

Proizvodnja ulja iz sjemenki grožđa hladnim prešanjem i određivanje udjela resveratrola u pogači

Zećiri, Besar

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:998127>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Besar Zećiri

**Proizvodnja ulja iz sjemenki grožđa hladnim prešanjem i
određivanje udjela resveratrola u pogači**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, ožujak 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij procesnog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Projektiranje uređaja u procesnoj industriji
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022., održanoj 29. lipnja 2022.
Mentor: doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*
Komentor: prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*

Proizvodnja ulja iz sjemenki grožđa hladnim prešanjem i određivanje udjela resveratrola u pogači

Besar Zečiri, 0113138999

Sažetak: Cilj ovog rada bio je proizvesti ulje iz sjemenki grožđa sorte Frankovka i Graševina postupkom hladnog prešanja pomoću laboratorijske preše. Prešanje se izvodi sa različitim promjerima sapnice kroz koju prolazi pogača nakon prešanja. U radu su se provela ispitivanja utjecaja promjera sapnice na količinu dobivenog ulja, te određivanje osnovnih parametara kvalitete dobivenog ulja. Dodatno se određivala oksidacijska stabilnost ulja pomoću Schaal Oven testa na temperaturi 63 °C u trajanju od 4 dana. Za određivanje oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja sjemenki grožđa koristili su se antioksidansi ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt jabuke, ekstrakt kadulje te ekstrakt ružmarina u količini od 0,2 %. Kvantifikacija resveratrola se određivala na pogači pomoću visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) uz prethodnu ekstrakciju klasičnom maceracijom te maceracijom potpomognutom ultrazvukom. Pokazalo se da se najveća količina sirovog ulja dobiva pri promjeru sapnice od 10 mm. Ekstrakt zelenog čaja u usporedbi sa ostalim dodatcima pokazuje najveće antioksidativno djelovanje. Najveću količinu resveratrola sadrži pogača sorte Frankovka koja je dobivena prešanjem s nastavkom promjera 10 mm.

Ključne riječi: sjemenka grožđa, hladno prešano ulje, resveratrol, HPLC, antioksidansi

Rad sadrži: 34 stranica
8 slika
6 tablica
0 priloga
17 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i>	predsjednik
2.	doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i>	član-komentor
4.	prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 8. ožujka, 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Process Equipment Design

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 29, 2022.

Mentor: *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant professor.

Co-Mentor: *Tihomir Moslavac*, PhD, prof.

Production of oil from grape seeds by cold pressing and quantification of resveratrol in the cake

Besar Zečiri, 0113138999

Summary: The aim of this work was to produce oil from grape seeds of the Frankovka and Graševina varieties by cold pressing using a laboratory press. Pressing was performed with different nozzle diameters through which the cakes pass after pressing. In this paper, the influence of the nozzle diameter on the amount of oil obtained was tested, as well as the determination of the basic quality parameters of the obtained oil. In addition, the oxidation stability of the oil was determined using the Schaal Oven test at a temperature of 63 °C for 4 days. Antioxidant green tea extract, apple extract, sage extract, and rosemary extract at concentration of 0.2% were used to determine the oxidation stability of cold-pressed grape seed oil. The quantification of resveratrol was determined on the cake using high-performance liquid chromatography (HPLC) with previous extraction by classic maceration and ultrasound-assisted maceration. It has been shown that the largest amount of crude oil is obtained with a nozzle diameter of 10 mm. Compared to other additives, green tea extract shows the highest antioxidant activity and that the highest amount of resveratrol is contained in the Frankovka variety cake, which is pressed with the nozzle diameter of 10 mm.

Key words: Grape seed, cold-pressed oil, resveratrol, HPLC, antioxidants

Thesis contains: 34 pages
8 figures
6 tables
0 supplements
17 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant professor. | supervisor |
| 3. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, prof. | member |
| 4. <i>Stela Jokić</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: Mart 8, 2023.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
	2.1. Sjemenke grožđa	4
	2.1.1. Kvaliteta i kemijski sastav sjemenki	4
	2.1.2. Ulje sjemenki grožđa	4
	2.2. Proizvodnja ulja iz sjemenki grožđa	5
	2.2.1. Hladno prešanje	5
	2.2.2. Odvajanje netopljivih nečistoća	6
	2.3. Resveratrol	6
	2.4. Ekstrakcija	7
	2.4.1. Klasična maceracija	7
	2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)	7
	2.5. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC)	8
	2.5.1. HPLC uređaj	8
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	10
	3.1. Zadatak	11
	3.2. Materijali i metode	11
	3.2.1. Materijali	11
	3.2.2. Kemikalije i reagensi	12
	3.2.3. Uređaji	12
	3.2.4. Hladno prešanje	12
	3.2.5. Određivanje udjela ulja u sjemenkama i pogači	16
	3.2.6. Određivanje udjela vode u sjemenkama i pogači	16
	3.2.7. Određivanje slobodnih masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa	16
	3.2.8. Određivanje peroksidnog broja u ulju sjemenki grožđa	17
	3.2.9. Određivanje vlage u ulju sjemenki grožđa	18
	3.2.10. Određivanje netopljivih nečistoća u ulju sjemenki grožđa	19
	3.2.11. Schaal Oven test	19
	3.2.12. Priprema uzorka za ekstrakciju	20
	3.2.13. Klasična maceracija	21
	3.2.14. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)	21
	3.2.15. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC)	22
4.	REZULTATI	24
5.	RASPRAVA	27
6.	ZAKLJUČCI	30
7.	LITERATURA	32

1. UVOD

Količina grožđa koja proizvedena na svjetskoj razini iznosi oko 60 miliona tona od kojih se većina konzumira u svježem obliku ili prerađuje u vino, sok od grožđa ili druge proizvode. Nakon prerade grožđa u vino zastaje velika količina komine koja se pretežito koristi kao gnojivo ili se baca. Komina sadrži od 20 do 26 % sjemenki koje u sebi sadrže određenu količinu ulja koja se može ekstrahirati. Sjemenke grožđa su bogate proteinima, vlaknima, ugljikohidratima, mastima te polifenolima (Argon i sur., 2020).

Zbog sve veće potrebe za očuvanjem okoliša te maksimalnog iskorištenja hrane, ljudska populacija je u potrazi za postupcima prerade otpada koji nastaju nakon procesiranja hrane. Kao jedan od postupaka kod kojih se otpad koristi kao sirovina je hladno prešanje sjemenki grožđa pri čemu se dobiva ulje visoke nutritivne vrijednosti te pogača koja se dodatno može samljeti i koristiti kao brašno.

Ovisno o sorti grožđa, klimatskim uvjetima i karakteristikama zemlje, sjemenke grožđa mogu sadržavati od 7 do 20 % ulja. Ulje sjemenki grožđa bogato je tokoferolima, fenolima, polifenolima, fitosterolima te resveratrolom koji konzumacijom imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Ulje sjemenki grožđa se osim za prehranu može koristiti i u drugim industrijama poput kozmetičke i aviondustije.

Cilj ovog diplomskog rada je opisati postupak proizvodnje ulja iz sjemenki grožđa hladnim prešanjem, analizirati utjecaj različitih promjera sapnica na količinu isprešanog ulja, ispitati osnovne parametre kvalitete, odrediti oksidacijsku stabilnost ulja, te pomoću visokotlačne djelotvorne tekućinske kromatografije odrediti količinu resveratrola zaostalu u pogači.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sjemenke grožđa

Grožđe kao plodovi biljke *Vitis vinifera* se u ljudskoj prehrani koriste u svježem, osušenom ili prerađenom obliku. Grozd se sastoji od peteljkovine i bobice, dok se bobica sastoji od kožice, sjemenke i mesa. Kožica se sastoji od različitih kiselina, polifenola, minerala i aromatičnih tvari. Kožica je zaslužna za aromu, boju i okus samog vina. Najveći udio sjemenki čine voda (25-50 %) i ugljikohidrati (30-35%), te manjim dijelom ulje (7-20%). Meso bobice se sastoji od 2/3 vode dok preostalo meso čine kiseline, mineralne tvari, celuloza te šećeri na koje otpada do 1/3 samog mesa.

Najpoznatiji i najzastupljeniji prerađeni oblik grožđa je vino koje je dobiveno alkoholnom fermentacijom (Andabaka, 2017).

Godišnje se na svjetskoj razini proizvede preko 60 milijuna tona grožđa od kojih 10 – 15% zaostaje kao komina. U komini se nalazi oko 20% sjemenki koje su bogate uljem. Ulje sjemenki grožđa sadrži razne komponente poput polifenola koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Matthaus, 2008). Korištenjem komine dobivene nakon proizvodnje vina za proizvodnju ulja, se smanjuje količina otpada dobivena iz vinske industrije pri čemu se smanjuje i utjecaj na okoliš (Bail i sur., 2008).

2.1.1. Kvaliteta i kemijski sastav sjemenki

Prije proizvodnja ulja, sjemenke je potrebno osušiti. Osušene sjemenke sadrže do 20% ulja, 35% vlakana, 11% proteina, 3% minerala, 7% vode te 24% različitih komponenata koje se pomoću otapala mogu ekstrahirati iz sjemenke. Najčešće korišteno otapalo je hexan (Matthaus, 2008). Ulje dobiveno iz sjemenki grožđa pronalazi primjenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i najvećim dijelom u prehrambenoj industriji (Bail i sur., 2008).

Matthaus (2008) u svom radu navodi da ulje sjemenki grožđa sadrži različite komponente poput tokoferola, fenola, polifenola, fitosterola, resveratrola koji konzumacijom imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje.

2.1.2. Ulje sjemenki grožđa

Ulje koje je dobiveno ekstrakcijom pomoću otapala ima neutralan miris i okus, dok ulje dobiveno hladnim prešanjem prati aroma vina i voća. Pri proizvodnji ulja vrlo je bitno sjemenke sušiti nekoliko sati nakon proizvodnje vina ili soka zbog toga što unutar određenog

vremena može doći do mikrobiološke degradacije sjemenke što dovodi do neugodnog mirisa koje prelazi na ulje (Matthaus, 2008).

Bail i sur. (2008) u svom radu navode da se čak do 90% ulja sastoji od polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina dok ostalih 10% čine zasićene masne kiseline. Kod nezasićenih masnih kiselina prevladava linolna (58-78%) i oleinska kiselina (3-15%). Zbog nemogućnosti metabolizma da sintetizira polinezasićene masne kiseline, ulje sjemenki grožđa je vrlo poželjno za konzumaciju zbog visoke količine linolne kiseline u ulju (Akkurt i sur., 2001). Ulje također sadrži i različite tvari koje imaju antioksidativno djelovanje kao što su fitosteroli, tokoferoli, tokotrienoli, fenolne kiseline i karotenoidi. Zbog visoke temperature dimljenja (190-230 °C) je vrlo pogodno za korištenje pri pripremi jela na visokim temperaturama (Bail i sur., 2008).

2.2. Proizvodnja ulja iz sjemenki grožđa

Ulje sjemenki grožđa se može dobiti različitim postupcima ekstrakcije kao što su mehaničko prešanje, ekstrakcija pomoću superkritičnog CO₂ te ekstrakcija ulja organskim otapalima.

2.2.1. Hladno prešanje

Zbog vrlo male količine koje sadrži sjemenka grožđa, ulje bi najekonomičnije bilo ekstrahirati organskim otapalima. Međutim, prilikom ekstrakcije ulja organskim otapalima dolazi do gubitaka arome i okusa samog ulja te se stoga pribjegava korištenju mehaničkih metoda dobivanja ulja. Ulja koja su dobivana mehaničkim putem odnosno prešanjem pomoću hidrauličkih ili pužnih preša, imaju bolja senzorska i nutritivna svojstva te zbog toga su sve više traženija. Za razliku od ulja dobivenog ekstrakcijom organskim otapalima, u hladno prešanom ulju zaostaju i bioaktivne komponente koje imaju određena pozitivna svojstva na ljudsko zdravlje (Bijelica i sur., 2019).

Prešanje je mehanički postupak kod kojeg se tekuća faza odvaja od čvrste te ovisno o temperaturi koja se koristi kod prešanja, definiramo da li je prešanje hladno ili toplo (Cakaloglu i sur., 2018).

Uređaj za hladno prešanje se sastoji od jednog ulaza gdje ulazi sirovina te dva izlaza kod kojeg na jednom izlazi ulje dok na drugom izlazu pogača. Količina ulja ovisi o pripremi

same sirovine (vrsta sirovine, uklanjanje nečistoća, sušenje) te kontroliranju određenih procesnih parametara prilikom hladnog prešanja. Parametri koji najviše utječu na količinu ulja su temperatura, brzina doziranja, promjer sapnice te brzina okretanja pužnice ako se radi o pužnoj preši (Cakaloglu i sur., 2018).

Cakaloglu i sur. (2018) navode da su ulja dobivena procesom hladnog prešanja, zbog svoje visoke kvalitete, spremna za konzumaciju odmah po završetku prešanja.

2.2.2. Odvajanje netopljivih nečistoća

Prilikom prešanja različite nečistoće mogu iz sjemenke prijeći u samo ulje koje zatim negativno utječe na kvalitetu samog ulja. Nečistoće mogu biti u krutom ili tekućem obliku te se zatim uklanjaju određenim postupcima kao što su taloženje, centrifugiranje i filtracija.

Kako bi se odvojile čestice iz tekućine na temelji razlike u gustoći, koristi se metoda taloženja. Taloženje se temelji na sili gravitacije ili centrifugalnoj sili. Taloženje temeljeno na sili gravitacije je dosta sporo te se zbog toga često pribjegava metodi centrifugiranja (Kušević, 2022).

2.3. Resveratrol

Resveratrol je polifenol koji pripada skupini stilbena. Sastavljen je od dva fenolna prstena međusobno povezanih etilenskim mostom te ga se može pronaći u dva izomerska oblika cis- i trans-resveratrol. Trans- oblik resveratrola je stabilniji te posjeduje visoka bioaktivna svojstva. Resveratrol se sintetizira kao odgovor biljke na ozljede ili infekcije te ga se zbog toga može pronaći u različitim biljka međutim u najvećoj količini se pronalazi u grožđu (Salehi i sur. 2018). Najveći udio resveratrola u samom grožđu se nalazi u kožici grožđa (oko 100 µg/g), dok u ostalim dijelovima grožđa se pronalazi u manjim količinama (Risuelo, 2016). Za industrijske se potrebe resveratrol dobiva kemijskom ili biokemijskom sintezom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Salehi i sur., 2018).

Salehi i sur. (2018) navode da resveratrol posjeduje različita biološka svojstva te je zbog toga predmet različitih studija. Neke biološke aktivnosti koje pokazuje resveratrol su antioksidativno djelovanje, protuupalno djelovanje, antikancerogeno djelovanje te kardio i neuroprotektivno djelovanje. Zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, resveratrol se na tržištu može pronaći u obliku dodataka prehrani (Salehi i sur., 2018).

2.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija koja se temelji na odvajanju komponenata iz ishodišnog materijala na osnovu topljivosti pojedinih komponenata u različitim otapalima. Do izdvajanja komponenata iz ishodišnog materijala dolazi zbog otapanja komponenata u otapalu, odnosno veća topljivost u otapalu nego u ishodišnom materijalu. S obzirom na agregatno stanje dviju faza, ekstrakciju dijelimo na ekstrakciju čvrsto-tekuće, tekuće-tekuće i plinovito tekuće (Čogelja, 2022).

Postoji niz tehnika ekstrakcija čiji izbor ovisi o ciljanoj komponenti koja se želi izolirati, te se dijele na konvencionalne i suvremene tehnike ekstrakcije (Čogelja, 2022). U ovom radu su korištene klasična maceracija koja spada u metodu konvencionalnih tehnika i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) koja spada u suvremene tehnike.

2.4.1. Klasična maceracija

S obzirom na agregatno stanje dviju faza, maceracija spada u postupke čvrsto-tekuće ekstrakcije. Klasična maceracija se primjenjuje za biljne materijale koji sadrže termolabilne komponente. Maceracija je postupak kod kojeg se usitnjeni biljni materijal prelije otapalom u određenom omjeru, te se nakon toga u dobro zatvorenoj posudi i zaštićen od sunčeve svjetlosti macerira nekoliko dana do nekoliko tjedana uz mućkanje i miješanje. Kako bi postigli maksimalni ekstrakcijski kapacitet važno je osigurati optimalne uvjete ekstrakcije (Čogelja, 2022).

2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ultrazvučni valovi frekvencije iznad 20 kHz stvaraju mehaničke vibracije u krutom ili tekućem mediju. Djelovanjem tih valova dolazi do promjene tlaka te nastanka kavitacije. Kao posljedica kavitacije, dolazi do bubrenja stanice te probijanja staničnih stijenki što dovodi do povećanja difuzije sastojak. Kako bi se postigla optimalna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, osim o otapalu, temperaturi i tlaku, potrebno je voditi računa i o frekvenciji, vremenu tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova (Čogelja, 2022).

Ultrazvuk se dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta čiji je frekvencijski raspon iznad 2MHz i ultrazvuk visokog intenziteta čiji je raspon frekvencija od 20 do 100 kHz. Ultrazvukom niskog intenziteta ne dolazi do fizikalnih i kemijskih svojstva materijala te se stoga koristi u analitičke

svrhe, dok kod ultrazvuka visokog intenziteta dolazi do fizikalnih i kemijskih promjena (Čogelja, 2022).

2.5. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC)

Kromatografija je fizikalna metoda separacije koja se bazira na raspodjeli sastojaka između mobilne i stacionarne faze. Raspodjela sastojaka odvija se na način da se određeni sastojci selektivno zadržavaju na stacionarnoj fazi, dok ostatak eluira mobilnom fazom. Stacionarna faza može biti čvrsta, tekuća ili gel dok je mobilna faza fluid koji prolazi kroz ili uzduž stacionarne faze (Vinko, 2012).

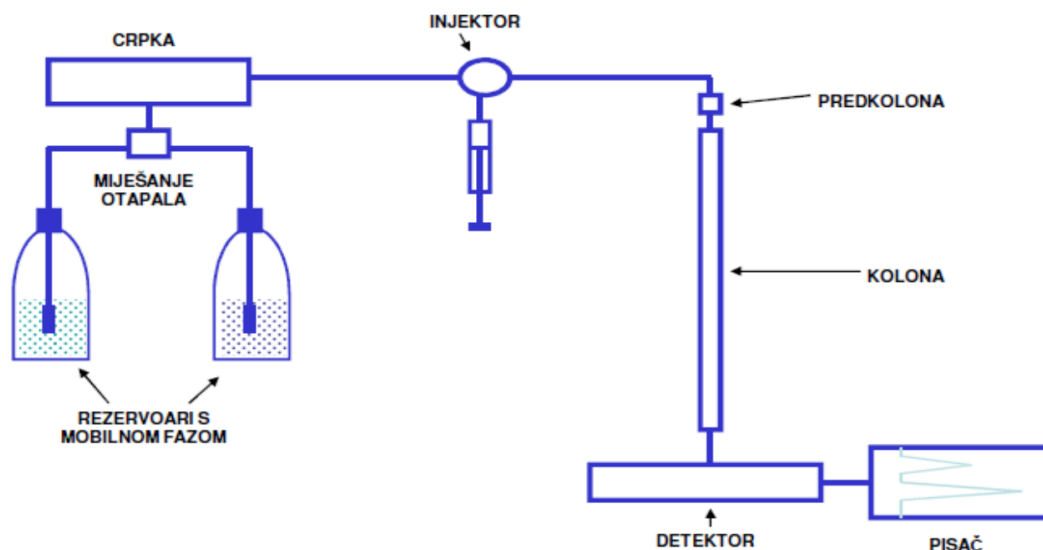
Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) je tehnika kromatografije kod koje mobilna faza pod određenim tlakom prolazi kroz kromatografsku kolonu pri čemu dolazi do bržeg razdvajanja sastojaka i veće učinkovitosti nego kod konvencionalne kromatografije. Visokotlačnu tekućinsku kromatografiju odlikuju visoka osjetljivost, prilagodljivost na uvjete kvantitativnog određivanja te podobnost za primjenu pri odvajanju termolabilnih i nehlapivih spojeva (Vinko, 2012).

Pomoću kromatografskih metoda možemo odjeljivati, identificirati i kvantitativno određivati kemijske sastojke u složenim smjesama (Vinko, 2012).

2.5.1. HPLC uređaj

HPLC uređaj se sastoji od:

- spremnika mobilne faze,
- crpke,
- injektora,
- pretkolone,
- kolone,
- detektora,
- pisača.



Slika 1. Shematski prikaz HPLC uređaja (Vinko, 2012)

Iz jednog ili više spremnika mobilne faze koji su inertne konstrukcije, crpka pod visokim tlakom upumpava mobilnu fazu u pretkolonu te zatim u kolonu. Crpka mora osiguravati visok tlak te dobar protok. Između crpke i pretkolone se injektira uzorak koji mora biti pravilno injektiran kako bi se dobio što veći stupanj razdjeljivanja čestica. Prolaskom kroz pretkolonu se uklanjaju čestice i kontaminanti koje bi se vezale na stacionarnu fazu te tako utjecale na sam postupak kromatografije. Nakon prolaska kroz pretkolonu, mobilna faza sa uzorkom ulazi u kolonu koja je izrađena od nehrđajućeg čelika na čijim se krajevima nalaze filteri. Kolone su punjene punilima koja su otporna na visoke tlakove i temperature, stabilna u organskim otapalima i širokom pH području. Kao najčešće punilo za kolone koristi se silikagel. Stacionarna faza je vezana za punilo. Nakon prolaska kroz kolonu, mobilna faza u kojoj se nalaze odijeljeni sastojci prolazi kroz detektor (Vinko, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je proizvesti ulje iz sjemenki grožđa sorte Frankovka i Graševina metodom hladnog prešanja. Ispitivan je utjecaj različitih promjera sapnice za izlaz pogače na iskorištenje ulja. Dodatno se ispitivala kvaliteta dobivenog ulja te određivanje oksidacijske stabilnosti ulja s dodatkom antioksidansa pomoću Schaal Oven testa. Također, zadatak ovog rada bio je identificirati i kvantificirati resveratrol u pogači koja je dobivena hladnim prešanjem primjenom metode visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC).

Analize parametara kvalitete dobivenog hladnog prešanog ulja uključivale su: peroksidni broj, udio vlage, udio slobodnih masnih kiselina, netopljive nečistoće dok su se na sjemenkama određivali udio vode i udio ulja. Ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja Schaal Oven testom uključivalo je dodavanje antioksidansa ekstrakta ružmarina (oxy less clear) (0,2 %), ekstrakta kadulje (0,2 %), ekstrakta jabuke (0,2 %), ekstrakta zelenog čaja (0,2 %) te pratila promjena peroksidnog broja ulja tijekom određenog vremena trajanja testa.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Materijali

Kao sirovina za proizvodnju hladno prešanog ulja sjemenke grožđa koristile su se sjemenke sorte Frankovka i Graševina koje su prethodno očišćene i osušene. Očišćene i osušene sjemenke su prethodno bile skladište na period od godinu dana.

Antioksidansi

Ekstrakt ružmarina tip OxyLess Clear

OxyLess Clear je ekstrakt dobiven od listova ružmarina (*Romarinus officinalis* L.) proizveden u Francuskoj, tvrtka Naturex. Upotrijebljen u udjelu 0,2 % računato na masu ulja.

Ekstrakt kadulje

Proizveden u Francuskoj (tvrtka Naturex), upotrijebljen u udjelu 0,2 % računato na masu ulja.

Ekstrakt tropa jabuke

Ekstrakt tropa jabuke dobiven je maceracijom tropa jabuke u tamnom prostoru pri 25 °C tijekom 24 h

Ekstrakt zelenog čaja

Ekstrakt zelenog čaja proizvela je tvrtka Podravka, upotrijebljen je u udjelu 0,2 % na računatu masu ulja.

3.2.2. Kemikalije i reagensi

Tijekom eksperimentalnog dijela ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije : petroleter, ledena octena kiselina, kloroform, kalijev jodid, natrijev tiosulfat, otopina škroba, vodena otopina kalij hidroksida, smjesa etiletera i etanola, fenolftalein.

3.2.3. Uređaji

- laboratorijska pužna preša (KOMET, screw oil expeller Ca 59 G, Njemačka),
- mlin (Retsch GM200, Njemačka),
- mlin (Albrigi Luigi S.R.L, molino trita piante, Italija),
- sušionik (Advantage-lab , AL 01-04, Njemačka),
- uređaj za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (Agilent, 1260 Infinity II, SAD),
- ultrazvučna kupelj (ELMA, Elmasonic P 120 H, Njemačka).

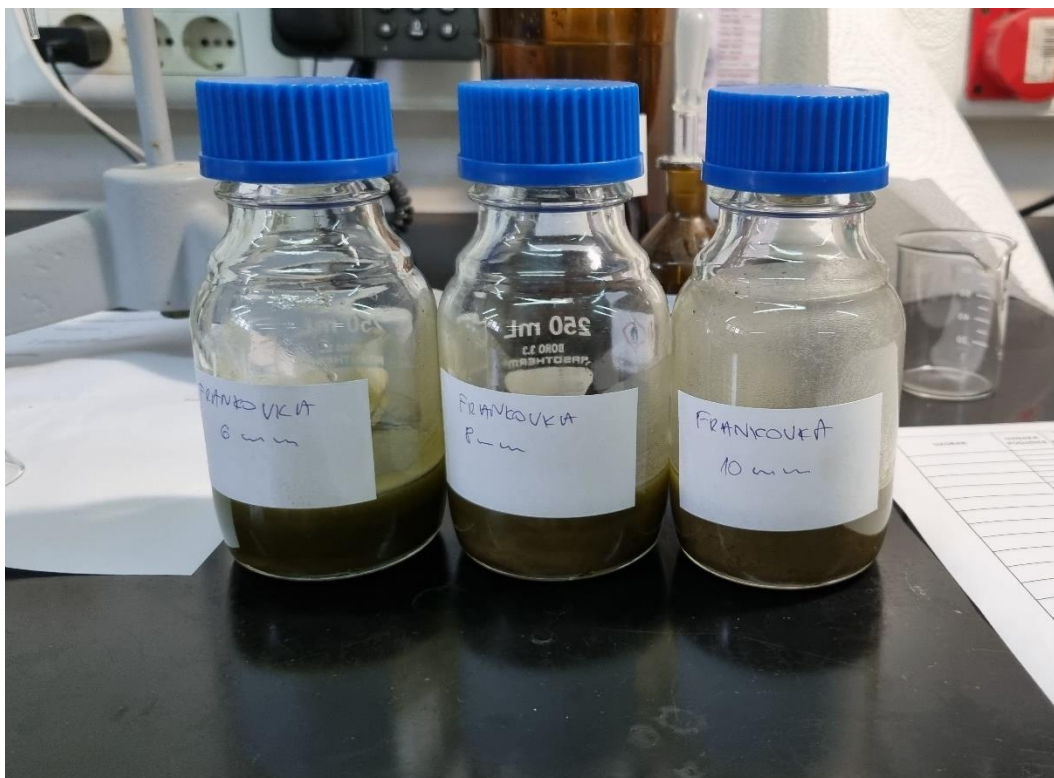
3.2.4. Hladno prešanje

Slika 2 prikazuje laboratorijsku kontinuiranu pužnu prešu na kojoj se provodio postupak hladnog prešanja sjemenki grožđa. Preša se sastoji od dozirnog lijevka, koša za prešanje, pužnice, nastavaka za regulaciju debljine pogače, grijača glave preše (sa mogućnošću regulacije temperature) te elektromotora (sa mogućnošću regulacije broja okretaja). Dodavanje sjemenki u lijevak se na početku prešanja provodilo postupno kako ne bi došlo do začepjenja. Kod prešanja su se koristili različite dimenzije nastavaka za regulaciju debljine pogače (6, 8 i 10 mm). Nakon prešanja se sirovo ulje pakiralo u boce te ostavilo na tamnom i hladnom mjestu kako bi se nečistoće istaložile tijekom sedam dana.

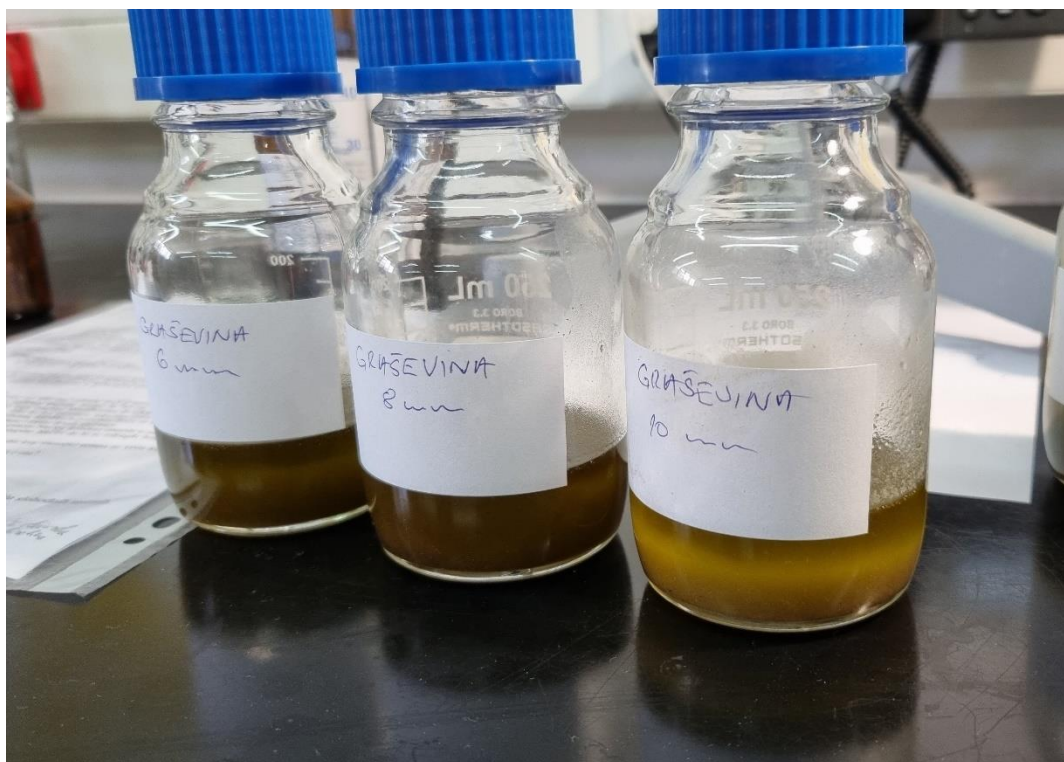


Slika 2. Laboratorijska kontinuirana pužna preša (Kušević, 2022)

Slika 3. prikazuje sirovo prešano ulje sorte Frankovka dok **Slika 4.** prikazuje sirovo prešano ulje sorte Graševine dobiveno sa različitim promjerima nastavaka za regulaciju debljine pogače.



Slika 3. Sirovo prešano ulje sjemenki grožđa sorte Frankovka (Izvor: autor)



Slika 4. Sirovo prešano ulje sjemenki grožđa sorte Graševina (Izvor: autor)

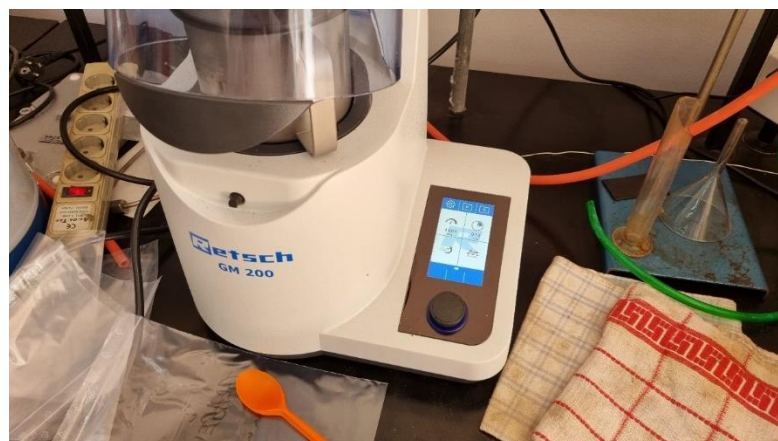
Mljevenje pogače

Za potrebe određivanja udjela vlage i udjela ulja zaostalog u pogači se prethodno koristio mlin čekičar prikazan na **Slici 5** za mljevenje pogače dobivene tijekom hladnog prešanja. Mlin nije imao mogućnost regulacije okretaja.



Slika 5. Mlin (Albrig Luigi S.R.L, molino trita piante) (Izvor: autor)

Za mljevenje pogače (nusproizvoda prešanja hladno prešanog ulja potrebne za identifikaciju i kvantifikaciju resveratrola iz pogače koristio se mlin prikazan na **Slici 6**. Postupak mljevenja se odvijao na 4000 okretaja u minuti u periodu od 30 sekundi.



Slika 6. Mlin (Retsch GM 200) (Izvor: autor)

3.2.5. Određivanje udjela ulja u sjemenkama i pogači

Kako bi se odredio udio ulja u sjemenkama i pogači dobivene nakon hladnog prešanja sjemenki grožđa, koristila se metoda ekstrakcije ulja po Soxhletu. Aparatura za ekstrakciju ulja po Soxhletu sastoji se od hladila, ekstraktora i tikvice. Na osušenu i izvaganu tikvicu se stavlja ekstraktor sa tuljkom u kojem se nalazi uzorak. Dodano je otapalo, pričvršćeno hladilo te se ekstrakcija provodila do iscrpljenja uzorka. Otapalo koje se koristilo za ekstrakciju ulja je petrol-eter. Otapalo se na kraju postupka predestilira, dok zaostalo ulje u tikvici se suši i važe.

$$\text{Udio ulja \%} = (a - b) \times \frac{100}{c}$$

a-masa tikvice sa uljem (g),

b-masa prazne tikvice (g),

c- masa uzorka koji se ispituje (g).

3.2.6. Određivanje udjela vode u sjemenkama i pogači

Kako bi se odredila količina vode u sjemenu i pogači (nusproizvoda prešanja) koristila se standardna metoda ISO 665:1991 gdje se određivanje provodi u sušioniku pri 103 °C u trajanju od 2 sata pri čemu dolazi do isparavanja vode i hlapljivih tvari. Zbog veličine i tvrdoće sjemenki grožđa, prethodno je bilo potrebno samljeti sjemenke u mlinu na veličinu do 2 mm. Sušenje se provodni do konstantne mase, odnosno dok razlika između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0.005 g. Aparatura korištena za određivanje vode u sjemenkama i pogači je aluminijska posudica sa poklopcem, električni sušionik, eksikator i analitička vaga.

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

m_0 -masa prazne posudice (g),

m_1 -masa posudice s uzorkom prije sušenja (g),

m_2 -masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.2.7. Određivanje slobodnih masnih kiselina u ulju sjemenki grožđa

Pored vezanih masnih kiselina, masti i ulja sadrže i dio slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline su važan parametar kvalitete masti i ulja tj. povećani udio slobodnih masnih kiselina u ulju i mastima govori o nepravilnom skladištenju. Udio slobodnih masnih

kiselina u mastima i ulju se može izraziti kao: kiselinski broj, kiselinski stupanj ili postotak oleinske kiseline.

5 g ulja je odvagano u Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL. Uzorak u tikvici je preliven sa 50 mL neutralne smjese etera i etanola. Nakon dodavanja otopine etera i etanola, smjesa se promućkala te se u nju dodalo nekoliko kapi fenolftaleina te titrirano sa 0,1 M otopinom NaOH do promjene boje. Kako bi se izbjeglo stvaranje sapuna, prilikom titriranja sa 0,1 M vodenom otopinom NaOH, potrebno je da količina etanola u smjesi sa eterom bude 1/5 veća od količine upotrijebljene otopine NaOH.

Kiselinski stupanj (KS) označava mg NaOH (KOH) potrebne za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u 1 g masti ili ulja, dok % SMK označava maseni udio slobodnih masnih kiselina izražen kao % oleinske kiseline.

$$KS = \frac{b \times 100}{a \times 10} = \frac{10 * b}{a}$$

$$\% SMK = \frac{10 \times b}{a} 0,282 (\% \text{ oleinska kiselina})$$

a- masa uzorka (g),

b- mL 0,1 M NaOH (KOH).

3.2.8. Određivanje peroksidnog broja u ulju sjemenki grožđa

Peroksidni broj predstavlja indikator svježine odnosno užglosti neke masti ili ulja. Čuvanjem ulja pod utjecajem prooksidanasa kao što su kisik iz zraka, svjetlost, toplina i dr., dolazi do vezanja kisika na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina te nastaju peroksidi, odnosno hidroperoksidi. Peroksidni broj se definira kao mL 0,002 M otopine natrijevog tiosulfata potrebnog za redukciju one količine joda koju oslobodi 1g ulja iz kalij jodida (KI).

U Erlenmayerovu tikvicu volumena 100 mL odvagano je oko 1 g ulja te je zatim dodano 10 mL smjese ledene octene kiseline i kloroforma (u omjeru 3:2) te se zatim promiješa. Nakon toga se dodalo 0,2 mL otopine KI iz birete, zatim se ručno promiješalo točno 1 minutu. Nakon miješanja se prvo dodalo 20 mL destilirane vode koja je prethodno prokuhana i ohlađena te zatim se dodalo još 0,5 mL otopine škroba. Nakon dodavanja otopine škroba otopina se odmah titrirala sa 0,01 M otopinom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Slijepa proba je obavljena na identičan način, ali bez dodatka ulja.

Reagensi korišteni prilikom provođenja postupka su:

- smjesa ledene octene kiseline i kloroforma (u omjeru 3:2),
- hladno zasićena otopina KI, svježe pripravljena – 14 g KI otopljeno u 10 mL svježe prokuhane i ohlađene vode,
- 0,01 M otopina natrij tiosulfata,
- 1 %-tna otopina škroba.

$$Pbr = \frac{(a - b) * 5}{c}$$

a= mL 0,01 M Na₂S₂O₃ utrošeno za uzorak ulja,

b= mL 0,01 M Na₂S₂O₃ utrošeno za slijepu probu,

c= masa uzorka (g).

3.2.9. Određivanje vlage u ulju sjemenki grožđa

Vlaga i isparljive komponente koje se nalaze u ulju su vrlo važan pokazatelj kakvoće samog ulja. Zbog prisustva vlage u ulju može doći do različitih kemijskih reakcija koje za rezultat imaju degradaciju kvalitete ulja, odnosno dolazi do reakcije pri kojima se povećava udio slobodnih masnih kiselina. Kod većih količina vlage u ulju dolazi do zamućenja ulja pri čemu se smanjuje estetska vrijednost ulja.

Metoda kojom se određuje vlaga i isparljive komponente u ulju temelji se na isparavanju vode i hlapljivih tvari iz ulja zagrijavanjem u sušioniku pri točno definiranim uvjetima. Dolazi do gubitka mase (izražen u %), pri zagrijavanju na 103±2 °C do konstantne mase. Gubitak mase utvrđuje se mjerenjem. Aparatura i pribor korišteni prilikom postupka su staklena posudica sa poklopcem, električni sušionik, eksikator, analitička vaga.

$$\% \text{ vlage} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100$$

m₀ - masa prazne posudice (g),

m₁ - masa posudice s uzorkom prije sušenja (g),

m₂ - masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.2.10. Određivanje netopljivih nečistoća u ulju sjemenki grožđa

Sadržaj netopljivih nečistoća određuje se prema ISO 663:1992. Netopljive nečistoće u ulju predstavljaju uglavnom mehaničke nečistoće koje mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci (dijelovi biljke uljarice). Također, mogu se naći u uljima i mastima razni ugljikohidrati, tvari s dušikom, smole, Ca-sapuni, oksidirane masne kiseline, laktoni masnih kiselina, hidroksi masne kiseline i njihovi gliceridi. Za ove spojeve karakteristično je da se ne otapaju u organskim otapalima, kao što se otapaju trigliceridi (ulja i masti).

Netopljive nečistoće su karakteristične za sirova biljna ulja i njihova količina je limitirana odgovarajućim standardima za određenu vrstu ulja. Udio netopljivih nečistoća u ulju dobre kvalitete je često niži od 0,05 %. Količina netopljivih nečistoća, kao uvjet kvalitete ulja, limitirana je kod jestivih rafiniranih, djevičanskih i hladno prešanih ulja određenim Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019).

Postupak rada uključuje stakleni lijevak sa sinteriranim dnom za filtriranje kojeg je potrebno osušiti u sušioniku na 103 °C u 30 minuta, ohladiti u eksikatoru i izvagati. U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL sa brušenim grlom i čepom dodano je 20 g sirovog ulja i 100 mL otapala (petrol-eter). Začepljeno je i dobro promućkano te ostavljeno da stoji na 20 °C, u trajanju 20 do 30 minuta. Nadalje, sastavljena je aparatura za vakuum filtraciju i filtriran je sadržaj Erlenmeyerove tikvice, uz ispiranje više puta s manjom količinom otapala, tako da ukupan utrošak otapala iznosi 200 mL. Isto tako, stakleni je filter-ljevak neko vrijeme ostavljen na zraku (da ishlapi otapalo), zatim osušen u sušioniku na 103 °C tijekom jednog sata, ohlađen u eksikatoru te izvagan i ponovo sušen 30 minuta. Postupak je ponavljan do konstantne mase.

$$\% \text{ netopljive nečistoće} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} * 100$$

m_0 -masa uzorka (g),

m_1 -masa osušenog filter-ljevka (g),

m_2 -masa filter-ljevka s nečistoćama nakon sušenja (g).

3.2.11. Schaal Oven test

Kako bi odredili oksidacijsku stabilnost ulja korišten je Schaal Oven test. Poznavanje oksidacijske stabilnosti ulja bitno je zbog poznavanja vremena skladištenja ulja prije

intenzivnijeg oksidacijskog kvarenja ulja koje će u većoj mjeri dovesti do promijene kvalitete samog ulja.

Priprema uzorka uključuje vaganje određene količine antioksidansa u čašicu te se u čašice dodaje određena količina ulja. Čašice se zatim zagrijavaju na 70 °C i uz miješanje se održava ta temperatura 30 min. Temperatura ne smije prekoračiti 80 °C. Nakon perioda od 30 min se tako pripremljeni uzorci stavljaju u sušionik na temperaturi od 63 °C. Uzorci se uzorkuju svaka 24 sata te se određuje peroksidni broj. Vrijeme provođenja testa je 4 dana.

Antioksidanski korišteni prilikom testa su :

- ekstrakt ružmarina tip Oxy'less clear – 0,2 %,
- ekstrakt zelenog čaja – 0,2 %,
- ekstrakt jabuke – 0,2 %,
- ekstrakt kadulje – 0.2 %.

3.2.12. Priprema uzorka za ekstrakciju

Prije provođenja klasične maceracije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE), pogače zaostale nakon hladnog prešanja su bile podvrgnute usitnjavanju u laboratorijskom mlinu Retsch GM 200 pri 4000 okr/min u vremenu trajanja od 30 sekundi. U mlin je stavljen uzorak koji se nakon usitnjavanja prebacio u kivetu. Odvaga uzorka iznosila je približno 5 grama. Tako usitnjeni uzorci koji su prebačeni u kivete su preliveni sa 25 mL 50 %-tnog EtOH (omjer 1:5).

Tablica 1. Odvaga uzoraka pogače za potrebe ekstrakcije

Uzorak	Uzorci 1 grupe Klasična maceracija		Uzorci 2 grupe (Ekstrakcija potpomognuta UAE)	
	Masa uzorka (g)	Količina otapala EtOH (mL)	Masa uzorka (g)	Količina otapala EtOH (mL)
6 mm Graševina	5,00	25	5,01	25
8 mm Graševina	5,03	25	4,98	25
10 mm Graševina	5,03	25	5,02	25
6 mm Frankovka	4,99	25	5,00	25
8 mm Frankovka	5,00	25	4,99	25
10 mm Frankovka	4,99	25	5,00	25

3.2.13. Klasična maceracija

Nakon što su kivete sa uzorkom pogače prelivene otapalom (EtOH u omjeru 1:5), prvih 6 uzoraka se podvrgavaju klasičnoj maceraciji. Odnosno, kivete se ostavljaju tjedan dana na tamnom i hladnom mjestu kako bi iz uzoraka topljive komponente prešle u otapalo. Nakon tog vremena se pomoću šprice iz kiveta uzima manja količina uzorka koja se zatim propušta kroz najlon-filter 0,45 μm te odlazi na HPLC analizu.

3.2.14. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Nakon usitnjavanja pogače, preostalih 6 uzoraka se prelije sa 25 mL 50 %-tnog EtOH te se dobro promiješaju. Nakon toga se stavljaju u ultrazvučnu kupelj. Ultrazvučna kupelj se postavlja na frekvenciju od 37 kHz u periodu od 30 min bez zagrijavanja. Prilikom ekstrakcije bilo je potrebno promiješati kivete kako bi se poboljšala ekstrakcija. Nakon završene ekstrakcije, manja količina ekstrakta se pomoću šprice uzima iz kivete te se filtrira kroz najlon-filter 0,45 μm . Tako profiltriran ekstrakt odlazi na HPLC.



Slika 7. Ekstrakcija resveratrola potpomognuta ultrazvukom (Izvor, autor)

3.2.15. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC)

Identifikacija i kvantifikacija resveratrola u etanolnim ekstraktima dobivenih klasičnom maceracijom i potpomognuta ultrazvukom određena je metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC), odnosno pomoću uređaja Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) prikazanog na **Slici 9**.



Slika 8. HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Izvor, autor)

Automatskim injektorom se u sustav injektiralo 20 μL pripremljenog uzorka. Uzorci prije HPLC analize su bili profiltrirani kroz najlon-filter 0,45 μm uz pomoć odgovarajuće šprice.

Korištene su dvije mobilne faze:

1. A faza: 0,1 % HCOOH u H₂O,
2. B faza: 0,1 % HCOOH u CH₃OH

Ovaj dvokomponentni sustav mobilnih faza koristio se prema gradijentu:

1. 0 min, 90 % A, 10 % B,
2. 2,00 min, 70 % A, 30 % B,
3. 6,00 min, 20% A, 80 % B,
4. 9 min, 5 % A, 95 % B.

Vrijeme trajanja analize iznosi 9 minuta s "posttime" od 5 minuta pri temperaturi kolone u iznosu od 35 °C. Detekcija resveratrola u uzorku provedena je pomoću detektora pri slijedećim valnim duljinama: 210, 280, 306, 320 nm. Identifikacija resveratrola u ekstraktima provedena je usporedbom retencijskog vremena u uzorku s retencijskim vremenom injektiranog standarda poznate koncentracije određene komponente. Dok se kvantifikacija resveratrola provodila integriranjem površine ispod dobivenih pikova na temelju kalibracijske krivulje prethodno izrađene za analiziranu komponentu.

4. REZULTATI

Tablica 2. Udio ulja u sjemenkama grožđa

Sorta	Udio ulja (%)
Tinto cão**	12,06
Tinta Carvalha**	8,49
Periquita**	7,24
Touriga Francesa	12,40
Pinot noir***	17,8
Alicante Bouschet***	16,2
Riesling**	16,0
Graševina*	8,18
Frankovka*	7,12
*sjemenke korištene u ovom istraživanju **istraživanja drugih autora(Fernandes i sur., 2012) ***istraživanja drugih autora(Akkurt i sur., 2001)	

Tablica 3. Količina isprešanog ulja

Uzorak	Masa uzorka (g)	Masa pogače (g)	Masa sirovog ulja (g)
6 mm Graševina	700,48	605,84	94,64
8 mm Graševina	700,18	600,10	100,08
10 mm Graševina	700,89	600,35	100,54
6 mm Frankovka	690,10	588,11	101,99
8 mm Frankovka	670,05	567,50	102,55
10 mm Frankovka	690,00	582,13	107,87

Tablica 4. Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja sjemenki grožđa sorti Graševina i Frankovka

Ulje iz sorte grožđa	Ispitivani parametri			
	Udio vlage (%)	Pbr (mmol O ₂ /kg)	SMK (% oleinske kiseline)	Netopljive nečistoće (%)
Graševina	0,086	5,86	1,23	0,62
Frankovka	0,16	8,22	2,29	0,67

Pbr- peroksidni broj; SMK- slobodne masne kiseline

Tablica 5. Analiza oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja sjemenke grožđa sorte Graševina

Uzorak	Pbr (mmol O ₂ /kg ulja)				
	Dan 0.	Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.
Ulje bez dodatka antioksidansa	5,86	11,22	18,13	28,19	35,71
Ulje sa dodatkom ekstrakta ružmarina (oxyless clear) 0,2 %	5,86	9,00	14,65	22,00	28,35
Ulje sa dodatkom ekstrakta kadulje 0,2 %	5,86	10,50	15,15	21,63	28,84
Ulje sa dodatkom ekstrakta jabuke 0,2 %	5,86	9,05	15,50	22,50	28,00
Ulje sa dodatkom ekstrakta zelenog čaja 0,2 %	5,86	8,41	13,64	17,86	24,74

Tablica 6. Analiza koncentracije resveratrola iz pogače dobivene prešanjem sjemenke grožđa sorte Graševina i Frankovka određene metodom HPLC

Uzorak pogače	Koncentracija resveratrola (mg/L)	Koncentracija resveratrola (mg/kg)
6 mm Graševina	42,4 ± 0,03	33,6 ± 0,03
6 mm UZV Graševina	43,8 ± 0,31	34,7 ± 0,30
8 mm Graševina	47,5 ± 0,03	37,6 ± 0,03
8 mm UZV Graševina	59,3 ± 0,35	47,0 ± 0,30
10 mm Graševina	50,3 ± 0,02	39,9 ± 0,02
10 mm UZV Graševina	59,0 ± 0,03	46,8 ± 0,03
6 mm Frankovka	52,6 ± 0,11	41,7 ± 0,08
6 mm UZV Frankovka	54,9 ± 0,06	43,5 ± 0,05
8 mm Frankovka	58,3 ± 0,07	46,2 ± 0,07
8 mm UZV Frankovka	67,9 ± 0,47	53,8 ± 0,38
10 mm Frankovka	69,5 ± 0,52	55,1 ± 0,41
10 mm UZV Frankovka	73,0 ± 0,53	57,8 ± 0,42

5. RASPRAVA

Prisutna količina ulja u sjemenkama grožđa je određena pomoću metode po Soxhletu koja je standardna metoda prilikom određivanja slobodnih masti i ulja u uzorcima. Udio ulja u sjemenkama kod sorte Graševina iznosi 8,18 % te kod sorte Frankovka 7,12 %. Udio ulja u sjemenkama varira između 7 % do 20 % ovisno o vrsti i sorti grožđa. Fernandes i sur. (2012) te Akkurt i sur. (2001) u svom istraživanju su naveli kako različita vrsta i sorta grožđa te starost grozdova utječu na udio ulja u sjemenkama. **Tablica 2** prikazuje usporedbu Graševine i Frankovke sa rezultatima drugih sorti dobivenih u istraživanju Fernandes i sur. (2012) i Akkurt i sur. (2001). Usporedbom rezultata dobivenih na sortama Graševina i Frankovka s ostalim literaturnim izvorima, vidljivo je da su sorte Graševina i Frankovka među sortama koje sadrže najmanji udio ulja u sjemenci. Iz rezultata je vidljivo da najmanju količinu ulja sadrži sorta Frankovka.

Količine sirovog ulja dobivene nakon hladnog prešanja sjemenki grožđa sorti Graševina i Frankovka pri različitim promjerima sapnice za izlaz pogače su prikazane u **Tablici 3**. Iz **Tablice 3** je vidljivo da se povećanjem promjera sapnice dobiva veća količina isprešanog ulja.

U **Tablici 4** su prikazani osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja sjemenke grožđa sorte Graševina i Frankovka. Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019), udio vlage u ulju sorte Graševina i Frankovka iznosi 0,086 % odnosno 0,16 % te udovoljava zahtjevima Pravilnika koji propisuje maksimalnu dozvoljenu količinu vode u ulju do 0,4 %. Maksimalna vrijednost peroksidnog broja po pravilniku iznosi 7 mmola O_2 /kg ulja, te stoga ulje dobiveno od sjemenke sorte Frankovka (8,22 mmol O_2 /kg ulja) ne udovoljava zahtjevima Pravilnika dok ulje sjemenke sorte Graševina (5,86 mmol O_2 /kg ulja) je u skladu sa Pravilnikom. Također, ulje sorte Frankovka ne udovoljava Pravilniku po vrijednosti % SMK (% oleinske kiseline), gdje je maksimalna dozvoljena vrijednost 2 % SMK (% oleinske kiseline) a ulje sorte Frankovka sadrži 2,29 % SMK. Sa vrijednošću od 1,23 % SMK (% oleinske kiseline), ulje sorte Graševina udovoljava vrijednostima Pravilnika. Po količini netopljivih nečistoća u ulju, oba ulja udovoljavaju Pravilniku.

Tablica 5 prikazuje rezultate ispitivanja oksidacijske stabilnosti svježe proizvedenog hladno prešanog ulja sjemenke grožđa sorte Graševina sa i bez dodanog prirodnog antioksidansa. Određivanje se provodilo Schaal Oven testom na temperaturi od 63 °C u periodu od 4 dana. Zbog visoke vrijednosti peroksidnog broja nakon hladnog prešanja, na ulju

sorte Frankovka nije se provodio Oven test već samo na ulju sorte Graševina. Iz rezultata je vidljivo da ulje bez dodataka antioksidansa nema veliku otpornost prema oksidaciji, dok se uz dodatak prirodnih antioksidanasa ta otpornost povećava. Kao najznačajniju efikasnost prilikom zaštite ulja sjemenki grožđa postigao je uzorak sa dodatkom ekstrakta zelenog čaja. Moslavac i sur. (2019) su u svom istraživanju oksidacijske stabilnosti hladnog prešanog ulja također dobili rezultate da hladno prešano ulje sa dodatkom ekstrakta zelenog čaja pokazuje najbolje antioksidacijsko svojstvo što se podudara sa rezultatima ovog istraživanja. Od preostala tri ispitivana antioksidansa, ekstrakt jabuke ima bolje antioksidativno djelovanje od ekstrakta ružmarina (tip Oxyless clear) i ekstrakta kadulje. Međutim, njihova međusobna razlika je vrlo mala te u usporedbi sa ekstraktom zelenog čaja pokazuju slabije antioksidativno djelovanje.

Tablica 6 prikazuje rezultate koncentracije resveratrola u pogači sjemenki grožđa dobivenih pri različitim promjerima sapnica te rezultate dobivene prethodno potpomognutom ekstrakcijom pomoću ultrazvuka kvantificiranih pomoću visokotlačne tekućinske kromatografije. Iz rezultata je vidljivo da ekstrakcije potpomognute ultrazvukom kod svih promjera sapnica daju bolje rezultate od ekstrakcije klasičnom maceracijom. Povećanjem promjera sapnice prilikom hladnog prešanja sjemenki grožđa povećava se i količina resveratrola koja zaostaje na pogači koja se kasnije izdvaja ekstrakcijom. Najveća količina resveratrola izmjerena je kod sorte Frankovka pri otvoru sapnice promjera 10 mm, dok najmanja količina resveratrola izmjerena je kod sorte Graševina pri promjeru sapnice od 6 mm. Hao i sur. (2009) u svom istraživanju su kao rezultat dobili da sjemenke različitih sorti grožđa sadrže od 1,06 do 17,03 mg/kg što je u usporedbi sa količinom resveratrola dobivenom klasičnom maceracijom i maceracijom potpomognutom ultrazvukom minimalno dvostruko manja. Hao i sur. (2009) također navode u svojim rezultatima količinu resveratrola dobivenu iz pokožice grožđa koja iznosi do 145,11 mg/kg koja igra ulogu u razlici između količine resveratrola u sjemenkama crnog i bijelog grožđa. Zbog procesa proizvodnje crnog vina kod kojeg se fermentacija vina provodi zajedno sa kominom u kojoj se nalazi pokožica, količina resveratrola je veća u sjemenkama crnog vina nego kod sjemenki grožđa bijelog vina kod kojeg se komina odvaja prije fermentacije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja kvalitete hlano prešanog ulja **sjemenke grožđa sorte Frankovka i Graševina**, određivanja utjecaja promjera sapnice na količinu dobivenog ulja i resveratrola zaostalog u pogači, doneseni su sljedeći zaključci:

- Udio ulja u sjemenkama grožđa sorte Frankovka i Graševina iznosi 7,12 % i 8,18 % što je u skladu sa udjelom ulja u sjemenkama grožđa dobivenih iz dostupnih literatura.
- Povećanjem promjera sapnice kroz koju prolazi pogača tijekom prešanja, povećava se količina dobivenog ulja procesom hladnog prešanja.
- Ulje sjemenki grožđa sorte Graševina dobiveno hladnim prešanjem udovoljava zahtjevima Pravilnika o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) kada se ispituju sljedeći parametri: peroksidni broj, SMK (% oleinske kiseline) i udio vlage u ulju, dok kod ispitivanog parametra netopljive nečistoće ne udovoljava Pravilniku.
- Ulje sjemenki grožđa sorte Frankovka dobiveno hladnim prešanjem ne udovoljava zahtjevima Pravilnika o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) kad se ispituju sljedeći parametri: peroksidni broj, SMK (% oleinske kiseline) i netopljive nečistoće, dok kod ispitivanog parametra udjela vlage u ulju udovoljava Pravilniku.
- Ispitivanjem oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja dodatkom različitih antioksidansa utvrđeno je da najbolje antioksidativno djelovanje ima ekstrakt zelenog čaja dok najmanje antioksidativno djelovanje pokazuje ekstrakt kadulje.
- Visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) utvrđeno je da najveća količina resveratrola u pogači uz prethodnu maceraciju ultrazvukom zaostaje kod sorte Frankovka koja iznosi 73 mg/L (57,8 mg/kg) gdje se proces hladnog prešanja odvijao uz promjer sapnice od 10 mm. Najmanja količina resveratrola zaostaje pri promjeru sapnice od 6 mm kod sorte Graševina koja iznosi 42,4 mg/L (33,6 mg/kg) koja je prethodno ekstrahirana klasičnom maceracijom.
- Pogača sorte crnog grožđa sadrži veću količinu resveratrola od pogače bijelog grožđa zbog različitog procesa proizvodnje vina kod crnog i bijelog grožđa.

7. LITERATURA

- Akkurt M, Baydar N.G: Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25:163-168, 2001.
- Andabaka J: Utjecaj fermentacijske posude na aromatski profil i boju vina sorte Plavac mali. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Antioxidant properties and phenolic components of grape seeds, *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3:60-68, 2009.
- Argon Z.U, Celenk V.U, Gumus Z.P.: Cold pressed grape (*Vitis vinifera*) seed oil, *Cold pressed oils*, 5:39-52, 2020.
- Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer H: Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity, *Food chemistry*, 108:1122-1132, 2008.
- Bijelica M, Vujasinović V, Rabrenović B, Dimić S: Some chemical characteristics and oxidative stability of cold pressed grape seed oils obtained from different winery waste, research article, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2019.
- Çakaloğlu B, Özyurt V.H, Ötleş S: Cold press in oil extraction. A review. *Ukrainian food journal*, 7:640-654, 2018.
- Čogelja A: Utjecaj klasične i ultrazvukom potpomognute maceracije na udio kanabidiola i kanabidiolne kiseline iz cvatova industrijske konoplje. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira J.A, Ramalhosa E: Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties, *Food Research International*, 50:161-166, 2012.
- Hao J.G, Li L, Wolf M, Xu M, Brinsko B, Yanik M, Chen S, Binzer L, Green S, Hitz C, Yu L.L: Antioxidant properties and phenolic components of grape seeds, *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3:60-68, 2009.
- Kušević T: Proizvodnja ulja iz sjemenki papripke dvostupanjskom ekstrakcijom, diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022
- Matthaus B: Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight?, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110:645-650, 2008.

Moslavac T, Šaravanja M, Jokić S, Šubarić D, Jakobović M: Urjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ulja koštica grožđa, *Glasnik zaštite bilja*, 6:48-56, 2019.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019),

https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_11_229.html

Risuelo G: Resveratrol: multiple activities on the biological functionality of the cell, *Nutraceuticals*, 33:453-464, 2016.

Salehi B, Mishra A.P, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou P.V.T, Martins N, Sharifi-Rad J: Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, 6:91, 2018.

Vinko Lj: Sadržaj vitamina C u komercijalnim voćnim sokovima i voću određen HPLC metodom. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.