etil heksanoat i etil oktanoat) nosioci voćnih i cvjetnih aroma (Shinagawa i sur., 2017). Koncentracija pojedinih hlapljivih spojeva se može razlikovati s obzirom na sortu, pa tako ulja sjemenki grožđa crnih sorti sadrže nešto više koncentracije 2-metil- i 3-metil butanola, dok ulja dobivena iz bijelog grožđa, primjerice sorti Welschriesling ili Chardonnay sadrže više koncentracije heksil acetata, izoamil acetata, 2-heptanona, benzaldehida, ali i etil acetata te octene kiseline (Bail i sur., 2008). Naime, kao posljedica mikrobne degradacije, oksidacijskih procesa te degradacije triglicerida može doći do formiranja nepoželjnih spojeva arome kao što

su etil acetat i octena kiselina, pri čemu je posebnu pozornost potrebno posvetiti pri proizvodnji ulja sjemenki bijelog grožđa (Shinagawa i sur., 2017; Matthäus, 2008).

Kemijski sastav ovog ulja uvjetuje i određene nutritivne prednosti. Naime, visok udio nezasićenih masnih kiselina u prehrani može utjecati na smanjenje rizika oboljenja od kardiovaskularnih bolesti (Sabir i sur., 2012). S druge strane, ulja s visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina podložnija su oksidaciji zbog većeg broja dvostrukih veza pa su time i nestabilnija. Također, smatra se kako su masne kiseline ulja sjemenki grožđa odgovorne i za njegova antibakterijska i antifungalna svojstva. Iako sam mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, znanstvenici pretpostavljaju kako se hidrofobni ugljikovodični lanci masnih kiselina mogu inkorporirati u fosfolipidni dvosloj membrana bakterija i tako povećati njezinu propusnost. Antibakterijsko djelovanje je uočeno posebno na Gram-pozitivnim bakterijama, vjerojatno kao posljedica slabije zaštite membrane u odnosu na Gram-negativne bakterije, pri čemu je utvrđena pozitivna korelacija između antibakterijskog učinka te koncentracija linolne kiseline i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) (Dabetić i sur., 2020). Također, zdravstvene prednosti ovog ulja vezuju se i za sastav vitamina E uslijed njegovog antioksidacijskog, neuroprotektivnog i antitumorskog djelovanja (Carmona-Jimenez i sur., 2022; Garavaglia i sur., 2016), kao i sastava fitosterola. Važnost fitosterola za zdravlje uvjetovana je njihovom kemijskom strukturom, koja je vrlo slična strukturi kolesterola, uslijed čega se s njim natječu za apsorpciju u crijevima, pritom smanjujući njegovu apsorpciju (Shinagawa i sur., 2017). Također, fitosteroli mogu spriječiti oslobađanje molekula koji sudjeluju u oksidaciji LDL-a (Garavaglia i sur., 2016).

2.2. METODE EKSTRAKCIJA ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Ulje sjemenki grožđa se najčešće ekstrahira uz pomoć organskih otapala ili hladnim prešanjem (Malićanin i sur., 2014), koje predstavljaju konvencionalne metode ekstrakcije. Metodom hladnog prešanja najčešće se proizvode ulja namijenjena ljudskoj konzumaciji, sa svrhom očuvanja visoke nutritivne vrijednosti i kvalitete ulja, dok se ekstrakcija organskim otapalima provodi s ciljem ostvarenja što većeg prinosa ulja te je uslijed toga i zastupljenija u proizvodnji ulja za kozmetičke svrhe (Sevindik i sur., 2022). S druge strane, u novije vrijeme sve širu primjenu imaju i suvremene metode ekstrakcije poput ekstrakcije superkritičnim fluidom (superkritični ugljikov dioksid), ali i primjena suvremenih predtretmana poput predtretmana ultrazvukom, mikrovalovima ili pulsirajućeg električnog polja prije ekstrakcije ulja (Ćurko i sur., 2023; Bellili i sur., 2018). Sve tehnike ekstrakcije dijele određene temeljne principe i ciljeve, a to su maksimalno očuvanje kvalitete ulja uz postizanje maksimalnih prinosa (te posljedično smanjenje udjela ulja zaostalog u pogači) u okviru korištene metode ekstrakcije (Cakaloglu i sur., 2018).

2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Ekstrakcija uz pomoć organskih otapala pripada, uz enzimski potpomognutu ekstrakciju, u skupinu kemijskih metoda ekstrakcije. Temelji se na otapanju ulja u otapalu i njegovu uklanjanju iz okoline, odnosno sjemenke (Cakaloglu i sur., 2018). Prilikom ekstrakcije po Soxhletu kao otapalo se najčešće koristi *n*-heksan te petroleter (Gitea i sur., 2023). Nakon što se ulje ekstrahira uz pomoć organskog otapala, obavezno slijedi postupak rafinacije, koji najčešće podrazumijeva nekoliko koraka, kao što su degumiranje, neutralizacija, bijeljenje, vinterizacija i deodorizacija (Argon i sur., 2020). Mnogi znanstvenici upravo rafinaciju smatraju jednim od najvećih nedostataka ulja dobivenih ovakvom metodom ekstrakcije, jer takva ulja imaju slabije izraženu boju, miris i aromu (Gitea i sur., 2023). Također, ova metoda zahtijeva primjenu velikih količina organskih otapala, koja imaju nepoželjno djelovanje na okoliš (Bellili i sur., 2018). Međutim, velika prednost ekstrakcije organskim otapalima je značajno veći prinos ulja, prosječno čak i do 11,5 %, u odnosu na hladno prešanje. Brojni su čimbenici koji utječu na uspješnost ove tehnike ekstrakcije, kao što su kontakt ulja s otapalom (predtretman sjemenke je vrlo važan kako bi se povećala dodirna površina između otapala i ulja), kemijska struktura otapala, količina otapala koja se koristi, temperatura (povišena temperatura olakšava ekstrakciju ulja) (Cakaloglu i sur., 2018).

Hladno prešanje je konvencionalna metoda ekstrakcije, koja za razliku od ekstrakcije organskim otapalima, predstavlja tzv. zelenu metodu ekstrakcije (Ramadan i sur., 2020). Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) definira hladno prešana ulja kao proizvode koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina samo mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, bez primjene topline, a naknadno se može provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem. S obzirom na relativno nizak udio ulja u sjemenkama grožđa, ekstrakcija organskim otapalima se smatra najučinkovitijom metodom, no danas se na tržištu bilježi porast potražnje kupaca za hladno prešanim uljem sjemenki grožđa, koje predstavlja visokokvalitetan proizvod (Bjelica i sur., 2019). Izbjegavanje upotrebe kemikalija i visokih temperatura rezultira uljem sačuvane kvalitete, vrlo visoke nutritivne vrijednosti, senzorskih karakteristika i visoke koncentracije bioaktivnih spojeva, poput antioksidansa i fitokemikalija (Gitea i sur., 2023; Argon i sur., 2020). Spomenute prednosti nadopunjuju opće karakteristike mehaničkih metoda ekstrakcije, poput jednostavnosti korištenja, relativno kratkog trajanja procesa, potrebe za malim količinama sirovog materijala. Najveći nedostatak ovakve metode ekstrakcije je svakako nizak prinos, visok udio ulja u pogači, ali i otežano postizanje uniformnosti i standardizacije proizvoda (Cakaloglu i sur., 2018). Manji prinosi su posljedica tvrde, vlaknaste i drvenaste strukture sjemenke koja prilikom prešanja pruža otpor. Povećanju iskorištenja može doprinijeti predtretman sjemenke, primjerice povećanjem temperature, no tada treba imati na umu da ovaj postupak nije dozvoljen kod hladnog prešanja, ali i potencijalni pad kvalitete ulja zbog moguće degradacije pojedinih termonestabilnih komponenti (Bellili i sur., 2018). Na sjemenke se prije samog prešanja, s ciljem povećanja prinosa, može djelovati i upotrebom enzima, tretmanom mikrovalovima, parenjem ili kondicioniranjem (Ramadan i sur., 2020). Prilikom odabira predtretmana iznimno je važno obratiti pažnju na bioaktivne komponente sjemenke i ciljane rezultate prešanja, kako ne bi došlo do degradacije sastojaka u ulju, ali i gubitka kvalitete. Dodatno, manja brzina rotacije puža preše te manji promjer matrice na dijelu za pražnjenje također rezultiraju većim prinosom ulja (Argon i sur., 2020). Hladno prešana ulja su u većini slučajeva spremna za konzumaciju odmah nakon prešanja i ne zahtijevaju proces rafinacije, uz najčešću primjenu dekantiranja, filtriranja ili centrifugiranja kao postupka bistrenja ulja dobivenog nakon prešanja (Cakaloglu i sur., 2018).

Usporedbom sastava ulja sjemenki grožđa dobivenih hladnim prešanjem i ekstrakcijom organskim otapalima, uočen je veći udio nezasićenih masnih kiselina u hladno prešanom ulju, bez obzira na sortu. Također, hladno prešana ulja pokazuju veći udio α - i γ -tokotrienola, ali i

tokoferola, gdje su utvrđene koncentracije između 40,53 i 90,45 mg/100 g ulja, dok su u uljima ekstrahiranim organskim otapalima utvrđene koncentracije od 29,99 do 82,36 mg/100 g ulja. Suprotno očekivanjima, pojedina istraživanja pokazala su kako ulja dobivena ekstrakcijom po Soxhletu mogu sadržavati visoke udjele polifenolnih spojeva (Juhaimi i Özcan, 2017). Također, zanimljivo je spomenuti i kako su u ulju dobivenim metodom ekstrakcije otapalima utvrđene značajno više koncentracije heksanala, spoja za koji se pretpostavlja da nastaje degradacijom linolne kiseline (Bail i sur., 2008).

2.2.2. Suvremene metode ekstrakcije

Iako su hladno prešanje i ekstrakcija organskim otapalima glavne metode ekstrakcije ulja sjemenki grožđa, novija znanstvena istraživanja usmjerena su i na metode ekstrakcije superkritičnim fluidima, u prvom redu ekstrakcija superkritičnim ugljikovim dioksidom (SC CO₂) (Bellili i sur., 2018). SC CO₂ ekstrakcija, kao i hladno prešanje, predstavlja zelenu metodu ekstrakcije, a karakterizira je upotreba CO₂ u ulozi otapala, odnosno sredstva koje provodi ekstrakciju. Navedenom metodom moguće je ekstrahirati ulja iz različitih uljarica, sjemenki ili orašastih plodova (npr. uljane repice, suncokreta, soje, sjemenki marelice, sjemenki grožđa, oraha). Uvjeti SC CO₂, kao što su tlak CO₂, temperatura ili brzina protoka otapala, ovisit će o sastavu supstrata te bioaktivnim komponentama ulja koje se želi ekstrahirati. Prednosti ove metode, u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije organskim otapalima, su veći stupanj selektivnosti, kraće trajanje te izostanak negativnog djelovanja na okoliš. Naime, CO₂ nije zapaljivo otapalo, a ujedno se može i reciklirati. Također, CO₂ ne ostavlja nikakve nusprodukte niti ostatke u proizvodu pa se postiže vrlo visoka čistoća dobivenog ekstrakta (Lavenburg i sur., 2021). Dodatna prednost metode je mogućnost razdvajanja termostabilnih spojeva jer se može provoditi i pri niskim temperaturama (Gitea i sur., 2023). Najznačajniji nedostaci su nepolarost CO₂, koja ograničava ekstrakciju polarnih komponenti poput polifenolnih spojeva i visoka cijena. Upravo spomenuti manjak ekonomičnosti metode, odnosno njezina visoka cijena provođenja je faktor koji ograničava širenje upotrebe ovakvog načina ekstrakcije u prehrambenoj industriji (Lavenburg i sur., 2021).

Nadalje, suvremene metode ekstrakcije podrazumijevaju i primjenu konvencionalnih metoda ekstrakcije (poput hladnog prešanja) potpomognutih različitim suvremenim predtretmanima kako bi se povećalo iskorištenje ekstrakcije. Navedeni predtretmani uključuju primjenu različitih metoda/tehnika, bilo kemijskih (poput ekstrakcije potpomognute enzimima), toplinskih (poput ekstrakcije mikrovalovima) ili netoplinskih (poput ekstrakcije

potpomognute ultrazvukom i primjenom pulsirajućeg električnog polja). Utjecaj navedenih predtretmana na sastav i kvalitetu ulja sjemenki grožđa još je neistražen.

Tijekom ekstrakcije potpomognute enzimima dolazi do enzimskog razaranja staničnih stijenki sjemenke i ekstrakcije ulja, a medij koji se koristi za separaciju je voda (Cakaloglu i sur., 2018). Metoda funkcionira po principu vezanja stanične stijenke stanice za aktivno mjesto enzima, a njihovo vezanje zatim uzrokuje promjenu konformacije enzima što pak dovodi do prekidanja određenih veza u staničnoj stijenci i lakšeg izlaska unutarstaničnog sadržaja. U sjemenkama se kapljice ulja uglavnom nalaze okružene proteinima pa se enzimskom hidrolizom proteina lakše dolazi do samoga ulja (Nadar i sur., 2018). Također, ulje je vrlo teško izvući iz kotiledona kojeg okružuju stijenke građene iz celuloze, hemiceluloze, lignina i pektina, pa vrlo važnu ulogu imaju i enzimi koji hidroliziraju ugljikohidrate (Lavenburg i sur., 2021). Metoda je razvijena s ciljem smanjenja upotrebe otrovnih i štetnih otapala, a upotreba enzima se pokušava svesti na minimalne razine (Cakaloglu i sur., 2018). Enzimski potpomognuta ekstrakcija nema negativan utjecaj na okoliš, za provođenje metode nisu potrebne iznimno visoke temperature i ne zaostaju tragovi otapala (Lavenburg i sur., 2021). Enzimi koji se najčešće upotrebljavaju su hemicelulaza, alkalaza, pektinaza (Cakaloglu i sur., 2018), a prilikom ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa se često koristi celulaza (Nadar i sur., 2018).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je također jedna od suvremenih metoda ekstrakcije. Mikrovalovi su elektromagnetski oblik energije frekvencija između 300 MHz i 300 GHz. Energija se ovom metodom prenosi u obliku valova kroz biomaterijal i reagira pritom s polarnim molekulama, primarno vodom, što rezultira povećanjem temperature (Kumar i sur., 2018). Prilikom tretiranja suhog biljnog materijala mikrovalovima dolazi do zagrijavanja vrlo sitnih kapljica vode koje su još zaostale u uzorku i njihovog isparavanja. Isparavanje zatim stvara tlak na unutrašnjoj strani stanične stijenke i posljedično stijenka puca što omogućuje puno lakšu ekstrakciju koja slijedi (Bitwell i sur., 2023). Metoda je vrlo učinkovita pri ekstrakciji raznih spojeva, kao što su eterična ulja, pigmenti, antioksidansi (Cardoso-Ugarte i sur., 2013). Prednosti su brojne, primjerice manja potrebna količina otapala i smanjeno vrijeme ekstrakcije koja slijedi, relativno niska cijena metode, kratko vrijeme izlaganja mikrovalovima što sprječava degradaciju većine komponenti (Kumar i sur., 2018; Cardoso-Ugarte i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na razaranju staničnih stijenki u sjemenci uz pomoć ultrazvuka, nakon čega obično slijedi ekstrakcija otapalom (Gitea i sur., 2023). Koriste se ultrazvučni valovi frekvencija 10 Hz – 20 kHz, a njihova energija izaziva

cikluse kompresije i ekspanzije, na način da se formiraju vrlo mali mjehurići koji, tijekom prijenosa vibracija, rastu i zatim kolabiraju. Prednosti metode su jednostavnost i relativno niska cijena, visoka učinkovitost, smanjuje se potrebno vrijeme i temperatura ekstrakcije koja slijedi, ali i potrebna količina otapala (Masoodi i sur., 2022), a također čuva termolabilne komponente, odnosno ne narušava njihovu strukturu. Isto tako, pokazala se kao odličan predtretman prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva (Bitwell i sur., 2023).

Ekstrakcija potpomognuta primjenom pulsirajućeg električnog polja također pripada kategoriji modernih, suvremenih metoda ekstrakcije (Dimić i sur., 2022). PEF je netoplinska tehnologija obrade materijala koja uključuje upotrebu vanjskog električnog polja, pomoću kojeg dolazi do oštećenja stanične membrane i strukturalnih promjena u njoj, čime se posljedično postiže njezina veća propusnost (Leone i sur., 2022). Najčešće se materijal izlaže električnim poljima u obliku impulsa, niskog do umjerenog intenziteta (do 10 kV/cm) i kratkog trajanja (mikrosekunde), što izaziva formiranje pora u staničnim membranama stanica tretiranog materijala (Puertolas i Martinez de Marañon, 2015). Detaljan mehanizam djelovanja pulsirajućeg električnog polja te njegova primjena u prehrambenoj industriji s naglaskom na ekstrakciju ulja potpomognutu ovim tretmanom biti će objašnjeni u nastavku.

2.3. PRIMJENA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

2.3.1. Mehanizam djelovanja i primjena pulsirajućeg električnog polja (PEF)

Glavni mehanizam djelovanja PEF tehnologije uključuje proces elektroporacije prilikom kojeg se, djelovanjem vanjskih električnih sila, povećava propusnost membrane. Elektroporacija može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Do reverzibilne elektroporacije uglavnom dolazi provođenjem PEF-a srednjeg intenziteta, pri čemu se pore nastale tretiranjem vremenom ponovno zatvore, dok kod ireverzibilne elektroporacije, do koje dolazi provođenjem PEF-a intenziteta većeg od 10 kV/cm, to nije slučaj. Također, pokazalo se kako ireverzibilna elektroporacija značajno poboljšava naknadnu ekstrakciju materijala. Jačina električnog polja je proporcionalno povezana s jačinom oštećenja koje izaziva na staničnoj membrani tretiranih stanica. Tako će polja intenziteta 0,1-10 kV/cm biti dovoljna za osjetljivija biljna tkiva, kao što su perikarp i mezokarp kod nekih vrsta voća, dok će za tretiranje otpornijeg biljnog materijala, poput sjemenki, biti potrebna polja intenziteta 10-20 kV/cm. Uspješnost i jačina postignute elektroporacije ovisit će stoga o nizu parametara, kao što su jakost električnog polja, oblik i broj impulsa, trajanje tretmana i karakteristike biljnog materijala na kojemu se tretman provodi (Ranjha i sur., 2021).

PEF je u prehrambenoj industriji poznat već neko vrijeme, ali se i dalje smatra tehnologijom u razvoju i rastu. Danas se najčešće koristi prilikom pasterizacije namirnica, posebno tekućih, zbog letalnog učinka na vegetativne oblike bakterija, plijesni i kvasaca (Nowosad i sur., 2021). Kantala i sur. (2022) su pokazali kako tretiranje soka od naranče pulsirajućim električnim poljem djeluje antimikrobno, a najjači učinak je uočen pri naponu električnog polja od 30 kV. Važno je napomenuti kako prilikom navedenog tretiranja nije došlo do narušavanja nutritivne kvalitete soka, niti snižavanja koncentracije vitamina C. Isto tako, tretiranje mlijeka kombinacijom PEF-a i mikrofiltracije u svrhu pasterizacije se pokazala učinkovitijom metodom u odnosu na tradicionalnu, toplinsku pasterizaciju. Prilikom blagog povećanja temperature provođenja kombinacije PEF metode i mikrofiltracije (50-65 °C) produljuje se vrijeme roka trajanja tretiranog mlijeka, a time i samo antimikrobno djelovanje, a najjače djelovanje je uočeno kod aerobnih bakterija, posebno entero- i psihotrofnih bakterija, plijesni i kvasaca (Walking-Ribeiro i sur., 2011).

Ekstrakcija primjenom PEF-a može utjecati na povećanje iskorištenja, kao i smanjenje vremena ekstrakcije te u konačnici poboljšanje kvalitete ekstrakta, smanjenje rizika degradacije

termonestabilnih spojeva uz izostanak negativnog djelovanja na okoliš (Leone i sur., 2022; Ranjha i sur., 2021). Primjena PEF tretmana se pokazala kao vrlo dobra metoda ekstrakcije karotenoida i polifenolnih spojeva iz algi, a najjača ekstrakcija pigmenata je uočena kod alge *Phaeodactylum tricornerutum* uz primjenu PEF tretmana i ekstrakciju otapalima (Kokkali i sur., 2020). Nadalje, u vinskoj industriji ovaj tretman može se primijeniti s ciljem povećanja antioksidacijskog kapaciteta, skraćivanja vremena maceracije, ubrzavanja starenja vina, inaktivacije oksidativnih enzima te povećanja ekstrakcije polifenolnih spojeva iz nusprodukata vinske industrije (Saykova i sur., 2022). Naime, primjena PEF tretmana tijekom maceracije crnog grožđa pri energiji električnog polja između 10 i 20 kJ/kg rezultirala je povišenim koncentracijama antocijana, tanina i polimeriziranih pigmenata nakon jedne godine starenja vina. S druge strane, u uzorku tretiranom pri energiji od 2 kJ/kg nije utvrđen porast koncentracija navedenih spojeva. Ovi rezultati upućuju na zaključak kako više energije električnog polja stvaraju veće pore u membrani tretiranog uzorka, a time se omogućuje kompleksnim polifenolnim molekulama lakši izlazak iz stanice (Comuzzo i sur., 2020). Također, istraživanje provedeno na tretiranom grožđu sorte Merlot pokazalo je kako PEF može pozitivno utjecati na promjene u sastavu arome vina (Arcena i sur., 2021).

Ekstrakcija potpomognuta PEF-om, osim samostalne primjene PEF tretmana, može uključivati i primjenu PEF-a kao predtretmana prije tradicionalne ili suvremene metode ekstrakcije (Ranjha i sur., 2021). PEF predtretman najčešće se provodi s ciljem povećanja ekstraktibilnosti pojedinih bioaktivnih spojeva ili ukupnog iskorištenja ekstrakcije ulja. Primjerice, značajno povećanje koncentracije polifenolnih spojeva, posebice visoko-polarnih, uočeno je u ulju maslina ekstrahiranom iz paste tretirane PEF-om (Leone i sur., 2022), a također je utvrđeno kako ekstrakcija polifenolnih spojeva ne ovisi samo o parametrima PEF predtretmana, već također i o samoj sorti (Navarro i sur., 2022). Naime, ulje maslina sorte Manzanilla pokazalo je značajan porast u koncentraciji polifenolnih spojeva nakon PEF tretmana, dok navedeni tretman nije utjecao na polifenolni sastav ulja sorte Hojiblanca.

U industriji procesiranja krumpira se pokazalo kako tretman PEF metodom utječe na strukturu tkiva biljke, što je rezultiralo kontroliranim otpuštanjem unutarstaničnog sadržaja, odnosno komponenti poput šećera i proteina koji sudjeluju u Maillardovim reakcijama. Time se postiže veća nutritivna kvaliteta proizvoda jer, prilikom prženja tretiranih krumpira, nastaje manja količina akrilamida. Također, tretirani krumpiri su prilikom pečenja upili značajno manje količine ulja u odnosu na netretirane (Nowosad i sur., 2021).

Također, istraživanje Liu i sur. (2018) pokazalo je kako PEF tretman svježeg lišća čaja prije ekstrakcije može uspješno zamijeniti konvencionalno termalno sušenje i pozitivno utjecati na iskorištenje ekstrakcije, smanjujući duljinu ekstrakcije i utrošak energije, pritom ne utječući na polifenolni profil čaja. Naime, poboljšanje ekstraktibilnosti u navedenoj studiji vjerojatno je rezultat formiranja velikog broja pora na površini tkiva lišća, čime je poboljšana permeabilnost te olakšana ekstrakcija polifenolnih spojeva.

Provođenje PEF-a može također doprinijeti i formiranju organskih kompleksa u kojima se mineralni ioni inkorporiraju u stanicu, odnosno vakuolu stanica kvasaca ili bakterija, uz pomoć raznih membranskih nosača. Tada takve kvaščeve ili bakterijske stanice služe kao nosači mineralnih iona i mogu koristiti za obogaćivanje namirnica i prehrane mineralima poput cinka, magnezija, kalcija ili selena (Nowosad i sur., 2021).

Prilikom tretiranja namirnice PEF-om potrebno je voditi računa o ujednačenosti tretiranja, kako ne bi došlo do nejednake raspodjele električnog polja unutar komore uslijed prisustva mjehurića zraka, nečistoća, ili pak zbog termofizikalnih karakteristika namirnice (posebice prilikom tretiranja tekućih namirnica). Posljedica ovakvog tretmana može biti preslabo tretiranje određenih dijelova tekućine, najčešće u sredini, ali i intenzivno tretiranje rubnih dijelova, o čemu je posebno potrebno voditi računa tijekom pasterizacije namirnice (Nowosad i sur., 2021).

2.3.2. Ekstrakcija ulja potpomognuta primjenom pulsirajućeg električnog polja

Ekstrakcija ulja potpomognuta PEF-om najčešće uključuje primjenu PEF-a kao predtretmana prije ekstrakcije ulja (konvencionalne ili suvremene), s ciljem povećanja iskorištenja ekstrakcije i ubrzavanja procesa (Saykova i sur., 2022). Navedeni predtretman najčešće se kombinira s hladnim prešanjem, s obzirom na činjenicu da je glavni nedostatak hladnog prešanja nizak prinos ekstrakcijskog procesa (ulje zaostaje zarobljeno u stanici ili emulgirano s vodom, uslijed čega se otežano ekstrahira) (Cakaloglu i sur., 2018; Puertolas i Martinez de Maraňon, 2015). Istodobno, primjenom PEF-a ne dolazi do narušavanja nutritivne vrijednosti tretiranog uzorka, jer se radi o netoplinskoj metodi obrade (Navarro i sur., 2022).

Literaturni podaci, iako malobrojni, pokazali su pozitivan utjecaj PEF predtretmana na sastav ulja sjemenki uljane repice, crnog kima, sojinog ulja, ulja kukuruznih klica, pekan oraha te maslinovog ulja (Bakhshabadi i sur., 2017; Guderjan i sur., 2007; Guderjan i sur., 2005). Također, pri tome je važno naglasiti kako iskorištenje pojedinog procesa ne ovisi samo o primijenjenim parametrima PEF predtretmana, nego i o karakteristikama samog tretiranog

supstrata (Rabago-Panduro i sur., 2021; Sarkis i sur., 2015; Guderjan i sur., 2007; Guderjan i sur., 2005). Naime, istraživanje Guderjan i sur. (2005) pokazalo je kako odabir adekvatnih parametara PEF predtretmana (0,6 kV/cm) i ekstrakcije može utjecati na značajno povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja kukuruznih klica (do 88,4 %) te značajno povećanje koncentracije fitosterola (do 32,4 %). S druge strane, povećanje iskorištenja od 7,4 % dobiveno je uz primjenu snage 1,3 kV/cm i 100 pulseva. Također, studija provedena na uljanoj repici pokazuje povećanje iskorištenja od 9 % kod primjene PEF predtretmana od 84 kJ/kg u odnosu na netretirane uzorke (Guderjan i sur., 2007), dok je u istraživanju provedenom na sjemenkama sezama povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja od 10,2 % ostvareno kod primjene PEF predtretmana od 40 kJ/kg (Sarkis i sur., 2015). Nadalje, istraživanje provedeno na pekan orasima pokazalo je kako udio vlage, ali i ulja, te mikrostruktura uzorka igraju presudnu ulogu u efikasnosti PEF tretmana (Rabago-Panduro i sur., 2021).

Primjena PEF predtretmana snage električnog polja od 3,25 kV/cm i 30 pulseva, širine 20 μ s na sjemenkama crnog kima rezultirala je povećanjem iskorištenja hladnog prešanja u odnosu na kontrolni uzorak, kao i povećanjem oksidacijske stabilnosti i indeksa boje, no bez značajnih promjena indeksa refrakcije ulja (Bakhshabadi i sur., 2017). Dobiveni rezultati vjerojatno su rezultat povećanja ukupnog udjela tokoferola i/ili drugih antioksidacijskih komponenti u ulju.

Istraživanje provedeno na maslinama sorte Picholine pokazalo je kako primjena PEF tretmana od 2,4 kV/cm i 4 kV/cm, uz širinu pulsa 6 μ s na pasti maslina značajno utječe na ekstraktibilnost i koncentraciju ukupnih polifenola, posebice derivata oleuropeina. Istovremeno, navedeni PEF tretman nije utjecao na sastav slobodnih masnih kiselina i peroksidni broj, kao ni na sastav tokoferola, hlapljivih spojeva ni senzorske karakteristike tretiranog ulja (Leone i sur., 2022). Dobiveni rezultati pokazuju kako PEF tretman značajno doprinosi efikasnosti procesa proizvodnje te vrlo uspješno može biti primijenjen u proizvodnji maslinovog ulja. Također, pozitivan utjecaj PEF tretmana ranije je utvrđen i na sorti Arbequina kod primjene tretmana od 2 kV/cm (Abenoza i sur., 2013).

Mogućnost primjene ekstrakcije potpomognute PEF-om na iskorištenje i sastav ulja sjemenki grožđa još je neistražena. Prethodna studija provedena na komini grožđa sorte Graševina pokazala je kako PEF predtretman komine sjemenki grožđa intenziteta 4,79 kJ/kg te 24,00 kJ/kg uz ekstrakciju superkričnim CO₂ pridonose značajno većem iskorištenju u usporedbi s hladnim prešanjem, a utvrđena je i selektivnost navedene metode prema ekstrakciji sterola, fenolnih kiselina i *trans*-resveratrola (Ćurko i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Sjemenke komine grožđa

Istraživanje je provedeno na sjemenkama grožđa sorte Graševina (vinarija Kutjevo d.d., Kutjevo, Hrvatska), godina berbe 2022. Grožđe je ubrano u fazi tehnološke zrelosti u rujnu 2022., a odmah nakon prenašanja sjemenke su odvojene od ostatka komine, ručno očišćene te transportirane u laboratorij radi ekstrakcije ulja te daljnjih analiza.

3.1.2. Kemikalije

Prilikom provođenja eksperimentalnog dijela rada upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- metanol (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- *n*-heksan (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- izooktan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev karbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev dihidrogen fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev hidrogensulfat monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- dinatrijev hidrogen fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kalijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Reagecon, Shannon, Irska)
- fluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid) -dihidroklorid, 98 %) (Acros, Gell, Belgija)
- Trolox standard (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- metilirani β -ciklodekstrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- galna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- (+)-katehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- (-)-epikatehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- procijanidin B1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kvercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- miricetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- metilni esteri standardne smjese masnih kiselina (FAME C8-C20) (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

- HVG60/1 PEF uređaj (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- laboratorijska pužna preša Komet (model CA/53, Montforts & Reiners, Rheydt, Njemačka)
- sušionik s ventilacijom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- analitička vaga (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)
- vorteks uređaj (IKA VORTEX 4 basic, IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- laboratorijska centrifuga (Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka)
- vodena kupelj (Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK)
- spektrofotometar (Specord 50 Plus, AnalytikJena, Jena, Njemačka)
- fluorimetar (Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian, Palo Alto, CA, SAD)
- plinski kromatograf (Agilent Technologies, 6890N Network GC System, Santa Clara, CA, SAD)
- HPLC uređaj (Agilent Technologies 1290 Infinity II LC System, Agilent, Santa Clara, CA, SAD) opremljen s DAD ((G7117A) i MS detektorima (G6125B)
- kapilarna DB-23 kolona za plinski kromatograf (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)
- kolona za HPLC Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD)
- mikropipete volumena 100 i 1000 μ L (Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD)
- eksikator
- plastične ladice za vaganje
- plastična žličica
- laboratorijske čaše volumena 100, 150 i 200 mL

- odmjerne tikvice volumena 25, 50 i 2000 mL
- pipete volumena 20 mL
- stalak za epruvete
- staklene epruvete
- čepovi za epruvete
- staklene kivete
- plastične kivete
- staklene vijale

3.2. METODE

3.2.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja (PEF) kao predtretmana hladnom prešanju

PEF predtretmani provedeni su na HVG60/1 PEF uređaju (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) prethodno detaljno opisanom (Bebek Markovinović i sur., 2022). Promjer reaktora korištenog PEF uređaja iznosi 22,5 cm, a udaljenost između elektroda 3,2 cm.

Neposredno prije predtretmana uzorci sjemenke komine grožđa namočeni su u destiliranoj vodi, u omjeru 1:1,5 (1 kg sjemenki namočen je u 1,5 L vode) kroz period od 4 sata. Količina od 1 kg namočenih sjemenki stavljena je u PEF komoru kapaciteta 1,3 L. Primijenjeni su različiti parametri PEF predtretmana obuhvaćajući napone od 40 i 50 kV, tijekom 15 i 30 min, uz duljinu trajanja pulsa od 1 μ s i frekvenciju od 100 Hz (tablica 1). Svaki PEF predtretman proveden je u duplikatu. Kontrolni uzorak bio je uzorak sjemenke komine koji nije bio predtretiran.

Nakon PEF predtretmana sjemenke su dalje osušene u sušioniku s ventilacijom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) pri 35 °C tijekom 24 h kako bi se postigao odgovarajući udio vlage od 8 % optimalan za hladno prešanje. Prije i nakon tretiranja svakog uzorka je izmjerena njihova temperatura. Uočeni porast temperature nakon tretmana se kretao između 1,95 °C za PEF1_15 i 3,7 °C za PEF2_30.

Tablica 1. Parametri PEF predtretmana (napon, frekvencija, duljina pulsa, intenzitet električnog polja i duljina tretiranja) i popis tretiranih uzoraka

Naziv uzorka	Napon	Frekvencija	Duljina trajanja pulsa	Jakost električnog polja	Vrijeme tretiranja
PEF1_15	40 kV	100 Hz	1 μ s	12,5 kV/cm	15 min
PEF1_30	40 kV	100 Hz	1 μ s	12,5 kV/cm	30 min
PEF2_15	50 kV	100 Hz	1 μ s	15,6 kV/cm	15 min
PEF2_30	50 kV	100 Hz	1 μ s	15,6 kV/cm	30 min

3.2.2. Ekstrakcija ulja hladnim prešanjem

Hladno prešano ulje sjemenki grožđa ekstrahirano je pomoću laboratorijske preše prikazane na slikama 1 i 2 (Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka). Prešanje PEF predtretiranih sjemenki i sjemenki kontrolnog uzorka (HP) provedeno je bez prethodnog mljevenja ili kondicioniranja (Cecchi i sur., 2019.).

U svakom ciklusu ekstrakcije prešano je 800 g sjemenki, a ekstrakcija je provedena u triplikatu. Dobivena ulja su centrifugirana pri 5 000 rpm tijekom 10 min. Ekstrahirano ulje sjemenki grožđa skladišteno je u tamnim staklenim bočicama u struji dušika, pri sobnoj temperaturi do daljnjih analiza.

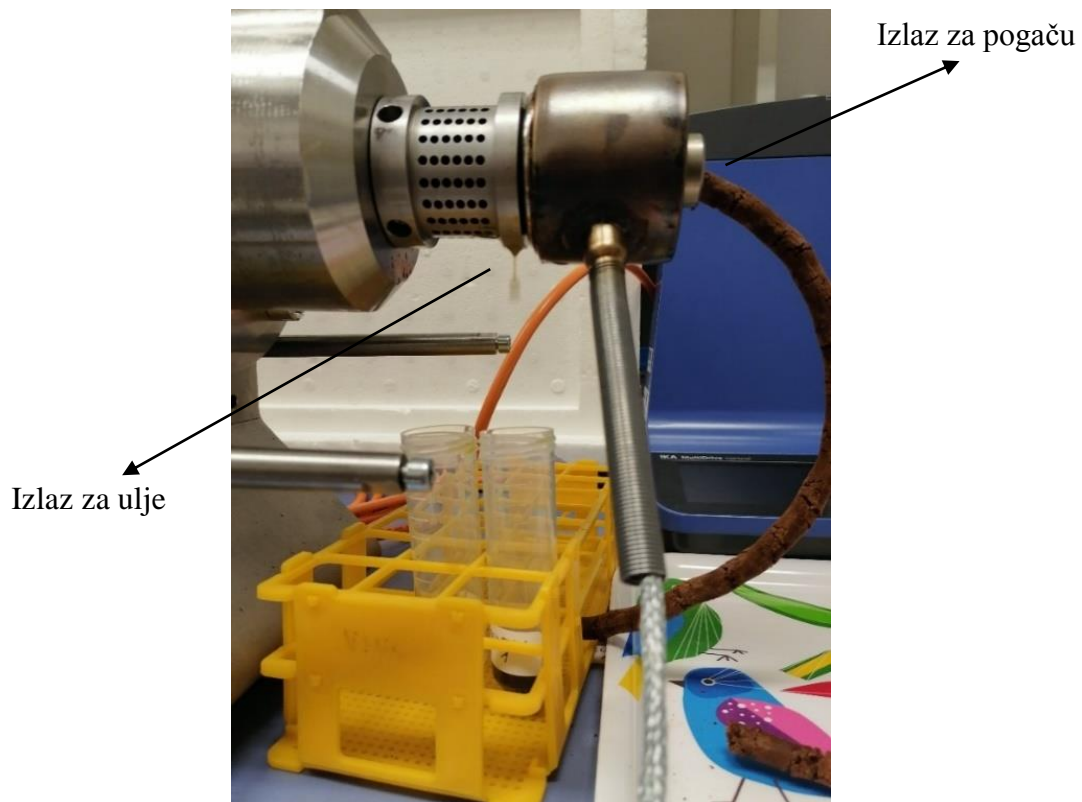
3.2.3. Određivanje iskorištenja ekstrakcije ulja hladnim prešanjem

Iskorištenje ekstrakcije hladnog prešanja ulja za PEF predtretirane uzorke (tablica 1) kao i kontrolni uzorak (HP), izračunati su uz pomoć sljedeće jednadžbe (Mohseni i sur., 2020b):

$$EY (\%) = \frac{\text{masa ekstrahiranog ulja (g)}}{\text{masa komine sjemenke grožđa (g)}} \times 100 \quad [1]$$



Slika 1. Laboratorijska pužna preša (vlastita fotografija)



Slika 2. Postupak prešanja (*vlastita fotografija*)

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva

Ekstrakcija polifenolnih spojeva provedena je prema postupku Bail i sur. (2008). Ukupni fenoli određeni su Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i Rossi, 1965).

Priprema polifenolnih ekstrakata:

U epruveti otopiti 6 g ulja u 10 mL *n*-heksana. Zatim ekstrakciju provesti tri puta s 10 mL metanol:voda (80:20 v/v), a faze odvojiti centrifugiranjem pri 5000 o/min tijekom 5 min. Tri dobivene vodeno alkoholne faze sakupiti te potom isprati tri puta s 10 mL *n*-heksana (faze također odvojiti centrifugiranjem pri 5000 o/min tijekom 5 min). Tako dobiveni polifenolni ekstrakt upariti do suhog pod sniženim tlakom i pri temperaturi od 35 °C, a zatim rekonstruirati s 700 µL metanola.

Postupak analize ukupnih polifenola:

U tikvicu od 5 ml otpipetirati 50 µL pripremljenog polifenolnog ekstrakta te dodati 3 mL vode i 250 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2 s destiliranom vodom). Sve dobro promiješati i nakon 30 s dodati 750 µL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Nadopuniti do

oznake s destiliranom vodom te ostaviti 2 h na sobnoj temperaturi. Potom izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi (koju je potrebno pripremiti na istovjetan način s destiliranom vodom). Koncentracije ukupnih polifenola odrediti temeljem baždarnog dijagrama galne kiseline kao standarda. Rezultate izraziti u mg ekvivalenta galne kiseline/kg uzorka ulja (mg GAE/kg).

3.2.5. Određivanje sastava pojedinačnih polifenolnih spojeva

Analiza neflavonoida (galna kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, *trans*-resveratrol) i flavonoida [(+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin dimer B1, kvercetin i miricetin] provedena je na Agilent Technologies 1290 Infinity II LC uređaju (Santa Clara, CA, SAD) opremljenim s DAD (G7117A) i MS detektorom (G6125B) (slika 3).

Razdvajanje je provedeno na Phenomenex Gemini C18 koloni (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD), pri čemu je korištena 3 % mravlja kiselina kao mobilna faza A te 100 % metanol kao mobilna faza B, prema ranije opisanoj metodi (Lukić i sur., 2020). Uvjeti HPLC analize te gradijent mobilnih faza korišten za razdvajanje polifenolnih spojeva prikazani su redom u tablicama 2 i 3. Koncentracije gore navedenih polifenolnih spojeva (neflavonoida i flavonoida) u polifenolnim ekstraktima ulja određene su pomoću kalibracijskih krivulja metodom vanjskog standarda. Rezultati su izraženi u μg/kg uzorka ulja.

Tablica 2. HPLC uvjeti za određivanje sastava pojedinačnih polifenola

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

Tablica 3. Gradijent mobilnih faza korišten za razdvajanje polifenolnih spojeva

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



Slika 3. HPLC uređaj korišten za analizu polifenolnih spojeva (*vlastita fotografija*)

3.2.6. Određivanje sastava masnih kiselina

Kako bi se odredio sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa, masne kiseline je prvo potrebno prevesti u njihove metilne estere, što je provedeno prema standardnoj metodi (ISO 12966-2, 2017).

Priprema metilnih estera masnih kiselina:

U epruvetu volumena 10 mL odvagati 60 mg uzorka ulja i zatim ga otopiti u 4 mL izooktana. Potom u epruvetu dodati 200 μ L pripremljene metanolne otopine KOH, molarne koncentracije 2 mol/L. Epruvetu zatim vorteksirati 30 sekundi i ostaviti na sobnoj temperaturi par minuta kako bi došlo do reakcije. Nakon što se reakcijska smjesa izbistri i glicerolni sloj se odvoji, dodati 1 g natrijeva hidrogensulfata monohidrata u svrhu neutralizacije smjese. Naposljetku, bistru otopinu prebaciti u vijalu i analizirati plinskom kromatografijom.

Analiza sastava masnih kiselina u uljima sjemenki grožđa provedena je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenim sa plameno-ionizacijskim detektorom (*Flame Ionization Detector*). Metilni esteri masnih kiselina razdvojeni su na kapilarnoj DB-23 koloni (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD) prema standardnoj metodi (ISO 12966-4, 2015). Kromatografski uvjeti analize su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti plinskog kromatografa za analizu metilnih estera masnih kiselina

Kolona	Kapilarna DB-23 kolona (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
Plin nosioc	Helij
Protok plina nosioca	1,5 mL/min
Temperatura injektora	250 °C
Split	1:30
Temperatura detektora	280 °C
Količina injektiranog uzorka	1 μ L
Temperaturni program	60 °C do 220 °C; 7 °C/min 220 °C tijekom 17 min

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja ispitivanih metilnih estera masnih kiselina s vremenom zadržavanja metilnih estera standardne smjese masnih kiselina poznatog sastava (FAME C8-C20). Sastav pojedinih masnih kiselina izražen je kao % ukupnih masnih kiselina u uzorku.

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u hidrofilnoj i lipofilnoj frakciji ulja

Antioksidacijski kapacitet određen je ORAC metodom (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Ou i sur., 2001), koja je provedena u hidrofilnoj (H-ORAC) i lipofilnoj (L-ORAC) frakciji ulja prema ranije opisanom postupku (Shinagawa i sur., 2017; Ou i sur., 2013). Rezultati H-ORAC i L-ORAC vrijednosti izraženi su u $\mu\text{mol TE/g}$ uzorka ulja.

Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrofilnoj frakciji ulja (H-ORAC):

U epruvetu dodati 2,25 mL 0,04 $\mu\text{mol/L}$ otopine fluoresceina ranije pripremljenog u 0,0075 mol/L Na-K fosfatnom puferu (pH= 7,0) i 0,375 mL hidrofilnog uzorka (polifenolni ekstrakt ulja). Epruvetu termostatirati u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 30 minuta, a potom dodati 0,375 mL 152 mmol/L otopine AAPH pripremljene u fosfatnom puferu (0,0075 mol/L; pH= 7,0). Reakcijsku smjesu prebaciti u kivetu i provesti mjerenje uz pomoć fluorescentnog spektrofotometra (37 °C kroz 30 minuta) pri valnoj duljina emisije od 520 nm te ekscitacije od 485 nm. Slijepu probu pripremiti na jednaki način, ali dodati 0,375 mL fosfatnog pufera ($c=0,075$ mol/L) umjesto 0,375 mL hidrofilnog uzorka. ORAC vrijednosti standarda, tj. otopine Troloxa, odrediti dodatkom 0,375 mL otopine Troloxa (0,0025-0,05 mmol/L) ranije pripremljene u fosfatnom puferu (0,0075 mol/L; pH= 7,0). Relativne ORAC vrijednosti izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost } (\mu\text{mol TE/g}) = \left(\frac{AUC_{uz} - AUC_{sp}}{AUC_{trx} - AUC_{sp}} \right) \times k \times \alpha \times h \quad [2]$$

gdje je:

$$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1) \quad [3]$$

AUC vrijednosti uzoraka korištene za izračun ORAC vrijednosti se dobivaju kada se suma relativnih vrijednosti apsorbancija zbroji s 0,5., pri čemu je R izmjerena 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

Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta u lipofilnoj frakciji ulja (L-ORAC):

Količinu od 15 mg ulja otopiti u 1 mL acetona, a potom razrijediti sa 7 % otopinom nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RMCD) pripremljenog u 50 % acetonu, s ciljem povećanja topljivosti (Shinagawa i sur., 2017). Uzorke prije upotrebe promiješati na tresilici (400 rpm tijekom 30 min). U epruvetu dodati 2,25 mL 0,04 μ mol/L otopine fluoresceina ranije pripremljenog u 0,0075 mol/L Na-K fosfatnom puferu (pH= 7,0) i 0,375 mL pripremljenog lipofilnog uzorka. Epruvetu termostatirati u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 30 minuta, a potom dodati 0,375 mL 152 mmol/L otopine AAPH pripremljene u fosfatnom puferu (0,0075 mol/L; pH= 7,0). Reakcijsku smjesu prebaciti u kivetu i provesti mjerenje uz pomoć fluorescentnog spektrofotometra (37 °C kroz 30 minuta) pri valnoj duljini emisije od 520 nm te ekscitacije od 485 nm. Slijepu probu pripremiti na jednaki način, ali dodati 0,375 mL 7 % otopine RMCD umjesto 0,375 mL lipofilnog uzorka. ORAC vrijednosti standarda, tj. otopine Troloxa, odrediti dodatkom 0,375 mL otopine Troloxa (0,0025-0,05 mmol/L) ranije pripremljene u 7 % otopini RMCD. Relativne ORAC vrijednosti izračunati prema gore navedenoj jednadžbi 2.

3.2.8. Obrada podataka

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

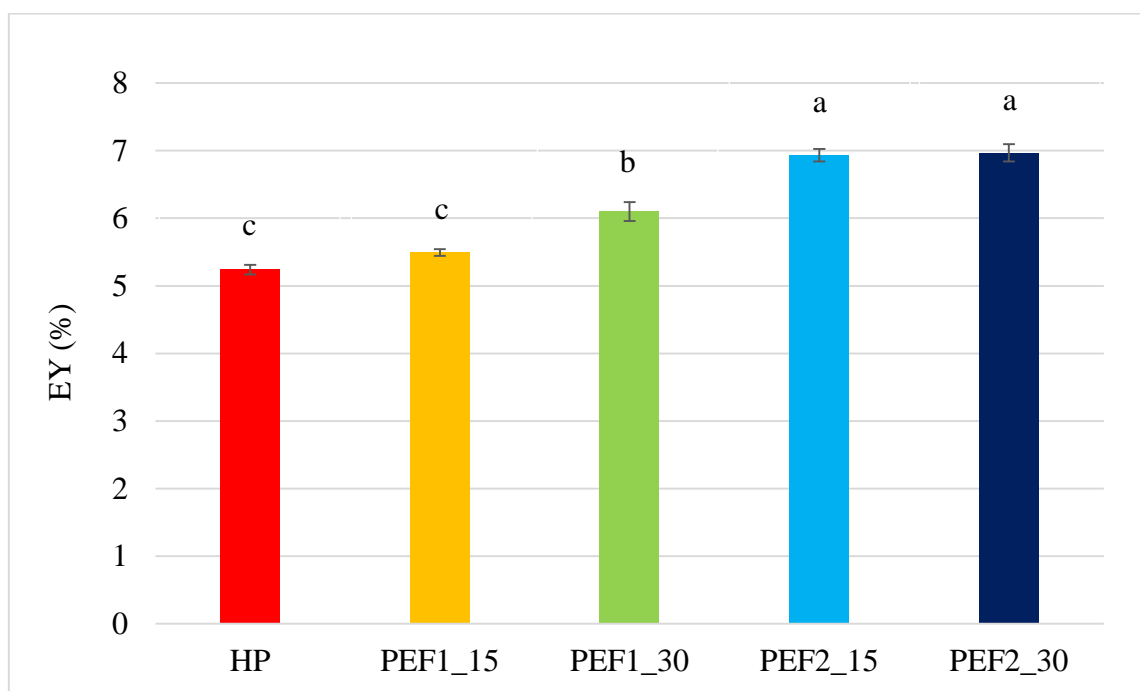
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj pulsirajućeg električnog polja (PEF) kao predtretmana hladnom prešanju kod ekstrakcije ulja sjemenki grožđa. Ispitan je utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na (i) iskorištenje prešanja, (ii) koncentraciju ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva, (iii) sastav masnih kiselina te (iv) antioksidacijski kapacitet hidrofilne i lipofilne frakcije ulja (H-ORAC i L-ORAC). Istraživanje je provedeno na sjemenkama komine grožđa sorte Graševina (vinarija Kutjevo d.d., Kutjevo, Hrvatska), godina berbe 2022. Sjemenke komine grožđa prije hladnog prešanja tretirane su PEF-om pri čemu je primijenjen napon od 40 i 50 kV, odnosno jakost električnog polja od 12,5 i 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min, uz duljinu trajanja pulsa od 1 μ s i frekvenciju od 100 Hz.

Iskorištenje ekstrakcije ulja sjemenki grožđa je nakon PEF predtretmana izračunato pomoću jednadžbe [1], a dobiveni rezultati prikazani su na slici 4. Koncentracija ukupnih polifenola je određena spektrofotometrijskom analizom, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 5. Analiza utjecaja pulsirajućeg električnog polja na koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva je provedena pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD/MS), čije rezultate pobliže prikazuje tablica 7, kao i slike 6 i 7. Sastav masnih kiselina određen je primjenom plinske kromatografije (GC-FID), a dobiveni rezultati analize su sumirani u tablici 8. Naposljetku, H-ORAC i L-ORAC vrijednosti analizirane su primjenom fluorescentnog spektrofotometra, a prikazane su na slikama 8 i 9.

4.1. UTJECAJ PREDTRETMANA PULSIRAJUĆIM ELEKTRIČNIM POLJEM (PEF) NA ISKORIŠTENJE EKSTRAKCIJE ULJA SJEMENKI GROŽĐA HLADNIM PREŠANJEM

Utjecaj predtretmana PEF-om na iskorištenje ekstrakcije ulja sjemenki grožđa prikazan je na slici 4, a izračunat uz pomoć ranije navedene jednadžbe [1]. Iz dobivenih rezultata uočljivo je kako je uzorak tretiran električnim poljem jakosti 12,5 kV/cm tijekom 30 min (PEF1_30) te kako su uzorci tretirani električnim poljem jakosti 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min (PEF2_15 i PEF2_30) pokazali značajno veće iskorištenje ekstrakcije u odnosu na kontrolni HP uzorak (uzorak netretiran PEF-om) ($p < 0,05$). S druge strane, između kontrolnog uzorka te uzorka tretiranog električnim poljem jakosti 12,5 kV/cm tijekom 15 min (PEF1_15) nisu utvrđene značajne razlike ($p < 0,05$).



Slika 4. Utjecaj PEF predtretmana na iskorištenje ekstrakcije ulja sjemenki grožđa hladnim prešanjem

Primjena ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem se, kako je i ranije istaknuto, pokazala kao suvremena metoda izrazitog potencijala, uslijed brze ekstrakcije i višeg prinosa prilikom hladnog prešanja (Saykova i sur., 2022; Bakhshabadi i sur., 2017; Guderjan i sur., 2007; Guderjan i sur., 2005). Primjerice, Sarkis i sur. (2015) su, tretirajući sjemenke

sezama intenzitetom električnog polja od 20 kV/cm, odnosno naponom od 40 kV, kao predkorak hladnom prešanju, uočili 4,9 % veći prinos ulja nakon predtretmana. Također, tretiranje sjemenki crnog kima PEF-om prije hladnog prešanja primjenom jakosti polja od 3,25 kV/cm i širini impulsa od 20 μ s dala je povećanje prinosa ulja za čak 35 % (Bakhshabadi i sur., 2017).

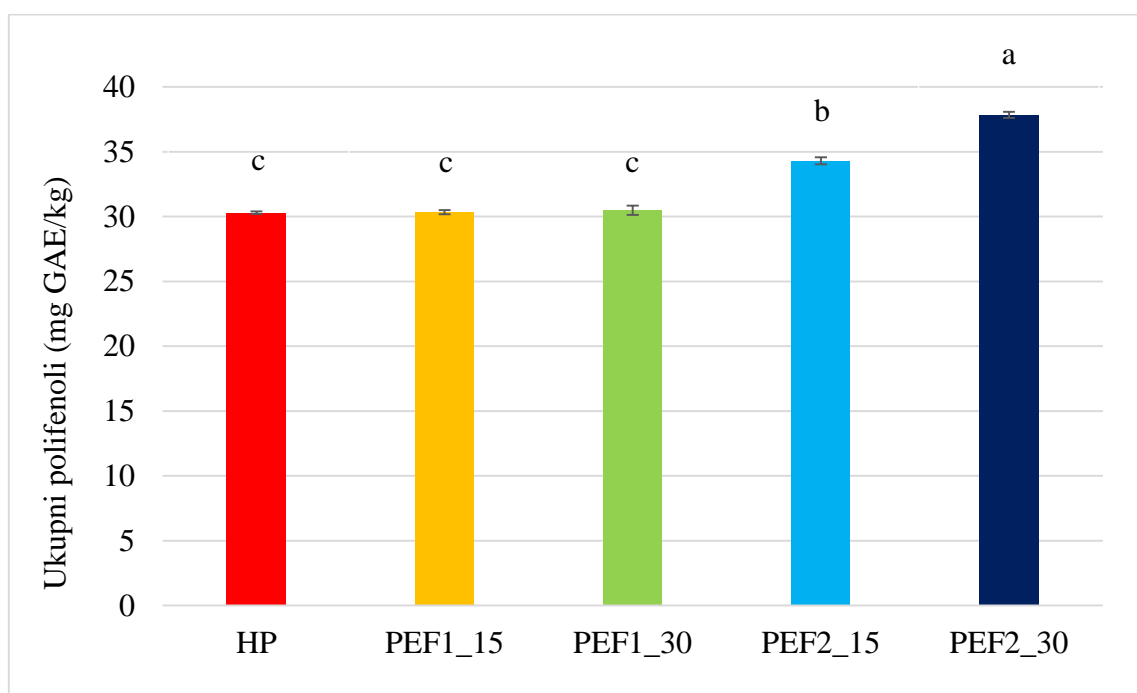
Nadalje, dobiveni rezultati (slika 4) upućuju kako je značajan utjecaj jakosti električnog polja kojim se sjemenke komine tretiraju na prinos ulja kod hladnog prešanja, s obzirom na činjenicu da su najviša iskorištenja ostvarena upravo pri najvišoj jakosti električnog polja (15,6 kV/cm), odnosno u uzorcima PEF2_15 te PEF2_30 ($p < 0,05$). Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjem Ghazanfari i sur. (2023), u kojem je prilikom primjene PEF predtretmana jakosti električnog polja od 0,25; 1 i 1,75 kV/cm na sjemenke korijandera prije hladnog prešanja, također uočen porast prinosa ulja s porastom jakosti električnog polja.

S druge strane, vrijeme tretiranja se pokazalo puno značajnijim pri jakosti električnog polja od 12,5 kV/cm, gdje uzorak tretiran 30 minuta (PEF1_30) pokazuje povećanje iskorištenja ekstrakcije za čak 0,6 % u odnosu na uzorak tretiran 15 min (PEF1_15). Naime, kod primjene jakosti električnog polja od 15,6 kV/cm duljina PEF predtretmana doima se kao manje važan faktor, pa se tako povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja sjemenki tretiranih 15 i 30 minuta razlikuje za samo 0,035 %, odnosno između dva navedena uzorka (PEF2_15 i PEF2_30) nije uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV UKUPNIH POLIFENOLA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Utjecaj predtretmana PEF-om na koncentraciju ukupnih polifenola u ulju sjemenki grožđa nakon hladnog prešanja prikazan je na slici 5. Koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima ulja bile su u skladu s ranijim literaturnim podacima (Ćurko i sur., 2023; Matthäus, 2008).

Rezultati prikazani na slici 5 pokazuju kako odabir parametara PEF predtretmana ima značajnu ulogu u ekstrakciji ukupnih polifenolnih spojeva tijekom hladnog prešanja. Naime, primjena električnog polja jakosti od 12,5 kV/cm, u trajanju od 15 i 30 minuta nije utjecala na povećanje koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva, s obzirom na činjenicu da između kontrolnog uzorka (HP) te uzoraka PEF1_15 i PEF1_30 nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Suprotni trend u odnosu na kontrolni uzorak uočen je u uzorcima PEF2_15 i PEF2_30, gdje je primjena električnog polja jakosti od 15,6 kV/cm, u trajanju od 15 i 30 minuta značajno povećala koncentracije ukupnih polifenola ($p < 0,05$).



Slika 5. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav ukupnih polifenola u ulju sjemenki grožđa

Najviše koncentracije ukupnih polifenola uočene su uzorku PEF2_30, tretiranim s električnim poljem najviše jakosti (15,6 kV/cm) i kroz najdulji vremenski period (30 min) ($p < 0,05$). Guderjan i sur. (2007) su tretirajući sjemenke uljane repice uočili sličan trend porasta koncentracije polifenola sa porastom jakosti električnog polja, posebno kod zajedničke primjene PEF tretmana i hladnog prešanja u odnosu na ekstrakciju organskim otapalima. Također, vrlo sličan trend utvrđen je u istraživanju provedenom na sjemenkama uljane repice, prilikom primjene predtretmana mikrovalovima i PEF-om te potom hladnog prešanja (Mohseni i sur., 2020a). Ipak, važno je naglasiti kako učinak PEF-a ne ovisi samo o primijenjenim parametrima ovog predtretmana, već također i o karakteristikama samog tretiranog supstrata (Rabago-Panduro i sur., 2021; Sarkis i sur., 2015; Guderjan i sur., 2007; Guderjan i sur., 2005). Struktura sjemenke komine grožđa vjerojatno je razlog zašto kod primjene električnog polja niže jakosti nije došlo do povećanja ekstrakcije ukupnih polifenolnih spojeva.

4.3. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA U ULJU SJEMENKI GROŽĐA

Koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva u hladno prešanom ulju sjemenki grožđa te uljima ekstrahiranim primjenom PEF predtretmana i hladnog prešanja su prikazane u tablici 7. U skladu s ranijim istraživanjima, najzastupljeniji polifenolni spojevi u ulju sjemenki grožđa bili su flavan-3-oli i to procijanidin B1 te (+)-katehin (Ćurko i sur., 2023; Garavaglia i sur., 2016).

Rezultati prikazani u tablici 7 pokazuju kako utjecaj PEF predtretmana kod hladnog prešanja ne ovisi samo o odabiru jakosti električnog polja, već i o duljini samog tretmana. Naime, primjena najniže jakosti električnog polja od 12,5 kV/cm tijekom 15 min rezultirala je značajno višom koncentracijom *p*-kumarinske kiseline, *trans*-resveratrola, (-)-epikatehina, procijanidina B1, kvercetina i miricetina u tretiranom ulju (PEF1_15) ($p < 0,05$), što ukazuje na činjenicu da su upravo navedeni spojevi pokazali najveću osjetljivost kod ekstrakcije potpomognute PEF-om. Dobiveni rezultati samo dijelom se slažu s ranijim istraživanjem provedenim na sjemenkama komine grožđa, što je i očekivano jer je navedeno istraživanje uključivalo primjenu PEF predtretmana u kombinaciji s ekstrakcijom superkritičnim CO₂ (SC CO₂) (Ćurko i sur., 2023). Naime, u navedenom istraživanju PEF predtretmani pridonijeli su značajno višim koncentracijama svih fenolnih kiselina, *trans*-resveratrola i kvercetina neovisno o primijenjenim parametrima tlaka i temperature SC CO₂; dok je hladno prešanje obzirom na SC CO₂ ekstrahirano ulje pridonijelo značajno višim koncentracijama *p*-hidroksibenzojeve kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B1 i miricetina.

Nadalje, značajno više koncentracije svih analiziranih flavonoida i neflavonoida u odnosu na kontrolni uzorak (HP) dobivene su u uzorcima tretiranim jakosti električnog polja od 15,6 kV/cm (PEF2_15 i PEF2_30) ($p < 0,05$). Ipak, najviše koncentracije ekstrahirane su primjenom najviše jakosti električnog polja i duljine tretiranja (PEF2_30). Povećanje duljine tretiranja s 15 na 30 min pri 15,6 kV/cm, osim ranije spomenutih polifenolnih spojeva [*p*-kumarinske kiseline, *trans*-resveratrola, (-)-epikatehina, procijanidina B1 i kvercetina], pridonijelo je i značajno višoj koncentraciji ferulinske kiseline i (+)-katehina.

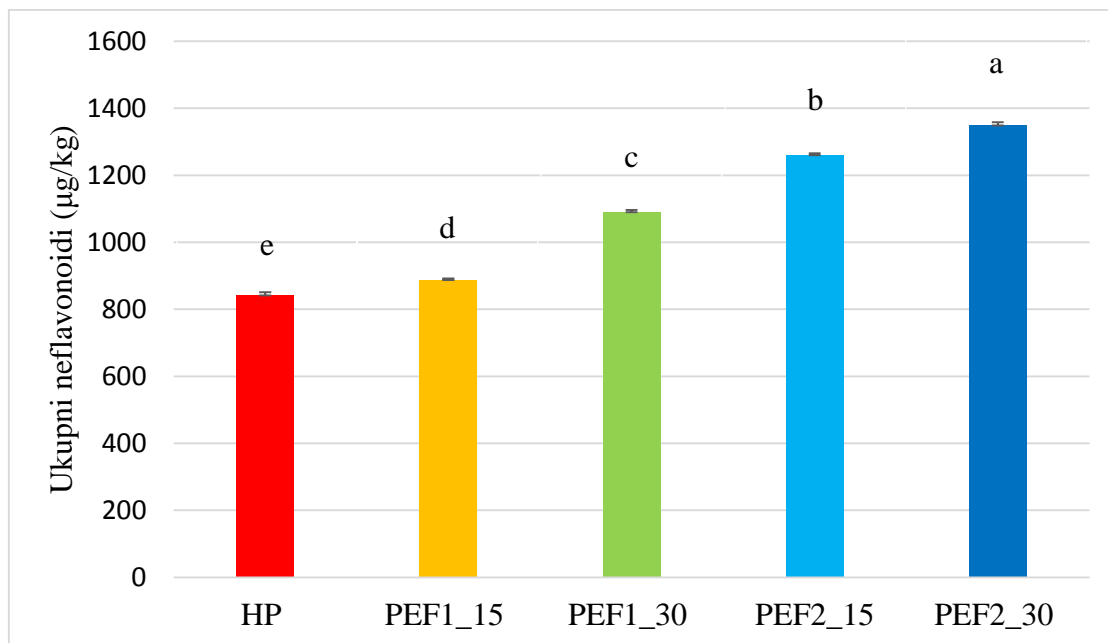
Posebno su zanimljivi rezultati uočeni u sastavu miricetina, gdje je primjena električnog polja najniže jakosti i duljine tretiranja (12,5 kV/cm, 15 min) utjecala na značajno povećanje koncentracije ovog spoja u tretiranom ulju, dok daljnje povećanje jakosti polja i duljine tretiranja nije imalo značajan utjecaj ($p < 0,05$).

Tablica 7. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav polifenolnih spojeva u ulju sjemenki grožđa

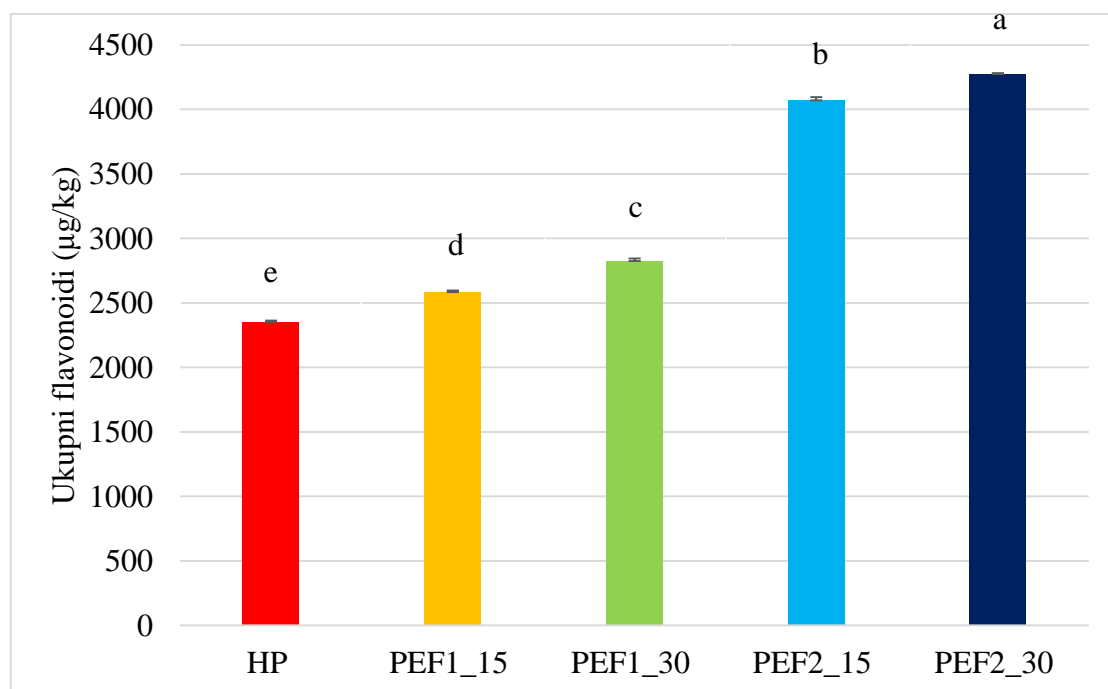
Polifenolni spojevi ($\mu\text{g/kg}$)	UZORCI				
	HP	PEF1_15	PEF1_30	PEF2_15	PEF2_30
<i>Neflavonoidi</i>					
Galna kiselina	147,3 \pm 5,4 ^c	151,5 \pm 1,7 ^c	250,2 \pm 4,3 ^b	278,7 \pm 1,7 ^a	285,4 \pm 0,8 ^a
Hidroksibenzojeva kiselina	322,5 \pm 3,6 ^c	328,0 \pm 1,6 ^c	377,9 \pm 2,3 ^b	387,6 \pm 4,4 ^a	387,1 \pm 0,4 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	170,0 \pm 0,9 ^e	191,4 \pm 0,5 ^d	220,5 \pm 1,1 ^c	323,5 \pm 1,1 ^b	346,2 \pm 0,06 ^a
Ferulinska kiselina	111,3 \pm 0,9 ^d	111,5 \pm 0,9 ^d	121,9 \pm 1,0 ^c	139,4 \pm 0,7 ^b	159,2 \pm 2,0 ^a
<i>trans</i> -resveratrol	91,8 \pm 1,8 ^e	106,2 \pm 2,4 ^d	120,7 \pm 3,5 ^c	131,4 \pm 1,6 ^b	172,3 \pm 3,6 ^a
<i>Flavonoidi</i>					
(+)-katehin	637,3 \pm 3,3 ^c	640,8 \pm 2,7 ^c	639,4 \pm 2,0 ^c	959,4 \pm 0,44 ^b	1000,0 \pm 2,3 ^a
(-)-epikatehin	200,2 \pm 4,1 ^d	213,0 \pm 9,4 ^c	333,4 \pm 5,0 ^b	421,0 \pm 1,4 ^a	428,5 \pm 3,4 ^a
Procijanidin dimer B1	1388,1 \pm 2,7 ^e	1470,9 \pm 2,7 ^d	1570,0 \pm 11,7 ^c	2435,5 \pm 15,8 ^b	2540,1 \pm 10,9 ^a
Kvercetin	62,7 \pm 2,0 ^e	104,5 \pm 3,5 ^d	127,1 \pm 1,2 ^b	112,4 \pm 2,6 ^c	140,8 \pm 1,9 ^a
Miricetin	66,2 \pm 1,3 ^b	155,2 \pm 0,7 ^a	156,8 \pm 0,7 ^a	152,8 \pm 5,1 ^a	164,3 \pm 2,0 ^a

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između uzoraka (Tukey's test, $p < 0.05$).

Utjecaj PEF predtretmana prije hladnog prešanja na sumu ukupnih analiziranih neflavonoida i flavonoida prikazan je redom na slikama 6 i 7. Sumirani podaci jasno pokazuju utjecaj jakosti električnog polja te duljine tretiranja, s obzirom na činjenicu da su značajno više koncentracije navedenih spojeva utvrđene u svim PEF tretiranim uzorcima. Također, utvrđen je porast koncentracije neflavonoida i flavonoida u nizu PEF1_15, PEF1_30, PEF2_15 i PEF2_30 ($p < 0,05$). Povećanje koncentracije polifenolnih spojeva uslijed primjene PEF predtretmana u skladu je s ranije provedenim istraživanjima (Mohseni i sur., 2020a; Guderjan i sur., 2007), a također istraživanje provedeno na sjemenkama crnog kima pokazuje kako primjena ovog tretmana može istodobno utjecati i na promjenu profila polifenola (Bakhshabadi i sur., 2017).



Slika 6. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav ukupnih neflavonoida u ulju sjemenki grožđa



Slika 7. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav ukupnih flavonoida u ulju sjemenki grožđa

4.4. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA SASTAV MASNIH KISELINA ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Utjecaj različitih PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav masnih kiselina ulja sjemenki grožđa prikazan je u tablici 8. Udio nezasićenih masnih kiselina u analiziranim uljima iznosio je oko 88 %, a najzastupljenija masna kiselina bila je linolna kiselina s udjelom oko 67 %. Dobivene vrijednosti u skladu su s ranije navedenim literaturnim podacima prema kojima ova nezasićena masna kiselina čini 58-78 % ukupnog udjela masnih kiselina (Bellili i sur., 2018). Sastav ostalih masnih kiselina također je bio u skladu s publiciranim podacima (Bellili i sur., 2018; Sabir i sur., 2012; Lutterodt i sur., 2011).

Suprotno trendovima ranije uočenim kod iskorištenja ekstrakcije te u sastavu ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva, utjecaj PEF predtretmana na sastav masnih kiselina bio je relativno mali. Naime, promjene u sastavu svih pojedinih masnih kiselina uvjetovane PEF predtretmanima od 12,5 i 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min bile su manje od 0,2 %. Slični trendovi uočeni su i kod PEF predtretmana paste od maslina primjenom električnog polja jakosti 1 i 2 kV/cm (Abenoza i sur., 2013), kao i sjemenki suncokreta tretiranih električnim poljem jakosti 0,8 i 1,1 kV/cm prije ekstrakcije otapalom (Moradi i Rahimi, 2018).

Ipak, PEF predtretmani jakosti električnog polja od 12,5 i 15,6 kV/cm tijekom 30 min utjecali su na povećanje udjela stearinske kiseline (C18:0), jer su u uzorcima PEF1_30 i PEF2_30 utvrđeni značajno veći udjeli ove masne kiseline, nego u hladno prešanom, netretiranom ulju (HP) ($p < 0,05$). Međutim, obzirom na značajno veći udio palmitinske kiseline (C16:0) kao najzastupljenije zasićene masne kiseline u HP uzorku, svi PEF tretirani uzorci pokazali su značajno niži udio zasićenih masnih kiselina ($p < 0,05$). S druge strane, Mohseni i sur. (2020b) su utvrdili kako tretiranje niger sjemenki kombinacijom mikrovalova i PEF-a prije prešanja može rezultirati povećanjem koncentracija zasićenih masnih kiselina.

Nadalje, uočeno je smanjenje udjela zasićenih masnih kiselina na račun porasta udjela polinezasićenih masti, posebice linolne kiseline. Značajno viši udio linolne kiseline utvrđen je u uzorcima tretiranim PEF-om jakosti 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min (PEF2_15 i PEF2_30), nego u kontrolnom uzorku (HP).

Tablica 8. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na sastav masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa

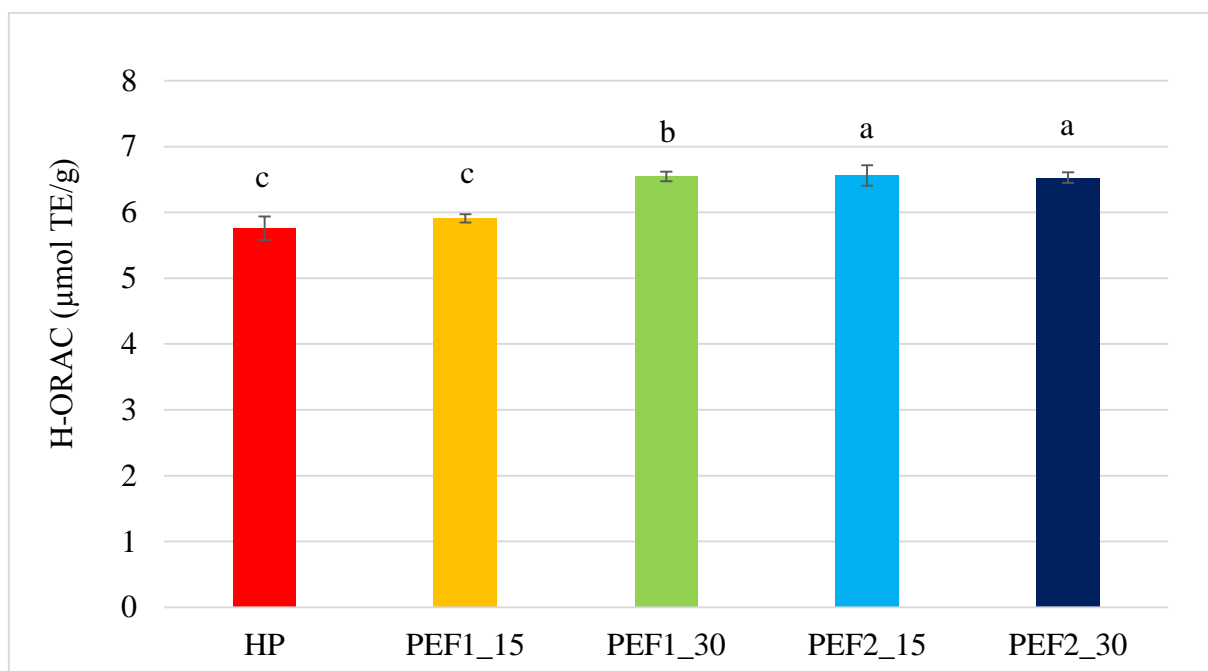
Masne kiseline (%)	UZORCI				
	HP	PEF1_15	PEF1_30	PEF2_15	PEF2_30
C14:0	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a
C16:0	7,25±0,01 ^a	7,10±0,02 ^b	7,08±0,04 ^b	7,09±0,01 ^b	7,09±0,05 ^b
C16:1	0,20±0,00 ^a	0,20±0,01 ^a	0,20±0,00 ^a	0,20±0,01 ^a	0,20±0,01 ^a
C18:0	4,50±0,02 ^b	4,54±0,01 ^{ab}	4,55±0,01 ^a	4,53±0,01 ^{ab}	4,55±0,01 ^a
C18:1	20,30±0,04 ^a	20,43±0,07 ^a	20,39±0,01 ^a	20,34±0,01 ^a	20,31±0,09 ^a
C18:2	67,09±0,02 ^b	67,11±0,05 ^b	67,18±0,01 ^{ab}	67,21±0,02 ^a	67,22±0,01 ^a
C18:3	0,43±0,00 ^a	0,41±0,01 ^a	0,41±0,00 ^a	0,41±0,01 ^a	0,41±0,02 ^a
C20:0	0,16±0,00 ^a	0,16±0,00 ^a	0,16±0,01 ^a	0,16±0,00 ^a	0,16±0,00 ^a
SFA	11,97±0,01 ^a	11,85±0,02 ^b	11,85±0,04 ^b	11,84±0,02 ^b	11,86±0,06 ^b
MUFA	20,51±0,03 ^a	20,62±0,07 ^a	20,59±0,01 ^a	20,55±0,02 ^a	20,52±0,08 ^a
PUFA	67,52±0,02 ^{ab}	67,52±0,06 ^{ab}	67,59±0,01 ^{ab}	67,62±0,02 ^a	67,64±0,02 ^a

ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između uzoraka (Tukey's test, $p < 0,05$). SFA, zasićene masne kiseline; MUFA, mononezasićene masne kiseline; PUFA, polinezasićene masne kiseline.

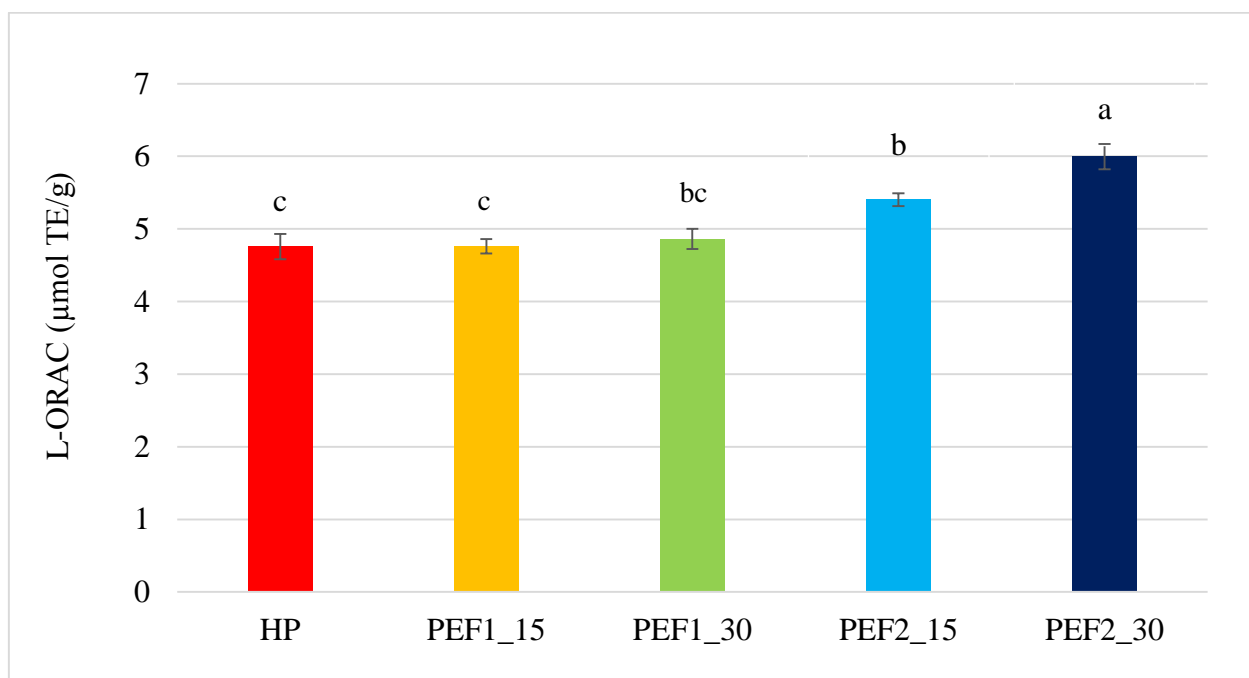
4.5. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) I HLADNOG PREŠANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA SJEMENKI GROŽĐA

Primjena PEF predtretmana prije hladnog prešanja generalno je utjecala na povećanje H-ORAC i L-ORAC vrijednosti ulja (slika 8 i 9). Guderjan i sur. (2007) su uočili porast antioksidacijskog kapaciteta ekstrahiranog ulja kod sjemenki uljane repice tretiranih PEF-om prije ekstrakcije otapalom, a sličan trend u odnosu na kontrolni uzorak uočen je kod sjemenki grožđa tretiranih električnim poljem jakosti 0,8 kV/cm (Saykova i sur., 2022).

Utjecaj PEF predtretmana na antioksidacijski kapacitet ovisio je o jakosti primijenjenog električnog polja, ali i o duljini samog tretiranja (slika 8 i 9). Uzorak tretiran električnim poljem jakosti 12,5 kV/cm tijekom 30 min (PEF1_30) te uzorci tretirani električnim poljem jakosti 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min (PEF2_15 i PEF2_30) su pokazali značajno veće H-ORAC vrijednosti u odnosu na kontrolni HP uzorak (uzorak netretiran PEF-om) ($p < 0,05$). S druge strane, između kontrolnog uzorka te uzorka tretiranog električnim poljem jakosti 12,5 kV/cm tijekom 15 min (PEF1_15) nisu utvrđene značajne razlike ($p < 0,05$). Također, najviše H-ORAC vrijednosti dobivene su u uzorcima tretiranim električnim poljem najviše jakosti (15,6 kV/cm), što je i očekivano s obzirom na činjenicu da su u navedenim uzorcima ekstrahirane i najviše koncentracije ukupnih i pojedinačnih polifenola. Naime, ranija istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju između koncentracije polifenolnih spojeva i H-ORAC vrijednosti ulja (Bie i sur., 2023; Zhao i sur., 2017). Također, suprotno trendu uočenom pri 12,5 kV/cm, pri 15,6 kV/cm produljenje vremena tretiranja s 15 na 30 min nije rezultiralo povećanjem H-ORAC vrijednosti, obzirom da između uzoraka PEF2_15 i PEF2_30 nisu utvrđene značajne razlike ($p < 0,05$).



Slika 8. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na H-ORAC vrijednosti ulja sjemenki grožđa



Slika 9. Utjecaj PEF predtretmana i hladnog prešanja na L-ORAC vrijednosti ulja sjemenki grožđa

Podaci prikazani na slici 9 jasno ukazuju na porast L-ORAC s porastom jakosti električnog polja i vremena tretmana. Tako uzorak PEF1_15, tretiran najblažim uvjetima (najniža jakost električnog polja i kraće vrijeme tretmana), pokazuje gotovo zanemariv porast L-ORAC u odnosu na netretirani, hladno prešani uzorak ($p < 0,05$). S druge strane, u uzorcima tretiranim najvišom jakošću električnog polja (15,6 kV/cm) izmjerene su značajno veće L-ORAC vrijednosti od onih u kontrolnom uzorku (HP). Također, suprotno ranije utvrđenom trendu kod H-ORAC, povećanje duljine tretiranja s 15 na 30 min, utjecalo je značajno na povećanje L-ORAC vrijednosti kod obje jakosti električnog polja. Smatra se kako je upravo koncentracija vitamina E u sjemenkama grožđa najznačajnija lipofilna komponenta odgovorna za njegov antioksidacijski kapacitet (Carmona-Jimenez i sur., 2022). Iako predmet ovog istraživanja nije bio utjecaj PEF predtretmana na promjene u sastavu vitamina E u ekstrahiranom ulju, brojni literaturni navodi ukazuju kako bi upravo povećanje koncentracije ovog vitamina moglo biti odgovorno za povećanje L-ORAC vrijednosti (Mohseni i sur., 2020a; Moradi i Rahimi, 2018; Abenoza i sur., 2013).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih tretiranjem sjemenki komine grožđa pulsirajućim električnim poljem te ekstrakcijom ulja hladnim prešanjem, možemo zaključiti sljedeće:

1. Primjena PEF predtretmana jakosti električnog polja 12,5 kV/cm tijekom 30 min te 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min utjecala je na značajno povećanje iskorištenja ekstrakcije ulja sjemenki grožđa hladnim prešanjem.
2. Značajno povećanje koncentracije ukupnih polifenola utvrđeno je samo kod primjene viših vrijednosti jakosti električnog polja (15,6 kV/cm), posebice pri duljem vremenu tretiranja (30 min).
3. PEF predtretman prije hladnog prešanja utjecao je na povećanje *p*-kumarinske kiseline, *trans*-resveratrola, (-)-epikatehina, procijanidina B1, kvercetina i miricetina te ukupnih neflavonoida i flavonoida u svim uzorcima.
4. Značajno veće koncentracije svih pojedinačnih polifenolnih spojeva utvrđene su kod primjene PEF predtretmana jakosti električnog polja 12,5 kV/cm tijekom 30 min te 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min.
5. PEF predtretman prije hladnog prešanja nije značajnije utjecao na sastav masnih kiselina.
6. Primjene PEF predtretmana jakosti električnog polja 12,5 kV/cm tijekom 30 min te 15,6 kV/cm tijekom 15 i 30 min utjecala je na značajno povećanje antioksidacijskih kapaciteta ulja (H-ORAC i L-ORAC).

6. LITERATURA

- Abenoza M, Benito M, Saldaña G, Alvarez I, Raso J, Sanchez-Gimeno AC (2013) Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. *Food Bioprocess Tech* **6**, 1367–1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>
- Arcena MR, Leong SY, Then S, Hochberg M, Sack M, Mueller G, i sur. (2021) The effect of pulsed electric fields pre-treatment on the volatile and phenolic profiles of Merlot grape musts at different winemaking stages and the sensory characteristics of the finished wines. *Innov Food Sci Emerg* **70**, 102698. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102698>
- Argon ZU, Celenk VU, Gumus ZP (2020) Cold pressed grape (*Vitis vinifera*) seed oil. U: Ramadan MF (ured.) *Cold Pressed Oils*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 39–52.
- Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G (2008) Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem* **108**, 1122–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>
- Bakhshabadi H, Mirzaei H, Ghodsvali A, Jafari SM, Ziaifar AM (2017) The influence of pulsed electric fields and microwave pretreatments on some selected physicochemical properties of oil extracted from black cumin seed. *Food Sci Nutr* **6**, <https://doi.org/10.1002/fsn3.535>
- Bebek-Markovinović A, Putnik P, Stulić V, Batur L, Duralija B, Pavlić B, i sur. (2022) The Application and optimization of HIPEF technology in the processing of juice from strawberries harvested at two stages of ripeness. *Foods* **11**, 1997. <https://doi.org/10.3390/foods11141997>
- Bellili S, Jazi S, ben Nasr S, Dhifi W, Neves MA, Miguel MGC, i sur. (2018) Grape seed oil: Chemical composition, biological properties and health benefits. U: Dieu HNK (ured.) *Seed Oil: Production, Uses and Benefits*, 1. izd., Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 145–174.
- Bie J, Sepodes B, Fernandes PCB, Ribeiro MHL (2023) Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds* **3**, 40–72. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>

- Bitwell C, Indra SS, Luke C, Kakoma MK (2023) A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Sci Afr* **19**, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
- Bjelica M, Vujasinović V, Rabrenović B, Dimić S (2019) Some chemical characteristics and oxidative stability of cold pressed grape seed oils obtained from different winery waste. *Eur J Lipid Sci Tech* **121**, 1800416. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800416>
- Cakaloglu B, Özyurt VH, Ötles S (2018) Cold press in oil extraction. A review. *Ukr Food J* **7**, 640–654. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2018-7-4-9>
- Cardoso-Ugarte GA, Juarez-Becerra GP, Sosa-Morales ME, Lopez-Malo A (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *J Microwave Power EE* **47**, 63–72. <https://doi.org/10.1080/08327823.2013.11689846>
- Carmona-Jimenez Y, Igartuburu JM, Guillen-Sanchez DA, Garcia-Moreno MV (2022) Fatty acid and tocopherol composition of pomace and seed oil from five grape varieties southern Spain. *Molecules* **27**, 6980. <https://doi.org/10.3390/molecules27206980>
- Cecchi L, Innocenti M, Urciuoli S, Arlorio M, Paoli P, Mulinacci N (2019) In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. *Food Chem* **271**, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.140>
- Comuzzo P, Voce S, Grazioli C, Tubaro F, Marconi M, Zanella G, i sur. (2020) Pulsed electric field processing of red grapes (cv. Rondinella): Modifications of phenolic fraction and effects on wine evolution. *Foods* **9**, 414. <https://doi.org/10.3390/foods9040414>
- Ćurko N, Lukić K, Jurinjak-Tušek A, 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>
- Dabetić NM, Todorović VM, Đuričić ID, Antić Stanković JA, Bašić ZN, Vujović DS, i sur. (2020) Grape oil seed characterization: A novel approach for oil quality assessment. *Eur J Lipid Sci Tech* **122**, 1900447. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900447>
- Dimić I, Pavlić B, Rakita S, Kljakić AC, Zeković Z, Teslić N (2022) Isolation of cherry seed oil using conventional techniques and supercritical fluid extraction. *Foods* **12**, 11. <https://doi.org/10.3390/foods12010011>

Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A (2016) Grape seed oil compounds: biological and chemical actions for health. *Nutr Metab Insights* **16**, 59–64. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32910>

Ghazanfari N, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohammadi M (2023) Using pulsed electric field pre-treatment to optimize coriander seeds essential oil extraction and evaluate antimicrobial properties, antioxidant activity, and essential oil compositions. *LWT – Food Sci Technol* **182**, 114852. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114852>

Gitea MA, Bungau SG, Gitea D, Pasca BM, Purza AL, Radu AF (2023) Evaluation of the phytochemistry-therapeutic activity relationship for grape seeds oil. *Life* **13**, 178. <https://doi.org/10.3390/life13010178>

Guderjan M, Elez-Martinez P, Knorr D (2007) Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innov Food Sci Emerg* **8**, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.07.001>

Guderjan M, Töpfl S, Angersbach A, Knorr D (2005) Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *J Food Eng* **67**, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.029>

ISO/R 12966-2:2017 Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids.

ISO/R 12966-4:2015 Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 4: Determination by capillary gas chromatography.

Juhaimi FA, Özcan MM (2017) Effect of cold press and soxhlet extraction systems on fatty acid, tocopherol contents, and phenolic compounds of various grape seed oils. *J Food Process Pres* **42**, e13417. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13417>

Kantala C, Supasin S, Intra P, Rattanadecho P (2022) Evaluation of pulsed electric field and conventional thermal processing for microbial inactivation in thai orange juice. *Foods* **11**, 1102. <https://doi.org/10.3390/foods11081102>

Kokkali M, Marti-Quijal FJ, Taroncher M, Ruiz MJ, Kousoulaki K, Barba FJ (2020) Improved extraction efficiency of antioxidant bioactive compounds from *Tetraselmis chuii* and *Phaeoactylum tricornerutum* using pulsed electric fields. *Molecules* **25**, 3921. <https://doi.org/10.3390/molecules25173921>

Kumar CR, Benal MM, Prasad BD, Krupashankara MS, Kulkarni RS, Siddaligaswamy NH (2018) Microwave assisted extraction of oil from pongamia pinnata seeds. *Mater Today-Proc* **5**, 2960–2964. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.094>

Lavenburg VM, Rosentrater KA, Jung S (2021) Extraction methods of oils and phytochemicals from seeds and their environmental and economic impacts. *Processes* **9**, 1839. <https://doi.org/10.3390/pr9101839>

Leone A, Tamborrino A, Esposito S, Berardi A, Servili M (2022) investigation on the effects of a pulsed electric field (PEF) continuous system implemented in an industrial olive oil plant. *Foods* **11**, 2758. <https://doi.org/10.3390/foods11182758>

Liu Z, Esveld E, Vincken JP, Bruins ME (2018) Pulsed electric field as an alternative pre-treatment for drying to enhance polyphenol extraction from fresh tea leaves. *Food Bioprocess Tech* **12**, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2199-x>

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

Lutterodt H, Slavin M, Whent M, Turner E, Yu LL (2011) Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chem* **128**, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.040>

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>

Masoodi L, Gull A, Masoodi FA, Gani A, Nissar J, Ahad T, i sur. (2022) An overview on traditional vs. green technology of extraction methods for producing high quality walnut oil. *Agronomy* **12**, 2258. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102258>

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

Mohseni NM, Mirzaei HO, Moghimi M (2020a) Optimization of producing oil and meal from canola seeds using microwave-pulsed electric field pretreatment. *OCL – Oilseeds Fats Crops Lipids* **27**, 2. <https://doi.org/10.1051/ocl/2019050>

- Mohseni NM, Mirzaei HO, Moghimi M (2020b) 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 (2018) Effect of simultaneous ultrasound/pulsed electric field pretreatments on the oil extraction from sunflower seeds. *Sep Sci Technol* **53**, 2088–2099. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1443131>
- Nadar SS, Rao P, Rathod VK (2018) Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res Int* **108**, 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Navarro A, Ruiz-Mendez MV, Sanz C, Martinez M, Rego D, Perez AG (2022) Application of pulsed electric fields to pilot and industrial scale virgin olive oil extraction: impact on organoleptic and functional quality. *Foods* **11**, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142022>
- Nikolova K, Perifanova M, Pashev A, Minkova S, Gentscheva G, Antova G, i sur. (2021) Composition and physicochemical properties of seed oil of rarely grown varieties of grapes. *St. Cerc. St. CICBIA* **22**, 427–435.
- Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R (2021) The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J Food Sci Technol* **58**, 397–411. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>
- OIV (2022) World statistics. OIV – International organisation of vine and wine, <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv>. Pristupljeno 5. travnja 2023.
- 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. *JAOAC 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>
- Pravilnik (2019) Pravilnik o jestivim uljima i mastima. Narodne novine 11, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_11_229.html Pristupljeno 18. rujna 2023.

- Puertolas E, Martinez de Marañon I (2015) Olive oil pilot-production assisted by pulsed electric field: Impact on extraction yield, chemical parameters and sensory properties. *Food Chem* **167**, 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.029>
- Rabago-Panduro LM, Morales-de la Peña M, Romero-Fabregat MP, Martin-Belloso O, Welti-Chanes J (2021) Effect of pulsed electric fields (PEF) on extraction yield and stability of oil obtained from dry pecan nuts (*Carya illinoensis* (Wangenh. K. Koch)). *Foods* **10**, 1541. <https://doi.org/10.3390/foods10071541>
- Ramadan MF (2020) Introduction to cold pressed oils: Green technology, bioactive compounds, functionality, and applications. U: Ramadan MF (ured.) Cold Pressed Oils, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 1–5.
- Ranjha MMAN, Kanwal R, Shafique B, Arshad RN, Irfan S, Kieliszek M, i sur. (2021) A critical review on pulsed electric field: A new technology for the extraction of phytoconstituents. *Molecules* **26**, 4893. <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>
- Sabir A, Unver A, Kara Z (2012) The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agr* **92**, 1982–1987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5571>
- Sarkis JR, Boussetta N, Tessaro IC, Marczak LDF, Vorobiev E (2015) Application of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges for oil extraction from sesame seeds. *J Food Eng* **153**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.003>
- Saykova I, Iatcheva I, Stoylov B (2022) Pulsed electric field extraction of valuable compounds from grape seeds. *J Chem Technol Metall* **57**, 1168–1174.
- Sevindik O, Kelebek H, Rombola AD, Selli S (2022) Grape seed oil volatiles and odour activity values: a comparison with Turkish and Italian cultivars and extraction methods. *J Food Sci Technol* **59**, 1968–1981. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05212-3>
- Shinagawa FB, de Santana FC, Araujo E, Purgatto E, Mancini-Filho J (2017) Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *J Food Sci Technol* **38**, 164–171. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.08317>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158.

Walking-Ribeiro M, Rodriguez-Gonzales O, Jayaram S, Griffiths MW (2011) Microbial inactivation and shelf life comparison of „cold“ hurdle processing with pulsed electric fields and microfiltration, and conventional thermal pasteurisation in skim milk. *Int J Food Microbiol* **144**, 379–386. <https://doi.org/0.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.023>

Zhao L, Yagiz Y, Xu C, Fang X, Marshall MR (2017) Identification and characterization of vitamin E isomers, phenolic compounds, fatty acid composition, and antioxidant activity in seed oils from different muscadine grape cultivars. *J Food Biochem* **41**, e12384. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12384>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUCIJA SOBOTINČIĆ 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