

Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (Cannabis sativa L.) ulja superkritičnim CO2 iz pogače nakon hladnog prešanja

Aladić, Krunoslav

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:109:853901>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Krunoslav Aladić, dipl. ing.

**OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE KONOPLJINOG (*Cannabis sativa L.*) ULJA SUPERKRITIČNIM CO₂ IZ POGAČE NAKON HLADNOG
PREŠANJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, veljača, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.011 : 66.061.35 : 665.344.9(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana: Inženjerstvo

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća ak. 13/14, održanoj 28. travnja 2014. godine

Voditelj: Doc. dr. sc. *Stela Jokić*

**OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE KONOPLJINOG (*Cannabis sativa* L.) ULJA SUPERKRITIČNIM CO₂ IZ
POGAČE NAKON HLADNOG PREŠANJA**

Krunoslav Aladić, 17/D-07

Sažetak:

Posljednjih par desetljeća, industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je nepravedno zapostavljena zbog izgledom slične vrste konoplje *Cannabis indica* L. koja se koristi kao opojno sredstvo. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj parametara ekstrakcije ulja iz *Cannabis sativa* L. sjemenki procesom hladnog prešanja nakon čega je provedena ekstrakcija zaostalog ulja u pogači pomoću superkritičnog CO₂. Optimiranje procesa ekstrakcije konopljinog ulja provedeno je metodom odzivnih površina. Ispitan je utjecaj temperature zagrijavanja glave preše, frekvencije elektromotora te veličine otvora pužne preše na iskorištenje i kvalitetu ulja kod procesa prešanja, kao i utjecaj tlaka ekstrakcije, temperature i protoka otapala u procesu ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂. U proizvedenim uljima odredili su se sljedeći parametri kvalitete ulja: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, netopljive nečistoće, voda, jodni broj, saponifikacijski broj, anisidinski broj i Totox broj. Osim navedenog, u dobivenim uljima ispitan je i sastav masnih kiselina, tokoferola, te klorofila i karotenoida. Ispitan je i utjecaj različitih prirodnih antioksidanasa i njihovih koncentracija na oksidacijsku stabilnost konopljinog ulja. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajan utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije na iskorištenje i kvalitetu ulja. Količina zaostalog ulja u pogači potpuno je ekstrahirana pomoću superkritičnog CO₂ na novokonstruiranom uređaju za superkritičnu ekstrakciju. Odabirom relevantnih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije, kao i periodičnim frakcioniranjem, dobiveno je konopljino ulje različitih masenih koncentracija masnih kiselina, tokoferola i pigmentata. Eterično ulje origana koncentracije 0,05 % je bilo najučinkovitije u zaštiti ulja od oksidacijske degradacije. Zbog svoje kvalitete, kao i sadržaja visokokvalitetnih komponenti u sjemenkama konoplje koje pozitivno utječu na ljudsko zdravlje, ovo istraživanje je vrlo značajno s obzirom na neznatan broj objavljenih studija o konopljinom ulju.

Ključne riječi: *Ekstrakcija superkritičnim CO₂, hladno prešanje, ulje industrijske konoplje, optimizacija*

Rad sadrži: 132 stranica
37 slika
36 tablica
3 priloga
220 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i>	predsjednik
2.	doc. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	član-mentor
3.	doc. dr. sc. <i>Senka Vidović</i>	član

4.

prof. dr. sc. *Mate Bilić*

zamjena člana

Datum obrane:

06. veljače 2015.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, te u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD**DOCTORAL THESIS**

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Engineering
Department of Process Engineering
Subdepartment of technological design process and construction materials
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 66.011 : 66.061.35 : 665.344.9(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Scientific branch: Engineering
Thesis subject: was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VII. held on April 28, 2014.
Mentor: *Stela Jokić*, PhD, assistant prof.

EXTRACTION OPTIMIZATION OF HEMP (*Cannabis sativa* L.) OIL FROM COLD PRESSED CAKE WITH SUPERCRITICAL CO₂

Krunoslav Aladić, 17/D-07

Summary:

In the past few decades, the *Cannabis sativa* L. hemp variety has been unfairly neglected because of its similarity to the illegal kind *Cannabis indica* L. used as a narcotic. The objective of this study was to evaluate the process of oil extraction from *Cannabis sativa* L. seeds by cold pressing, followed by extraction with supercritical CO₂. Extraction optimization of hemp oil production was conducted using response surface methodology (RSM). The effects of temperature, temperature head presses, frequency, and nozzle size on oil recovery and quality parameters in the pressing experiments and the effects of extraction pressure, temperature and solvent flow rate in supercritical CO₂ extraction experiments were investigated. In obtained hemp oils the following parameters were analysed: peroxide value, free fatty acids, insoluble impurities, moisture content, iodine value, saponification value, Anisidine value and Totox value. The composition of fatty acids, tocopherols, chlorophyll and carotene content was also determined. The influence of different natural antioxidants and their concentration on the oxidative stability of hemp seed oil was investigated. The results show that the oil recovery and quality was statistically significantly (ANOVA) affected by applied operational extraction process parameters. The residual oil in the pressed cake was extracted almost completely by supercritical CO₂ in a newly designed supercritical fluid extraction system. By selecting the relevant process conditions of supercritical extraction, as well as by fractionation, it is possible to obtain hemp oil with different mass concentrations oil fatty acids, tocopherols and pigments. The essential oil of oregano in concentration of 0.05 % was the most efficient in protecting the hemp oil against oxidative deterioration. Because of the oil's high quality, as well as the high content of high-quality components in hemp seeds which positively affect human health, this study is very significant regarding the small number of published studies on hemp seed oil.

Key words: *Supercritical CO₂ extraction, cold pressing, industrial hemp oil, optimization*

Thesis contains: 132 pages
37 figures
36 tables
3 supplements
220 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	<i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, associate prof.	chair person
2.	<i>Stela Jokić</i> , PhD, assistant prof.	supervisor
3.	<i>Senka Vidović</i> , PhD, assistant prof.	member
4.	<i>Mate Bilić</i> , PhD, prof.	stand-in

Defense date: 06. February 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, President's office, University Library in Zagreb and University Library in Osijek.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici i kolegici doc. dr. sc. Steli Jokić na ukazanom povjerenju prilikom izrade uređaja, vodstvu i pomoći tijekom cijelog studija i izrade doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Mati Biliću na konstruktivnim savjetima tijekom cijelog studija i prof. dr. sc. Dragi Šubariću na ukazanoj pomoći prilikom izrade uređaja.

Hvala kolegama iz Hrvatskog veterinarskog instituta, posebno prof. dr. sc. Željku Cvetniću i doc. dr. sc. Mariju Škrivanku na izrazitoj potpori tijekom cijelog doktorata.

Hvala doc. dr. sc. Senki Vidović na pomoći u analizama ukupnih pigmenata.

Hvala kolegi Goranu Horvatu, mag. ing. s kojim sam zajedno prolazio kroz sve probleme i pronalazio sva rješenja tijekom cijelog procesa izrade uređaja za superkritičnu ekstrakciju.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i svima onima koji su mi na bilo koji način pomogli pri izradi ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji – svojoj supruzi Ivani na neizmjernom razumijevanju, potpori i ljubavi koja mi je omogućavala apsolutnu slobodu, svojoj djeci Petru, Klari i Jakovu koji su mi davali snagu da završim ovaj rad, te svojim roditeljima i bratu na potpunoj podršci.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA	5
2.1.1. Sjemenka industrijske konoplje.....	6
2.1.2. Ulje industrijske konoplje	7
2.1.2.1 Sastav masnih kiselina	8
2.1.2.2 Tokoferoli.....	9
2.1.2.3 Pigmenti.....	10
2.2. PROIZVODNJA JESTIVIH BILJNIH ULJA	11
2.2.1. Mehaničko prešanje	12
2.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima.....	15
2.3. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	15
2.3.1. Superkritični ugljični dioksid.....	20
2.4. PROJEKTIRANJE UREĐAJA ZA EKSTRAKCIJU SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	25
2.5. PRIENOS REZULTATA IZ LABORATORIJSKOG U INDUSTRIJSKO MJERILO ZA EKSTRAKCIJU SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	26
2.6. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	28
2.6.1. Box-Behnken plan pokusa	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO	34
3.1. ZADATAK	35
3.2. MATERIJAL	36
3.2.1. Sjemenke industrijske konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	36
3.2.2. Kemikalije	36
3.3. METODE	38
3.3.1. Hladno prešanje	38
3.3.2. Određivanje udjela vlage i ulja u sjemenkama i pogači industrijske konoplje	39
3.3.3. Određivanje proteina i vlakana u sjemenci i pogači industrijske konoplje	40
3.3.4. Određivanje parametara kvalitete konopljinog ulja.....	40
3.3.4.1 Određivanje volumena i temperature ulja dobivenog prešanjem.....	41
3.3.4.2 Određivanje peroksidnog broja	41
3.3.4.3 Određivanje slobodnih masnih kiselina	42
3.3.4.4 Određivanje udjela netopljivih nečistoća u ulju	42
3.3.4.5 Određivanje udjela vlage u ulju	43
3.3.4.6 Određivanje anisidinskog i totox broja	43
3.3.4.7 Određivanje jodnog broja	44
3.3.4.8 Određivanje saponifikacijskog broja.....	44
3.3.5. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja	45
3.3.6. Projektiranje i izrada uređaja za ekstrakciju superkritičnim CO ₂	46
3.3.6.1 Konstrukcijski materijal.....	46
3.3.6.2 Izrada ekstraktora	46
3.3.6.3 Izrada separatora	47
3.3.6.4 Filtracijski element (filter).....	47
3.3.6.5 Visokotlačne cijevi, spojni elementi i visokotlačni ventili	48
3.3.6.6 Kontrola tlaka.....	48
3.3.6.7 Kontrola protoka.....	48
3.3.6.8 Regulacija temperature i tlaka.....	48
3.3.6.9 Visokotlačna pumpa	48
3.3.7. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkritičnim CO ₂	49
3.3.8. Ekstrakcija ulja iz sjemenki i pogače industrijske konoplje superkritičnim CO ₂	50
3.3.9. Analize konopljinog ulja	50
3.3.9.1 Određivanje sastava masnih kiselina	50
3.3.9.2 Određivanje tokoferola.....	51
3.3.9.3 Određivanje klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> i ukupnih karotenoida	52
3.3.10. Optimiranje procesa hladnog prešanja i procesa ekstrakcije superkritičnim CO ₂ primjenom metode odzivnih površina	53

3.3.11.	Statistička obrada podataka	54
4.	REZULTATI.....	55
4.1.	UDIO ULJA I VLAGE U SJEMENKAMA I POGAČI INDUSTRIJSKE KONOPLJE.....	56
4.2.	UDIO PROTEINA I VLAKANA U SJEMENKAMA, POGAČI I BRAŠNU INDUSTRIJSKE KONOPLJE	56
4.3.	UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA HLADNOG PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE I KVALITETU KONOPLJINOG ULJA.....	58
4.3.1.	Statistička analiza parametara kvalitete i iskorištenja hladno prešanog ulja.....	59
4.3.2.	Optimiranje procesa hladnog prešanja konopljinog ulja.....	62
4.4.	ISPITIVANJE UTJECAJA DODATKA PRIRODNIH ANTIOKSIDANaSA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST HLADNO PREŠANOG KONOPLJINOG ULJA.....	63
4.5.	EKSTRAKCIJA OSTATKA ULJA IZ POGAČE	63
4.5.1.	Ekstrakcija zaostalog ulja iz pogače dobivene pri optimalnim uvjetima hladnog prešanja pomoću superkritičnog CO ₂	63
4.5.2.	Utjecaj procesnih parametara superkritične ekstrakcije na iskorištenje ulja iz pogače.....	64
4.5.3.	Optimiranje procesa superkritične ekstrakcije konopljinog ulja iz pogače	65
4.5.4.	Statistička analiza parametara iskorištenja ulja iz pogače superkritičnim CO ₂	65
4.6.	UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO ₂ NA PRINOS KONOPLJINOG ULJA IZ SJEMENKE	68
4.6.1.	Raspodjela veličine čestica	68
4.7.	UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO ₂ NA ISKORIŠTENJE I SASTAV POJEDINIH KOMPONENTI U DOBIVENIM ULJIMA	68
4.7.1.	Utjecaj procesnih parametara ekstrakcije na prinos ulja	69
4.7.2.	Utjecaj parametara ekstrakcije na udio pigmenata u dobivenim uljima.....	70
4.7.3.	Sastav masnih kiselina konopljinog ulja	72
4.7.4.	Utjecaj parametara ekstrakcije na sastav masnih kiselina u dobivenim uljima	73
4.7.5.	Utjecaj parametara ekstrakcije na sastav tokoferola u dobivenim uljima	73
4.7.6.	Usporedba sastava masnih kiselina i tokoferola u uljima dobivenim pomoću različitih metoda ekstrakcije.....	75
5.	RASPRAVA.....	76
5.1.	UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA HLADNOG PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE I KVALITETU KONOPLJINOG ULJA.....	77
5.1.1.	Statistička analiza parametara kvalitete i iskorištenja hladno prešanog ulja.....	78
5.1.2.	Optimiranje procesa hladnog prešanja konopljinog ulja.....	79
5.2.	OKSIDACIJSKA STABILNOST HLADNO PREŠANOG KONOPLJINOG ULJA	80
5.3.	EKSTRAKCIJA ZAOSTALOG ULJA IZ POGAČE.....	80
5.3.1.	Utjecaj procesnih parametara superkritične ekstrakcije na iskorištenje ulja iz pogače.....	81
5.3.2.	Statistička analiza parametara iskorištenja ulja iz pogače superkritičnim CO ₂	81
5.4.	UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE NA PRINOS KONOPLJINOG ULJA IZ SJEMENKE.....	83
5.4.1.	Utjecaj temperature	83
5.4.2.	Utjecaj tlaka.....	84
5.4.3.	Utjecaj parametara ekstrakcije na sadržaj pigmenata u dobivenim uljima	84
5.4.4.	Utjecaj parametara ekstrakcije na sadržaj masnih kiselina i tokoferola u dobivenim uljima	86
5.4.5.	Usporedba sastava masnih kiselina i tokoferola u uljima dobivenim pomoću različitih metoda ekstrakcije.....	86
6.	ZAKLJUČCI	87
7.	LITERATURA.....	90
8.	PRILOZI.....	106
	PRILOG 1. POGLAVLJE U KNJIZI.....	107
	PRILOG 2. PRIMJER KROMATOGRAMA ODREĐIVANJA SASTAVA MASNIH KISELINA	131
	PRILOG 3. PRIMJER KROMATOGRAMA ODREĐIVANJA TOKOFEROLA.....	132

OZNAKE

A_0	apsorpcija ne reaktivne test otopine
A_1	apsorpcija reaktivne test otopine
A_2	apsorpcija slijepe probe
c	količina pigmenta u ulju (mgkg^{-1})
c_1	koncentracija pigmenta (mgL^{-1})
c_p	broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki
d	srednji promjer čestica
D_{ax}	difuzijski koeficijent u čvrstom sloju (m^2s^{-1})
D_{ay}	aksijalni disperzijski koeficijent (m^2s^{-1})
F_{CO_2}	maseni protok CO_2 (kg h^{-1})
Fr	frekvencija (Hz)
G	masa ulja (kg)
h	aksijalna koordinata sloja materijala u ekstraktoru (m)
$J(x,y)$	prijenos mase na međusloju (s^{-1})
k	broj faktora eksperimentalnog pokusa
m_{1-12}	odvagana masa uzorka (g)
m_i	masa pojedine frakcije zaostala na situ (g)
N	otvor glave preše (mm)
P	tlak (MPa)
P_c	kritični tlak (MPa)
P_e	tlak ekstrakcije (MPa)
Q	konstanta određivanja anisidinskog broja (gmL^{-1})
R	razrjeđenja (ako se primjenjuje u metodi; ukoliko ne $R=1$)
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
T_c	kritična temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
T_e	temperatura ekstrakcije ($^{\circ}\text{C}$)
u_i	brzina otapanja (ms^{-1})

V_{1-7}	volumen utrošenog reagensa (mL)
V_a	volumna konstanta (mL)
x	bezdimenzionalna koncentracija čvrste faze (kgkg^{-1})
$X_{i,j}$	ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)
y	bezdimenzionalna koncentracija tekuće faze (kgkg^{-1})
Y	modelom predviđena odzivna funkcija

SIMBOLI

β_0	konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
β_i	koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ii}	koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ij}	koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
ρ_c	gustoća fluida u kritičnoj točki (kgm^{-3})
ρ_f	gustoća fluida (kgm^{-3})
ρ_s	gustoća čestica krutog materijala (kgm^{-3})
ω_3	omega 3 - oznaka mjesta prve dvostruke veze u lancu masne kiseline
ω_6	omega 6 - oznaka mjesta prve dvostruke veze u lancu masne kiseline
ω_9	omega 9 - oznaka mjesta prve dvostruke veze u lancu masne kiseline

INDEKSI

c	kritični
-----	----------

KRATICE

AISI 304	legura nehrđajućeg čelika (X5CrNi18-10)
AISI 316Ti	legura nehrđajućeg čelika visoke otpornosti na kiseline i lužine (X6CrNiMoTi17-12-2)
ANOVA	analiza varijance (<i>engl.</i> Analysis of variance)
AV	anidinski broj
AVG	srednja vrijednost (<i>engl.</i> Average)
BBD	Box-Behnken plan pokusa
C16:0	palmitinska kiselina

C18:0	stearinska kiselina
C18:1	oleinska kiselina
C18:2 ω 6	linolna kiselina
C18:3 ω 3	α -linolenska kiselina
C18:3 ω 6	γ -linolenska kiselina
C18:4 ω 3	stearidonska kiselina
C20:0	arahinska kiselina
C20:1	eikosenoinska kiselina
C22:0	behenska kiselina
CCD	centralno kompozitni plan pokusa (<i>engl.</i> Central composite design)
CCF	plošno centrirani kompozitni plan (<i>engl.</i> Face centred composite design)
-CH ₃	metilna skupina
CO ₂	ugljični dioksid
DD	doehlert pokus (<i>engl.</i> Doehlert design)
EMK	esencijalne masne kiseline
FAME	metilni esteri masnih kiselina (<i>engl.</i> Fatty Acid Methyl Ester)
FFD	faktorijalni plan pokusa (<i>engl.</i> Full factorial design)
HM-SFE	ručno izrađeni uređaj za ekstrakciju superkritičnim fluidima (<i>engl.</i> handmade supercritical fluid extraction system)
JV	jodni broj
NIST	nacionalni Institut za standarde i tehnologiju
NN	netopljive nečistoće
NPT	cijevni navoj, inčni, konusni (<i>engl.</i> National pipe thread)
OLAC	oleinska kiselina
p.a.	za analizu (<i>engl.</i> Pro analysis)
Pbr	peroksidni broj
PC-8	plastokromanol-8
PID	proporcionali intergral-derivativni upravljač temperature (<i>engl.</i> Proportional integral derivative controller)
PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet

PTFE	politetrafluoroetilen
R ½"	cijevni navoj, inčni, ravni ½"
RPM	broj okretaja u minuti (<i>engl.</i> Rotation per minute)
RSM	metoda odzivne površine (<i>engl.</i> Response Surface Methodology)
SD	standradna devijacija (<i>engl.</i> Stanadard deviation)
SFE	ekstrakcija superkritičnim fluidima (<i>engl.</i> Supercritical fluid extraction)
SLPM	standardna litra po minuti (<i>engl.</i> Standard Liter Per Minute)
SMK	slobodne masne kiseline
SSR	poluvodički relej (<i>engl.</i> Solid state relej)
SV	saponifikacijski broj
THC	δ-9-tetrahidrokanabinol
TV	totox broj

1. UVOD

Posljednjih godina, zbog sve većeg negativnog utjecaja ljudskih aktivnosti na okoliš, sve više raste svijest ljudi o potrebi zaštite okoliša te se stoga u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji velika pozornost pridaje *zelenim* i održivim tehnologijama koje se zasnivaju na prihvatljivom kompromisu između ekonomskih i ekoloških zahtjeva. Kao novo *zeleno* otapalo posljednjih se godina razmatra i superkritični ugljični dioksid (CO₂) koji se pokazao kao vrlo poželjno otapalo u separacijskim procesima, ali i sintetskim postupcima, budući da je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, kao i zbog toga što je ekološki prihvatljivo i *GRAS* (generalno prihvaćen kao sigurno) otapalo. Jedna od čestih potreba je tržišni zahtjev za proizvodom visoke kvalitete koji se ne može postići bez primjene ekstrakcije superkritičnim fluidima, kao što je npr. slučaj s bezkofeinskom kavom. Sve češća primjena je i u farmaceutskoj industriji kod kristalizacije i u oblikovanju čestica, za ekstruziju polimera koji se koriste pri kapsuliranju, kao medij za provođenje enzimskih reakcija, za sterilizaciju polimernih materijala i finih čestica, za uklanjanje pomoćnih tvari i otapala korištenih u proizvodnji lijekova te posebice za ekstrakciju i pročišćavanje aktivnih supstanci iz različitih sirovina. S druge strane s obzirom na protokol o globalnom zatopljenju i emisiji stakleničkih plinova, prednost velikih procesnih postrojenja je svakako mogućnost skladištenja i korištenja CO₂ proizvedenog u drugim industrijama, te se na taj način stvaraju nove vrijednosti umjesto da se CO₂ ispušta u atmosferu (Jokić i sur., 2014a; Ayre i sur., 2013; Rutkowska i Stolyhwo, 2009; Sahena i sur., 2009; Temelli, 2009; Abbas i sur., 2008; Reverchon i De Marco, 2006; Wang i Weller, 2006; Damjanović i sur., 2005; Brunner, 2005). Spomenuta *zelena* tehnologija nalazi sve veću primjenu i u proizvodnji biljnih ulja umjesto tradicionalne ekstrakcija organskim otapalima. Stoga u svijetu postoji trend projektiranja takvih postrojenja koja koriste *zelena* otapala kao što je CO₂. Poznavanje mehanizama prijenosa tvari u procesu ekstrakcije i parametara koji kontroliraju brzinu prijenosa tvari neophodni su kod razvoja metoda za ekstrahiranje željenih komponenata iz biljnog materijala, kao i za projektiranje komercijalne opreme (Gamse, 2005). Shodno navedenom, u okviru ovog rada projektirao se i izradio laboratorijski uređaj za ekstrakciju superkritičnim fluidima koji je prvi uređaj takve vrste u RH.

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka koja je u posljednjih par desetljeća nepravredno zapostavljena zbog izgledom sličnoj vrsti konoplje *Cannabis indica* L., koja sadrži veću količinu psiho-aktivnog sastojka *delta*-9-tetrahidrokanabinol-a (THC-a) (Chen i sur., 2014; Sacilik i sur., 2003; Oomah i sur., 2002). S obzirom na ova ograničenja dopušteno je

uzgajati samo sorte koje imaju manje od 0,2% THC-a (Callaway, 2004; Kriese i sur., 2004; Oomah i sur., 2002). Upravo iz tih dopuštenih sorti industrijske konoplje dobiva se visokovrijedno ulje s idealnim omjerom visokovrijednih masnih kiselina u omjeru $\omega 6:\omega 3=3:1$ (Teh i Birch, 2013; Da Porto i sur., 2012). Sjeme konoplje je također i veliki izvor drugih visokovrijednih nutrienata kao što su visoko probavljive bjelančevine, ugljikohidrati, minerali i dijetetska vlakna (Callaway i Pate, 2009). Trend zdravog načina života ljudi doveo je do povećanja uporabe konopljinog sjemena i njezinih proizvoda.

Ulje dobiveno hladnim prešanjem iz sjemenki konoplje je visoke kvalitete, ali značajna količina ulja nakon prešanja zaostaje u nusproizvodu - pogači. Danas postoji veliki interes u korištenju nusproizvoda prehrambene industrije u različite svrhe. Nusproizvod (pogača) u procesu prešanja ulja ima veliki potencijal primjene u proizvodnji hrane zbog visokog udjela zaostalog ulja, bjelančevina, vlakana, minerala i drugih tvari. Stoga je cilj ovoga rada bio optimirati proces ekstrakcije konopljinog ulja. Ispitan je utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije na iskorištenje i kvalitetu konopljinog ulja. Ispitan je i sastav masnih kiselina, tokoferola te sadržaj klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida u dobivenim uljima. Budući da je stabilnost ulja vrlo bitno svojstvo u radu se ispitao i utjecaj procesa ekstrakcije superkritičnim CO₂ na stabilnost dobivenog konopljinog ulja u odnosu na hladno prešano ulje. Dobiveni podaci od iznimnog značaja su za projektiranje i optimizaciju budućih industrijskih postrojenja.

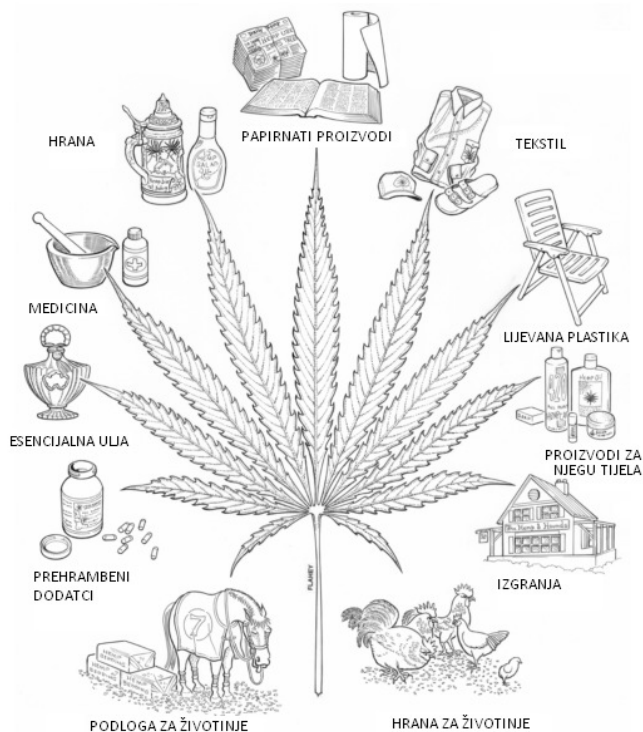
Značenje povedenog istraživanja ogleda se u proizvodnji visokokvalitetnog hladno prešanog konopljinog ulja, maksimalnom iskorištenju ulja iz pogače pomoću superkritičnog CO₂ te u potencijalnoj mogućnosti korištenja odmašćene pogače u druge svrhe (u obogaćivanju ekstrudiranih proizvoda, u dobivanju proteinskog praha konoplje i slično). Na ovaj način iskorištenje početne sirovine je 100%-tno i proces proizvodnje hrane se zaokružio tako da se minimalizirao organski otpad koji je danas veliki ekološki i financijski teret u prehrambenoj industriji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka koja je na našim prostorima uzgajana dugi niz godina. Proizvodnja konoplje, njezina upotreba i razvoj kudelarstva u Hrvatskoj započinju krajem 19. i početkom 20. stoljeća najvećim dijelom u istočnoj Slavoniji (Butorac, 2009). Najstariji postojeći dokumenti koji opisuju korištenje sjemenki konoplje u prehrani i u medicinske svrhe potječu iz Kine (de Padua i sur., 1999), u kojim je navedeno da su u grobnici staroj preko 4500 godina pronađeni stabljika, lišće i sjemenke konoplje (Jiang i sur., 2006). Uzgoj konoplje bio je zabranjen u europskim zemljama do 1996. godine kada je dozvoljen uzgoj kultivara konoplje s udjelom δ -9-tetrahidrokanabinola (THC-a) nižim od 0,3%. Danas je na području Europske unije dozvoljen uzgoj kultivara s udjelom THC-a nižim od 0,2%. U Hrvatskoj, blagodati ove biljke još uvijek nisu dovoljno prepoznate upravo zbog zakonske regulative koja strogo propisuje kontrolu uzgoja industrijske konoplje (NN 107/01 Zakon o suzbijanju zlouporabe opojnih droga) i to isključivo za proizvodnju sjemenki i proizvoda (ulje i pogača) od industrijske konoplje. Ali unatoč svim zaprekama, uzgoj industrijske konoplje u Hrvatskoj svakim danom sve više raste. Industrijska konoplja ima jako veliku primjenu u svim industrijskim granama. Postoji podatak da se od cijele biljke konoplje može izraditi više od 25000 različitih proizvoda (Slika 1) (Small i Marcus, 2002). Drvenasti dio stabljike konoplje iskorištava se za proizvodnju papira. Papir proizveden od celuloze konoplje je iznimne kvalitete, a najčešće se koristi u proizvodnji cigareta, vrijednosnog papira, masnog papira, posebnog papira za slikarstvo, u proizvodnji elektroničke opreme, filter papira za kavu i čaj. Zanimljiva je činjenica da je Biblija pisana na papiru od konoplje. Konoplju za proizvodnju svojih proizvoda koriste mnoge industrije poput auto industrije, građevinske industrije, tekstilne i papirne industrije, a koristi se i ribarstvu, te kao ogrjevni materijal. Najvažniji sastavni dio stabljike konoplje je vlakno koje ima izuzetnu čvrstoću (Butorac, 2009). Konoplja može proizvesti 250% više vlakana nego pamuk, uz manju potrošnju vode i 600% više vlakana od lana na istoj površini obradive zemlje (Wilkerson, 2008). Vlakna konoplje potencijalno mogu zamijeniti druga biološka vlakna u mnogim primjenama. Vrlo je zanimljivo da zbog svoje čvrstoće vlakna konoplje se poistovjećuju sa staklenim vlaknima i čelikom koji se dodaju u beton u građevinarstvu. S obzirom na drastična smanjenja šuma u svijetu velika je vjerojatnost da će se uzgoj jednogodišnjih biljaka kao izvora vlakana u budućnosti povećati

(Small i Marcus, 2002). Industrijska konoplja produkcijom jedne tone celuloze iz atmosfere uklanja 1,5 tonu ugljičnog dioksida (Wilkerson, 2008).



Slika 1. Dio palete proizvoda od industrijske konoplje (Small i Marcus, 2002)

2.1.1. Sjemenka industrijske konoplje

Za sjemenku idustrijske konoplje može se s sigurnošću reći da joj u nutritivnom pogledu nema konkurencije među sjemenjem (Wilkerson, 2008). Sjemenka industrijske konoplje (Slika 2), koja u svojoj punoj zrelosti ima relativno tvrdu ovojnicu, oblikom varira od gotovo kuglastog prema izduženom. Njena ukupna veličina može znatno varirati, a najčešće je približne veličine glave šibice. Ulje dobiveno iz kvalitetne sjemenke konoplje rezultira izvanrednim okusom i mirisom. Sadržaj ulja u sjemenki konoplje varira od 28 do 35%, ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, geografskom području i godini uzgoja (Matthäus i Brühl, 2008). Osim ulja, sjemenka konoplje sadrži 20-25% bjelančevina, 20-30% ugljikohidrata, 10-15% vlakana i nutritivno je bogata mineralima osobito fosforom, kalijem, magnezijem, sumporom, kalcijem, željezom, cinkom, te sadrži vitamine A (beta-karoten u masti topljiv oblik), B1, B2, B3, B6, D i E (prirodni antioksidans) i to sve u lako probavljivom obliku (Brckan i Katić, 2013; Latif i Anwar, 2009). Kemijskom analizom sjemenke konoplje u kasnom 19. stoljeću, po prvi put je identificirana linolna kiselina, kao glavni sastojak sjemenke odnosno

ulja konoplje. Kvantitativna analiza glavnih komponenti masnih kiselina u ulju sjemenke konoplje postala je od znanstvenog interesa u ranom 20-om stoljeću (Callaway i Pate, 2009).



Slika 2. Sjemenska konoplje, povećana (Deferne i Pate, 1996); usporedba s glavom šibice (Small i Marcus, 2002)

2.1.2. Ulje industrijske konoplje

Uporaba konoplje za proizvodnju ulja započela je prije 3 tisućljeća. Ulje sjemenke industrijske konoplje (**Slika 3**) spada u suha ulja, te se nekad koristilo u proizvodnji boja i lakova te u proizvodnji sapuna. Uzgoj konoplje za proizvodnju jestivog ulja nije konkurentno proizvodnji jestivih biljnih ulja od uljnih sorti poput suncokreta, uljane repica, pa čak i lana. Međutim postoje izvanredne prehrambene prednosti konopljinog ulja, koje svakako ima dobar potencijal za prodor na tržište kao ulje za salatu, a i za uporabu u drugim prehrambenim proizvodima (Small i Marcus, 2002).



Slika 3. Ulje sjemenke industrijske konoplje (WEB 1)

2.1.2.1 Sastav masnih kiselina

Po svom sastavu ulje industrijske konoplje je izrazito bogato nezasićenim masnim kiselinama (**Tablica 1**) u kojem je u najvećoj mjeri zastupljena linolna kiselina (C18:2 ω 6) oko 55%, potom α -linolenska kiselina (C18:3 ω 3) u količini oko 20%. Od nezasićenih kiselina prisutne su još i oleinska (C18:1) i γ -linolenska kiselina (C18:3 ω 6), te od zasićenih palmitinska i stearinska kiselina.

Tablica 1. Sastav značajnijih masnih kiselina u ulju konoplje prema nekim autorima

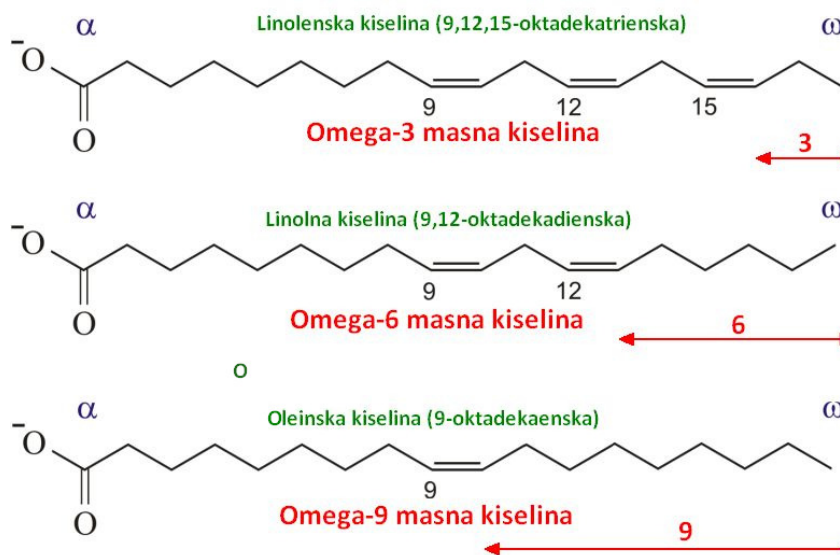
Masne kiseline	Ulje konoplje (%)					
	Oomah i sur. (2002)	Kriese i sur. (2004)	Anwar i sur. (2006)	Callaway i Pate (2009)	Da Porto i sur. (2012b)	Lin i sur. (2012)
Palmitinska (C16:0)	6,60	5,37	8,27	5,00	5,19	7,20
Stearinska (C18:0)	2,70	3,35	2,19	2,00	1,57	3,39
Oleinska (C18:1)	10,1	n.p.	14,03	9,00	10,99	11,72
Linolna (C18:2 ω 6)	54,3	54,90	56,50	56,00	59,77	55,94
α -linolenska (C18:3 ω 3)	19,1	20,84	18,85	22,00	18,15	20,35
γ -linolenska (C18:3 ω 6)	3,6	2,12	1,65	4,00	3,42	0,84
Stearidonska (C18:4 ω 3)	-	0,94	n.d.	2,00	-	-
Arahinska (C20:0)	0,90	n.p.	-	-	-	0,56
Eikosenoinska (C20:1)	-	n.p.	-	-	0,78	-
Behenska (C22:0)	0,4	n.p.	-	-	0,13	-
Omjer ω 3/ ω 6	n.p.	n.p.	n.p.	2,50	3,29	2,64

n.d. - nije detektirano; n.p. - nije prikazano

U ovisnosti na kojem se mjestu nalazi prva dvostruka veza formiraju se imena nezasićenih odnosno polinezasićenih kiselina, pa tako imamo ω 3, ω 6 i ω 9 masne kiseline. Kod ω 3 masne kiseline prva dvostruka veza se nalazi između trećeg i četvrtog ugljikovog atoma (n-3) od metilnog kraja (-CH₃) molekule (omega kraja), te kako slijedi kod ω 6 masne kiseline između šestog i sedmog i kod ω 9 masne kiseline između devetog i desetog ugljikovog atoma (**Slika 4**) ([Generalić, 2014](#)).

Prisutnost γ -linolenske kiseline u konopljinom ulju svrstava ga među kozmetička laka ulja zbog svojstva da se lako upija u kožu ([Da Porto i sur., 2012b](#); [Oomah i sur., 2002](#)). Ulje ima gotovo idealan i uravnotežen omjer linolne i α -linolenske kiseline u iznosu 3:1 za koji se

smatra da ima jedan od najpovoljnijih učinaka na krvožilni sustav kod ljudi (Teh i Birch, 2013). Esencijalne masne kiseline (EMK) su potrebne za ljudsko zdravlje i odgovorne su za sjaj kože, kose i očiju. One čiste arterije, jačaju imunitet i sprječavaju virusne i druge prijetnje imunološkom sustavu. Međutim, esencijalne masne kiseline se ne mogu sintetizirati u ljudskom tijelu nego moraju biti unešene putem hrane.



Slika 4. Omega masne kiseline (Generalić, 2014)

Konopljino ulje sadrži svih 9 esencijalnih masnih kiselina (Wilkerson, 2008). Zanimljiv je podatak da količina EMK-a raste što su uvjeti rasta rigorozniji. Pa tako u sjevernim krajevima svijeta gdje su zime jače količina EMK je veća što zasigurno osigurava sjemenku konoplje od smrzavanja. Upravo iz ove konstatacije konopljino ulje se počne zgušnjavati tek kada je nekoliko dana pohranjeno na temperaturi ispod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Callaway i Pate, 2009).

2.1.2.2 Tokoferoli

Osim povoljnog sastava masnih kiselina, konopljino ulje je odličan izvor bioaktivnih komponenata poput tokoferola, tokotrienola i plastokromanola-8 (PC-8). Tokoferoli su prirodni antioksidansi koji sprječavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (Kriese i sur., 2004). Ulje konoplje sadrži oko 800 mgkg^{-1} ukupnih tokoferola, od kojih je dominantan γ -tokoferol (Tablica 2) (Matthaus i Bruhl, 2008). Tokoferoli i tokotrienoli, skraćeno nazvani tokoli i sažeti pod pojmom vitamina E, su skupina topljivih antioksidansa u masti s

kromanolskim prstenom i hidrofobnim bočnim lancem (fitil u slučaju tokoferola, izoprenil kod tokotrienola) (Schwartz i sur., 2008). Prepoznati su kao vrlo dobri inhibitori oksidacije masti u hrani i u biološkim sustavima. S obzirom da ih ljudi i životinje ne mogu sintetizirati u svom organizmu, već samo biljke, od velike su važnosti u prehrani. Antioksidacijska svojstva tokoferola su izrazito kompleksna. Pri niskim koncentracijama tokoferoli pokazuju visoku efikasnost, dok djelotvornost gube postupno pri porastu koncentracije u uljima. Takvo ponašanje najviše pokazuje α -tokoferol, ali je uočeno i kod drugih tokoferola (Brckan i Katić, 2013). Ali nasuprot tome, γ -tokoferol je učinkovitiji u zaštiti od koronarnih bolesti srca, u odnosu na α -tokoferol. Možda najzanimljiviji podatak je da γ -tokoferol, koji još nije široko proučavan, ima sposobnost djelovanja kao sredstvo protiv karcinoma, posebno na rak debelog crijeva (Leizer, 2000). Razine tokoferola u biljnim uljima su u optimalnim količinama za njihovu oksidacijsku stabilnost. Tokoferoli pokazuju antioksidacijska svojstva većinom zbog svoje lipofilnosti. Vrlo je teško obogatiti biljna ulja tokoferolima, jer postoje optimalne granice koje osiguravaju maksimalnu zaštitu ulja (Brckan i Katić, 2013).

Tablica 2. Sadržaj tokoferola prema nekim autorima

Autor rada	Tokoferoli (mgkg ⁻¹)			
	α -	β -	γ -	δ -
Oomah i sur. (2002)	34,00	6,00	733,0	25,00
Kriese i sur. (2004)	16,30	1,50	162,1	10,10
Gruszka i Kruk (2007)	52,70	-	304,60	10,70
Uluata i Özdemir (2012)	25,58	5,96	597,91	39,71
Teh i Birch (2013)	27,80	-	564,11	13,00
Brckan i Katić (2013)	135,0	40,00	532,0	30,00

2.1.2.3 Pigmenti

Hladno prešano konopljino ulje je svijetlozelene do tamnozelene boje i ugodnog orašastog okusa. Što je ulje tamnije u njemu je prisutna veća količina klorofila (**Tablica 3**), a takvo ulje ima okus koji podsjeća na okus zelene trave. Klorofili i karotenoidi su glavni pigmenti u biljnim uljima, a glavnu komponentu klorofil skupine čini feoftin. I za klorofile i karotenoide se smatra da imaju važnu ulogu u održavanju kvalitete jestivih ulja, uglavnom zbog njihovog djelovanja kao fotosenzibilizatori ili hvatači slobodnog radikala kisika. Najznačajniji pigment u konopljinom ulju je svakako klorofil *a* i *b* koji mu daju prepoznatljivu tamnozelenu boju (Cert

i Pérez-Camino, 2000). I klorofil i karotenoidi su molekule koje su prilično hidrofobne i prema tome mogu se ekstrahirati s jednim ili smjesom organskih otapala uz prethodno homogeniziranje ili pomoću superkritičnog CO₂ (Schoefs, 2004).

Tablica 3. Sadržaj klorofila prema nekim autorima

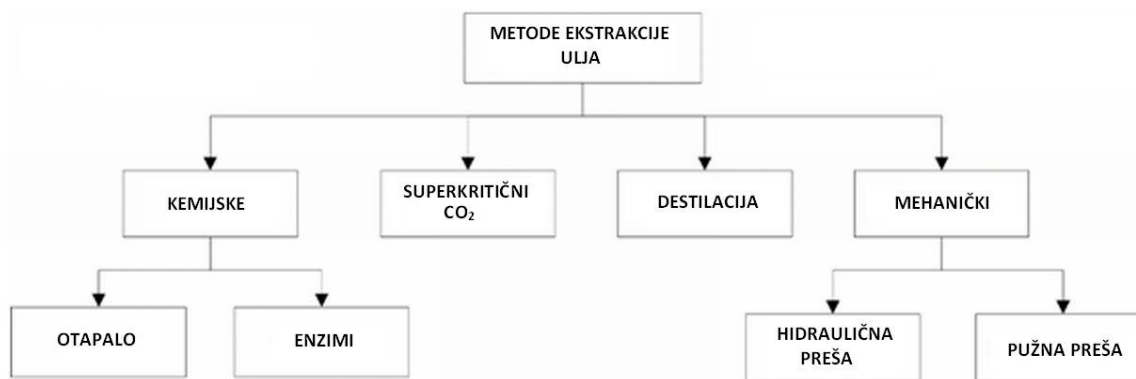
Postupak	Autor	Klorofili (mgkg ⁻¹)	Karotenoidi (mgkg ⁻¹)
Hladno prešanje	Brckan i Katić (2013)	9,48 ± 0,11 (Feofitin <i>a</i>)	277,00 ± 0,99 (<i>β</i> -karoten)
Hladno prešanje	Teh i Birch (2013)	75,21 ± 0,04	n.d.

n.d. – nije detektirano

2.2. PROIZVODNJA JESTIVIH BILJNIH ULJA

Oko 2/3 od ukupne proizvodnje biljnih ulja otpada na jestiva ulja, a 1/3 su tehnička ulja koja se koriste u proizvodnji sredstava za pranje, boja, glicerina, masnih kiselina, lijekova i kozmetike. Uljarice su vrlo važna trgovinska roba za proizvodnju biljnih ulja. Prilikom proizvodnje ulja iz uljarica od velike je važnosti da se proces proizvodnje ulja usavrši sve u svrhu što boljeg prinosa i kvalitete ulja. Nakon prerade uljarica zaostaje pogača koja je vrijedan izvor proteina koji se najčešće koristi u ishrani životinja (Sorin-Stefan i sur., 2013.). Najznačajnija dva postupka za proizvodnju ulja, fizikalni i kemijski, prikazani su na **Slici 5**. Fizikalnom postupku pripadaju svi proizvodni procesi koji uključuju upotrebu mehaničke energije za dobivanje ulja iz sjemena. Najznačajnija dva fizikalna procesa proizvodnje ulja su diskontinuirano prešanje pomoću hidraulične klipne preše i kontinuirano prešanje pomoću pužne preše. Koji postupak će se koristiti za izdvajanje ulja iz neke sirovine ponajprije ovisi o udjelu ulja u sirovini. Kao što je već spomenuto, sjeme konoplje sadrži 28-35% ulja, a to ekonomski opravdava odabir procesa proizvodnje ulja metodom prešanja na pužnim prešama.

Kemijski procesi uglavnom se temelje na ekstrakciji otapalima (Turtelli Pighinelli i Gambetta, 2012). Kod enzimskih tretmana, koji se koriste za poboljšanje prinosa ulja (Najaifan i sur., 2009; Chen i Diosady, 2003) vrlo je važan izbor prikladnog enzima. U novije vrijeme sve se više koristi ekstrakcija superkritičnim fluidima kao postupak dobivanja biljnih ulja gdje se najčešće primjenjuje CO₂ kao otapalo.



Slika 5. Metode ekstrakcije ulja (Sorin-Stefan i sur., 2013)

2.2.1. Mehaničko prešanje

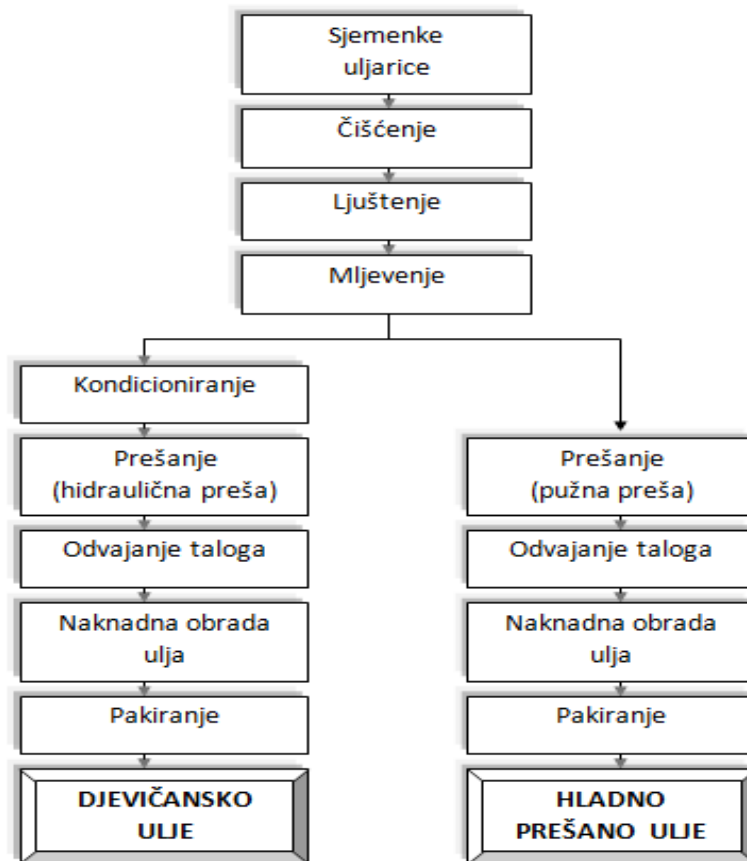
Prešanje je tehnološki proces kojim se iz pripremljene sirovine, mehaničkim putem i primjenom tlaka, izdvaja ulje. Prešanje se provodi na pužnim i hidrauličkim prešama, a razlikujemo dva procesa proizvodnje iz kojih se dobivaju toplo i hladno prešana biljna ulja. Kod toplog prešanja, prije samog procesa prešanja, materijal se zagrijava, te se pri tome gubi dosta prirodne arome. Primjena termičke obrade prije ili tijekom prešanja općenito poboljšava iskorištenje ulja, ali to može imati negativan utjecaj na kvalitetu ulja smanjenjem oksidacijskih parametara stabilnosti (Martinez i sur., 2008). Kod proizvodnje hladno prešanih ulja potrebno je obratiti pažnju na temperaturu sirovog ulja koja na izlazu iz preše ne smije prijeći 50 °C. U tu svrhu, prešanje se mora provesti pri blažim uvjetima, odnosno pri nižem tlaku. Upravo zbog tih činjenica količina zaostalog ulja u pogači kod hladnog prešanja je znatno veća u odnosu na toplo prešanje. Ulje dobiveno hladnim prešanjem intenzivnije je po okusu, mirisu i boji (Bockisch, 1998) što ovu vrstu ulja čini skupljim od toplo prešanih ulja.

Tehnološki proces proizvodnje jestivih hladno prešanih kao i nerafiniranih ulja (Slika 6) obuhvaća dvije osnovne faze:

- pripremu sirovine za izdvajanje ulja i
- izdvajanje ulja mehaničkim putem.

Kontinuirane pužne preše mogu biti:

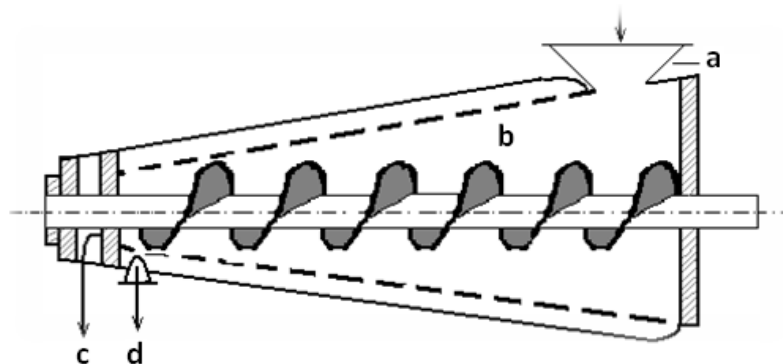
- predpreše, kod kojih je stupanj djelovanja 50-60% u odnosu na sadržaj ulja;
- završne preše, kod kojih stupanj djelovanja iznosi 80-90% (Dimić i Turkulov, 2000).



Slika 6. Proces proizvodnje djevičanskog i hladno prešanog biljnog ulja (Dimić i sur., 2002)

Mali proizvođači ulja vrlo često se odlučuju za upotrebu pužne preše (Slika 7) u proizvodnji ulja s obzirom da se dobiva proizvod visoke kvalitete bez korištenja kemijskih sredstava. Dobivanje ulja na ovaj način ima mnoge prednosti kao što su niska cijena opreme, niska potrošnja energije i ne zahtijevaju visokostručnu obuku radnika (Fils, 2000). Unatoč brojnim prednostima taj proces ima i nedostataka s gledišta niskog prinosa ulja jer određen dio ulja zaostaje u pogači (Moslavac i sur., 2014). Pužna preša omogućuje jednostavan i pouzdan postupak za preradu male količine sjemena, ali njegova učinkovitost ovisi o načinu pripreme sirovina poput čišćenja, mljevenja, ljuštenja, sušenja, termičke obrade ili vlaženja na optimalnu vlažnost iako se sirovina može prešati i bez ljuštenja i mljevenja, a što ovisi o vrsti sirovine. Poznato je da su tlak, temperatura, vrijeme prešanja i sadržaj vlage čimbenici koji utječu na prinos ulja u preradi uljarica (Dimić, 2005; Khan i Hanna, 1983). Prilikom procesa prešanja, puž zahvaća materijal koji se uvodi kroz uređaj za doziranje te ga prenosi iz većeg u manji zatvoreni prostor, što uzrokuje sabijanje materijala i porast tlaka te dolazi do cijeđenja

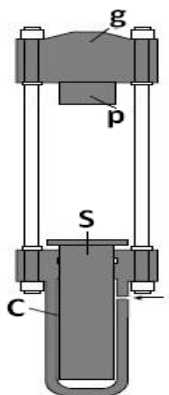
ulja (Dimić i Turkulov, 2000). Debljina pogače regulira se odgovarajućom konstrukcijom izlaznog konusa, a to ujedno utječe na radni tlak u preši. Što je otvor na glavi preše manji, tlak u preši je veći i obrnuto (Rac, 1964). Nakon provedenog hladnog prešanja sirovo ulje sadrži određeni udio netopljivih nečistoća koje umanjuju njegovu kvalitetu. Fizikalna i kemijska svojstva ulja (slobodne masne kiseline, jodni broj, saponifikacijski broj, peroksidni broj, anisidinski broj) i sastav masnih kiselina su glavni pokazatelji kvalitete ulja kao najbitnije stavke krajnjem potrošaču (Mitra i sur., 2009). U svrhu uklanjanja netopljivih nečistoća primjenjuju se procesi taloženja, filtracije ili centrifugiranja.



ulaz materijala (a), perforirano konusno kućište s pužnom osovinom (b), izlaz isprešane pogače (c), izlaz ulja (d)

Slika 7. Shema kontinuirane pužne preše (Rac, 1964)

Hidraulične preše (Slika 8) su najstariji uređaji u proizvodnji jestivih biljnih ulja. Njihova primjena danas je rijetka i isključivo se koriste za proizvodnju maslinovog i bučinog ulja te eventualno ulja sezama (Rac, 1964).



tlačni cilindar (C), stap (S) i glava preše (g) s protustapom (p)

Slika 8. Shema hidraulične preše (Rac, 1964)

2.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima

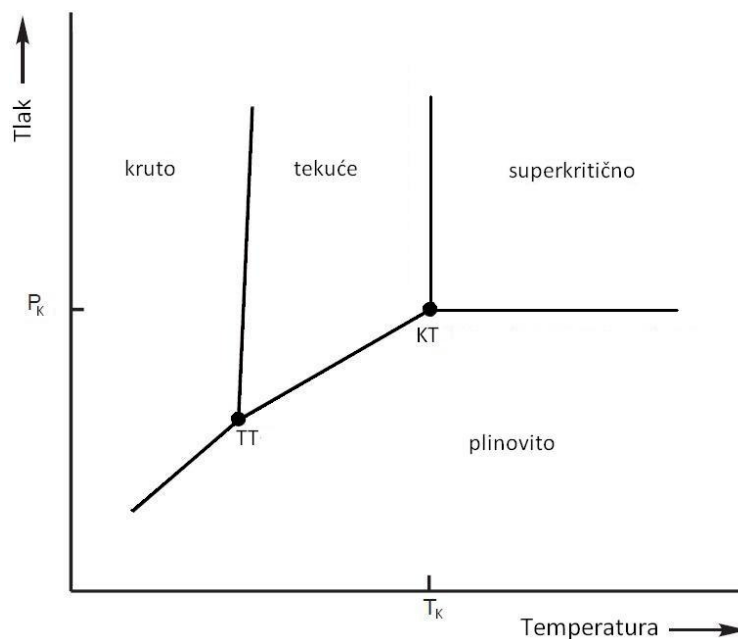
Tradicionalna ekstrakcija organskim otapalima još uvijek se koristi u industrijskoj proizvodnji ulja, posebno za materijale s niskim sadržajem ulja. Ekstrakcijom s organskim otapalima (heksan, ekstrakcijski benzin, i dr.) postiže se gotovo potpuno iskorištenje ulja (preko 98%), međutim, organsko otapalo koje zaostaje u ulju je nepoželjno i ima određenu toksičnost što predstavlja veliki problem (Sahena i sur, 2009; Hammond i sur., 2005). Nakon prerada uljarica s organskim otapalom ostaje pogača, nusproizvod, vrijedan izvor proteina koji se najčešće koristi za ishranu životinja. Dobivena miscela nakon filtracije ide na destilaciju kako bi se uklonilo organsko otapalo i dobilo sirovo ulje koje još mora proći proces rafinacije. Organsko otapalo izdvaja i neke netriglicerole, koji se ne pojavljuju u ulju dobivenom prešanjem (Williams, 2005). Nadalje, najveći problem je prisutnost i hlapljivih organskih nečistoća u konačnom produktu, koji mogu utjecati na kvalitetu ulja (Michulec i Wardenki, 2005).

2.3. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Za razliku od tradicionalnih postupaka ekstrakcije organskim otapalima pri visokim temperaturama, hladno prešanje daje ulje neusporedivo bolje kvalitete budući da prilikom provođenja procesa nema termičke degradacije bioaktivnih komponenti i zaostatka otapala, a dobiveno ulje zadržava sve bioaktivne komponente kao što su esencijalne masne kiseline, fenoli, flavonoidi i tokoferoli (Teh i Birch, 2013). Materijal koji se procesira postupkom hladnog prešanja mora biti izuzetno kvalitetan, bez stranih primjesa, te kod kojeg nije potrebna rafinacija kako bi se uklonile sve nepoželjne primjese i arome. Nasuprot hladnom prešanju kod kojeg su potrebna relativno mala investicijska ulaganja u kapitalnu opremu u novije vrijeme koristi se ekstrakcija superkritičnim fluidima koja iziskuje veća investicijska ulaganja u opremu i tehnički zahtjevniji inženjerski pristup s obzirom da se radi o relativno visokim tlakovima pri kojima se provodi sam proces (Carr, 1997).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (*engl. Supercritical fluid extraction – SFE*) ili, prema navodima nekih autora, superkritična ekstrakcija, je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Jokić, 2011). U tom postupku mobilna faza je podvrgnuta tlaku i temperaturi blizu ili iznad kritične točke sve u

svrhu poboljšanja snage otapanja mobilne faze (Sairam i sur., 2012). Superkritični fluid može biti svaka tvar koja se nalazi na temperaturi i tlaku iznad kritične točke (Slika 9). U superkritičnom stanju postoji samo jedna faza u kojem fluid nije niti plin, niti tekućina. Ova faza ima moć otapanja poput tekućina i snagu prijenosa uobičajenu za plinove (Askin i Ötles, 2005). Zanimljivo je da tvar nikada neće prijeći u superkritično stanje, neovisno o stalnom povećanju tlaka, ukoliko se nalazi na temperaturi nižoj od kritične temperature.



Slika 9. Fazni dijagram (tlak-temperatura) (Mukhopadhyay, 2000)

Fluidi s nepolarnim svojstvom vršit će ekstrakciju uglavnom nepolarnih komponenti, dok je za ekstrakciju polarnih komponenti potrebno u proces dodavati kootapalo kako bi se pospješila ekstrakcija. Sukladno toj konstataciji ekstrakcija polarnih komponenti vrši se u superkritičnom stanju otapala s polarnim svojstvom. Amonijak i metanol su neka od polarnih otapala kod kojih se relativno lako postižu uvjeti za ekstrakciju u superkritičnom stanju. Međutim problemi koji se pojavljuju daju prednost ekstrakciji CO_2 s dodatkom kootapala. Amonijak prilikom tlačenja rastapa brtve pumpe, reaktivan je, opasan za svakodnevnu upotrebu, dok je metanol na atmosferskom tlaku u tekućem stanju pa se nakon ekstrakcije iz ekstrakta naknadno mora ukloniti, a i temperatura postizanja superkritičnog stanja je relativno visoka (Luque de Castro i Jimenéz-Carmona, 2000). U superkritičnom stanju gustoća fluida približava se gustoći tekućine, viskoznost se približava viskoznosti normalnih plinova, a difuzija je dva reda veličine veća nego kod tipičnih tekućina (Brunner, 2005).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima ima puno više prednosti u odnosu na postupak ekstrakcije s organskim otapalima (Jokić, 2011):

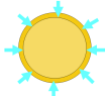




- Superkritični fluidi imaju sposobnost otapanja kao i organska otapala, ali s boljom difuzijom, nižom viskoznosti i manjom površinskom napetosti fluida (**Tablica 4**).

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva za plinovito, tekuće i superkritično stanje fluida

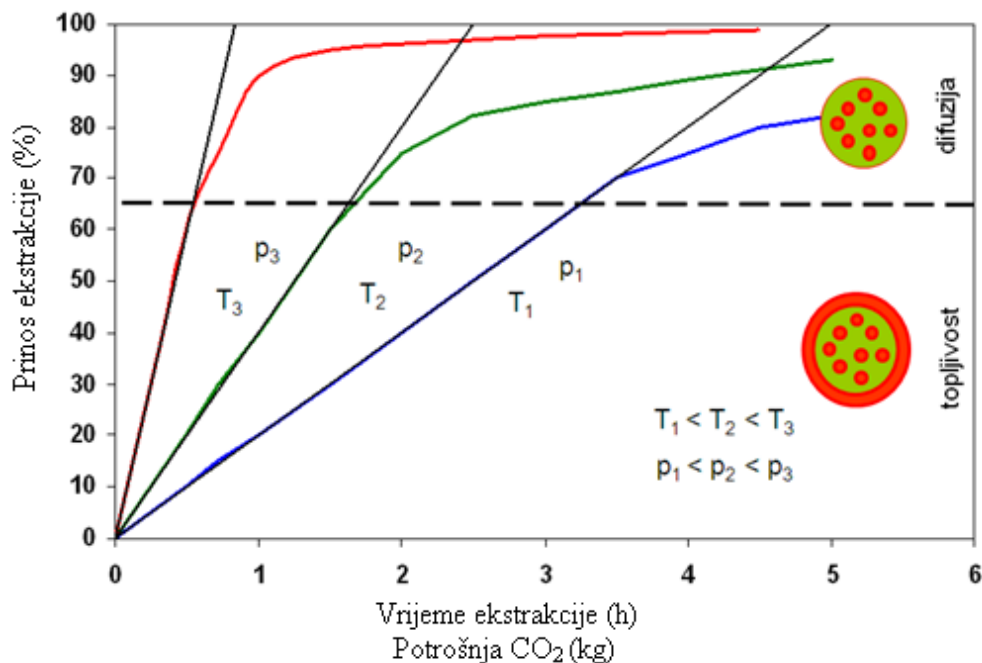
STANJE FLUIDA	Plin	Tekućina	Superkritični fluid
Gustoća (kgm^{-3})	1	300-900	1000
Koeficijent difuzije (cm^2s^{-1})	10^{-1}	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-5}
Viskoznost (Pa·s)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}

- Razdvajanje ekstrakta od otapala je lako i brzo zbog mogućnosti reguliranja topljivosti komponenata promjenom tlaka ili temperature.
- Dodavanjem kootapala (metanola, etanola, vode i drugih polarnih otapala) u CO_2 , moguće je poboljšati topljivost polarnih supstanci čime se postiže veća selektivnost prilikom separacije.
- Otapala korištena u superkritičnoj ekstrakciji su jeftina i sigurna za okoliš. Troškovi odlaganja nisu visoki, a u industrijskim procesima moguće je i recikliranje otapala.
- Ekstrahiranje termolabilnih komponenata s minimalnim deformacijama.
- Ekstrahiranje komponenata visokih temperatura ključanja na relativno niskim temperaturama.
- Zeleni proces.
- Ekstrakcija superkritičnim fluidima se može primijeniti na sustave različitog kapaciteta od analitičkih (manje od grama do nekoliko grama uzorka), preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), poluindustrijskih postrojenja (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone sirovine; npr. postrojenje za dekofeinizaciju kave i čaja) (Jokić, 2011).

Proces ekstrakcije superkritičnim fluidima odvija se u pet uzastopnih faza (Jokić, 2011):

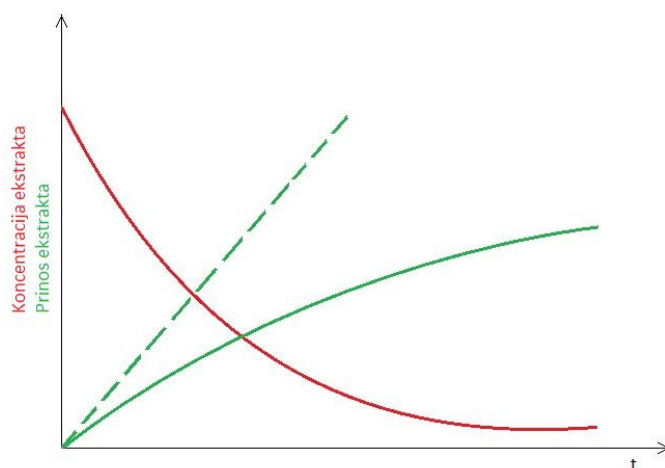
1. difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje; 
2. prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala; 
3. kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari; 
4. difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice; 
5. difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida. 

Najbolji prikaz proces ekstrakcije je preko ekstrakcijskih krivulja iz kojih je vrlo lako iščitati podatke o masi dobivenog ekstrakta u odnosu na vrijeme ekstakcije, masi utrošenog CO₂ odnosno podatak o specifičnoj potrošnji (kg CO₂/ kg materijala) (Slika 10).

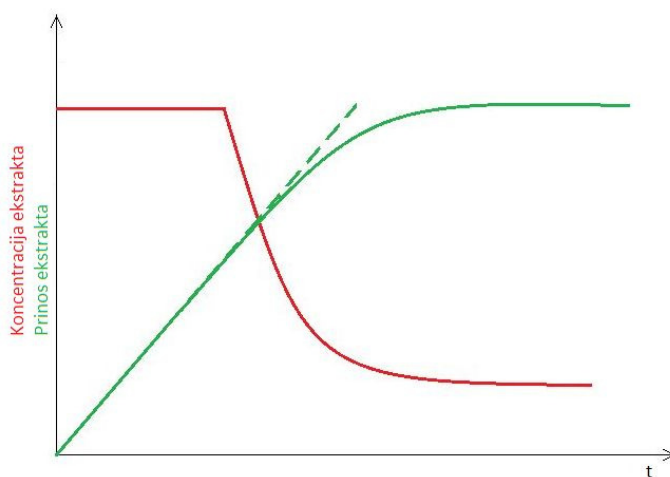


Slika 10. Prikaz krivulja ekstrakcije (Jokić, 2011)

S obzirom da postoje materijali s manjim ili većim udjelom topljivog dijela ekstrakta u svom sastavu ekstrakcijska krivulja i brzina ekstrakcije bit će različita za svaki odabrani materijal. Kod materijala s manjim udjelom topljivog ekstrakta proces ekstrakcije je nestacionaran od samog početka ekstrakcije i koncentracija ekstrakta u superkritičnom fluidu neprekidno se smanjuje (**Slika 11**). Nadalje, kod materijala s većom količinom topljivog dijela ekstrakta javljaju se 2 faze, gdje je u prvoj fazi proces ekstrakcije stacionaran i nema promjene koncentracije ekstrakta u superkritičnom fluidu, dok u drugoj fazi proces postaje nestacionaran odnosno dolazi do neprekidnog smanjenja koncentracije ekstrakta u superkritičnom fluidu (**Slika 12**) (Jokić, 2011; Nikolovski, 2009; Mukhopadhyay, 2000).



Slika 11. Promjena koncentracije i prinosa ekstrakta u ovisnosti o vremenu kod materijala s manjom količinom topljivog dijela ekstrakta



Slika 12. Promjena koncentracije i prinosa ekstrakta u ovisnosti o vremenu kod materijala s većom količinom topljivog dijela ekstrakta

Najznačajniji čimbenici koji imaju izravan utjecaj na sam tijek ekstrakcije su:

- tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije te protok otapala;
- gustoća, viskoznost i difuzivnost otapala i supstance koja se ekstrahira;
- interakcije između molekula otapala, topljive supstance i netopljivog dijela krutog materijala (matriksa) u kome se nalazi topljiva supstanca, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije;
- dodatak različitih kootapala;
- oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica i
- poroznost sloja (Jokić, 2011).

Gustoća je svakako jedan od najvažnijih čimbenika ekstrakcije superkritičnim fluidima i podložna je promjeni u ovisnosti o promjenama tlaka i temperature. Cilj ekstrakcije je svakako veća gustoća superkritičnog fluida čime se povećava interakcija superkritičnog fluida i materijala koji se ekstrahira što rezultira većom količinom dobivenog ekstrakta. Međutim sama gustoća ne objašnjava potpuno povećanje topljivosti. Isparljivost, tj. povećanje tlaka pare ekstrahiranog materijala u reciprocitativnoj je vezi s gustoćom superkritičnog fluida. Sukladno navedenom, izobarnim povećanjem temperature dolazi do smanjenja gustoće superkritičnog fluida, tj. smanjuje se topljivost prema efektu gustoće, ali dolazi i do povećanja tlaka pare ekstrahiranog materijala, pa se povećava topljivost prema efektu isparljivosti (Jokić, 2011; Mukhopadhyay, 2000).

2.3.1. Superkritični ugljični dioksid

Najčešće korišteno otapalo u superkritičnom stanju je ugljični dioksid (CO₂) koji se, bez obzira što nema najblaže uvjete postizanja superkritičnog stanja, najčešće koristi upravo zbog svojih svojstava i brojnih prednosti, iako su detaljno ispitani i drugi fluidi kao superkritična otapala poput etana, propana, heksana, pentana, butana, dušičnog oksida i dr. (Temelli, 2009; Demirbas, 2001). U **Tablici 5** prikazane su fizikalno kemijske vrijednosti različitih superkritičnih otapala. Bilo koji fluid može se koristiti kao superkritično otapalo, međutim tehnička održivost (kritična svojstva), toksičnost, troškovi i sposobnost topljivosti određuju koje otapalo je najbolje za određenu primjenu (Pereira i sur., 2010). Superkritični CO₂ kao novo *zeleno* otapalo razmatra se intenzivno posljednjih godina te se pokazao kao vrlo poželjno otapalo u separacijskim procesima budući da je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, kao i zbog toga što je ekološki

prihvatljivo i GRAS (generalno prihvaćen kao sigurno) otapalo. Nadalje, s tehničkog gledišta posjeduje dobre osobine postizanja superkričnog stanja ($T_c = 31,06 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_c = 7,38 \text{ MPa}$) (Herrero i sur., 2010; Damjanović i sur., 2005). Ekstrakcija superkričnim CO_2 spada u "čiste tehnologije" jer nema sekundarnih proizvoda štetnih za okolinu i kao takva nalazi značajno mjesto u prehrambenoj industriji.

Tablica 5. Fizikalno kemijska svojstva pojedinih superkričnih fluida

OTAPALO	T_c (K)	P_c (MPa)	ρ_c (gcm^{-3})
Metan	191	4,06	0,162
Etilen	282	5,03	0,218
Dušikov oksid	310	7,34	0,445
Ugljični dioksid	304	7,38	0,468
Dietil-eter	467	3,64	0,265
Heksan	507	3,05	0,230
Aceton	508	4,70	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Amonijak	405	11,3	0,225
Voda	647	22,0	0,322

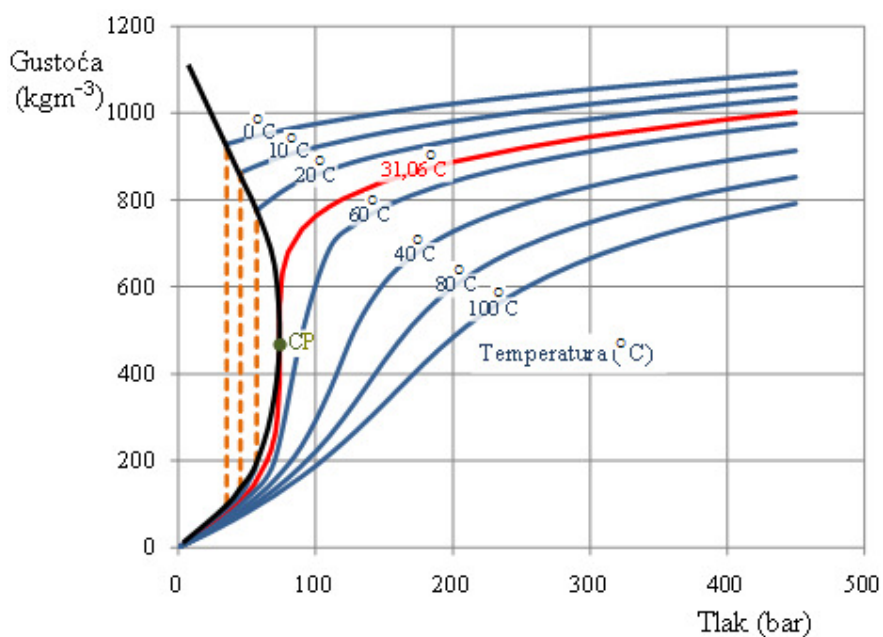
Snaga otapanja superkričnog CO_2 može se sažeti u nekoliko pravila (Jokić, 2011; Brunner, 2005):

- otapa nepolarne ili blago polarne spojeve (alkani, alkeni, terpeni);
- snaga otapanja za spojeve male molekularne mase je visoka i smanjuje se sa povećanjem molekularne mase;
- kisikovi organski spojevi s niskom ili srednjom molekularnom masom (ketoni, esteri, alkoholi) su vrlo topljivi;
- proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli, voćne kiseline i glikozidi su netopljivi;
- superkrični CO_2 ima sposobnost odvajanja spojeva koji su manje isparljivi, imaju veću molekularnu masu i / ili su više polarni, s porastom tlaka;
- pigmenti su slabo topljivi;
- voda ima slabu topljivost (<0,5% m/m) na temperaturama ispod $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

CO_2 je pogodno otapalo za ekstrakciju lipofilnih nepolarnih sastojaka. Kao takav, on ima nizak afinitet prema polarnim spojevima. To je jedan od glavnih nedostataka ekstrakcije superkričnim CO_2 . Niski polaritet superkričnog CO_2 može se prevladati upotrebom

polarnih modifikatora (kootapala, uglavnom etanola i metanola) za promjenu polariteta superkritičnog fluida s ciljem povećanja snage otapanja prema komponenti od interesa. Prema [Herrero i sur. \(2010\)](#), dodavanjem malog postotka metanola (1-10% vol) u CO₂ povećava se prinos ekstrakta s više polarnih komponenti.

Moć otapanja stlačenog CO₂ može se opisati preko gustoće tekućine. Gustoća CO₂ se kreće od 0,15 do 1,0 gcm⁻³, i ovisi o glavnim procesnim parametarima, tlaku i temperaturi (**Slika 13**). Najjednostavniji način kako bi se razumjela svojstva i CO₂ i superkritičnog CO₂ je pomoću prikaza ovisnosti gustoće CO₂ o promjeni tlaka pri konstantnoj temperaturi. U superkritičnoj stanju, iznad kritične vrijednosti temperature i tlaka, gustoća se može podešavati promjenom tlaka ili temperature ([Jokić i sur. 2014a](#); [Levelt Sengers, 2000](#)).



Slika 13. Ovisnost gustoće CO₂ o tlaku i temperaturi ([Jokić, 2011](#))

Time se mijenja se sposobnost otapanja CO₂ u širokim granicama te je omogućeno da se iz biljnog materijala dobiju eterična i biljna ulja, začini i aromatične komponente, kao i komponente s antioksidacijskim, antibakterijskim i farmakološki aktivnim djelovanjem ([Jokić, 2011](#)). Što se tiče biljnih matriksa, najbrojniji ekstrakti su jestiva ulja, gdje su triacilgliceroli glavni sastojci. Oni su esteri masnih kiselina i glicerola ([Sahena i sur., 2009](#)). Razlika u molarnoj masi i broju nezasićenih veza u molekuli masnih kiselina čine glavnu razliku u fizikalnim i nutritivnim svojstvima triacilglicerola ([Soares i sur., 2007](#)). Tipični izvori za jestiva

ulja su: palma, soja, suncokret, uljana repica, kikiriki, lan, kokosa, maslina, kukuruz i sezam. Klasifikacija ulja dobivena pomoću ekstrakcije superkritičnim CO₂ mogu se podijeliti u sljedeće kategorije:

1. Specijalna ulja, kao što su ulja orašastog voća (badema, lješnjaka, kikirikija, oraha, pistacija);
2. Ulja iz koštica i sjemenki (marelice, višnje, lana, grožđa, bundeve, sezam i dr.);
3. Ulja iz klica žitarica (amarant, zob, rižine posije i pšenične klice);
4. Ulja iz sjemenki voća i povrća (mrkve, komine masline, rajčice i dr.) (Temelli i sur. 2009).

Vrlo zanimljivo područje istraživanja su specijalna ulja gdje ekstrakcija superkritičnim fluidima igra važnu ulogu u očuvanju jedinstvenih okusa i aroma. Ulja orašastog voća sadrže visoku razinu bioaktivnih komponenata, koje imaju pozitivnu ulogu na zdravlje ljudi, poput polinezasićenih masnih kiselina, tokoferola, tokotrienola, fitosterola, karotenoida i skvalena. Popis najviše istraživanih ulja iz uljarica dobivenih pomoću superkritičnog CO₂ u posljednjih deset godina prikazan je u **Tablici 6**.

Tablica 6. Primjeri primjene ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ u dobivanju jestivih ulja u posljednjem desetljeću

MATERIJAL	REFERENCE
Kukuruzna klica	(Rebolleda i sur., 2012; Nagy i sur., 2008)
Luk	(Jin i Tong, 2014)
Pšenične klice	(Özcan i sur., 2013; Jiang i Niu, 2011; Gelmez i sur., 2009; Piras i sur., 2009; Eisenmenger i Dunford, 2008; Shao i sur., 2008; Zacchi i sur., 2006; Eisenmenger i sur., 2006)
Rižine posije	(Tomita i sur., 2014; Yoon i sur., 2014; Jalilvand i sur., 2013; Jesus i sur., 2010; Chen i sur., 2008)
Sjemenka peršina	(Louli i sur., 2004)
Koštica badema	(Zhang i sur., 2009; Ma i sur., 2007; Leo i sur., 2005)
Koštica breskve	(Mezzomo i sur., 2009, 2010; Sánchez-Vicente i sur., 2009)
Sjemenka bundeve	(Durante i sur., 2014; Hrabovski i sur., 2012; Mitra i sur., 2009; Sovilj i Barjaktarović, 2005; Bernardo-Gil i Lopes, 2004; Wenli i sur., 2004)
Sjemenka dinje	(Bimakr i sur., 2013; Nyam i sur., 2011,2010)
Sjemenka grožđa	(Rombaut i sur., 2014; Prado i sur., 2012; Dalmolin i sur., 2011; Passos i sur., 2010; Da Silva i sur., 2008; Bravi i sur., 2007; Fiori, 2007, 2010; Beveridge i sur., 2005)

2. Teorijski dio

Sjemenka jojobe	(Salgin, 2007; Salgin i sur., 2004)
Sjemenka kikirikija	(Dong i Gu, 2010)
Sjemenka konoplje	(Aladić i sur., 2014; Da Porto i sur., 2012a,b,c, 2014; Tomita i sur., 2013; Kriese i sur., 2004)
Sjemenka lana	(Galvão i sur., 2013; Pradhan i sur., 2010; Özkal, 2009; Jiao i sur., 2008; Nikolovski i sur., 2008; Morrison III i sur., 2006)
Sjemenka divljeg lana	(Moslavac i sur., 2014)
Jezgra lješnjaka	(Ciurlia i sur., 2009; Bernardo-Gil i Casquilho, 2007)
Sjemenka marakuje	(Cardoso De Oliveira i sur., 2013; Liu i sur., 2009)
Sjemenka marelice	(Özkal i sur., 2005, 2006)
Jezgra oraha	(Zhong i sur., 2013; Martínez i sur., 2008; Bernardo-Gil i Casquilho, 2007; Salgin i Salgin, 2006)
Sjemenka palme	(Ab Rahman i sur., 2012; Akanda i sur., 2012; Krishnaiah i sur., 2012; Hong i sur., 2010; Norhuda i Jusoff, 2009; Norhuda i Omar, 2009; Zaidul i sur., 2006a,b; 2007a,b,c; Norulaini i sur., 2004 a,b)
Sjemenka pamuka	(Bhattacharjee i sur., 2007)
Pistacija	(Sheibani i Ghaziaskar, 2008)
Sjemenka rajčice	(MacHmudah i sur., 2012; Eller i sur., 2010; Cadoni i sur., 2000)
Sjemenka soje	(Wilkinson i sur., 2014; Da Silva i sur., 2012; Jokić i sur., 2010, 2011a,b, 2012, 2013; Artz i sur., 2005)
Sjemenka suncokreta	(Boutin i sur., 2011; Nimet i sur., 2011; Fiori, 2009; Boutin i Badens, 2009; Salgin i sur., 2006)
Sjemenka uljane repice	(Wan i sur., 2014; Cvjetko i sur., 2012; Yu i sur., 2012; Uquiche i sur., 2012; Boutin i sur., 2011)
Sjemenka višnje	(Yilmaz i Gökmen, 2013)
Sjemenka boražine	(Soto i sur., 2008; Venskutonis i sur., 2008; Lu i sur., 2007; Kotnik i sur., 2006)
Sjemenka celera	(Marongiu i sur., 2013; Mišić i sur., 2008)
Sjemenke chie	(Ixtaina i sur., 2010, 2011; Uribe i sur., 2011)
Sjemenka divljeg šipka	(del Valle i sur., 2004; Machmudah i sur., 2007)
Sjemenke uljane repice)	(Jenab i Temelli, 2013; Pederssetti i sur., 2011; Li i sur., 2010; Dong i Walker, 2008)
Sjemenke sezama	(Botelho i sur., 2014; Honarvar i sur., 2013; Corso i sur., 2010; Döker i sur., 2010; Rajaei i sur., 2008)
Sjemenke vučjeg trna	(Kagliwal i sur., 2011; Yang i sur., 2009, 2011; Sajfrtová i sur., 2010; Sovová i sur., 2010; Xu i sur., 2008; Menvielle-Bourg i Joanny, 2009; Beveridge i sur., 2004; Derevich i Shindyapkin, 2004)

2.4. PROJEKTIRANJE UREĐAJA ZA EKSTRAKCIJU SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Matematičko modeliranje u procesima ekstrakcije superkritičnim fluidima ima veliku važnost s obzirom na to da omogućava relativno brzo i jeftino procjenjivanje utjecaja različitih procesnih parametara na izlazne varijable procesa uz smanjenje broja potrebnih eksperimentalnih podataka (Jokić, 2011). Mnogi matematički modeli, predstavljeni u literaturi, opisuju proces ekstrakcije superkritičnim fluidima (Jokić i sur., 2011c; Oliveira i sur., 2011; Valle i Fuente, 2006). Ali niti jedan od matematičkih modela danih u literaturi u potpunosti ne zadovoljava zahtjev jednog univerzalnog matematičkog modela kojim bi se opisao proces ekstrakcije superkritičnim fluidima. Razlog za to je izuzetno velika raznolikost ekstrakcijskih procesa koji obuhvaćaju mnogo različitih prirodnih sirovina za koje mogu biti vezani različiti kemijski spojevi.

Kod projektiranja procesne opreme za ekstrakciju superkritičnim fluidima osim poznavanja fazne ravnoteže, poznavanje mehanizama prijenosa tvari od iznimne je važnosti. Većina matematičkih modela koji opisuju ekstrakcijske krivulje temelje se na bilanci tvari, fenomenima prijenosa topline i tvari u procesu ekstrakcije. Sloj punjenja materijala u ekstraktoru može se podijeliti u dvije faze: (a) kruta faza, koja se sastoji od sirovine iz koje se dobiva ekstrakt i (b) fluidna faza, koja se sastoji od superkritičnog otapala s topljivom supstancom u njemu (Brunner, 1984). Pretpostavlja se da je ekstraktor cilindričnog oblika te da superkritično otapalo prolazi aksijalno kroz sloj materijala u ekstraktoru pri čemu odnosi topljivu supstancu iz krute faze. Objе faze, i kruta i tekuća, zauzimaju volumen ekstraktora. Prema ovim pretpostavkama, bilance tvari u obje faze mogu se prikazati sljedećim izrazima ((2.1) - (2.2)):

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u_i \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{ay} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(x, y)}{\varepsilon} \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} u_i \left(D_{ax} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(x, y) \rho_f}{(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (2.2)$$

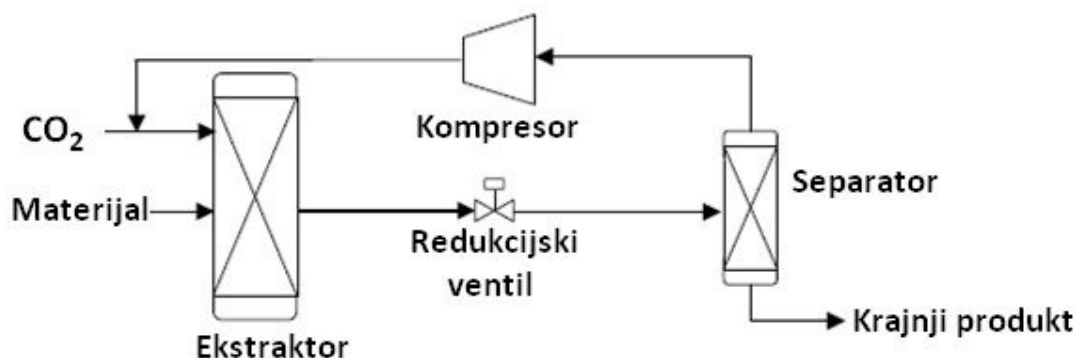
gdje je:

- x, y bezdimenzionalna koncentracija čvrste i tekuće faze (kgkg^{-1})
- u_i brzina otapanja (ms^{-1})
- h aksijalna koordinata sloja materijala u ekstraktoru (m)

- D_{ax} difuzijski koeficijent u čvrstom sloju (m^2s^{-1})
 D_{ay} aksijalni disperzijski koeficijent (m^2s^{-1})
 ρ_f, ρ_s gustoća fluida i gustoća čestica krutog materijala (kgm^{-3})
 $J(x,y)$ prijenos mase na međusloju (s^{-1}).

Kao što se može vidjeti iz jednadžbi (2.1) i (2.2) fenomeni prijenosa tvari koji postoje tijekom procesa superkritične ekstrakcije su sljedeći: akumulacija u obje faze, konvekcija i disperzija u tekućoj fazi, difuzija u krutoj fazi i površinski prijenos tvari. Razlika između modela danih u literaturi je u njihovom tumačenju pojedinih fenomena i zanemarivanja nekih od njih (Oliveira i sur., 2011).

Svaki proces ekstrakcije superkritičnim fluidom sastoji se od četiri osnovne komponente kako slijedi: kompresora ili pumpe visokog tlaka, ekstraktora, redukcijskog ventila i separator. Osnovni prikaz takvog procesa dan je na Slici 14.



Slika 14. Osnovni shematski prikaz uređaja za ekstrakciju superkritičnim fluidima

Detaljan prikaz projektiranja jednog takvog sustava za ekstrakciju superkritičnim fluidima prikazan je u poglavlju (Prilog 1) pod nazivom „Design of SFE system using a holistic approach - problems and challenges“ (Jokić i sur., 2014b).

2.5. PRIJENOS REZULTATA IZ LABORATORIJSKOG U INDUSTRIJSKO MJERILO ZA EKSTRAKCIJU SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Jedan od čimbenika koji zahtijevaju najviše pozornosti je proširenje i primjena dobivenih rezultata sa laboratorijskih na pilot (poluindustrijska) i industrijska postrojenja. Ovaj proces je u većini slučajeva vrlo složen i poznat je pod terminom engl. "scale-up". Ukoliko se želi optimirati proces ekstrakcije, ili se pak želi povećati kapacitet i dimenzije uređaja (scale-up),

tada je potrebno matematički opisati proces prijenosa tvari odgovarajućim modelom. Matematički modeli se primjenjuju u cilju kvantitativnog opisivanja kinetike različitih ekstrakcijskih procesa. Proučavanje kriterija tzv. *scale-up* ekstrakcije superkritičnim fluidima je vrlo važno za uspostavu metodologije koja omogućava predviđanje ponašanja procesa na industrijskoj razini od laboratorijskih podataka. Razumijevanje utjecaja različitih parametara na proces ekstrakcije superkritičnim fluidima je od iznimne važnosti. Poznavanje tih učinaka nije samo bitno za optimizaciju i ekonomsku evaluaciju procesa, nego i za sposobnost predviđanja procesa ekstrakcije kao i za projektiranje industrijskog postrojenja (Han i sur., 2009; Mezzomo i sur., 2009). Mnogo je izazova, ali isto tako i problema u metodi prijenosa rezultata iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo u tehnologiji ekstrakcije superkritičnim fluidima (Mezzomo i sur., 2009; Meireles 2008; Kotnik i sur, 2007; Martinez i sur, 2007; Moura i sur, 2005; Del Valle i sur, 2004). Neki od njih su navedene u nastavku.

Izazovi u tehnologiji ekstrakcije superkritičnim fluidima su sljedeći:

- Izvediv dizaj za prijenos podataka iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo koji je potreban za buduću komercijalizaciju industrijskih postrojenja;
- Modeliranje u postupku *scale-up*;
- Kontinuirana poboljšanja opreme i instrumenata;
- Kontinuirana istraživanja, razvoj aplikacija i dizajna za nove materijale (Jokić i sur. 2014b).

Problemi u tehnologiji ekstrakcije superkritičnim fluidima:

- Literatura o *scale-up* postupku ekstrakcije superkritičnim fluidima je ograničena na matematičke izraze za preliminarnu procjenu i investicijskih i operativnih troškova;
- Neki autori tvrde da je proces ekstrakcije superkritičnim fluidima učinkovitiji kod većih razmjera, ali izvješća pokazuju niže prinose što je omjer prijenosa veći;
- Jedan od problema kod *scale-up* procedure je korištenje malih ekstraktora za određivanje ekstrakcijskih krivulja, što utječe na rezultate zbog gubitaka u cijevima i na stjenkama opreme (Jokić i sur., 2014b).

Zbog eksperimentalnih problema i činjenice da ne postoji konsenzus, na ovom području je potrebno više znanstvenih istraživanja. Del Valle i sur. (2004) predložili su s obzirom da nekoliko parametara utječe na proces ekstrakcije superkritičnim fluidima, kriteriji

učinkovitog povećanja (scale-up) trebaju uključiti utjecaj interakcije među tim parametrima. S druge strane, korištenje jednostavnih kriterija pridonosi razvijanju jednostavnijih metoda za proširenje (scale-up) koje će smanjiti vrijeme i troškove korištene za razvoj procesa ekstrakcije superkritičnim fluidima. Prijenos podataka iz laboratorijskog u pilot ili industrijsko mjerilo kod ekstrakcije superkritičnim fluidima može biti proveden prema sljedećem postupku (Clavier i Perrut, 2004):

1. Prvo se trebaju provesti određena eksperimentalna istraživanja u malom mjerilu radi utvrđivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije praćenjem različitih procesnih parametara poput tlaka ekstrakcije, temperature ekstrakcije, protoka otapala, itd.
2. Izbor metode scale-up prema mehanizmu koji kontrolira proces ekstrakcije (topljivost/difuzija) je od iznimne važnosti (Jokić i sur., 2014b).

2.6. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija općenito podrazumijeva poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa (odziva) uz što manje troškove. Pojam optimizacije je uobičajeno korišten u analitičkoj kemiji kao sredstvo otkrivanja uvjeta u kojima se primjenjuju postupci koji stvaraju najbolji mogući odziv. Tradicionalno se optimizacija u analitičkoj kemiji provodila zbog praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na neki eksperimentalni odziv. Kod ovakve optimizacije jedan faktor je bio podložan promjeni dok se drugi držao na konstantnoj razini (Bezerra i sur., 2008). Budući da većina tehnoloških procesa ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre nije moguće dobiti stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces. Razlog tome je što takav pristup optimizaciji zahtjeva veliki utrošak vremena i veliki broj eksperimenata, a ne uzima u obzir interakciju promatranih parametara procesa. Međutim u novije vrijeme sve se više u optimizaciji procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa (Liyana-Pathirana, 2005).

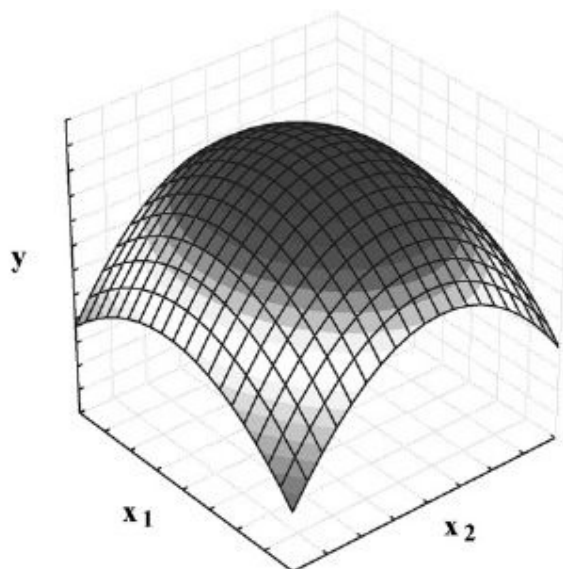
Metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology* - RSM) spada u najčešće korištene postupke statistički planiranih eksperimenata. Ova metoda predstavlja skup empirijskih i statističkih tehnika kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nezavisnih varijabli (faktori, procesni parametri) na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja,

razvoja i optimiranja procesa. Metodu odzivnih površina prvi su uveli Box i Wilson sredinom 20. stoljeća, a kasnijoj popularizaciji ove tehnike pridonio je Montgomery. Ovaj pojam je nastao iz grafičke perspektive nastale nakon prilagodbe matematičkog modela, a njegova upotreba je široko prihvaćena i korištena u istraživanjima o kemometriji ([Bezerra i sur., 2008](#); [Edwards i Jutan, 1997](#); [Myers i Montgomery, 1995](#)).

Osnovni koraci u primjeni metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta su sljedeći:

- odabir nezavisnih varijabli (parametara) koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara;
- izbor dizajna eksperimenta i provođenje eksperimenta prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara;
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko-statističkih metoda;
- evaluacija prikladnosti modela;
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli ([Bezerra i sur., 2008](#)).

Osnovna ideja metode je dobiti odnos utjecajnih faktora (nezavisnih varijabli) na zavisnu varijablu (odziv) preko odzivne funkcije, te razlučiti na koji način članovi modela (ulazni parametri) utječu na promatrani odziv. Prije primjene ove metode potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti iz ispitivanog eksperimentalnog područja. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna ploha. Odzivna funkcija je funkcija koja opisuje odzivnu plohu (**Slika 15**) i ona prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoj funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i proračunati koeficijente jednadžbe.



Slika 15. Primjer prikaza odzivne plohe

Odabir dizajna eksperimenta ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Dizajn eksperimenta za modele prvog reda koristi se samo u slučajevima kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulje odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Tada je dobivena aproksimacijska funkcija modela prvog reda (2.3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots \beta_i \cdot x_i + \varepsilon \quad (2.3)$$

Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije. Međutim za aproksimaciju eksperimentalnih podatka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine odnosno dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom)(2.4):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^I \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^I \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{i=2}^I \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \quad (2.4.)$$

gdje su:

Y - modelom predviđena odzivna funkcija,

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

$x_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti).

Koeficijenti odzivne funkcije (modela) određuju se metodom najmanjih kvadrata. Nakon određivanja koeficijenata odzivne funkcije radi se analiza i test adekvatnosti odzivne funkcije primjenom analize varijance (ANOVA) ili studentovog *t*-testa čime se ističu oni faktori ili njihove interakcije koji značajno utječu na promatrani proces.

Termini u metodi odzivnih površina su sljedeći:

- **eksperimentalna domena** – predstavlja područje ispitivanja unutar raspona minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli;
- **plan pokusa** – predstavlja plan određen matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli;
- **faktori ili nezavisne varijable** – varijable koje se mogu mijenjati neovisno jedne od drugih i koje su kontrolirane tijekom procesa;
- **razina varijabli** – različite razine vrijednosti varijabli pri kojima će se pokus provesti da bi se optimirao neki proces;
- **odziv ili zavisne varijable** – predstavljaju izmjerene vrijednosti u pokusu;
- **ostatak** – predstavlja razliku između izračunatih i eksperimentalno određenih vrijednosti kao dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom. Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom predstavljena je niskim vrijednostima ostataka (Lukinac Čačić, 2012).

Glavni cilj kod izbora plana pokusa je odabir onog koji će dovoljno dobro opisati promatranu pojavu, uz minimalni utrošak resursa. Stoga je odabir modela planova pokusa osnovni problem eksperimentiranja. U literaturi postoje već razrađeni algoritmi koji rješavaju problem okvirnog odabira modela plana pokusa, a obzirom na prirodu pojave koja se promatra i želi opisati (Bas i Boyaci, 2007; Montgomery i sur., 2000).

Nekoliko najčešćih oblika plana pokusa:

- Centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Central composite design*, CCD)
- Plošno centrirani kompozitni plan (engl. *Face centred composite design*, CCF)
- Faktorijalni plan pokusa (engl. *Full factorial design*, FFD)
- Doehlert pokus (engl. *Doehlert design*, DD) itd.

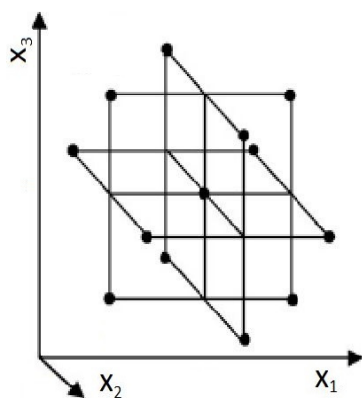
Navedeni planovi pokusa razlikuju se obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli (Bezzer, 2008). Odabir plana pokusa ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Plan pokusa za modele prvog reda koristi se samo u slučajevima kada se eksperimentalne vrijednosti međusobno zavisnih varijabli mogu

aproksimirati linearnom funkcijom. Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije (npr. faktorijalni dizajn) (Myers i Montgomery, 1995).

Međutim za aproksimaciju nelinearnih eksperimentalnih podataka koristi se plan pokusa za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: trofaktorijalni plan pokusa na tri razine, Box-Behnken-ov plan pokusa, centralno kompozitni plan pokusa. Takvi modeli daju funkcionalnu zavisnost mjerene varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama te njihovoj interakciji, kao i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma) (Bezerra i sur., 2008).

2.6.1. Box-Behnken plan pokusa

Box-Behnken plan pokusa (BBD) ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti. Box-Behnkenov dizajn (Slika 16) predlaže kako odabrati točke eksperimenta kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenta matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn je učinkovit i efikasan zbog mogućnosti ispitivanja većeg broja varijabli i to od 3 do 10.



Slika 16. Box-Behnken plan pokusa (Bezerra i sur., 2008)

Osnovne karakteristike ovoga dizajna su sljedeće:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu (2.5):

$$N = 2^k (k - 1) + b_p \quad (2.5)$$

gdje je k broj faktora, a b_p je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina (**Tablica 7**).

Tablica 7. Eksperimentalna matrica za BBD za tri varijable (Tekindal i sur., 2012)

Broj	Box-Behnken eksperimentalni dizajn		
	A	B	C
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- Pripremiti materijal za ekstrakciju – usitnjavanje s ciljem povećanja površine uzorka (IKA A11 basic); klasiranje prosijavanjem na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200, Njemačka) i utvrđivanje raspodjele veličina čestica.
- Izvršiti kruto-tekuća ekstrakciju ulja iz sjemenki konoplje pomoću heksana (Soxhlet standard).
- Izvršiti hladno prešanje i proizvesti konopljino ulje na kontinuiranoj pužnoj preši tipa SPU 20 (ElektroMotor-Šimon d.o.o., Senta, Srbija) pri različitim uvjetima prešanja.
- Odrediti osnovne parametre kvalitete konopljinog ulja (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, voda, netopljive nečistoće, anisidinski broj, Totox broj).
- Odrediti oksidacijsku stabilnost konopljinog ulja.
- Projektirati i izraditi laboratorijski uređaj za ekstrakciju superkričnim CO₂ na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale u suradnji s tvrtkom Đuro Đaković Aparati d.o.o. (Slavonski Brod, Hrvatska).
- Izvršiti ekstrakciju ulja iz sjemenki konoplje i iz pogače koja zaostaje nakon procesa prešanja ulja pomoću superkričnog CO₂ na novo konstruiranom uređaju.
- Ispitati utjecaj različitih procesnih uvjeta ekstrakcije pomoću superkričnog CO₂ (tlak, temperatura, protok fluida) na iskorištenje konopljinog ulja.
- Optimirati proces hladnog prešanja i ekstrakcije superkričnim CO₂ konopljinog ulja metodom odzivnih površina uz primjenu programa *Design Expert*[®].
- Frakcionirati konopljino ulje (skupljanjem frakcija ulja periodično tijekom procesa ekstrakcije) u svrhu određivanja značajnih makro i mikrokomponentata u dobivenim frakcijama.
- Identificirati i kvantificirati masne kiseline u dobivenim ekstraktima/frakcijama metodom plinske kromatografije s plamenim detektorom.
- Identificirati i kvantificirati pojedinačne tokoferole u dobivenim ekstraktima/frakcijama metodom plinske kromatografije s masenim detektorom.
- Odrediti sadržaj klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida u dobivenim uljima.
- Obraditi eksperimentalno dobivene podatke uz korištenje komercijalnih računalnih programa.

3.2. MATERIJAL

3.2.1. Sjemenke industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

U radu su korištene ekološki uzgojene sjemenke industrijske konoplje sorte Fedora 17 (**Slika 17** i **Slika 18**) proizvođača Organica Vita (Vraneševci, Hrvatska). Ova vrsta industrijske konoplje se uzgaja isključivo za proizvodnju sjemenja koja služe kao sirovina za proizvodnju konopljinog ulja.



Slika 17. Industrijska konoplja tip Fedora 17 ([WEB 2](#))



Slika 18. Sjemenke industrijske konoplje

3.2.2. Kemikalije

U istraživanju je korišten *n*-heksan p.a. kao organsko otapalo (proizvođač Carlo Erba, Francuska) za određivanja udjela ulja u sjemenkama konoplje.

Za određivanje parametara kvalitete (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, udio vlage, netopljive nečistoće, anisidinski broj, Totox broj) korištene su sljedeće kemikalije p.a. čistoće:

- 0,1 M vodena otopina natrij hidroksida;
- 0,5 M vodena otopina kalij hidroksida i klorovodične kiseline;
- Neutralizirana smjesa etiletera i 96%-tnog etanola (1:1);

- 1%-tna otopina fenolftaleina u 96%-tnom etanolu;
- Smjesa ledene octene kiseline i kloroforma (3:2);
- Hladno zasićena otopina kalij jodida (14 g kalij jodida otopi se u 10 ml svježe prokuhane i ohlađene vode);
- 0,1 M otopina natrij tiosulfata;
- 1%-tna otopina škroba;
- Destilirana voda;
- Petroleter;
- Fenolftalein;
- Natrijev sulfat;
- Izooktan;
- *p*-anisidin;

Za određivanje oksidacijske stabilnosti korišteni su sljedeći prirodni antioksidansi:

- ekstrakt ružmarina – Oxy Less CS (proizvođač Naturex, Francuska);
- ekstrakt zelenog čaja (proizvođač Naturex, Francuska);
- ekstrakt lista masline (proizvođač Naturex, Francuska);
- ekstrakt nara (proizvođač Naturex, Francuska);
- eterična ulja mente (*Mentha piperita*), origana (*Origanum vulgare*), primorskog vrijeska (*Satureja montana*), bosiljka (*Ocimum basilicum*), majčina dušica (*Thymus serpyllum*) dobivena su s Tehnološkog fakulteta Novi Sad (Srbija).

Za određivanje sastava masnih kiselina korištena je smjesa metilnih estera masnih kiselina:

- Supelco™ 37 Component FAME Mix (Bellefonte, Pennsylvania, SAD; engl. FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*).

Za određivanje tokoferola korišteni su sljedeći standardi:

- β -, γ - i δ -tokoferol proizvođača Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- α -tokoferol proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka).

Za određivanje klorofila *a* i *b* i kaortenoida korišten je:

- dietil eter, p.a.

Za laboratorijsku superkritičnu ekstrakciju korišten je CO₂ čistoće 99,97%, proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).

3.3. METODE

3.3.1. Hladno prešanje

Iz sjemenki industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) postupkom hladnog prešanja na laboratorijskoj pužnoj preši tipa SPU 20 (ElektroMotor-Šimon d.o.o., Senta, Srbija) proizvedeno je sirovo ulje.



Slika 19. Pužna preša tipa SPU 20

Pužna preša (**Slika 19**) se sastoji od dozirnog lijevka, komore za prešanje (koja se sastoji od glave preše s promjenjivim otvorima za pogaču različitih promjera i to 6, 8, 9, 10 i 12 mm), puža preše, elektromotorom pogonjen reduktorski mehanizam s automatskom kontrolom broja okretaja, te grijač glave preše s automatskom kontrolom temperature grijanja. Sjemenke je u početku potrebno dodavati postupno kako bi se izbjeglo začepljenje glave preše. Kapacitet preše je promjenjiv i iznosi, ovisno o vrsti materijala koji se preša, te o stanju i udjelu vlage u materijalu koji se preša, između $20\text{-}25\text{ kg h}^{-1}$, prema navodima proizvođača.

Postupak prešanja provodio se u sedamnaest različitih eksperimenata, sa masom polazne sirovine od 1 kg te uz promjenu polaznih parametara: temperature zagrijavanja glave preše (60, 80, 100 °C), frekvencije elektromotora (20, 30, 40 Hz), te veličine otvora glave pužne preše (6, 9, 12 mm). Sirovo ulje je skupljano u posebno pripremljene posude, a dobivena pogača (**Slika 20**) hlađena je na zraku i pohranjivana u polietilenske vrećice, te skladištena u

hladnjaku do daljnjih analiza. Dobiveno sirovo ulje se centrifugiralo, a postupkom dekantiranja odvojilo se bistro ulje od taloga.



a) b) c)

Slika 20. Pogača industrijske konoplje a) Ø12 b) Ø9 c) Ø6

3.3.2. Određivanje udjela vlage i ulja u sjemenkama i pogači industrijske konoplje

Udio vlage u sjemenkama industrijske konoplje određivan je standardnom metodom [AOAC 925.40 \(2000\)](#) u dva ponavljanja. U osušenu, izvaganu posudicu izvagalo se 5 g sjemenki te se posudica s podignutim poklopcem stavila u zagrijan sušionik (103 °C). Nakon 2 h sušenja posudica s poklopcem se stavila u eksikator na hlađenje do sobne temperature. Kada se ohladila, uzorak se izvagao te ponovo stavio s podignutim poklopcem u sušionik 1 h. Nakon toga se ponovo provodilo hlađenje i vaganje uzorka. Sušenje se ponavljalo do konstantne mase, odnosno dok razlika između dva uzastopna mjerenja nije bila najviše 0,005 g. Udio vlage u sjemenkama izračunat je prema sljedećem izrazu (3.1):

$$\text{udio vlage} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [\%] \quad (3.1)$$

gdje je:

m_0 - masa prazne posudice (g),

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

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

Udio ulja u sjemenci i pogači industrijske konoplje određeni su metodom po Soxhlet-u u automatskom destilacijskom uređaju SOXHTERM (**Slika 21**) prema ISO standardnoj metodi za određivanje ukupnih ulja i masti ([HRN ISO 6492:2001](#)).



Slika 21. Soxhterm ekstrakcijski uređaj za određivanje masti i ulja

U prethodne osušene ($103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) i izvagane čaše (točnost odvage $0,001 \text{ g}$) za ekstrakciju stave se ekstrakcijski tuljci s prethodno odvaganim uzorkom ($5 \pm 0,001 \text{ g}$). U čaše je preko tuljaca uliveno 120 ml *n*-heksana. Uređaj je potpuno automatiziran i potrebno je samo izabrati otapalo i temperaturni program. Vrijeme ekstrakcije iznosilo je 2 h i 45 min . Nakon ekstrakcije čaše su osušene na $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 1 h i potom izvagane. Sve analize su provedene u dva ponavljanja. Udio ulja izračunat je prema jednadžbi (3.2):

$$\text{Udio ulja} = \frac{(m_3 - m_4)}{m_5} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3.2)$$

gdje je:

m_3 - masa tikvice sa uljem (g),

m_4 - masa prazne tikvice (g),

m_5 - masa ispitivanog uzorka (g).

3.3.3. Određivanje proteina i vlakana u sjemenci i pogači industrijske konoplje

Udio proteina u uzorcima odredio se prema ISO standardnoj metodi [HRN EN ISO 5983-2:2010](#), a udio vlakana prema ISO standardnoj metodi [HRN EN ISO 5498:1999](#).

3.3.4. Određivanje parametara kvalitete konopljinog ulja

Nakon postupka hladnog prešanja sjemenki industrijske konoplje provelo se ispitivanje parametara kvalitete proizvedenog konopljinog ulja. Ispitivani su sljedeći parametri:

- volumen i temperatura sirovog prešanog ulja;

- peroksidni broj;
- udio slobodnih masnih kiselina;
- udio vlage u ulju;
- udio netopljivih nečistoća u ulju;
- udio ulja u pogači.

3.3.4.1 Određivanje volumena i temperature ulja dobivenog prešanjem

Volumen i temperatura sirovog ulja dobivenog prešanjem određen je neposredno nakon prešanja sjemenki uz pomoć menzure i termometra. Nakon toga je sirovo ulje centrifugirano na laboratorijskoj centrifugi. Bistro ulje je odvojeno od taloga dekantiranjem te je izmjeren njegov volumen pomoću menzure.

3.3.4.2 Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj (Pbr) uzoraka ulja određen je prema metodi [ISO 3960 \(1998\)](#). Pbr je indikator svježine odnosno užeglosti masti ili ulja. Metoda određivanja se zasniva na sposobnosti peroksida da oslobode jod iz otopine kalij jodida, koji se zatim određuju titracijom s otopinom natrijevog tiosulfata.

Oko 1 g ulja odvagalo se u erlenmayer tikvicu od 100 ml s točnošću od $\pm 0,005$ g. Dodano je 10 ml ledene octene kiseline i kloroforma, promiješano i potom dodano iz birete 0,2 ml otopine kalij jodida. Smjesa je mućkana jednu minutu, zatim se razrijedila s 20 ml prethodno prokuhane i ohlađene destilirane vode, dodano je 0,5 ml otopine škroba i odmah se titriralo sa 0,01M otopinom natrijevog tiosulfata. Peroksidni broj se izrazio u milimolima aktivnog kisika po kg ulja ili masti i izračunao prema sljedećem izrazu (3.3):

$$\text{Peroksidni broj} = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 5}{m_6} \quad [\text{mmol O}_2\text{kg}^{-1}] \quad (3.3)$$

gdje je:

v_1 - ml 0,01 M natrijevog tiosulfata utrošeni za glavnu probu,

v_2 - ml 0,01 M natrijevog tiosulfata utrošeni za slijepu probu,

m_6 - masa uzorka (g).

3.3.4.3 Određivanje slobodnih masnih kiselina

Udio slobodnih masnih kiselina (SMK) određen je prema standardnoj metodi [AOCS 940.28 \(1999\)](#). U erlenmayerovu tikvicu od 300 ml odvagano je 5 g ulja, zatim je dodano 50 ml neutralne smjese etera i etanola te je nježno promućkana smjesa. Zatim je dodano nekoliko kapi fenolftaleina i titriralo s 0,1 M otopinom natrij hidroksida do promjene boje. Udio slobodnih masnih kiselina u ulju izrazio se kao postotak oleinske kiseline koji označava udio slobodnih masnih kiselina u ulju. Udio oleinske kiseline izračunao se prema sljedećem izrazu (3.4):

$$\text{Udio oleinske kiseline} = \frac{(10 \cdot m_7)}{v_3} \cdot 0,282 \quad [\text{g OLAC} / 100 \text{ g ulja}] \quad (3.4)$$

gdje je:

m_7 - masa uzorka (g),

v_3 – volumen (ml) 0,1 M natrijevog hidroksida.

3.3.4.4 Određivanje udjela netopljivih nečistoća u ulju

Netopljive nečistoće (NN) u ulju predstavljaju uglavnom mehaničke nečistoće koje mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci (dijelovi biljke uljarica). Netopljive nečistoće u uzorcima ulja određivane su metodom [ISO 663 \(1992\)](#).

U Erlenmayer tikvicu od 250 mL s brušenim grlom i čepom, izvagalo se 20 g uzorka sirovog ulja te se dodalo 100 mL petroletera. Začepilo se i dobro se promućkalo te se ostavilo da stoji pri 20 °C u trajanju 20-30 min. Dobivena otopina se filtrirala kroz stakleni filter lijevak sa sinteriranim dnom uz ispiranje taloga istim otapalom. Stakleni filter lijevak se ostavio nekoliko minuta na zraku kako bi otparilo organsko otapalo te se nakon toga stavio u sušionik na 103 °C. Nakon sušenja se ohladio u eksikatoru i izvagao. Postupak sušenja, hlađenja i vaganja uzorka se ponavljao do postizanja konstantne mase te se računao prema izrazu (3.5):

$$\text{udio netopljivih nečistoća} = \frac{m_8 - m_9}{m_{10}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3.5)$$

gdje je:

m_8 - masa filter lijevka s nečistoćama nakon sušenja (g),

m_9 - masa osušenog filter lijevka (g),

m_{10} - masa uzorka (g).

3.3.4.5 Određivanje udjela vlage u ulju

Količina vlage i isparljivih tvari je važan pokazatelj kvalitete sirovih i rafiniranih biljnih ulja. Zbog prisustva vlage u ulju, pri određenim uvjetima, može doći do hidrolitičkih promjena što rezultira porastom kiselosti ulja. Također može dovesti do zamućena ulja što dovodi do smanjenja estetske vrijednosti ulja. Udio vlage u ulju određivan je metodom [AOAC 925.40 \(2000\)](#).

Izvagalo se 5 g uzorka za ispitivanje u prethodno osušenu, ohlađenu u eksikatoru i izvaganu staklenu posudicu sa poklopcem. Posudica sa uzorkom stavila se u sušionik na sušenje 2 h pri 103°C, te se ohladila u eksikatoru na sobnu temperaturu i izvagala. Postupak sušenja, hlađenja i vaganja ponavljao se sve dok gubitak mase između dva uzastopna mjerenja nije bio manji od 0,002 g. Udio vlage i isparljivih sastojaka ulja računao se prema navedenom izrazu (3.1).

3.3.4.6 Određivanje anisidinskog i totox broja

Metoda koja je upotrijebljena u ovom istraživanju za određivanje anisidinskog broja (AV) je standardna metoda [ISO 6885 \(2006\)](#). AV je definiran kao povećanje vrijednosti apsorbancije otopine uzorka ulja (1 g) u 100 mL mješavine otapala i reagensa (*p*-anisidina) mjenog na valnoj duljini 350 nm u kivetu od 10 mm. Uzorak ulja otopljen je u izooktanu (2,2,4-trimetilpentanu) uz dodatak *p*-anisidina i octene kiseline. Nakon stajanja od 10 minuta na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi mjereno je povećanje apsorbancije na 350 nm pomoću spektrofotometra (UV-1700 Shimadzu, Japan) i zatim izračunat AV prema izrazu (3.6):

$$AV = 100 \cdot Q \cdot \frac{V_a}{m_{11}} \cdot [1,2 \cdot (A_1 - A_2 - A_0)] \quad [\text{g l}_2/100\text{g ulja}] \quad (3.6)$$

gdje je:

Q - konstanta 0.01 (g/mL);

V_a – volumna konstanta 25 mL;

m_{11} - masa uzorka u gramima;

A_0 - apsorbancija ne reaktivne test otopine;

A_1 - apsorbancija reaktivne test otopine;

A_2 - apsorbancija slijepa probe;

1,2 - faktor korekcije za razrjeđenje test otopine dodatkom 1 mL ledene octene kiseline.

Totox broj (TV) nekog ulja se određuje jednostavno računski iz vrijednosti Pbr i AV (ISO 6885:2006) prema izrazu (3.7):

$$TV = (2 \times Pbr) + AV \quad (3.7)$$

gdje je:

Pbr - peroksidni broj izražen u $\text{mmol O}_2\text{kg}^{-1}$;

AV- anisidinski broj.

3.3.4.7 Određivanje jodnog broja

Za određivanje jodnog broja (JV) korištena je standardna metoda AOAC 920.185 (1999). U tikvicu je odvagano 0,2-0,4 g ulja i otopljeno u 10 mL kloroforma, zatim je dodano 25 mL jodnog monobromida, sve dobro promućkano te ostavljeno u tamnom prostoru 30 minuta. Nakon toga je dodano 15 mL hladno zasićene otopine kalij jodida te oko 150 mL prethodno prokuhane i ohlađene destilirane vode. Titracija je provedena sa 0,1 M natrij tiosulfatom. Zatim je dodano 1-2 mL otopine škroba i produžena je titracija do nestanka plave boje. Slijepa proba je provodena na isti način samo bez ulja. JV je izračunat se prema izrazu (3.8):

$$JV = \frac{(v_4 - v_5)}{m_{12}} \cdot 0,01269 \cdot 100 \quad (3.8)$$

gdje je:

v_4 - mL 0,1 M otopine ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) za titraciju slijepe probe;

v_5 - mL 0,1 M otopine ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) za titraciju uzorka;

m_{12} - masa ispitivanog uzorka (g)

3.3.4.8 Određivanje saponifikacijskog broja

Za određivanje saponifikacijskog broja (SV) korištena je standardna metoda AOAC 920.160 (1999). U tikvicu je odvagano 2 g ulja, dodano 25 ml 0,5 M kalij hidroksida, te stavljeno nekoliko staklenih kuglica i zagrijavano na vodenoj kupelji oko pola sata. Nakon završene saponifikacije u vruću otopinu dodano je nekoliko kapi 1%-tne otopine fenolftaleina i višak kalij hidroksida titriran je 0,5 M klorovodičnom kiselinom do nestanka crvene boje. SV izračunat je prema izrazu (3.9):

$$SV = \frac{(v_6 - v_7)}{m_{13}} \cdot 28,1 \text{ [mgKOH/g ulja]} \quad (3.9)$$

gdje je:

v_6 - ml 0,5 M otopine HCl utrošenog za slijepu probu;

v_7 - ml 0,5 M otopine HCl utrošenog za glavnu probu;

m_{13} - odmijerna količina uzorka (g);

(1 ml 0,5 M otopine klorovodične kiseline ekvivalentan je 28,1 mg kalij hidroksida).

3.3.5. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja

U čašice je izvagano 30 g hladnoprošanog konopljinog ulja, koje je zatim zagrijavano na magnetskoj mješalici dok se nije postigla temperatura od 70 °C. Nakon što je postignuta temperatura, u ulje je dodana određena količina antioksidansa (u koncentraciji 0,05%, 0,1% i 0,2 %) u odnosu na ukupnu masu ulja. Ulje sa dodanom količinom antioksidansa (**Tablica 8.**) nastavljeno je zagrijavati do temperature od 75 ± 5 °C tijekom 30 minuta uz neprestano miješanje. Nakon toga uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu, a potom stavljen u termostat (Binder), te je time započelo ispitivanje oksidacijske stabilnosti konopljinog ulja.

Tablica 8. Prikaz dodanih antioksidansa u određenim koncentracijama

ANTIOKSIDANS	KONCENTRACIJA ANTIOKSIDANSA (%)
Ekstrakt zelenog čaja	0,1
	0,2
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)	0,1
	0,2
Ekstrakt maslinovog lista	0,1
	0,2
Ekstrakt nara	0,1
	0,2
Eterično ulje origana	0,05
Eterično ulje bosiljka	0,05
Eterično ulje mente	0,05
Eterično ulje majčine dušice	0,05
Eterično ulje vrijeska	0,05

Određivanje oksidacijske stabilnosti konopljinog ulja provedeno je četverodnevnom testom ubrzane oksidacije - Schaal Oven testom, a rezultat oksidacije ulja izražen je Pbr-om. Određivanje Oven testom provedeno je na uzorku čistog konopljinog ulja kao i na mješavinama konopljinog ulja i dodanih prirodnih ekstrakata (0,1% i 0,2%) i eteričnih ulja (0,05%). Pripremljeni uzorci zagrijavani su u termostatu na temperaturi od 63 °C, uz praćenje

porasta Pbr-a tijekom četiri dana. Svakih 24 sata konopljino ulje i mješavine su uzorkovane kako bi se odredio Pbr. Prije samog uzorkovanja važno je da su uzorci dobro homogenizirani staklenim štapićem. Nakon homogeniziranja u pripremljene čašice odvagano je od 3 do 5 grama ulja, a uzorci s uljem ponovno su vraćeni u termostat. Kada je temperatura ulja dostigla sobnu temperaturu određen je Pbr. Rezultati Oven testa prikazani su kao vrijednosti Pbr-a ($\text{mmol O}_2\text{kg}^{-1}$) nakon određenog vremena držanja uzorka pri temperaturi od 63 °C, odnosno tijekom četiri dana trajanja Schaal Oven testa.

3.3.6. Projektiranje i izrada uređaja za ekstrakciju superkričnim CO₂

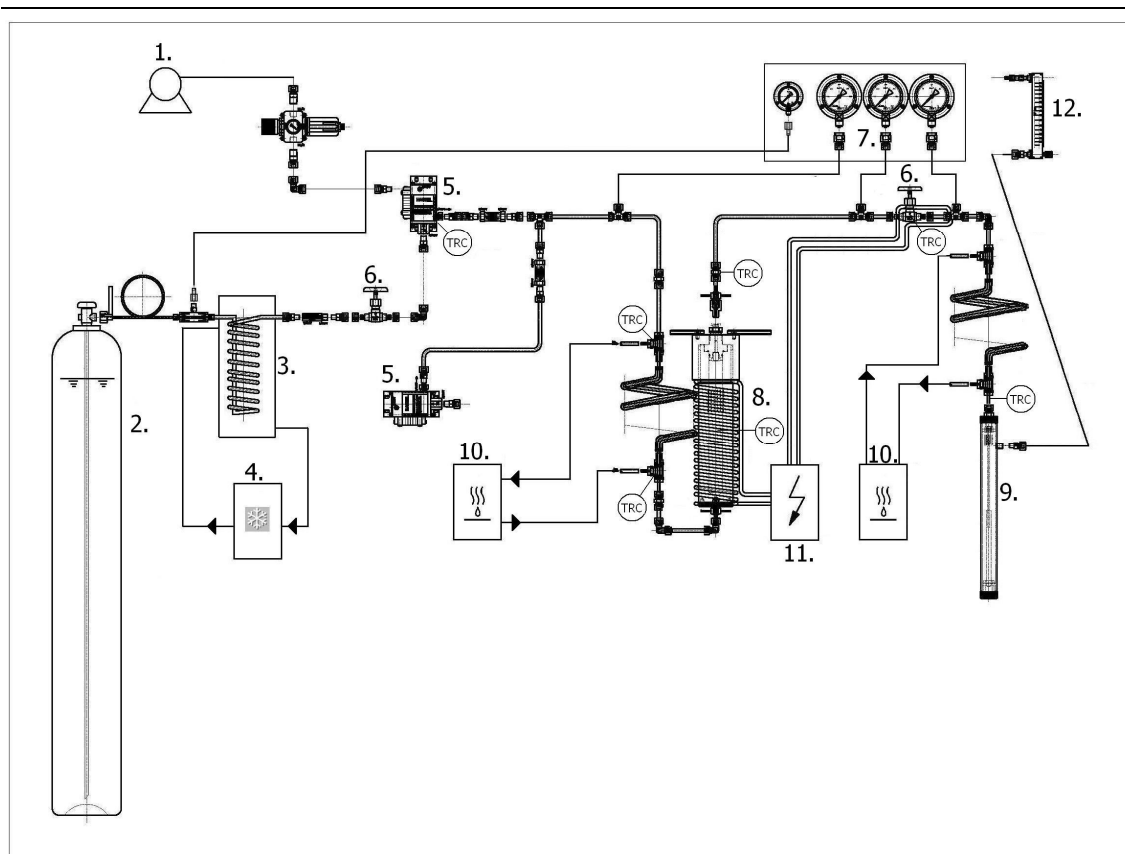
Novokonstruirani uređaj za ekstrakciju superkričnim CO₂ (engl. *handmade supercritical fluid extraction system*, HM-SFE) prikazan je na **Slikama 22 i 23**, a dijelovi i izrada samog uređaja opisani su u sljedećim poglavljima.

3.3.6.1 Konstrukcijski materijal

Materijali koji su korišteni za izgradnju HM-SFE sustava su nehrđajući čelici AISI 316Ti i AISI 304. Svi dodatni priključni dijelovi za cijevi su također iste kvalitete materijala.

3.3.6.2 Izrada ekstraktora

Ekstraktor je izrađen od nehrđajuće čelične šipke (AISI 304) vanjskog promjera 100 mm i visine 500 mm. Šipka je izbušena s \varnothing 40 mm svrdlom u dužini 400 mm. Gornji dio unutrašnjeg dijela ekstraktora dobro je ispoliran da bi brtvljenje bilo što bolje. Kapa ekstraktora dizajnirana je da zadrži čep, a povezana je s ekstraktorom pomoću trapeznog navoja. Čep je patentiran od strane tvrtke koja je sastavila HM-SFE sustav i brtvi na dva mjesta s O-prstenom. Donji dio ekstraktora je izbušen i pripremljen za brzi spoj s R ½" navojem uz brtvljenje s O-prstenom.



Slika 22. Procesna shema novokonstruiranog uređaja za ekstrakciju superkričnim CO₂

1. Kompresor; 2. CO₂ spremnik; 3. Izmjerni jač toplote od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

3.3.6.3 Izrada separatora

Separator je izrađen od bešavne cijevi od nehrđajućeg čelika (AISI 304) dimenzija $\varnothing 50 \times 5$ mm. Separator ima dva čepa i to na svakoj strani separatora. Čepovi su zabrtvljeni s O-prstjenovima kako bi se osigurala plino-nepropusnost. Donji čep izrađen je kao nositelj kivete za prikupljanje ekstrakta. Na gornjoj strani dijela separatora predviđen je priključak 1/4" NPT, koji vodi do mjerača protoka.

Ekstraktor i separator su testirani pri faktoru sigurnosti od 1,5. Ekstraktor je testiran na radni tlak od 50 MPa (ispitni tlak 75 MPa) i separator na radni tlak 3 MPa (ispitni tlak 4,5 MPa).

3.3.6.4 Filtracijski element (filter)

U čepu ekstraktora nalazi se filter. Glavna uloga filtera je spriječiti prolaz materijala, zajedno s ekstraktom, prema separatoru. Filter element ima mogućnost filtriranja veličine čestica $2 \mu\text{m}$ nominalno i $10 \mu\text{m}$ apsolutno. Filter je sačinjen od višeslojno nabranih i gusto naslaganih

nehrđajućih mrežica komercijalno dostupnih kod proizvođača Norman Filter Company (Bridgeview, Illinois, SAD), Model Norman Ultraporous 4202T-6T-2M.

3.3.6.5 Visokotlačne cijevi, spojni elementi i visokotlačni ventili

Visokotlačne bešavne cijevi korištene u izradi uređaja su dimenzija 10x2 i 6x1 mm, a međusobno su povezane Ermeto spojnicama (ravne, koljena, T-komadi). Visokotlačni ventili (B-HV), cijevi i Ermeto spojnice su komercijalno dostupni s pripadajućim certifikatima o tlačnim probama. Tvrtka koja ih je dobavila je Bijuk HPC d.o.o. (Samobor, Hrvatska).

3.3.6.6 Kontrola tlaka

Tlak u ekstraktoru kontroliran je s dva WIKA manometra (model 212.20) od 60 MPa i jedan WIKA manometar (model 212.20) 4 MPa za kontrolu tlaka u separatoru.

3.3.6.7 Kontrola protoka

Protok CO₂ je kontroliran preko Matheson FM-1050 (E800) mjerča protoka. Maksimalno moguće izmjereni protok je 63,03 SLPM (engl. *Standard Liter Per Minute*).

3.3.6.8 Regulacija temperature i tlaka

Ekstraktor je grijan električnim grijačem od staklenih vlakana kontroliran s centraliziranim sustavom i solid state relejom (SSR). Kontrola temperature postiže se s PID regulatorom s kompenzacijom kašnjenja (engl. *lag delay*), s obzirom na veliku masu ekstraktora. Mjerenje i regulacija temperature ekstraktora se izvodi pomoću integriranog senzora temperature unutar ekstraktora i dodatni senzor temperature koji mjeri temperaturu izlaznog plina. Ulaz CO₂ linije u ekstraktor zagrijan je pomoću izmjenjivača topline, omogućen sustavom za grijanje vode. Odabirom temperature ekstrakcije, kontrolira se i temperatura ulaznog plina regulirana. Ulazni plin se zagrijava na temperaturu ekstrakcije pomoću termokupelji i izmjenjivača temperature. Regulacija tlaka u separatoru obavlja se putem elektromehaničkog rješenja za kontrolu tlačnog ventila, sa senzorom tlaka radi povratne informacije o tlaku. Sigurnosni ventil separatora otvara se na 3,5 MPa.

3.3.6.9 Visokotlačna pumpa

Visokotlačna pumpa koja se koristi za tlačenje tekućeg CO₂ je Haskel[®] MS-71. Tekući CO₂ je predhlađen kroz zavojnicu, na temperaturu od -5 °C, koja je uronjena u rashladnu kupelj punjenu smjesom etilen glikol / etanol. Pumpa ima sposobnost tlačiti tekućine i tekuće plinove do 60 MPa. Maksimalni kontinuirani radni tlak je 50 MPa. Poslije pumpe nalazi se

nepovratni ventil koji sprečava eventualni poremećaj protoka CO₂. Nakon ekstraktora zadani tlak pri kojem se provodi ekstrakcija snižava se pomoću visokotlačnog ventila (B-HV) na željeni tlak u separatoru od 1,5 MPa. Ekstrakt se od otapala odvaja se u separatoru. Ventil i cijevi do separatora se zagrijavaju na temperaturu od 0 °C kako bi se spriječilo stvaranje leda ili suhog leda unutar cijevi uslijed velikog pada tlaka.



Slika 23. Uređaj za ekstrakciju superkričnim CO₂ (PTF, Osijek)

Prema projektnoj dokumentaciji spajanje HM-SFE u cjelinu izvela je tvrtka Đuro Đaković Aparati d.o.o. (Slavonski Brod, Hrvatska), koji je obavila sve potrebne testove izdržljivosti materijala i tlačne probe posuda pod tlakom.

3.3.7. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkričnim CO₂

Prije provođenje eksperimenata ekstrakcije ulja superkričnim CO₂ iz sjemenki industrijske konoplje, uzorak se usitnio na laboratorijskom mlinu IKA A11 Basic. Pogača industrijske konoplje nakon hladnog prešanja, koja se koristila u ekstrakciji superkričnim CO₂, nije se dodatno usitnjavala zbog prethodne obrade na pužnoj preši. Srednji promjer čestica (d) usitnjenog materijala određen je prosijavanjem na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200, Njemačka) i izračunat prema jednadžbi (3.10) (Vidović, 2011):

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (3.10)$$

3.3.8. Ekstrakcija ulja iz sjemenki i pogače industrijske konoplje superkričnim CO₂

Ekstrakcija ulja iz sjemenki i pogače industrijske konoplje superkričnim CO₂ provedena je pri sljedećim procesnim uvjetima:

- tlak (20, 30 i 40 MPa),
- temperatura (40, 50 i 60 °C),
- protok fluida (0,70, 1,75 i 2,8 kg h⁻¹),

Prinos ekstrakta je praćen u određenim vremenskim intervalima sve dok promjena mase dobivenog ekstrakta u dva uzastopna ciklusa nije izgubila statistički značaj, odnosno do konstantne mase ekstrakta. Razdvajanje CO₂ i ekstrakta provedeno je u separatoru pri tlaku 1,5 MPa i temperaturi 25 °C.

3.3.9. Analize konopljinog ulja

3.3.9.1 Određivanje sastava masnih kiselina

Priprema metilnih estera masnih kiselina provedena je prema normi [HRN EN ISO 5509:2000](#). Odvagano je 100 mg ekstrahiranog uzorka masti, dodano 10 mL heksana i mućkano je u tresilici (HS260 control, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka) dok se sva mast nije otopila. Za pripremu metilnih estera masnih kiselina, dodano je 200 µL 2M metanolne otopine kalij hidroksida (bazno katalizirana transesterifikacija). Uzorci su mućkani 30 s, a nakon toga centrifugirani 15 min na 3000 rpm i temperaturi od 15°C. Prije injektiranja u plinski kromatograf, 200 µL uzorka je filtrirano kroz PTFE filter. Pripravljene metilni esteri masnih kiselina analizirani su plinskom kromatografijom prema normi [HRN EN ISO 5508:1995](#). Korišten je plinski kromatograf 7890B (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD) po temperaturnom programu prikazanom u **Tablici 9**.

Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja (engl. *retention time*) 37 metil estera masnih kiselina standardne smjese analizirane pri istim uvjetima. Uz uzorke i standard, pri svakoj analizi korišten je i certificirani referentni materijal, pripremljen i analiziran na isti način kao i uzorci. Rezultat je izražen kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline. Granica detekcije metode je bila 0,1%. Vrijednosti utvrđene u validacijskom postupku za parametar istinitosti

su uspoređivane sa kriterijem definiranim Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 2/2005), koji za dokazivanje istinitosti pri udjelu mase >10 µg/kg može odstupati od -20 % do +10 % u odnosu na certificiranu vrijednost. Primjer kromatograma nalazi se u **Prilogu 2**.

Tablica 9. GC/FID uvjeti za određivanje sastava masnih kiselina

Kolona:	Kapilarna kolona HP88 100 x 0,25 mm x 0,20 µm (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
Detektor:	FID detektor
Autoinjektor:	Agilent 7683 A
Temperatura injektora:	250 °C
Volumen injektiranja:	1 µl
Split / splitless mod:	Split 1:50
Plin nosač i protok:	Helij 5.0; 2 ml/min
Temperaturni program:	120 °C, 1 min; 10 °C/min do 175 °C zadržavanje 10 min; 5 °C / min do 210 °C zadržavanje 5 min; 5 °C/min do 230 °C zadržavanje 5 min
FID parametri:	Helij 40 ml/min; Zrak 450 ml/min; Dušik 30 ml/min
Vrijeme uravnoteženja kolone između analiza:	2 minute na 120 °C

3.3.9.2 Određivanje tokoferola

Uzorci za kromatografiju pripremljeni su otapanjem 0,5 g ulja u 50 ml kalij hidroksida. Identifikacija i kvantifikacija tokoferola u dobivenim uljima provedena je metodom plinske kromatografije na plinskom kromatografu (Agilent 7890 A) s masenim detektorom (Agilent 5975 MSD) koristeći postupak opisan u AGILENT aplikacijskoj noti ([GC and GC/MS Applications, 2011](#)) s određenim modifikacijama. Uvjeti za GC/MS metodu za određivanje tokoferola su prikazani u **Tablici 10**.

Kvalitativno određivanje pojedinačnih tokoferola je provedeno na osnovi masenih spektara i retencijskih vremena, pri čemu je korištena biblioteka masenih spektara NIST (Nacionalni Institut za standarde i tehnologiju) 2008. Kvantitativna analiza je provedena metodom kalibracijske krivulje sa citiranim standardima. Analiza svakog ekstrakta provedena je u dva ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine. Primjer kromatograma nalazi se u **Prilogu 3**.

Tablica 10. Uvjeti GC/MS metode za određivanje tokoferola

Kolona:	Kapilarna kolona HP-5MS; 30 m x 0.250 mm x 0.25 μ m (Agilent J&W 19091S-433)
Detektor:	Agilent 5975 MSD
Autoinjektor:	Agilent 7683 A
Temperatura injektora:	250 °C
Volumen injektiranja:	1 μ l
Split / splitless mod	Splitless
Plin nosač:	Helij
Temperaturni program:	200 °C, 3 min; 8 °C/min do 280 °C, 12 min
MSD parametri:	Scan (45 to 450 amu), threshold 100 MS quad 150 °C, MS source 250 °C
Vrijeme uravnoteženja kolone između analiza:	4 minute

3.3.9.3 Određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida

Za određivanje klorofila *a* i *b*, te ukupnog sadržaja karotenoida, korištena je modificirana metoda [Dere i sur. \(1998\)](#). Izvaganom uzorku ulja dodan je dietil eter (50 ml za svaki gram) koji je potom otopljen u ultrazvučnoj kupelji (model Branson b-220, proizvođača Smith-Kline Company, SAD) tijekom jedne minute. Potom se uzorak homogenizirao 30 sekundi na homogenizatoru i ponovno u ultrazvučnoj kupelji tijekom jedne minute. Homogenizirani uzorak se centrifugirao 10 minuta pri 3000 okretaja u minuti. Supernatant se odvojio, a apsorbancije su mjerene pri 400 - 700 nm na UV spektrofotometru. Klorofil *a* pokazuje maksimalnu apsorpciju pri 660 nm, klorofil *b* pri 642,5 nm, a ukupni karotenoidi pri 470 nm. Sve analize su provedene u tri paralele. Količina navedenih pigmenata (mgL^{-1}) izračunata je prema sljedećim jednadžbama (3.11 – 3.14)

$$\text{Klorofil } a = 9,93 \cdot A_{660} - 0,78 \cdot A_{642,5} \quad (3.11)$$

$$\text{Klorofil } b = 17,60 \cdot A_{642,5} - 2,81 \cdot A_{660} \quad (3.12)$$

$$\text{Klorofil } a+b = 7,12 \cdot A_{660} - 16,80 \cdot A_{642,5} \quad (3.13)$$

$$\text{Ukupni karotenoidi} = (1000 \cdot A_{470} - 0.52 \cdot \text{Klor } a - 7.25 \cdot \text{Klor } b)/226 \quad (3.14)$$

Nakon proračuna koncentracija (mgL^{-1}), potrebno je pretvoriti količinu pigmenata u ulju u mg pigmenta/kg ulja (3.15):

$$c = c_1 \cdot V \cdot R / G \quad (3.15)$$

gdje je:

c - količina pigmenta u ulju (mgkg^{-1})

c_1 - koncentracija pigmenta (mgL^{-1})

V - početni volumen (mL)

R - razrjeđenja (ako se primjenjuje u metodu; ukoliko ne $R=1$)

G - izmjerena masa ulja (kg)

3.3.10. Optimiranje procesa hladnog prešanja i procesa ekstrakcije superkričnim CO_2 primjenom metode odzivnih površina

U ovom radu korišten je Box-Behnken plan pokusa za procjenu utjecaja procesnih parametara hladnog prešanja na iskorištenje i kvalitetu ulja odnosno na volumen dobivenog sirovog ulja, temperaturu sirovog ulja, volumen ulja nakon centrifugiranja, udio slobodnih masnih kiselina u ulju, peroksidni broj ulja, udio vlage i netopljivih nečistoća u ulju te na količinu ulja zaostalog u pogači; kao i za procjenu procesnih parametara ekstrakcije konopljinog ulja superkričnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja. Za potrebe istraživanja procesa hladnog prešanja odabrane su tri različite nezavisne varijable: temperatura zagrijavanja glave preše (X_1), veličina otvora glave pužne preše (X_2), frekvencija okretaja pužnice (X_3). Nezavisne varijable u kodiranom i nekodiranom obliku prikazane su u **Tablici 11**.

Tablica 11. Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu hladnog prešanja

Nezavisne varijable	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	X_1	60	80	100
Otvor pužne preše (mm)	X_2	6	9	12
Frekvencija (Hz)	X_3	20	30	40

Za potrebe istraživanja procesa ekstrakcije konopljinog ulja superkričnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja odabrane su tri različite nezavisne varijable: temperatura ekstrakcije (X_1), tlak pri kojem se vrši ekstrakcija (X_2), protok CO_2 (X_3). Nezavisne varijable u kodiranom i nekodiranom obliku prikazane su u **Tablici 12**.

Tablica 12. Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu superkritične ekstrakcije

Nezavisne varijable	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Temperatura (°C)	X_1	40	50	60
Tlak ekstrakcije (MPa)	X_2	20	30	40
Protok CO ₂ (kg h ⁻¹)	X_3	0,70	1,75	2,80

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je sedamnaest eksperimenata hladnog prešanja i ekstrakcije superkritičnim CO₂ (pojedinačno). Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom (2.4) odzivnih površina tj. polinomom drugog reda i prikazani u **Tablicama 15 i 22**.

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućavaju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese (**Slika 29 i 32**). Odzivne površine mogu se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina. Kako bi razvijeni modeli imali primjenu u simulaciji i optimiranju, provodi se završni korak u metodi odzivnih površina, optimiranje promatranog procesa ([Myers i Montgomery, 1995](#)). Za optimiranje procesa najčešće se primjenjuje metoda temeljena na konceptu željene funkcije (engl. *Desirability function*, *D*). Optimiranje se provodi na način da se praćeni odzivi (*y*) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću 0 - 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, odnosno 1, najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (*D*) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija.

3.3.11. Statistička obrada podataka

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa *Design-Expert*[®], v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Prednost ovog programa je što može raditi s kodiranim i nekodiranim varijablama.

Za statističku obradu eksperimentalnih podataka analiziranih makro i mikrokomponenta u konopljinom ulju te utjecaja različitih procesnih parametara ekstrakcije korištena je analiza varijance (ANOVA, t-test) i računalni program (IBM SPSS for Windows software).

4. REZULTATI

Prikaz rezultata rada podijeljen je u nekoliko osnovnih dijelova:

- određivanje udjela osnovnih kemijskih parametara (udio ulja, vlage, proteina i vlakana) u sjemenci i pogači industrijske konoplje;
- praćenje utjecaja procesnih parametara hladnog prešanja na iskorištenje i kvalitetu konopljinog ulja;
- optimiranje procesa prešanja i ekstrakcije superkritičnim CO₂ konopljinog ulja primjenom metode odzivnih površina;
- ispitivanje utjecaja dodatka prirodnih antioksidansa na oksidacijsku stabilnost konopljinog ulja;
- ekstrakcija zaostalog ulja iz pogače superkritičnim CO₂;
- praćenje utjecaja različitih procesnih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO₂ na prinos ulja i udio makro i mikrokomponentata u konopljinom ulju.

4.1. UDIO ULJA I VLAGE U SJEMENKAMA I POGAČI INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Tablica 13. Udio ulja i vlage u mljevenoj sjemenki i pogači industrijske konoplje

Matriks	Udio ulja (%)	Udio vlage (%)
Sjemenka konoplje	33,34 ± 0,11	8,09 ± 0,08
Pogača nakon hladnog prešanja	10,33 ± 0,14*	-
Pogača nakon ekstrakcije superkritičnim CO ₂	0,56 ± 0,08	-

* dobivena vrijednost pri optimalnim uvjetima prešanja prema Box-Behnkenovom planu pokusa

4.2. UDIO PROTEINA I VLAKANA U SJEMENKAMA, POGAČI I BRAŠNU INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Tablica 14. Sadržaj proteina i udjela vlakana u uzorcima

Uzorak	Proteini (%)	Vlakna (%)
Sjemenka konoplje ^a (Slika 24)	23,89 ± 0,02	27,81 ± 0,04
Brašno konoplje poslije ekstrakcije superkritičnim CO ₂ iz sjemenke konoplje	35,63 ± 0,06	30,21 ± 0,04
Brašno konoplje SFE < 200 μm ^c (Slika 26)	60,03 ± 0,03	5,61 ± 0,04
Pogača konoplje nakon prešanja ^d (Slika 27)	30,31 ± 0,01	24,41 ± 0,06
Pogača nakon SFE ^e (Slika 28)	35,51 ± 0,05	26,84 ± 0,06

a) Sjemenke konoplje

b) Pogača konoplje poslije ekstrakcije superkritičnim CO₂ iz sjemenke konoplje

c) Promjer čestice manjih od 200 μm iz pogače konoplje nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂ iz sjemenke konoplje

d) Usitnjena pogača konoplje nakon postupka hladnog prešanja

e) Pogača konoplje (od hladnog prešanja) nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂



Slika 24. Sjemenke konoplje



Slika 25. Brašno konoplje poslije ekstrakcije superkritičnim CO₂



Slika 26. Brašno konoplje d < 200um



Slika 27. Pogača konoplje nakon prešanja



Slika 28. Pogača nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂

4.3. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA HLADNOG PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE I KVALITETU KONOPLJINOG ULJA

Tablica 15. Vrijednosti promatranih odziva pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta prešanja u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

Br. eksp.	Veličina otvora (mm)	Temp. (°C)	Frekvencija (Hz)	Volumen sirovog ulja (mL)	Volumen ulja nakon centrifugiranja (mLkg ⁻¹)	Prinos ulja (gkg ⁻¹)	Temperatura sirovog ulja (°C)	SMK (%)	NN (%)	Udio ulja u pogači (%)	Iskorištenje (%)
1	12,00	100,00	30,00	260	210	201,6	49	2,60	0,33	13,20	60,47
2	9,00	100,00	20,00	275	225	216	48	2,64	0,49	10,22	64,79
3	12,00	80,00	20,00	260	222	213,12	42	2,66	0,43	10,42	63,92
4	6,00	60,00	30,00	285	220	211,2	41	2,57	0,36	11,17	63,35
5	12,00	60,00	30,00	235	180	172,8	42	2,50	0,42	13,34	51,83
6	9,00	80,00	30,00	255	215	206,4	44	2,62	0,44	10,50	61,91
7	9,00	100,00	40,00	255	190	182,4	48	2,61	0,41	13,38	54,71
8	9,00	60,00	20,00	265	215	206,4	43	2,49	0,44	10,52	61,91
9	9,00	60,00	40,00	250	188	180,48	43	2,51	0,46	13,71	54,13
10	9,00	80,00	30,00	255	215	206,4	44	2,63	0,44	12,32	61,91
11	9,00	80,00	30,00	255	215	206,4	42	2,63	0,44	13,08	61,91
12	9,00	80,00	30,00	253	210	201,6	44	2,62	0,47	12,57	60,47
13	6,00	80,00	20,00	275	225	216	45	2,58	0,48	9,96	64,79
14	9,00	80,00	30,00	260	219	210,24	43	2,63	0,45	12,51	63,06
15	12,00	80,00	40,00	235	188	180,48	44	2,61	0,43	14,16	54,13
16	6,00	80,00	40,00	270	220	211,2	48	2,59	0,38	12,10	63,35
17	6,00	100,00	30,00	280	225	216	49	2,61	0,48	10,60	64,79

SMK – Slobodne masne kiseline

NN – Netopjive nečistoće

Pbr – je u svim eksperimentima iznosio 1,95 mmol O₂kg⁻¹

4.3.1. Statistička analiza parametara kvalitete i iskorištenja hladno prešanog ulja

Tablica 16. Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda

Termin	Koeficijent ^a	Volumen sirovog ulja	Volumen ulja nakon centrifugiranja	Temperatura ulja	SMK	NN	Udio ulja u pogači
odsječak	β_0	255,60*	214,80*	43,40*	2,63*	0,45*	12,20*
X_1	β_1	-15,00*	-11,25*	-0,75	0,003	-0,011	0,91*
X_2	β_2	4,38*	5,88*	3,13*	0,041*	0,004	-0,17
X_3	β_3	-8,13*	-12,63*	0,63	0,001	-0,020*	1,53*
X_1^2	β_{11}	4,07*	1,60	0,55	0,003	-0,035*	-0,21
X_2^2	β_{22}	5,32*	-7,65*	1,30	-0,059*	-0,015	0,090
X_3^2	β_{33}	0,33	-2,65	0,80	-0,019	0,017	-0,33
X_1X_2	β_{12}	7,50*	6,25	-0,25	0,015	-0,052*	0,11
X_1X_3	β_{13}	-5,00*	-7,25*	-0,25	-0,015	0,025*	0,40
X_2X_3	β_{23}	-1,25	-2,00	0,000	0,003	-0,025*	-0,008

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

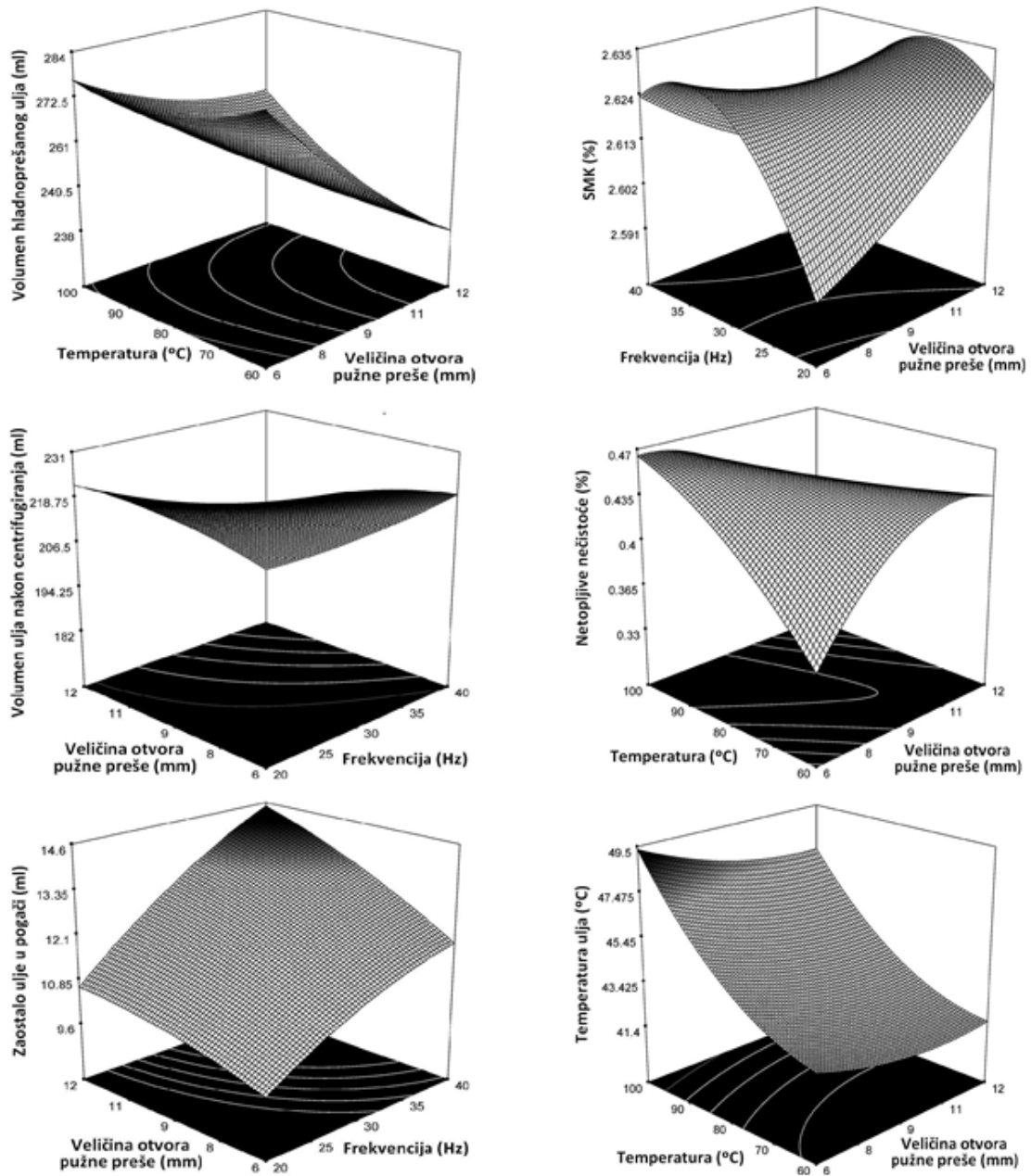
X_1 : veličina otvora pužne preše; X_2 : temperatura glave preše; X_3 : frekvencija.

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Tablica 17. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva hladnog prešanja sjemenki konoplje polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Volumen hladno prešanog ulja					
Model	3015,02	9	335,00	28,10	0,0001*
Ostatak	83,45	7	11,92		
Nedostatak modela	56,25	3	18,75	2,76	0,1760
Pogreška	27,20	4	6,80		
Ukupno	3098,47	16			
R ²	0,9731				
Volumen ulja nakon centrifugiranja					
Model	3236,48	9	359,61	11,29	0,0021*
Ostatak	223,05	7	31,86		
Nedostatak modela	182,25	3	60,75	5,96	0,0588
Pogreška	40,80	4	10,20		
Ukupno	3459,53	16			
R ²	0,9355				
Temperatura ulja					
Model	98,43	9	10,94	4,39	0,0320*
Ostatak	17,45	7	2,49		
Nedostatak modela	14,25	3	4,75	5,94	0,0591
Pogreška	3,20	4	0,80		
Ukupno	115,88	16			
R ²	0,8494				
Slobodne masne kiseline					
Model	0,032	9	0,003	4,59	0,0286*
Ostatak	0,006	7	0,0008		
Nedostatak modela	0,006	3	0,002	59,72	0,0009
Pogreška	0,0001	4	0,00005		
Ukupno	0,038	16			
R ²	0,8550				
Netopljive nečistoće					
Model	0,028	9	0,003	10,75	0,0025*
Ostatak	0,002	7	0,0003		
Nedostatak modela	0,001	3	0,0004	2,60	0,1895
Pogreška	0,0007	4	0,0002		
Ukupno	0,030	16			
R ²	0,9325				
Udio ulja u pogači					
Model	26,93	9	2,99	4,58	0,0286*
Ostatak	4,57	7	0,65		
Nedostatak modela	0,66	3	0,22	0,23	0,8745
Pogreška	3,91	4	0,98		
Ukupno	31,51	16			
R ²	0,8549				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 29. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine iskorištenja i kvalitete konopljinog ulja u ovisnosti o temperaturi, frekvenciji i veličini otvora pužne preše

4.3.2. Optimiranje procesa hladnog prešanja konopljinog ulja

Kako bi razvijeni modeli imali primjenu u simulaciji i optimiranju, provodi se završni korak u metodi odzivnih površina, optimiranje promatranog procesa. Optimiranje se provodi na način da se praćeni odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, odnosno 1, najbolju vrijednost za promatrani odziv. Da bi se odredili optimalni uvjeti procesa proizvodnje hladno prešanog konopljinog ulja za ispitivano eksperimentalno područje, provedena je numerička optimiranje procesa pomoću programa *Design Expert* pri čemu odabrane kombinacije vrijednosti nezavisnih varijabli zadovoljavaju kriterij optimalnosti. Dobiveno je više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih nezavisnih varijabli, međutim kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (engl. *Desirability*), kao kriterij za optimalno provođenje procesa, bila najveća. Primjenom funkcionalne metode, optimalni uvjeti prešanja pri kojima je dobivena najveća količina i najbolja kvaliteta ulja prikazani su u

Tablici 18.

Zadani uvjeti optimiranja procesa hladnog prešanja konopljinog ulja bili su:

- Što veće iskorištenje ulja;
- Što manji udio ulja u pogači;
- Što niža temperatura sirovog ulja;
- Što niže količine SMK, NN i Pbr.

Tablica 18. Optimalni procesni parametri prešanja i izračunati promatrani odzivi

Procesni parametri	Volumen sirovog ulja (mL)	Temperatura ulja (°C)	SMK (%)	NN (%)	Udio ulja u pogači (%)
$T = 60\text{ °C}$ $N = 6\text{ mm}$ $Fr = 20\text{ Hz}$	285,3	42,5	2,51	0,39	9,97

T-temperatura zagrijavanja glave preše; N-veličina otvora pužne preše; Fr-frekvencija elektromotora

Tablica 19. Parametri kvalitete optimalnog uzorka konopljinog ulja

Procesni parametri	Jodni broj ($\text{gI}_2\text{ kg}^{-1}$ ulja)	Saponifikacijski broj (gKOH kg^{-1} ulja)	Sadržaj vlage u ulju (%)	Anisidinski broj	Totox broj
$T = 60\text{ °C}$ $N = 6\text{ mm}$ $Fr = 20\text{ Hz}$	1550	205	0,075	1	2,8

T-temperatura zagrijavanja glave preše; N-veličina otvora pužne preše; Fr-reakvencija elektromotora

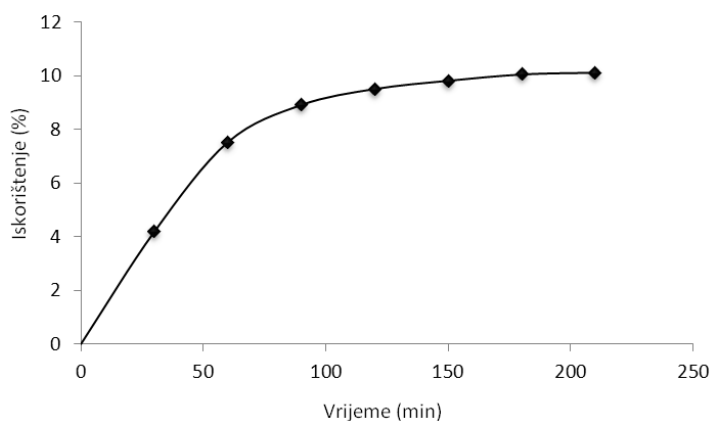
4.4. ISPITIVANJE UTJECAJA DODATKA PRIRODNIH ANTIOKSIDANASA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST HLADNO PREŠANOG KONOPLJINOG ULJA

Tablica 20. Utjecaj dodatka prirodnih antioksidansa na oksidacijsku stabilnost konopljinog ulja kroz 4 dana ispitivanja

Uzorci	Pbr (mmol O ₂ kg ⁻¹)				
	0 dan	1 dan	2 dan	3 dan	4 dan
Ulje bez dodatka antioksidansa	1,95	2,43	3,40	6,07	9,09
0,1% Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)	1,95	2,33	3,35	5,97	8,67
0,2% Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)	1,95	2,18	3,20	5,74	8,25
0,1% Ekstrakt maslinovog lista	1,95	2,78	7,18	8,14	11,78
0,2% Ekstrakt maslinovog lista	1,95	2,91	5,12	7,95	11,06
0,1% Ekstrakt nara	1,95	2,36	4,35	8,06	10,76
0,2% Ekstrakt nara	1,95	2,23	2,25	4,74	7,98
0,1% Ekstrakt zelenog čaja	1,95	2,29	5,55	9,21	10,89
0,2% Ekstrakt zelenog čaja	1,95	2,15	3,76	5,72	7,24
0,05% Eterično ulje origana	1,95	2,01	2,79	4,05	6,23
0,05% Eterično ulje bosiljka	1,95	2,08	3,67	7,42	8,15
0,05% Eterično ulje mente	1,95	2,04	3,98	7,37	9,50
0,05% Eterično ulje majčine dušice	1,95	2,11	3,60	5,43	8,23
0,05% Eterično ulje vrijeska	1,95	2,04	2,93	5,64	6,67

4.5. EKSTRAKCIJA OSTATKA ULJA IZ POGAČE

4.5.1. Ekstrakcija zaostalog ulja iz pogače dobivene pri optimalnim uvjetima hladnog prešanja pomoću superkritičnog CO₂



Slika 30. Ekstrakcija konopljinog ulja iz pogače ($T_e = 45\text{ }^\circ\text{C}$; $P_e = 25\text{ MPa}$; $F_{\text{CO}_2} = 1,2\text{ kg h}^{-1}$) pomoću superkritičnog CO₂



Slika 31. Uzorak konopljinog ulja

4.5.2. Utjecaj procesnih parametara superkritične ekstrakcije na iskorištenje ulja iz pogače

Daljnji tijek istraživanja uključio je istraživanje utjecaja procesnih parametara superkritične ekstrakcije (temperatura, tlak, protok CO₂) na iskorištenje ulja i vrijeme trajanja procesa ekstrakcije s time da se vrijeme trajanja ekstrakcije odredilo na osnovu praćenja prinosa ulja u u određenim vremenskim intervalima. Kad je promjena mase dobivenog ekstrakta u dva uzastopna ciklusa izgubila statistički značaj, odnosno kada se postigla konstantna masa ekstrakta, proces je prekinut i zabilježeno je vrijeme trajanja procesa. U ovom dijelu se koristila se pogača s najvećim udjelom ulja udjelom ulja od 15,65 %.

Tablica 21. Vrijednosti promatranih odziva pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica) na iskorištenje ulja iz pogače i vrijeme trajanja procesa

Uzorak			Vrijeme trajanja ekstrakcije (h)	Udio ulja (%)
Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Protok CO ₂ (kg h ⁻¹)		
40	20	1,75	4,50	12,76
60	20	1,75	7,50	10,11
50	20	0,7	7,50	10,41
50	20	2,8	4,00	12,66
40	30	0,7	5,00	13,34
60	30	0,7	4,75	14,32
40	30	2,8	1,75	12,82
60	30	2,8	1,75	14,97
50	30	1,75	2,00	14,67
50	30	1,75	2,50	14,13
50	30	1,75	2,00	13,60
50	30	1,75	2,00	14,27
50	30	1,75	2,50	14,34
40	40	1,75	2,25	13,43
60	40	1,75	1,50	14,58
50	40	0,7	3,00	14,72
50	40	2,8	1,75	13,45

4.5.3. Optimiranje procesa superkritične ekstrakcije konopljinog ulja iz pogače

Kao i u poglavlju 4.3.2. *Optimiranje procesa hladnog prešanja konopljinog ulja* primjenjena je funkcionalna metoda (engl. *desirability function method*) u optimiranju procesa te su optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je dobivena najveća količina ulja za najkraće vrijeme trajanja procesa prikazani u **Tablici 22**.

Tablica 22. Optimalni procesni parametri ekstrakcije superkritičnim CO₂ ulja iz pogače i izračunati promatrani odzivi

Procesni parametri	Vrijeme ekstrakcije (h)	Udio ulja u pogači dobiven ekstrakcijom supekritičnim CO ₂ nakon hladnog prešanja (%)
$T_e = 58,84 \text{ }^\circ\text{C}$ $P_e = 39,22 \text{ MPa}$ $F_{CO_2} = 1,75 \text{ kg h}^{-1}$	1,63	15,09

Zaostala količina ulja u pogači određenja je metodom po Soxhletu i iznosila je $0,56 \pm 0,08\%$.

4.5.4. Statistička analiza parametara iskorištenja ulja iz pogače superkritičnim CO₂

Tablica 23. Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda

Termin	Koeficijent ^a	Vrijeme ekstrakcije	Iskorištenje
Odsječak	θ_0	2,20*	14,20*
X_1	θ_1	0,25	0,2
X_2	θ_2	-1,88*	1,28*
X_3	θ_3	-1,38*	0,14
X_1^2	θ_{11}	0,49	-0,21
X_2^2	θ_{22}	1,24*	-1,27*
X_3^2	θ_{33}	0,62*	-0,12
X_1X_2	θ_{12}	-0,94*	0,95*
X_1X_3	θ_{13}	0,062	0,29
X_2X_3	θ_{23}	0,56	-0,88*

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

X_1 : temperatura; X_2 : tlak; X_3 : protok otapala.

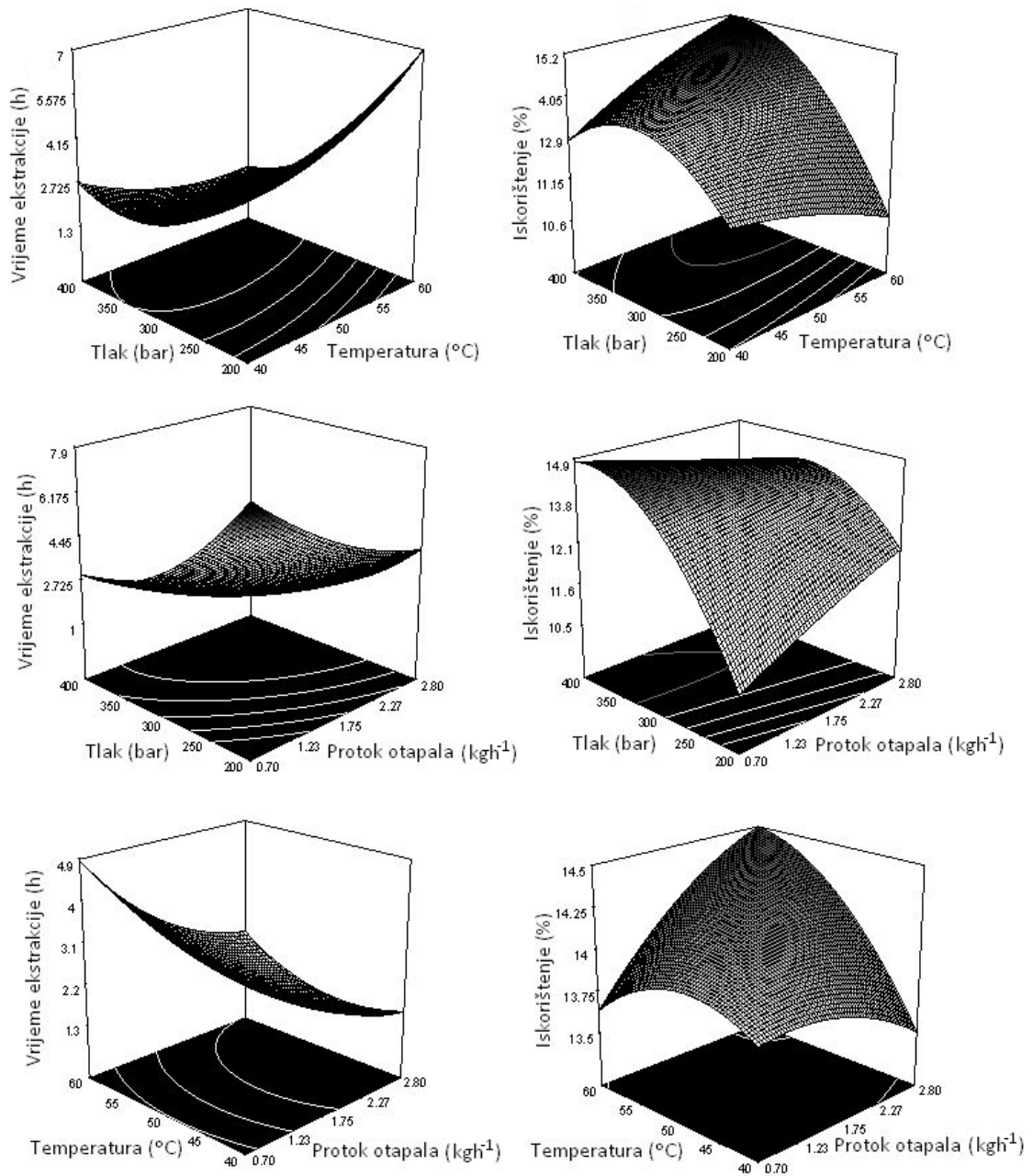
* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Tablica 24. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva superkritične ekstrakcije ulja iz pogače polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Vrijeme ekstrakcije					
Model	58,55	9	6,51	27,70	0,0001*
Ostatak	1,64	7	0,23		
Nedostatak modela	1,34	3	0,45	0,45	0,0585
Pogreška	0,30	4	0,075		
Ukupno	60,19	16			
R ²	0,9727				
Iskorištenje					
Model	27,92	9	3,10	6,42	0,0114*
Ostatak	3,38	7	0,48		
Nedostatak modela	2,77	3	0,92	6,05	0,0537
Pogreška	0,61	4	0,15		
Ukupno	31,30	16			
R ²	0,8920				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 32. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine iskorištenja i vremena ekstrakcije konopljinog ulja u ovisnosti o temperaturi, tlaku i protoku otapala

4.6. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO₂ NA PRINOS KONOPLJINOG ULJA IZ SJEMENKE

Radi usporedbe dobivenih podataka o ulju dobivenom postupkom hladnog prešanja provedena je i ekstrakcija ulja superkritičnim CO₂ iz usitnjene sjemenke industrijske konoplje.

4.6.1. Raspodjela veličine čestica

Tablica 25. Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima sjemenki konoplje

Broj sita	Veličina otvora sita (mm)	1. uzorak (g)	2. uzorak (g)	3. uzorak (g)
0	3,15	6,76	6,84	6,81
1	1,4	33,06	32,99	33,04
2	0,8	15,49	15,51	15,59
3	0,63	9,83	9,85	9,81
4	0,5	5,48	5,52	5,5
5	0,4	8,75	8,7	8,71
6	0,315	8,18	8,21	8,19
7	0,2	9,2	9,18	9,22
8	0,1	2,51	2,53	2,56
9	0,05	0,66	0,68	0,7
10	0	6,76	6,84	6,81

Srednja veličina čestica (tri ponavljanja) iznosi $0,380 \pm 0,0018$ mm

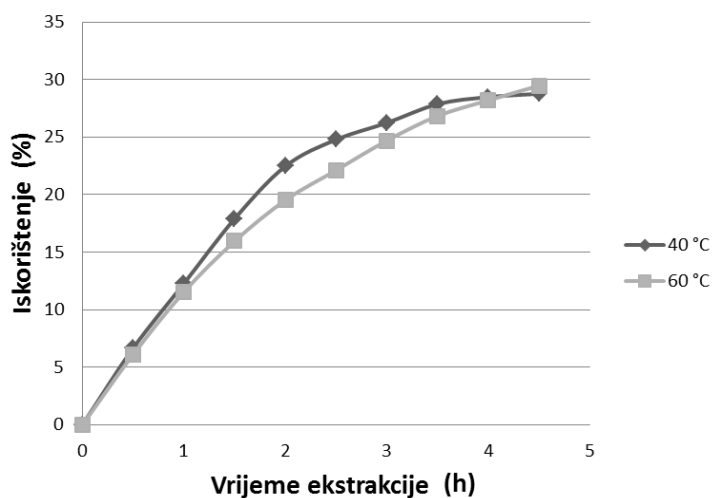
4.7. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE SUPERKRITIČNIM CO₂ NA ISKORIŠTENJE I SASTAV POJEDINIH KOMPONENTI U DOBIVENIM ULJIMA

U ovom dijelu istraživanja rezultati rada podijeljeni su u nekoliko osnovnih dijelova:

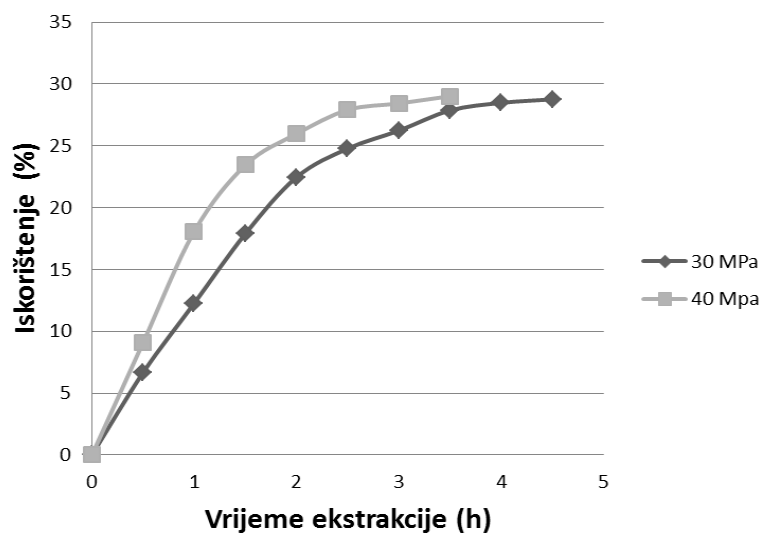
- utjecaj različitih procesnih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO₂ na iskorištenje konopljinog ulja iz sjemenke;
- utjecaj različitih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije na udio masnih kiselina u dobivenim uljima;
- utjecaj različitih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije na udio tokoferola u dobivenim uljima;
- utjecaja različitih procesnih uvjeta superkritične ekstrakcije na udio klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida u dobivenim uljima;

- usporedba sastava masnih kiselina i tokoferola u uljima dobivenim pomoću različitih metoda ekstrakcije.

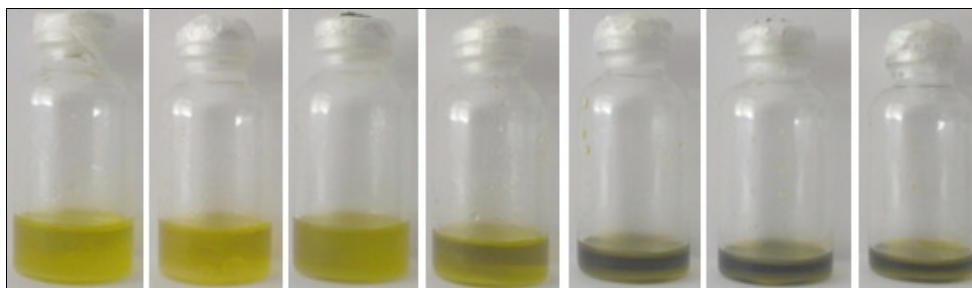
4.7.1. Utjecaj procesnih parametara ekstrakcije na prinos ulja



Slika 33. Utjecaj temperature na iskorištenje konopljinog ulja
(uvjeti ekstrakcije: $F_{CO_2} = 1,75 \text{ kgh}^{-1}$; $P_e = 30 \text{ MPa}$)



Slika 34. Utjecaj tlaka na iskorištenje konopljinog ulja
(uvjeti ekstrakcije: $F_{CO_2} = 1,75 \text{ kgh}^{-1}$; $T_e = 40 \text{ °C}$)



Slika 35. Fotografije konopljinog ulja dobivenog iz sjemenki u različitim vremenskim intervalima tijekom ekstrakcije superkričnim CO₂ pri tlaku od 30 MPa, temperaturi 40 °C i protoku od 1,75 kgh⁻¹.

4.7.2. Utjecaj parametara ekstrakcije na udio pigmentata u dobivenim uljima

Tablica 26. Udio klorofila i karotenoida u konopljinom ulju iz pogače dobivenom primjenom različitih procesnih parametara ekstrakcije

Uzorak			Klorofil <i>a</i> (mgkg ⁻¹)	Klorofil <i>b</i> (mgkg ⁻¹)	Klorofil <i>a+b</i> (mgkg ⁻¹)	Ukupni karotenoidi (mgkg ⁻¹)
Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Protok CO ₂ (kgh ⁻¹)				
50	20	2,8	101,11	80,44	181,43	37,89
60	20	1,75	126,91	112,25	238,98	34,49
40	20	1,75	179,07	130,07	308,93	41,21
50	20	0,7	305,85	189,78	495,32	33,58
40	30	0,7	186,08	82,47	268,39	66,28
50	30	1,75	207,40	96,01	273,26	72,18
60	30	0,7	212,23	67,68	279,76	73,23
50	30	1,75	234,64	93,06	327,51	93,60
50	30	1,75	253,46	112,53	365,98	88,24
40	30	2,8	261,60	65,44	326,88	99,07
50	30	1,75	262,33	113,07	405,09	86,40
60	30	2,8	272,66	97,94	370,40	91,81
50	30	1,75	318,94	126,53	412,26	95,05
40	40	1,75	269,15	183,29	352,25	109,87
50	40	2,8	316,97	177,14	393,93	112,84
50	40	0,7	376,14	175,17	451,10	132,67
60	40	1,75	378,28	131,92	509,93	128,53

Tablica 27. Statistička analiza parametara pigmenata u uljima

Termin	Koeficijent ^a	Klorofil <i>a</i>	Klorofil <i>b</i>	Ukupni karotenoidi
Odsječak	β_0	250,7551	108,2248	87,09377
X_1	β_1	11,77359	-6,43602	1,451491
X_2	β_2	78,45039*	19,37324*	42,0907*
X_3	β_3	-15,9946	-11,767	4,479555
X_1^2	β_{11}	-	-23,0484	-2,6096
X_2^2	β_{22}	-	54,20531*	-5,95856
X_3^2	β_{33}	-	-6,79525	-1,88793
X_1X_2	β_{12}	-	-8,38685	6,343285
X_1X_3	β_{13}	-	11,82081	-3,55084
X_2X_3	β_{23}	-	27,82674*	-6,03723

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

X_1 : temperatura; X_2 : tlak; X_3 : protok CO₂.

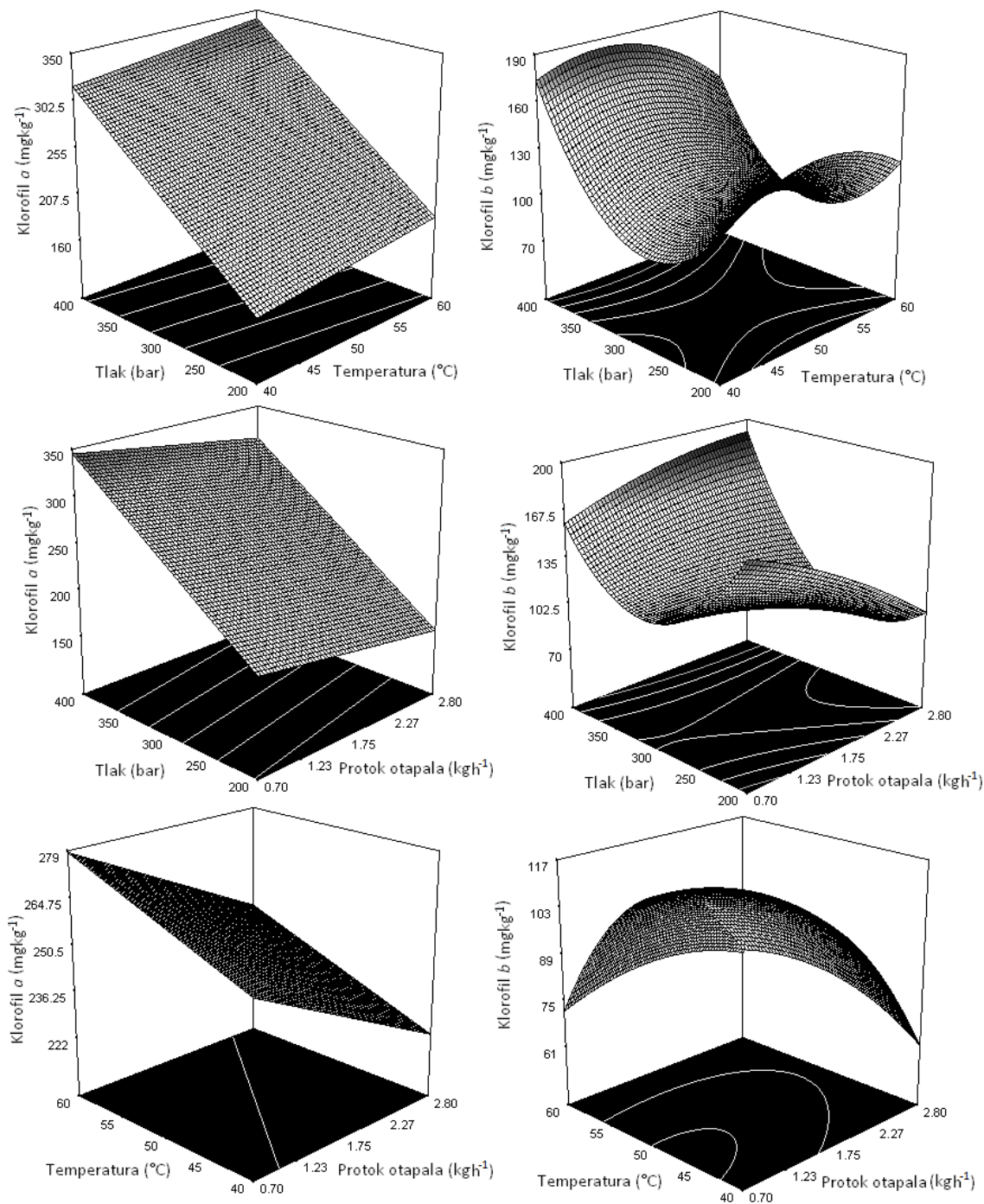
* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Tablica 28. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva pigmenata polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Klorofil a					
Model	52391,26	3	17463,75	5,228838	0,0138*
Ostatak	43418,59	13	3339,891		
Nedostatak modela	36593,98	9	4065,998	2,383139	0,2091
Pogreška	6824,608	4	1706,152		
Ukupno	95809,85	16			
R ²	0,7157				
Klorofil b					
Ostatak	22581,36	9	2509,04	4,977432	0,0230*
Nedostatak modela	3528,583	7	504,0833		
Pogreška	2772,726	3	924,242	4,891094	0,0796
Ukupno	755,8572	4	188,9643		
Ostatak	26109,95	16			
R ²	0,8649				
Ukupni karotenoidi					
Ostatak	14916,82	9,00	1657,42	20790,00	0,0015*
Nedostatak modela	923,85	7,00	131,98		
Pogreška	594,17	3,00	198,06	14642,00	0,2081
Ukupno	329,68	4,00	82,42		
Ostatak	15840,66	16,00			
R ²	0,9417				

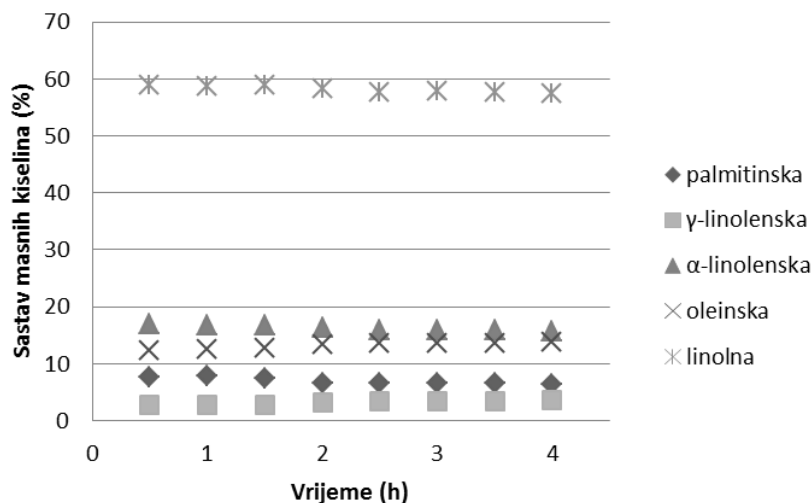
SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 36. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine klorofila *a* i *b* konopljinog ulja u ovisnosti o temperaturi, tlaku i protoku otapala

4.7.3. Sastav masnih kiselina konopljinog ulja



Slika 37. Sastav masnih kiselina tijekom vremena ekstrakcije superkritisnim CO₂ (uvjeti ekstrakcije: T_e=40 °C; P_e=30 MPa; F_{CO₂}=1,75 kg h⁻¹)

4.7.4. Utjecaj parametara ekstrakcije na sastav masnih kiselina u dobivenim uljima

Tablica 29. Utjecaj temperature ekstrakcije na sastav masnih kiselina u uljima

Masne kiseline	40°C		60°C		t
	AVG	SD	AVG	SD	
palmitinska (%)	6,93	0,61	7,37	0,64	-4,72**
γ-linolenska (%)	3,15	0,32	3,00	0,13	1,94 n.s.
α-linolenska (%)	16,30	0,47	16,55	0,06	-1,41 n.s.
oleinska (%)	13,15	0,57	12,82	0,26	2,91*
linolna (%)	58,18	0,60	58,45	0,17	-1,56 n.s.

(n.s. - nije značajno pri P>0,05; * 0,01<P< 0,05; **0,001<P<0,01; *** P<0,001)

Tablica 30. Utjecaj tlaka ekstrakcije na sastav masnih kiselina u uljima

Masne kiseline	30 MPa		40 MPa		t
	AVG	SD	AVG	SD	
palmitinska (%)	7,12	0,61	7,02	0,37	0,59 n.s.
γ-linolenska (%)	3,05	0,30	3,19	0,28	-2,28 n.s.
α-linolenska (%)	16,46	0,44	16,18	0,57	2,13 n.s.
oleinska (%)	12,98	0,56	13,24	0,58	-1,88 n.s.
linolna (%)	58,38	0,56	58,09	0,60	1,97 n.s.

(n.s. - nije značajno pri P>0,05; * 0,01<P< 0,05; **0,001<P<0,01; *** P<0,001)

4.7.5. Utjecaj parametara ekstrakcije na sastav tokoferola u dobivenim uljima

Tablica 31. Utjecaj temperature ekstrakcije na sastav tokoferola u uljima

	40°C		60°C		t
	AVG	SD	AVG	SD	
α -tokoferol (mgL ⁻¹)	110,61	45,02	37,09	68,89	3,02*
γ -tokoferol (mgL ⁻¹)	158,26	46,80	95,40	92,40	2,95*

(n.s. - nije značajno pri P>0,05; * 0,01<P< 0,05; **0,001<P<0,01; *** P<0,001)

Tablica 32. Utjecaj tlaka ekstrakcije na sastav tokoferola u uljima

	30 MPa		400 MPa		t
	AVG	SD	AVG	SD	
α -tokoferol (mgL ⁻¹)	110,61	45,02	31,43	58,19	3,69**
γ -tokoferol (mgL ⁻¹)	181,60	44,85	163,66	42,02	1,92n.s.

(n.s. - nije značajno pri P>0,05; * 0,01<P< 0,05; **0,001<P<0,01; *** P<0,001)

Tablica 33. Promjena udjela tokoferola tijekom vremena ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: F_{CO2} = 1,75 kg h⁻¹; T_e=40 °C; P_e=30 MPa)

Uzorak			Vrijeme (h)	α -tokoferol (mgL ⁻¹)	γ -tokoferol (mgL ⁻¹)
Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Protok CO ₂ (kg h ⁻¹)			
40	30	1,75	0-0,5	134,06	242,42
40	30	1,75	0,5-1	135,18	199,58
40	30	1,75	1-1,5	125,72	189,98
40	30	1,75	1,5-2	123,97	146,66
40	30	1,75	2-2,5	123,81	129,35
40	30	1,75	2,5-3	121,23	123,47
40	30	1,75	3-3,5	120,94	117,04
40	30	1,75	3,5-4	n.d.	117,61

n.d. – nije detektirano

Tablica 34. Promjena udjela tokoferola tijekom vremena ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: F_{CO2} = 1,75 kg h⁻¹; T_e=40 °C; P_e=40 MPa)

Uzorak			Vrijeme (h)	α -tokoferol (mgL ⁻¹)	γ -tokoferol (mgL ⁻¹)
Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Protok CO ₂ (kg h ⁻¹)			
40	40	1,75	0-0,5	126,42	213,36
40	40	1,75	0,5-1	124,98	200,29
40	40	1,75	1-1,5	n.d.	157,42
40	40	1,75	1,5-2	n.d.	125,22
40	40	1,75	2-2,5	n.d.	122,02
40	40	1,75	2,5-3	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano

Tablica 35 Promjena udjela tokoferola tijekom vremena ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: F_{CO2} = 1,75 kg h⁻¹; T_e=60 °C P_e=30 MPa)

Uzorak			Vrijeme (h)	α -tokoferol (mgL ⁻¹)	γ -tokoferol (mgL ⁻¹)
Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Protok CO ₂ (kg h ⁻¹)			
60	30	1,75	0-0,5	158,71	248,51
60	30	1,75	0,5-1	137,97	179,40
60	30	1,75	1-1,5	n.d.	138,86
60	30	1,75	1,5-2	n.d.	103,50
60	30	1,75	2-2,5	n.d.	92,90
60	30	1,75	2,5-3	n.d.	n.d.
60	30	1,75	3-3,5	n.d.	n.d.
60	30	1,75	3,5-4	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano

4.7.6. Usporedba sastava masnih kiselina i tokoferola u uljima dobivenim pomoću različitih metoda ekstrakcije

Tablica 36. Sastav masnih kiselina i tokoferola u konopljinom ulju

Masne kiseline	Hladno prešanje	Soxhlet (<i>n</i> -heksan)	SFE
palmitinska (%)	7,31	7,41	6,92
γ -linolenska (%)	3,20	3,18	3,16
α -linolenska (%)	16,24	16,10	16,29
oleinska (%)	13,00	13,27	13,17
linolna (%)	58,25	57,94	58,19
Tokoferoli			
α -tokoferol (mgL ⁻¹)	n.d.	n.d.	134,06
γ -tokoferol (mgL ⁻¹)	137,46	n.d.	189,98

n.d. – nije detektirano

5. RASPRAVA

5.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA HLADNOG PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE I KVALITETU KONOPLJINOG ULJA

Na učinkovitost procesa ekstrakcije (i u postupku hladnog prešanja i ekstrakcije superkritičnim fluidima) utječu brojni procesni parametri koji mogu djelovati zavisno ili nezavisno. Određivanje, a i kontrola svih procesnih parametara praktički je nemoguća, stoga je neophodno odabrati samo one procesne parametre koji imaju najveći utjecaj na promatrani proces. Parametar poput udjela vlage u sjemenci konoplje vrlo je važan i potrebno ga je odrediti prije samog procesa prešanja jer znatno utječe na iskorištenje i kvalitetu ulja te daljnja ispitivanja. Udio vlage određen je u samljevenim sjemenkama konoplje prema izrazu (3.1) u dva ponavljanja, a srednja vrijednost je iznosila $8,09 \pm 0,08$ % (**Tablica 13**). Isto tako potrebno je znati i početnu količinu ulja u sjemenci konoplje koja je određena standardnom metodom prema izrazu (3.2). Srednja vrijednost dvaju ponavljanja iznosila je $33,34 \pm 0,11$ % (**Tablica 13**). Količina proteina i vlakana prikazana je u **Tablici 14** iz koje je vidljivo da industrijska konoplja sadrži veliku količinu proteina koja se nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂ uz određenu obradu (razdvajanje prosijavanjem) znatno povećala u zadnjoj skupljenoj frakciji (**Slika 26**).

U svim provedenim eksperimentima hladnog prešanja, tj. u dobivenim uljima pronađen je mali postotak vlage (0,071-0,094 %). Primarni produkti procesa oksidacije u ulju uglavnom čine hidroperoksidi koji se određuju preko peroksidnog broja (Pbr). Jedan od pokazatelja kvalitete ulja je svakako Pbr, a manji Pbr rezultira boljom kvalitetom ulja. U **Tablici 20**, vidljivo je da je vrijednost Pbr poslije postupka hladnog prešanja iznosila $1,95 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$. [Borhade \(2013\)](#) je objavio da Pbr u proizvedenom konopljinom ulju iznosi $7,2 \text{ Meq O}_2\text{kg}^{-1}$ ($3,6 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$), dok su [Teh i Birch \(2013\)](#) objavili vrijednost Pbr konopljinog ulja u iznosu $1,94 \text{ Meq O}_2\text{kg}^{-1}$ ($0,97 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}$). Osim niskog udjela vlage u ulju vrlo je bitno da i udio slobodnih masnih kiselina (SMK) bude što niži kako bi se zadržala kvaliteta i produžio rok trajanja ulja. Udio SMK-a u dobivenim uljima u ovom istraživanju bio je u rasponu od 2,49 do 2,66 %, dok su [Teh i Birch \(2013\)](#) objavili da su SMK-e iznosile 0,89 %. [Abramovič i Abram \(2005\)](#) objavili su visoku vrijednost SMK-a u hladno prešanom ulju i pretpostavili da do povećanja SMK-a vjerojatno dolazi zbog hidrolitičke aktivnosti lipolitičkih enzima tijekom pripreme sjemena za proizvodnju ulja (uvjeti sušenja sjemena su bili rigorozni što je utjecalo na povećanje SMK-a). Temperatura sirovog ulja (**Tablica 15**) u svim eksperimentima u ovom radu bila je u rasponu od 41 do 49 °C, a udio netopljivih nečistoća između 0,33 i 0,49 %.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je proizvedeno konopljinu ulje zadovoljavajuće kvalitete u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima NN 41/2012.

5.1.1. Statistička analiza parametara kvalitete i iskorištenja hladno prešanog ulja

Tablica 16 pokazuje da dobiveni regresijski koeficijenti, podešavanjem eksperimentalnih podataka, odgovaraju funkciji drugog reda odzivnih modela za ispitivane odzive. Linearni član modela (X_1), koji se odnosi na veličinu otvora glave preše, ima značajan utjecaj ($p < 0,05$) na količinu sirovog ulja i na količinu zaostalog ulja u pogači. Linearni član modela (X_2), koji se odnosi na temperaturu zagrijavanja glave preše, ima značajan utjecaj na količinu sirovog ulja, temperaturu ulja i udio slobodnih masnih kiseline, a linearni član modela (X_3), koji se odnosi na frekvenciju elektromotora, ima značajan utjecaj na količinu ulja, netopljivih nečistoća i na količinu zaostalog ulja u pogači. Kvadratni član modela veličine otvora glave preše (X_1^2) ima značajan utjecaj ($p < 0,05$) na količinu ulja i količinu netopljivih nečistoća. Kvadratni član modela temperature (X_2^2) ima značajan utjecaj na volumen ulja i udio slobodnih masnih kiselina, a kvadratni član modela frekvencije (X_3^2) nema značajan utjecaj na sve ispitivane odzive. Interakcija između veličine otvora glave preše i temperature (X_1X_2) imala je značajan utjecaj na količinu ulja, netopljivih nečistoća isto kao i interakcija između veličine otvora glave preše i frekvencije (X_1X_3), dok je interakcija između temperature i frekvencije (X_2X_3) imala značajan utjecaj samo na netopljive nečistoće.

ANOVA rezultati odzivnih modela prikazani su u **Tablici 17** (F -test i test vjerojatnosti). [Joglekar i May \(1987\)](#) predložili su da za dobro podešavanje modela R^2 treba biti najmanje 0,80. U ovom radu, R^2 vrijednosti svih ispitivanih varijabli odziva bile su veće od 0,85, što pokazuje da su regresijski modeli zadovoljavajući. Vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela je ispod 0,05, što znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva. Najbolji rezultati dobiveni su u slučaju ispitivanja volumena hladno prešanog ulja gdje je R^2 iznosio 0,973, a p -vrijednost 0,0001.

Najbolji način izražavanja utjecaja parametara hladnog prešanja na iskorištenje i kvalitetu ulja unutar istraživanog područja je pomoću 3D modela odzivnih površine (**Slika 29**). Iz **Slike 29** može se vidjeti da se volumen sirovog hladno prešanog ulja značajno smanjuje s porastom veličine otvora na glavi preše. Parametar frekvencije elektromotora ima značajan utjecaj na udio zaostalog ulja u pogači. Sukladno tome korištenjem niže frekvencije udio zaostalog ulja u pogači se smanjuje. Temperatura sirovog ulja u velikoj mjeri ovisi o

povećanju temperature glave preše. S povećanjem temperature glave preše proporcionalno se povećava i temperatura sirovog ulja. Udio SMK-a povećava se s porastom veličine otvora glave preše (od 6 do 12 mm). Porastom frekvencije od 20 prema 30 Hz, povećava se i udio SMK, dok se daljnjim povećanjem frekvencije udio SMK-a smanjio. Netopljive nečistoće se značajno povećavaju upotrebom više temperature i korištenjem veličine otvora na glavi preše od 6 do 10 mm, dok se kod veličine otvora na glavi preše od 10 do 12 mm može vidjeti smanjenje ispitivanog parametra. ANOVA je pokazala da su modeli prihvatljivi i mogu se koristiti za optimizaciju parametara prešanja s obzirom na iskorištenje i kvalitetu ulja.

5.1.2. Optimiranje procesa hladnog prešanja konopljinog ulja

Optimizacija je osnovni alat u prehrambenom inženjerstvu za unaprijeđenje različitih procesa sve u svrhu dobivanja kvalitetnijeg proizvoda. Tijekom optimizacije procesa hladnog prešanja, nekoliko varijabli odziva opisuju karakteristike kvalitete i iskorištenja ulja. Neke od tih varijabli treba svesti na maksimum, dok druge treba svesti na minimum. Cilj ovog istraživanja bio je pronaći najbolje procesne parametre za postupak hladnog prešanja konopljinih sjemenki. Iz **Tablice 18** vidljivo je da su primjenom metode odzivnih površine dobiveni optimalni uvjeti hladnog prešanja: temperatura glave preše 60 °C, frekvencija 20 Hz i veličina otvora glave preše 6 mm. Pri tim uvjetima izračunate optimalne vrijednosti parametara su sljedeće: volumen hladno prešanog ulja 285,3 mL, temperatura ulja 42,5 °C, udio slobodnih masnih kiselina 2,51 %, netopljive nečistoće 0,39 %, zaostalo ulje u pogači 9,97 %, što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

Iz **Tablice 19** vidljivi su parametri kvalitete ulja za optimalni uzorak (jodni i saponifikacijski broj, te udio vlage u ulju). [Kostić i sur. \(2013\)](#) objavili su da jodni broj konopljinog ulja iznosi 153 g I₂ / 100 g, a saponifikacijski broj 189,8 mg KOH/g, dok je [Borhade \(2013\)](#) prikazao iznos jodnog i saponifikacijskog broja u iznosu od 163,5 g I₂/100 g ulja i 190,2 mg KOH/g. Dobiveni rezultati u ovom radu potpuno se slažu s prikazanim činjenicama. Anisidinski broj (AV) u dobivenom hladno prešanom konopljinom ulju u ovom radu iznosio je 1, dok je izračunata vrijednost Totox broja iznosila 2,8 što ukazuje kako je dobiveno hladno prešano ulje dobre kvalitete, jer je Anisidinski broj manji od 2, a Totox broj manji od 4 ([Frankel, 2005](#)). [Oomah i sur. \(2002\)](#) pokazali su da se Anisidinski broj kod ulja različitih vrsta konoplje kretao od 0,88 do 3,41, dok su [Teh i Birch \(2013\)](#) prikazali vrijednost AV od 0,62.

5.2. OKSIDACIJSKA STABILNOST HLADNO PREŠANOG KONOPLJINOG ULJA

Rezultati oksidacijske stabilnosti hladno prešanog konopljinog ulja, sa i bez dodatka prirodnih antioksidansa prikazani u **Tablici 20** iz koje je vidljivo da konopljino ulje, bez dodanih antioksidansa (kontrolni uzorak) nakon četiri dana Schaal Oven testa ima vrijednost Pbr u iznosu od $9,09 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$. Dodavanjem eteričnog ulja origana (u koncentraciji od 0,05 %) u konopljino ulje postiže se najbolja stabilnost ulja protiv oksidacijske degradacije (Pbr iznosi $6,23 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$ nakon četiri dana) u odnosu na primjenu drugih ispitivanih prirodnih antioksidansa. Također, eterično ulje vrijeska (0,05 %), ima učinkovitu zaštitu konopljinog ulja od oksidacijske degradacije, gdje je zabilježena vrijednost Pbr nakon četiri dana testiranja u iznosu $6,67 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$. Ekstrakt zelenog čaja (0,2%) dovodi do smanjenja stabilnosti konopljinog ulja, u odnosu na konopljino ulje s dodatkom eteričnog ulja od origana, gdje je nakon četiri dana Pbr iznosio $7,24 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$. Dodatak OxyLess CS ekstrakta ružmarina u koncentracijama od 0,1% i 0,2%, bitno ne utječe na stabilnost konopljinog ulja s obzirom da je vrijednost Pbr bila tek nešto niža u odnosu na kontrolni uzorak. Stabilnost konopljinog ulja dodatno je smanjena dodatkom ekstrakta nara (0,2%), eteričnog ulja bosiljka (0,05%) i eteričnog ulja majčine dušice (0,05%), ali oksidacijska stabilnost konopljinog ulja bila je bolja od stabilnosti konopljinog ulja sa dodatkom ekstrakta ružmarina. Međutim, dodatak ekstrakta lista masline (0,1% i 0,2%), ekstrakt nara (0,1%), ekstrakt zelenog čaja (0,1%) i eteričnog ulja mente (0,05%) ne utječe na stabilnost konopljinog ulja protiv oksidacijske degradacije, naprotiv, vrijednost Pbr je veća od kontrolnog uzorka nakon 4 dana testa.

5.3. EKSTRAKCIJA ZAOSTALOG ULJA IZ POGAČE

Prije procesa ekstrakcije superkričnim CO_2 određena je količina zaostalog ulja u pogači dobivenoj pri optimalnim uvjetima ($T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $N = 6 \text{ mm}$, $Fr = 20 \text{ Hz}$) prema standardnoj metodi po *Soxhlet*-u i iznosila je $10,33 \pm 0,14\%$. Na **Slici 30** prikazano je da je tijekom 3,5 h trajanja procesa ekstrakcije pomoću superkričnog CO_2 (pri tlaku od 25 MPa i temperaturi 45°C te pri protoku CO_2 od $1,2 \text{ kg h}^{-1}$) ekstrahirana gotovo sva količina ulja iz pogače. Na **Slici 31** prikazano je konopljino ulje koje je dobiveno ekstrakcijom superkričnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja.

Daljnji tijek istraživanja uključio je istraživanje utjecaja procesnih parametara superkritične ekstrakcije (temperatura, tlak, protok CO₂) na iskorištenje ulja i vrijeme trajanja procesa ekstrakcije s time da se vrijeme trajanja ekstrakcije odredilo na osnovu praćenja iskorištenja ulja u određenim vremenskim intervalima. Kada je promjena mase dobivenog ulja u dva uzastopna ciklusa izgubila statistički značaj, odnosno kada se postigla konstantna masa ulja, proces je prekinut i zabilježeno je vrijeme trajanja procesa.

Iz krivulje ekstrakcije (**Slika 30**) vidimo da je proces ekstrakcije podijeljen u tri perioda: brzi period, prijelazni period i usporeni period ekstrakcije ulja. Prvi period je konstantni period ekstrakcije (razdoblje brze ekstrakcije) gdje je konvekcija dominantni mehanizam ekstrakcije. Količina ekstrahiranog ulja uvjetovana je topljivošću konopljinog ulja u superkritičnom CO₂. Drugi period je prijelazni period ekstrakcije (pad brzine ekstrakcije) – kombinacija konvekcije i difuzije. Treći period ekstrakcije je period difuzije (razdoblje spore ekstrakcije) – difuzija je glavni mehanizam prijenosa tvari ([Sovova, 1994](#)).

5.3.1. Utjecaj procesnih parametara superkritične ekstrakcije na iskorištenje ulja iz pogače

Prema prethodno definiranom Box-Behnkenovom planu pokusa u radu je proveden eksperiment (**Tablica 21**) na uzorku pogače koja je sadržavala najveću količinu zaosalog ulja od 15,65%. Tijekom svakog eksperimenta praćene su vrijednosti odziva (vrijeme trajanja ekstrakcije i iskorištenje ulja). Iz **Tablice 23** vidljivo je da vrijeme ekstrakcije uvelike ovisi o tlaku pri kojem se provodi ekstrakcija i protoku otapala, dok temperatura nije imala statistički značajan utjecaj na trajanje procesa ekstrakcije. Što je veći tlak i veći protok otapala vrijeme ekstrakcije se smanjuje, tj. vrijeme ekstrakcije je obrnuto proporcionalno s tlakom i protokom otapala. Trajanje procesa ekstrakcije prema eksperimentima provedenim u **Tablici 21** je bilo u rasponu od 1,5 do 7,5 h. Na promatrani odziv iskorištenja ulja jedino je tlak imao utjecaj, za razliku od temperature i protoka otapala. U ovisnosti o tlaku količina dobivenog ulja odnosno iskorištenje je bilo u rasponu od 10,11 do 14,97 %.

5.3.2. Statistička analiza parametara iskorištenja ulja iz pogače superkritičnim CO₂

Tablica 23 pokazuje da dobiveni regresijski koeficijenti, podešavanjem eksperimentalnih podataka, odgovaraju funkciji drugog stupnja odzivnih modela za ispitivane odzive. Koeficijenti se odnose na kodirane varijable. Linearni član modela (X_1), koji se odnosi na

temperaturu ekstrakcije, nema statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije. Linearni član modela (X_2), koji se odnosi na tlak, ima značajan utjecaj na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije, a linearni član modela (X_3), koji se odnosi na protok otapala, ima značajan utjecaj samo na vrijeme ekstrakcije. Kvadratni član modela temperature (X_1^2) nema značajan utjecaj ($p < 0,05$) na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije. Kvadratni član modela tlaka (X_2^2) ima značajan utjecaj na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije, dok kvadratni član modela protoka otapala (X_3^2) ima značajan utjecaj samo na vrijeme ekstrakcije. Interakcija između temperature i tlaka (X_1X_2) imala je značajan utjecaj na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije, dok interakcija između temperature i protoka otapala (X_1X_3) nije imala značajan utjecaj na iskorištenje i vrijeme ekstrakcije. Interakcija između tlaka i protoka otapala (X_2X_3) imala je značajan utjecaj samo na iskorištenje ulja.

ANOVA rezultata odzivnih modela prikazana je u **Tablici 24** (F-test i test vjerojatnosti). Kao što je spomenuto u poglavlju 5.1.1. [Joglekar i May \(1987\)](#) predložili su da za dobro podešavanje modela, R^2 treba biti najmanje 0,80. R^2 vrijednosti ispitivanih odziva varijabli bile su veće od 0,89, što čini ove regresijske modele zadovoljavajućim. Vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela je ispod 0,05, što znači da postoji statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive. Najbolji rezultat doveden je za iskorištenje ulja (R^2 je 0,972 i p -vrijednost 0,0001).

Najbolji način izražavanja utjecaja parametara ekstrakcije superkritičnim CO₂ na iskorištenje ulja i trajanje procesa ekstrakcije unutar istraživanog područja je pomoću 3D modela odzivnih površina (**Slika 32**). Iz **Slike 32** može se vidjeti da se iskorištenje ulja značajno povećalo s povećanjem tlaka. Parametri tlaka, i linearni i kvadratni član modela, imaju značajan utjecaj i na vrijeme ekstrakcije pa se pri višim tlakovima smanjuje vrijeme ekstrakcije. [Da Porto i sur. \(2012\)](#) pratili su procesne parametre tlaka, temperature i veličine čestica, te su primjenom metode odzivnih površina prikazali da se porastom tlaka povećava iskorištenje. Isto tako povećanjem protoka otapala uvelike se smanjuje vrijeme ekstrakcije.

Kao što je već prije navedeno u poglavlju 5.1.2 cilj je pronaći najbolje procesne parametre pri kojim se vrši ekstrakcija. Primjenom metode odzivnih površina dobiveni su optimalni uvjeti procesa ekstrakcije superkritičnim CO₂ vidljivi u **Tablici 21**: temperatura ekstrakcije 58,84 °C, tlak ekstrakcije 39,22 MPa i protok otapala od 1,75 kg h⁻¹. Korištenjem metode odzivnih površina izračunate su optimalne vrijednosti procesa ekstrakcije: vrijeme ekstrakcije 1,63 h i iskorištenje zaostalog ulja 15,09%. Izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije vrlo su slični s

dobivenim eksperimentalnim podacima. Optimalni uvjeti koje su prikazali [Da Porto i sur. \(2012\)](#) u njihovom eksperimentu iznosili su $T_e=40$ °C; $P_e=30$ MPa; veličina čestica=0,71mm.

5.4. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH UVJETA SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE NA PRINOS KONOPLJINOG ULJA IZ SJEMENKE

Radi usporedbe podataka o ulju dobivenom postupkom hladnog prešanja izvršena je ekstrakcija superkričnim CO₂ iz usitnjene sjemenke konoplje. Poslije usitnjavanja proveden je postupak raspodjele veličine čestica te je utvrđena veličina čestica od $0,380 \pm 0,0018$ mm.

5.4.1. Utjecaj temperature

Utjecaj temperature na iskorištenje konopljinog ulja tijekom ekstrakcije superkričnim CO₂ pri tlaku 30 MPa, protoku CO₂ od $1,75 \text{ kg h}^{-1}$ s srednjim promjerom čestica od 0,380 mm prikazuje **Slika 33**. Prikazani eksperimenti provedeni su na novokonstruiranom laboratorijskom uređaju za ekstrakciju superkričnim CO₂, volumena ekstraktora 0,5 L (**Slika 23**). Eksperiment je provođen na temperaturama 40 i 60°C, dok je tlak ekstrakcije bio konstantan i iznosio 30 MPa. Općenito, sjemenke konoplje sadržavaju 28 do 35% ulja, ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, geografskom području i godini uzgoja ([Matthäus i Brühl, 2008](#)). Zbog visokog udjela ulja u sjemenkama konoplje, nije efikasno primjenjivati niže vrijednosti tlaka od 30 MPa, zbog same dugotrajnosti procesa ekstrakcije i izuzetno malih prinosa ekstrakta ([Jokić, 2011](#)). Utjecaj promjene temperature pri tlaku od 30MPa i protoku $1,75 \text{ kg h}^{-1}$ (**Slika 33**) nije pokazao značajnu razliku u iskorištenju na što su dali objašnjenje [Eggers, \(1996\)](#) te [Salgin i sur. \(2006\)](#) koji su objavili da je povećanje iskorištenja u ovisnosti o povećanju temperaure, pri konstantnom tlaku, zabilježeno tek kod vrijednosti tlaka od 40 MPa i većim tlakovima. Isto tako zbog efekta prijelaznog tlaka (engl. *crossover pressure*) koji se kod biljnih ulja upravo nalazi na oko 30 MPa ne dolazi do povećanja iskorištenja povećanjem temperature. Naime, pri konstantnom tlaku ekstrakcije, povećanje topljivosti pri promjenama temperature ovisit će o vrijednosti tlaka. Na tlakovima ispod prijelaznog tlaka, povećanjem temperature, uslijed smanjenja gustoće superkričnog fluida, smanjivat će se i njegova moć otapanja, odnosno, u ovom slučaju, topljivost ulja u superkričnom CO₂ će se smanjivati. Suprotno tome, na tlakovima višim od prijelaznog tlaka, povećanje temperature utjecat će na povećanje topljivosti ulja u superkričnom CO₂, iako se gustoća superkričnog

fluida smanjuje, zbog većeg utjecaja temperature na porast tlaka pare ulja (King, 1997; Jokić, 2011).

Prinosi ekstrakata superkričnim CO₂ nakon 4,5 h ekstrakcije pri 40 i 60 °C iznosili su redom 28,77 ± 0,40% i 29,48 ± 0,55%, iz čega je vidljivo da povećanje temperature pri tlaku 30 MPa ne daje značajno povećanje iskorištenja ulja što možemo pripisati prethodno navedenim činjenicama, a dobivene razlike u iskorištenjima nisu statistički značajne.

5.4.2. Utjecaj tlaka

Slika 34 prikazuje promjenu iskorištenja dobivenog ulja iz usitnjene sjemenke konoplje, srednjeg promjera čestica 0,380 mm, tijekom ekstrakcije superkričnim CO₂, pri različitim tlakovima (uvjeti ekstrakcije: T_e=40°C; F_{CO₂}=1,75 kg h⁻¹). Pri konstantnom vremenu ekstrakcije, iskorištenje ulja raste sa povećanjem tlaka, zbog veće učinkovitosti otapala na višim tlakovima, što je posljedica povećanja gustoće CO₂, od 912 do 992 kg/m³, od najmanjeg do najvišeg ispitivanog tlaka. Povećanjem gustoće superkričnog CO₂ raste njegova moć otapanja, odnosno povećava se topljivost ulja u superkričnom CO₂. Ulja biljnih sjemenki imaju vrlo slabu topljivost pri nižim vrijednostima tlaka od 30 MPa dok se povećavanjem tlak do 70 MPa topljivost znatno povećava (King, 1997).

Iskorištenje dobivenog ulja pri tlaku ekstrakcije 30 MPa iznosio je 28,77 ± 0,40% za period ekstrakcije od 4,5 h. Primjenom tlaka od 400 bara, dobiveno je 29 ± 0,17% ulja za 3,5 h. Iz **Tablice 21** vidljivi su optimalni procesni parametri za ekstrakciju ulja iz pogače konoplje gdje su izračunati procesni parametri T_e=58,84 °C; P_e = 39,22 MPa; F_{CO₂} = 1,75 kg h⁻¹, dobiveno vrijeme i iskorištenje ekstrakcije iznosi 1,63 h i 15,09%.

5.4.3. Utjecaj parametara ekstrakcije na sadržaj pigmenta u dobivenim uljima

Najznačajniji pigmenti u konopljinom ulju su svakako klorofil *a* i *b* koji mu daju prepoznatljivu tamnozelenu boju (Cert i Pérez-Camino, 2000). Uz klorofil od pigmenta netopljivih u vodi i staničnom soku prisutni su još i karotenoidi. Literature na temu pigmenta u konopljinom ulju je vrlo malo što je dalo povoda da se proširi eksperiment. Na uljima dobivenim ekstrakcijom superkričnim CO₂ prema Box-Behnkenovom planu pokusa, kako je opisano u poglavlju 5.3.1, primjenjena je statistička analiza i postupak optimiranja.

Tijekom svakog eksperimenta praćene su vrijednosti odziva (udio korofila *a* i *b* i karotenoida). Iz **Tablice 26** vidljivo je da isključivo tlaku pri kojem se provodi ekstrakcija

utječe na promjenu udjela klorofila, dok protok fluida i temperatura nemaju statistički značajan utjecaj na udio ekstrahiranog klorofila i karotenoida. Što je veći tlak veća je i količina pigmenata u dobivenom ulju. U ovisnosti o tlaku raspon klorofila *a* kretao se od 101,11 do 378,28 mgkg⁻¹, klorofila *b* od 65,14 do 189,78 mgkg⁻¹, a karotenoida od 33,58 do 132,67 mgkg⁻¹. **Tablica 27** pokazuje da dobiveni regresijski koeficijenti, podešavanjem eksperimentalnih podataka, odgovaraju funkciji prvog reda odzivnih modela za ispitivani odziv klorofila *a*. Koeficijenti se odnose na kodirane varijable. Linearni član modela (X_1), koji se odnosi na temperaturu ekstrakcije, nema statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio klorofila *a* kao i linearni član modela (X_3), koji se odnosi na protok otapala. Linearni član modela (X_2), koji se odnosi na tlak, ima značajan utjecaj na udio klorofila *a*. Dobiveni regresijski koeficijenti, podešavanjem eksperimentalnih podataka, odgovaraju funkciji drugog reda odzivnih modela za ispitivani odziv klorofila *b* i karotenoida. Linearni član modela (X_1), koji se odnosi na temperaturu ekstrakcije, nema značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio klorofila *b* i karotenoida. Linearni član modela (X_2), koji se odnosi na tlak, ima značajan utjecaj na udio i na udio klorofila *b* i na udio karotenoida, a linearni član modela (X_3), koji se odnosi na protok otapala, kao i kod klorofila *a* nema značajan utjecaj na klorofil *b* i karotenoide. Kvadratni član modela temperature (X_1^2) ima značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio klorofila *b*, dok na karotenoide nema. Kvadratni član modela tlaka (X_2^2) ima značajan utjecaj na udio klorofila *b* i karotenoida, a kvadratni član modela protoka otapala (X_3^2) nema značajan utjecaj na udio klorofila *b* i karotenoida. Interakcija između temperature i tlaka imala je značajan utjecaj na udio karotenoida, dok interakcija između temperature i protoka otapala nije imala statistički značajan utjecaj na udio klorofila *b* i karotenoida. Interakcija između tlaka i protoka otapala imala je značajan utjecaj samo na udio klorofila *b*. ANOVA rezultati odzivnih modela prikazani su u **Tablici 28**. *p*-vrijednost svih regresijskih modela je ispod 0,05, što znači da postoji statistički značajan utjecaj ispitivanih nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Na **Slici 34** prikazana je fotografija ekstrakata iz sjemenke konoplje dobivenih u različitim vremenskim intervalima tijekom ekstrakcije superkritičnim CO₂ pri tlaku od 30 MPa i temperaturi 40 °C i protoku od 1,75 kg h⁻¹. Tijekom vremena ekstrakcije uočeno je smanjenje količine sakupljenih ulja te povećanje obojenosti istih. Prema boji može se zaključiti da je udio pigmenata (zelenih) na samom početku ekstrakcije vrlo mali i s vremenom se povećava.

Udio klorofila *a* u prvom sakupljenom ulju iznosio je $8,89 \text{ mgL}^{-1}$, dok je na samom završetku ekstrakcije iznosio $116,81 \text{ mgL}^{-1}$.

5.4.4. Utjecaj parametara ekstrakcije na sadržaj masnih kiselina i tokoferola u dobivenim uljima

Iz **Slike 37** može se vidjeti da je sastav masnih kiselina iz svih sakupljenih ulja tijekom procesa ekstrakcije superkritičnim CO_2 (**Slika 35**) ostao nepromijenjen tj. vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj na sastav masnih kiselina. U **Tablicama 29 i 30** prikazane su samo masne kiseline zastupljene s većim udjelom u ulju, dok su druge kiseline, kao što su C16:1 palmitoleinska, C18:0 stearinske, C20:0 arahidininska i C20:2n6 eikozadienska pronađene u vrlo malim količinama. Slične rezultate sastava masnih kiselina prikazali su autori [Kriese i sur. \(2004\)](#), [Oomah i sur. \(2002\)](#) i [Da Porto i sur. \(2012\)](#). Prosječno (**Tablica 29**), udio palmitinske kiseline značajno je veći na višoj temperaturi nego kod niže, $t(8) = -4,72$, $p < 0,01$. Nasuprot tome udio oleinske kiseline znatno veći na nižoj temperaturi nego na višoj, $t(8) = 2,91$, $p < 0,05$, dok u ostale tri masnim kiselinama razlike nisu pronađene. Isto tako razlike u udjelu masnih kiselina, primjenom različitog tlaka u postupku ekstrakcije, nisu utvrđene (**Tablica 30**). Iz **Tablica 31 i 32** vidljivo je da se povećanjem tlaka i temperature smanjuje sadržaj tokoferola. U **Tablicama 33, 34 i 35** prikazane su promjene udjela tokoferola tijekom vremena iz kojih se vidi trend opadanja tokoferola porastom tlaka i temperature. [Da Porto i sur. \(2012\)](#) objavili su da se oksidacijska stabilnost koja je rezultat količine tokoferola u uljima opada s porastom tlaka i temperature što se slaže eksperimentalnim podacima u ovome radu.

5.4.5. Usporedba sastava masnih kiselina i tokoferola u uljima dobivenim pomoću različitih metoda ekstrakcije

Tablica 36 pokazuje sastav masnih kiselina i udio tokoferola u konopljinom ulju dobivenom različitim metodama ekstrakcije (hladno prešanje i ekstrakcija organskim otapalom i superkritičnim CO_2), gdje se može zaključiti da je sadržaj masnih kiselina konopljinog ulja, dobiven pomoću sva tri postupka ekstrakcije, vrlo sličan. Udio tokoferola u konopljinom ulju dobiven pomoću ekstrakcije superkritičnim CO_2 je veći u odnosu na postupak hladnog prešanja, dok kod ulja dobivenog metodom po *Soxhlet*-u pomoću organskog otapala nisu pronađeni tokoferoli upravo zbog visokih temperatura tijekom postupka ekstrakcije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ispitivane sjemenke industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) sadrže $33,34 \pm 0,11\%$ ulja i $8,09 \pm 0,08\%$ vlage;
- Procesni uvjeti hladnog prešanja (temperatura zagrijavanja glave preše, frekvencija elektromotora, veličina otvora glave pužne preše) statistički značajno utječu na iskorištenje i kvalitetu ulja;
- Optimalni uvjeti prešanja pri kojim je dobiveno najveće iskorištenje i najbolja kvaliteta ulja određeni metodom odzivnih površina su sljedeći: temperatura zagrijavanja glave preše $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, veličina otvora glave pužne preše 6 mm i frekvencija elektromotora 20 Hz ;
- Dobiveno hladno prešano konopljinolje pokazuje visoku kvalitetu jer sadrži malu količinu vlage i netopljivih nečistoća, slobodnih masnih kiselina i nisku vrijednost peroksidnog, anisidinskog i totox broja;
- Najveća efikasnost zaštite konopljinog ulja od oksidacijskog kvarenja postignuta je dodatkom eteričnog ulja origana ($0,05\%$);
- Box-Behnkenova metoda odzivnih površina pokazala se kao učinkovita metoda u modeliranju i optimiranju promatranih procesa uz relativno mali broj pokusa;
- Optimalni uvjeti ekstrakcije ulja iz pogače superkritičnim CO_2 pri kojima je dobiveno najveće iskorištenje ulja u najkraćem vremenskom periodu su sljedeći: temperatura ekstrakcije $58,84\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlak ekstrakcije $39,22\text{ MPa}$ i protok CO_2 $1,75\text{ kg h}^{-1}$;
- Prema statističkoj značajnosti (ANOVA) utjecaja različitih procesnih uvjeta na ekstrakciju konopljinog ulja superkritičnim CO_2 vidljivo je da je tlak ekstrakcije imao najveći utjecaj na prinos ulja dok temperatura ekstrakcije nije pokazala statistički značajan utjecaj na prinos ulja. Navedena pojava posljedica je povećanja gustoće CO_2 pri višem tlaku, uslijed čega se povećava topljivost konopljinog ulja u superkritičnom CO_2 .
- Analiza varijance (ANOVA) je pokazala da procesni parametri superkritične ekstrakcije nisu imali značajan utjecaj na sastav masnih kiselina, ali su imali značajan utjecaj na sastav tokoferola. Količina α - tokoferola kretala se u intervalu od $37,09$ do $110,61\text{ mg L}^{-1}$ ovisno o primjenjenim procesnim uvjetima. Sadržaj γ -tokoferola je značajno veći od sadržaja α -tokoferola (2-3 puta), dok je sadržaj β - i δ -tokoferola nizak ili nije uopće detektiran u dobivenim frakcijama.

- Sadržaj pigmenata (klorofila i karotenoida) u ulju dobivenom ekstrakcijom superkritičnim CO₂ iz pogače znatno je viši od udjela pigmenata u ulju dobivenom postupkom hladnog prešanja. Sadržaj pigmenata u ulju dobivenog iz sjemenke konoplje superkritičnim CO₂ statistički se značajno mijenjao tijekom vremena ekstrakcije.
- Proces ekstrakcije konopljinog ulja, pri svim ispitanim procesnim uvjetima, odvijao se u tri perioda. Na početku ekstrakcije postoji linearna ovisnost količine ekstrahiranog ulja o vremenu ekstrakcije. Nakon početnog perioda konstantne brzine prijenosa ulja iz sjemenki konoplje u superkritični CO₂, dolazi do usporavanja brzine procesa ekstrakcije (prijelazni period ekstrakcije) te potom slijedi razdoblje spore ekstrakcije, gdje je glavni mehanizam prijenosa tvari difuzija.
- Nakon ekstrakcije ulja iz pogače superkritičnim CO₂ zaostaje odmašćena pogača sa značajnim sadržajem proteina ($35,51 \pm 0,05\%$) i vlakana ($26,84 \pm 0,06\%$).
- Primjenom suvremene metode ekstrakcije superkritičnim CO₂ moguće je potpuno ekstrahirati zaostalo ulje iz pogače nakon procesa prešanja što je iznimno važno u industrijskoj proizvodnji ulja, jer se time postiže gotovo potpuno iskorištenje sirovine i ostvaruju se minimalni gubitci u proizvodnom procesu;
- Poznavanje utjecaja procesnih parametara izuzetno je važno za optimizaciju i upravljanje procesima ekstrakcije superkritičnim fluidima te za projektiranje laboratorijskih, poluindustrijskih i industrijskih postrojenja;
- Značenje predloženog istraživanja ogleda se u proizvodnji visokokvalitetnog hladno prešanog ulja, maksimalnom iskorištenju ulja iz nusproizvoda i u dobivanju odmašćene pogače koja se dalje može koristiti u druge svrhe, čime je proces proizvodnje hrane zaokružen i ne stvara se velika količina organskog otpada koji danas predstavlja ogromni ekološki i financijski teret u gotovo svim granama prehrambene industrije.

7. LITERATURA

- Ab Rahman, NN; Al-Rawi, SS; Ibrahim, AH; Ben Nama, MM; Ab Kadir, MO. Supercritical carbon dioxide extraction of the residual oil from palm kernel cake. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108, 166–170.
- Abbas, KA; Mohamed, A; Abdulmir AS; Abas, HAA. Review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 4, 345–353.
- Abramovič H; Abram V; Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 43, 63–70.
- Akanda, MJH; Sarker, MZI; Ferdosh, S; Manap, MYA; Rahman, NNN; Kadir, MOA. Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. *Molecules*, 2012, 17, 1764-1794.
- Aladić, K; Jokić, S; Moslavac, T; Tomas, S; Vidović, S; Vladić, J; Šubarić, D. Cold pressing and supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 2014, 28, 4, 1-10
- Anita, A; Komal, G; Priya, M; Mayuri, N; Sonali, G; Akshaya, P; Anuja, L. Supercritical Fluid Extraction - A Green Paradigm in the Area of Separation Science. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2013, 3, 1–6.
- Anwar, F; Latif, S; Ashraf, M. Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, 83, 323–329.
- Artz, WE; Kinyanjui, T; Cheryan, M. Solubility optimization of oil components in supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Lipids*, 2005, 12, 91–102.
- Askin, R; Ötles, A. Supercritical fluids. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2005, 4, 3-16.
- Baş, D; Boyacı, İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, 836–845.
- Bernardo-Gil, MG; Casquilho, M. Modeling the supercritical fluid extraction of hazelnut and walnut oils, *AIChE Journal*, 2007, 53, 2980-2985.
- Bernardo-Gil, MG; Lopes, LMC. Supercritical fluid extraction of *Cucurbita ficifolia* seed oil. *European Food Research and Technology*, 2004, 219, 593-597
- Beveridge, THJ; Cliff, M; Sigmund, P. Supercritical carbon dioxide percolation of sea buckthorn press juice. *Journal of Food Quality*, 2004, 27, 41-54.
- Beveridge, THJ; Girard, B; Kopp, T; Drover, JCG. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1799-1804.
- Bezerra, MA; Santelli, RE; Oliveira, EP; Villar, LS; Escaleira, LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, 76, 965–77.
- Bhattacharjee, P; Singhal, RS; Tiwari, SR. Supercritical carbon dioxide extraction of cottonseed oil. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79, 892–898.

- Bimakr, M; Rahman, RA; Taip, FS; Adzahan, NM; Islam Sarker, MZ; Ganjloo, A. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from winter melon (*Benincasa hispida*) and its antioxidant activity and fatty acid composition. *Molecules*, 2013, 18, 997-1014.
- Borhade, SS. Chemical composition and characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil and essential fatty acids by HPLC method. *Archives of Applied Science Research*, 2013, 5, 5-8.
- Botelho, JRS; Medeiros, NG; Rodrigues, AMC; Araújo, ME; Machado, NT; Guimarães Santos, A; Santos, IR; Gomes-Leal, W; Carvalho Jr, RN. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. *Journal of Supercritical Fluids*, 2014, 93, 49–55.
- Boutin, O; Badens, E. Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO₂: Experimental design and products quality. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92, 396-402.
- Boutin, O; De Nadaï, A; Perez, AG; Ferrasse, JH; Beltran, M; Badens, E. Experimental and modelling of supercritical oil extraction from rapeseeds and sunflower seeds. *Chemical Engineering Research and Design*, 2011, 89, 2477-2484.
- Bravi, M; Spinoglio, F; Verdone, N; Adami, M; Aliboni, A; D'Andrea, A; De Santis, A; Ferri, D. Improving the extraction of α -tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO₂. Optimisation of the extraction conditions. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, 488–493.
- Brckan, J; Katić, M. Utjecaj parametara proizvodnje na kemijski sastav nerafiniranih ulja konoplje. Rad za rektorovu nagradu, Zagreb, 2013.
- Brunner, G. Mass transfer from solid material in gas extraction. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 1984, 88, 887-891.
- Brunner, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 2005, 67, 21–33.
- Butorac, J: Predivo bilje. Kugler d.o.o., Zagreb, 2009, str. 1-32.
- Cadoni, E; De Giorgi, MR; Medda, E; Poma, G. Supercritical CO₂ extraction of lycopene and beta carotene from ripe tomatoed. *Dyes Pigments*, 2000, 44, 27-33.
- Callaway, JC; Pate, DW. Poglavlje 5: Hempseed oil. U knjizi: *Gourmet and Health Promoting Specialty Oils*, American Oil Chemists Society Press. 2009, str. 185-213.
- Callaway, JC. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 2004, 140, 65–72.
- Cardoso De Oliveira, R; Rossi, RM; Gimenes, ML; Jagadevan, S; Machado Giufrida, W; Davantel De Barros, ST. Extraction of passion fruit seed oil using supercritical CO₂: A study of mass transfer and rheological property by bayesian inference. *Grasas y Aceites*, 2013, 64, 400-406.
- Carr, RA. Poglavlje: Oilseeds Processing. U knjizi: *Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils*, Editori: Wan, PJ, i Wakelyn, PJ, AOCS Press, Champaign, IL, 1997, str. 109-112.
- Cert, A; Moreda, W; Pérez-Camino, M. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 2000, 881, 131–148.

- Chen, BK; Diosady, LL. Enzymatic aqueous processing of coconuts. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2003, 1, 55-61.
- Chen, C-R; Wang, C-H; Wang, L-Y; Hong, Z-H; Chen, S-H; Ho, W-J; Chang, C-MJ. Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 2008, 45, 322-331.
- Chen, T; He, J; Zhang, J; Li, X; Zhang, H; Hao, J; Li, L. The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chemistry*, 2012, 134, 1030-1037.
- Ciurlia, L; Bleve, M; Rescio, L. Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 49, 338-344.
- Clavier, JY; Perrut, M. Poglavlje: Scale-up issues for supercritical fluid processing in compliance with GMP. U knjizi: *Supercritical fluid technology for drug product development*. Editori: York UP, Kompella UB, Marcel Dekker, Inc New York, 2004, str. 617-631.
- Cojocar, C; Khayet, M; Zakrzewska-Trznadel, G; Jaworska, A. Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167, 52-63.
- Corso, MP; Fagundes-Klen, MR; Silva, EA; Cardozo Filho, L; Santos, JN; Freitas, LS; Dariva, C. Extraction of sesame seed (*Sesamum indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 2010, 52, 56-61.
- Cvjetko, M; Jokić, S; Lepojević, Ž; Vidović, S; Marić, B; Radojčić Redovniković, I. Optimization of the supercritical CO₂ extraction of oil from rape seed using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 2012, 50, 208-215.
- Da Porto, C; Voinovich, D; Decorti, D; Natolino, A. Response surface optimization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) oil yield and oxidation stability by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 2012a, 68, 45-51.
- Da Porto, C; Decorti, D; Tubaro, F. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 2012b, 36, 401-404.
- Da Porto, C; Decorti, D; Natolino, A; Invernizzi, S. Application of supercritical carbon dioxide for hemp (*Cannabis Sativa* L.) seed oil extraction. *Industrie Alimentari*, 2012c, 526, 5-10.
- Da Porto, C; Decorti, D; Natolino, A. Separation of aroma compounds from industrial hemp inflorescences (*Cannabis sativa* L.) by supercritical CO₂ extraction and on-line fractionation. *Industrial Crops and Products*, 2014, 58, 99-103.
- Da Silva, C; Borges, G; de Castilhos, F; Oliveira, JV; Filho, LC. Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil at supercritical conditions. *Acta Scientiarum - Technology*, 2012, 34, 185-192.

- Da Silva, TL; Bernardo, EC; Nobre, B; Mendes, RL; Reis, A. Extraction of Victoria and Red Globe grape seed oils using supercritical carbon dioxide with and without ethanol. *Journal of Food Lipids*, 2008, 15, 356-369.
- Dalmolin, I; Mazutti, MA; Batista, EAC; Meireles, MAA; Oliveira, JV. Chemical characterization and phase behavior of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 2010, 42, 797-801.
- Damjanović, B; Lepojević, Ž; Živković, V; Tolić, A. Extracting of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 2005, 92, 143-149.
- de Franca, LF; Reber, G; Meireles, MAM; Machado, NT; Brunner, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *Journal of Supercritical Fluids*, 1999, 14, 247-256.
- de Padua, LS; Bunyaprafatsara, N; Lemmens RHMJ. U knjizi: Plant Resources of South-East Asia: Medicinal and Poisonous Plants, Leiden, Backhuys Publishers, 1999, 1, 12, str. 167-175.
- Deferne, JL; Pate, DW. Hemp seed oil: A source of valuable essential fatty acids. *Journal of the International Hemp Association*, 1996, 3, 1, 4-7.
- Del Valle, JM; Rivera, O; Mattea, M; Ruetsch, L; Daghero, J; Flores, A. Supercritical CO₂ processing of pretreated rosehip seeds: effect of process scale on oil extraction kinetics. *Journal of Supercritical Fluids*, 2004, 31, 159-174.
- Demirbas, A. Supercritical fluid extraction and chemicals from biomass with supercritical fluids. *Energy Conversion & Management*, 2001, 42, 279-294.
- Dere, S; Gunes, T; Sivaci, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, 1998, 22, 13.
- Derevich, IV; Shindyapkin, AA. Extraction of organic oil from sea buckthorn seeds with supercritical carbon dioxide. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 2004, 38, 274-283.
- Dimić, E; Turkulov, J: *Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
- Döker, O; Salgin, U; Yildiz, N; Aydogmus, M; Çalimli, A. Extraction of sesame seed oil using supercritical CO₂ and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 2010, 97, 360-366.
- Dong, J; Gu, B. Simulation of supercritical CO₂ extraction for peanut oil based on artificial neural networks. *Applied Mechanics and Materials*, 2010, 37-38, 1172-1175.
- Dong, M; Walker, TH. Characterization of high-pressure carbon dioxide explosion to enhance oil extraction from canola. *Journal of Supercritical Fluids*, 2008, 44, 193-200.
- Durante, M; Lenucci, MS; D'Amico, L; Piro, G; Mita G. Effect of drying and co-matrix addition on the yield and quality of supercritical CO₂ extracted pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) oil. *Food Chemistry*, 2014, 148, 314-320.
- Edwards, IM; Jutan, A. Optimization and control using response surface methods. *Computers and Chemical Engineering*, 1997, 21, 441-453.

- Eggers R: Poglavlje: *Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids*. U knjizi: *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, Editori: King JW i List GR, AOCS Press, Illinois, SAD, 1996, str. 34).
- Eisenmenger, M; Dunford, NT. Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008, 85, 55-61.
- Eisenmenger, M; Dunford, NT; Eller, F; Taylor, S; Martinez, J. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, 83, 1-6.
- Eller, FJ; Moser, JK; Kenar, JA; Taylor, SL. Extraction and analysis of tomato seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, 87, 755–762.
- Fils, JM. Poglavlje: The Production of Oils. U knjizi: *Edible Oil Processing*, Editori: Hamm W, Hamilton RJ, Sheffield Academy Press, 2000, str. 47–78.
- Fiori, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 43, 43–54.
- Fiori, L. Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: Plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2010, 49, 866-872.
- Fiori, L. Supercritical extraction of sunflower seed oil: Experimental data and model validation. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 50, 218-224.
- Frankel, EN. Lipid Oxidation, drugo izdanje, The Oily Press, Bridgwater, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2005.
- Galvão, EL; Martínez, J; de Oliveira, HNM; de Sousa, EMBD. Supercritical extraction of linseed oil: economical viability and modeling extraction curves. *Chemical Engineering Communications*, 2013, 200, 205-221.
- Gamse, T. Industrial applications and current trends in supercritical fluid technologies. *Hemjska industrija*, 2005, 59, 207-212.
- Gelmez, N; Kincal, NS; Yener, ME. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 48, 217–224.
- Generalić, E. Omega-3 masne kiseline, <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=omega-3+masne+kiseline> Pristupljeno 14.11.2014.
- Gruszka, J.; Kruk, J. RP-LC for Determination of Plastochromanol, Tocotrienols and Tocopherols in Plant Oils. *Chromatografia*, 2007, 66, 909-913.
- Hammond, EG; Johnson, LA; Su, C; Wang, T; White, PJ. Poglavlje: Edible oil and fat products: Edible oils. U knjizi: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Editor: Shahidi F, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, str. 592-614.
- Han, X; Cheng, L; Zhang, R; Bi, J. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO₂. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92, 370–376.

- Herrero, M; Mendiola, JA; Cifuentes, A; Ibanez, E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2495-2511.
- Honarvar, B; Sajadian, SA; Khorram, M; Samimi, A. Mathematical modeling of supercritical fluid extraction of oil from canola and sesame seeds. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2013, 30, 159-166.
- Hong, S.-A; Kim, J.-D; Kim, J; Kang, J.W; Kang, I.-J. Phase equilibria of palm oil, palm kernel oil, and oleic acid + supercritical carbon dioxide and modeling using Peng-Robinson EOS. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2010, 16, 859-865.
- Hrabovski, N; Sinadinović-Fišer, S; Nikolovski, B; Sovilj, M; Borota, O. Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO₂. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114, 1204-1211.
- HRN EN ISO 5498:1999 - Poljoprivredni prehrambeni proizvodi - Određivanje količine sirovih vlakana -- Opća metoda (ISO 5498:1981)
- HRN ISO 6492:2001 Stočna hrana - Određivanje udjela masti (ISO 6492:1999)
- HRN EN ISO 5983-2:2010 - Stočna hrana - Određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina - 2. dio: Razaranje u bloku / metoda destilacije parom
- Ixtaina, VY; Mattea, F; Cardarelli, DA; Mattea, MA; Nolasco, SM; Tomás, MC. Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of Argentinean chia seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88, 289-298.
- Ixtaina, VY; Vega, A; Nolasco, SM; Tomás, MC; Gimeno, M; Bárzana, E; Tecante, A. Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 2010, 55, 192-199.
- Jalilvand, M; Kamali, H; Nematollahi, A. Pressurized fluid extraction of rice bran oil using a modified supercritical fluid extractor and a central composite design for optimization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2013, 36, 1562-1574.
- Jenab, E; Temelli, F. Characterization of enzymatically interesterified canola oil and fully-hydrogenated canola oil blends under supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2013, 90, 1645-1652.
- Jesus, SP; Grimaldi, R; Hense, H. Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil byproduct using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 2010, 55, 149-155.
- Jiang, HE; Li, X; Zhao, YX; Ferguson, DK; Hueber, F; Bera, S; Wang, YF; Zhao, LC; Liu, CJ; Li, CS. A new insight into *Cannabis sativa* (*Cannabaceae*) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 108, 414-422.
- Jiang, ST; Niu, L. Optimization and evaluation of wheat germ oil extracted by supercritical CO₂. *Grasas y Aceites*, 2011, 62, 181-189.
- Jiao, S.-S; Li, D; Huang, Z.-G; Zhang, Z.-S; Bhandari, B; Chen, X.D; Mao, Z.-H. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of flaxseed oil using response surface methodology. *International Journal of Food Engineering*, 2008, 4, 1556-3758.
- Jin, J.-Z; Tong, J.-Y. Optimization of supercritical extraction of oil from onion by supercritical CO₂. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26, 142-144.

-
- Joglekar, AM; May, AT. Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 1987, 32, 857-868.
- Jokić, S; Zeković, Z; Vidović, S; Sudar, R; Nemet, I; Bilić, M; Velić, D. Supercritical CO₂ extraction of soybean oil: process optimisation and triacylglycerol composition. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, 45, 1939–1946.
- Jokić, S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO₂. Doktorska disertacija, Osijek, 2011.
- Jokić, S; Svilović, S; Zeković, Z; Vidović, S. Mathematical modeling of soybean oil solubility in supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011a, 46, 1031–1037.
- Jokić, S; Svilović, S; Zeković, Z; Vidović, S; Velić, D. Solubility and kinetics of soybean oil and fatty acids in supercritical CO₂. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011b, 113, 644–651.
- Jokić, S; Nagy, B; Velić, D; Bucić-Kojić, A; Bilić, M. Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkričnim CO₂ - pregledni rad. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2011c, 3, 39-54.
- Jokić, S; Nagy, B; Zeković, Z; Vidović, S; Bilić, M; Velić, D; Simándi, B. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on soybean oil yield. *Food and Bioproducts Processing*, 2012, 90, 693–699.
- Jokić, S; Nagy, B; Aladić, K; Simándi, B. Supercritical fluid extraction of soybean oil from the surface of spiked quartz sand - modelling study. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2013, 5, 70-77.
- Jokić, S; Vidović, S; Aladić, K. Poglavlje: Supercritical Fluid Extraction of Edible Oils. U knjizi: *Supercritical Fluids: Fundamentals, Properties and Applications*. Nova Science Publishers, Inc., 2014a, NY, USA, str. 205-228.
- Jokić, S; Horvat, G; Aladić, K. Poglavlje: Design of SFE system using a holistic approach - problems and challenges. U knjizi: *Supercritical Fluid Extraction: Technology, Applications and Limitations*. Nova Science Publishers, Inc., 2014b, NY, USA, str. 95-122
- Kagliwal, LD; Patil, SC; Pol, AS; Singhal, RS; Patravale, VB. Separation of bioactives from seabuckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction methodology through solubility parameter approach. *Separation and Purification Technology*, 2011, 80, 533-540.
- Khan, LM; Hanna, MA. Expression of oil from oilseeds - A review. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 1983, 28, 495-503.
- King JW. Critical fluids for oil extraction (Poglavlje 17), U „Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils” (Editori P.J. Wan i P.J. Wakelyn), str. 283-307. Champaign, Illinois: AOCs Press., 1997.
- Kostić, MD; Joković, NM; Stamenković, OS; Rajković, KM; Milić, PS; Veljković, VB. Optimization of hempseed oil extraction by *n*-hexane. *Industrial Crops and Products* 2013, 48, 133–143.
-

- Kotnik, P; Škerget, M; Knez, Ž. Kinetics of supercritical carbon dioxide extraction of borage and evening primrose seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, 108, 569-576.
- Kriese, U; Schumann, E; Weber, WE; Beyer, M; Brühl, L; Matthäus, B. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica*, 2004, 137, 339-351.
- Krishnaiah, D; Bono, A; Sarbatly, R; Fadhilah, S. Supercritical fluid extraction of palm kernel oil from palm kernel cake. *American Journal of Food Technology*, 2012, 7, 168-172.
- Latif, S; Anwar, F. Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, 111, 1042-1048.
- Leo, L; Rescio, L; Ciurlia, L; Zacheo, G. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and α -tocopherol from almond seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85, 2167-2174.
- Levelt Sengers, JMH. Poglavlje: Supercritical fluids: their properties and applications. U knjizi: *Supercritical fluids fundamentals and applications* Editori: Kiran E, Debenedetti PG, Peters CJ. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 2000; 1-29.
- Li, H; Wu, J; Rempel, CB; Thiyam, U. Effect of operating parameters on oil and phenolic extraction using supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, 87, 1081-1089.
- Lin, J-Y; Zeng, Q-X; An, Q; Zeng, Q-Z; Jian, L-X; Zhu, Z-W. Ultrasonic extraction of hempseed oil. *Journal of Food Process Engineering*, 2012, 35, 76-90.
- Liu, S; Yang, F; Zhang, C; Ji, H; Hong, P; Deng, C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 48, 9-14.
- Liyana-Pathirana, C; Shahidi, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 2005, 93, 47-56,
- Louli, V; Folas, G; Voutsas, E; Magoulas K. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 2004, 30, 163-174.
- Lu, T; Gaspar, F; Marriott, R; Mellor, S; Watkinson, C; Al-Duri, B; Seville, J; Santos, R. Extraction of borage seed oil by compressed CO₂: Effect of extraction parameters and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 41, 68-73.
- Lukinac Čačić, J: Matematičko modeliranje i optimiranje kinetike promjene boje kruha tijekom pečenja. Doktorska disertacija, Osijek, 2012.
- Luque de Castro, MD; Jimenéz-Carmona, MM. Where is supercritical fluid extraction going? *Trends in analytical chemistry*, 2000, 19, 223-228.
- Ma, Y; Zhao, Z; Li, K; Ma, X; Guo, C; Shi, Q; Zhu, H. Optimization of technology for almond oil extraction by supercritical CO₂. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23, 272-275.

- Machmudah, S; Kawahito, Y; Sasaki, M; Goto, M. Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 41, 421–428.
- Machmudah, S; Zakaria; Winardi, S; Sasaki, M; Goto, M; Kusumoto, N; Hayakawa, K. Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108, 290-296.
- Marongiu, B; Piras, A; Porcedda, S; Falconieri, D; Maxia, A; Frau, M.A; Goncalves, M.J; Cavaleiro, C; Salgueiro, L. Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (*Apiaceae*) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: Chemical composition and antifungal activity. *Natural Product Research*, 2013, 27, 1521-1527.
- Martínez, ML; Mattea, MA; Maestri, DM. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *Journal of Food Engineering*, 2008, 88, 399–404.
- Matthäus, B; Brühl, L. Virgin hemp seed oil: an interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008, 110, 655–661.
- Menvielle-Bourg, FJ; Joanny, F. Supercritical CO₂ extracted sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pulp and seed oil and its benefits on skin and mucous membranes. *Phytotherapie*, 2009, 7, 3-7.
- Mezzomo, N; Martínez, J; Ferreira, SRS. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids* 2009, 51, 10–16.
- Mezzomo, N; Mileo, BR; Friedrich, MT; Martínez, J; Ferreira, SRS. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 5622-5632.
- Michulec, M; Wardencki, W. Development of headspace solid-phase microextraction–gas chromatography method for the determination of solvent residues in edible oils and pharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1071, 119–124.
- Mišić, D; Žižović, I; Stamenić, M; Ašanin, R; Ristić, M; Petrović, SD; Skala, D. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 42, 148-152.
- Mitra, P; Ramaswamy, HS; Chang, KS. Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. *Journal of Food Engineering*, 2009, 95, 208–213.
- Morrison III, WH; Holser, R; Akin, DE. Cuticular wax from flax processing waste with hexane and super critical carbon dioxide extractions. *Industrial Crops and Products*, 2006, 24, 119-122.
- Moslavac, T; Jokić, S; Šubarić, D; Aladić, K; Vukoja, J; Prce, N. Pressing and supercritical CO₂ extraction of *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*, 2014, 54, 122-129.
- Mukhopadhyay, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton: CRC Press; 2000.
- Myers, RH; Montgomery DC. Poglavlje: Response Surface Methodology. U knjizi: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons, New York, NY, 1995.

- Nagy, B; Simándi, B; András, CsD. Characterization of packed beds of plant materials processed by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, 2008, 88, 104–113.
- Najaifan, L; Ghodsvali, A; Khodaparast, MHH; Diosady, L.L. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 2009, 42, 171-175.
- Norulaini, NA; Zaidul, IS; Anuar, O; Mohd Omar, AK. Supercritical enhancement for separation of lauric acid and oleic acid in palm kernel oil (PKO). *Separation and Purification Technology*, 2004a, 35, 55-60.
- Norulaini, NA; Zaidul, IS; Anuar, O; Azlan, A; Omar, AK. Supercritical reduction of lauric acid in palm kernel oil (PKO) to produce cocoa butter equivalent (CBE) fat. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 2004b, 37, 194-203.
- Nikolovski, B; Sovilj, M; Đokić, M; Vidović, S. Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz semena lana (*Linum usitatissimum* L.) natkritičnim ugljendioksidom. *Hemijska industrija*, 2008, 62, 283-292.
- Nikolovski, B: Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorski rad, Novi Sad, 2009.
- Nimet, G.; Silva, EA; Palú, F; Dariva, C; Freitas, LS; Medina Neto, A; Cardozo Filho, L. Extraction of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil with supercritical CO₂ and subcritical propane: Experimental and modeling. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 168, 262-268.
- Norhuda, I; Jusoff, K. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) as a clean technology for palm kernel oil extraction. *Journal of Biochemical Technology*, 2009, 1, 75–78.
- Norhuda, I; Mohd Omar, AK. Mass transfer of palm kernel oil under supercritical conditions. *Proceedings of World Academy of Science: Engineering & Technology*, 2009, 37, 169-172.
- NN 2/2005 - Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata
- NN 41/2012 - Pravilnikom o jestivim uljima i mastima
- NN 107/2001 - Zakon o suzbijanju zlouporabe opojnih droga
- Nyam, KL; Tan, CP; Karim, R; Lai, OM; Long, K; Man, YBC. Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO₂). *Food Chemistry*, 2010, 119, 1278-1283.
- Nyam, KL; Tan, CP; Lai, OM; Long, K; Man, YBC. Optimization of supercritical CO₂ extraction of phytosterol-enriched oil from Kalahari melon seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4, 1432-1441.
- Oomah, BD; Busson, M; Godfrey, DV; Drover, JC. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 2002, 76, 33–43.
- Özcan, MM; Rosa, A; Dessi, MA; Marongiu, B; Piras, A; AL-Juhaimi, FYI. Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Czech Journal of Food Sciences*, 2013, 31, 236-240.

- Özkal, SG; Yener, ME; Bayındırlı, L. Response surfaces of apricot kernel oil yield in supercritical carbon dioxide. *LWT - Food Science and Technology*, 2005, 38, 611–616.
- Özkal, SG; Yener, ME; Bayındırlı, L. The solubility of apricot kernel oil in supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology*, 2006, 41, 399–404.
- Özkal, SG. Response surface analysis and modeling of flaxseed oil yield in supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2009, 86, 1129-1135.
- Passos, CP; Silva, RM; Da Silva, FA; Coimbra, MA; Silva, CM. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 160, 634-640.
- Pederssetti, MM; Palú, F; da Silva, EA; Rohling, JH; Cardozo-Filho, L; Dariva, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 2011, 102, 189–196.
- Pereira, CG; Angela, M; Meirles, A. Supercritical Fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 2010, 3, 340- 372.
- Piras, A; Rosa, A; Falconieri, D; Porcedda, S; Dessì, MA; Marongiu, B. Extraction of oil from wheat germ by supercritical CO₂. *Molecules*, 2009, 14, 2573-2581.
- Pradhan, RC; Meda, V; Rout, PK; Naik, S; Dalai, AK. Supercritical CO₂ extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes. *Journal of Food Engineering*, 2010, 98, 393-397.
- Prado, JM; Dalmolin, I; Carareto, NDD; Basso, RC; Meirelles, AJA; Oliveira, JV; Batista, EAC; Meireles, MAA. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 2012, 109, 249-257.
- Rac M: *Ulja i masti*: Privredni pregled, Beograd, 1964.
- Rajaei, A; Barzegar, M; Sahari, MA. Comparison of antioxidative effect of tea and sesame seed oils extracted by different methods. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10, 345-350.
- Rebolleda, S; Rubio, N; Beltrán, S; Sanz, MT; González-Sanjosed, ML. Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *Journal of Supercritical Fluids*, 2012, 72, 270-277.
- Reverchon, E; De Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 2006, 38, 146-166.
- Rombaut, N; Savoie, R; Thomasset, B; Bélliard, T; Castello, J; Van Hecke, É; Lanoisellé, J-L. Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 2014, 17, 284-292.
- Rutkowska, J; Stolyhwo, A. Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. *Food Chemistry*, 2009, 115, 745-752.

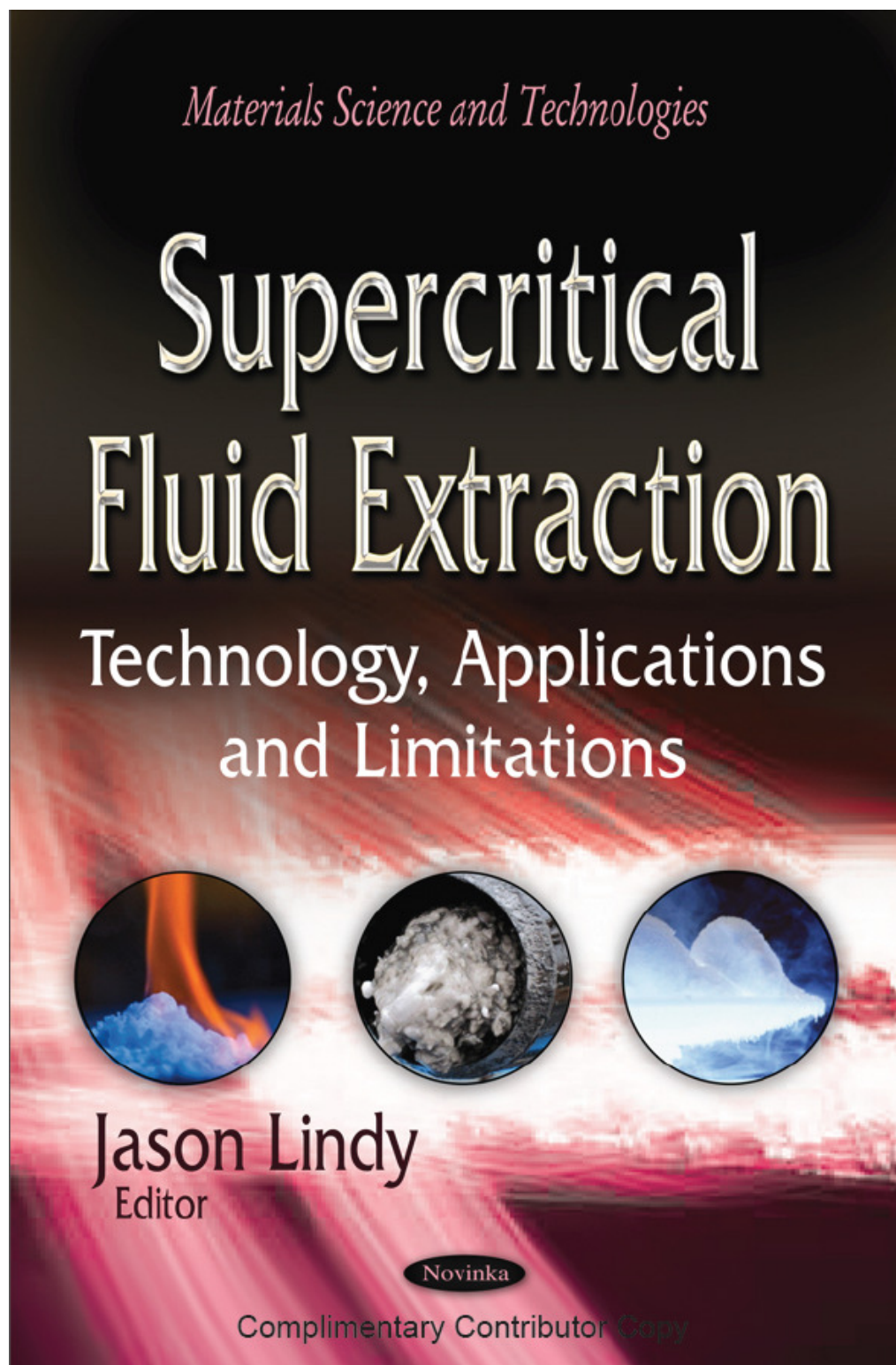
- Sacilik, K; Öztürk, R; Keskin, R. Some Physical Properties of Hemp Seed. *Biosystems Engineering*, 2003, 86, 191–198.
- Sahena, F; Zaidul, ISM; Jinap, S; Karim, AA; Abbas, KA; Norulaini, NAN; Omar, AKM. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 2009, 95, 240–253.
- Sairam, P; Ghosh, S; Jena, S; Rao, KNV; Banji, D. Supercritical Fluid Extraction (SFE)-An Overview, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 2, 3, 112–120.
- Sajfrtová, M; Ličková, I; Wimmerová, M; Sovová, H; Wimmer, Z. β -sitosterol: Supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11, 1842-1850.
- Salgin, U; Çilimli, A; Uysal, BZ. Supercritical fluid extraction of jojoba oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004, 81, 293-296.
- Salgin, S; Salgin, U. Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, 108, 577-582.
- Salgin, U; Döker, O; Çalimli, A. Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂: Experiments and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 2006, 38, 326–331.
- Salgin, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂ + ethanol mixture in green and high-tech separation process. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 39, 330-337.
- Sánchez-Vicente, Y; Cabanas, A; Renuncio, JAR; Pando, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 49, 167–173.
- Schoefs, B. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054, 217–226.
- Schwartz, H; Ollilainen, V.; Piironen, V; Lampi, AM. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 152-161.
- Shao, P; Sun, P; Ying, Y. Response surface optimization of wheat germ oil yield by supercritical carbon dioxide extraction. *Food and Bioprocesses Processing*, 2008, 86, 227–231.
- Sheibani, A; Ghaziaskar, HS. Pressurized fluid extraction of pistachio oil using a modified supercritical fluid extractor and factorial design for optimization, *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41, 1472-1477.
- Small, E; Marcus, D. Poglavlje: Hemp: A New Crop with New Uses for North America. U knjizi: Trends in new crops and new uses Editori Janick J; Whipkey A. ASHS Press, Alexandria, VA, SAD, 2002, str. 284–326.
- Soares, BMC; Gamarra, FMC; Paviani, LC; Goncalves, LAG; Cabral, FA. Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007 43, 25–31.
- Sorin-Stefan, B; Ionescu, M; Voicu, G; Ungureanu, N; Vladut, V. Poglavlje: Calculus Elements for Mechanical Presses in Oil Industry. U knjizi: Food Industry. Editor: Dr. Muzzalupo. 2013.

- Soto, C; Conde, E; Moure, A; Zúñiga, ME; Domínguez, H. Supercritical extraction of borage seed oil coupled to conventional solvent extraction of antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008, 110, 1035-1044.
- Sovilj, M; Barjaktarović, B. Kinetika ekstrakcije ulja iz sjemena uljane tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim CO₂. *Hemijska industrija*, 2005, 59, 238-242.
- Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂– I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, 1994, 49, 409–414.
- Sovová, H; Galushko, AA; Stateva, RP; Rochová, K; Sajfrtová, M; Bártlová, M. Supercritical fluid extraction of minor components of vegetable oils: β -Sitosterol. *Journal of Food Engineering*, 2010, 101, 201-209.
- Teh, S.-S; Birch, J. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, 30, 26–31.
- Tekindal, MA; Bayrak, H; Ozkaya, B; Genc, Y. Box- behnken experimental design in factorial experiments : The importance of bread for nutrition, *Turkish Journal of Field Crops*, 17, 2012, 2, 115–123.
- Temelli, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 47, 583-590.
- Tomita, K; Machmudah, S; Quitain, AT; Sasaki, M; Fukuzato, R; Goto, M. Extraction and solubility evaluation of functional seed oil in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 2013, 79, 109-113.
- Tomita, K; Machmudah, S; Wahyudiono; Fukuzato, R; Kanda, H; Quitain, AT; Sasaki, M; Goto, M. Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration. *Separation and Purification Technology*, 2014, 125, 319-325.
- Turtelli Pighinelli, ALM; Gambetta, R. Poglavlje: Oil Presses. U knjizi: *Oilseeds*. Editori: Dr. Akpan UG. InTech, 2012.
- Uluata, S.; Özdemir, N. Antioxidant Activities and Oxidative Stabilities of Some Unconventional Oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89, 551-559.
- Uquiche, E; Romero, V; Ortíz, J; Del Valle, JM. Extraction of oil and minor lipids from cold-press rapeseed cake with supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2012, 29, 585-597.
- Uribe, JAR; Perez, JIN; Kauil, HC; Rubio, GR; Alcocer, CG. Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 2011, 56, 174-178.
- Venskutonis, PR; Daukšas, E; Sivik, B. Use of immobilised lipase from *Candida antarctica* in supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seed oil. *Food Technology and Biotechnology*, 2008, 46, 157-163.
- Vidović S: Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija, Novi Sad, 2011, str. 55.
- Wan, C; Hu, S; Li, W; Deng, Q; Huang, F. Feasibility of extraction of oil from dehulled rapeseed cake using supercritical CO₂. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30, 272-278.

- Wang, L; Weller, CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17, 300–312.
- WEB 1 <http://hempseed-oil.blogspot.com/> pristupljeno 11.10.2014.
- WEB2 <http://www.cannadata.eu/index.php?id=strains&language=en&strain=50> pristupljeno 13.10.2014.
- Wenli, Y; Yaping, Z; Jingjing, C; Bo, S. Comparison of two kinds of pumpkin seed oils obtained by supercritical CO₂ extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, 106, 355–358.
- Wilkerson, S. 2008. Hemp, the world's miracle crop [rad kupljen na web lokaciji]. <https://www.nexusmagazine.com/products/hemp-the-world-s-miracle-crop-detail> Pristupljeno 11.10.2014.
- Wilkinson, N; Hilton, R; Hendry, D; Venkitasamy, C; Jacoby, W. Study of process variables in supercritical carbon dioxide extraction of soybeans. *Food Science and Technology International*, 2014, 20, 63-70.
- Williams, MA. Poglavlje: Recovery of oils and fats from oilseeds and fatty materials. U knjizi: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Editor: Shahidi F, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, str. 99-189.
- Xu, X; Gao, Y; Liu, G; Zheng, Y; Zhao, J. Supercritical CO₂ extraction of whole berry oil from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides var. sp*) fruit. *Food Science and Biotechnology*, 2008 17, 470-474.
- Yang, B; Ahotupa, M; Määtä, P; Kallio, H. Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 2011, 44, 2009-2017.
- Yang, B; Bonfigli, A; Pagani, V; Isohanni, T; van-Knorring, Å; Jutila, A; Judin, V-P. Effects of oral supplementation and topical application of supercritical CO₂ extracted sea buckthorn oil on skin ageing of female subjects. *Journal of Applied Cosmetology*, 2009, 27, 13-25.
- Yilmaz, C; Gökmen, V. Compositional characteristics of sour cherry kernel and its oil as influenced by different extraction and roasting conditions. *Industrial Crops and Products*, 2013, 49, 130-135.
- Yoon, SW; Pyo, YG; Lee, J; Lee, JS; Kim, BH; Kim, IH. The concentrations of tocopherols and γ-oryzanol compounds in rice bran oil obtained by fractional extraction with supercritical carbon dioxide. *Journal of Oleo Science*, 2014, 63, 47-53.
- Yu, J; Wang, J; Liu, C; Liu, Z; Wang, Q. Application of response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide extraction of oil from rapeseed (*Brassica napus* L.). *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47, 1115-1121.
- Zacchi, P; Daghero, J; Jaeger, P; Eggers, R. Extraction/fractionation and deacidification of wheat germ oil using supercritical carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2006, 23, 105-110.
- Zaidul, ISM; Norulaini, NNA; Mohd Omar, AK. Separation/fractionation of triglycerides in terms of fatty acid constituents in palm kernel oil using supercritical CO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006a, 86, 1138-1145.

- Zaidul, ISM; Norulaini, NNA; Omar, AKM; Smith Jr, RL. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction and fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. *Journal of Food Engineering*, 2006b, 73, 210–216.
- Zaidul, ISM; Norulaini, NAN; Mohd Omar, AK; Sato, Y; Smith Jr, RL. Separation of palm kernel oil from palm kernel with supercritical carbon dioxide using pressure swing technique. *Journal of Food Engineering*, 2007a, 81, 419-428.
- Zaidul, ISM; Norulaini, NNA; Mohd Omar, AK; Smith Jr, RL. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *Journal of Food Engineering*, 2007b, 79, 1007-1014.
- Zaidul, ISM; Norulaini, NNA; Mohd Omar, AK; Smith Jr, RL. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. *Journal of Food Engineering*, 2007c, 78, 1397-1409.
- Zhang, QA; Fan, XH; Zhang, ZQ; Zhang BS; Zhang, ZQ; Jia, XY. Optimization of SC-CO₂ extraction of oil from almond pretreated with autoclaving. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42, 1530–1537.ž
- Zhong, S; Chang, Y; Zhong, Y; Zhu, M; Zheng, J; Gao, Q; Shi, X; Ren, G. Optimization of extraction of oil from Chinese walnut by supercritical CO₂ fluid extraction technology. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28, 37-40.

8. PRILOZI



Prilog 1. Poglavlje u knjizi

In: Supercritical Fluid Extraction
Editor: Jason Lindy

ISBN: 978-1-63463-310-9
© 2015 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 5

**DESIGN OF SFE SYSTEM USING A HOLISTIC
APPROACH: PROBLEMS AND CHALLENGES**

Stela Jokić^{1*}, Goran Horvat² and Krunoslav Aladić³

¹University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek,
Faculty of Food Technology Osijek, Osijek, Croatia

²University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Faculty of Electrical
Engineering, Osijek, Croatia

³Croatian Veterinary Institute, Branch, Veterinary Institute Vinkovci,
Vinkovci, Croatia

ABSTRACT

Supercritical fluid extraction (SFE) emerged in the last few decades as a promising green technology and a good alternative in food and natural products processing. SFE has proven to be technically and economically feasible with a lot of advantages over the traditional extraction methods with organic solvents. By using carbon dioxide (CO₂) as solvent the SFE becomes environmentally friendly process resulting in extracts free of toxic solvents. Today over few hundred commercial plants in the world are using the process of SFE. SFE technology continuously increases its application in different fields and operating extraction conditions have the most influence on the performance of such processes.

* Corresponding author: e-mail : stela.jokic@ptfos.hr (S. Jokić); T: 00 385 31 224 300; F: 00 385 31 207 115.

With the rapid development of SFE technology next generation of extraction plants will begin to emerge in the upcoming years, combining up-to-date technological advances in optimizing SFE process. On this topic, precise controls of various process parameters need to be implemented with highest confidence while retaining simplicity and cost effectiveness of a system. Further on, with the advancement in Information and Communication Technologies (ICT) the ability to remotely monitor the extraction process becomes a reality, alongside with the possibility of process data exchange with other plants using Internet. This will result in maximizing production yield and obtaining high quality extracts. By presenting uniform and simple guidelines for the construction of laboratory SFE system an adequate scale-up of laboratory to industrial design purposes becomes a simple task.

This chapter highlights on-going problems and challenges in the design and development of a SFE laboratory plant from a bottom-up holistic approach. By proposing holistic approach to the problem the design of SFE system can be formulated as a multidisciplinary problem, encompassing fields such as mechanical engineering, process engineering and electrical engineering into design flow. In this manner various on-going problems in SFE design can be efficiently solved and future scale-up from laboratory to pilot or industrial plants can be simplified.

1. INTRODUCTION

Objective of every food production is to achieve high quality, minimally processed, "natural" food high in nutritional value. The important task for researchers is to find the best alternative processes that can minimize the environmental impact, decrease the toxic residues, more efficiently use the sub-products and also produce higher quality foods. The influence of pressure in process fulfills these requirements. Supercritical Fluid Extraction (SFE) is an alternative method to replace or to complement conventional industrial process such as pressing and solvent extraction. Traditional solid-organic solvent extraction methods are very time-consuming, they required relatively large quantities of solvents, they leave toxic solvent residue, and cause degradation of unsaturated compounds due to the heat. Because of this fact there is an increasing demand for different extraction techniques with shorten extraction time, reduced organic solvent consumption, and decreasing pollution. SFE technique presents various advantages over traditional methods, like the use of low temperatures, reduced energy consumption and high product quality due to the absence of solvent in extracts. Carbon dioxide (CO₂)

is most widely used compressed fluid because it is non-toxic, non-explosive, inflammable, cheap, readily available, easy removable from the product and possesses moderate critical properties ($T_c=31.1^\circ\text{C}$, $P_c=7.38$ MPa). The technical and environmental advantages of SFE technology, as well as the fact that CO_2 is generally recognized as safe (GRAS) solvent, should be utilized in as many industrial applications. The disadvantages of SFE are the high investment costs for equipment acquisition and the high energy demand of the CO_2 extraction unit (Brunner, 2005; Reverchon and De Marco, 2006; Martínez et al., 2008; Sahena et al., 2009; Temelli, 2009).

Handmade supercritical fluid extraction (HM-SFE) system enables the extraction in an inexpensive way. The obtained extraction yields and composition is very similar to those obtained by commercial SFE system (Castro-Vargas et al., 2011). Just like a commercial SFE systems, HM-SFE system is composed of various components that need to be in tune to achieve optimal extraction process. In order to balance all the components within a SFE system this paper applies a holistic approach for the problem, where the design is planned as a bottom-up approach (Figure 1).

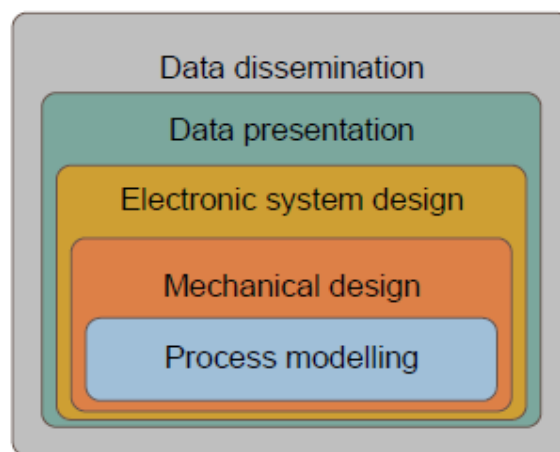


Figure 1. Holistic bottom-up approach in the design of HM-SFE system.

The first step in a holistic approach for SFE system design is defining a mathematical process model. From the defined process model a mechanical design of the device is achieved, taking into account critical constraints. After the mechanical design is finished the electronic system is projected according

to the mechanical design and the projected operating parameters (pressures, temperatures etc.).

Next on, the acquired data by the electronic system from the mechanical level is presented to the end user by means of the designed communication protocols and accompanying applications. Parameters such as temperatures, pressures and flows of fluid needs to be monitored and controlled in order to enable efficient and economical extraction process. Due to the fact that the aforementioned parameters affects the extraction yield and the quality of the extract (Jokić et al., 2012), these parameters need to be controlled and monitored with high precision. Since the process of SFE has been used on industrial scales for decades now the constraints on regulation and control are well known. However, with the arrival of new communication technologies and the concept of Internet of Things (Lehmann et al., 2012) the ability of remote multi-parametric monitoring and control of the SFE process is again placed into focus. As the application of the remote control and monitoring system is targeted at low cost HM-SFE systems used for research, the design of the electronic system must adapt to these constraints. Further on, the system must contain safety features with the ability of emergency system shutdown due to system failures.

2. SFE PLANT DESIGN AND CONSTRUCTION

Many mathematical models, presented in the literature, describe the SFE process (Valle and Fuente, 2006; Oliveira et al., 2011). Beside the knowledge of phase equilibria, the knowledge of mass transfer rates is essential for designing process equipment. The extraction process from solid substrates can be divided into two steps (Brunner, 1984): the first one is transport of the substances within the solid material to the interface solid-gas and the second one is transition of the substances into the gas and transportation with the bulk of the extracting gas. It is assumed that the extractor is cylindrically shaped and the supercritical solvent passes axially through the layer of material in the extractor, carrying out soluble substance from the solid phase. Under these assumptions, the mass balance in both phases can be represented by the following Eqs. (1)-(2):

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u_i \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{av} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(x,y)}{\varepsilon} \quad (1)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} u_i \left(D_{ax} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(x,y) \rho_f}{(1-\varepsilon) \rho_s} \quad (2)$$

where is:

x, y dimensionless concentration of solid and liquid phases (kg/kg),

u_i solvent rate (m/s),

h axial coordinate in the layer of material in the extractor (m/s),

D_{ax} diffusion coefficient in solid phase (m²/s).

D_{ay} axial dispersion coefficient (m²/s)

ρ_f, ρ_s fluid phase density and particle density (kg/m³),

$J(x,y)$ mass transfer flow at the interface (1/s)

As can be seen from Eqs. (2) and (3) transfer phenomena which exist in the SFE process are follows: accumulation in both phase, convection and dispersion in the fluid phase, the solid phase diffusion and surface mass transfer. Each SFE process consists of four basic components as followed: the compressor or high-pressure liquid pump, extraction vessel, pressure reducing valve and the separator. Basic schematic diagram is given in Figure 2.

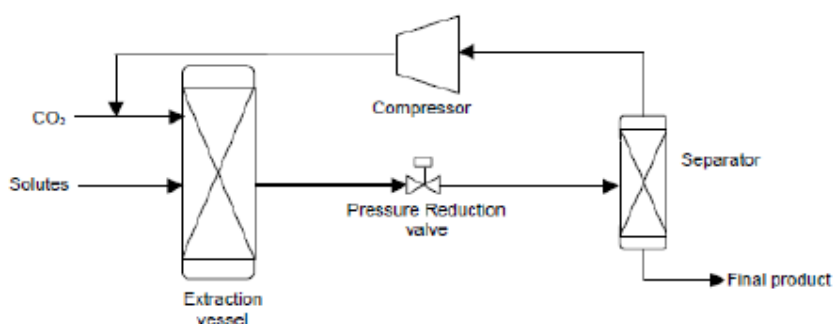


Figure 2. Basic SFE process (Burgos Solórzano, 2004).

2.1. Safety of HM-SFE System

When designing the device crucial is to pay attention to several factors that make the device safe for work, because supercritical fluids and liquefied gases present a big risk for hazard (explosion). Based on our experience in designing HM-SFE we give special importance on security of the process. For

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} u_i \left(D_{ax} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(x,y) \rho_f}{(1-\varepsilon) \rho_s} \quad (2)$$

where is:

x, y dimensionless concentration of solid and liquid phases (kg/kg),

u_i solvent rate (m/s),

h axial coordinate in the layer of material in the extractor (m/s),

D_{ax} diffusion coefficient in solid phase (m²/s).

D_{ay} axial dispersion coefficient (m²/s)

ρ_f, ρ_s fluid phase density and particle density (kg/m³),

$J(x,y)$ mass transfer flow at the interface (1/s)

As can be seen from Eqs. (2) and (3) transfer phenomena which exist in the SFE process are follows: accumulation in both phase, convection and dispersion in the fluid phase, the solid phase diffusion and surface mass transfer. Each SFE process consists of four basic components as followed: the compressor or high-pressure liquid pump, extraction vessel, pressure reducing valve and the separator. Basic schematic diagram is given in Figure 2.

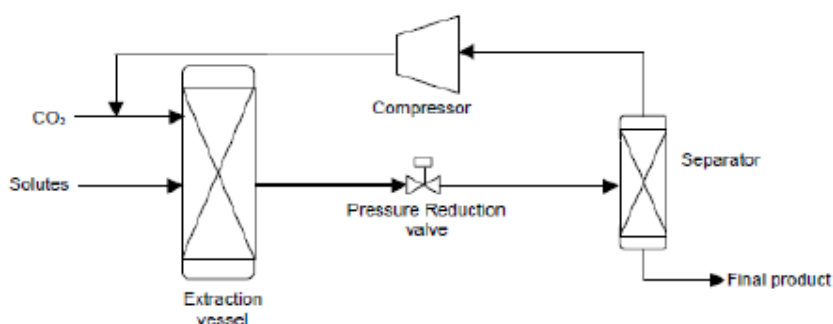


Figure 2. Basic SFE process (Burgos Solórzano, 2004).

2.1. Safety of HM-SFE System

When designing the device crucial is to pay attention to several factors that make the device safe for work, because supercritical fluids and liquefied gases present a big risk for hazard (explosion). Based on our experience in designing HM-SFE we give special importance on security of the process. For

& Perrut, 2004). Due to the need for heating and cooling fluid in the HM-SFE system required heat exchangers. Heat exchangers have the role of conditioning the fluid stream to required temperatures for pumping, extraction, separation, and holding (process storage) (Del Valle et al., 2014). In our experience the heat exchanger should be placed just before the entrance of the extractor. Thus preheated CO₂, at the temperature of the extraction, enters the extractor. The most common fluid for supercritical fluid extraction is carbon dioxide which usually comes at high purity (99.5% and higher) and it is desirable to keep the purity of such. Precisely because of this fact it is preferred to use non lubricated compressors and pumps to retain purity of carbon dioxide (Clavier & Perrut, 2004). At HM-SFE system air driven non lubricated liquid pump is used to obtain desirable carbon dioxide pressure. To prevent cavitation and irregularity in pump operation, head of pump is additionally cooled through cooling bath with stainless steel coil.

Just because limited finance for production HM-SFE used fluid isn't recycling but is released to the atmosphere. The schematic diagram of designed HM-SFE is given in Figure 3 and explained in detail in our previous paper (Jokić et al., 2014).

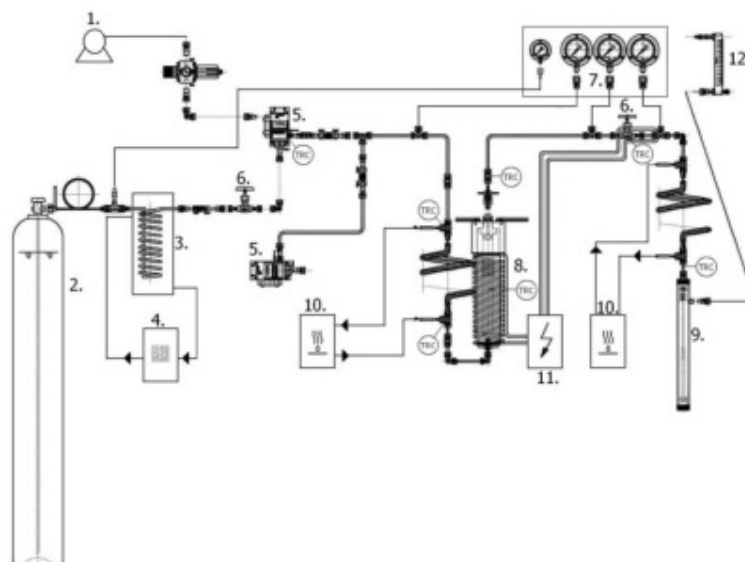


Figure 3. HM-SFE system. (1. Compressor; 2.CO₂ tank; 3.Stainless steel coil; 4.Cooling bath; 5.Air driven fluid pump; 6. High pressure needle valves (B-HV); 7. Manometers; 8.Extraction vessel; 9.Separator vessel; 10.Water bath; 11. Centralized system glass fiber heater; 12. Flow meter).

3. CONTROLLING THE SFE PROCESS

As described before, the process of SFE consists of heating and pressurizing CO₂ gas to achieve supercritical state, upon which it acts as a solvent that extracts desired components from raw material. In this process a precise control of temperatures, pressures and solvent flows is necessary in order to achieve quality extract and to avoid the possibility of relapsing the CO₂ into liquid or gaseous state. In ideal situation, basic principles of industrial automation could be applied in order to control the aforementioned parameters (Boyes, 2010), however, due to specific constraints of SFE system this section highlights the most common problems and possible solutions in achieving precise control of the SFE extraction process. Important guideline in this section will be the design of a small scale laboratory plant with emphasis on establishing efficient and cost effective process control.

3.1. Sensors, Sensing and Information Gathering

It is common knowledge that each process control starts with raw data acquisition performed by sensors installed within the system. From most simple sensors such as limit switches to the most complex biochemical and molecular sensors, the outlying principle of any sensor is to gather the information (physical quantity) from its surroundings and converts this information into an acceptable form of presentation, weather this information is interpreted by a human or by a machine (Marcus, 2006). In laboratory SFE plant design, three main physical quantities needs to be measured in order to precisely control the process of extraction and guarantee quality extract:

- Temperature,
- Pressure and
- Solvent flow.

In modern electrical engineering, measurement of temperature can be performed by various different methods, starting from a most basic bimetal temperature switches up to laser pre-celebrated semiconductor sensors with high accuracy (Boyes, 2010). The most basic principle of measuring temperature in industrial plants is the use of thermocouple probes by exploiting the thermoelectric effect in metals (called the Seebeck effect) that

manifests itself as a minute voltage difference between two conductors made of different materials (Rowe, 2005). The principle of thermocouples is shown on Figure 4.

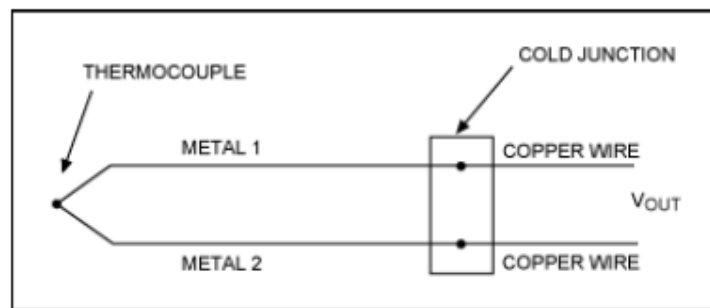


Figure 4. Simple thermocouple circuit for temperature measurement (Mirza et al., 2010).

The principle behind thermocouple measurement is the following: when a temperature difference between hot and cold junction is present a voltage proportional to the temperature difference can be measured across the conductors. This approach of measuring temperatures is most commonly used in industrial automation due to the fact that the maximal measured temperature can be up to a few thousand degrees Celsius. Beside this advantage there are various drawbacks in using thermocouple probe. The main drawback is that the thermocouple measures temperature difference (ΔT) between junctions, resulting in its inability to measure absolute temperature value. Further on, low output voltage and high sensitivity to interference propelled the need to design complex electronic circuitry and filters, resulting in an overall expensive sensor. Also, the aspect of practical application is questionable in systems with very large number of temperature measuring points. Finally, the output of the sensor is an analogue voltage that needs to be digitized further on, representing yet another component in the process of gathering temperature information. Over the years, other types of temperature sensors have been developed, such as resistance temperature detectors (RTDs) and thermistors that exploit the property of a semiconductor to vary its conductivity upon temperature difference. Its main advantages are higher stability, higher accuracy, and fast response, however their cost and limited temperature range are their main drawbacks (Omega, 2014).

In recent years the development of Integrated Circuit (IC) sensors have reduced the need to use thermocouples in small scale systems and presented an

elegant and accurate temperature measurement applicable to even larger scale systems and industrial automation. The integration of temperature sensor, signal processing circuitry, Analogue to Digital Conversion (ADC) and digital interface have resulted in an advanced temperature sensor with very few disadvantages (such as reduced temperature range and increased response time), low cost and the ability for a factory pre-calibration. Another significant advantage of using IC sensors is a very simple connection between sensors, where all the sensors occupy a single digital line, enabling the interconnection of dozens of sensors using only two wires. This digital interface is called 1Wire communication and it brings simplicity and elegance into the domain of temperature measurement (Figure 5).

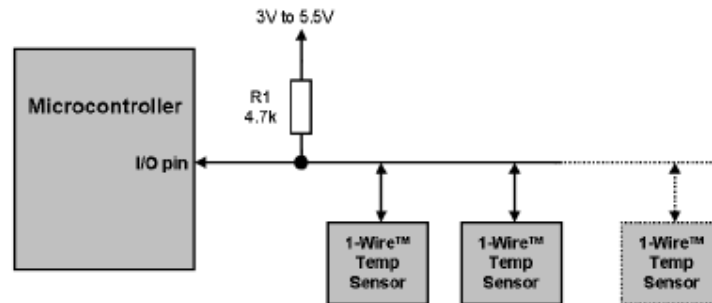


Figure 5. 1Wire communication between temperature sensors (www.maxim.com).

With the factory pre-calibration the IC sensors have a range of maximum temperature dilatation from ± 0.5 °C up to ± 2 °C (type dependent) and maximum resolution of 0.0625 °C. The main drawback of IC sensors in their response time (measurement, AD conversion and data transmission) ranging up to 800ms for a single temperature sample acquisition. However, the ability to start a global temperature conversion among all the sensors residing on a bus mitigates this drawback and enables a constant sampling rate for any number of sensors in the system. As the process of SFE is a slow time dependent process (in temperature domain) the IC sensors enables a constant monitoring of temperature variation across the entire system and the precise temperature regulation.

The aspect of measuring pressures in SFE systems is a non-trivial task. The primary reason for this statement is the fact that pressures during extraction can reach values of 500Bar (7500 psi) placing the overall question

of operator and system safety. The concept of high pressure measurement is based on classical diaphragm type of manometers, where the difference of pressure causes the diaphragm dilatation which is associated with pressure difference (Benedict, 1984). On the other hand, electrical pressure sensors (often referred to as pressure senders or pressure transducers) utilize the same effect but with one additional conversion; the diaphragm dilatation is converted to analogue voltage. This conversion is enabled by the use of strain gauges that changes their resistance according the straining or compression. The principle of operation is shown on Figure 6.

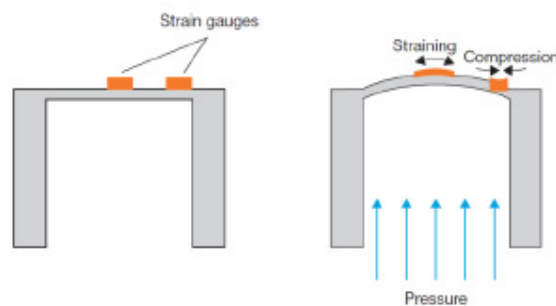


Figure 6. Fundamentals of electronic pressure sensors (Gafmann et al., 2010).

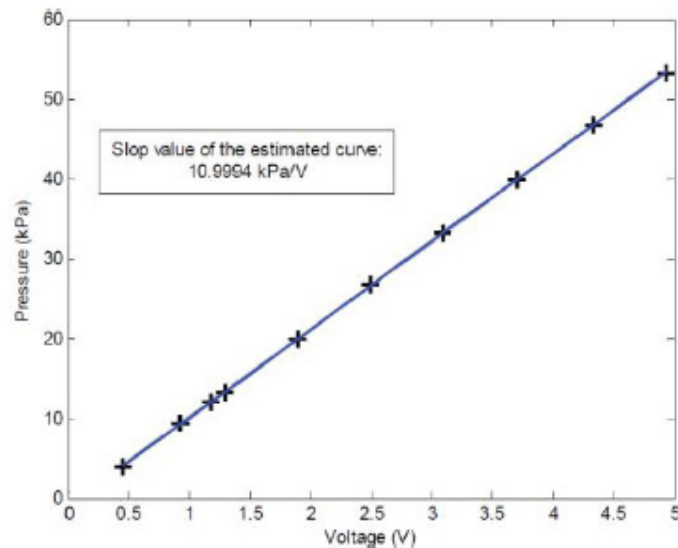


Figure 7. Transfer function of a pressure transducer (Ferreira et al., 2011).

As seen from Figure a3, the difference in pressure is expressed by change in strain gauge resistance, which is later on amplified, filtered and compensated for temperature and atmospheric pressure, resulting in an absolute pressure value. After the linearization stage within the sensor circuitry the pressure value is manifested as an output voltage (or electrical current) with a linear transfer function.

Linear transfer function is shown on Figure 7. The output analog signal of a pressure sensor is often expressed as a ratiometric signal, ranging from 10% to 90% of supply voltage (or 0.5V to 4.5V). This offset can be very useful in estimating pressure sensor faults or line severing due to the fact that at zero pressure the output voltage must be 0.5V, i.e. 10% of power supply voltage (5V regulated within sensor).

Digital pressure sensors are also available in a form of CANbus or similar digital interfaces, however in industrial applications at the moment they play a minor role due to the cost and the need to implement advanced communication protocols (Gaßmann et al., 2010). Different approach to the problems of digital pressure sensors is the use of a 1Wire Analogue to Digital Converter, connected to each pressure sensor. In this fashion it is possible to establish a data acquisition very similar to IC temperature sensors, and enable the interconnection of all sensors within the system using a single 1Wire bus. The resolution and accuracy of electronic pressure measurement depends mainly on the calibration of a sensor (shown within specifications) and the resolution of Analogue to Digital Converter. For classical ADC and pressures up to 500 bar the pressure resolution ranges from 50 mbar to 500 mbar for lower and higher pressures respectively. The response time of a pressure sensor is also regulated by the ADC and the physical characteristics of a sensor and it ranges from 10 ms up to 100 ms of response time.

Modern pressure sensors are often fitted with protective enclosures (Ingress Protection, IP) that defines the working ranges of a sensor. IP67 is the most often type of sensor protection, exhibiting the ability to support dust and water/oil type of media. Also, the temperature ranges of these sensors are often in range up to a maximum of 120 °C, presenting working temperature ranges for an SFE system. On the other hand, due to the fact that pressure within SFE system ranges up to 500 bar (7500 psi) the maximum pressure of a sensor must be chosen accordingly. An important fact to note that for a wide range of pressure sensors the maximum tolerable pressure is often expressed as a factor 1.5 times the nominal working pressure, leaving a margin for possible pressure spikes. Finally, choosing a cost effective pressure sensor that exceeds pressure values of 2000 psi is a daunting task due to the safety risk factor, but for SFE

system working pressured up to 2000 psi (such as separator, CO₂ tank and intake air pressure measurement) the low cost of the sensor can be a contributing factor in sensor choice.

Measuring mass and volumetric flow of gasses is a process of estimating the quantity of material being transferred from one point to another (Boyes, 2010). In SFE systems the primary medium used as a solvent is CO₂ that is released through the oil separator, exiting the system in gaseous form. By measuring and regulating gas flow from the system it is possible to optimize the process of extraction and increase extraction yield (Jokić et al., 2012). However, due to the fact that the exiting CO₂ gas is pressurized and cooled down to approximately a temperature below room temperature, measuring and estimating mass and volumetric flow of the gas is not trivial. The simplest method for measuring the flow rate of a gas is by means of a venturi flow meter (Figure 8).

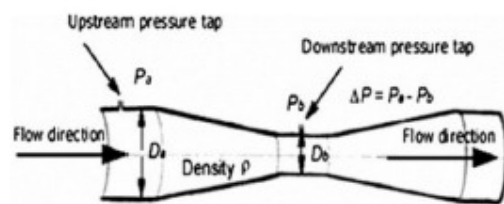


Figure 8. Cross-section of a venturi nozzle (Venkata & Roy, 2013).

A fluid passing through the nozzle smoothly varying constrictions experience changes in velocity and pressure. These changes can be used to measure flow rate of the fluid. When the fluid reaches the venturi nozzle, the fluid is forced to converge throughout a smaller aperture. The point of maximum convergence occurs at vena-contracta, where the velocity and the pressure changes. The volumetric and mass flow rates (Eq. 3) can be obtained from Bernoulli's equation by measuring the difference in fluid pressure between the two stated points (Venkata & Roy, 2013).

$$Q = C_d \cdot A_b \sqrt{\frac{1}{(1-\beta^4)}} \sqrt{\frac{2\Delta P}{\rho}} \quad (3)$$

where C_d is the discharge coefficient, A_b is the area of the flow meter cross section, β is the ratio of D_b to D_a (as shown on Figure 8), the ΔP is the differential pressure and ρ is the density of the fluid.

Even though the process of measuring flow of a gas is simple as described, due to the measurement error and non-linear transfer characteristics between pressure and flow at low values of differential pressure ΔP (low values of flow) absolute error of the measurement is significant and can create very large fluctuations within the regulation system. This is the main contributing factor in the design of an SFE flow regulation system. In order to obtain precise mass (or volumetric) flow from the system, an IC based flow meter must be installed and compensated for the specific medium used (CO_2) and for specific flow ranges. In SFE systems the flow ranges from 0 SLPM to 50 SLPM, for a small scale laboratory SFE system. By using compensated and calibrated flow meter it is possible to eliminate the large error at low flow values and ensure linear transfer characteristics. As similar to pressure sensors, calibrated flow sensors outputs electrical voltage in range from 0V to 5V, corresponding from 0 to maximum volumetric (or mass) flow. The main disadvantage of IC flow meters is their cost that increases with precision and with compensation capabilities, and it can exceed the price of a pressure sensor by a factor of 10! On the other hand, the need to measure flow of CO_2 gas in SFE systems is often considered to be a single measuring point, so the increase in price can be overlooked in the design of a stable system. By implementing ADC conversion in the form of a 1Wire adapter module (as discussed in the previous paragraph) it is possible to enable a simple data exchange over a single 1Wire bus.

3.2. Actuators and the Control of the Process

Actuators are key acting components in any industrial automation as they enable the change in the process driven by a regulator, leading to an improved, more stable and more efficient process as a whole (Hughes, 2007). In general, various actuators for controlling any process exists, but for the sake of the argument, these types are most common actuators required in an SFE system:

- Heating actuators and
- Valve actuators.

Even though the term actuator is often used to describe a device with moving components, we use the same term for any device that can act upon a component of a system. For instance, the first type of actuators, heating assembly actuators can be seen as a class of power electronic circuitry that is

responsible for controlling electric heaters and heating assembly, but due to the fact that their action results in system performance we have assorted them as a part of the actuating members. The primary goal of a heating actuators is the control of electrical (or gas type) of heaters, designed to ensure optimum temperature conditions within the system.

These components are called Solid State Relays (SSRs), as they are composed from non-moving components (as opposed to mechanical relays) and they have the ability to conduct large amounts of electrical current (power high powered loads) (Bishop, 1986). However, due to their simple and cost effective design their main disadvantage is inability to linearly control the power of electrical heaters. To rectify this problem an approach of using a very low frequency Pulse Width Modulation (PWM) can be implemented for slow time dependent process, resulting in a linear control of electrical heaters through larger time durations. Its main principle of operation is switching the heater on and off throughout time, not switching too fast due to the inverse effects of alternating current AC (causes the SSR to conduct electricity continuously) and not to slow to increase transport delay. An optimum period of 5 seconds was proven to be most effective for 50Hz alternating current, resulting in 250 steps of power regulation. This presents a good alternative to phase switching regulators that unnecessary increases the overall cost of a system.

On the other hand, the most important actuating elements in SFE systems are valve actuators. The main task of a valve actuator is to position a valve to a precise position, governed by the regulator, ensuring adequate flow and pressure. In low pressure systems these actuators are composed of servo motors, position sensor and often a 90 degrees ball type of valve being actuated. However, in high pressure systems such as SFE system the use of ball valves is not possible due to the fact that the input and output pressures on a valve can differentiate in hundreds of bar's (around 800 psi). Only solution for controlling this large pressure difference is the use of micrometering needle valves that have multiturn type of control (opening and closing the valve requires more than one turn of 360 degrees). This presents a problem due to the fact that most commercially available electric valve actuators do not support multivalve operation. Also, due to the fact that pressure difference is vast, precise control of the valve must be achieved under 1 degree precision. This is (to the best of our knowledge) an unresolved problem in the area of valve actuating for SFE systems. Some commercial variants of the valve in question exists, however their price and various limitations (such as maximum

pressure or the precision or very fast response rate in case of abrupt pressure change) renders them unusable for small scale systems.

One of the possible solutions is using a specially designed actuator suited specifically for micrometering multistep needle valves, with very fast response and very high precision. The proposed architecture is shown on Figure 9.

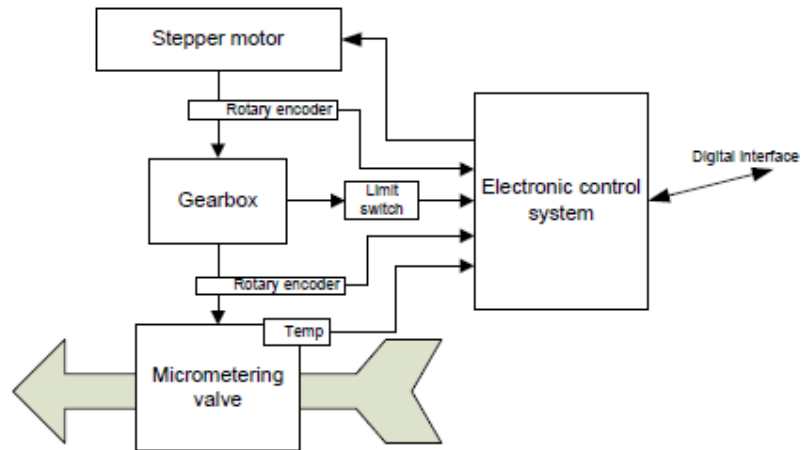


Figure 9. Proposed architecture of an electric controlled micrometering valve.

As shown on Figure 9 the proposed architecture of the micrometering valve consist of electronic control system controlling a stepper motor that is interconnected with the valve through a gearbox. On both input and output shafts of the gearbox a rotary encoder is present, monitoring the angular velocity of the shaft. Within the gearbox a limit switch is driven through an additional transmission, defining the fully closed position.

Also, a temperature sensor located on top of the valve measures the temperature of the valve and compensates for the impact of valve freeze due to large pressure drop. When pressure drops rapidly dry ice is formed within the needle of the valve, blocking the operation of the needle and preventing normal regulation.

When this phenomena occurs the valve control needs to be halted until temperature rises beyond the freezing point. This is propelled by an electric heater installed within the micrometering valve.

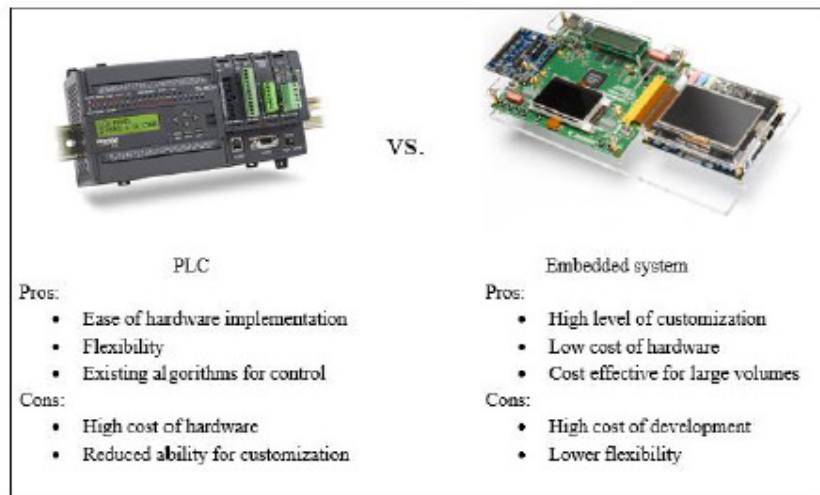


Figure 10. PLC compared to embedded system for process control.

In general, embedded systems are more cost effective from a hardware point of view, however the design of an algorithm for control must be performed by a skilled engineer. On the other hand, PLC enables easier integration and the design of an algorithm, with higher initial investment. For a small scale laboratory type of SFE system our approach was based on design and implementation of a low complexity embedded system for process control with the functionality of a complex PLC system. Figure 10 lists pros and cons for both approaches.

4. DATA PRESENTATION AND DISSEMINATION

Last but not least this section deals with the advances in ICT technology and the advantages for small scale SFE systems. In recent years the need to interconnect large number of devices into a network as a whole is becoming a daunting task and the concept called Internet of Things (IoT) started to emerge, interconnecting machine to machine (M2M) and other types of communication within the concept. As the Internet of Things (IoT) evolves the number of devices connected to Internet started to increase in exponential terms. By comparison, in 2011 the number of devices interconnected on the planet overtook the actual number of people. Nowadays more than 9 billion devices are present on the planet, and according to some forecasts in year 2020

more than 24 billion devices will be present on the planet (Gubbi et al., 2013). The concept of IoT alongside with cloud computing paradigm enables the exchange of data, control and supervision of various system using the internet infrastructure anywhere on the planet (Figure 11). In this concept the classical approaches in supervising and controlling the industrial plants is becoming outdated (Holler et al., 2014).

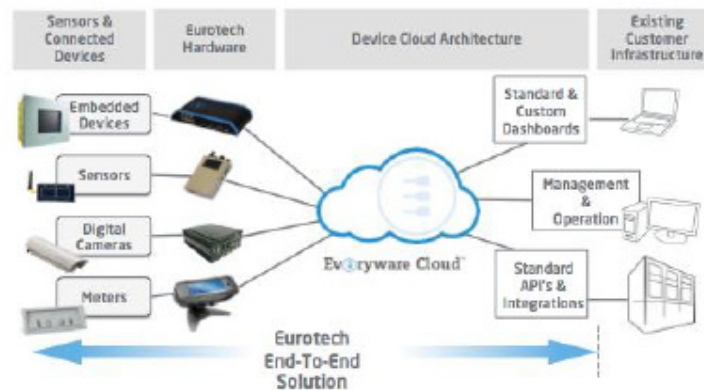


Figure 11. Cloud computing and Internet of Things (IoT) interconnecting technologies (Mayer, 2012).

On the other hand, various advantage are emerging as a consequence of IoT growth. First and foremost, with the ability of remote system supervision the data acquired within SFE system can be monitored in real-time and presented to process engineers in an effort to optimize the process of extraction. This concept is known as data presentation and dissemination, where the obtained data is used to optimize and improve on the existing process of extraction. However, another major advantage can be seen in the use of IoT and Cloud based technologies, that being the exchange of data and experience within the community of SFE systems. This concept is rather new and it involves sharing the data of the process between similar SFE systems in the attempt to optimize the process by collective experience – collaboration engineering. This approach emphasizes the computational aspects of collective intelligence, inspired from the stigmergic system designs, to perform optimization based on the collective knowledge that reflects not only the design space per se, but the collective experience in exploiting it as well (Zamfirescu et al., 2014). This in turn results in a repository of data for all SFE processes being performed, and by applying intelligent algorithms it is possible to maximize the efficiency of SFE process. We believe that this

approach is the future and can benefit not only in the design of a better and more efficient system but in general in the production of quality extract, reduction of energy consumption and CO₂ emissions respectively. These technologies are yet to come, but their implementation within classical industrial processes of SFE extraction could bring various benefits, thus they must not be neglected in years to come.

5. SCALE UP PROCEDURE

One of the aspects that require most attention is the extension and application of the results obtained on a laboratory scale to pilot plant and industrial scales. This process is in most cases very complex and it is known as „scale-up“. Studying scale-up criteria for SFE is important to establish a methodology that allows predicting the behavior of the process at industrial scale from laboratory data. Understanding the effects of different parameters on the SFE process is essential. The knowledge of these effects is not only useful for the optimization and economic evaluation of the process, but also for the ability to predict the extraction process, which is useful for scale-up as well as for the design and the optimization of an industrial plant (Han et al., 2009; Mezzomo et al., 2009). There are lots of challenges but also problems in scale-up procedure in SFE technology (Del Valle et al., 2004; Moura et al., 2005; Kotnik et al., 2007; Martinez et al., 2007; Meireles 2008; Mezzomo et al., 2009). Some of them are listed below.

Challenges in SFE technology:

- Feasible designs for scale-up are necessary for commercialization;
- Modeling for scale-up not always available;
- Continuing instrumental and equipment improvements;
- Continuing research and development for applications and new material design.

Problems in SFE technology:

- The literature on scaling-up of SFE processes is limited to mathematical expressions for a preliminary estimation of both investment and operating costs;

- Some authors claim that SFE process is more efficient at larger scale and reports lower yields as operation scale increases;
- One of the problems found in scale-up studies is the use of small vessels for determining extraction curves, which influences the results because of the extract loss in the tubes walls of the equipment;

Due to experimental problems and the fact that there is no consensus, more studies on this field are needed. Del Valle et al. (2004) suggested that since several parameters influence SFE process, an efficient scale-up criterion should include the influence of the interactions among these parameters. On the other hand, using a simple criterion could help to develop a scale-up method easily applicable, which would decrease time and cost employed on developing the SFE process.

SFE processes can be scaled-up from lab-scale or pilot scale results according to the following procedure (Clavier & Perrut, 2004):

1. Small scale experiments should be performed first to achieve optimal extraction conditions through a scanning of different process parameters such as extraction pressures, temperatures, solvent flow rate, etc.
2. Selection of scale-up method according to mechanism which control the extraction process (solubility/diffusion).

Many extractions are limited by both solubility and diffusion. In Figure 12 is shown the typical extraction curves where the extraction yield (kg extract/kg feed) is plotted against the mass of solvent passed through the extractor per unit mass of feed (kg CO₂/kg feed). The extraction is characterized by first period during which the extraction rate is constant and the second period during which the extraction rate is decreasing due to the diffusion limitation. The first part of the extraction curve is always a right line corresponding to CO₂ saturation (extract solubility in CO₂). Both periods are smoothly connected by a short transition section.

Depending on the complexity and kinetic limitations of the extraction, different scale-up methods can be applied to design the production unit. If we consider that the extractor is under isothermal conditions and chemical reaction does not take place, the only similarity relationships that should be consider are those corresponding to geometry and dynamics. For this reason, it is necessary to keep constant in both scales, laboratory and industrial, the

geometric factors and the dimensionless numbers related to the dynamic similarity. In geometric proposal (Eq. 4):

$$\frac{h_{packed\ column}}{d_{packed\ column}} = \text{constant} \quad (4)$$

the ratio packed column height/packed column diameter should be maintained constant. Furthermore, the scale-up assays can be performed according to four proposals presented by Clavier and Perrut (2004). The first three proposals are based on the mass transfer mechanism involved in the extraction, and proposal 4 considers dimensionless numbers.

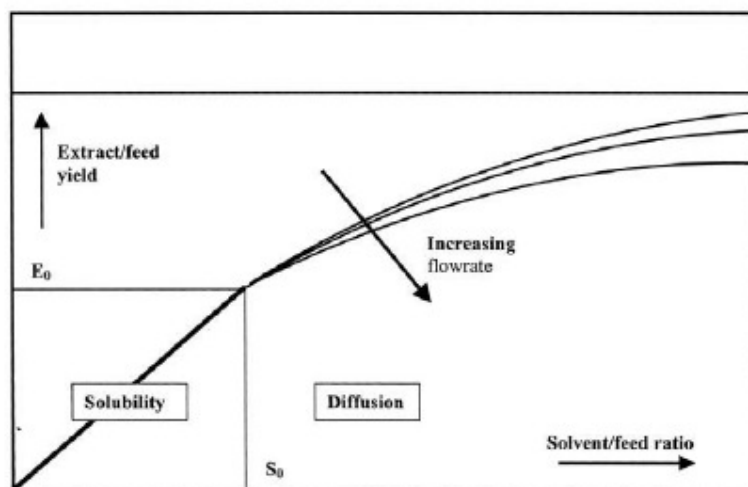


Figure 12. Typical extraction curves (Clavier & Perrut, 2004).

These proposals are presented as follows:

Proposal 1: for processes where the solubility is the limiting kinetics mechanism, the ratio solvent mass/raw material mass should be maintain constant between small and large scales as given in following equation (Eq. 5):

$$\frac{\dot{m}_f}{m_s} = \text{constant} \quad (5)$$

where the m_s and \dot{m}_f are the mass of the raw material and the mass of the CO_2 .

Proposal 2: for processes where the diffusion mechanism (particularly internal diffusion) controls the extraction, the ratio CO_2 flow rate/mass of raw material as given:

$$\frac{Q_f}{m_s} = \text{const.} \quad (6)$$

should be maintained constant between small and large scales.

Proposal 3: for processes where diffusion and solubility are limiting mechanisms, both ratios (Eq. 5 and Eq. 6) should be maintained constant between small and large scales.

Proposal 4: in this proposal three factors should be maintained constant between small and large scale: solvent mass/raw material mass, CO_2 flow rate/mass of raw material and the *Reynolds* number (*Re*).

From all of the above mentioned the appropriate extrapolation method for scale-up depends on the mechanism controlling the extraction, which could be the solubility of the extract in the fluid, internal diffusion in the extracted material, or their combination.

The different models from literature can be used for the simulation of extraction process. In our previous research Sovová's model (Sovová, 1994) was adequate to predict the overall extraction curves in SFE of soybean oil (Jokić et al., 2012).

The scale-up proposals given by Clavier and Perrut (2004) were used. The similar results for the same scale-up proposal have been published by Mezzomo et al. (2009) where authors investigate the SFE of peach almond oil. Four different scale-up methodologies were performed and the best scale-up criterion was obtained maintaining the ratio CO_2 flow rate/mass of raw material constant. Martínez et al. (2007) also achieved the similar results during scale-up study of SFE of clove and vetiver oils.

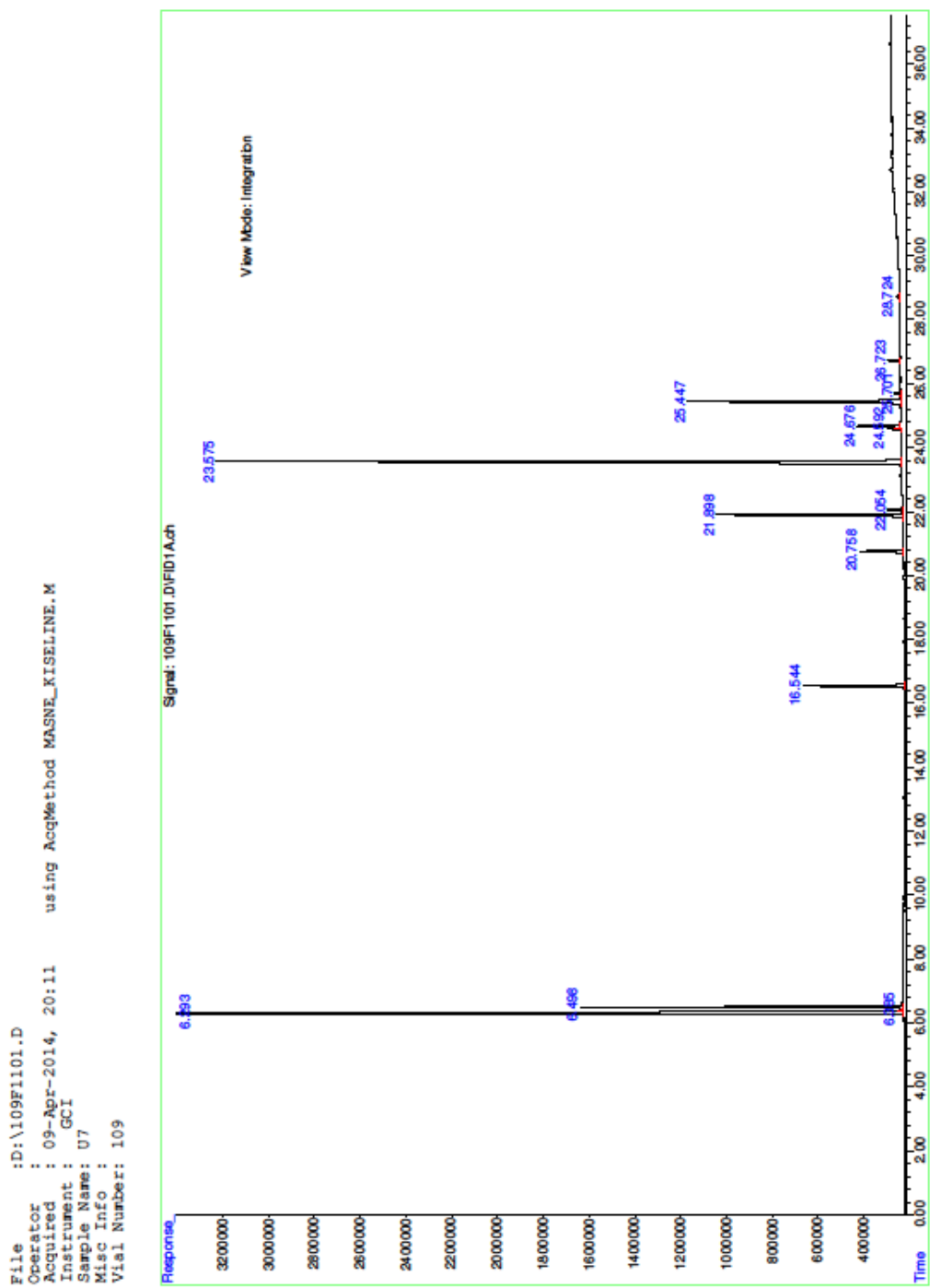
CONCLUSION

This paper presents a holistic approach in the design of a HM-SFE, used as a small scale research SFE system. The proposed approach incorporates the bottom-up design where the system is projected from a mass transfer mathematical model towards a functioning SFE system.

In the process of the design, mechanical design and development is performed, following by the implementation of an electronic process control system and implementing a remote supervision and control system with ability of presenting relevant data to end user. After the design of the system the comparison of the proposed system is drawn in respect to the existing commercial system. The measurements included extraction yield over time for the two systems. From the measurement results it can be concluded that the statistical error between the compared systems is less than 10%, representing a significant correlation of the data and the validation of the proposed HM-SFE system.

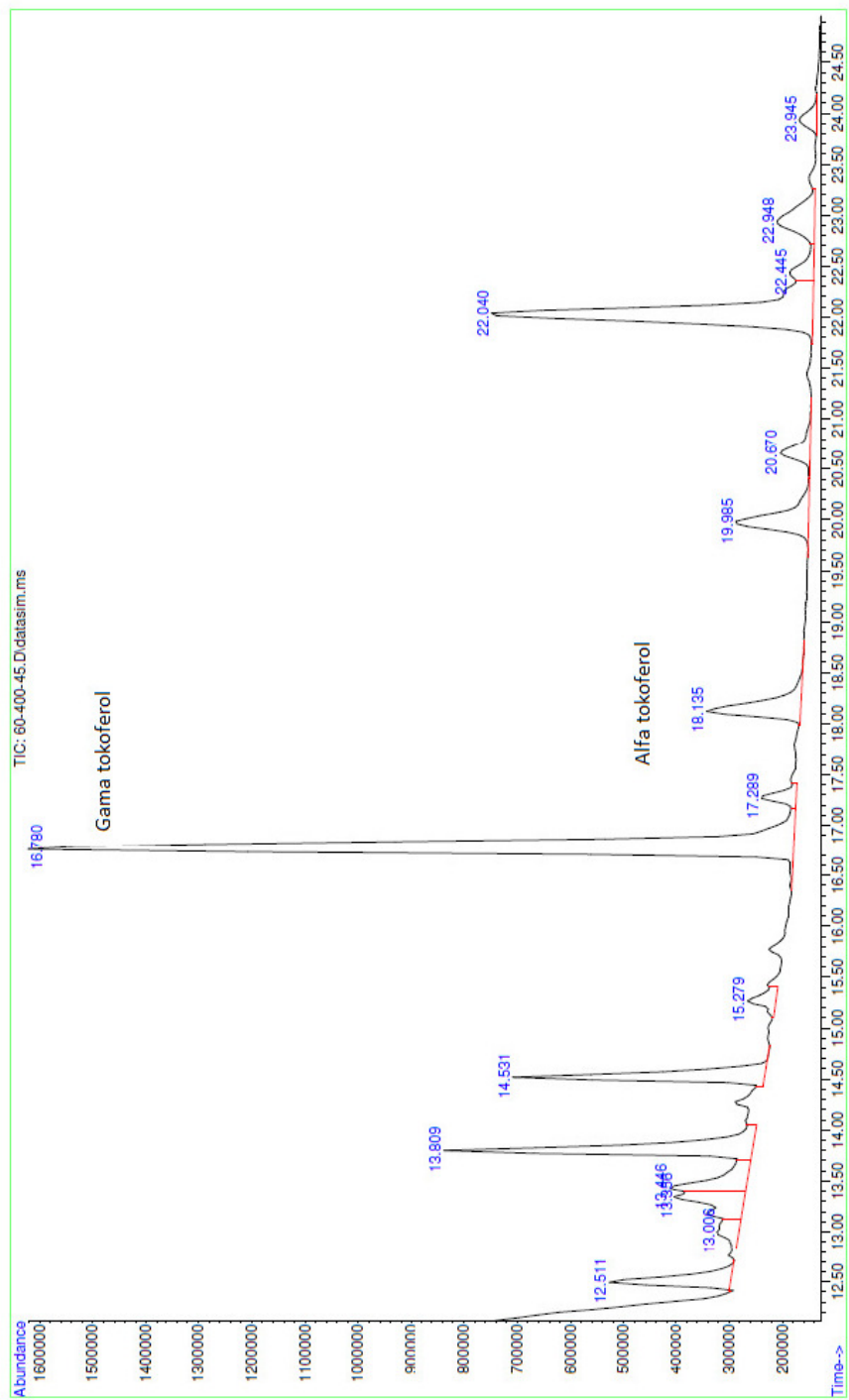
The proposed system offers a cost effective solution for small scale research SFE systems with the ability of detailed parametric analysis and remote process supervision, normally not available in industrial grade SFE systems. The fact that the system enables remote parameter supervision and remote process control presents an advantage for scientific research. Also with precision temperature and pressure control a supercritical state of the CO₂ can be guaranteed, eliminating the possibility of not achieving supercritical conditions of the fluid.

In conclusion it must be noted that holistic approach enables user customization of a system, eliminating most common problems is the pursuit of designing a small scale SFE system, designed for laboratory use, however for large industrial scale systems a classical industrial automation approach is a more suited option, due to the fact that the initial cost of industrial automation cannot be compared to any damage or fault cost that can arise from an inadequately designed measurement, actuating or control system. The goal of this chapter was to present recent advantages and the process of designing a complete SFE system, so this chapter should be used as a guideline upon system design.



Prilog 2. Primjer kromatograma određivanja sastava masnih kiselina

File : C:\msdchem\1\data\Tokoferoli\Konoplja Kruno\60-400-45.D
Operator :
Acquired : 27 Feb 2014 11:02 using AcqMethod VITAMIN E SIM.M
Instrument : GCMSD
Sample Name : 60/400/45
Misc Info :
Vial Number : 65



Prilog 3. Primjer kromatograma određivanja tokoferola