UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Marko V. Malićanin

IZOLOVANJE I FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ULJA IZ SEMENA CRVENIH SORTI GROŽĐA

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Marko V. Malićanin

EXTRACTION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF GRAPE SEED OILS OBTAINED FROM RED GRAPE VARIETIES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

_____

Dr Vesna Rakić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

_____

Dr Mališa Antić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

_____

Dr Irena Žižović vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko metalurški fakultet

_____

Dr Biljana Rabrenović, docent,

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

_____

Dr Dragica Zorić, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

Koristim ovu priliku da se najsrdačnije zahvalim svom mentoru, prof. dr. Vesni Rakić, na prenesenom znanju, neizmernoj i svesrdnoj pomoći, savetima i podršci tokom kompletnih doktorskih studija i u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Prof. dr. Vesna Rakić je izuzetan mentor i saradnik, te smatram da je rad sa njom na ovoj doktorskoj disertaciji bio posebna privilegija.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mališi Antiću na svesrdnoj pomoći i sugestijama u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Posebno sam mu zahvalan na pomoći pri rešavanju nedoumica vezanih za hemiju ulja i tumačenju dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se prof. dr. Ireni Žižović na pruženoj pomoći tokom osmišljavanja i sprovođenja eksperimentalnog dela u oblasti ekstrakcije natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom, kao i na korisnim savetima u toku završne faze izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr. Biljani Rabrenović na korisnim sugestijama i savetima u rešavanju nedoumica u tehnološkom delu ove doktorske disertacije, kao i na pomoći u toku završne faze izrade disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. Dragici Zorić na korisnim sugestijama u toku završne faze izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. Vladimiru Pavloviću na velikoj pomoći koju mi je pružio pri analiziranju morfologije i anatomije semenki grožđa skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

Zahvalnost dugujem i dr. Stanislavi Gorjanović, kao i mr. Stevanu Blagojeviću koji su mi pomogli u delu fizičko-hemijske karakterizacije dobijenih uzoraka ulja.

Posebnu i neizmernu zahvalnost dugujem svojoj koleginici Srbijanki Marković koja mi je svojim znanjem i iskustvom bezrezervno pomogla u eksperimentalnom radu.

I na kraju beskrajno se zahvaljujem svojoj porodici, supruzi Svetlani, sinovima Vladeti i Matiji i svojoj majci Radi, koji su me svakodnevno podržavali i podsticali za sve vreme trajanja ovog, za mene izuzetno važnog projekta.

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Beograd – Zemun

IZOLOVANJE I FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ULJA IZ SEMENA CRVENIH SORTI GROŽĐA

Rezime

Ulje semenki grožđa predstavlja odličnu alternativu tradicionalno korišćenim jestivim biljnim uljima, naročito u kontrolisanim režimima ishrane. Zdravstveno koristan aspekt, odnosno, funkcionalnost ovog ulja potiče od njegovog sastava: ulje semenki grožđa je bogato nezasićenim masnim kiselinama (posebno linolnom) i ima izuzetno nizak sadržaj holesterola (*Crews et al., 2006; Matthäus, 2008; Bail et al., 2008; Pardo et al., 2009*). Pored toga ovo ulje sadrži prirodne antioksidante, kao što su polifenoli i tokoferoli koji imaju ulogu u zaštiti od slobodno radikalskih reakcija i oksidativnog stresa (*Maier et al.,2009*).

Upravljanje velikim količinama organskog otpada koji nastaje u prehrambenoj industriji predstavlja ozbiljan ekološki problem. Zbog toga su u toku istraživanja koja bi omogućila nove procese za kontrolisano odlaganje otpada i njegovo prevođenje u druge biološki aktivne i iskoristljive proizvode. Ovakvi procesi bi rešili probleme zagađenja životne sredine i sa druge strane stvorili dodatne izvore prihoda. Dakle, iskorišćenje otpada od grožđa uključujući i semenke izuzetno je važno sa dva aspekta: ekološkog i ekonomskog. S tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji vršeno je izdvajanje ulja iz semenki crvenih sorti grožđa primenom različitih metoda ekstrakcije i fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih ulja.

U poglavlju 5.1 ovog rada je ispitivana mogućnost primene ultrazvuka u pospešivanju ekstrakcije ulja iz semenki grožđa, uz korišćenje male, ekološki prihvatljive količine n-heksana kao rastvarača (odnos rastvarača i uzorka 2:1). Vreme trajanja ultrazvučnog tretmana u ekstrakciji ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon iz berbe 2012. je menjano od 15 do 135 minuta; dok su svi ostali parametri ekstrakcije (temperatura, odnos mase rastvarača i uzorka semenke, snaga i frekfencija

ultrazvuka) držani konstantnim. Prinosi ulja određeni su gravimetrijski, a dobijeni uzorci ulja su okarakterisani u pogledu biološki aktivnih komponenti, korišćenjem UV-Vis spektorskopije (sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja), tečne hromatografije (HPLC - α-tokoferol), gasne hromatografije (GC - sastav masnih kiselina). Za određivanje antioksidativnog kapaciteta i oksidativne stabilnosti, korišćene su moderne analitičke tehnike: metoda luminol – hemiluminiscencije i diferencijalno skenirajuća kalorimetrija kombinovana sa termogravimetrijom (DSC-TG). Određeno je najpovoljnije vreme tretmana ultrazvukom sa aspekta ekstrakcionog prinosa i sadržaja biološki aktivnih komponenti i utvrđen uticaj sastava i sadržaja antioksidanata na antioksidativni kapacitet i oksidativnu stabilnost.

Poglavlja 5.2 i 5.3 najpre prikazuju rezultate ispitivanja morfologije semenki pet sorti grožđa iz kojih je vršena ekstrakcija (Pinot Noir, Prokupac, Gamay, Merlot i Cabernet Sauvignon, berba 2013) primenom skenirajuće elektronske mikroskopije. Potom su prikazani rezultati izdvajanja ulja iz semenki ovih sorti metodama hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u vremenu trajanja od 90 minuta i izvršena fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semenki ispitivanih crvenih sorti grožđa. Prinosi ulja određeni su gravimetrijski i poređeni sa ukupnim sadržajem ulja određenim metodom po Soxhlet-u. Primenom standardnih volumetrijskih metoda određeni su sledeći fizičko-hemisjki parametri kvaliteta: gubitak mase sušenjem, relativna gustina, tačka dimljenja, saponifikacioni, jodni, kiselinski i peroksidni broj. Sastav masnih kiselina i sadržaj α-tokoferola određeni su GC-MS i HPLC metodom, respektivno. Primenom UV-Vis spektrofotometrije je određen sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i anisidinski broj, dok je otpornost ulja na oksidaciju utvrđena merenjem indukcionog perioda Rancimat testom i određivanjem početne temperature oksidacije (OOT) primenom DSC tehnike.

U cilju optimizacije metode hladnog ceđenja, ispitan je uticaj uklanjanja dela spoljnjeg omotača semenke autohtone sorte grožđa Prokupac, kao predtretmana hladnom ceđenju ulja, na povećanje prinosa i na kvalitet dobijenog ulja. Rezultati su prikazani u poglavlju 5.4.

Mogućnost primene natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom za izdvajanje ulja iz semenki crvenih sorti grožđa je takođe ispitana; a dobijeni rezultati su prikazani u poglavlju 5.5. Natkritična ekstrakcija ulja iz semenki grožđa sorti: Pinot Noir, Prokupac,

Gamay, Merlot i Cabernet Sauvignon (berba 2013), vršena je sa ugljenik(IV)-oksidom na pritisku od 25 Mpa, temperaturi od 50 °C i protoku 0,3 kg CO_2/h, na postrojenju Autoclave Engineers SCE Screening System, SAD. Utvrđeni su ekstrakcioni prinosi ulja, ispitana je kinetika ekstrakcije i izvršeno je njeno matematičko modelovanje modelom po Sovovoj. U izdvojenim uzorcima ulja, korišćenjem prethodno pomenutih analitičkih metoda, određen je sastav masnih kiselina, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola, dok je otpornost ulja na oksidaciju procenjena primenom DSC tehnike.

U ovom radu je analiziran uticaj sorte grožđa na ukupan sadržaj ulja u semenkama grožđa, kao i uticaj sorte i metode izdvajanja na ekstrakcione prinose, fizičko-hemijske karakteristike, sadržaj biološki aktivnih komponenti i održivost ulja iz semenki grožđa. Dokazan je uticaj biološki aktivnih komponenti na antioksidativni kapacitet i otpornost ulja na oksidaciju.

Ključne reči: ulje semenke grožđa; hladno ceđenje; ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom; natkritična ekstrakcija; sastav masnih kiselina; fenolna jedinjenja; antioksidativni kapacitet; otpornost na oksidaciju.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Prehrambena tehnologija

UDK: 66.061.34:634.863:631.53.027(043.3)

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Belgrade – Zemun

EXTRACTION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF GRAPE SEED OILS OBTAINED FROM RED GRAPE VARIETIES

Abstract

Grape seed oil represents a suitable alternative to traditionally used edible vegetable oils, especially in controlled diets. Good health aspect or named more precisely, the functionality of this oil originates from its composition: grape seed oil is rich in unsaturated fatty acids (especially linoleic) and it possesses very low amounts of cholesterol (*Crews et al., 2006; Matthäus, 2008; Bail et al., 2008; Pardo et al., 2009*). Besides, this oil contains natural antioxidants, such as poliphenols and tocopherols, which have their role in protection from free radical reactions and oxidative stress (*Maier et al., 2009*).

Management of large amounts of organic waste from food industry could be a serious ecological problem. For that reasons, vast investigations are in progress, which should enable some new processes of controlling waste disposal and making it biologically active and useful products. Such processes would solve problems of the environment pollution, and, on the other side, they would bring an additional income. Therefore, the use of grape waste, including seeds, is very important from two aspects: ecological and economical. Having this in mind, in this work the oil was extracted from red grape variety using different extraction methods. The physico-chemical characterization of the obtained oils was done as well.

In order to improve the extraction of oil from grape seeds, the possibility of ultrasound application while small amounts of n-hexane as a solvent were used (solvent to solid sample ratio 2:1) was estimated. The results are presented in the chapter 5.1. The oil was extracted from the grape seeds variety Cabernet Sauvignon (harvested in 2012). Duration of ultrasound treatment varied from 15 to 135 minutes; while all other

extraction parameters of interest (temperature, solvent to seeds mass ratio, strength and frequency of ultrasound treatment) were kept constant. Oils' yields are determined using gravimetric technique while the obtained oil samples are characterized in terms of biologically active components' contents: using UV-VIS spectroscopy (the content of total phenolic compounds), liquid chromatography (HPLC - the content of α-tocopherol), gas chromatography (GC - fatty acids contents). For the determination of antioxidant capacity and oxidative stability, the modern analytical methods such as luminol - cheminulinuscence and differential scanning calorimetry combined with thermogravimetry (DSC-TG) were applied. The most appropriate time of the ultrasound treatment was determined taking into account the oil yields and the contents of biologically active components. In addition, the impact of oils' composition on their antioxidant capacities and on oxidative stabilities is estimated

Chapters 5.2 and 5.3 of this dissertation present the results related to the morphology of grape seeds, investigated by scanning electron microscopy (SEM). The seeds of five red grape varieties were considered: Pinot Noir, Prokupac, Gamay, Merlot i Cabernet Sauvignon (2013 harvest). Further, the oils were extracted from the mentioned seeds using two methods: cold pressing and by n-hexane as an organic solvent, with the application of ultrasound treatment that lasted for 90 minutes. The oils are characterised in terms of their physico-chemical characteristics. The yields were determined gravimetrically and compared to the total oil content, obtained using the Soxhlet extraction method. The achieved yields are discussed in relation to seeds morphologies. Standard volumetric methods were applied in order to determine the following physico-chemical quality parametres: mass loss (by drying), relative density, the point of smoking, saponification, iodine, acid and peroxide numbers. The fatty acids composition and α-tocopherol contents were determined by GC-MS and HPLC methods, respectively. The contents of total phenolic compounds and anisidine value are determined by UV-VIS spectrophotometery, while the oils' stability to oxidation is estimated by measuring the inductive period (using Rancimat test) and by determining the temperature of oxidation onset (OOT, using DSC technique).

In order to optimize the method of cold pressing, the influence of seeds' outer layers removal on the yield and oil quality was investigated, in the case of autochthonic variety of grape (Prokupac). The removal of seeds' outer layers was performed as a pre-

treatment before the cold pressing procedure. The results are presented in the chapter 5.4.

The possibility of using supercritical extraction with carbon(IV)-oxide for the extraction of oil from red grape varieties seeds was studied as well; the results are presented in the chapter 5.5. The supercritical extraction was performed on seed of Pinot Noir, Prokupac, Gamay, Merlot and Cabernet Sauvignon varieties (harvest 2013). Carbon(IV)-oxide of 25 MPa pressure was applied at 50 °C, with the flow 0,3 kg CO_2/h at the Autoclave Engineers SCE Screening System, SAD equipment. The extraction yields were determined. Kinetics of extraction was investigated; its mathematical modelling following the Sovova's model was done. The contents of fatty acids, total phenolic compounds and α-tocopherols were determined using previouslly mentioned analytical techniques, while the oxidative stability was estimated using DSC methods.

In this work, the influence of grape variety on the total oil content was considered, as well as the influence of grape variety and methods of extraction on extraction yields, physico-chemical characteristics, the content of biologically active components and on the oxidative stability. The influence of biologically active components on antioxidative capacity and oil resistance to oxidation has been proven.

Key words: grape seed oil, cold pressing, n-hexane extraction by ultrasound treatment, phenol compounds, supercritical extraction, fatty acid content, antioxidative capacity, oxidative stability.

Scientific field: Biotechnical sciences

Narrower scientific field : Food technology

UDK: 66.061.34:634.863:631.53.027(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED LITERATURE 5
2.1. Lipidi (definicija i klasifikacija) 5
2.2. Hemijski sastav biljnih ulja – glavni i minorni sastojci biljnih ulja 7
2.2.1. Masne kiseline 7
2.2.1.1. Zasićene masne kiseline 8
2.2.1.2. Nezasićene masne kiseline 9
2.2.3. Minorne komponente biljnih ulja 13
2.2.3.2. Tokoli (tokoferoli i tokotrienoli) 16
2.2.3.3. Steroli 17
2.2.3.4. Pigmenti - lipohromi 19
2.3. Uloga lipida i esencijalnih masnih kiselina u ishrani 21
2.4. Lipidi u grožđu 24
2.5. Semenka grožđa (morfologija, anatomija i sastav) 27
2.6. Ulje iz semenki grožđa 31
2.7. Sastav i fizičko-hemijske karakteristike ulja iz semenki grožđa 31
2.7.1. Sastav masnih kiselina 32
2.7.2. Fenolna jedinjenja 34
2.7.3. Steroli 38
2.7.4. Tokoferoli i tokotrienoli 40
2.8. Oksidativna stabilnost ulja i uloga prirodnih antioksidanata 43
2.9. Metode izdvajanja (ekstrakcije) ulja iz semenki grožđa 51
2.9.1. Ekstrakcija ulja primenom organskih rastvarača 52
2.9.1.1. Primena ultrazvuka u ekstrakciji 55
2.9.2. Izdvajanje ulja mehaničkim putem 57
2.9.2.1. Hidraulične prese 61
2.9.2.2. Pužne prese 62
2.9.2.3. Proizvodnja hladno ceđenog ulja iz semenki grožđa 64
2.9.3. Natkritična ekstrakcija 64

2.9.3.1. Osnovni principi procesa natkritične ekstrakcije 67
2.9.3.2. Prednost i nedostaci natkritične nad klasičnim metodama ekstrakcije ... 69
2.9.3.3. Ugljenik(IV)-oksid (CO_2) kao rastvarač u natkritičnoj ekstrakciji 70
2.10. Analitičke metode u analizi biljnih ulja 73
2.10.1. Ultraljubičasta - vidljiva spektroskopija (UV-Vis) 75
2.10.2. Gasna hromatografija (GC) 78
2.10.3. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) 80
2.10.4. Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC) 84
2.10.5. Oksidacija ulja i metode za praćenje njegovog kvaliteta 88
3. CILJ RADA 90
4. MATERIJALI I METODE 92
4.1. Postavka eksperimenta 92
4.2. Materijali 93
4.3. Hemikalije i aparati 95
4.4. Izdvajanje ulja iz semenki grožđa 96
4.4.1. Izdvajanje ulja postupkom hladnog ceđenja 96
4.4.2. Izdvajanje ulja natkritičnom ekstrakcijom 97
4.4.3. Izdvajanje ulja ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom 98
4.5. Metode 99
4.5.1. Morfologija i anatomija semenki 99
4.5.2. Određivanje sadržaja vlage u semenkama 100
4.5.3. Određivanje ukupnog sadržaja ulja u semenkama metodom po Soxhletu .. 100
4.5.4. Određivanje prinosa ulja 101
4.5.5. Odredjivanje gubitka mase sušenjem (sadržaj vlage i isparljivih nečistoća u ulju) 101
4.5.6. Odredjivanje tačke dimljenja 101
4.5.7. Određivanje relativne gustine 102
4.5.8. Određivanje saponifikacionog broja 102
4.5.9. Određivanje jodnog broja (Jbr) 103
4.5.10. Određivanje kiselinskog broja (Kbr) 104
4.5.11. Određivanje peroksidnog broja (Pbr) 104
4.5.12. Određivanje anisidinskog broja (Abr) 105

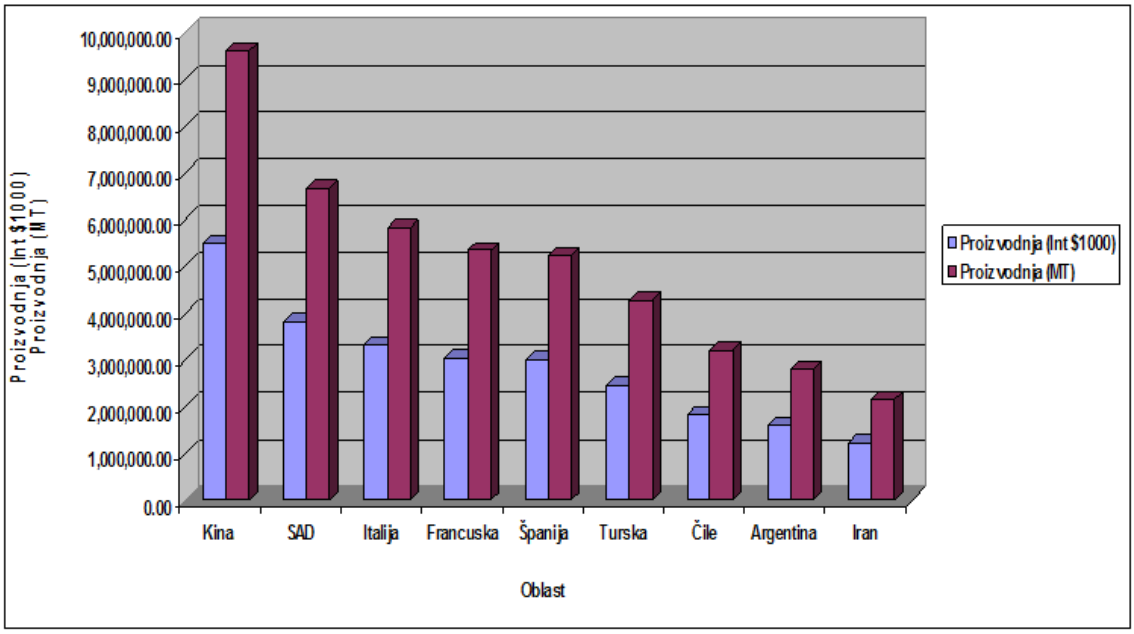
4.5.13. Određivanje oksidativne vrednosti (OV) 106
4.5.14. Određivanje sastava masnih kiselina primenom gasne hromatografije (GC) 106
4.5.15. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja..... 106
4.5.16. Određivanje sadržaja α - tokoferola HPLC - metodom 107
4.5.17. Određivanje antioksidativnog kapaciteta primenom luminol - hemiluminiscencije 107
4.5.18. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom..... 108
4.5.19. Određivanje oksidativne stabilnosti primenom DSC – metode 109
4.5.20. Rancimat test..... 109
4.5.21. Statistička analiza..... 110
4.5.22. Matematički model Sovove za procese natkritične ekstrakcije 111
5. REZULTATI I DISKUSIJA..... 118
5.1. Uticaj variranja vremena trajanja tretmana ultrazvukom na ekstrakciju ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon n-heksanom 118
5.1.1. Sadržaj vlage i ukupan sadržaj ulja u semenkama 118
5.1.2. Ekstrakcioni prinos..... 118
5.1.3. Hemijska analiza dobijenih uzoraka ulja 120
5.1.3.1. Sastav masnih kiselina, jodni, kiselinski i peroksidni broj 120
5.1.3.2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola..... 122
5.1.4. Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti ulja DSC metodom i antioksidativne aktivnosti ulja metodom luminol - heminluminiscencije 123
5.2. Ispitivanje morfologije i anatomije semenki crvenih sorti grožđa skenirajućom elektronskom mikroskopijom 131
5.3. Izdvajanje ulja iz semenki crvenih sorti grožđa metodom hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom 134
5.3.1. Sadržaj vlage i ukupni sadržaj ulja u semenkama..... 134
5.3.2. Prinos ulja..... 135
5.3.3. Fizičko-hemijske karakteristike ulja 137
5.3.4. Biološki aktivne komponente ulja..... 147
5.3.4.1. Sastav masnih kiselina 147
5.3.4.2. Sadržaj α-tokoferola..... 159
5.3.4.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja..... 161

5.3.5. Antioksidativni kapacitet ulja 162
5.3.6. Oksidativni status i oksidativna stabilnost ulja 165
5.3.6.1. Oksidativni status (Peroksidni broj - Pbr, anisidinski broj – Abr i oksidativna vrednost – OV) 166
5.3.6.2. Oksidativna stabilnost ulja 170
5.4. Ispitivanje uticaja uklanjana spoljneg omotača na povećanje prinosa i na kvalitet izdvojenog ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, postupkom hladnog ceđenja 176
5.4.1. Rezultati tretmana na mašini za poliranje zrna (ribalici) 176
5.4.2. Prinos ulja 178
5.4.3. Fizičko-hemijska analiza ulja 179
5.4.3.1. Fizičko-hemijski parametri kvaliteta ulja 180
5.4.3.2. Biološki aktivne komponente ulja 180
5.4.3.3. Oksidativni status, antioksidativni kapacitet i oksidativna stabilnost ulja 182
5.5. Natkritična ekstrakcija ulja iz semenki crvenih sorti 183
5.5.1. Ekstrakcioni prinos 183
5.5.2. Rezultati matematičkog modelovanja natkritične ekstrakcije (model Sovove) 187
5.5.3. Hemijska analiza uzoraka ulja iz semenki različitih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom 190
5.5.3.1. Sastav masnih kiselina 190
5.5.3.2. Sadržaj α-tokoferola i ukupnih fenolnih jedinjenja 196
5.5.3.3. Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti ulja primenom DSC metode 200
6. ZAKLJUČAK 204
7. LITERATURA 215

1. UVOD

Neke od prvih ilustracija o gajenju vinove loze, a koje se i danas mogu videti, nalaze se na zidovima grobnica faraona. Procenjeno je da su stare 6.000 - 7.000 godina (*Burić, 1981*). Kroz vekove, čovek je naučio da gaji vinovu lozu i da od njenih plodova stvara različite proizvode. Pored proizvodnje vina i sokova, u XX veku spoznate su i mogućnosti iskorišćenja semenke grožđa koja je otpadni materijal nakon primarne prerade grožđa; od nje se dobijaju veoma kvalitetni finalni proizvodi poput jestivih ulja i kozmetičkih proizvoda. Nakon primarne prerade grožđa u procesu proizvodnje vina zaostaje komina čija se prerada u razvijenim zemljama usmerava u pravcu proizvodnje ulja iz semenki grožđa kao i biološki aktivnih komponenti iz pokožice.

Ukupna proizvodnja grožđa u svetu je u 2012. godini bila 67 miliona tona (*FAO-STAT, 2014*). Zajedno sa Kinom, USA, Italijom i Francuskom, Španija, Turska i Čile postaju glavni proizvođači grožđa a proizvodnja se značajno razvija i u zemljama bliskog istoka među kojima se ističe Iran (*FAO-STAT, 2014*).



Slika 1.1. Proizvodnja grožđa u svetu u 2012. godine prikazana po proizvođačima, (*FAO-STAT 2014*)

Od ukupne proizvedene količine grožđa u svetu u toku procesa proizvodnje vina i sokova nastaje oko 5 - 10 miliona tona otpada koji sadrži pokožicu sa semenkom (*Matthäus, 2008*). Dok je nekada ovaj ostatak od proizvodnje vina i sokova predstavljao zaista samo otpad, danas je poznato nekoliko načina njegovog iskorišćavanja. Spektar

upotrebe ovih proizvoda je jako širok: od proizvodnje prirodnih đubriva, izdvajanja alkohola ili kiselina, preko izdvajanja polifenolnih jedinjenja do proizvodnje ulja.

Semenka grožđa je lako dostupna sirovina, s obzirom da je jedan od glavnih nusprodukata u proizvodnji vina. Od suvog ostatka koji zaostaje nakon ceđenja grožđa (oko 25% od ukupne količine grožđa), čak trećinu čine semenke grožđa (*Passos et al., 2009*). Upravljanje velikim količinama organskog otpada koji nastaje u prehrambenoj industriji predstavlja ozbiljan ekološki problem. Neprestano se traga za novim procesima za kontrolisano odlaganje otpada i njegovo prevođenje u druge biološki aktivne i iskoristljive proizvode. Ovi procesi bi rešili probleme zagađenja životne sredine i sa druge strane stvorili dodatne izvore prihoda kompanijama. Iz ovoga se može zaključiti da je iskorišćenje otpada od grožđa uključujući i semenke izuzetno važno sa dva aspekta: ekološkog i ekonomskog.

Poslednjih nekoliko godina semenke grožđa su sve više u žiži interesovanja zato što sadrže značajnu količinu ulja i polifenolnih jedinjenja, koja su poznata po svojim antioksidativnim svojstvima i pozitivnom uticaju u sprečavanju kardiovaskularnih oboljenja. Sa druge strane ulje iz semenki grožđa se karakteriše izuzetnim fizičko-hemijskim i senzornim karakteristikama i veoma je bogato biološki aktivnim materijama (*Pardo et al., 2009*). Zato je očigledno da procesuiranje semenke grožđa može da dovede do veoma značajnih rezultata u proizvodnji jestivog ulja, koje bi se po svom korisnom zdravstvenom efektu moglo porediti sa maslinovim uljem. Na osnovu navedenog, danas se bez dileme može smatrati da semenke grožđa zaista ne predstavljaju otpadni materijal već veoma kvalitetnu sirovinu za dobijanje jednog od najkvalitetnijih jestivih ulja. Sa druge strane, i samo ulje izdvojeno iz semenki grožđa, zbog visokog sadržaja biološki aktivnih materija, može predstavljati veoma kvalitetnu sirovinu za proizvodnju farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda visokog kvaliteta.

Semenke grožđa predstavljaju približno 30% od celokupne težine otpada nakon prerade grožđa (*Passos et al., 2009*). Svaka bobica sadrži 3-4 semenke, za koje je karakterističan veoma veliki udeo čvrstog omotača - ljuske, čak 75%, dok udeo jezgra iznosi 25%. Sadržaj ulja u semenci grožđa je 12 - 18% (*Dimić., 2005*) i zavisi od sorte grožđa, klimatskih uslova i uslova gajenja vinove loze. Tvrdi omotač semenke – ljuska, sa jedne strane predstavlja prednost jer u velikoj meri štiti semenku od uticaja različitih hemijskih sredstava kojima je tretirano grožđe u vegetativnom periodu, dok s druge

strane predstavlja problem prilikom odvajanja ulja primenom metode hladnog ceđenja. Naime, zbog velike čvrstine ljuske, masa se lako ″zaguši″ u delovima prese. Takođe, zbog velikog udela ljuske, ulje može da se u njoj apsorbuje.

Ulje se iz semenki uljarica, pa i iz semenki grožđa može izdvojiti na nekoliko načina. Uobičajen proces sastoji se iz nekoliko faza: čišćenje biomase, sušenje, lomljenje - mlevenje i ceđenje. Tokom ovog procesa veliki deo ulja se izdvoji iz semena, ali značajna količina ipak ostaje u finalnoj pogači i odatle se može ekstrahovati različitim metodama. Najčešće korišćena je konvencionalna metoda ekstrakcije organskim rastvaračima, uobičajeno n-heksanom.

Pored ove metode, poslednjih godina je veoma popularna metoda ekstrakcije fluidima pod natkritičnim uslovima. Upotreba fluida u natkritičnim uslovima pobudila je veliko interesovanje zbog njihovih karakteristika (moć rastvaranja kao kod tečnih rastvarača, neznatan površinski napon, moć transporta čestica kao kod gasova), kao i zbog zahteva na koje obavezuje pravna regulativa a koja podstiče upotrebu takozvanih „zelenih“, odnosno, ekološki prihvatljivih rastvarača. U tu svrhu, ugljenik(IV)-oksid (CO_2) u natkritičnom stanju je veoma prihvatljiv s obzirom da je u osnovi netoksičan, nezapaljiv, jeftin, može se reciklirati, potpuno se uklanja iz ekstrakta pri atmosferskom pritisku i lako mu se postižu natkritični uslovi (*Gomez et al., 1996; Cao i Ito, 2003; Beveridge et al., 2005*).

Izdvajanje ulja je moguće i fizičkim putem, korišćenjem hidrauličkih ili pužnih presa *(Rostagno et al, 2003)*. Takođe, dokazano je da primena ultrazvuka može povećati efikasnost ekstrakcije, dejstvom akustičnih kavitacija koje mogu razoriti ćelijski zid olakšavajući prodiranje rastvarača u biljni materijal i otpuštanje intracelularnog sadržaja (*Rostagno et al., 2003; Chemat et al., 2004.; Li et al., 2004*). Mehanički efekati prouzrukovani ultrazvukom mogu pospešiti iskorišćenje rastvarača u toku ekstrakcije tako što povećavaju kontaktnu površinu između rastvarača i željene komponente. Zbog ovih efekata, kao glavne prednosti primene ultrazvuka navode se smanjenje vremena ekstrakcije i smanjenje potrošnje rastvarača (*Wu et al., 2001*). Osim ovih prednosti, ekstrakcija ultrazvukom se može vršiti na nižim temperaturama u odnosu na konvencionalne metode, i na taj način se mogu izbeći termička oštećenja ekstrakta i gubici bioaktivnih komponenti.

Smatra se da je ulje iz semenki grožđa visokog kvaliteta, karakteriše ga prijatan miris sa blagim voćnim tonovima, visoka tačka ključanja (216°C), laka varljivost i blagi porast viskoziteta kada se koristi za prženje (*Kinsella, 1974*). Ono pripada grupi ulja koja sadrže visok procenat nezasićenih masnih kiselina (oko 90%) i mali procenat zasićenih masnih kiselina (oko 10%) (*Bail et al., 2008*). Najzastupljenija je polinezasićena linolna kiselina koja spada u red esencijalnih masnih kiselina koje oraganizam ne stvara već se moraju unositi preko hrane. Ulje iz semenki grožđa je takođe bogato i vitaminom E. Visok sadržaj vitamina E, čini da ovo ulje bude jako stabilno. Sadržaj neosapunjivih materija, od kojih su najzastupljeniji steroli i tokoferoli, je između 0,8 i 1,5% (*Luque-Rodriguez et al., 2005*).

Visok sadržaj linolne kiseline (važna je za sintezu prostaglandina koji ima uticaja na agregaciju trombocita i zapaljenske procese), visok sadržaj vitamina E (pomaže smanjenju rizika od ateroskleroze) kao i nizak sadržaj holesterola doprinose pozitivnom zdravstvenom efektu ovog ulja koji se odnosi na prevenciju u sprečavanju srčanih oboljenja i oboljenja krvotoka (*Massanet et al., 1986; Sineiro et al., 1995; Oomah et al, 1998*). Međutim, iako je semenka grožđa izuzetno bogata polifenolima uglavnom iz grupe proantocijanidina, prirodnim antioksidansima sa jakom antiradikalskom aktivnošću, količina ovih komponenti koja pređe u ulje je vrlo limitirana, zbog izrazito polarne prirode njihove hemijske strukture (*Joshi et al., 2001; Nakamura et al., 2003*).

Literaturni podaci o svojstvima ulja koje je iz semenke grožđa dobijeno korišćenjem različitih metoda izdvajanja su malobrojni. S obzirom na to i kako kod nas još uvek ne postoji razrađen tehnološki postupak za izdvajanje ulja iz semenki grožđa, a takođe nije izvršena fizičko-hemijska karakterizacija ulja izdvojenog iz semenki grožđa sa ovih prostora, u ovoj disertaciji akcenat će biti stavljen na razvoj i optimizaciju metoda - tehnika za izdvajanje ulja iz semenki grožđa kao i na njihov uticaj na kvalitet izdvojenog ulja. Poseban akcenat će biti stavljen na fizičko-hemijsku karakterizaciju izdvojenih ulja sa aspekta sastava masnih kiselina, otpornosti ulja na oksidaciju (oksidativne stabilnosti) i antioksidativnog kapaciteta kao i na ispitivanje mogućnosti i efikasnosti primene modernih analitičkih tehnika za evaluaciju navedenih osobina. Jedan deo istraživanja će biti posvećen uticaju sorte grožđa na sadržaj i kvalitet ulja sa posebnim akcentom na fizičko-hemijsku karakterizaciju ulja autohtone sorte grožđa Prokupac.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Lipidi (definicija i klasifikacija)

Lipidi su organska jedinjenja koja predstavljaju značajne metaboličke supstance u živoj ćeliji. Po svojoj hemijskoj prirodi lipidi predstavljaju veoma heterogenu grupu jedinjenja. Tačna definicija lipida ne postoji. Christi definiše lipide kao "široko rasprostranjenu grupu prirodnih produkata uključujući masne kiseline i njihove derivate, steroide, terpene, karotenoide i žučne kiseline, koji imaju zajedničko svojstvo da su rastvorljivi u organskim rastvaračima kao što su dietil etar, n-heksan, benzen, hloroform ili metanol (*Christie, 1982*). Kates kaže da su lipidi "one supstance koje su (a) nerastvorljive u vodi; (b) rastvorljive u organskim rastvaračima kao što su hloroform, etar ili benzen; (c) sadrže duge lance ugljovodoničnih grupa u njihovim molekulima; i (d) prisutni su u ili su deo živih organizama" (*Kates, 1986*). Gurr i James ukazuju da standardna definicija uključuje "hemijski heterogenu grupu supstanci, koje imaju zajedničko svojstvo da su nerastvorljive u vodi, ali su rastvorljive u nepolarnim rastvaračima kao što je hloroform, ugljovodonici ili alkoholi" (*Gurr i James, 1971*).

Uprskos uobičajenoj upotrebi, definicije zasnovane na rastvorljivosti imaju očigledne nedostatke. Naime, neka jedinjenja koja se smatraju lipidima, kao što su masne kiseline vrlo kratkih lanaca C1-C4 (isparljive masne kiseline kratkog lanca), su potpuno rastvorljive u vodi a nerastvorljive u organskim rastvaračima. Neki autori su strogo prihvatili definiciju zasnovanu na rastvorljivosti isključujući masne kiseline kratkih lanaca (C1-C3), zadržavajući C4 (buternu kiselinu) samo zato što je ona prisutna u mlečnoj masti. Pored toga, neka jedinjenja koja se smatraju lipidima, kao što su neke trans masne kiseline (one koje nisu nastale bakterijskom hidrogenacijom), ne nastaju direktno iz živih organizama. Razvoj sintetičkih nekaloričnih i niskokaloričnih lipida dodatno komplikuje problem, jer se ovi lipidi mogu uklopiti u definiciju o rastvorljivosti, ali ne potiču od živih organizama, mogu biti nekalorični i mogu da sadrže estre isparljivih masnih kiselina kratkog lanca (*O'Keefe, 2002*). Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je preciznu definiciju lipida jako teško dati, upravo zbog njihove kompleksnosti i heterogenosti.

Dakle, lipidi predstavljaju veoma heterogenu grupu jedinjenja raznovrsne hemijske strukture i biološkog porekla uključujući: masti, ulja, voskove, steroide i srodna jedinjenja koja su više povezana po njihovim fizičkim nego hemijskim osobinama.

Prilikom podele i klasifikacije lipida, mogu se uzimati različiti kriterijumi. To mogu biti: fizička svojstva na sobnoj temperaturi, polarnost, poreklo, hemijski sastav, uloga u organizmu, nivo složenosti, nutritivni zahtevi i uticaj na zdravlje (*Jašić i Begić, 2008*).

Na osnovu fizičkih svojstava na sobnoj temperaturi lipidi se mogu podeliti na ulja koja su na sobnoj temperaturi tečna i masti koje su na sobnoj temperaturi čvrste. Prema poreklu se dele na biljne i životinjske. Na osnovu polarnosti na polarne i neutralne lipide (jedinjenja bez električnog naboja). Neutralni lipidi uključuju masne kiseline, alkohole, acilgrlicerole i sterole, dok polarni lipidi uključuju glicerofosfolipide i gliceroglikolipide. Klasifikacija lipida na bazi polarnosti je proizvoljna, jer su neke masne kiseline kratkog lanca jako polarne. Na osnovu nutritivnih osobina i uticaja na zdravlje, odnosno, na osnovu uloge u organizmu dele se na esencijalne i neesencijalne masne kiseline (*O'Keefe, 2002*). Prema hemijskom sastavu (mogućnosti osapunjenja) dele se na osapunjive i neosapunjive. Osapunjivi lipidi u molekulu sadrže ostatak bar jedne masne kiseline, koja se pri alkalnoj hidrolizi oslobađa u vidu alkalne soli, odnosno sapuna. U ovu grupu spadaju: neutralne masti (triacilgliceroli), fosfoacilgliceroli, sfingolipidi i voskovi. Neosapunjivi lipidi se često zovu zajedničkim imenom i izoprenoidi, a obuhvataju: steroide (steroli, žučne kiseline i steroidni hormoni) i terpene. Prema ulozi koju obavljaju u organizmu postoje lipidi kao depoi energije, strukturni lipidi (fosfolipidi, voskovi, steroidi) i regulatorni lipidi (polni hormoni i hormoni korteksa nadbubrežnih žlezda).

Najčešća klasifikacija lipida je na osnovu složenosti njihove hemijske strukture. Po ovom kriterijumu, Bloor je predložio sledeću klasifikaciju (*Peter i Botham, 2003*)*:*

- **Jednostavni (prosti) lipidi -** Estri masnih kiselina sa različitim alkoholima:
  1. Ulja i masti – Estri masnih kiselina sa glicerolom (mono-, di- i triacilgliceroli);
  2. Voskovi – Estri masnih kiselina sa visokomolekularnim monohidroksilnim alkoholima.
- **Složeni lipidi -** Estri masnih kiselina koji pored alkohola i masne kiseline sadrže i druge grupe:

1. Fosfolipidi – lipidi koji pored masne kiseline i nekog alkohola sadrže i ostatak fosforne kiseline. Oni takođe sadrže i baze koje u strukturi imaju azot i druge suspstituente. Kod mnogih fosfolipida (na primer, kod glicerofosfolipida) alkohol je glicerol, dok je kod drugih (pimer su sfingofosfolidi) alkohol sfingozin;
2. Glikolipidi – jedinjenja masnih kiselina sa ugljenim hidratima, sadrže azot ali ne i fosfornu kiselinu (cerebrozidi);
3. Drugi složeni fosfolipidi, kao što su sulfolipidi i amino lipidi. Lipoproteini se takođe mogu svrstati u ovu kategoriju.

- **Izvedeni (derivirani) lipidi -** Supstance koje se iz pomenutih grupa dobijaju hidrolizom, predstavljaju gradivne jedinice za jednostavne i složene lipide. One obuhvataju masne kiseline (zasićene i nezasićene), glicerol, steroide i druge alkohole pored glicerola i sterola; masne aldehide, ketonska tela, masne ugljene hidrate, u mastima rastvorljive vitamine (A, D, E i K) i hormone.

2.2. Hemijski sastav biljnih ulja – glavni i minorni sastojci biljnih ulja

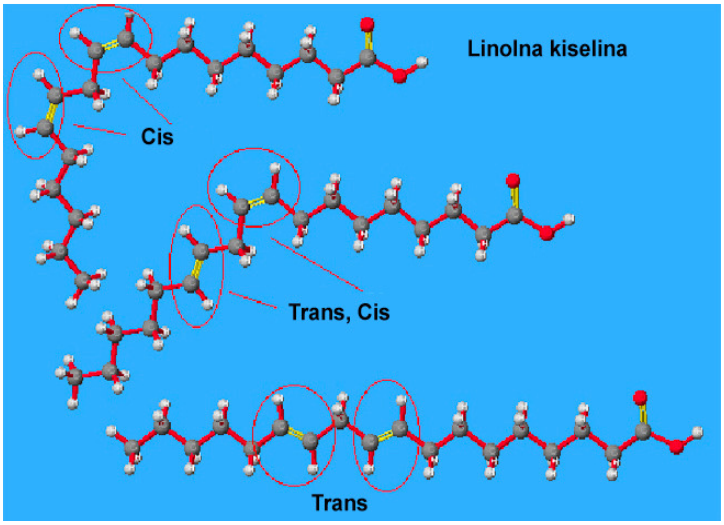
Biljna ulja zauzimaju posebno mesto u ishrani, pre svega zbog esencijalnih masnih kiselina i određenih sastojaka koji su nezamenjivi u zdravoj ishrani. Glavne komponente biljnih ulja su triacilgliceroli koji čine oko 98% sastava većine biljnih ulja. Pored njih u uljima se u malim količinama mogu naći i monoacilgliceroli, diacilgliceroli i slobodne masne kiseline, kao i ostali minorni sastojci koji pripadaju neosapunjivim materijama.

2.2.1. Masne kiseline

Masne kiseline su glavni gradivni elementi acilglicerola (masti i ulja) i drugih klasa lipida, kao što su: fosfolipidi, glikolipidi, voskovi i tako dalje. Sastavljene su od lanca ugljenikovih atoma (najčešće s parnim brojem), a molekul se završava karboksilnom grupom. Međusobno se razlikuju jedna od druge po broju ugljenikovih atoma u ugljovodoničnom lancu, stepenu nezasićenosti (broju dvostrukih C=C veza) i po položaju dvostrukih veza u različitim lancima. Masne kiseline se dele po nekoliko osnova:

1. Prema broju ugljenikovih atoma;
2. Na osnovu prisustva nezasićenih veza i
3. Prema prostornom rasporedu kiselinskih ostataka oko nezasićene veze.

1. Prema broju ugljenikovih atoma masne kiseline se dele na:
   - masne kiseline kratkog lanca – broj C atoma do 8;
   - masne kiseline srednjeg lanca – broj C atoma od 8 do 12 i
   - masne kiseline dugog lanca – broj C atoma iznad 12.
2. Na osnovu odsustva odnosno prisusutva dvostrukih veza (kojih može biti od 1 do 6), masne kiseline se dele na:
   - zasićene i
   - nezasićene (mononezasićene – jedna dvostruka veza i polinezasićene – od 2 do 6 dvostrukih veza).
3. Na osnovu geometrijske izomerije - prostorne orijentacije dela masnih kiselina oko dvostruke veze, masne kiseline se dele na: cis oblik i trans oblik (Slika 2.1).



Slika 2.1. Ilustracija cis i trans konfiguracije na primeru linolne masne kiseline

2.2.1.1. Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline koje se najčešće javljaju u prirodi su laurinska, palmitinska, stearinska i arahidinska. Ugljenikovi atomi u molekulu zasićenih masnih kiselina su povezani jednostrukim (prostim) vezama koje su stabilne i mastima daju jaku formu. Ove kiseline se prvenstveno javljaju u mastima životinjskog porekla. Smatra se da zasićene masne kiseline potstiču nastanak i razvoj nekih bolesti pa su iz tog raloga

nepoželjne za upotrebu. Laurinska, miristinska i palmitinska kiselina utiču na povećanje holesterola u plazmi, i to posebno „lošeg“ LDL (od *low density lipoprotein – lipoprotein niske gustine*) holesterola. Posebno veliki uticaj na koncentraciju holesterola ima miristinska kiselina. Masne kiseline sa kraćim lancem i stearinska ne utiču na nivo holesterola u plazmi (*Grande et al., 1970; Bonanome i Grundy, 1988; Hayes, 2000*). U tabeli 2.1 su date najvažnije zasićene masne kiseline.

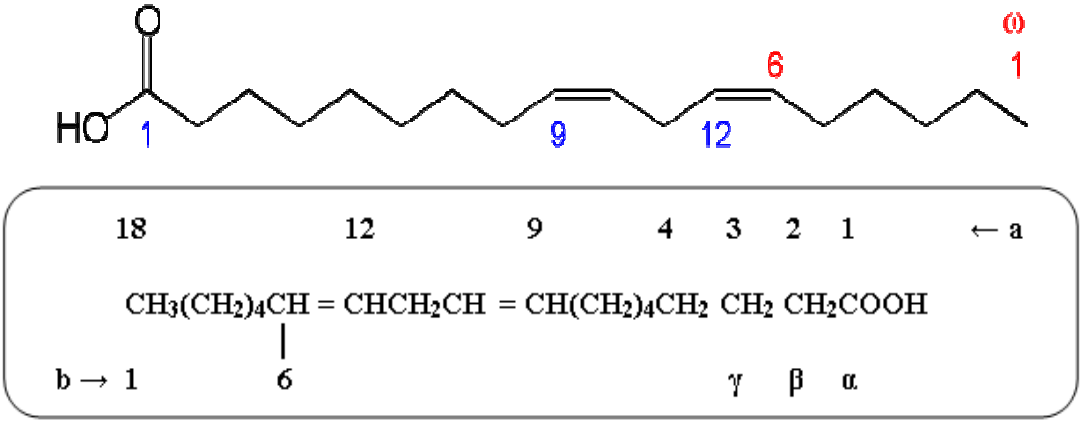
Tabela 2.1. Najvažnije zasićene masne kiseline

Zasićena masna kiselina	Broj C atoma	Formula
Buterna	4	$C_3H_5 – COOH$
Kapronska	6	$C_5H_{11} – COOH$
Kaprilna	8	$C_7H_{15} – COOH$
Kaprinska	10	$C_9H_{19} – COOH$
Laurinska	12	$C_{11}H_{23} – COOH$
Miristinska	14	$C_{13}H_{27} – COOH$
Palmitinska	16	$C_{15}H_{31} – COOH$
Stearinska	18	$C_{17}H_{35} – COOH$
Arahidinska	20	$C_{19}H_{39} – COOH$
Behenska	22	$C_{21}H_{43} – COOH$

2.2.1.2. Nezasićene masne kiseline

Nezasićene masne kiseline karakteriše prisusutvo jedne ili više nezasićenih dvostrukih veza. Prisutne dvostruke veze su uglavnom u *cis* formi. Dvostruke veze kod polinezasićenih masnih kiselina su razdvojene metilenskom, ($-CH_2$) grupom. U jednoj nezasićenoj masnoj kiselini dvostruka veza može se nalaziti na različitim položajima, pri čemu na taj način nastaju različite varijante te kiseline. Fizičke i hemijske osobine a samim tim i reaktivnost masnih kiselina, kao i triacilglicerola koji u svom sastavu imaju nezasićene masne kiseline, upravo zavisi od broja i položaja dvostrukih veza. Iz ovih razloga sasvim je razumljiva važnost pravilnog obeležavanja masnih kiselina. Ugljenikovi atomi u nezasićenim masnim kiselinama se obeležavaju brojevima ili grčkim slovima, i u literaturi se najčešće primenjuje:

- obeležavanje po IUPACU–u (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), gde se položaj dvostruke veze računa sa strane –COOH (*kabroksilne*) grupe ili
- biohemijsko obeležavanje – ECC (*End of Carbon Chain*), gde se položaj dvostruke veze računa sa strane $–CH_3$ (*metil*) grupe.



Slika 2.2. Šematski prikaz obeležavanja nezasićenih masnih kiselina na primeru linolne kiseline (*Dimić, 2005*)

Po IUPAC-u (a) linolna kiselina se obeležava kao: **$C_{18:2}$ *cis* 9, 12 ili $C_{18:2}$ $\Delta^{9,12}$ ili $C_{18:2}$ n 9, 12;** dok je po biohemijskom obeležavanju (b) ista kiselina predstavljena kao: **$C_{18:2}$ ω - 6 ili $C_{18:2}$ n - 6, ω** (omega) ili **n** označava C atom gde se nalazi prva dvostruka veza, pri čemu se broji od metil grupe.

Kao što je prethodno pomenuto nezasićene masne kiseline se mogu javiti u dva geometrijska oblika: *cis* ili *trans* obliku. *Cis* oblici se javljaju u prirodnim izvorima dok se *trans* oblici koji su termodinamički znatno stabilniji, formiraju tokom tehnološkog procesa usled hemijskih modifikacija, čime se objašnjava mogućnost stvaranja *trans* izomera i tokom termičkog tretmana pri rafinaciji ulja u fazi deodorizacije (uklanjanja nepoželjnih ukusa i mirisa). Kod jestivih nerafinisanih biljnih ulja kod kojih se ulja ne izlažu povišenim temperaturama, *trans* masne kiseline ne bi trebalo da se javljaju ni u tragovima. Najnovija istraživanja su pokazala da *trans* masne kiseline značajno utiču na nivo pojedinih frakcija lipoproteina u krvi, što ima za posledicu ubrzani razvoj ateroskleroze, koronarnih bolesti, alergija, kancera i dijabetesa (*Vollhard i Schore, 2003; Wandall, 2008*). Generalno, kod masnih kiselina u biljnim uljima prva dvostruka veza se nalazi između 9. i 10., druga između 12. i 13. i treća između 15. i 16. ugljenikovog atoma, mada postoje i izuzeci, koji se javljaju kod masnih kiselina sa neparnim brojem ugljenikovih atoma, razgranatim ili cikličnim lancima, sa dvostrukom vezom u trans konformaciji i konjugovanim nezasićenjem (*Raven i Johnson, 1999; Mc. Murray, 2000; Gunstone, 2004*).

Nezasićene masne kiseline, posebno polinezasićene, su od izuzetnog značaja za zdravlje ljudi. Esencijalne masne kiseline pripadaju grupi polinezasićenih masnih

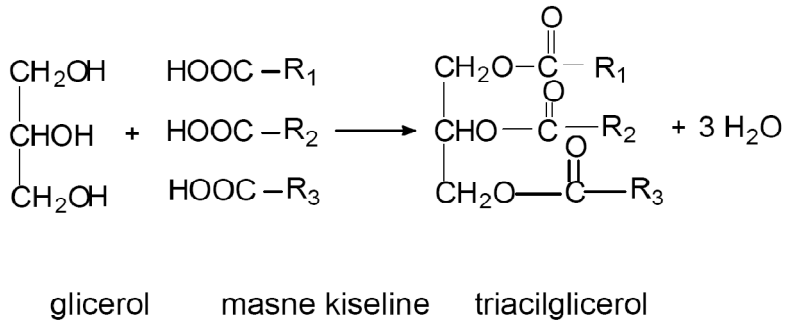
kiselina sa 18, 20 i 22 ugljenikova atoma i sadrže od 2 do 6 dvostrukih veza koje su obavezno u *cis* konfiguraciji (*Matijašević i Turkulov, 1971; Lepšanović i Lepšanović, 2000*). Esencijalne masne kiseline i njihovi derivati, kao što su triacilgliceroli, imaju nekoliko veoma bitnih funkcija u organizmu: služe kao izvor energije; gradivni su elementi fosfolipida, strukturnih elemenata ćelijskih membrana; sastojci su lipoproteina krvne plazme; prekursori su važnih jedinjenja sa hormonskim dejstvom, kao što su prostaglandini, leukotrieni, tromboksani. Najvažnije nezasićene masne kiseline date su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Najvažnije nezasićene masne kiseline

Mononezasićene masne kiseline	**Broj C atoma**	**Formula**
Miristoleinska	14:1	$CH_3(CH_2)_3$**CH=CH**$(CH_2)_7COOH$
Palmitoleinska	16:1	$CH_3(CH_2)_5$**CH=CH**$(CH_2)_7COOH$
Oleinska	18:1	$CH_3(CH_2)_7$**CH=CH**$(CH_2)_7COOH$
Polinezasićene masne kiseline		
Linolna	18:2 n-6	$CH_3(CH_2)_4$**CH=CH**CH_2**CH=CH**$(CH_2)_7COOH$
α-linolenska	18:3 n-3	CH_3CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**$(CH_2)_7COOH$
γ-linolenska	18:3 n-6	$CH_3(CH_2)_4$**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**$(CH_2)_4COOH$
Stearidonska	18:4 n-3	CH_3CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**$(CH_2)_4COOH$
Arahidonska	20:4 n-6	$CH_3(CH_2)_4$**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**CH_2**CH=CH**$(CH_2)_3COOH$
Eikosapentaenska (EPA)	20:5 n-3	$C_{20}H_{30}O_2$
Dokosaheksaenska (DHA)	22:6 n-3	$C_{22}H_{32}O_2$

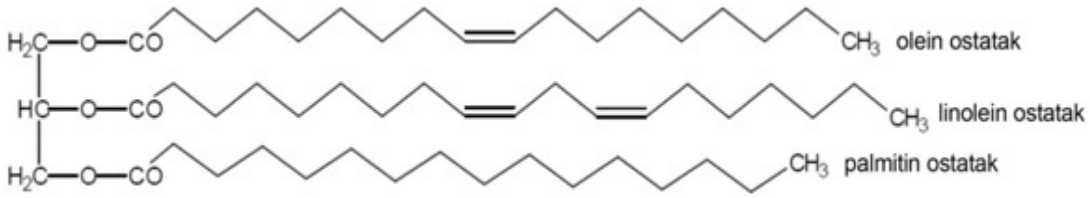
2.2.2. Triacigliceroli (trigliceridi)

Triacilgliceroli su glavni konstituenti biljnih ulja. To su nepolarne u vodi nerastvorljive supstance, koje se sastoje od tri ugljovodonična lanaca, ostataka tri masne kiseline, koja su esterifikovana na molekul glicerola (slika 2.3), te otuda i potiče njihova hidrofobnost (*Gunstone i Norris, 1983; Hoffman, 1989; Gunstone, 2004*).



Slika 2.3. Struktura triacilglicerola, gde R_1, R_2 i R_3 predstavljaju moguće različite lance ugljovodonika

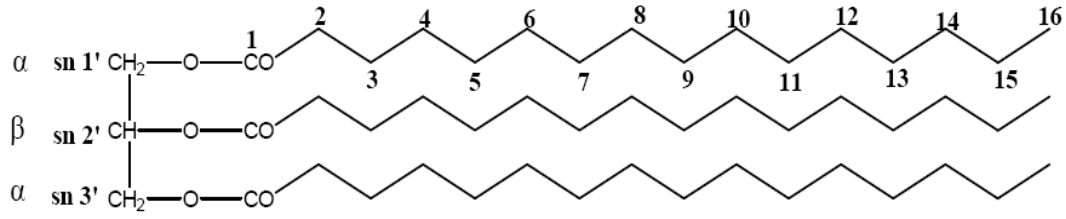
U slučaju trioleina, sva tri lanca (ostatka masnih kiselina) potiču od oleinske kiseline te su otuda identični. Međutim u biljnim uljima, koja predstavljaju mešavinu različitih triacilglicerola, javljaju se i triacilgliceroli kod kojih su sva tri ugljovodonična lanca unutar triacilglicerola različita jer potiču od različitih masnih kiselina (Slika 2.4) (*Hoffman, 1989; Gunstone, 2004*).



Slika 2.4. Hipotetički raspored ugljovodoničnih lanaca (ostataka različitih masnih kiselina) u molekulu triacilglicerola

Postoje dva načina označavanja položaja lanaca masnih kiselina u molekulu triacilglicerola. Kod prvog načina lanci koji su vezani na spoljne C atome molekula glicerola se označavaju sa α, a lanac koji je vezan na unutrašnji C atom sa β. Drugi način se bazira na strogo numerisanoj identifikaciji (sn), gde je svaki lanac označen kao sn 1', sn 2' ili sn 3', što odgovara ugljenikovom atomu na koji je lanac vezan - gornji (C1), srednji (C2) i donji (C3). Ovo obeležavanje je poznato kao stereospecifično

obeležavanje (*O'Keefe, 2002*). Na slici 2.5 je data ilustracija navedenih načina obeležavanja.



Slika 2.5. Prikaz obeležavanja za tripalmitin

Stepen zasićenja i dužina ugljovodoničnog lanca su veoma značajni i određuju fizičke osobine triacilglicerola: oni koji sadrže samo zasićene masne kiseline dugog lanca, nalaze se u čvrstom stanju, dok se oni koji sadrže nezasićene ili masne kiseline kratkog lanca javljaju u tečnom stanju (*Hoffman, 1989; Gunstone, 2004*). Triacilgliceroli čvrstog ili polučvstog agregatnog stanja na sobnoj temperaturi se nazivaju mastima a triacilgliceroli koji su na istoj temperaturi tečni - uljima.

Kvalitet i primena raznih ulja i masti u velikoj meri zavisi od njihovih fizičkih svojstava koje, uglavnom, određuju vrsta i položaj masnih kiselina u molekulu triaciglicerola.

Triacigliceroli stvaraju u organizmu energetske depoe iz kojih se, zavisno od potrebe organizma, oslobađaju masne kiseline, a iz njih se procesom oksidacije stvara energija neophodna za život svih ćelija i organizma uopšte.

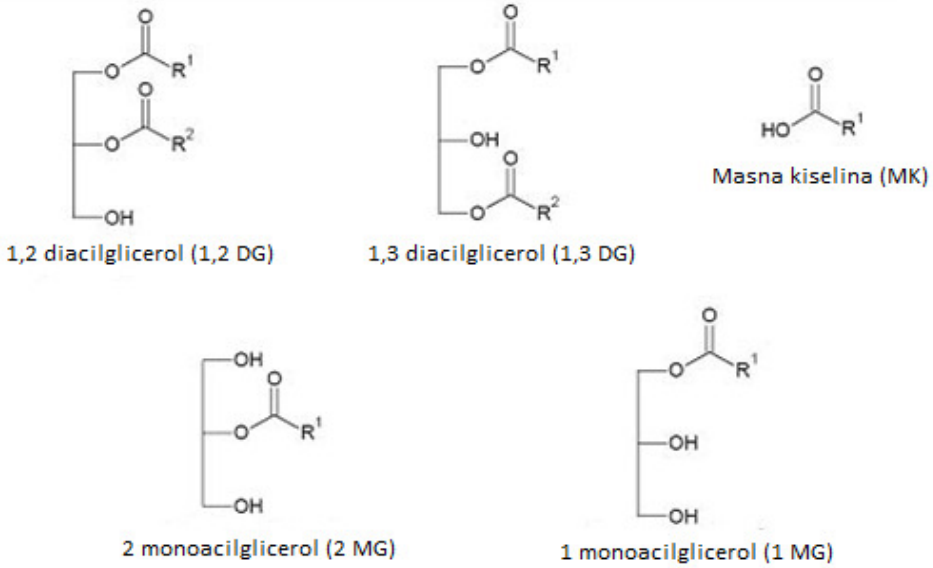
2.2.3. Minorne komponente biljnih ulja

Prisustvo ovih komponenti u biljnim uljima je od velikog značaja, jer su mnoge od njih odgovorne za formiranje senzornih karakteristika različitih tipova ulja kao i njihovih antioksidativnih svojstava (*Hoffman, 1989; Gunstone, 2004*). Takve komponente su, na primer, monoacilgliceroli i diacilgliceroli. Ova jedinjenja nastaju hidrolizom triacilglicerola pa njihov sadržaj u sirovim uljima i mastima zavisi od stepena nastalih hidrolitičkih promena. Ukoliko se u biljnim uljima nađu u značajnim količinama, to ukazuje na falsifikovanje ili na starenje ulja. Do hidrolitičkih promena prirodnim putem, može doći na dva načina: ili dejstvom enzima u biljkama ili voću, ili tokom starenja usled prisustva vode i dugog izlaganja uticaju kiseonika iz vazduha. Formiranje mono i diacilglicerola takođe dovodi do pojave slobodnih masnih kiselina,

koje se takođe mogu naći u biljnim uljima. Na slici 2.6 je prikazana struktura nekih mono i diacilglicerola i slobodnih masnih kiselina.

Ostale minorne komponente biljnih ulja koje su posebno odgovorne za senzorne karakteristike i antioksidativna svojstva biljnih ulja su (*Hoffman, 1989; Gunstone, 2004*):

- Fosfolipidi
- Steroli, uključujući slobodne sterole i estre sterola
- Tokoli, uključujući tokoferole, tokosterole i tokotrienole
- Pigmenti, uključujući hlorofile i karotenoide
- Alkoholi
- Ugljovodonici, koji uključuju alkane, alkene (uključujući skvalene i karotene) i policiklične aromatične ugljovodinike

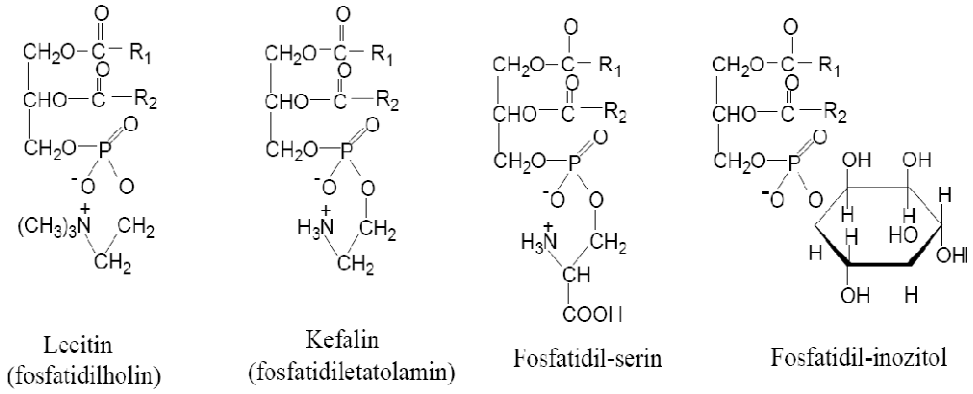


Slika 2.6. Struktura mono i diacilglicerola i masnih kiselina

2.2.3.1. Fosfolipidi (fosfoacilgliceroli)

Fosfolipidi ili fosfatidi su jedinjenja nastala esterifikacijom polihidroksilnog alkohola (najčešće glicerola) masnim kiselinama i fosfornom kiselinom. Pripadaju složenim lipidima i značajna su komponenta svih ćelijskih membrana (*Voet i Voet, 2005*). Fosfolipidi koji se mogu naći u biljnim uljima su brojni. Fofolipidi se generalno mogu smatrati asimetričnim diestrima fosforne kiseline koji sadrže tri vrste hemijsle veze: C-C veze, estarske veze i fosfoestarske veze (*O'Keefe, 2002*). Osnovu

fosfolipidnih komponenti čini fosfatidna kiselina koja se sastoji iz glicerola na kojem se u položaju C1 i C2 nalaze masne kiseline esterifikovane karboksilnom (-COOH) grupom a u položaju C3 je esterifikovan molekul fosforne kiseline. Fosfolipidi ili fosfatidi su dakle, estri fosfatidne kiseline sa aminoalkoholima (fosfatidilaminoalkoholi) ili sa poliakoholima (fosfatidilpolialkoholi). Glavni predstavnici fosfolipida u biljnim uljima su fosfatidilholin (Lecitin), fosfatidiletanolamin (Kefalin) i fosfatidilinozitol (Inozitol), i u manjim razmerama ih prate drugi fosfolipidi (*Gunston, 2005*).



Slika 2.7. Glavni predstavnici fosfolipida u biljnim uljima
(Lecitin, Kefalin, Serin i Inozitol)

Pri preradi semena uljarica ceđenjem ili ekstrakcijom, pod uticajem toplote, vlage ili rastvarača, fosfolipidi prelaze u ulje. Njihov sadržaj u sirovom ulju zavisi od količine fosfolipida u semenci, stepena zrelosti i uslova čuvanja semenke, kao i od načina izdvajanja ulja (*Dimić, 2005*).

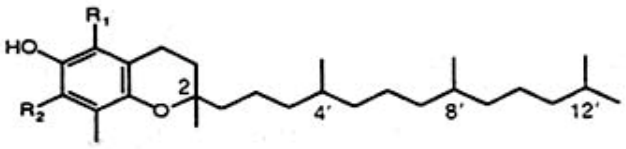
S obzirom na to da sadrže lipofilni i hidrofilni deo, fosfolipidi su amfifilnog (istovremeno hidrofilnog i lipofilnog) karaktera, te pripadaju površinski aktivnim supstancama i veoma su dobri emulgatori. Upravo zbog ovih svojstava fosfolipidi imaju niz veoma važnih funkcija u organizmu, posebno u transferu masnih kiselina i proteina u plazmu (*Lepšanović i Lepšanović, 2000*).

Fosfolipidi se, kao veoma značajan indikator kvaliteta, pojavljuju samo kod sirovih nerafinisanih ulja. Kod jestivih rafinisanih ulja praktično nemaju značaja, budući da se u potpunosti uklanjaju u fazi predrafinacije, odnosno, tokom rafinacije (*Matijašević i Turkulov, 1980; Gunston, 2005; Dimić, 2005*).

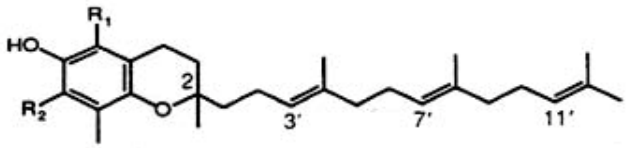
2.2.3.2. Tokoli (tokoferoli i tokotrienoli)

Ekstrakti tokola predstavljaju smešu do osam komponenti, četiri tokoferola i četiri analogna tokotrienola (*Gunston, 2005*).

Tokoferoli i tokotrienoli su široko rasprostranjeni u skoro svim biljnim uljima, manje u animalnim mastima. Osnovu svih oblika tokoferola i tokotrienola čini hipotetični molekul ″tokola″ hromanolne strukture sa bočnim lancem. Hromanolni prsten može biti supstituisan metil grupom u položaju 5, 7 i 8. Na slici 2.8 prikazane su strukturne formule tokoferola i tokotrienola.



R^1	R^2	
CH_3	CH_3	α- Tokoferol
CH_3	H	β- Tokoferol
H	CH_3	γ- Tokoferol
H	H	δ- Tokoferol



R^1	R^2	
CH_3	CH_3	α-Tokotrienol
CH_3	H	β-Tokotrienol
H	CH_3	γ- Tokotrienol
H	H	δ-Tokotrienol

Slika 2.8. Strukturne formule tokoferola i tokotrienola

Osnovna razlika između tokoferola i tokotrienola je u zasićenosti bočnog lanca. Poliizoprenski lanac sa 16 C atoma kod tokoferola je zasićen, a kod tokotrienola su u lancu prisutne tri nezasićene dvostruke veze. Izomerni oblici tokoferola i tokotrienola se međusobno razlikuju po broju i položaju metil grupa i označavaju se sa α (5, 7, 8 - trimetil) , β (5, 7 - dimetil), γ (7, 8 - dimetil) i δ (8 - metil). Tokoli imaju dva važna svojstva: pokazuju biološku aktivnost (vitamin E) i jaki su antioksidansi. Pojedini tokoli se međusobno bitno razlikuju po biološkoj aktivnosti i antioksidativnom dejstvu, pri čemu je biološka aktivnost u obrnutoj srazmeri sa antioksidativnim delovanjem. Najbolje vitaminsko dejstvo pokazuje α–tokoferol (koji je dobio naziv vitamin E), a redosled je sledeći: α (1) : β (0,5) : γ (0,1) : δ (0,03), pri čemu se ukupna aktivnost obično izražava u α–tokoferol ekvivalentima. Za antioksidativno dejstvo, ovaj redosled je obrnut i najsnažnije dejstvo imaju δ i γ - tokoferol (*Dimić, 2005; Gunston, 2005; Shahidi i Zhong, 2005*). α–tokoferol se u prirodi pojavljuje samo kao 2 R, 4′ R i 8′ R izomer (RRR – tokoferol, d-α-tokoferol) (*Matijašević i Turkulov, 1971; Matijašević i*

Turkulov, 1980; Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Udeo pojedinih izomera u ukupnim tokoferolima je karakterističan za svaku vrstu ulja, te se zbog toga koristi i za njihovu identifikaciju (*Dimić, 2005*).

Tokoferoli su posebno važni sastojci biljnih ulja. Pošto pripadaju grupi prirodnih antioksidanasa fenolnog tipa, utiču na usporavanje procesa oksidacije ulja i masti a u organizmu sprečavaju (blokiraju) štetno dejstvo slobodnih radikala (*Toppel, 1997; Frankel, 1999*). α-tokoferol inhibira oksidaciju slobodnih radikala, to jest reagujući sa peroksi radikalima inhibira lančanu reakciju i reagujući sa alkoksil radikalima inhibira razgradnju hidroperoksida i smanjuje formiranje aldehida (*Frankel, 1996*).

α–tokoferol može delovati kao antioksidant ili kao prooksidant u zavisnosti od testiranog sistema, koncentracije, oksidacionog vremena i metode koja se koristi za praćenje oksidacije (*Frankel, 1996*). Smeše prirodnih tokoferola se u prehrambenoj industriji koriste kao antioksidansi, obično u količini do 500 ppm, zajedno sa askorbil-palmitatom da bi se produžila antioksidativna aktivnost. U većim količinama (>1000 ppm), smatra se da će α–tokoferol delovati kao pro-oksidant. Ako biljna ulja sadrže tokole od 200 – 800 ppm, dalji dodatak pokazaće limitirani efekat (*Gunstone, 2000*). Sojino ulje sa sadržajem tokoferola od 1500 μg/g je pokazalo značajno povećanje oksidativne stabilnosti nakon uklanjanja dela prirodnih tokoferola aktivnim ugljem. Optimalna oksidativna aktivnost sojinog ulja je pronađena pri koncentraciji tokoferola između 400 μg/g i 600 μg/g (*Frankel, 1996*). Tokoli su veoma osetljivi na oksidaciju i znatno su stabilniji u esterifikovanoj formi gde sve važne hidroksilne grupe nisu slobodne. Međutim, takva jedinjenja ne pokazuju antioksidativnu aktivnost dok nisu hidrolizovana in vivo do slobodnih fenolnih oblika (*Gunstone, 2000*).

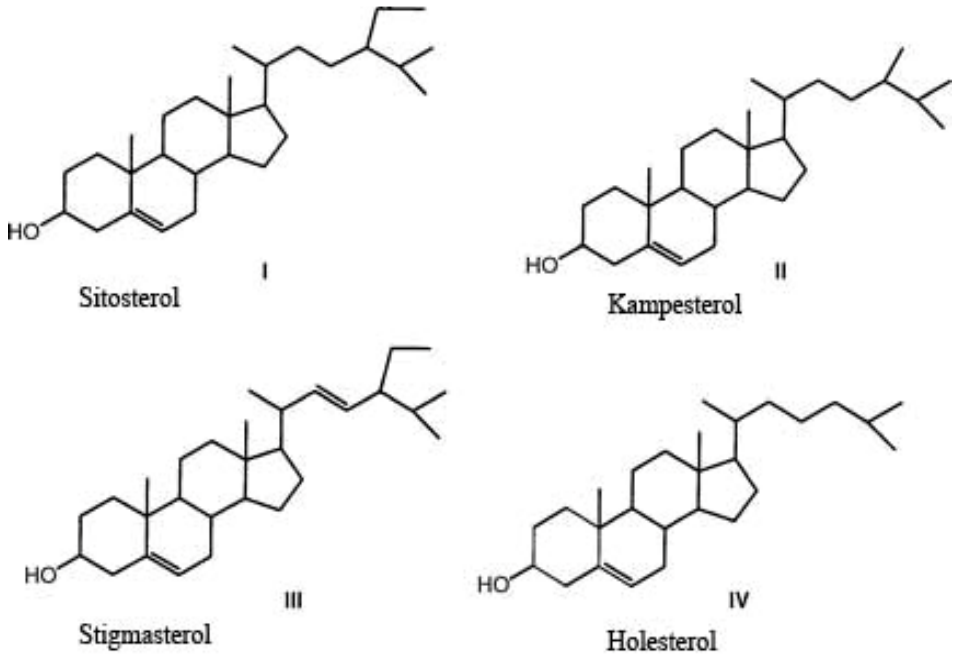
S obzirom na izuzetno važna vitaminska i antioksidativna svojstva tokoferola, poznavanje njihovog sadržaja u biljnim uljima je od izuzetne važnosti. Ovi podaci sa jedne strane omogućuju identifikaciju, a s druge strane procenu biološke vrednosti ulja.

2.2.3.3. Steroli

Steroli (visokomolekularni ciklični alkoholi) su grupa jedinjenja sa osnovnom strukturom ciklopentanofenantrena, koji se sastoji od 4 kondenzovana prstena sa 17 C atoma. Svi pojedinačni steroli sadrže -OH grupu vezanu za C3, a u položaju C17 nadovezuje se alifatični lanac sa 8 do 10 C atoma. Zavisno od porekla steroli se dele na:

fitosterole (prisutni u biljnim uljima) i zoosterole (prisutne u animalnim mastima) (*Dimić, 2005*).

Većina biljnih ulja sadrži 1000 – 5000 ppm (1 - 5 g/kg) sterola. Najviše ih ima u ulju uljane repice (5 - 11 g/kg) i u kukuruznom ulju (8 - 22 g/kg). Najzastupljeniji fitosteroli su: sitosterol (50 - 80% od ukupnih strerola), campesterol, stigmasterol i 5-avenasterol koji kod nekih ulja ima značajan udeo u ukupnim fitosterolima. Glavni predstavnik sterola animalnog porekla je holesterol i on u biljnim sistemima nije prisutan u značajnim količinama. Normalne vrednosti su 20 - 50 ppm u biljnim uljima u poređenju sa daleko većim vrednostima pronađenim u životinjskim mastima (do 1000 ppm), ribljem ulju (do 7000 ppm), mlečnim mastima (2000 – 3000 ppm) i žumancu (12500 ppm) (*Gunston, 2005*). Na slici 2.9 su prikazane strukturne formule najzastupljenijih sterola.



Slika 2.9. Strukturne formule najzastupljenijih sterola

Sadržaj i vrsta sterola su od posebne važnosti jer se na bazi sadržaja pojedinačnih sterola, specifičnih za neko ulje ili mast, može odrediti poreklo, odnosno, izvršiti identifikacija ulja ili masti (*Matijašević i Turkulov, 1980*).

Sa nutritivnog aspekta holesterolu se u poslednje vreme poklanja posebna pažnja. Naime, on je veoma važan učesnik metabolizma ljudi, međutim sa njim su tesno

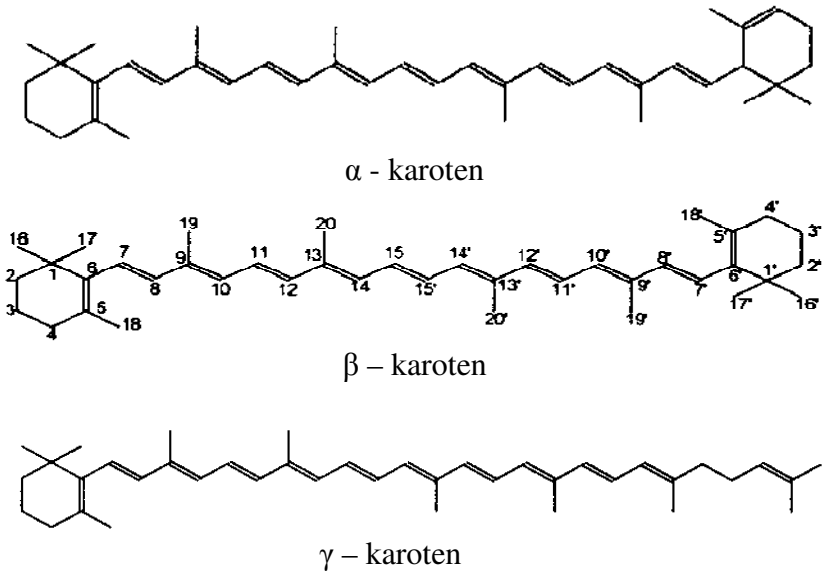
povezani i uzroci oboljenja krvnih sudova, najraširenije bolesti modernog doba. Prema najnovijim rezultatima nutricionističkih istraživanja pojedini biljni steroli imaju veoma povoljan uticaj u smislu snižavanja nivoa holesterola u plazmi. Fitosteroli najverovatnije deluju na taj način što sprečavaju apsorpciju holesterola (*Heinemann et al., 1993*).

Fitosteroli, koji su u biljnim uljima prisutni u različitim količinama, se delimično prevode u steradiene (stigmastadiene, kampestadiene, stigmastatriene i kampestatriene) tokom tretmana ovih ulja u procesu beljenja primenom aktivne zemlje ili tokom deodorizacije eliminacijom vode. Takođe, ova jedinjenja mogu nastati i kao rezultat neodgovarajućeg procesa termotretmana semenki tokom procesa sušenja, usled čega se mogu naći i u devičanskim i hladno ceđenim uljima (*Matthäus, 2008*).

2.2.3.4. Pigmenti - lipohromi

Lipohromi su supstance biljnog porekla koje su odgovorne za boju ulja. Boja ulja je uslovljena prisustvom malih količina u ulju rastvorljivih pigmenata kao što su: karotenoidi, hlorofili i gosipol – karakteristične bojene materije za crveno palmino, zelenkasto maslinovo, zelenkasto - žuto ulje semenki grožđa i žuto ćilibarno pamukovo ulje (*Dimić, 2005*).

Karotenoidi su polinezasićeni ugljovodonici sastavljeni od kovalentno povezanih izoprenskih jedinica. Na kraju svakog lanca nalazi se prsten ili otvoren lanac po tome se karotenoidi međusobno razlikuju. Karotenoidi mogu biti obojeni od svetlo žute do tamno crvene boje (*Food fats and oils (9 ed.), 2006*), a njihova boja je rezultat velikog broja dvostrukih konjugovanih veza u molekulu (*Gunston, 2005*). Razlikujemo dve strukturne grupe karotenoida: karotene (kao što su α-, β-, γ- karoten i likopen) i ksantofile (kao što su lutein, zeaksantin i kriptoksantin). Najvažniji karotenoidi su α-, β-, γ- karoten, čija je opšta molekulska formula $C_{40}H_{56}$ (*Dimić, 2005*). Na slici 2.10 su prikazane strukturne formule najvažnijih karotenoida. Karotenoidi su veoma osetljivi na oksidaciju, pri čemu dolazi do destrukcije njihove strukture što za posledicu ima gubitak karakteristične boje.



Slika 2.10. Strukturne formule najvažnijih karotenoida
(*Bockish, 1998; Rodriguez-Amaya, 2001*)

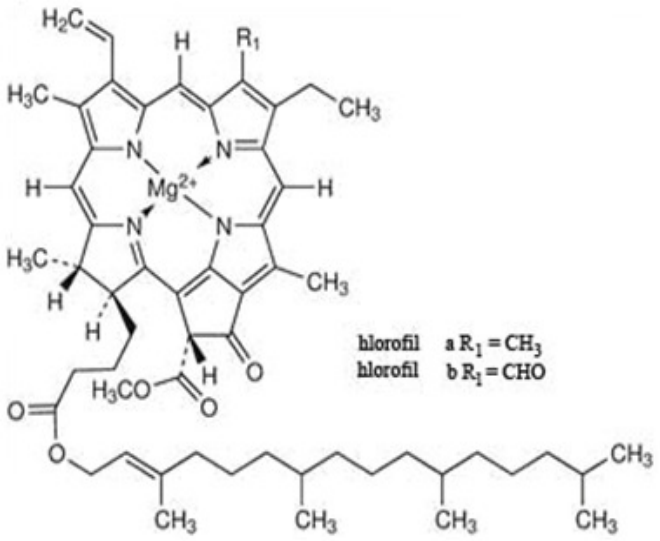
Karotena ima najviše u ulju palme (*Food fats and oils (9 ed.), 2006*), zatim u ulju semena tikve, kukuruznih klica, suncokreta (*Matijašević i Turkulov, 1980; Dimić, 2005*). Sirovo ulje palme sadrži 500 – 700 ppm karotena (*Gunston, 2005*). α– i β–karoten su posebno značajni jer imaju provitaminsko delovanje, u organizmu naime pod uticajem nekih enzima prelaze u vitamin A, te su zbog toga poželjni sastojci ulja (*Matijašević i Turkulov, 1980; Dimić, 2005; Jašić i Begić, 2008*).

Karotenoidi, a posebno β–karoten, ispoljavaju različite biološke funkcije u organizmu, kao što su: provitaminske, antioksidativne, utiču na poboljšanje imunološkog sistema, zaštitu od UV zračenja i slično. Brojna su istraživanja vezana za provitaminska i antioksidativna svojstva β–karotena; ustanovljeno je da smanjuje rizik od određenih vrsta kancera i efikasno deluje u prevenciji koronarno - srčanih oboljenja (*Kohlmeier i Hastings, 1995*).

U procesima oksidacije lipida, neki autori β–karotenu pripisuju antioksidativna a neki prooksidativna svojstva. Prema rezultatima Yanishlieve i saradnika, lipidima u kojima nisu prisustni drugi antioksidanasi, β–karoten ne pruža nikakvu zaštitu od oksidacije (*Yanishlieva et al., 2001*). Kod suncokretovog ulja koje sadrži tokoferole, β–karoten deluje sinergistički sa tokoferolima i povećava oksidativnu stabilnost pri sobnoj temperaturi i svetlu. Pro- ili antioksidativno dejstvo β–karotena veoma zavisi i od

njegove koncentracije. Prema Viljanenu i saradnicima, karotenoidi pokazuju antioksidativnu sposobnost i u procesima fotooksidacije (*Viljanen et al., 2002*).

Hlorofili su zeleni pigmenti prisutni u mnogim biljnim uljima, najviše ih ima u ulju uljane repice (*Food fats and oils (9 ed.), 2006*), a ima ih takođe u sojinom ulju, kao i u nerafinisanim uljima masline i koštice grožđa. Hlorofili su takođe prisutni i u biljnim uljima dobijenim iz nezrelog semena. Prisutvo hlofila daje uljima zelenkastu nijansu. Na slici 2.11 prikazana je strukturna formula hlorofila.



Slika 2.11. Strukturna formula hlorofila

2.3. Uloga lipida i esencijalnih masnih kiselina u ishrani

Lipidi u hrani imaju jedinstvena fizička i hemijska svojstva. Njihov sastav, kristalna struktura, temperatura topljenja, sposobnost asociranja (vezivanja) molekula vode i drugih nelipidnih molekula su od velikog značaja za funkcionalna svojstva većine namirnica. Svojstvo lipida je stvaranje micela i dvosloja u kontaktu sa vodom. Lipidi sa jednim bočnim lancem stvaraju micele dok lipidi s dva bočna lanca stvaraju dvosloje.

Lipidi se u svim živim ćelijama javljaju kao strukturna komponenta. Neki su linearni alifatični molekuli, dok drugi imaju prstenastu strukturu. Neki su aromatični, dok drugi nisu. Neki lipidi imaju delimično polarni karakter, dok su drugi nepolarni. Generalno, njihova izvorna struktura je nepolarna ili hidrofobna, što znači da ne postoji dobra intereakcija sa polarnim rastvaračima kao što je voda. Neke grupe lipida mogu imati deo strukture koji je polaran ili hidrofilan i pokazuje izraženu tendenciju združivanja sa polarnim rastvaračem kao što je voda. Ova pojava ih čini amfifilnim

molekulima (imaju i hidrofilna i hidrofobna svojstva). U slučaju holesterola hidrofilna komponenta je –OH grupa (hidroksil ili alkohol). U slučaju fosfolipida polarne grupe su veće i više polarizovane (*Jašić i Begić, 2008*).

Potreba čoveka za uljima i mastima (lipidima) datira od najranijih vremena. Ulja i masti su neophodni sastojci pravilne ishrane jer su glavni izvor energije, liposolubilnih vitamina, esencijalnih masnih kiselina i raznih minornih komponenti, a imaju i određene fiziološke funkcije. Osim toga, nezamenljive su kod izrade mnogih prehrambenih proizvoda kao i u pripremanju jela. Da bi pravilno odigrale svoju višestruku ulogu u pravilnom razvoju i radu organizma, ulja i masti moraju biti visokog kvaliteta i dobre održivosti. Količina masti koju treba uzimati u pravilnoj ishrani, pre svega zavisi od ukupne energetske potrebe organizma. Zato se pri utvrđivanju optimalne količine masnoće u pravilnoj ishrani u obzir moraju uzeti mnogobrojni faktori: uzrast, stil života, lokalni običaji i navike u ishrani, zanimanje. Smatra se da masti treba da daju manje od 30%, a po većini autora 25% od energetskih potreba organizma, pri čemu je od velikog značaja i odnos pojedinih vrsta masnih kiselina (*Dimić, 2005*).

Prema preporukam *FAO (2010*) ukupna količina unetih masti trebalo bi da je između 20 i 35% od ukupnih dnevnih energetskih potreba (kalorija), pri čemu udeo zasićenih masnih kiselina ne bi trebalo da pređe 10%, udeo mononezasićenih masnih kiselina bi trebalo da bude između 15 i 20%, a polinezasićenih od 6 do 11% od ukupne količine masti. Osim toga, prema najnovijim preporukama odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina bi trebalo da bude 0,6 (*Dimić, 2005*). U tabeli 2.3 su date preporuke za unos masti u ishrani.

Tabela 2.3. Preporuke za unos masti u ishrani (% od ukupnog energetskog unosa) (*Dimić, 2005*)

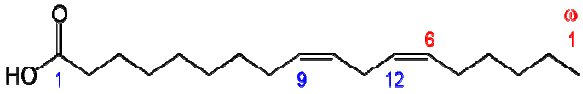
Zemlja	Ukupne Masti	Zasićene masne kiseline	Polinezasićene masne kiselina	Mononezasićene masne kiselina
Kanada	< 30	< 10	3 % - n-6 0,5 % - n-3	-
SAD	< 30	< 10	< 10	-
VelikaBritanija	< 30	< 10	7,5	-
Austarija	30	10	7 – 10	> 10
Novi Zeland	30	12	8	20
Japan	20 - 25	6 – 8	6 – 8	8 – 10
WHO/ FAO	15 – 30	-	3 - 7	-

WHO – *World health Organization* - Svetska zdravstvena organizacija
FAO – *Food and agriculture Organization* - Organizacija za hranu i poljoprivredu.

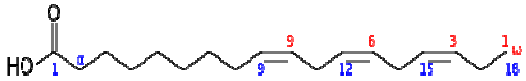
Osim njihove tradicionalne uloge nutrijenata, lipidi takođe obezbeđuju kritične biohemijske i fiziološke funkcije kao modulatori ćelijskih reakcija i gena. Uloga omega-3 masnih kiselina (posebno dokozaheksaenoinske kiseline - DHA) u razvoju nervnog sistema i retine beba je jasno utvrđena. Postoji više podataka koji indiciraju da lipidi poreklom iz hrane mogu ne samo značajno da utiču na nivo serum holesterola i triacilglicerola, već takođe i na sastav i sadržaj lipoproteina (*Watkins et al., 2005*).

Lipidi koji se u organizam unose hranom su sposobni da veoma značajno utiču na metabolizam lipoproteina i da smanje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Mnogobrojna istraživanja *in vivo* su potvrdila da *cis*-nezasićene masne kiseline kao što su oleinska, linolna i α-linolenska kiselina smanjuju koncentraciju LDL holesterola u plazmi, pri čemu pokazuju neznatan efekat na koncentraciju HDL (od *High density lipoprotein – lipoprotein velike gustine*). Prema tome, hrana koja sadrži ove masne kiseline može biti klasifikovana kao funkcionalna i može da doprinese smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti i arterijske tromboze *(Hornstra, 1999*).

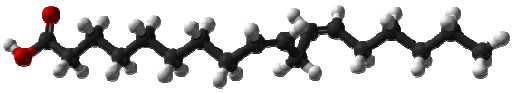
Esencijalne masne kiseline (EMK), koje su neophodne za rast i razvoj organizma, pripadaju grupi polinezasićenih masnih kiselina sa 18, 20 i 22 ugljenikova atoma i sadrže od dve do šest dvostrukih veza u cis konfiguraciji. EMK su značajni sastojci ćelijske membrane i ne mogu biti sintetizovane u ljudskom telu, pa se moraju uneti hranom. Od prirodnih biljnih ulja i animalnih masti organizam obezbeđuje sledeće esencijalne masne kiseline: linolnu (C-18:2, ω-6), α-linolensku (C-18:3, ω-3) i arahidonsku kiselinu (C-20:4, ω-6). Linolna kiselina je najzastupljenija u biljnim uljima, linolenska se takođe nalazi u nekim biljnim uljima, dok se arahidonska nalazi samo u animalnim mastima i to u veoma malim količinama (*Dimić, 2005*). Hemijske formule i trodimenzionalni prikaz molekula linolne i α-linolenske kiseline su dati na slici 2.12.



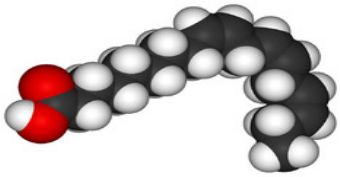
LA: cis, cis-9, 12-oktadekadienska kiselina (IUPAC)



ALA: *cis*, *cis*, *cis*-9, 12, 15-Oktadekatrienska kiselina (IUPAC)



Linolna kiselina C18:2, ω-6



α-Linolenska kiselina, C18:3, ω-3

Slika 2.12. Hemijske formule i trodimenzionalni prikaz linolne i α-linolenske masne kiseline

2.4. Lipidi u grožđu

Biljni lipidi su veoma važni konstituenti biljnih ćelija. Pretežno se mogu naći u membranama i igraju veoma važnu ulogu u kompoziciji i funkciji ćelijske membrane (*Ohlrogge i Browse, 1995*). Tokom sazrevanja voća oni trpe velike kvalitativne i kvantitativne promene. Glavni biljni lipidi su ulja, voskovi i fosfolipidi. Ulja se kao rezerve lipida u većini semenki u obliku hemijske energije troše za vreme klijanja semena. Fosfolipidi čine sastavni deo ćelijskih membrana i imaju veoma značajnu strukturnu ulogu, formiraju micele i lipidni zaštitni sloj. Voskovi su estri viših masnih kiselina i viših monohidroksilnih alkohola, koji pored estara sadrže i veliki udeo primesa (oksikarboksilnih kiselina, slobodnih alkohola, ugljovodonika, smolastih materija); osobine prirodnih voskova su određene upravo ovim primesama. Kod biljaka voskovi čine zaštitni sloj koji sprečava isušivanje biljaka.

O ulozi lipida u enologiji nije poznato mnogo osim da se pojedini lipidi javljaju kao prekursori arome i da lipidi ekstrahovani iz polomljenih semenki grožđa mogu uticati na aromu vina. Grožđe nije bogato lipidima kao što je bogato ugljenim hidratima ili proteinima ali su lipidi svakako sastavni deo bobice grožđa. Njihovo prisustvo je posebno značajno za formiranje primarne arome grožđa i kasnije vina. Lipidi su u grožđu prisutni u svim delovima bobice. Uljem su posebno bogate semenke, dok su voskovi locirani u pokožici i predstavljaju voštanu prevlaku koja štiti bobicu od isušivanja tokom jako sušnih, i od pojave plesni tokom vlažnih dana (*Radovanović, 1986*). Pojedini lipidi su locirani i u mesu bobice. Masne kiseline iz grožđa igraju

veoma važnu ulogu u procesu proizvodnje vina, značajan su faktor razmnožavanja i preživljavanja kvasaca tokom alkoholne fermentacije šire i predstavljaju izvore aromatičnih jedinjenja vina. Odgovorne su za formiranje velikog broja isparljivih jedinjenja kao što su alifatični aldehidi, ketoni, alkoholi i masne kiseline kratkih lanaca (*Millan i Vargas, 1992*). Brojne su studije koje ukazuju na ulogu i značaj masnih kiselina u razmnožavanju i preživljavanju kvasaca u anaerobnim uslovima tokom alkoholne fermentacije šire (*Andreasen i Stier, 1953, 1954; Watson, 1982; Youings i Rose, 1989; Mauricio, et al., 1990*), kao i na značaj i ulogu masnih kiselina kao prekursora arome vina (*Forss, 1969; Wildenradt, et al., 1975*).

S obzirom na ulogu i zanačaj lipida u grožđu, sprovedena su mnogobrojna istraživanja koja ukazuju na sadržaj pojedinih grupa lipida u različitim delovima grozda. *Gallender i Peng* (*1980*), pronašli su da koncentracija lipida kod 6 različitih sorti grožđa varira između 0,15 i 0,25%. Oni su dalje ukazali da je palmitinska kiselina najdominantnija među polarnim lipidima kod francuskih hibrida i vrste *Vitis Labrusca*. S aspekta polarnih lipida, bilo je značajanih razlika između vrste *Vitis Vinifera* i drugih vrsta. *Kamel i Dawson* (*1985*) ukazuju da je kod različitih sorti grožđa generalno najzastupljenija linolna kiselina. *Millan i Vargas* (*1992*) su ispitivali sadržaj masnih kiselina u širi (grožđanom soku) nezrelog i zrelog grožđa sorte Pedro Ximenez (*Vitis Vinifera*) i tom prilikom su kao glavne masne kiseline, i kod zrelog i kod nezrelog grožđa, identifikovali: linolnu, palmitinsku, linolensku, oleinsku i stearinsku. Pomenuti autori su utvrdili da tokom sazrevanja grožđa dolazi do porasta sadržaja ukupnih masnih kiselina i da kod zrelog grožđa u frakciji neutralnih lipida dominiraju linolna, palmitinska i oleinska masna kiselina dok u frakciji polarnih lipida dominiraju palmitinska, linolna i linolenska masna kiselina. Veoma detaljna istraživanja je obavio *Miele et al.* (*1993*); tom prilikom je pokazano da su lipidi koji su zastupljeni u sva tri dela bobice grožđa (pokožica, meso i semenka) prisutni u obliku glikolipida, fosfolipida i neutralnih lipida (acilgliceroli). Pri tome u pokožici ima najviše fosfolipida (60,6%), pa zatim neutralnih lipida (28,0%) i na kraju glikolipida (11,4%). Ovaj sastav odgovara i mesu bobice gde je takođe najviše zastupljeno fosfolipida (68,7%), slede neutralni lipidi (20,5%) i glikolipidi (10,8%). U semenkama je sastav dosta drugačiji: najzastupljeniji su neutralni lipidi (acilgliceroli) (95,6%), slede glikolipidi (3,0%) i fosfolipidi (1,4%). U sledećim tabelama je predstavljen sadržaj masnih kiselina u

semenkama (Tabela 2.4), mesu (Tabela 2.5) i pokožici (Tabela 2.6) bobica grožđa sorte Cabernet Sauvignon.

Tabela 2.4. Sastav masnih kiselina u semenci grožđa sorte Cabernet Sauvignon (*Miele et al., 1993*)

Trivijalni naziv	**%**
Kaprilna	< 0,1
Laurinska	< 0,1
Miristinska	0,1
Palmitinska	7,0
Palmitoleinska	0,1
Stearinska	4,2
Oleinska	9,9
Linolna	77,6
Linolenska	0,6
Arahidinska	0,2
Gadoleinska	0,2
Behenska	0,1
Nezasićene masne kiseline	***88,4***
Zasićene masne kiseline	***11,6***

Tabela 2.5. Sastav masnih kiselina u mesu bobice grožđa Cabernet Sauvignon (*Miele et al., 1993*)

Trivijalni naziv	**%**
Kaprilna	0,1
Undecilinska	0,1
Laurinska	0,2
Tridecilinska	0,1
Miristinska	0,6
Miristoleinska	< 0,1
Pentadecilinska	0,3
Palmitinska	25,3
Palmitoleinska	0,5
Stearinska	3,4
Oleinska	7,7
Linolna	35,7
Linolenska	17,3
Arahidinska	1,8
Gadoleinska	0,3
Behenska	2,6
Lignocerinska	3,0
Nezasićene masne kiseline	***61,6***
Zasićene masne kiseline	***38,4***

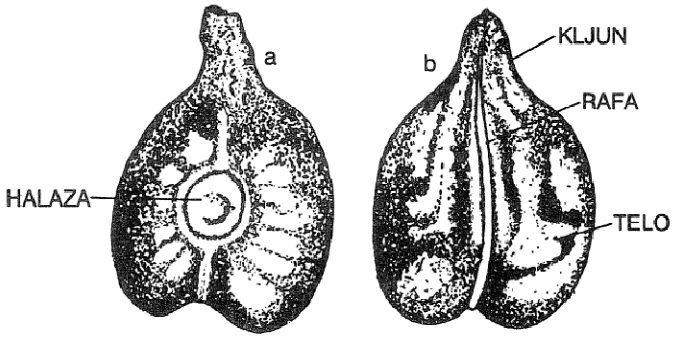
Tabela 2.6. Sastav masnih kiselina u pokožici bobice grožđa Cabernet Sauvignon (*Miele et al., 1993*)

Trivijalni naziv	**%**
Kaprilna	0,1
Undecilinska	0,1
Laurinska	0,4
Tridecilinska	0,4
Miristinska	0,7
Miristoleinska	0,1
Pentadecilinska	0,6
Palmitinska	22,8
Palmitoleinska	0,7
Stearinska	5,0
Oleinska	9,7
Linolna	33,1
Linolenska	12,1
Arahidinska	3,9
Gadoleinska	0,2
Behenska	3,7
Lignocerinska	5,5
Nezasićene masne kiseline	***56,0***
Zasićene masne kiseline	***44,0***

Iz datih tabela se vidi da svaki deo bobice grožđa ima svoj specifičan sastav masnih kiselina. U svim delovima bobice najzastupljenija je linolna masna kiselina, za njom slede palmitinska, linolenska, oleinska i stearinska, takođe su prisutne i druge masne kiseline ali u mnogo manjim količinama.

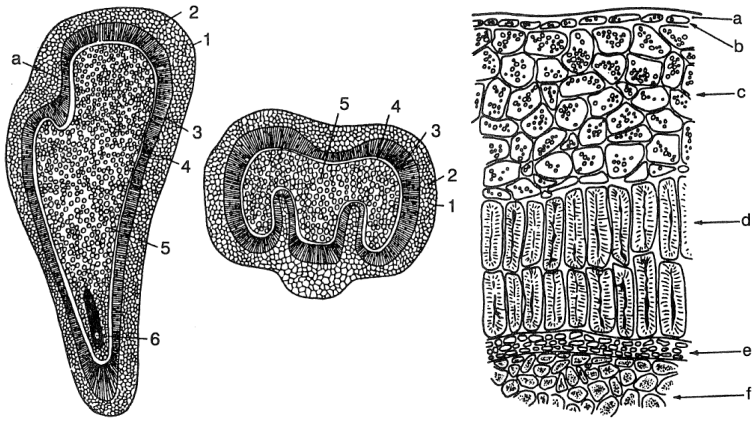
2.5. Semenka grožđa (morfologija, anatomija i sastav)

Genetički i mehanički semenka je veoma postojan organ vinove loze. Semenka loze ima telo, kljun, leđnu i trbušnu stranu. Telo semenke je okruglog ili sferičnog oblika a kljun je različitog oblika i dužine. Na leđnoj strani se nalazi kružno udubljenje oivičeno naborima. To je halaza i ona predstavlja mesto gde je semenka bila povezana sa sprovodnim sudovima. Po sredini trbušne strane semenka je jače zadebljana, tu je izražen greben koji se naziva rafa. S obe strane rafe nalaze se uzdužna udubljenja – brazdice (Slika 2.13) *(Milosavljević, 1998)*.



Slika 2.13. Izgled semenke vinove loze: a - leđna strana; b – trbušna strana (*Milosavljević, 1998*)

Na poprečnom i uzdužnom preseku fiziološki sazrele semenke jasno se zapaža endosperm u kojem je smešten embrion i semenjača koja se sastoji iz tri opne: unutrašnje, srednje i spoljašnje - epidermis i kutikula (Slika 2.14) (*Burić, 1981*; *Milosavljević, 1998*). Ćelije endosperma imaju veoma izraženu citoplazmu u kojoj se nalazi mnogo masti u obliku okruglih kapi i belančevine u obliku aleuronskih zrna (*Milosavljević, 1998*).



Slika 2.14. Levo - uzdužni i poprečni presek semenke grožđa. 1 – kutikula i epidermis; 2 – spoljna opna; 3 – srednja opna; 4 – unutrašnja opna; 5 – endosperm; 6 – embrion; a – položaj halaze. Desno – struktura opni mlade semenke. a – kutikula; b – epidermis; c – spoljnja opna; d – srednja opna; e – unutrašnja opna; f – endosperm *(Milosavljević, 2008)*

Svaka oplođena bobica grožđa bi trebalo da sadrži 4 semenke, međutim, usled nepotpune oplodnje broj semenki je od 1 – 4 (*Radovanović, 1986*). U literaturi se sreću različiti podaci koji ukazuju na sadržaj, to jest, udeo semenke u plodu grožđa, odnosno u komini koja zaostaje kao otpad nakon prerade grožđa u procesu proizvodnje vina.

Radovanović (*1986*) navodi da se od 100 kg bobica grožđa može dobiti 2 – 5 kg semenki a da isceđena komina sadrži 20 – 30% semenki. *Kinsella* (*1974*) navodi da semenke grožđa koje se javljaju kao veoma važni sastojci čvrstog otpada u procesu proizvodnje vina, čine 3 – 5% težine grožđa. *Choi i Lee* (*2009*) navode da semenke grožđa kao produkti procesa proizvodnje vina i soka čine oko 5% težine grožđa. Prema *Matthäus* (*2008*), semenke grožđa čine do oko 20% težine ploda, a računato na suvu materiju udeo semenke je oko 40 – 60%. *Maier et al.* (*2009*) navode da semenke predstavljaju značajan udeo kljuka, u količini od 38 – 52% računato na suvu materiju. *Luque-Rodriguez et al.* (*2005*), navode da semenke grožđa čine oko 15% čvrstog otpada koji nastaje u proizvodnji vina. Prema *Bockisch* (*1993*) i *Schieber et al.* (*2002*), semenke čine 20 - 26% komine grožđa. *Rice* (*1976*), iznosi da približno 25% (w/w) grožđa čini komina, a da oko 38% (w/w) komine čini semenka. *Nair i Pullammanappallil* (*2003*) iznose da se vinski otpad nakon ceđenja grožđa sa peteljkom sastoji od oko 30% peteljke, 30% semenki i 40% pokožice i pulpe.

Danas u svetu postoje dobro razrađena tehnička rešenja mašina za izdvajanje semenke grožđa iz komine. Ove mašine rade na principu sistema vibro sita različitih preforacija ili na bazi suprotno strujnog kretanja vazduha i različite specifične težine semenke od drugih delova komine.

Slika 2.15. Osušene semenke grožđa

Semenke grožđa predstavljaju veoma složen biljni materiljal. Suve semenke pored ulja sadrže oko 35% vlakana, 29% ekstraktibilnih jedinjenja uključujući fenolna jedinjenja, 11% proteina, 3% minerala i oko 7% vode (*Matthäus, 2008*). *Pao* (*1994*), je pronašao da semenka grožđa sadrži: 44% sirovih vlakana, 10% proteina, 10,2% masti,

2,9% pepela, 4,2% tanina, 4,1% skroba i 6% vlage. Semenke grožđa su veoma bogat izvor biološki aktivnih kompomenti, polifenolnih jedinjenja (katehina i proantocijanidina) (*Saito et al., 1998*), kao i vitamina E (tokoferola i tokotrienola).

Sadržaj ulja u semenkama grožđa varira, u zavisnosti od sorte grožđa (*Luque-Rodriguez et al., 2005*), stepena zrelosti grožđa, klimatskih uslova i uslova gajenja vinove loze (*Mironeasa et al., 2010; Pardo et al., 2011*). U literaturi se mogu naći različiti opsezi u kojima se može naći ova vrednost: 6 - 20% (*Crews et al., 2006*), 7 - 20% (*Matthäus, 2008*), 10 - 15% (*Kinsella, 1974),* 10 – 16% (*Luque-Rodriguez et al., 2005*), 10 – 20% (*Choi i Lee, 2009*). *Rice (1976)*, navodi da semenke crvenog grožđa sadrže 14,34 ± 1,94% ulja, dok semenke belih sorti sadrže 14,72 ± 1,62% ulja. U uporednim studijama koje izveo *Iancov* (*1967*), rezultati pokazuju da je sadržaj ulja kod crvenih sorti grožđa bio od 16 – 19% a kod belih sorti grožđa od 15,5 – 18% (*Mironeasa et al., 2010*). Prema *Dimić* (*2005*), sadržaj ulja u koštici evropskih sorti grožđa se nalazi u rasponu 12-18%, a prosečan sadržaj ulja u semenki domaćih sorti grožđa je oko 13%. Ona takođe navodi da su semenke crvenih sorti bogatije uljem od belih sorti. U tabeli 2.7 dat je prikaz hemijskog sastava semenke grožđa.

Tabela 2.7. Sastav semenke grožđa (*Dimić, 2005*)

Pokazatelj %	**Vlažno seme**	**Suvo seme**
Vlaga	30 – 52	-
Ulje	8 – 12	12 – 22
Pepeo	1,2 – 2,0	-
Sirovi proteini	-	12
Sirova vlakna, od toga celuloza	-	46 – 48 10 – 12
Polisaharidi	-	8 – 10
Ugljeni hidrati	-	3,0 – 8,5
Tanini	-	5 – 7
Lecitin	-	0,12
Fitin	-	0,72

Za koštice grožđa je karakterističan veoma veliki udeo čvrste ljuske, čak 75%, dok udeo jezgra iznosi 25% (*Dimić, 2005*). Tvrdi omotač semenke – ljuska, sa jedne strane predstavlja prednost jer u velikoj meri štiti semenku od uticaja različitih hemijskih sredstava kojima je tretirano grožđe u vegetativnom periodu, dok sa druge strane predstavlja problem prilikom odvajanja ulja primenom metode hladnog ceđenja. Naime, zbog velike čvrstine ljuske, masa se lako ″zaguši ″ u delovima prese a zbog velikog udela ljuske, ulje može da se apsorbuje u ljusci. Semenke grožđa se smatraju vrednom

sirovinom za dobijanje ulja, dok se ljuske semenke grožđa mogu koristiti za izdvajanje i proizvodnju tanina (*Pruthi, 1977*).

2.6. Ulje iz semenki grožđa

Ulje iz semenki grožđa pripada grupi polusušivih ulja, zelenkasto je do zlatno – žute boje koja pri dužem stajanju može preći u braonkastu. Senzorna svojstva ovog ulja su prijatna, slična maslinovom ulju, sa slabije izraženim vinsko - voćnim tonovima. Za razliku od rafinisanog ulja koje je neutralnog mirisa i ukusa, devičansko ulje iz semenki grožđa, ukoliko je za proizvodnju upotrebljen kvalitetan materijal, ima lagan voćni miris i ukus koji blago podseća na orah, sa blagim notama grožđa (*Dimić, 2005; Matthäus, 2008*). Jedna od njegovih osnovnih fizičkih karakteristika je postojanost na višim temperaturama; ima visoku tačku dimljenja, 190 - 230˚C (*Morin, 1996*). *Rubio et al.* (*2009*) navodi da se kvalitetna ulja semenke grožđa karakterišu blagim mirisom sa voćnim notama, visokom tačkom dimljenja (216 ˚C), visokom svarljivošću i blagim porastom viskoziteta kada se koriste za prženje.

2.7. Sastav i fizičko-hemijske karakteristike ulja iz semenki grožđa

Kao i kod većina drugih biljnih ulja, glavni sastojci ulja iz semenki grožđa su triacilgliceroli (oko 98%), a ostatak uglavnom čine sastojci koji pripadaju neosapunjivim materijama. *Bail et al.* (*2008*) su utvrdili da u kompoziciji triacilglicerola dominiraju trilinolein (LLL) do 41,8%, palmitodilinolein (LLP) do 24,3%, oleodilinolein (LLO) do 16,3%, dioleolinolein (LOO) do 11,7%, zatim palmitooleolinolein (LOP) do 9,3% i stearooleolinolein/triolein (LOS/OOO) do 4,3%. Ulje iz semenke grožđa pripada grupi ulja koja sadrže visok procenat nezasićenih (oko 90%) i mali procenat zasićenih masnih kiselina (oko 10%) (*Luque-Rodriguez et al.,2005; Matthäus, 2008; Bail et al., 2008*). Najzastupljenija masna kiselina je linolna kiselina (*Crews et al., 2006; Matthäus, 2008; Bail et al.,2008*) koja je polinezasićena i koja spada u red esencijalnih masnih kiselina koje organizam ne stvara već se moraju unositi preko hrane. Ulje iz semenki grožđa sadrži 0,8 do 1,5% neosapunjivih lipida, pretežno sterola (*Luque-Rodriguez et al., 2005*) i veće količine tanina u poređenju sa drugim uljima (*Udayasekhara Rao, 1994*). Nerafinisana ulja semenke grožđa sadrže i bioaktivne komponente uključujući tokoferole i brojna fenolna jedinjenja (*Bail et al.,*

2008). Ulje iz semenki grožđa predstavlja jedan od glavnih izvora vitamina E i sadrži relativno visoke količine tokoferola i tokotrienola (*Freitas et al., 2008*). Visok sadržaj vitamina E i polifenolnih jedinjenja, čini da ovo ulje bude jako stabilno (*Beveridge et al., 2005*).

2.7.1. Sastav masnih kiselina

Kao što je već naglašeno, ulje iz semenki grožđa sadrži oko 90% nezasićenih masnih kiselina i oko 10% zasićenih masnih kiselina. Dominantna nezasićena masna kiselina u ulju semenke grožđa je linolna (C18:2 ω-6), a zatim oleinska (C18:1 ω-9). Sadržaj ovih masnih kiselina varira, te je za linolnu u opsegu od 60 do 75% (*Crews et al., 2006; Matthäus, 2008; Pardo et al., 2009; Rubio et al., 2009*); dok po nekim autorima njen sadržaj varira čak i od 58 do 78% (*Bail et al., 2008*). Sadržaj oleinske kiseline je od 14 do 22% (*Crews et al., 2006; Matthäus, 2008*), neki autori navode da njen sadržaj varira od 3 do 15% (*Bail et al., 2008),* a ima i podataka da njen sadržaj može biti i do 25% (*Luque-Rodriguez et al., 2005; Pardo et al., 2011*). Nakon ove dve kiseline koje su dominantne, slede zasićene masne kiseline: palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) koje su zastupljene u nešto manjim koncentracijama a nakon toga sledi polinezasićena linolenska (C18:3 ω-3) koja je prisutna u znatno manjim koncentracijama. Pored navedenih kiselina, u zavisnosti od uzorka sporadično se javljaju i druge kiseline ali u veoma malim koncentracijama.

S obzirom na značaj sastava masnih kiselina sa spekta stabilnosti ulja i kao i sa aspekta nutritivnog značaja, mnogobrojna ispitivanja su urađena na ovu temu: *Miele et al.* (*1993*) su vršili ispitivanja sastava masnih kiselina u različitim delovima grozda (pokožica, pulpa i semenka) kod sorte Cabernet Sauvignon; *Crews et al.* (*2006*) su u okviru svojih istraživanja odredili sastav masnih kiselina u 30 uzoraka ulja iz semenki grožđa dobijenih iz različitih zemalja (Francuska, Španija i Italija); *Rubio et al.* (*2009*) su u okviru svojih ispitivanja odredili sastav masnih kiselina ulja iz semenki grožđa prikupljenih u različitim fazama zrelosti grožđa; *Pardo et al.,* (*2009*) su u okviru svojih istraživanja odredili sastav masnih kiselina kod 5 uzoraka ulja dobijenih od semenki 4 različite crvene sorte grožđa (semenke jedne sorte su pre mlevenja sušene na dva različita načina) koje se gaje u regionu Castilla-La Mancha i Murcia u Španiji. U tabeli

2.8 su prikazani rezultati sastava masnih kiselina u uzorcima ulja iz semenki grožđa koje su utvrdili navedeni autori.

Tabela 2.8. Sadržaj masnih kiselina u ulju semenki grožđa, rezultati različitih autora

Masna kiselina	**(%)** *Miele et al., 1993.*	**(%)** *Crews et al., 2006.*	**(%)** *Pardo et al., 2009.*	**(%)** *Rubio et al., 2009.*
Kaprilna $C_{8:0}$	< 0,1	-	-	-
Laurinska $C_{12:0}$	< 0,1	-	-	-
Miristinska $C_{14:0}$	0,1	0 – 0,1	0,04 – 0,08	0,04 – 0,06
Palmitinska $C_{16:0}$	7,0	6,6 – 11,6	7,86 – 9,19	8,36 – 9,33
Palmitoleinska $C_{16:1}$	0,1	0,1 – 0,2	-	0,10 – 0,12
Margarinska $C_{17:0}$	-	0 – 0,1	-	0,07 – 0,09
Margaroleinska $C_{17:1}$	-	0	-	0,04 – 0,05
Stearinska $C_{18:0}$	4,2	3,5 – 5,4	4,42 – 5,87	3,26 – 4,36
Oleinska $C_{18:1}$	9,9	14 - 20	16,07 – 24,88	12,28 – 18,73
Linolna $C_{18:2}$	77,6	61,3 – 74,6	60,94 – 69,16	72,98 – 67,61
Linolenska $C_{18:3}$	0,6	0,3 – 1,8	0,62 – 0,64	0,35 – 0,97
Arahidinska $C_{20:0}$	0,2	0,1 – 1,7	0,17 – 0,21	0,18 – 0,33
Gadoleinska $C_{20:1}$	0,2	0 – 0,4	-	0,13 – 0,16
Behenska $C_{22:0}$	0,1	0,1 – 0,5	-	0,02 – 0,06
Eruka $C_{22:1}$	-	0 – 0,1	-	0,02 – 0,13
Lignocerinska $C_{24:0}$	-	0 – 0,3	-	0,01 – 0,02

Varijacije sastava masnih kiselina ulja iz semenki grožđa, zavise od više faktora: područja uzgajanja grožđa, zrelosti ploda, sastava zemljišta, postupanja sa semenkama u predtretmanu, načina dobijanja ulja iz semenki i uslova procesa (Crews *et al., 2006*). Sa ovakvim sadržajem masnih kiselina, ulje semenki grožđa je slično suncokretovom ulju (60-70% linolne i 15-25% oleinske kiseline) ali ima manji sadržaj linolenske kiseline od ovog ulja (manje od 1% u ulju semenki grožđa) (*Matthäus, 2008*). Sadržaj linolne kiseline u ulju semenki grožđa je viši nego u ulju uljane tikve (34 - 65%), soje (48 - 59%) i kukuruza (34 - 65%) (*Pravilnik o kvalitetu ulja, 2013*). Od posebnog je značaja istaći da su ulja sa visokim sadržajem linolne kiseline ocenjena kao blagotvorna po zdravlje jer utiču na smanjenje masnoća i "lošeg" holesterola - LDL u krvi. Sadržaj zasićenih masnih kiselina u ovom ulju (oko 10%) je tek nešto veći nego kod uljane repice ali je uporediv sa sadržajem u većini jestivih biljnih ulja (*Matthäus, 2008*).

Polinezasićene masne kiseline (linolna, linolenska) su esencijalne masne kiseline i kao i vitamini, minerali i amino kiseline (proteini) bitne su hranljive materije u ishrani. Neophodne su za normalno funkcionisanje ćelija, a ne mogu da se sintetišu u telu, već ih je potrebno unositi hranom. O značaju esencijalnih masnih kiselina u ishrani ljudi je

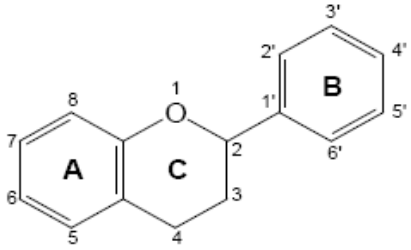
već pisano u ovom radu, pa se sa tim u vezi, a sa aspekta sastava masnih kiselina ulje iz semenki grožđa može smatrati veoma vrednim izvorom dijetalnih masnoća.

2.7.2. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena u biljnom svetu i predstavljaju najzastupljenije sekundarne metabolite pronađene u biljkama (*Macheix et al., 1990*). Ova grupa jedinjenja uključuje mnogo klasa jedinjenja kao što su fenolne kiseline, obojeni antocijani, prosti flavonoidi i složeni flavonoidi (*Spanos i Wrolstad, 1992*). Sva fenolna jedinjenja sadrže aromatični prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih grupa.

Fenolna jedinjenja koja se mogu naći u grožđu i proizvodima od grožđa (sokovima i vinima) mogu se podeliti na dve grupe: flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi obuhvataju obojene flavonole (najčešći flavonol u hrani je kvercentin), obezbojene flavan-3-ole ili flavanole (kao što su katehin, epikatehin i njihovi polimeri kao i njihovi estri formirani sa galaktarnom kiselinom ili glukozom), antocijane (crveni i plavi) i tanine koji nastaju polimerizacijom određenih formi. U neflavonoide spadaju derivati cimetne kiseline (kumarinska, kafena, ferulinska, hlorogenska i nehlorogenska kiselina) i benzoeve kiseline (*p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska i galna kiselina). Tu su još i derivati tirozina (tirozol i hidroksitirozol) i stilbeni (resveratrol) (*Shi et al.*, *2003*).

U toku sazrevanja bobice dolazi do brzog nakupljanja fenolnih jedinjenja koja su posebno važna za crvene sorte. Kao sekundarni proizvodi katabolizma šećera, fenolna jedinjenja počinju da se nakupljaju sa sazrevanjem bobice. Kondenzacijom eritrozo-4-fosfata (intermedijarni proizvod pentozofosfatnog ciklusa) sa fosfoenol pirogrožđanom kiselinom, nastaje benzenov prsten koji je preteča svih fenolnih jedinjenja. Ovaj put (šikimat-arogenat put ili put šikiminske kiseline) vodi ka stvaranju benzoeve i cimetne kiseline kao i aromatičnih aminokiselina. Kondenzacijom tri molekula Acetil koenzim A (acetil-CoA), nastalih u Krebsovom ciklusu, stvara se takođe benzenov prsten. Kondenzacijom ovih sekundarnih prstenova sa cimetnom kiselinom, nastaje molekulska grupa poznata kao flavonoidi (*Daayf i Lattanzio, 2008*).



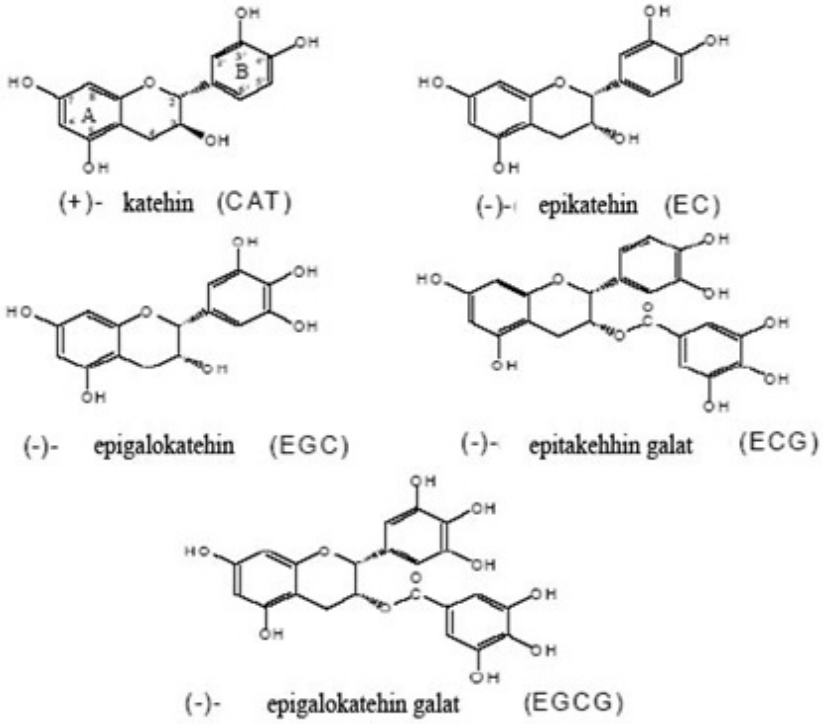
Slika 2.16. Osnovna struktura flavonoida

Fenolna jedinjenja su široko raprostranjena unutar bobice grožđa (*Singleton, 1980*). Kada se ekstrahuje određena sorta grožđa, sastav polifenola zavisi od toga da li se vrši ekstrakcija cele bobice, pokožice ili semenke. Prema *Downey et al.* (*2003*), u semenkama se nalazi oko 60% ukupnih fenolnih jedinjenja grožđa, u šepurini oko 20%, dok je sadržaj ovih jedinjenja u pokožici u granicama 15 – 20%. Prema *Kovaču* (*1995*), ukupni ekstrakcioni polifenoli u grožđu su prisutni u mesu (pulpi) bobice sa samo 10 % i manje, sa 60 – 70% u semenci i sa 28 – 35% u pokožici. Sadržaj polifenola u semenci je od 5 – 8% od njene težine.

Između 50 i 70% fenolnih jedinjenja semenki grožđa čine flavan-3-oli, odnosno proantocijanidini (*Kovač, 1995*). Proantocijanidini semenki sadrže do 28 jedinica flavanola (*Hayasaka et al., 2003*) i imaju izražena taninska svojstva (adstringencija). Tokom zrenja grožđa, hemijski sastav fenola se značajno menja tako da se sadržaj monomernih flavan-3-ola u semenkama smanjuje za 90 %, a proantocijanidina za 60 % (*Kennedy, 2000*).

Sastav polifenola semenke grožđa je veoma kompleksan. Semenke su bogate fenolnim jedinjenima kao što su flavonoidi (monomeri flavan-3-ola i proantocijanidini), fenolne kiseline i stilbeni (*Emre et al., 2005*). Od flavonoida prisutni su monomeri (katehin, epikatehin i epikatehin-3-O-galat), dimeri i trimeri flavan-3-ola (*Naczk i Shahidi, 1991*). Tokom sazrevanja grožđa flavan-3-oli polako kondenzuju u oligomerne proantocijanidine i polimerne komponente (kondenzovani tanini). Dimeri proantocijanidina su često poznati kao B-serija a trimeri kao C-serija. Pet različitih dimera (proantocijanidin B1, B2, B3, B4 i B5) i dva trimera (C1 i C2) su identifikovani u pokožici i semenci. Ovi dimeri i trimeri se sastoje od katehina i epikatehina (*Shi et al., 2003*). *Fuleki i Da Silva* (*1997*) su izolovali i identifikovali ukupno 11 monomera, dimera i trimera iz semenke crvenog grožđa primenom tečne hormatografije na

reversnoj fazi (RP HPLC). Sve ove supstance pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost, koja rezultira "hvatanjem" slobodnih radikala (*Matthäus, 2008*). Mnoge naučne studije pokazuju da je antioksidativna moć proantocijanidina (glavnih sastojaka ekstrakta semenke grožđa) 20 puta veća od vitamina E i čak do 50 puta veća od vitamina C (*Shi et al.*, *2003*).

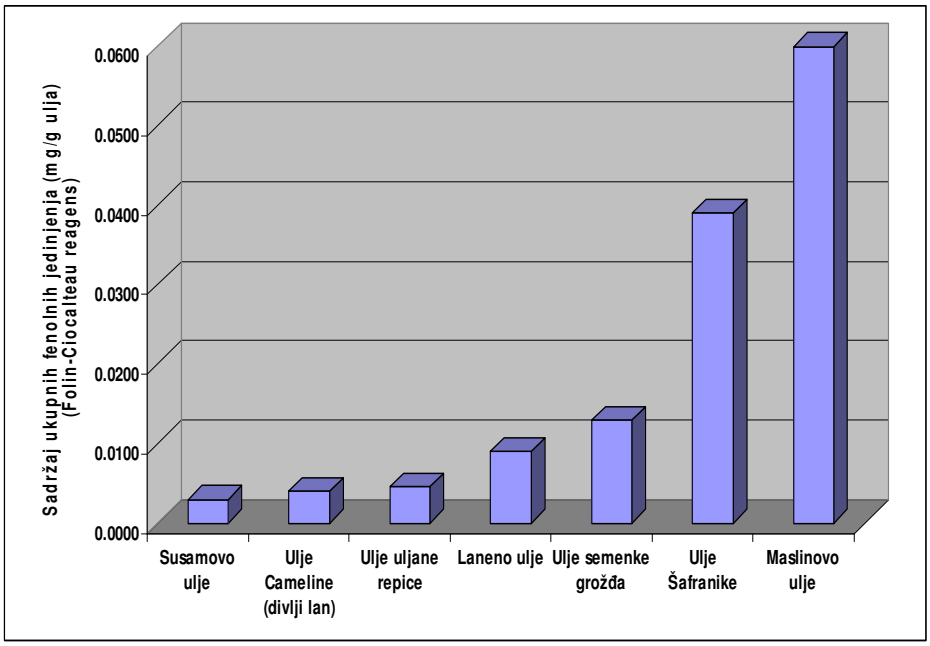


Slika 2.17. Monomeri flavan-3-ola i derivati. Struktura glavnih polifenola identifikovanih u ekstraktu semenke grožđa

Jedan od veoma važnih argumenta za korišćenje ulja semenke grožđa zbog pozitivnog zdravstvenog efekta je upravo visok sadržaj nabrojanih oligo-fenolnih komponenti u ulju. Ovo ulje sadrži oligomerne proantocijanidine na nivoima 1000 puta većim nego u uljima drugih semenki (*Udayasekhara Rao, 1994*).

Tokom procesa ceđenja semenki, glavne količine fenolnih jedinjenja zaostaju u ostacima od ceđenja (pogači) jer je njihova rastvorljivost u ulju ograničena. Određivanjem količine ukupnih fenolnih jedinjenja, pokazuje se da je pogača koja zaostaje nakon ceđenja veoma bogata fenolnim jedinjenjima dok se u ulju može naći samo oko 0,01 mg/g ulja (*Matthäus, 2008*). Poređenja radi, koncentracija polifenolnih jedinjenja nađenih u pogači od ceđenja je oko 2000 puta veća nego u ulju (*Matthäus, 2008*). U poređenju sa drugim biljnim uljima sadržaj polifenola u ulju semenke grožđa nije značajno viši: nešto je viši u odnosu na laneno ulje i ulje uljane repice ali je u

poređenju sa maslinovim uljem daleko niži. Na slici 2.18 dat je grafički prikaz sadržaja polifenola u različitim biljnim uljima.



Slika 2.18. Sadržaj fenolnih jedinjenja u različitim devičanskim biljnim uljima (*Matthäus, 2008*)

Ispitivanja na temu sastava i sadržaja fenolnih jedinjenja u ulju semenki grožđa nisu brojna, bez obzira na nesumnjivo veliki značaj polifenolnih jedinjenja sa aspekta njihovog pozitivnog uticaja na stabilnost ulja sa jedne i na pozitivni zdravstveni efekat sa druge strane; a razloge treba tražiti u kompleksnosti ovih sistema.

Bail et al., (*2008*) su određivali sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (spektrofotometrijski, primenom Folin–Čikalteovog (Folin-Ciocalteu) reagensa) i antioksidativni kapacitet (metodom Trolox ekvivalenta) kod 9 uzoraka ulja dobijenih od semenki različitih sorti grožđa postupkom hladnog ceđenja, i tom prilikom su utvrdili sadržaj fenolnih jedinjenja u rasponu 59,0 – 115,5 μg/g, dok je antioksidativni kapacitet utvrđen u opsegu 0,09 – 1,16 μg ekvivalenata Troloxa/g uzorka. Niže vrednosti u sadržaju fenolnih jedinjenja i niže vrednosti kod antioksidativnog kapaciteta pokazala su rafinisana ulja i ulja od semenki koje su zagrevane (na 60 °C) 30 minuta pre ceđenja kao i ulja dobijena od semenki belih sorti grožđa.

Pardo et al., (*2009*), su u okviru svojih ispitivanja odredili sadržaj fenolnih jedinjenja (spektrofotometrijski, primenom Folin–Čikalteovog reagensa) i otpornost na oksidaciju (Rancimat test) kod 5 uzoraka ulja dobijenih od semenki 4 različite crvene

sorte grožđa (semenke jedne sorte su pre mlevenja sušene na dva različita načina) koje se gaje u regionu Castilla-La Mancha i Murcia u Španiji, i utvrdili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u opsegu vrednosti 10,68 – 34,43 mg/kg; dok su vrednosti indukcionog perioda određene Rancimat testom (na 98 °C) bile od 6,38 do 9,36 h. Rezultati njihovih ispitivanja pokazali su da je veći sadržaj fenolnih jedinjenja i bolju oksidativnu stabilnost pokazalo ulje dobijeno od semenki koje su sušene toplim vazduhom u trajanju od 6 sati od ulja dobijenog od semenki koje su sušene 7 dana na sobnoj temperaturi. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i oksidativne stabilnosti je takođe utvrđena. Isti autor je sa svojim saradnicima (*Pardo et al., 2011*) radio na ispitivanju mogućnosti poboljšanja kvaliteta rafinisanog ulja semenke grožđa, ekstrakcijom sveže mlevene semenke u ulju i tom prilikom su utvrđene slične vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju semenke grožđa kao u prethodnom radu; nađeno je povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju nakon ekstrakcije sveže semenke kao i blago povećanje oksidativne stabilnosti ulja koje je pripisano upravo povećanju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.

2.7.3. Steroli

Do pre desetak godina informacije o sastavu i sadržaju sterola u ulju semenke grožđa su bile dosta oskudne, ali s obzirom na njihov značaj u poslednjoj dekadi sprovedeno je dosta istraživanja na ovu temu. *Tiscornia i Bertini* (*1973*) su objavili da su u ulju semenke grožđa prisutni: holesterol (0,2 - 0,4%), brasikasterol (0 - tragovi), kampesterol (10,2 - 10,5%), stigmasterol (11,8 - 12,2%), β-sitosterol (74,2 - 75,3%), i Δ7-stigmasterol (2,2 - 3%).

Firestone (*1997*) navodi sledeće podatke o sastavu sterola u ulju semenke grožđa: holesterol (0 – 0,2%), kampesterol (9 - 14%), stigmasterol (9-17%), β-sitosterol (prisutan), Δ5 -avenasterol (1 - 3%), Δ7-stigmasterol (1 - 3%) i Δ7-avenasterol (0 - 1%), a prisutni su drugi steroli kao što su sitostanol i Δ5, 24–stigmasterol. On navodi da je ukupan sadržaj sterola u ulju semenke grožđa oko 580 mg/100 g, a kampesterol, stigmasterol, β-sitosterol i Δ5-avenasterol su najzastupljeniji steroli, dok je dominantan po sadržaju bio β-sitosterol.

Beveridge et al. (*2005*) su vršili istraživanja u okviru kojih su ispitivali mogućnost primene natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom i ekstrakcije petrol-etrom u

izdvajanju ulja iz semenki 8 različitih crvenih sorti grožđa i tom prilikom su pronašli fitosterole u opsegu od 410,3 mg/100 g do 1861,7 mg/100 g (kod ulja dobijenih primenom ugljenik(IV)-oksida kao rastvarača) i u opsegu od 316,5 mg/100 g do 1106,5 mg/100 g (kod ulja dobijenih primenom petrol-etra kao rastvarača). Ukupan sadržaj kao i udeo pojedinih sterola je varirao u zavisnosti od sorte i najviši sadržaj je utvrđen kod sorte Gamay a najniži kod sorti Merlot i Cabernet Sauvignon.

Crews et al. (*2006*), su u svojim istraživanjima (na 30 uzoraka ulja iz semenki grožđa iz Francuske, Španije i Italije) pronašli sterole u opsegu od 285 mg/100 g do 1125 mg/100 g sa prosekom od 571 mg/100 g. U širokom opsegu (8,6 - 40,4 mg/100 g) je pronađen i sitostanol, dok brasikasterol nije pronađen. Isti autor je sa svojim saradnicima utvrdio i prsisustvo 3,5-stigmastadiena u količinama do 6,69 mg/kg. Oni su sugerisali da je do formiranja 3,5–stigmastadiena moglo da dođe tokom zagrevanja semenki u procesu sušenja, tokom ekstracije rastvaračima ili tokom procesa filtracije. Na prisustvo 3,5–stigmastadiena je takođe ukazao i *Matthäus* (*2008*) koji ih je u rafinisanim uljima semenke grožđa pronašao u opsegu 10 – 40 mg/kg, a u devičanskim uljima semenke grožđa u količini do 2,2 mg/kg.

Pardo et al. (*2009*), su u okviru svojih istraživanja na uljima dobijenim od semenki 5 različitih crvenih sorti grožđa (semenke jedne sorte su pre mlevenja sušene na dva različita načina), utvrdili da sadržaj ukupnih sterola kao i odnos pojedinih sterola zavisi od sorte grožđa i da način sušenja takođe utiče na sadržaj sterola (veći sadržaj je pronađen kod ulja koje je dobijeno od semenki koje su sušene na višim temperaturama kraće vreme). Sve pronađene vrednosti su bile u okviru opsega koji su utvrdili prethodni autori.

U istraživanjima koje su sproveli *Rubio et al.* (*2009*) utvrđeno je da sadržaj ukupnih sterola u ulju semenke grožđa drastično opada sa sazrevanjem bobice do perioda šarka, pri čemu se značajno menja i udeo pojedinih sterola, a nakon toga, od perioda šarka do potpune tehnološke zrelosti grožđa, ukupni sadržaj kao i udeo, menja se neznatno. Utvrđene vrednosti ukupnih sterola kao i udeo pojedinih sterola u ukupnom sadržaju, u uzorcima ulja od semenki koje su sakupljenje od faze šarka do potpune tehnološke zrelosti, su takođe bile u okviru opsega koje su utvrdili prethodni autori.

2.7.4. Tokoferoli i tokotrienoli

Kao što je već navedeno u delu o tokolima, ova jedinjenja se mogu naći u svim biljnim uljima u različitim količinama i u različitim kompozicijama. Poznata su 4 različita izomera tokoferola i tokotrienola: α, β, γ i δ, dodatno ova grupa jedinjenja sadrži i plastohromanol–8. Sva ova jedinjenja imaju antioksidativnu aktivnost koja štiti ulje od oksidativnih promena, a dodatno imaju i biološku aktivnost koja štiti ćelije od oksidativnog stresa. Intenzitet ova dva efekta, antioksidativnog i biološkog su međusobno suprotni; što važi za svaki tokoferol unutar normalnih temperaturnih granica. α-tokoferol pokazuje najjaču biološku aktivnost *in vivo* i najslabiji antiooksidativni efekat u uljima i mastima *in vitro*, dok obrnuto, γ-tokoferol, a pogotovo δ-tokoferol, pokazuju najizraženije antioksidativne sposobnosti *in vitro,* ali i slabu biološku aktivnost *in vivo* (*Pićurić-Jovanović i Milovanović, 2005*). Većina biljnih ulja sadrži samo tokoferole i u izvesnoj meri plastohromanol-8, dok su tokotrienoli retki (*Matthäus, 2008*).

Istraživanja na temu sadržaja ovih jedinjenja u ulju semenke grožđa su brojna. *Beveridge et al.,* (*2005*), su u okviru svojih istraživanja kojima su ispitivali mogućnost primene natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom i ekstrakcije petrol-etrom u izdvajanju ulja iz semenki 8 različitih crvenih sorti grožđa, pronašli vrednosti tokoferola i tokotrienola u sledećem opsezima: α–tokoferol (7,67 – 30,9 mg/100 g), β–tokoferol (4 – 15,3 mg/100 g), γ–tokoferol (2,06 – 13,2 mg/100 g), α–tokotrienol (10,2 – 22,8 mg/100 g) i γ–tokotrienol (21,7 – 38,3 mg/100 g). Značajne razlike u sadržaju tokoferola i tokotrienola između uzoraka ulja dobijenih primenom ugljenik(IV)-oksida i petrol-etra kao rastvarača u natkritičnoj ekstrakciji nisu utvrđene; dok su razlike između ulja od semenki različitih sorti grožđa bile značajne. Najviši sadržaj α–tokoferola je pronađen kod ulja od sorte Gamay, a najniži sadržaj je pronađen kod ulja od sorti Cabernet Sauvignon i Merlot. S druge strane kod ulja ove dve sorte je pronađen najviši sadržaj γ–tokotrienola. Generalno, vrednosti sadržaja tokoferola i tokotrienola koje je objavio ovaj autor su veće u odnosu na podatke iz literature, što je objašnjeno načinom ekstrakcije koji isključuje oksidativne procese i načinom pripreme i čuvanja uzoraka do analize (tretman sa butilovanim hidroksitoluenom (BHT), ispiranje azotom i čivanje na (- 70°C)), koji isključuju ili svode na minimum degradaciju ovih osetljivih jedinjenja.

U istraživanjima koja su sprovedena tokom 2002. i 2003. godine na 30 ulja iz semenki grožđa (iz Francuske, Španije i Italije) *Crews et al.,* (*2006*) su pronašli da je ukupni sadržaj tokoferola i tokotrienola između 63 i 1208 mg/kg. Ovaj opseg je značajno širi od vrednosti datih Codex standardom (240 – 410 mg/kg). Sadržaj pojedinačnih tokoferola je pronađen u izuzetno širokom opsegu: α–tokoferol (0 – 229 mg/kg), β–tokoferol (0 – 133 mg/kg), γ–tokoferol (0 – 168 mg/kg) i δ–tokoferol (0 – 69 mg/kg), nezavisno od zemlje porekla. Od ukupno 30 uzoraka ulja u 12 uzoraka je najdominantniji bio α–tokoferol, u 10 uzoraka β–tokoferol, u 6 uzoraka γ–tokoferol i u 2 uzorka δ–tokoferol. Od tokotrienola je kao dominantan utvrđen γ–tokotrienol, često na nivou većem od tokoferola. Međutim i kod tokotrienola su uočene značajne varijacije u sadržajima: α–tokotrienol (0 – 352 mg/kg), β–tokotrienol (0 – 125 mg/kg), γ–tokotrienol (0–785 mg/kg) i δ–tokotrienol (0 – 82 mg/kg); u po jednom uzorku iz Francuske i Italije i u tri uzorka iz Španije, γ–tokotrienol nije detektovan, dok je u uzorcima iz Španije pronađen izuzetno visok sadržaj (92 – 125 mg/kg) β–tokotrienola (*Crews et al., 2006*).

Bravi et al., (*2007*), su istraživali optimalne uslove natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom u cilju dobijanja ulja iz semenki grožđa obogaćenog α–tokoferolom. Ekstrakciju su izvodili na pritisku od 25 MPa. U eksperimentu je korišćena mešavina semenki od 10 različitih sorti grožđa (4 crvene sorte i 6 belih sorti). Meren je ekstrakcioni prinos i sadržaj α–tokoferola, a rezultati su izraženi u funkciji veličine čestice semenke, temperature ekstrakcije i odnosa rastvarača (CO_2) i mase semenke. Pronađeno je da se na temperaturi od 80 °C sa veličinom čestice semenke od 300 – 425 μm u prvoj fazi ekstrakcije (nakon potrošnje CO_2 u količini 25 puta u odnosu na masu tretirane semenke), dobija ulje sa sadržajem α–tokoferola u količini od 265 ppm, ali je prinos ulja nakon ove faze bio jako nizak (2,3%). Sa produženjem ekstrakcije, ekstrakcioni prinos ulja raste, ekstrakcija α–tokoferola je nastavljena ali u daleko manjoj meri u odnosu na prvu fazu. Na kraju ekstrakcije, sa potrošnjom CO_2 u količini od 95 puta u odnosu na masu semenke dobijen je prinos ulja od 8,4% sa sadržajem tokoferola od 95 ppm. Ekstrakcijom n-heksanom (odnos rastvarača i semenke je bio 103:1), je dobijeno 15,4% ulja sa sadržajem α–tokoferola od 44 ppm.

Freitas et al. (*2008*) su ispitivali mogućnost primene tečne ekstrakcije pod pritiskom za dobijanje ulja iz semenki grožđa sa visokim sadržajem vitamina E. U svom

eksperimentu oni su određivali sadržaj α–tokoferola u uzorcima ulja dobijenim od semenki 6 različitih sorti koje se gaje na jugu Brazila, a ulja su izolovali na tri načina: ekstrakcijom po Soxhletu, primenom mehaničke prese i tečnom ekstrakcijom pod pritiskom (kao rastvarač je korišćen n-heksan). Pronađene vrednosti sadržaja α–tokoferola su varirale od 0,1 mg/100 g do 5,67 mg/100 g, pri čemu su najveće vrednosti izmerene kod uzoraka dobijenih primenom tečne ekstrakcije pod pritiskom. Takođe je utvrđeno da na sadržaj α–tokoferola značajan uticaj ima i sorta grožđa - najveće vrednosti su pronađene kod Cabernet Sauvignona i Merlot-a a najniže vrednosti su pronađene kod sorte Isabel koja se u Brazilu uglavnom koristi kao konzumna sorta i za proizvodnju stonih vina.

Kim et al. (*2008*), su istraživali promene sadržaja tokoferola i tokotrienola u ulju semenke grožđa tokom oksidacije. Tri uzorka ovog ulja i po jedan uzorak sojinog i maslinovog ulja čuvani su na termeraturama od 25 °C i 60 °C u trajanju od 120 dana. Tokom navedenog perioda stepen oksidacije je praćen određivanjem vrednosti peroksidnog broja i konjugovanih diena, a istovremeno je praćena i promena sadržaja tokoferola i tokotrienola. Količine tokoferola i tokotrienola u uzorcima ulja iz semenki grožđa, koje su izmerene odmah nakon izdvajanja ulja, kretale su se u sledećim opsezima: α–tokoferol (151 - 237 mg/kg), γ–tokoferol (27 - 36 mg/kg), δ–tokoferol (0 – 3 mg/kg) , α–tokotrienol (156 – 216 mg/kg) i γ–tokotrienol (250 - 318 mg/kg). Količine tokoferola pronađene kod sojinog ulja su: α (63 mg/kg), γ (651 mg/kg) i δ (194 mg/kg), dok tokotrienoli nisu detektovani. Količine tokoferola pronađene kod maslinovog ulja su: α (120 mg/kg) i γ (14 mg/kg), dok δ–tokoferol i tokotrienoli nisu detektovani. Sa izuzetkom maslinovog ulja čuvanog na 25 °C, kod svih uzoraka ulja čuvanih i na obe temperature tokom vremena zabeležen je pad u ukupnom sadržaju tokoferola i tokotrienola. Pad u ukupnom sadržaju vitamina E je bio praćen povećanjem vrednosti peroksidnog broja, a promene koje su zabeležene su bile daleko izraženije kod uzoraka čuvanih na 60 °C, gde je već nakon 15 i 20 dana došlo do skoro potpunog gubitka vitamina E. Ovi rezultati su ukazali da vitamin E deluje kao antioksidant u ovim uljima: sa napredovanjem oksidacionih procesa sadržaj vitamina E je opadao, jer se trošio u njima kao antioksidant.

Sabir et al. (*2012*), su određivali sadržaj tokoferola u uljima iz semenki dvadeset i jedne sorte grožđa gajene na teritoriji Turske, pri čemu su ulja izolovali metodom po

Soxhletu. Tom prilikom su utvrdili da je najdominantniji α–tokoferol (135,1 – 260,5 mg/kg), a zatim po sadržaju sledi γ–tokoferol (13,7 – 30,2 mg/kg); dok su β–tokoferol i δ–tokoferol pronađeni u veoma malim opsezima (0,5 - 175 mg/kg i 0,5 - 1,46 mg/kg).

2.8. Oksidativna stabilnost ulja i uloga prirodnih antioksidanata

Oksidativna stabilnost u velikoj meri utiče na sveobuhvatni kvalitet i nutritivnu vrednost ulja, što istovremeno uslovljava i održivost ulja. To je važno svojstvo jestivih ulja i odnosi se na vreme u kome se uzorak odupire oksidaciji i može se koristiti za procenu kada ulje dostigne nivo oksidacije pri kom je neupotrebljivo za ishranu. Poznavanje održivosti je veoma važno kako bi se unapred utvrdilo vreme tokom kojeg se ulja mogu sačuvati bez bitnih promena kvaliteta i posebno je važno radi definisanja roka upotrebe ulja. Iako zakonskim propisima održivost nije definisana, ona je sve traženiji parametar kvaliteta u prometu jestivih ulja. Određivanju održivosti, to jest, definisanju roka upotrebe jestivih nerafinisanih ulja treba pristupiti krajnje oprezno i odgovorno. Usled odsustva rafinacije, kod devičanskih ulja mogu biti prisutne komponente (razgradni produkti oksidacije, metali i drugo) koje pogoršavaju održivost, a sa druge strane, veći sadržaj prirodnih sastojaka sa antioksidativnim svojstvima (tokoferoli, karotenoidi, fosfolipidi, fenolna jedinjenja i slično) mogu doprineti boljoj održivosti ulja (*Murkovic i Pfannhauser, 2000*).

Nekoliko je hemijskih pokazatelja koji se koriste za utvrđivanje stepena oksidacije ulja, a oni se baziraju na merenju primarnih i sekundarnih proizvoda oksidacije. U procesima oksidacije važnu ulogu igraju reaktivne vrste koje se pojavljuju tokom procesa izazvanih prisustvom kiseonika a dele se na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale) (*Halliwel i Whiteman, 2004*). Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni uzrok su njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti pozitivno (radikal katjon) i negativno naelektrisani (radikal anjon). Nespareni elektron može da se nalazi na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali dele na slobodne radikale (reaktivne slobodnoradikalske vrste) kiseonika (ROS), hlora (RCS), azota (RNS) i taklo dalje. Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom

svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcione procese i iradijaciju visokom enrgijom (*Piletić et al., 1993*).

U organizmu je u normalnim uslovima nastajanje toksičnih oblika kiseonika i drugih slobodnih radikala u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata pomerena u stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (*Halliwel, 1999; Zirojević et al, 2002*). Oksidativni stres dovodi do oksidativnih oštećenja primarnih biomolekula: proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, što može biti uzrok čitavog niza poremećaja u metabolizmu; može izazvati disfunkciju i smrt ćelija pa može biti uzrok nastanka mnogih oboljenja, kao što su: arterioskleroza, kancer, kardiovaskularna i oboljenja kao što su astma, artitis, gastritis, dermatitis, dijabetes, bolesti jetre, bolesti bubrega, zapaljenski procesi, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest (*Kow, 1999; Puigros et al., 2005*).

Nastajanje reaktivnih vrsta kiseonika i drugih slobodnih radikala u biološkim sistemima može biti indukovano različitim endogenim (prooksidativni enzimski sistemi, proces ćelijske respiracije, fagocitoze) i egzogenim faktorima (zračenje, kontaminiran vazduh) (*Bagchi i Puri, 1998*).

Neki slobodni radikali nastaju i u toku normalnog metabolizma. Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitohondrija (*Acworth, 2003*). Do intenzivne produkcije slobodnih radikala (superoksid anjon radikala i vodonik peroksida) dolazi i u procesu fagocitoze, u procesu respiratorne eksplozije u fagocitnim ćelijama, kao odgovor imunog sistema na prisustvo bakterija i virusa (*Đorđević et al., 2000*).

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet -}$) odnosno njegov protonovani oblik, perhidroksilni radikal ($HO_2^{\bullet -}$), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida. Značajne količine produkuju se i u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (na primer, ksantin oksidazom) (*Ohara et al., 1993*), kao i u procesu fagocitoze (*Choi et al., 2006*).

Hidroksil radikal, ($^{\bullet}$OH) je najreaktivniji od svih ROS i najodgovorniji za citotoksične efekte kiseonika. Brzo reaguje sa biomolekulima, pa je njegov poluživot

izuzetno kratak (10^{-9} s). Hidroksil radikal se u ćelijama stvara kada postoje uslovi za Haber-Vajsovu reakciju:

$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^+ + OH^-$ ili

Fentonovu reakciju:

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{3+}$

Takođe, nastaje dejstvom γ-zračenja na molekul vode, u procesu fagocitoze, troelektronskom redukcijom iz molekulskog kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija, kao i iz hipohlorne kiseline (*Mimić-Oka et al., 1999*):

$HOCl + O_2^{\bullet-} \rightarrow {}^{\bullet}OH + Cl^- + O_2$

Vodonik peroksid (H_2O_2) nije slobodni radikal, ali se ubraja u reaktivne vrste kiseonika (*Wu D. i Cederbaum A.J., 2003*). Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelktronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom mutacijom, dejstvom superoksid dismutaze:

$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Proces stvaranja vodonik peroksida odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćelijske membrane (*Gatellier et al., 1995*).

Singletni kiseonik ($^1O_2$) je izrazito reaktivan, nastaje tokom fagocitoze i enzimskim putem u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza (*Kanofsky et al., 1988*).

Peroksil i alkoksil radikali ($RO_2^{\bullet}$ i $RO^{\bullet}$) nastaju u lančanoj, slobodnoradikalskoj reakciji lipidne oksidacije (*Mimić-Oka et al., 1999*).

Oksidacija lipida je proces oksidativnog oštećenja koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide, u uslovima oksidativnog stresa. Polinezasićene masne kiseline u fosfolipidima i glikolipidima, kao i holesterol u biološkim membranama, predstavljaju osnovni supstrat za oksidativno oštećenje lipida (*Abuja i Albertini, 2001*). Lipidna oksidacija u biološkim sistemima može se odigravati enzimskim (delovanjem lipoksigenaza) i neenzimskim putem. Intenzivan proces lipidne oksidacije nađen je kod aterogeneze, kancerogeneze, neurodegenerativnih i drugih oboljenja (*Girotti, 1998*). Lipidna oksidacije predstavlja i najvažniji proces koji dovodi do kvarenja masti i ulja, što dovodi do smanjenja njihove nutritivne vrednosti, pojave neprijatnog ukusa i mirisa i nastajanja toksičnih proizvoda.

Lipidna oksidacija je proces u kome slobodnoradikalske i neradikalske vrste kiseonika reaguju sa lipidima izazivajući oksidativnu destrukciju nezasićenih odnosno polinezasićenih masnih kiselina. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne oksidacije, koja se još naziva autooksidacijom, odvija se u tri faze, kao i mehanizam delovanja antioksidanata i prikazani su sledećim reakcijama:

Inicijacija

$X^{\bullet} + RH \rightarrow R^{\bullet} + XH$ (2.1)

Propagacija

$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (2.2)

$ROO^{\bullet} + R'H \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$ (2.3)

Terminacija

$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$ (2.4)

$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$ (2.5)

$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ (2.6)

Sekundarna inicijacija

$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$ (2.8)

$2ROOH \rightarrow ROO^{\bullet} + RO^{\bullet} + H_2O$ (2.9)

Katalitička inicijacija

$M^{n+} + ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + {}^{-}OH + M^{(n+1)+}$ (2.10)

$M^{(n+1)+} + ROOH \rightarrow ROO^{\bullet} + H^{+} + M^{n+}$ (2.11)

Slika 2.19. Mehanizam lančane reakcije lipidne autoksidacije (*Yanishlieva-Maslarova, 2001*)

Prva faza mehanizma lančane reakcije oksidacije lipida se naziva *faza inicijacije*, i podrazumeva formiranje slobodnih radikala. Slobodni (alkil) radikali ($R^{\bullet}$) nastaju homolitičkim razlaganjem nezasićenih masnih kiselina u lipidima, izdvajanjem α-metilenskog molekula vodonika iz masne kiseline (jednačina 2.1). Ovaj visoko reaktivni radikal dalje reaguje sa kiseonikom i formira peroksidni radikal ($ROO^{\bullet}$) (jednačina 2.2). Ovi radikali su većinom odgovorni za oksidaciju lipida zbog njihove tendencije da prihvataju elektrone. Sledeća faza je *faza propagacije* koja podrazumeva dalju proizvodnju produkata primarne oksidacije. Reagujući sa vodonikom iz lipidne strukture, peroksil-radikali formiraju hidroperokside - produkte primarne oksidacije (ROOH) (jednačina 2.3), koji će dalje reagovati sa kiseonikom proizvodeći novi

peroksil radikal što dalje rezultira cikličnim, samokatalizujućim oksidativnim mehanizmom (lančana reakcija). Hidroperoksid je nestabilan i degradira se dalje do proizvodnje novih radikala a što na dalje produžava reakciju propagacije. Hidroperoksidi formiraju na kraju alkoksi ($RO^{\bullet}$) ili peroksi ($ROO^{\bullet}$) radikale (jednačine 2.8 i 2.9) koji dalje, u *fazi terminacije*, reaguju međusobno formirajući stabilne dimerne produkte (jednačine 2.4, 2.5 i 2.6). Alkoksi radikali nastali razgradnjom hidroperoksida, mogu daljom razgradnjom da oslobode isparljive ugljovodonike, alkohole i aldehide. Takođe mogu biti stvoreni i neisparljivi alkoholi i ketoni. Od posebnog su značaja isparljivi aldehidi koji su odgovorni za miris oksidovanih ulja. Produkti sekundarne oksidacije, alkoholi i nezasićene masne kiseline, takođe dovode do proizvoda terminacije (stabilnih dimera). Rezultat je formiranje viskoznih materijala tokom polimerizacije. Ovi polimeri su nerastvorni u mastima i predstavljaju završnu fazu oksidacije (*Yanishlieva-Maslarova, 2001*). Stvaranje slobodnih radikala može biti katalizovano i jonima metala (M^{n+}) (jednačina 2.10 i 2.11).

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanata jeste ona koju je dao *Halliwell* (*1990*), a prema kojoj su antioksidanti "supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata". Antioksidanti mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da: deluju kao "hvatači" (eng. “scavengers”) slobodnih radikala, odnosno deluju kao donori elektrona ili H-atoma peroksil ili hidroksil radikalima ili akceptori elektrona ili H atoma ugljenikovih slobodnih radikala (*Bragadóttir, 2001*); kompleksiraju jone metala (čime je onemogućena kataliza reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida, na primer, $^{\bullet}OH$) (*Vaya i Aviram, 2001*); razgrađuju hidroperokside; eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika (*Pokorny, 2001; Pokorny i Parkányiová, 2005*); pokazuju sinergetske efekte, i tako dalje.

Kao “hvatači”, antioksidanti (AH) reaguju sa slobodnim radikalima lipida ($R^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$), nastalim prvenstveno razgradnjom hidroperoksida, svodeći ih na neradikalske proizvode. Tokom ovih reakcija, antioksidanti se takođe prevode u slobodne radikale ($A^{\bullet}$). Ovi slobodni radikali su mnogo manje reaktivni od slobodnih radikala molekula lipida, stoga oni ne mogu da iniciraju stvaranje novih slobodnoradikalskih vrsta. Slobodni radikali antioksidanata reaguju sa drugim slobodnim radikalima

antioksidanata stvarajući dimere ili sa slobodnim radikalima lipida stvarajući kopolimere (*Pokorny i Parkányiová, 2005*). Mehanizam delovanja antioksidanata hvatanjem slobodnih radikala, prikazan je sledećim reakcijama:

$$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet} \quad (2.12)$$

$$RO^{\bullet} + AH^{\bullet} \rightarrow ROH + A^{\bullet} \quad (2.13)$$

$$A^{\bullet} + ROOH \rightarrow AH + ROO^{\bullet} \quad (2.14)$$

$$A^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow \text{ne radikalski produkt} \quad (2.15)$$

$$A^{\bullet} + RH \rightarrow AH + R^{\bullet} \quad (2.16)$$

$$A^{\bullet} + ROOH \rightarrow A^{\bullet} + R^{\bullet} + H_2O \quad (2.17)$$

$$AH + O_2 \rightarrow A^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \quad (2.18)$$

$$AOOR \rightarrow AO^{\bullet} + RO^{\bullet} \quad (2.19)$$

$$A^{\bullet} + O_2 \rightarrow AOO^{\bullet} \quad (2.20)$$

Slika 2.20. Reakcije inhibicije lipidne autooksidacije (*Yanishlieva-Maslarova, 2001*)

Antioksidanti ne mogu da zaustave oksidaciju, mogu samo da je uspore. Tokom oksidacije, antioksidanti se troše. Period spore oksidacije se naziva idukcioni period. Antioksidativna aktivnost može biti određena merenjem dužine indukcionog perioda. Nakon potpune potrošnje antioksidanata, dolazi do nagomilavanja slobodnih radikala i process oksidacije se naglo ubrzava (*Pokorny i Parkányiová, 2005*).

Neka ulja sadrže prirodne antioksidante u dovoljnim količinama da garantuju očekivani rok trajanja proizvoda, dok se u ostala ulja moraju dodati prirodni ili veštački antioksidanti. Prirodni antioksidanti su tokoferoli i tokotrienoli, karotenoidi i fitosteroli (*Pokorny i Parkányiová, 2005*).

Prisustvo antioksidanata (polifenola, tokoferola i tokotrienola) u biljnim uljima je od vitalnog značaja za stabilnost polinezasićenih masnih kiselina prema oksidativnom kvarenju i prema tome, održivosti ulja. Biljna ulja uglavnom sadrže γ- ili α-tokoferol (*Kamal-Eldin, 2005*). Uloga antioksidanata pri eliminisanju slobodnih radikala je da uspore oksidaciju sve dok se antioksidant ne potroši. Oksidacija lipida je uslovljena mnogim faktorima od kojih su najznačajniji vrsta, količina i stepen nezasićenosti masnih kiselina, koncentracija kiseonika, temperatura, svetlost, kao i prisustvo metalnih jona. U prisustvu kiseonika, oksidacija ne može biti ni potpuno zaustavljena niti njen tok promenjen, ali može biti usporena, zaustavljajući nagomilavanje proizvoda

oksidacije do prihvatljivog nivoa. Aktivnost antioksidanata zavisi od njegove koncentracije i prirode medijuma i zahteva posebnu pažnju pri upotrebi, pošto oni takođe mogu delovati kao prooksidansi pod određenim uslovima. Najčešće korišćeni antioksidanti su takozvani skupljači/hvatači slobodnih radikala (*eng*. free radical scavengers), koji uklanjaju reaktivne radikale formirane u početnim fazama autooksidacije (*Scrimgeour, 2005*).

Tokoferoli i tokotrienoli su klasifikovani prema svojoj hemijskoj strukturi na α-, β-, γ-, i δ-tokoferole i tokotrienole. Uopšteno govoreći, tokotrienoli imaju jači antioksidativni efekat na oksidaciju lipida od tokoferola. Antioksidativna aktivnost tokoferola zavisi od temperature i u sledećem je redosledu po aktivnosti: δ > γ > β > α (*Shahidi i Zhong, 2005*). Od svih tokoferola, α-tokoferol ima aktivnost vitamina E, stoga se jedino količina ovog tokoferola uzima u obzir pri određivanju količine vitamina E. Suncokretovo ulje ima vrlo visok sadržaj α-tokoferola (671 mg/kg) u poređenju sa repičinim (180 mg/kg) ili sojinim uljem (116 mg/kg) (*Kamal-Eldin, 2006*). Zbog veoma izraženog antioksidativnog dejstva (prekidanje lanaca), smatra se da je uticaj α-tokoferola u sprečavanju hroničnih bolesti neosporan i njegov efekat je potvrđen. Kod ljudi, nedostatak vitamina E dovodi do nepoželjnih neuromuskularnih promena kao što je na primer anemija. Ono što je veoma značajno je činjenica da se sav višak α-tokoferola unet u organizam izluči preko urina. Ispitivanja su takođe pokazala da γ-tokoferol osim funkcije antioksidanta, ima takođe i dodatne uloge u metabolizmu. Nasuprot α-tokoferolu, γ-tokoferol je snažan nukleofil koji uklanja elektrofilne mutagene u lipofilnim delovima ćelija štiteći ih od raznih oštećenja (*Brigelius-Flohe i Traber, 1999*).

Biljni steroli (fitosteroli) generalno predstavljaju jedinjenja sa najvećim udelom frakcije neosapunjivih materija u biljnim uljima i prisutni su u većini ulja. Sadržaj sterola u biljnim uljima je od 0,03 do 1,0%. Steroli se mogu klasifikovati u tri podgrupe na osnovu broja metil grupa na četvrtom C-atomu, ili, što je mnogo češće, prema položaju dvostruke veze u jezgru sterola (Δ5-steroli i Δ7-steroli). Najviše zastupljeni Δ5-fitosteroli su: kampesterol, stigmasterol i sitosterol, dok su predstavnici Δ7-sterola: Δ7-avenasterol, Δ7-kampesterol, Δ7-sitosterol, Δ7-spinasterol, Δ7-stigmasterol, i Δ7, 22, 25-stigmastatrienol (*Zhang X. et al., 2006).* Mnogobrojnim objavljenim studijama je potvrđeno da su fitosteroli veoma efikasni u snižavanju ukupnog i LDL holesterola.

Glavni mehanizam odgovoran za ovu funkciju sterola je sprečavanje apsorpcije intestinalnog holesterola. Redovno konzumiranje biljnih sterola značajno doprinosi snižavanju ukupnog i LDL holesterola (*Trautwein et al.*, *2003*).

Skvalen je prekusor biosinteze svih steroida, kako u biljnim tako i u životinjskim ćelijama, a nalazi se, sa fitosterolima i tokoferolima, u neosapunjivom delu lipida. Mediteranska ishrana obuhvata široku upotrebu maslinovog ulja koje sadrži značajne količine skvalena. Smatra se da je njegova uloga preventivne prirode i da preventivno deluje protiv razvoja tumora. Istraživanja ove komponente u hrani su malobrojna. *Rayan et al.,* (*2007*) su ispitivali sadržaj i sastav masnih kiselina, tokoferola, fitosterola i skvalena različitih žitarica, uljarica i leguminoza. Nađeno je da tikvino seme (poreklom iz Irske) među ispitivanim uzorcima ima najviši sadržaj skvalena (89 mg/100 g). Međutim, malezijska vrsta tikve sadrži mnogo veće količine skvalena (590,7 mg/100 g) od svih do tada ispitivanih vrsta tikvinog semena (*Nyam et al.*, *2009*).

Karotenoidi i ostali ugljovodonici su žuto-crveni pigmenti prisutni u većini sirovih ulja, iako je njihovo prisustvo često maskirano zelenom bojom koja potiče od hlorofila (*Kamal-Eldin, 2005*). Karotenoidi su veoma značajni u sprečavanju fotooksidacije ulja, posebno u prisustvu hlorofila i deluju kao sekundarni antioksidanti eliminišući "singlet kiseonik". Singlet kiseonik je pobuđeno stanje kiseonika i njegova inaktivacija je efektivan način sprečavanja početka oksidacije lipida. Karotenoidi su sposobni da inaktiviraju ove fotoaktivne čestice tako što fizički apsorbuju njihovu energiju pri čemu se formira pobuđeno stanje karotenoida. U toku fotooksidacije, koja je katalizovana hlorofilom, molekul trostrukog atoma kiseonika, normalno prisutan u vazduhu, se pretvara u singlet kiseonik koji je mnogo reaktivniji. Ovaj singlet kiseonik ima nekoliko stotina puta veću moć oksidacije dvostrukih veza lipida od trostrukog kiseonika. Pigmenti karotenoida pretvaraju singlet kiseonik u njegov mnogo manje aktivan, ozonski oblik (*Pokorny i Parkányiová, 2005*). Karotenoidi mogu takođe da spreče oksidaciju lipida blokiranjem slobodnih radikala u odsustvu singlet kiseonika. Osim toga, karotenoidi su dobri sinergisti tokoferolima. β-karoten, lutein, likopen i isozeaksantin su tipični karotenoidi koji efektivno usporavaju oksidaciju hrane. β-karoten reaguje sa peroksi radikalima proizvodeći manje reaktivne radikale. Ovi stabilizovani radikali ne iniciraju i ne pospešuju lančanu reakciju (*Shahidi i Zhong, 2005*).

Fenoli su prisutni u svim biljnim uljima, ali u različitim koncentracijama, što je veoma važno za oksidativnu stabilnost polinezasićenih masnih kiselina ovih ulja. Najznačajni fenoli su flavonoidi i lignin (*Kamal-Eldin, 2005*). Fenolna jedinjenja imaju veliki uticaj na stabilnost, senzorne i nutritivne karakteristike proizvoda i mogu da spreče njihovu oksidativnu degradaciju inaktivacijom slobodnih radikala. *Siger et al.,* (*2008*) su ispitivali uticaj sadržaja i antioksidativne aktivnosti fenola hladno ceđenog sojinog, suncokretovog, repičinog, kukuruznog ulja, kao i ulja iz semena grožđa, semena konoplje i lana, ljuske pirinča i tikvinog ulja. Najbolje antioksidativne osobine su pokazala ulja konoplje, tikve i repičino ulje, uz najveći ukupni sadržaj fenola detektovanog u ulju tikve i konoplje (2,5 i 2,4 mg/100 g ulja, respektivno).

2.9. Metode izdvajanja (ekstrakcije) ulja iz semenki grožđa

Ulje iz semenke grožđa se može izdvojiti na nekoliko načina. Uobičajen proces izdvajanja ulja iz biljnih semenki sastoji se iz nekoliko faza: čišćenje biomase, sušenje, lomljenje - mlevenje i ceđenje. Prinos ovakvog procesa značajno je porastao primenom mehaničkih ili toplotnih uređaja. Ceđenjem se izdvoji veliki deo ulja iz semena, ali ipak, značajna količina ostaje u finalnoj pogači. Zaostalo ulje se zatim može ekstrahovati različitim metodama ekstrakcije, a najčešće korišćena je konvencionalna metoda ekstrakcije organskim rastvaračima. Pored ove metode, poslednjih godina je veoma popularna metoda ekstrakcije natkritičnim fluidima, čija upotreba je izazvala veliko interesovanje zbog njihovih karakteristika (moć rastvaranja kao kod tečnih rastvarača, neznatan površinski napon, moć transporta čestica kao kod gasova), mogućnosti višestruke upotrebe i zakonske regulative (u vezi sa zaštitom životne sredine) koja podstiče upotrebu takozvanih „zelenih“ rastvarača. Ulje semenki grožđa se uglavnom proizvodi u Francuskoj, Italiji, Španiji, koji su i glavni svetski proizvođači grožđa, ali je u porastu i u ostatku Evrope (*Kamel i Dawson, 1985; Maier et al., 2009*).

Dobijanje ulja iz semenki grožđa uključuje sušenje komine, izdvajanje semenki iz komine, njihovo ceđenje (sa ili bez prethodnog mlevenja) ili ekstrakciju. Na kvalitet izdvojenog ulja najveći uticaj ima kvalitet semenke grožđa. Naime, ostaci koji zaostaju nakon ceđenja grožđa u procesu proizvodnje vina i sokova, pored semenki sadrže delove grožđa koji su vlažni, što ih čini pogodnim za mikrobiološke procese. Pored toga, ostaci nakon ceđenja grožđa sadrže i enzime iz grožđa koji mogu početi sa radom.

Rezultat aktivnosti mikroorganizama i enzima je razvoj neprijatnih aroma koje tokom ekstrakcije prelaze u ulje, jer je ono veoma dobar nosač aromatičnih komponenti. Ovaj proces se dešava veoma brzo, zato je neophodno semenku osušiti i očistiti odmah nakon prerade grožđa. Za samo nekoliko sati od ceđenja grožđa do sušenja ostataka, mogu se pojaviti neprijatne arome koje pretežno sadrže etil-acetat, sirćetnu kiselinu i alkohol, koji nastaju kao rezultat mikrobiološke degradacije. Za razliku od toga, čiste i suve semenke grožđa mogu da se čuvaju dosta dugo bez promene kvaliteta ulja (*Dimić, 2005*). Zbog toga je veoma bitno da, ubrzo nakon izdvajanja soka iz grožđa, ostatak koji se sastoji od komine i semenki bude u što kraćem periodu osušen na propisan način (*Matthäus, 2008*). Oprezno, ali brzo sušenje komine nakon proizvodnje vina je potrebno kako bi se postiglo dobijanje visoko vrednog ulja semenki grožđa, sa karakterističnim mirisom i ukusom, kao i sa visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja (*Bail et al., 2008*). Sušenje semenki grožđa zagrejanim vazduhom pre ekstrakcije daje viši fizičko-hemijski kvalitet, viši sadržaj ukupnih fenolna i stabilnost a manji sadržaj voskova u odnosu na semenke sušene na vazduhu. Proces sušenja takođe utiče na sadržaj sterola (sadržaj je nešto viši), dok na sadržaj masnih kiselina nema uticaja (*Laufenberg et al., 2003; Makris et al., 2007; Pardo et al., 2009*).

Kako se kvalitetno ulje ne može dobiti ukoliko upotrebljeni sirov materijal nije kvalitetan, i kako se tokom prerade kvalitet ulja ne može poboljšati, kvalitet semenke je od izuzetnog značaja.

2.9.1. Ekstrakcija ulja primenom organskih rastvarača

Klasična ekstrakcija se temelji na korišćenju odgovarajućeg rastvarača za uklanjanje rastvornih materija iz unutrašnjosti biljnog tkiva. Izbor optimalnog rastvarača u kombinaciji sa dovoljnim mehaničkim tretmanom poboljšava prenos mase i efikasnost ekstrakcije. Rastvarač koji zadovoljava uslove za ekstrakciju treba da je selektivan (u slučaju ekstrakcije ulja da rastvara triacilglicerole i neke poželjne sastojke ulja – negliceridne komponente kao što su liposolubilni vitamini i neke druge specifične komponente) i treba da ima odgovarajuće toplotne konstantne (da ima nisku tačku ključanja), kako bi se pri toj temperaturi lako odvojile druge komponente, a takođe i da bi se odvojio rastvarač iz ulja. Najčešće korišćen rastvarač za ekstrakciju jestivih ulja iz biljnih sirovina je komercijalni n-heksan, smeša ugljovodonika koja ključa na

temperaturi od 65 – 69 °C. Većina komercijalnih heksana se sastoji od 65 % n-heksana a preostalih 35% je smeša koja se sastoji od ciklopentana i heksanovih izomera (*Kemper, 2005*). Heksanom se ekstrahuje najveći deo ulja prisutan u semenci ili u pogači koja zaostaje nakon procesa ceđenja; ovaj rastvarač je dostupan, jeftin i efikasan u smislu izolovanja ulja (*Mustakas, 1980*). Nakon procesa ekstrakcije neophodno je izdvojiti rastvarač iz ulja, a tokom procesa prerade ulje mora da bude prečišćeno, jer se tokom procesa ekstrakcije u uljnu fazu prenosi mnogo neželjenih komponenti.

Kompletan proces izdvajanja ulja se sastoji iz nekoliko faza:

1. Dezintegracija (mlevenje) semenke;
2. Potapanje samlevene semenke u vodu i zagrevanje uz stalno mešanje do početka izdvajanja ulja;
3. Ceđenje na presama različitog tipa (pužne ili hidraulične);
4. Umesto tačke 2. i 3. može se odmah vršiti ekstrakcija samlevenog semena;
5. Ekstrakcija ulja pogače ili samlevenog semena grožđa organskim rastvaračem – heksanom.

Osnovni cilj ekstrakcije je da se ostvari maksimalno izdvajanje ulja uz minimalan utrošak rastvarača u što kraćem vremenu.

Kod ekstrakcije rastvaračima čitavim nizom faktora utiče se na tok i efikasnost ovog procesa. Kinetika ekstrakcije, to jest, promena brzine ekstrakcije u funkciji vremena, zavisi od mnogobrojnih faktora a najznačajniji su:

- Morfološke karakteristike ćelija u kojima se nalazi ulje (vrsta i veličina ćelija, debljina ćelijskih zidova i slično). Sitne ćelije se mnogo teže razaraju mlevenjem, pa postoji mogućnost da veći deo ovakvih ćelija ostane neoštećen, a kod celih ćelija se proces ekstrakcije odvija kroz ćelijsku membranu. Kada je ćelijska membrana deblja, difuzija je otežana pa se proces ekstrakcije obavlja sporije.
- Strukturno – mehanička svojstva materijala pripremljenog za ekstrakciju (veličina čestica, čvrstina, poroznost i propustljivost sloja). Čestice manjeg prečnika obezbeđuju bolji kontakt materijala i rastvarača, povećava se dodirna površina, skraćuje se put difuzije što sve vodi bržoj ekstrakciji. Međutim, suviše sitne čestice daju više taloga u sirovom ulju, a takođe se smanjuju i drenažna svojstva materijala (dolazi do slepljivanja materijala).

- Uslovi ekstrakcije (vrsta rastvarača (njegova polarnost), temperatura, vreme ekstrakcije, kontakt sa rastvaračem). Povećanjem temperature smanjuje se viskozitet ulja usled čega se povećava i intenzitet difuzije, pa samim tim raste i brzina ekstrakcije. Međutim, visinu temperature određuje i tačka ključanja rastvarača. Sa druge strane, preterano visoka temperatura smanjuje selektivnost rastvarača pa se u sirovom ulju povećava sadržaj primesa. Što se tiče vremena ekstrakcije, u ovom slučaju treba naći modus između stepena iskorišćenja ulja i kvaliteta ulja. Poslednje količine ulja se veoma sporo izdvajaju a pri tome su pune primesa – fosfatidi, steroli i tako dalje, što stvara teškoće u daljoj preradi. Kontakt sa rastvaračem zavisi od: procenta ulja u materijalu; procenta ulja u rastvaraču; načina kretanja rastvarača kroz masu i smera kretanja toka materijala i rastvarača.
- Sadržaj vlage u materijalu. U mebranama vlažnog semena ima više vlage, a budući da su rastvori lipida u organskim rastvaračima hidrofobni, njihov prolaz kroz vlažne membrane će biti otežan (*Rac, 1964; Dimić i Turkulov, 2000; Kemper, 2005*).

Nakon završenog postupka ekstrakcije, heksan iz miscele (ulje rastvoreno u n-heksanu) se uklanja frakcionom destilacijom. Pre nego što se podvrgne postupku odvajanja rastvarača, miscela se najpre prečišćava od mehaničkih nečistoća (taloženjem, sistemom sita, centrifugiranjem, filtracijom). Ulje je moguće prečistiti od mehaničkih nečistoća i nakon odvajanja rastvarača, ali se to ipak ne radi jer prisustvo nečistoća otežava rad kolone za destilaciju, što dovodi do prevelikih gubitaka ulja, koje ostaje u nečistoćama ako se dobro ne isperu (*Swern, 1972*). Kako n-heksan ima veoma nisku tačku ključanja, ova komponenta iz rastvora ključa prva i prevodi se u paru, koja dalje odlazi u kondenzator, kondenzuje se i izdvaja, ostavljajući za sobom sirovo ulje. Sirova ulja osim triacilglicerola sadrže i razne druge prirodne prateće komponente (vodu, fosfolipide, sluzne materije, bojene materije, voskove, zatim produkte oksidacije, oksidativne ili termičke polimerizacije, kondenzacije odnosno degradacije ulja: hidroperoskide, perokside, aldehide, ketone, polimere, kao i produkte nastale hidrolitičkom razgradnjom triacilglicerola: slobodne masne kiseline, mono-, di– acilglicerole, glicerol i tako dalje) (*Dimić, 2005*). Neke od ovih komponenti su veoma poželjne (vitamini, steroli, fenolna jedinjenja) i treba ih maksimalno sačuvati, dok sa

druge strane nepoželjne sastojke (sluzne materije, produkte oksidacije, razgradne produkte, voskove, nosioce raznih neprijatnih mirisa i ukusa) treba ukloniti iz ulja. Uklanjanje ovih nepoželjnih prirodnih pratećih komponenti kao i drugih nepoželjnih komponenti (ostaci pesticida, herbicida, teški metali, policiklični aromatični ugljovodonici i drugo) koje su na neki način dospele u ulje, vrši se procesom rafinacije (*Rac, 1964; Swern, 1972; Dimić, 2005*).

Metod ekstrakcije organskim rastvaračima je veoma koristan sa ekonomske tačke gledišta jer daje dobar randman ulja a sama semenka grožđa kao sirovina sadrži malu količinu ulja u poređenju sa ostalim najčešće korišćenim uljaricama, i zato je ekstrakcija organskim ratsvaračima veoma efikasna (*Matthäus, 2008*), ali s druge strane ovaj postupak je veoma dugotrajan.

U novije vreme se intenzivno povećava upotreba nekih drugih, ekoloških rastvarača za ekstrakciju, kao što su alkoholi (etanol ili izopropanol) i natkritični ugljenik(IV)-oksid (*Dunnuck, 1991*). Alternativni rastvarači su obično manje efikasni zbog smanjenog molekularnog afiniteta između rastvarača i supstance. Osim toga, njihova primena se do sada karakteriše većim troškovima samog procesa i visokom cenom rastvarača (izuzev ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom).

2.9.1.1. Primena ultrazvuka u ekstrakciji

Primena ultrazvuka u ekstrakciji je dospela u centar pažnje kao jedna od metoda koja u manjoj meri utiče na kvalitet hrane i njen nutritivni sastav, što i jeste sve izraženiji zahtev u prehrambenoj industriji zadnjih godina. Mogućnost primene ultrazvuka u ekstrakciji različitih komponenti iz biljnih materijala je jako široka i zadnjih godina je objavljen veliki broj radova na ovu temu. Objavljeni su radovi na temu primene ultrazvuka u ekstrakciji biljnih ekstrakata, ulja, proteina, biološki aktivnih komponenti (kao što su fenolna jedinjenja) i dokazano je višestruko pozitivno dejstvo ultrazvuka na ekstrakciju. Samim tim prepoznata je mogućnost industrijske primene ultrazvuka u fito-farmaceutskoj i prehrambenoj industriji za ekstrakciju veoma širokog opsega komponenti iz biljnih materijala *(Vilkhu et al., 2008)*.

Ultrazvuk podrazumeva upotrebu zvuka visokog intenziteta i fekvencije i njihovu interakciju sa materijalima (*Luque-Garcia i De Castro, 2003*). Pogodna je metoda kod ekstrakcije neisparljivih i poluisparljivih organskih jedinjenja iz čvrste faze. Osnovna

dejstva ultrazvučnih talasa klasifikuju se kao fizička, hemijska i biološka. Fizička dejstva se ogledaju u generisanju toplote u tkivu i pojavi kavitacionih mehura što dovodi do poboljšanja procesa ekstrakcije. Usled širenja ultrazvučnih talasa kroz medijum dolazi do pojave kavitacionih fenomena i nekih mehaničkih efekata koji pospešuju proces ekstrakcije (*Rostango et al., 2003; Chemat et al., 2004; Vilkhu et al., 2008*). Akustične kavitacije mogu razoriti ćelijski zid olakšavajući prodiranje rastvarača u biljni materijal i otpuštanje intracelularnog sadržaja. Mehanički efekti prouzrokovani ultrazvukom mogu pospešiti iskorišćenje rastvarača u toku ekstrakcije, tako što povećavaju kontaktnu površinu između rastvarača i željene komponente omogućavajući bolje prodiranje rastvarača u uzorak koji se ekstrahuje (*Zhang Zh-Sh. et al., 2008; Kowalski i Wawrzykowski, 2009; Shalamashi, 2009*). Primena zvuka visokog intenziteta u tečnom medijumu rezultira ciklusima visokog pritiska (kompresija) i niskog pritiska (ekspanzija), u zavisnosti od frekvencije. Tokom ciklusa niskog pritiska, intenzivni ultrazvučni talasi u interakciji sa tečnim medijumom stvaraju male mehure vakuuma u tečnosti. Mehurići rastu i kada postignu volumen na kome se više ne može absorbovati energija oni se naprasno raspadaju tokom ciklusa visokog pritiska. Ova implozija mehura oslobađa visok pritisak što dovodi do razaranja ćelisjkih zidova biljnih ćelija pa se dešavaju i mikroturbulencije, visoke brzine udara na mikročestice i premeštanje biomase unutar mikroporoznih čestica što ubrzava vrtložnu difuziju i unutrašnju difuziju.

Slika 2.21. Različiti tipovi ultrazvučnih kupatila (ili kada)

Posledično razaranje ćelijskih zidova dovodi do razaranja tkiva, ljuštenja, erozije i raspada čestica. Razaranje tkiva povećava kontaktnu površinu čvrsto - tečno i prenos mase postaje intenzivniji na ili u blizini zidova biljnih ćelija ili na graničnoj površini.

Ovaj efekat omogućava izloženost novonastalih površina daljem porastu prenosa mase. Na ovaj način se ubrzava proces ekstrakcije a smanjuje količina zaostalog ulja u presnom kolaču a svakako, to znači i povećan prinos ulja, što je i cilj (*Vinatoru, 2001; Veličković, 2007*). Najniža ultrazvučna frekvencija je prihvaćena kao 20 kHz. Ceo proces kavitacije lokalno traje oko 400 milisekundi (*Luque-Garcia i De Castro, 2003*).

Ultrazvuk visokog inteziteta, upravo zbog činjenice da može ubrzati prenos toplote i mase, primenjuje se sve više u različitim procesuiranjima hrane (sušenje, mešanje, ekstrakcija, homogenizacija), poboljšavajući ih. Da bi se postigao maksimum efikasnosti ekstrakcije neophodno je da se strogo poštuje procedura metode (uključujući i uputstva proizvođača).

Najznačajnije hemijsko dejstvo ultrazvučnih talasa je depolarizacija velikih molekula, naročito molekula belančevina i nešto manje DNK. Takođe se intenziviraju oksido-redukcioni procesi.

Biološka dejstva ultrazvuka su najznačajnija i brojna, zabeležene su promene propustljivosti ćelijskih membrana, pH sredine, kretanja jona, koncentracije bioaktivnih supstanci, kao i promene aktivnosti enzima i stvaranja slobodnih radikala.

Dakle, glavne prednosti primene ultrazvuka su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjenje potrošnje rastvarača (*Wu et al., 2001*), uz veoma dobar esktrakcioni prinos. Nedavno je pokazano da je ekstrakcioni prinos postignut primenom ultrazvuka bio sličan onom kod ekstrakcije po Soxhletu (*Da Porto et al., 2013*) i dodatno, ultrazvučna ekstrakcija se može vršiti na nižim temperaturama, čime se mogu izbeći termička oštećenja ekstrakta i gubici bioaktivnih komponenti (*Vilkhu et al., 2008*).

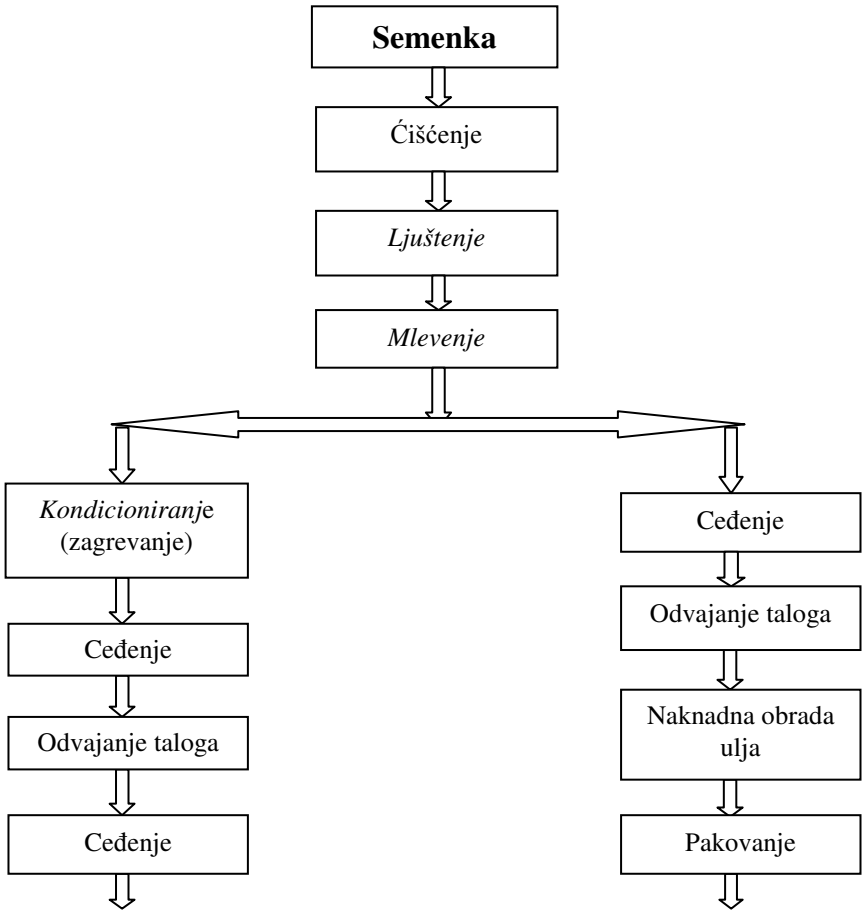
2.9.2. Izdvajanje ulja mehaničkim putem

Na osnovu "Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarine i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode" (2013), razlikuju se sledeće vrste jestivih nerafinisanih biljnih ulja:

"*Hladno presovano jestivo biljno ulje* proizvodi se mehaničkim postupkom, presovanjem, odnosno konačnim presovanjem, bez zagrevanja. U toku proizvodnje moraju se sačuvati prirodni sastojci ulja u nepromenjenom obliku. Hladno presovano jestivo biljno ulje može se prečišćavati isključivo taloženjem, filtracijom, centrifugiranjem i pranjem vodom".

"*Devičansko jestivo biljno ulje* proizvodi se mehaničkim postupkom, presovanjem odnosno konačnim presovanjem. Pri izdvajanju ulja dozvoljeno je zagrevanje materijala za presovanje (kondicioniranje). U toku proizvodnje moraju se sačuvati prirodni sastojci ulja. Devičansko jestivo biljno ulje može se prečišćavati isključivo taloženjem, filtracijom, centrifugiranjem i pranjem vodom".

Shodno definicijama jestivih nerafinisanih ulja, na slici 2.22 je dat prikaz tehnološkog procesa proizvodnje ovih ulja.



Slika 2.22. Blok šema proizvodnje jestivih nerafinisanih ulja iz semenki uljarica (*Dimić, 2005*)

Iako se na bazi prikazane tehnološke šeme čini da je proces proizvodnje hladno ceđenih ulja "relativno jednostavan", postoji veliki broj faktora koji utiče na kvalitet proizvodenog ulja.

Tehnološki proces proizvodnje jestivih nerafinisanih ulja u osnovi obuhvata dve osnovne faze:

- Pripremu sirovine za izdvajanje ulja;

- Izdvajanje ulja mehaničkim putem.

Izdvajanje ulja treba prilagoditi karakteristikama polaznih sirovina. Priprema obuhvata čišćenje, ljuštenje, mlevenje i hidrotermičku obradu, međutim u zavisnosti od vrste sirovine na ceđenje može ići materijal i bez ljuštenja, mlevenja i hidrotermičke obrade (*Dimić, 2005*).

Ceđenje je tehnološki postupak u toku kojeg se iz pripremljenih semenki, mehaničkim putem, primenom pritiska, izdvaja (cedi) ulje. Ceđenje može da se obavlja na pužnim ili hidrauličnim presama. Danas su u najširoj primeni pužne prese, dok se hidraulične prese pretežno koriste pri proizvodnji maslinovog ulja i ulja iz semenki tikve (*Rac, 1964; Dimić, 2005*).

Najvažniji faktori koji utiču na efikasnost ceđenja su:

- vrsta i karakteristike sirovine;
- priprema materijala za ceđenje; granulometrijski sastav, udeo zaostale ljuske i uslovi kondicioniranja. Kondicioniranjem u funkciji temperature, sadržaja, vlage i dužine trajanja procesa može se uticati na plastična svojstva materijala i viskozitet ulja;
- konstrukcija i snaga prese;
- uslovi, odnosno parametri ceđenja: pritisak, temperatura, dužina procesa, sadržaj vlage ulaznog materijala, sadržaj ulja u pogači i drugo (*Dimić, 2005*).

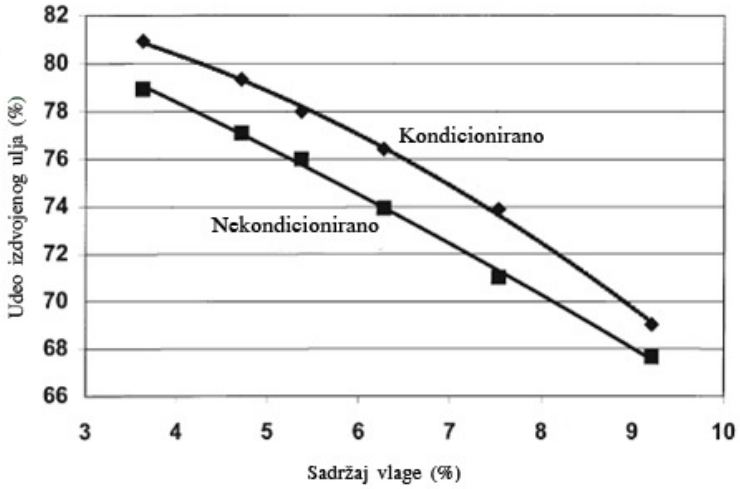
Efikasnost ceđenja u prvom redu zavisi od vrste sirovine, odnosno sadržaja ulja i karakteristika polaznog materijala. Ne postoji univerzalna presa za sve vrste sirovina, većina presa je prema preporuci proizvođača predviđena za ceđenje 6 – 8 vrsta sirovina.

Veoma bitan faktor koji utiče na efikasnot ceđenja i na sadržaj zaostalog ulja u pogači je snaga prese; sa povećanjem snage prese značajno se smanjuje sadržaj zaostalog ulja u pogači (*Dimić, 2005*).

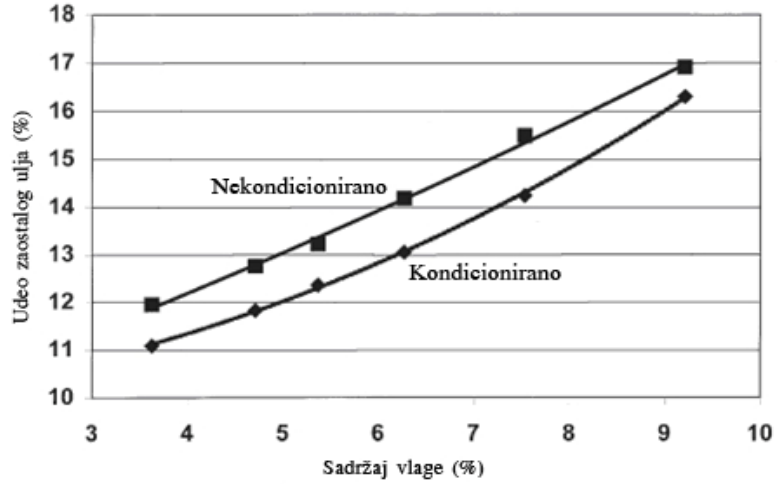
Takođe, jedan od najvažnijih faktora koji utiče na efikasnost ceđenja je i sadržaj vlage u sirovini. Stalna kontrola sadržaja vlage u procesu ceđenja je od izuzetnog značaja, jer vlaga neposredno utiče kako na kapacitet prese i sadržaj zaostalog ulja u pogači, tako i na kvalitet ceđenog ulja. Veoma mala odstupanja sadržaja vlage u materijalu za ceđenje, daju velika odstupanja u sadržaju zaostalog ulja.

Prema rezultatima koje su objavili *Singh K.K. et al.* (*2002*), hidrotermička obrada, kao i sadržaj vlage semenki *Crambe abyssinica* bitno su uticali na udeo izdvojenog ulja

(Slike 2.23 i 2.24). Kondicioniranje materijala je vršeno pri temperaturi od 100 °C tokom 10 minuta uz dodatak vodene pare, dok je ceđenje izvršeno na pužnoj presi Komet (Model S 87G; IBG Monforts, Nemačka) (*Singh K.K. et al., 2002*).



Slika 2.23. Odnos sadržaja vlage i količine izdvojenog ulja pri ceđenju semenke *Crambe abyssinica* na pužnoj presi sa i bez hidrotermičke obrade (*Singh K.K. et al., 2002*)



Slika 2.24. Odnos sadržaja vlage i količine zaostalog ulja u pogači pri ceđenju semenke *Crambe abyssinica* na pužnoj presi sa i bez hidrotermičke obrade (*Singh K.K. et al., 2002*)

Pri ceđenju vlaženog a zatim osušenog semena lana na pužnoj presi, udeo izdvojenog ulja se povećao sa 78% na 88% pri promeni sadržaja vlage sa 5% na 7%, daljim povećanjem sadržaja vlage na 9%, udeo izdvojenog ulja se smanjio na 76%. Objašnjenje ovih trendova je da veći sadržaj vlage povećava plastičnost materijala usled čega se smanjuje nivo kompresije što se ogleda u slabijem izdvajanju ulja (*Singh i*

Bargale, 1990). Prema drugom objašnjenju vlaga deluje kao "mazivo" te njen veći sadržaj ne obezbeđuje dovoljno trenje tokom ceđenja (*Singh K.K. et al., 2002*). Prema nekim autorima, optimalan sadržaj vlage za ceđenje semenki suncokreta na hidrauličnoj presi je 6% (*Singh M.S. et al., 1984*).

Prednosti primene ove metode izdavajanja ulja u odnosu sa ekstrakciju solventom su sledeći:

- dobijanje čistijeg proizvoda, bez prisustva organskog rastvarača,
- dobijanje ulja sa svojom izvornom bojom i izvornim ukusom,
- dobijanje ulja koje zadržava svoju hranljivu vrednost,
- nema dodavanja aditiva u ulje.

Nedostaci su:

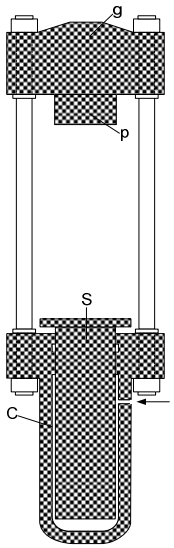
- mali prinos ulja koji je kod ovog postupka manji nego kod metode ekstrakcije rastvaračem,
- kraći rok trajanja ulja, s obzirom da nema dodataka aditiva,
- s obzirom na krajnji mali prinos ulja, proizvod je skuplji za krajnjeg potrošača,
- tokom ceđenja se stvara velika količina toplote kao rezultat trenja što može uništiti neka svojstva ulja (zbog toga, mnoge kompanije ugrađuju u prese sistem za hlađenje što povećava troškove),
- proizvodnja je teža jer proizvođač mora voditi računa o kvalitetu sirovine.

2.9.2.1. Hidraulične prese

Hidraulične prese predstavljaju najstarije uređaje u proizvodnji jestivih ulja. Prvu hidrauličnu presu za izdvajanje ulja je izumeo Bramah 1795.god. u Engleskoj (*Kemper, 2005*). Njihova primena je međutim sve ređa i danas se isključivo koriste za proizvodnju maslinovog ulja (*Firestone et al., 1996; Kemper, 2005*) i ulja semena tikve (*Rac, 1964*).

Prema načinu punjenja materijala postoje: a) otvorene i b) zatvorene prese. Kod otvorenih presa materijal se puni u tekstilne vreće koje se slažu jedna na drugu, a između dve vreće se stavlja čelična ploča. Kod zatvorenih presa, između dve glave se nalazi porozni cilindar (koš) u koji se puni material za ceđenje. Unutar cilindra materijal se ravnomerno raspoređuje na situ u tankom sloju, a zatim se stavlja čelična ploča,

ponovo materijal i čelična ploča i tako naizmenično (*Dimić, 2005*). Na slici 2.25 je prikazana šema hidraulične prese.



Slika 2.25. Šema hidraulične prese - pritisni cilindar (C), klip (S) i glava prese (g) sa protivklipom (p)

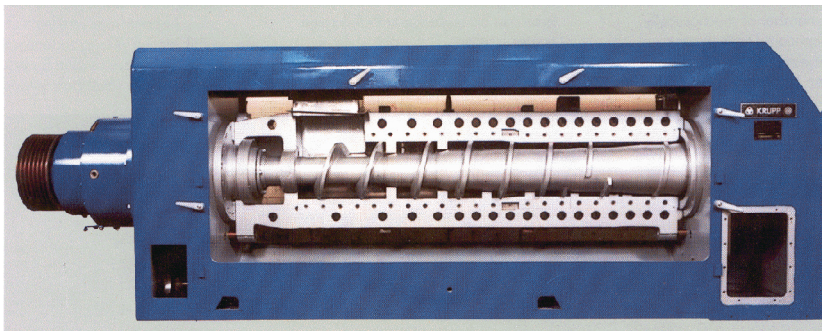
Pritisak se kod svih vrsta hidrauličnih presa ostvaruje pomoću dvo- i više- stepenih pumpi. Zavisno od konstrukcije prese može se postići pritisak od 300 do 360 bara (*Rac, 1964; Dimić, 2005*), mada postoje i hidraulične prese manjih kapaciteta kod kojih se može postići pritisak i preko 600 bara. Rad sa hidrauličnim presama je diskontinualan, a potrebni su i pomoćni uređaju kao što su: uređaj za zagrevanje materijala pre ceđenja, uređaj za punjenje i pražnjenje cilindra, kolica i tako dalje, a osim toga potrebno je i mnogo manuelnog rada (*Dimić, 2005*).

2.9.2.2. Pužne prese

Pužne prese danas praktično predstavljaju najznačajnije aparature za izdvajanje jestivih nerafinisanih ulja. Prvu mehaničku pužnu presu je izumeo Valerius D. Anderson 1900. godine u Klivlendu (Ohajo, SAD) (*Kemper, 2005*).

Kontinualne pužne prese (Slika 2.26) su u osnovi pužni transporteri sa promenljivom zapreminom za materijal, čime se može menjati radni pritisak duž prese i kompenzovati gubitak pritiska usled isticanja ceđenog ulja. Glavni elementi ovih presa su: vodoravni puž, koš koji se nalazi oko puža, uređaj za punjenje i doziranje materijala, uređaj za regulaciju debljine pogače, zupčasti prenosnik i kućište prese. Princip rada se

zasniva na tome da puž gura materijal iz većeg u manji zatvoreni prostor, ovo izaziva sabijanje materijala usled čega dolazi do porasta pritiska i izdvajanja ulja. Regulacija debljine pogače u presi postiže se odgovarajućom konstrukcijom izlaznog konusa, a preko različite debljine pogače se reguliše radni pritisak (*Rac, 1964; Dimić, 2005*). Stepen efikasnosti kontinualnih pužnih presa koje rade kao pretprese je oko 50 do 60% u odnosu na sadržaj ulja, a kod završnih presa može da iznosi čak 80 - 90% (*Dimić i Turkulov, 2000*). Trenje u materijalu i presi je jako veliko pa se neminovno javlja i porast temperature. Visoka trenja mogu da povise temperaturu i do 170°C. Uobičajene temperature pretpresa velikih kapaciteta u industrijskim sistemima su oko 100°C (*Bockisch, 1998*).



Slika 2.26. Kontinualna pužna presa

Pri proizvodnji hladno ceđenih ulja visina temperature ulja koje napušta presu je izuzetno bitna. Prema podacima iz literature, temperatura ulja koje napušta presu ne bi smela da bude viša od 50°C (*De Panfilis et al., 1998*). Da bi se to postiglo potrebne su prese posebnih konstrukcija ili se ceđenje mora obaviti pri blažim uslovima, to jest, pri nižim pritiscima. U tom slučaju sadržaj zaostalog ulja u pogači je po pravilu veći, odnosno prinos ulja je manji.

Pored standardnih pužnih presa sa jednim pužem, postoje i prese koje su konstruisane sa dva puža, takozvane "twin screw presses". *Isobe et al.* (*1992*), su na ovakvoj presi cedili oljuštene semenke suncokreta i dobili iskorišćenje od 93,6%, pri tome, sadržaj vlage u semenkama je bio 6%, a semenke prethodno nisu bile podvrgnute mlevenju, to jest, kondicioniranju.

2.9.2.3. Proizvodnja hladno ceđenog ulja iz semenki grožđa

Zbog relativno malog sadržaja ulja, primena ekstrakcije organskim rastvaračima je daleko efiksnija od hladnog ceđenja. Ipak, ceđenje pužnim i hidrauličnim presama se i dalje vrši. Ukoliko se za ceđenje koristi pužna presa, mora se voditi računa da ona bude odgovarajuće snage - jačine i specijalne konstrukcije. Naime, zbog velike čvrstine ljuske masa se lako zaguši (zapeče) u delovima prese, a zbog velikog udela ljuske ulje može da se apsorbuje (i time izgubi) u ljusci. Ukoliko se koristi hidraulična presa suvo seme se uz dodatak vode fino samelje, u dobijenu masu se ponovo dodaje voda i uz stalno mešanje se zagreva - kuva dok se ne opazi izdvajanje ulja. Masa se tada sipa u vreće i presuje na hidrauličnoj presi (*Dimić, 2005*). Ovako dobijeno ulje ima vinsku i voćnu aromu i ukus i uglavnom se primenjuju za pripremu salata.

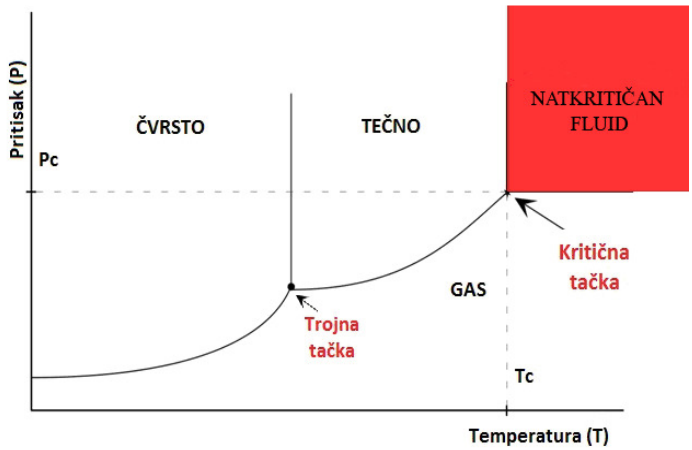
U Francuskoj se semenke grožđa prethodno ljušte, a zatim se hladno presuju. Ljuštenje semenki je dugo bio tehnički nerešiv problem, što se objašnjava specifičnom građom semenjače. Vremenom je taj problem rešen i zaštićen patentom (Dimić, 2005). Postupak se bazira na tome da se semenke pre ljuštenja dovedu do određenog sadržaja vlage, a zatim se ljušte na ljuštilici. Mešavina ljuske i jezgra odlazi na vibraciona sita, odakle se ljuska aspirira, a jezgro se zatim suši u rotacionoj sušnici. Nakon sušenja jezgro se melje i hladno presuje, pri čemu se dobija zlatno-žuto-zelenkasto obojeno ulje. Ulje se oslobađa taloga i obrađuje toplom vodom da bi se oslobodilo sluznih materija (proces degumiranja). Ovo ulje je skoro bez mirisa i predstavlja kavalitetno jestivo ulje. Iskorišćenje pri ceđenju na ovaj način je 50 - 60% od ukupno prisutnog ulja (Dimić, 2005).

Tokom procesa ceđenja, samo mala količina fenolnih jedinjenja dospe u ulje (0,01 mg/g), dok većina ovih nutritivno interesantnih jedinjenja zaostaje nakon ceđenja u pogači, u kojoj je sadržaj fenolnih jedinjenja oko 2000 puta veći u odnosu na ulje (Matthäus, 2008).

2.9.3. Natkritična ekstrakcija

Ekstrakcija gasovima u tečnom i natrkritičnom stanju je relativno nova tehnika koja je poslednjih godina našla široku primenu u hemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Natkritična ekstrakcija je postupak u kome se kao rastvarač koristi natkritičan fluid. Natkritičnim fluidom se naziva svaka materija koja se nalazi u natkritičnom

stanju, odnosno u oblasti iznad svoje kritične tačke. Kritična tačka je skup uslova pod kojim tečnost i njena para postaju iste. Za svaku supstancu, kritična tačka je na faznom dijagramu definisana: kritičnom temperaturom, kritičnim pritiskom i kritičnom gustinom. U natkritičnom stanju, odnosno, iznad kritične temperature (Tc) i kritičnog pritiska (Pc), ne postoje razlike između faza. Natkritični fluid nema definisano stanje; predstavlja novu homogenu fazu nastalu kada nestane razlika između tečne i gasovite faze. Fizičke osobine natkritičnih fluida se nalaze između vrednosti istih osobina gasova i tečnosti i upravo to ih čini pogodnim rastvaračima (*Žižović, 2009*).



Slika 2.27. Dijagram zavisnosti pritiska i temperature za čiste komponente

Ekstrakcija natkritičnim fluidima se temelji na činjenici da se blizu kritične tačke rastvarača, njegova svojstva menjaju naglo samo sa malim varijacijama pritiska i/ili temperature, a samim tim, sa promenama ovih parametara, varira i rastvorljivost komponente u natkritičnom fluidu (*Ghaderi, 2000*). Naime, fluidi u natkritičnom stanju imaju znatno veću rastvorljivost i stepen selektivnosti procesa je veći nego kod primene klasičnih tečnih rastvarača u ekstrakciji. Fizičko-hemijska svojstva natkritičnog fluida mogu značajno oscilirati bez promene molekulske strukture materije (*Sovilj, 2004*).

Natkritični fluid je vrlo stišljiv, sa visokom gustinom koja je nalik tečnosti i transportnim svojstvima koja su nalik gasu (niska dinamička viskoznost, bliska gasovima i vrlo nizak površinski napon). Uz to, koeficijent difuzije je blizak gasovima, čak oko 100 puta veći nego kod običnih tečnosti (*Sovilj, 2004*). Visoka gustina natkritičnog fluida doprinosi većoj rastvorljivosti jedinjenja, dok niska viskoznost omogućava prodiranje fluida u čvrste materije i protok uz manje trenja. Promene pritiska ili temperature u blizini kritične tačke mogu uveliko menjati gustinu, a kako je

snaga rastvaranja u natkritičnoj regiji direktna funkcija gustine, promena pritiska i temperature menjaće rastvornu moć natkritičnog fluida. Konkretno, moć rastvaranja natkritičnog fluida raste sa gustinom na datoj temperaturi i obrnuto, raste sa temperaturom na datoj gustini. Sve ovo zajedno omogućava lako prodiranje fluida u mikroporozni materijal rastvorka i njegovo rastvaranje pri promeni temperature, odnosno, pritiska. To kao posledicu ima značajno povećanje brzine ekstrakcije i povećanje razdvajanja faza (stepena separacije) u poređenju sa ekstrakcijom organskim rastvaračem (*Žižović et al., 2007*).

Pri normalnim uslovima (25°C i 1 bar) rastvorljivost isparljivih jedinjenja u gasu je direktno povezana sa njihovim naponom pare i obično je neznatna. Takođe, rastvorljivost je rezultat interakcija između rastvorka i rastvarača. Posledica toga je složena zavisnost rastvorljivosti čvrstih rastvoraka u natkritičnom fluidu od pritiska. Rastvaranje se može fino podešavati promenom pritiska i/ili temperature, u rasponu od idealnog gasa do gotovo čiste tečnosti.

Rastvorljivost isparljivih jedinjenja u natkritičnom fluidu je veća nego u idealnom gasu, ali se često, radi smanjenja zahteva postupaka, dodatno povećava. To se može postići dodatkom polarnih supstanci, takozvanih kosolvenata (u malim udelima od 5 do 20%), čija je isparljivost uglavnom u opsegu između isparljivosti natkritičnog fluida i rastvorka i koji se dodaju kako bi se povećala isparljivost polarnijih supstanci. Kosolventi interaguju sa rastvorkom i na taj način menjaju njegovu rastvorljivost u natkritičnom fluidu. U prehrambenoj industriji najčešće korišćeni kosolventi za ekstrakciju polarnih komponenti su etanol i voda (*Skala et al., 2002*).

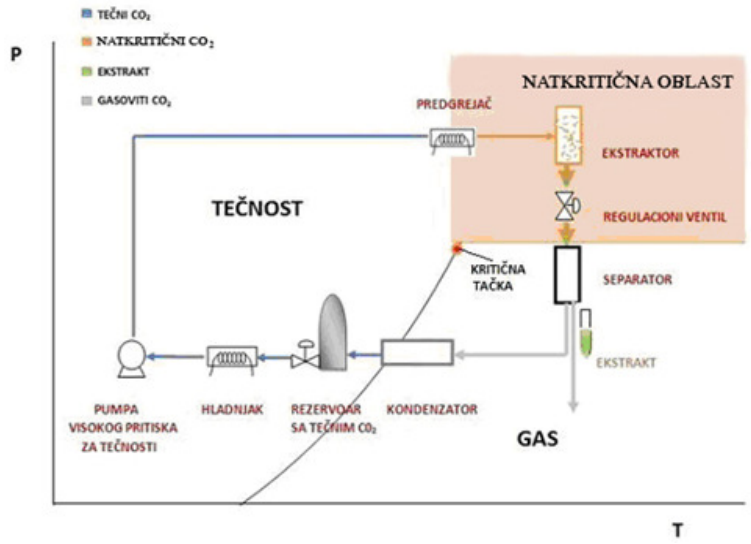
Raspon gustina većine natkritičnih fluida je 0,1 do 0,9 g/mL pri normalnim radnim pritiscima (75 - 450 bar). Najkorisnija oblast ekstrakcije je regija u kojoj je redukovani pritisak ($P_R = P / P_C$) u rasponu 1,01 do 1,5 i redukovana temperatura ($T_R = T / T_C$) u rasponu od 1,01 do 1,1 (*Ghaderi, 2000*).

Za uspešnu ekstrakciju u obzir se ne uzimaju samo rastvorljivost jedinjenja od interesa i/ili neželjenih jedinjenja već i otpor prenosu mase kroz strukturu sirovog materijala, kao i specifična lokacija komponente koja se ekstrahuje. U ovom smislu bitne mogu biti i informacije o veličlini čestica i vreme zadržavanja rastvarača (*Reverchon i De Marco, 2006*) . Materijal koji se podvrgava ekstrakciji mora biti usitnjen do određenog stepena, jer od veličine čestica zavisi efikasnost i brzina

ekstrakcije. Smanjenjem veličina čestica povećava se njihova specifična površina, odnosno međufazna površina čvrsto-tečno, smanjuje se put koji rastvorak prelazi, što povećava brzinu ekstrakcije. Sa druge strane, ukoliko je materijal previše usitnjen, dolazi do kanalisanja u pakovanom sloju, sprečena je kvalitetna cirkulacija tečnosti, pri čemu je kontakt između tečnosti (rastvarača) i čvrstih čestica (rastvorka) redukovan (*Lepojević, 2000*). Ovaj način ekstrakcije je naročito pogodan za izolaciju supstanci srednjih molekulskih masa i relativno male polarnosti. Osnovna prednost u odnosu na druge načine separacije je što se izvodi na umerenim temperaturama, pa se može primeniti za separaciju slabo isparljivih i termički degradibilnih jedinjenja (*Skala et al., 2002*).

2.9.3.1. Osnovni principi procesa natkritične ekstrakcije

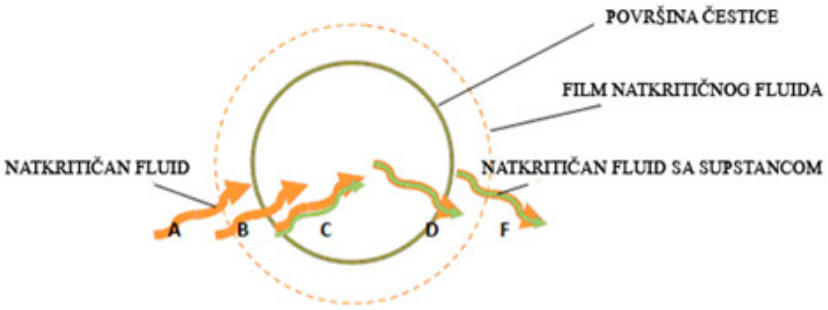
Uopšteno, u postupku natkritične ekstrakcije ekstraktor se puni čvrstim materijalima. Natkritični fluid se u ekstraktor dovodi preko pumpi visokog pritiska. Najpre se rastvarač provodi kroz hladnjak, čime se održava njegovo tečno stanje, a zatim se nakon prolaska kroz pumpu odvodi do razmenjivača toplote. Na ovaj način, usled povišenog pritiska i temperature, fluid se prevodi u natkritično stanje i potom se transportuje do ekstraktora sa supstancom koja se tretira, gde rastvara rastvorne komponente i dalje ih nosi sa sobom. Potom se ventilom za regulaciju pritiska vrši smanjivanje pritiska i natkritični fluid sa ekstrahovanim komponentama se uvodi u separator. Usled pada temperature i pritiska, u separatoru fluid se prevodi u gas i izdvaja se ekstrakt. Na uslovima sniženog pritiska i temperature, opada moć rastvaranja fluida, on se prevodi u gas i odvajanje od ekstrakta se jednostavno vrši. Kao što se vidi na slici 2.28, gasoviti rastvarač se može otpustiti u atmosferu, ili se može odvoditi dalje u kondenzator radi njegove recirkulacije i ponovne upotrebe. Dakle, ekstrakcija se obavlja u natkritičnoj oblasti a proces separacije u uslovima pritiska i temperature koja odgovara gasnom stanju rastvarača. U slučaju tečnog materijala, ekstraktor je modifikovan u kolonu kroz koju se materijal i natkritični fluid ispuštaju simultano ili istovremeno (suprotnostrujna kolona), a može biti i polušaržno.



Slika 2.28. Šematski prikaz procesa natkritične ekstrakcije

Na nivou čestice, ekstrakcija rastvorljive supstance natkritičnim fluidom obuhvata sledećih pet faza (Slika 2.29):

1. difuziju natkritičnog fluida do površine čestice, kroz film fluida koji je okružuje,
2. prodiranje i difuziju natkritičnog fluida u unutrašnjost čestice,
3. kontakt natkritičnog fluida sa rastvorljivom supstancom i njeno rastvaranje u fluidu,
4. difuziju natkritičnog fluida sa rastvorenom supstancom kroz česticu na njenu spoljnu površinu i
5. difuziju natkritičnog fluida sa rastvorenom supstancom, sa površine čestice kroz film natkritičnog fluida koji okružuje česticu.



Slika 2.29. Difuzija natkritičnog fluida kroz česticu i ekstrakcija rastvorljive supstance

2.9.3.2. Prednost i nedostaci natkritične nad klasičnim metodama ekstrakcije

U savremenoj prehrambenoj industriji organski rastvarači imaju mnoge primene. Međutim, oni ostaju u tragovima u finalnom proizvodu, što je vrlo nepoželjno, s obzirom na njihovu toksičnost. Ujedno, njihova upotreba i odlaganje doprinose zagađenju životne sredine. Zbog toga su razvijene alternativne metode procesiranja koje isključuju upotrebu ovih toksičnih materija a među njima je svakako, i natrkritična ekstrakcija.

U nastavku su date neke od prednosti i nedostataka ovog procesa u poređenju sa ekstrakcijom pomoću konvencionalnih rastvarača (*Lang i Wai, 2001; Sovilj, 2004; Norhuda i Jusoff, 2009; Sahena et al., 2009; Mićić et al., 2011*). Prednosti su:

- moć rastvaranja (natkritičnog fluida) je pod kontrolom pritiska i/ili temperature. Ovo je korisno za ekstrakciju kompleksnih uzoraka kao što su biljni materijali;
- natrkritični fluid se jednostavno uklanja iz ekstrakta, zbog čega se može eliminisati proces koncentrisanja uzorka;
- natkritični rastvarači su netoksični, ne ostavljaju štetne ostatke;
- termolabilna jedinjenja mogu biti ekstrahovana uz minimalna oštećenja, zbog rada na niskim radnim temperaturama;
- mnoge nepoželjne reakcije kao što su hidroliza, oksidacija, degradacija i preraspodela mogu se efikasno izbeći zbog rada na niskim temperaturama;
- nema upotrebe organskog rastvarača ili se upotrebljava u vrlo malim količinama;
- natkritični fluid ima relativno nisku viskoznost i visoku difuzivnost (reda veličine 10^{-4} cm^2s^{-1}, u poređenju sa 10^{-5} cm^2s^{-1} kod tečnih rastvarača), tako da može prodreti u porozni materijal efektivnije nego tečni rastvarač, pa je transfer mase brži i brža je ekstrakcija;
- omogućava efikasnije i selektivnije ekstrakcije;
- dodavanjem kosolvenata (metanola, etanola, vode i drufih) moguće je poboljšati rastvaranje i ekstrakciju polarnih komponenti čime se postiže veća selektivnost prilikom ekstrakcije;
- nema zaostajanja rastvarača u dobijenom ekstraktu za razliku od upotrebe organskih rastvarača;
- za ekstrakciju natkritičnim fluidom mogu se primeniti postrojenja različitih kapaciteta, od analitičkih (manje od grama do nekoliko miligrama uzorka),

preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), poluindustrijskih (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone sirovine);

- troše manje energije jer nema uparavanja ratvarača.

Sa druge strane, ova metoda ima i neke nedostatke, kao što su:

- rad na relativno visokim pritiscima;
- veliki investicioni troškovi za procesnu opremu. Investicioni troškovi za procese natkritične ekstrakcije su veći u odnosu na konvencionalne tipove ekstrakcije, ali su zato operativni troškovi znatno manji zbog lake regeneracije rastvarača.

2.9.3.3. Ugljenik(IV)-oksid (CO_2) kao rastvarač u natkritičnoj ekstrakciji

Izbor odgovarajućeg ekstragensa zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika fluida koji se mogu koristiti za ekstrakciju u natkritičnom stanju (Tabela 2.9), a koji ujedno određuje i konstrukcione karakteristike tehnologije, odnosno samog uređaja za ovu vrstu ekstrakcije (*Sovová i Stateva, 2011*).

Tabela 2.9. Kritične tačke fluida koji se koriste za natkritičnu ekstrakciju (*Filip, 2013*)

Fluid	**Kritična temp. (°C)**	**Kritični pritisak (bar)**	**Gustina (kg/m^3)**
etilen	9,3	50,4	218
ugljenik(IV)-oksid	31,3	73,8	468
etan	32,3	48,8	203
azot oksid	36,7	72,7	470
propilen	91,9	46,2	233
propan	96,7	42,5	217
amonijak	132,5	112,8	235
dietiletar	194	36,4	265
metanol	239,6	80,9	272
etanol	240,9	61,4	276

Kao najpoželjniji i najčešće korišćeni rastvarač u procesima natkritične ekstrakcije pokazao se ugljenik(IV)-oksid iz više razloga. Ugljenik(IV)-oksid je gas bez boje, mirisa i ukusa, nekorozivan, nezapaljiv i jeftin. Ima oznaku GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Za razliku od drugih fluida koji se mogu primeniti kao rastvarači u natkritičnoj ekstrakciji, CO_2 je dostupan u velikim količinama kao veoma čist. Takođe, prednost CO_2 u odnosu na ostale rastvarače je što je relativno inertan sa hemijske tačke gledišta, ekološki siguran i prihvatljiv. Bitna činjenica je da ovaj fluid lako ostvaruje

svoje kritične parametre, s obzirom na niske vrednosti kritične temperature (31,3 ˚C/304,04 K) i kritičnog pritiska (7,3865 MPa). Ovo je značajno i zbog toga što su proizvodi biološkog porekla često termolabilni, lipofilni i moraju se čuvati i obrađivati na temperaturama bliskim sobnoj, što svakako CO_2 čini posebno pogodnim za ekstrakciju biološkog materijala. Niska kritična temperatura CO_2 čini ga atraktivnim za obradu hrane osetljive na toplotu, obradu lekova i labilnih lipida i ima relativno visoku moć rastvaranja u odnosu na druge natkritične fluide. Pokazuje veliki afinitet prema isparljivim (lipofilnim) jedinjenjima (*Ghaderi, 2000; Mićić et al., 2011*). Kao ekstrakcioni solvent CO_2 pokazuje veliku hidrofilnu selektivnost; takva prednost podrazumeva da su ekstrakti lišeni nepoželjnih komponenti kao što su organske i neorganske soli, šećeri, amino kiseline, tanini i tako dalje (*Da Porto et al., 2009*). Zbog svoje lake disipacije, CO_2 se nakon ekstrakcije može lako ukloniti (*Gomez, 1996; Beveridge et al., 2005*). CO_2 je na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku gas, tako da ne ostaje u finalnom proizvodu. Zbog svoje nepolarne prirode, CO_2 može biti neprikladni rastvarač za polarna jedinjenja. Međutim, uz dodatak polarnog kosolventa, kao što su voda, etanol ili metanol, polarna jedinjenja takođe mogu biti efikasno izdvojena.

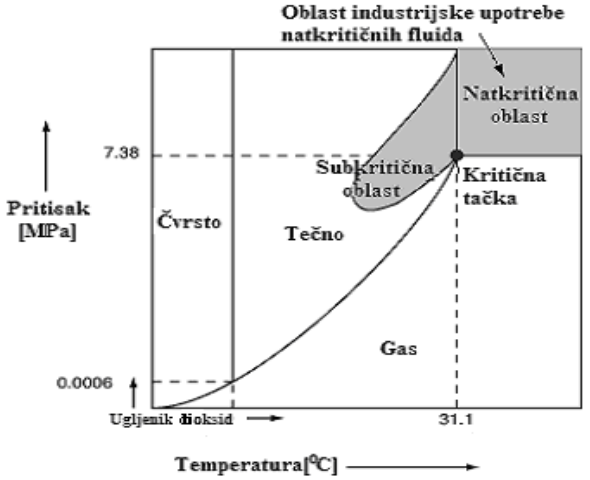
Ugljenik(IV)-oksid se nalazi u tečnom stanju na pritiscima u intervalu od 5 do 73,38 bara i temperaturama od -55 do 31,3 °C. Ohlađen ispod kritične temperature (31,3 °C) tečni CO_2 poseduje visoku moć rastvaranja, koja u maloj meri zavisi od pritiska. Kada je CO_2 u natkritičnom stanju, to jest kada je na temperaturi većoj od 31,3 °C i pritisku iznad 73,38 bara sposobnost rastvaranja CO_2 varira u širokim granicama sa promenom pritiska i temperature (promena gustine i dielektrične konstante). Na taj način se može, pogodnim izborom pritiska i temperature, ostvariti selektivna ekstrakcija prirodnih aktivnih supstanci, kao i frakciono razdvajanje ovih supstanci, na primer, višestepenim kaskadnim smanjenjem pritiska primenom više separatora. Odgovarajuće frakcionisanje je moguće ostvariti i u toku same ekstrakcije, programiranjem odnosa pritiska i temperature (*Lepojević, 2000*).

Tabela 2.10. Poređenje fizičkih svojstava gasovitog, natkritičnog i tečnog CO_2

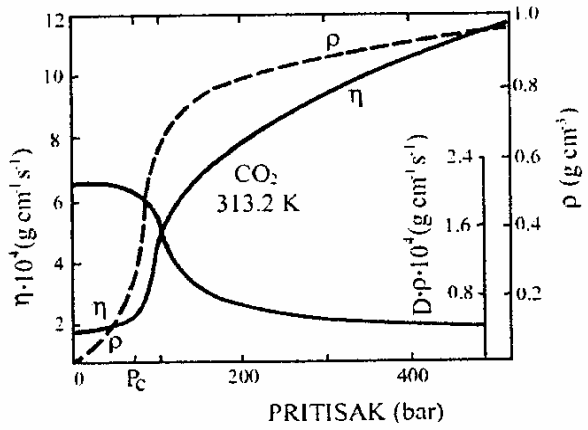
	Gustina (g/m^3)	**Difuzivnost** (cm^2/s)	**Viskoznost** (Pa s)
Gas P=101,3 kPa T=15 – 30 °C	0,0006 - 0,002	0,1 - 0,4	0,00001 - 0,00003
Natkritični CO_2 P=Pc, T=Tc P=4Pc, T=Tc	0,2 - 0,5 0,4 - 0,9	0,0007 0,0002	0,0001 - 0,0003 0,0003 - 0,0009
Tečnost P=101,3 kPa T=15 – 30 °C	0,6 - 1,6	0,000002 - 0,00002	0,0002 - 0,003

Na faznom dijagramu za ugljenik(IV)-oksid (Slika 2.30) mogu se uočiti tri oblasti: *i)* oblasti iznad trojne tačke (-56,6 ^oC i 0,51 MPa) u kojoj su čvrsta, tečna i gasovita faza u ravnoteži, *ii)* oblast ispod kritične tačke (31^oC i 7,38 MPa) u kojoj ugljenik(IV)-oksid može postojati kao bezbojna tečnost (subkritična oblast) i *iii)* oblast iznad kritične tačke to jest, oblast određena vrednostima pritiska i temperature iznad kritičnih vrednosti i u kojoj se ugljenik(IV)-oksid nalazi u natkritičnom stanju.

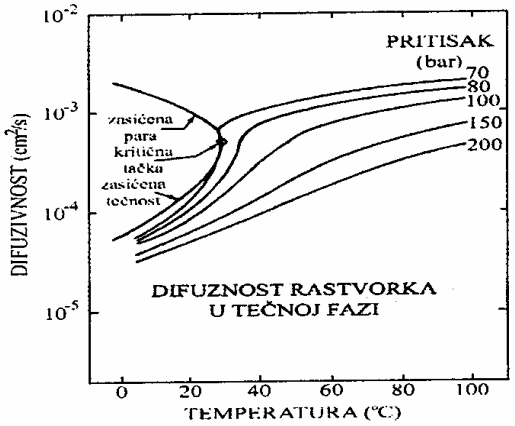
Kao natkritični fluidi, osim ugljenik(IV)-oksida, upotrebljavaju se i: freon, azot, amonijak, azot(II)-oksid, etilen, etan, propan, propilen, metilamin i tako dalje. Oni se kao rastvarači mogu koristiti i u tečnom stanju.



Slika 2.30. Fazni dijagram za ugljenik(IV)-oksid (*Žižović, 2009*)



Slika 2.31. Fizičko-hemijske osobine (viskoznost, gustina, difuzivnost) natkritičnog CO_2, (*Žižović, 2009*)



Slika 2.32. Promena difuzivnosti ugljenik(IV)-oksid sa pritiskom i temperaturom u natkritičnim uslovima (*Žižović, 2009*)

2.10. Analitičke metode u analizi biljnih ulja

Za identifikaciju i klasifikaciju biljnih ulja se koristi veliki broj analitičkih tehnika i metoda; koje služe za određivanje mnogobrojnih parametara koji definišu kvalitet biljnih ulja kao što su: stepen nezasićenosti, tačka topljenja, kiselost, i mnogi drugi. Najčešće su u upotrebi volumetrijske metode koje se obično koriste za određivanje stepena nezasićenosti i sadržaja slobodnih masnih kiselina (SMK), mada su u sve češćoj primeni spektroskopske i hromatografke tehnike kao što su: gasna (GC) kao i tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tankoslojna hromatografija (TLC), masena spetroskopija (MS), infra-crvena (IR) spektroskopija (uključujući blisku infracrvenu spektroskopiju (NIR) i infra-crvenu spektorskopiju sa Furijeovom transformacijom (FTIR)) i ultra ljubičasta – vidljiva (UV-Vis) spektroskopija. Svaka od

ovih tehnika nam daje različite i veoma važne informacije o kvalitativnim i kvantitativnim svojstvima biljnih ulja. Tabela 2.11 daje prikaz najčešće korišćenih tehnika koje se koriste za merenje – određivanje parametara kvaliteta biljnih ulja.

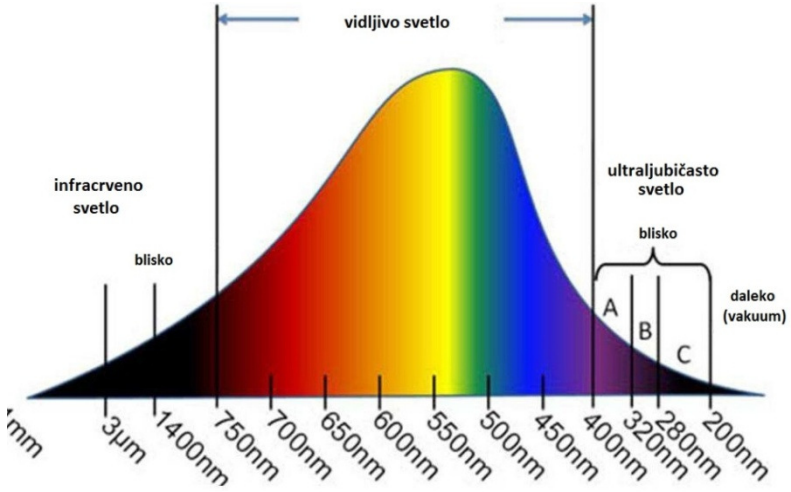
Tabela 2.11. Hromatografske i druge analitičke tehnike za određivanje hemijskih osobina biljnih ulja (*Commission Regulation (EEC), 1991; Gunstone, 2004*)

Tehnika	**Osobine biljnih ulja koje se detektuju**
GC / GC-MS	Kvalitativno i kvantitativno određivanje sastava masnih kiselina Određivanje sadržaja tokoferola Određivanje sadržaja alifatičnih alkohola Određivanje sastava i sadržaja sterola
Head space GC	Određivanje sadržaja isparljivih halogenovanih rastvarača
HPLC	Određivanje sadržaja tokoferola
Apsorpciona spektroskopija	Kvantitativno određiavnje vitamina A
UV apsorpcija	Identifikacija masti i masnih kiselina sa konjugovanim dvostrukim vezama; Određivanje stepena oksidacije i promena koje nastaju tokom tehnološkog procesa
Emisiona spektroskopija	Detekcija metala u pepelu ulja
Fluorescentna spektroskopija	Detekcija primesa u ulju
FTIR Spektroskopija	Merenje cis-trans odnosa, jodnog broja, saponifikacionog broja, sadržaja slobodnih masnih kiselina, peroksidnog broja, anisidinskog broja
Volumetrijske titracije	Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina, jodnog i peroksidnog broja
TLC	Određivanje prisustva eritrodiola i uvaola
TLC / GC	Određivanje zasićenih masnih kiselina u položaju 2 u triacilgrlicerolima
GC sa ECD	Određivanje isparljivih halogenovanih rastvarača u maslinovom ulju

Veoma popularne metode čije se mogućnosti primene u ispitivanjima kvaliteta biljnih ulja u poslednje vreme sve više razmatraju su DSC, TG, polarografija, heminluminiscencija luminola i druge. Primena ovih metoda je sve veća zbog njihove preciznosti i efikasnosti u određivanju antioksidativnog kapaciteta i otpornosti na oksidaciju kao veoma važnih pokazatelja kvaliteta biljnih ulja.

2.10.1. Ultraljubičasta - vidljiva spektroskopija (UV-Vis)

Uv-vis spektroskopija ispituje molekule koji apsorbuju elektromagnetno zračenje u oblasti između ~200 i ~800 nm. Ultraljubičasto i vidljivo zračenje čine mali deo spektra elektromagnetnog zračenja koji je podeljen na blisku ultraljubičastu (UV) (200 – 400 nm) i vidljivu oblast (400 - 800 nm). Na nižim talasnim dužinama (< 200 nm) nalazi se takozvana vakuumska ultraljubičasta oblast, koja nije od interesa jer se apsorpcija u ovoj oblasti ne može meriti standardnim uređajima zbog apsorpcije svetlosti od strane kiseonika iz vazduha, pa bi uzorak morao da bude u evakuisanom prostoru (*Milosavljević, 2004*).



Slika 2.33. Deo spektra elektomagnetnog zračenja

Kada molekul apsorbuje foton iz UV-Vis oblasti, odgovarajuća količina energije biva „zarobljena" od strane jednog ili više spoljašnjih elektrona molekula te ispitivane materije. Kao posledica toga dešava se da dolazi do promene energetskog stanja elektrona (ΔE_{elek}), kao i vibracione (ΔE_{vib}) i rotacione energije (ΔE_{rot}), kao dela ukupne energije molekula (*Rouessac i Rouessac, 2007*).

$$\Delta Etot=\Delta E_{rot}+\Delta E_{vib}+\Delta E_{elek} \qquad (2.21)$$

Energetski nivoi vibracije i rotacije su diskretni i pobuđuju se fotonima iz IR spektroskopske oblasti (> 800 nm). Vidljivi deo spektra obuhvata energije fotona od 36 do 72 kcal/mol, a u oblasti UV spektra (400nm do 200nm) opseg ove energije se proširuje na 143 kcal/mol. Energija fotona iz VIS i UV delova spektra je dovoljna da pobudi elektrone spoljnih elektronskih orbitala i omogući njihove skokove na više energetske nivoe; što posledično dovodi do toga da elektroni prelaze iz najviše

popunjene molekulske orbitale u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu. Razmena energije u fotonima daje brojne mogućnosti pojedinačnih prelaza elektrona (*Milosavljević, 2004; Hamid et al., 2007).*

Deo molekula odgovoran za apsorpciju zračenja zove se *hromofora*. Hromofore su najčešće nezasićene grupe kao što su C=C, C=O, -N=N-, $-NO_2$, ili benzenov prsten. Prisustvo apsorpcione trake na određenoj talasnoj dužini je često pokazatelj prisustva hromofora. Rastvarač ne sme apsorbovati u UV/vis oblasti (*Milosavljević, 2004*).

Optički spektrometar beleži stepen apsorpcije koji se odigrava na određenim talasnim dužinama i tako nastaje spektar (*Hamid et al., 2007*). Prolaskom UV/Vis zračenja kroz uzorak, jedan njegov deo se apsorbuje od strane materije (uzorka, mera količine apsorbovane svetlosti naziva se apsorbancija i obeležava sa A), a deo se transmituje, odnosno, prolazi kroz uzorak (mera količine propuštene svetlosti naziva se transparencija i obeležava sa T). UV/Vis spektar daje skup podataka o apsorbovanoj količini zračenja u funkciji od talasne dužine i predstavlja se kao apsorbancija (ili transparencija) u funkciji talasne dužine. U spektroskopiji, transparencija (T), predstavlja meru "propustljivosti" sredine (uzorka) za monohromatski zrak i određena je količnikom intenziteta svetlosti koja je prošla kroz uzorak (I) sa intenzitetom svetlosti koja je na uzorak upućena (I_0) (*Rouessac i Rouessac, 2007; Milosavljević, 2004)*:

$$T = I/I_{0,} \qquad (2.22)$$

Dok je apsorbanca predstavljena negativnim dekadnim logaritmom transparencije:

$$A = -\log 1/T \qquad (2.23)$$

Veza apsorbancije i koncentracije optičke sredine definisana je Lambert-Beer-ovim zakonom:

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon\, c\, l \qquad (2.24)$$

koji se primenjuje pri kvantitativnoj analizi, za određivanje koncentracije ispitivanog uzorka. U prethodnoj jednačini je:

c - koncentracija uzorka (mol/L);

l - dužina puta snopa svetlosti (debljina kivete sa uzorkom, cm);

ε – molarna apsorptivnost (molarni ekstinkcioni koeficijent, 1000 cm^2/mol).

Ako je molekulska težina jedinjenja nepoznata, onda se u jednačini (2.24) koncentracija izražava u g/100 cm^3, a umesto molarne apsorptivnosti (ε) koristi se apsorptivnost (ekstinkcioni koeficijent), koja predstavlja apsorbanciju 1%-tnog rastvora

u ćeliji debljine 1 cm i ova veličina se označava sa $E_{1cm}^{1\%}$. Veza između nje i ε je data izrazom:

$$\varepsilon = 10^{-1} E_{1cm}^{1\%} \, x \, M \quad (M\text{-molekulska težina}) \qquad (2.25)$$

Lambert - Beer-ov zakon ne važi kada (*Milosavljević, 2004):*

- rastvorak u uzorku postoji u više hemijskih oblika koji su u međusobnoj ravnoteži;

- rastvorak i rastvarač grade asocijat;

- postoji termička ravnoteža između osnovnog i pobuđenih stanja elektrona;

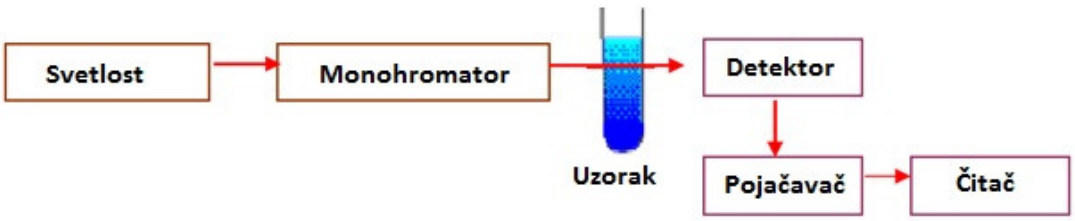
- jedinjenja fluoresciraju ili se hemijski menjaju prilikom apsorpcije zračenja.

Uv-vis spektri se mogu koristiti za kvantitativnu analizu. Potpuna identifikacija nepoznatog jedinjenja se ne može izvršiti primenom ove spektroskopije ali se mogu dobiti informacije o prirodi supstance komparativnom analizom. Takođe, metoda se može koristiti za određivanje obima konjugacije u molekulu i za ispitivanje geometrijske izomerije molekula (trans izomer apsorbuje pri većim talasnim dužinama). Većina komercijalnih spektrofotometara pokriva oblast 185 – 900 nm (*Kumar, 2006; Rouessac i Rouessac, 2007*).

Konstrukcija uređaja

Ključni delovi ovog uređaja su:

- Izvor koji generiše širok snop elektromagnetnog zračenja;
- Disperzioni uređaj koji iz ovog snopa selektuje određene talasne dužine – monohromator;
- Jedan ili više detektora za merenje intenziteta radijacije;
- Ostale optičke komponente, sočiva i ogledala, koje omogućavaju prenos svetlosti kroz instrument (Slika 2.31).



Slika 2.34. Delovi UV-Vis spektrofotometra

Kao svetlosni izvori koriste se lampe: deuterijumske lučne lampe pod pritiskom za UV oblast talasnih dužina 160 - 375 nm, volfram lampa sa filamentom u kvarcu ili volfram halogena lampa za VIS i NIR oblast, što odgovara talasnim dužinama 350 - 2500 nm; alternativno za ceo region, ksenon lučna lampa. Kivete koje se koriste mogu biti staklene (za Vis oblast) ili kvarcne (za UV oblast) i najšešće su debljine 1cm (dužina puta zraka).

Spektrofotometri mogu biti jednozračni ili dvozračni, skenirajući ili neskenirajući, transmisioni ili refleksioni (*Hamid et al., 2007*). Uzorak se "umeće" na optički put, bilo ispred ili iza disperzionog sistema. Bitna osobina instrumenata je rezolucija. Za sve spektrofotometre je važno da daju mogućnost kvantitativnog određivanja (*Rouessac i Rouessac, 2007*).

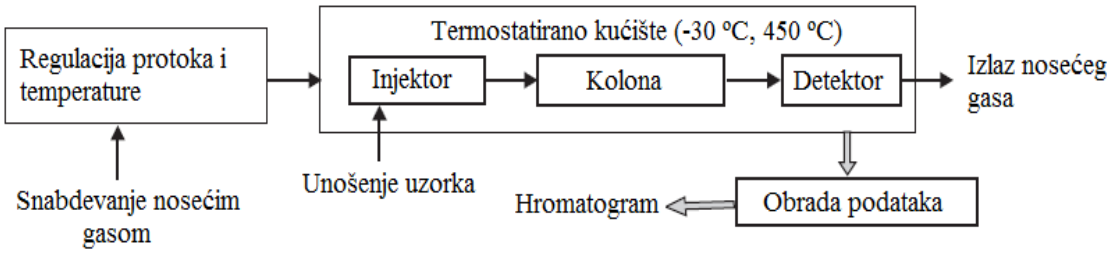
Detektor konvertuje svetlosni signal u električni signal. Idealno, detektor bi dao linearan odgovor na širokom opsegu talasnih dužina. Spektrometri normalno sadrže ili fotomultiplikator ili fotodinodni detektor. Fotomultiplikator kombinuje konverziju signala sa nekoliko nivoa pojačanja unutar cevi. Sadrži fotoemisionu katodu, diodu i anodu. Diode se sve više koriste danas u modernim spektrofotometrima. Imaju širi dinamički opseg i mnogo su pouzdanije od fotomultiplikatora.

2.10.2. Gasna hromatografija (GC)

Pod hromatografijom se podrazumevaju analitičke metode koje služe za razdvajanje hemijskih jedinjenja na osnovu različitih raspodela između dve faze: mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne). Kod gasne hromatografije stacionarna faza je tečna ili čvrsta, a pokretna je gasovita i nju čine inertan noseći gas i pare jedinjenja koja se razdvajaju. Do dodira između ove dve faze dolazi u takozvanoj gasno-hromatografskoj koloni. Ukoliko je stacionarna faza čvrsta, jedinjenja se razdvajaju putem selektivne adsorpcije, a ukoliko je tečna, do razdvajanja dolazi usled različitih rastvorljivosti para ispitivanih jedinjenja u datoj tečnoj fazi. Kod najvećeg broja gasnohromatografskih analiza primenjuje se takozvana tehnika eluiranja koja se sastoji u neprekidnom proticanju nosećeg gasa kroz gasnohromatografski sistem: isparivač – kolona – detektor. Po izlasku iz kolone, razdvojena jedinjenja prolaze zajedno sa nosećim gasom kroz detektor gde se registruju kao električni signali čiji su intenziteti proporcionalni njihovoj koncentraciji u nosećem gasu. Ovi signali se pojačavaju i beleže na pisaču u zavisnosti

od vremena. Kriva zavisnosti jačine signala (u mV) od vremena naziva se gasni hromatogram. U uslovima kada je postignuto dobro razdvajanje svaki signal (maksimum) u gasnom hromatogramu odgovara jednom hemijskom jedinjenju i okarakterisan je vremenom zadržavanja (retencionim vremenom) i površinom (*Milosavljević, 2004*).

Osim vremena pripreme uzorka, vreme instrumentalne analize je obično određeno trajanjem same gasno hromatografske analize i najčešće je to između 20 i 100 minuta. Analiza podataka može potrajati još 1 - 20 h (ili više), u zavisnosti od stepena detaljnosti koja je zahtevana/potrebna (*Hites, 1997*).



Slika 2.35. Šema aparature za GC (*Rouessac i Rouessac, 2007*)

Izvođenje analize teče tako da se rastvor uzorka najpre ubrizgava u GC ulaz (injektor - isparivač), gde se prevodi u paru i zahvaćen nosećim gasom (obično helijum) ulazi u gasnohromatografsku kolonu. Uzorak, nošen nosećim gasom teče kroz kolonu i jedinjenja koja sadrži ispitivana smeša se u koloni razdvajaju na osnovu njihovog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Sa izlazom kolone je direktno povezan detektor, tako da sve što je sa nje eluirano (noseći gas + pare ispitivanih jedinjenja) prolazi kroz njega. Uglavnom se primenjuju takozvani diferencijalni detektori čiji se princip rada zasniva na neprekidnom merenju nekog fizičkog svojstva nosećeg gasa koje je u direktnoj vezi sa koncentracijom pare u njemu. Najviše se primenjuju dve vrste detektora: termoprovodljivi i jonizacioni. Kod termoprovodljivog detektora – TCD (*engl.* Thermal Conductivity Detector) detekcija se zasniva na činjenici da brzina prelaska toplote sa zagrejanog tela na okolni gas zavisi od sastava gasa. Najveći deo toplote odvodi se procesom termičke provodljivosti i on zavisi od broja sudara molekula gasa (u jedinici vremena) sa zagrejanim telom, to jest od pokretljivosti molekula gasa. Princip rada jonizacionih detektora zasniva se na tome da je električna provodljivost gasa direktno proporcionalna broju prisutnih naelektrisanih čestica (jona, elektrona). Najčešće se primenjuje takozvani plameno-jonizacioni detektor (*eng.* Flame Ionisation

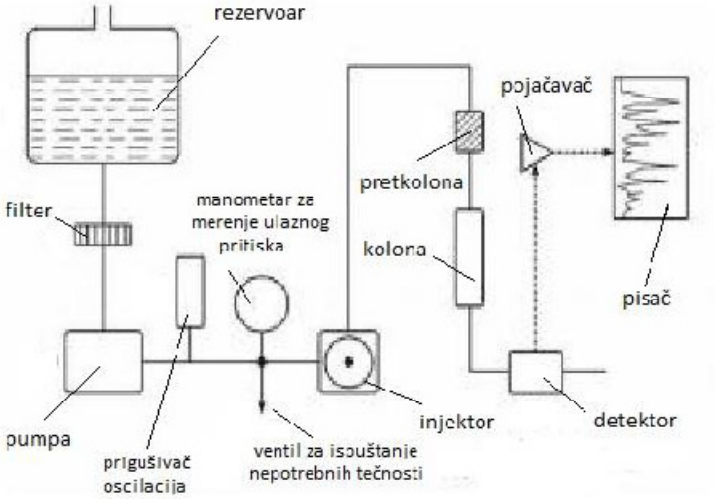
Detector – FID). Pored njega u grupi jonizacionih detektora su i veoma osetljivi i selektivni uređaji tipa detektora sa zahvatom elektrona (*eng.* Electron Capture Detector - ECD) i detektora sa alkalnim plamenom (Alkali Flame Ionisation Detector – AFID) koji se još naziva i fosforni (*Milosavljević, 2004*). U poslednje vreme pored navedenih detektora sve više su u upotrebi i veoma osetljivi maseni spektrometri – MS (*eng.* Mass Spectrometer). Kombinacija GC i MS tehnike je predložena sredinom 1950-ih, ubrzo nakon razvoja GC tehnike (*Hites, 1997*). GC-MS je danas vrlo važan alat za određivanje količine isparljivih organskih jedinjenja u složenim smešama (*Marjanović, 2001*), njihovo razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju. Naime, gasnom hromatografijom se može izvršiti odvajanje isparljivih jedinjenja iz kompleksnih smeša, sa odličnom rezolucijom, ali se ne može izvršiti njihova identifikacija; koja je omogućena spajanjem GC-a sa masenim spektrometrom kao detektorom (*Marjanović, 2001*).

Masne kiseline nisu dovoljno isparljive za GC analizu. Osim toga, one su veoma reaktivna jedinjenja i nedovoljno polarna da bi mogle dovoljno dobro da se razdvoje. Direktna GC analiza može dovesti do "tejlinga" pika (širenja pred kraj pika na hromatogramu) tokom adsorpcije i nespecifičnih interakcija sa kolonom. Zato se masne kiseline hemijski modifikuju derivatizacijom do isparljivih metilestara, jedinjenja čije osobine omogućavaju efikasno izvođenje GC analize (*Marjanović i Krstić, 1998; Marjanović, 2001*).

2.10.3. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

HPLC (High Performance Liquide Chromatography) metoda je *Tečna hromatografija visokog stepena razdvajanja* ili kako se još naziva, *Tečna hromatografija pod visokim pritiskom*. Za razliku od gasne, tečna hromatografija podrazumeva da je mobilna faza u tečnom stanju. Razdvajanje komponenti od interesa u uzorku koji se ispituje je posledica različite interakcije svake od ovih komponenti sa mobilnom i sa stacionarnom fazom. U HPLC metodi, tečna mobilna faza se mehanički pumpa kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom, pumpom visokog pritiska. Čestice stacionarne faze su sitne što povećava površinu za adsorpciju, a to povećava efikasnost separacije komponenti uzorka. Pakovanje kolone je gusto zbog čega i jeste potreban visok pritisak koji će pokretati mobilnu fazu kroz kolonu. Mala količina uzorka se ubrizgava u hromatografsku kolonu ispunjenu stacionarnom fazom, zajedno sa

mobilnom fazom. Mobilna faza sa uzorkom teče preko stacionarne faze, a interakcije komponenti uzorka sa stacionarnom fazom i njihov afinitet i prema stacionarnoj i mobilnoj fazi odrediće njihovo zadržavanje u koloni. Na tim interakcijama i afinitetu se i zasniva razdvajanje komponenta analiziranog uzorka. Ove odvojene komponente na izlazu iz kolone dospevaju na detektor, u različitim vremenskim intervalima. Detektor je povezan na pisač ili računar koji daje hromatogram koji se dalje može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (*Rounds i Greqory, 1998*). U daljem tekstu objašnjeni su pojedinačni delovi ovog uređaja.



Slika 2.36. Delovi HPLC uređaja

1. Rezervoar za mobilnu fazu, za upotrebu u HPLC sistemu mora biti bez čvrstih suspendovanih čestica i bez rastvorenog gasa. Čvrste čestice se uklanjaju filtracijom kroz ultrafiltre, dok se rastvoreni gasovi uklanjaju ključanjem u vakuumu, uz pomoć ultrazvuka ili barbotiranjem helijuma.

2. Filter služi za uklanjanje slučajno prisutnih čvrstih čestica prečnika oko 10 μm (*Deak, 2008*).

3. Pumpa ima ulogu transfera mobilne faze od rezervoara preko injektora do kolone, određenim protokom, izraženim u mL/min. Normalni protoci u HPLC su u rasponu od 1 do 2 mL/min. Pumpa služi da se obezbedi ulazni pritisak mobilne faze, najčešće između 30 i 300 bara, uz odgovarajući protok kroz hromatografski sistem (oko 1 mL/min). HPLC sistem može imati jednu pumpu ili sistem pumpi. Karakteristike pumpe su određene tipom i dimenzijama kolone. Najčešće su u upotrebi klipne pumpe sa linearnim (jednosmernim) ili naizmeničnim kretanjem klipa. Upotreba pumpi sa

naizmeničnim kretanjem klipa ima jedan nedostatak, a to je pulsiranje pritiska, odnosno protoka. Zbog toga se neposredno iza pumpe ugrađuje prigušivač oscilacija (*Deak, 2008).* Uloga pumpe je i eluiranje supstanci iz kolone. Eluiranje supstanci može da bude *gradijentno* ili *izokratsko*. Kod izokratskog sistema pumpi sastav mobilne faze je konstantan. Ovaj sistem eluiranja je najbolji za jednostavne separacije i često se koristi u kontroli kvaliteta aplikacija u proizvodnim procesima. Kod gradijentnog eluiranja, sastav mobilne faze se vremenom povećava. Ovo se vrši zbog različitih afiniteta komponenti uzorka prema stacionarnoj fazi, jer neke isprva ne mogu da se isperu iz kolone. Ovaj način eluiranja je najbolji za analizu složenih uzoraka i često se koristi u razvoju metoda za nepoznate smeše. Linearni gradijenti su najpopularniji (*Rounds i Greqory, 1998*).

4. Injektor. Zadatak injektora je da unese uzorak u struju pokretne faze. Neki od osnovnih injekcionih sistema su: pregradni, višegardni, sa zaustavnim protokom, ventilni, automatski, špric-injektori, slavine. U ranijim HPLC sistemima su korišćeni pregradni i zaustavno-protočni injektori kod kojih se špricem unosi uzorak u sistem. Najjednostavniji injektor koji se danas koristi je slavina sa šest otvora koja ima dve radne pozicije. Kod ovakvog tipa injektora, petlja sa uzorkom je povezana između dva kanala ventila. Za količine od 10 μL i više, ove petlje su spoljašnje, a za uzorke manje od 10 μL, petlje su unutrašnje. Jedan deo ventila može da bude povezan sa pumpom i služi za unošenje uzorka u sistem. Ostala dva otvora služe za ubacivanje i izbacivanje uzorka. Tokom rada, uzorak se unosi u petlju, koja je u poziciji za injekciju. Otvor za uzorak je zatvoren, a pumpa i kolona su direktno povezane sa ventilom. Kada se uzorak ubaci, ventil se okreće u drugu poziciju, čime uzorak odlazi u hromatografsku kolonu. Zaokretanje ventila može da se vrši ručno ili automatski. Petlje mogu biti različitih zapremina, a zamenjuju se ručno. Najčešće korišćene su one zapremina 10, 20 ili 25 μL. Za specijalna injektovanja mogu da se koriste petlje zapremine 50 i 100 μL. Danas postoje sistemi (autosempleri) u kojima se uzorak injektuje automatski. Većina ovakvih sistema radi tako što uzorak premešta iz posude za uzorak u petlju HPLC sistema; a ovaj postupak zahteva određenu (minimalnu) količinu uzorka; a obično je potrebno od 0,5 do nekoliko mililitara rastvora. Autosempleri

omogućavaju automatsku analizu velikog broja uzoraka ili kada upotreba injektora nije praktična.

5. Kolone su "srce" hromatografske metode. Kolona može biti izrađena od stakla (ređe, uglavnom za biomolekularna ispitivanja), nerđajućeg čelika (najpopularniji materijal, jer daje mogućnost ostvarivanja visokih pritisaka) ili tantala i postavljene su na nosače kako bi bile fiksirane. Obično su unutrašnjeg prečnika 4,5 - 10 mm, dužine 20 - 30 cm, sa česticama stacionarne faze promera 3,5 - 10 μm. Najčešće su pakovane silika gelom, mikroporoznim česticama, čija je veličina pora od ključnog značaja za vreme zadržavanja (retencije) u koloni. Većina kolona je internog prečnika 2,5 mm. Na oba kraja kolone nalaze se proširenja na kojima je narezan navoj na koji se navrće posebna navrtka (nut) namenjena za spajanje kolona sa metalnim kapilarama za dovod i odvod tečnosti. Ove navrtke takođe služe za učvršćivanje sita koja služe za uklanjanje grubih nečistoća i kao porozni čep pri punjenju kolone, na početku i kraju kolone (*Deak, 2008*). Većina korisnika kupuje unapred popunjene kolone**.** *Pretkolona* ima iste karakteristike kao kolona i zadatak joj je da ukloni nečistoće unete sa uzorkom i na taj način spreči začepljenje kolone. Pretkolone obično imaju dužinu od nekoliko cm (≤ 5cm) (*Rounds i Greqory, 1998*).

Tipovi kolona u HPLC sistemima:

• *Analitičke* (unutrašnji promer- *inner diameter* (id): 1,0 - 4,6 mm; dužina 15 mm - 250 mm)

• *Preparativne* (id > 4,6 mm; dužina 50 mm -250 mm)

• *Kapilarna* (id: 0,1 – 1,0 mm; različite dužine)

• *Nano* (id <0,1 mm, ili se ponekad navodi id <100 μm)

Konstrukcijski materijali za cevi

• od nerđajućeg čelika (najpopularniji, daje visoke mogućnosti pritisaka)

• Staklo (uglavnom za biomolekulama)

• PEEK polimera (biokompatibilni i hemijski inertan na većinu otapala).

6. Detektor može otkriti pojedinačne molekule koji dolaze (eluiraju se) iz kolone i on služi za merenje količine tih molekula, tako da hemičar kvantitativno može analizirati eluirane komponente. Detektor može biti svaki uređaj koji može da je detektuje eluiranu supstancu na osnovu njenih fizičkih ili hemijskih osobina. Detektor generiše električni signal koji je proporcionalan intenzitetu neke osobine mobilne faze

ili supstance koja se eluira. Tačnije, služi za prevođenje signala mase (koncentracije) u električni signal, koji se zatim pojačava na pojačivaču, moduliše i meri (registruje). Najčešće su u primeni UV-detektori (zasnovani na apsorpciji zračenja iz UV i vidljive oblasti elektromagnetnog spektra), manje detektori na bazi merenja fluorescencije, indeksa refrakcije, elektrohemijski i ostali. UV detektori mere apsorbanciju pri konstantnoj talasnoj dužini (ili rasponu talasnih dužina) koristeći protočne kivete kroz koje protiče mobilna faza sa komponentama. U detektoru nastaje električni signal saglasan koncentraciji ispitivane komponente koji se pojačava /oslabljuje i zatim zapisuje potenciometrijskim kompenzacionim pisačem ili se analogni električni signal prevodi u digitalni (*Deak, 2008*).

7. Računar ne samo da kontroliše sve module u HPLC instrumentu, već prikuplja signale iz detektora i koristi ih (obrađuje) kako bi se utvrdilo vreme eluiranja (zadržavanja) uzorka komponenti (kvalitativna analiza) i količina uzorka (kvantitativna analiza). Pri tome su dominantne funkcije merenja vremena izlaska pikova (maksimuma) i merenja površine pikova (integracija) uz dodatno računanje udela komponente na bazi funkcije zavisnosti površine od količine (definisane na bazi standarda) (*Deak, 2008*).

Dodatni delovi HPLC sistema su i *manometar* za merenje ulaznog pritiska i *ventil za ispuštanje* nepotrebne tečnosti i za uklanjanje gasa iz prethodno opisanih delova.

HPLC metoda je laka za kontrolu, precizna, jedna od najnaprednijih tehnika, postupak je automatizovan, smanjen je rizik od degradacije anailita jer nema visokih temperatura i lako je podešavanje uslova za veliki broj supstanci. Nedostaci metode su što nema detektora za supstance bez hromofora, obavezna je ekstrakcija pre analize i utrošak velikih zapremina organskih rastvarača.

2.10.4. Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Metode termalne analize se u najširem smislu mogu definisati kao tehnike koje se zansnivaju na merenju promena hemijskih i fizičkih osobina materijala u funkciji temperature. Po definiciji Internacionalne konfederacije za termalnu analizu (International Confederation for Thermal Analysis – ICTA), termalne metode analize su: ”Grupa tehnika kojima se mere fizičke osobine materijala i/ili reakcionih proizvoda kao funkcija temperature dok je materijal izložen kontrolisanom temperaturskom

programu" (*Mackenezie, 1979*). Dakle, termalna analiza je opšti naziv za grupu instrumentalnih metoda kojima se određuju promene fizičko-hemijskog svojstava materijala sa promenom temperature. Dve najčešće tehnike koje su u upotrebi su: diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC) i diferencijalna termalna analiza (DTA). Kod obe metode, uređaj meri razliku u vrednosti relevantne fizičke veličine za ispitivani uzorak i referentno telo (etalon), zbog čega se ove metode i nazivaju diferencijalnim. Kontrolisani temperaturski program je uobičajeno linearna promena temperature sa vremenom koja se može prikazati relacijom:

$$\frac{dT}{dt} = \beta \tag{2.26}$$

gde je β brzina grejanja i izražava se u K/min ili K/s (*Mackenezie, 1979; Haines, 2002; Rajić, 2004*).

U slučaju diferencijalne termalne analize, predmet merenja su temperaturske razlike (ΔT) između ispitivanog uzorka i nekog termički inertnog etalona (referentnog uzorka), prilikom njihovog zagrevanja pod jednakim uslovima:

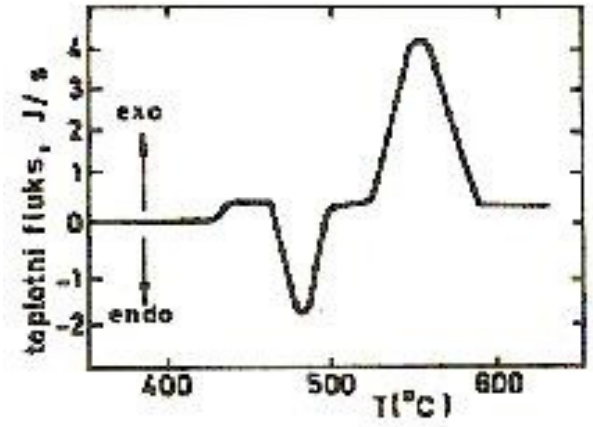
$$\Delta T = T_S - T_R \tag{2.27}$$

gde je T_S – temperatura uzorka, a T_R – temperatura referentnog uzorka (etalona). Temperaturske razlike se javljaju kao posledica različitih fizičkih ili hemijskih procesa u uzorku praćenih promenom entalpije. Osnovna svrha DTA metode je analiza termijskih osobina supstanci poznatog hemijskog sastava. Ovom metodom uobičajeno se dobijaju podaci o temperaturama i toplotnim efektima faznih transformacija, promena kristalnih struktura uzoraka (polimorfizam), zatim o desorpciji adsorbovanih gasova ili o određenim hemijskim reakcijama (dehidratacija, termičko razlaganje) (*Mackenezie, 1979; Haines, 2002; Rajić, 2004*).

Za razliku od diferencijalno termalne analize, diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC) je tehnika kod koje se meri razlika toplotnog fluksa apsorbovanog od strane uzorka i referentnog materijala prilikom njihovog jednovremenog zagrevanja. Drugim rečima, radi se o tehnici koja registruje energiju (u formi fluksa) potrebnu za održavanje nulte temperaturske razlike između ispitivanog uzorka i referentnog materijala, pri unapred definisanoj brzini grejanja (hlađenja), uz pretpostavku da se oba materijala nalaze pod istim uslovima. Iz prethodnog sledi da se praktična razlika između DTA i DSC nalazi u prirodi signala koji se dobija; dok je u slučaju DTA analize

signal proporcionalan temperaturskoj razlici između uzorka i referentnog materijala koji se zagrevaju u istom režimu; kod DSC metode signal je proporcionalan razlici između snage grejača koji zagreva uzorak i referentni materijal (*Mackenezie, 1979; Haines, 2002; Rajić, 2004*).

DTA i DSC daju ekvivalentne podatake o temperaturama na kojima počinju i završavaju se procesi praćeni promenom entalpije. Međutim, metoda DSC je znatno pogodnija i tačnija za kvantitativna određivanja promene entalpije jer je svojim tehničkim rešenjem prvenstveno namenjena tom zadatku. Slika 2.37 daje prikaz rezultata dobijenog DSC tehnikom.



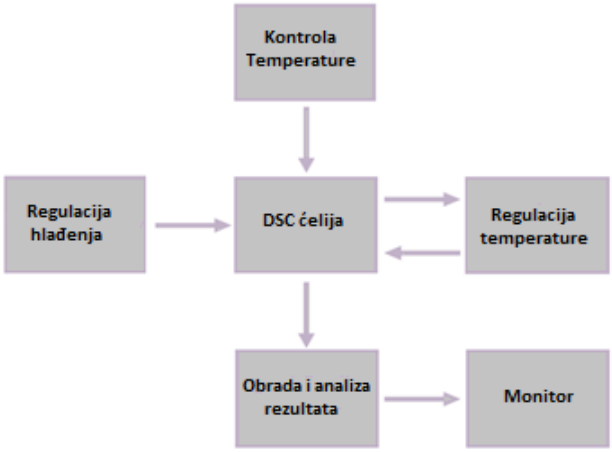
Slika 2.37. Primer termograma dobijenog DSC tehnikom. Slika prikazuje endotermnu i egzotermnu promenu toplotnog fluksa sa promenom temperature

Površina pika ispod DSC krive je direktno srazmerna odgovarajućoj promeni entalpije ΔH:

$$\Delta H = K \frac{S_0}{m} \quad [\text{J/g}] \qquad (2.28)$$

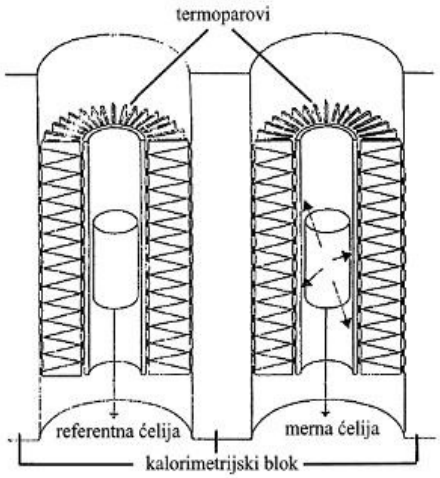
gde je S_0 površina ispod DSC pika, m – masa, a K kalibracioni koeficijent.

Slika 2.38 daje šematski prikaz glavnih delova instrumenta, dok slika 2.39 pokazuje poprečni presek referentne i merne ćelije.



Slika 2.38. Šematski prikaz konstrukcije diferencijalno skenirajućeg kalorimetra

Merenje se sastoji u zagrevanju uzorka konstantnom izabranom brzinom a toplota koja se pri tome oslobađa snima se u funkciji temperature ili vremena. Kako je prethodno pomenuto, najčešći temperaturni program je linearna promena temperature u vremenu, ali se koriste i kompleksni programi koji mogu kombinovati različite brzine zagrevanja ili hlađenja sa izotermalnim periodima.



Slika 2.39. Poprečni presek ćelije DSC uređaja (*Solinas i Ferino, 1998*)

DSC merenja obezbeđuju:

- detekciju procesa koji se odigravaju u uzorku i određivanje temperature na kojima se oni odigravaju;
- određivanje kinetike pojedinih procesa i energije njihove aktivacije;
- određivanje promene toplotnog kapaciteta uzorka;
- određivanje energije koja odgovara detektovanim procesima;
- određivanje stepena čistoće supstance, i tako dalje.

2.10.5. Oksidacija ulja i metode za praćenje njegovog kvaliteta

Procesi hemijske razgradnje, a naročito lipidna peroksidacija, najčešci su vid kvarenja ulja i masti. Zbog toga se često, kada je reč o kvarenju lipida, radi o kvarenju zbog oksidacije na vazduhu (*Dimić i Turkulov, 2000*). Lipidi podležu autooksidaciji, fotooksidaciji, termičkoj i enzimskoj oksidaciji pod različitim uslovima, od kojih većina uključuje neki oblik slobodnih radikala ili vrstu kiseonika. Autooksidacija je najčešći proces oksidativnih promena u uljima i definisana je kao spontana reakcija atmosferskog kiseonika sa lipidima (*Shahidi i Zhong, 2005a*). Proces autooksidacije može se pratiti preko količine nastalih hidroperoksida (peroksida), kao i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije. Primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi i peroksidi), nastali autooksidacijom ulja i masti su nestabilna jedinjenja bez ukusa i mirisa. Tokom daljih reakcija dolazi do njihovog raspadanja i nastanka sekundarnih produkata oksidacije, odnosno, karbonilnih jedinjenja (aldehida, ketona, raznih kiselina i drugih). Sekudarni produkti oksidacije mogu biti isparljivi (zasićeni i nezasićeni nižemolekularni aldehidi) i neisparljivi, odnosno teško isparljivi. Kvalitet ulja i masti se menja upravo zbog nastanka sekundarnih produkata oksidacije, koja su intenzivnog mirisa i ukusa, a pri malim koncentracijama daju veoma jak, neprijatan miris i ukus. (*Gray, 1978*). Promene ukusa i mirisa u ulju se mogu detektovati senzornom analizom ili upotrebom hemijskih i instrumentalnih metoda. Hemijske i instrumentalne metode se najčešće koriste za praćenje kvaliteta ulja u toku procesa proizvodnje, dok se senzorna ispitivanja, uz analize, obavezno koriste za praćenje kvaliteta ulja u toku skladištenja.

Fotooksidacija je pojava kod koje svetlost, u prisustvu kiseonika, izaziva oksidaciju nezasićenih masnih kiselina. Ultravioletno zračenje razlaže hidroperokside, perokside i druga ugljenikova jedinjenja proizvodeći radikale koji iniciraju autooksidaciju. Fotooksidacija indukovana svetlošću veće talasne dužine (iz vidljive ili infracrvene oblasti), zahteva prisustvo promotera.

Kao merilo količine primarnih produkata oksidacije najcešće se uzima vrednost peroksidnog broja (Pbr), koji se najčeše koristi za određivanje stepena oksidacije lipida i prema tome određivanje kvaliteta ulja (*Shahidi i Zhong, 2005a*). Za njegovo određivanje najčešće se koristi jodometrijska metoda (AOCS Metoda Cd 8-53 ili ISO 3960), a dobijena vrednost se izražava u miliekvivalentima ili milimolovima kiseonika

(hidroperoksida) utrošenog po kilogramu ulja (meq O_2/kg, ili mmol/kg ulja). Maksimalne dozvoljene vrednosti su određene Pravilnikom o kvalitetu jestivih biljnih ulja i masti (*Pravilnik o kvalitetu ulja, 2013*). Za određivanje sadržaja neisparljivih karbonilnih jedinjenja, to jest, sekundarnih produkata oksidacije koji su prisutni u ulju, koristi se anisidinski broj (Abr), koji se dobija primenom UV-Vis spektroskopije (*Dimić i Turkulov, 2005*). U toku razvoja autooksidacije, sadržaj hidroperoksida i Pbr se povećavaju. Međutim, kako se hidroperoksidi razlažu, raste sadržaj sekundarnih produkata oksidacije i vrednosti Abr se povećava (*Scrimgeour, 2005*).

Kiselinski broj određuje sadržaj slobodnih masnih kiselina i takođe se koristi kao jedan od parametara za utvrđivanje kvaliteta ulja. Hidrolitički procesi dovode do stvaranja slobodnih masnih kiselina cepanjem acilglicerola, što utiče na aromu. Standardne AOCS metode Ca 5a-40 i Cd 3a-63, kao i ISO 660 se najčešće koriste za određivanje kiselinskog broja, odnosno, sadržaja slobodnih masnih kiselina preračunavanjem procentnog udela slobodne oleinske kiseline. Kiselinski broj je posebno važan kao indikator kvaliteta u toku proizvodnje i skladištenja ulja.

Održivost jestivih ulja se najcešce sagledava preko oksidativne stabilnosti. Oksidativna stabilnost ulja u najvećoj meri zavisi od sastava masnih kiselina ulja, budući da se polinezasićene masne kiseline daleko brže oksidišu od mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina, ali i od stereospecifične raspodele masnih kiselina u molekulu triacilglicerola (*Shahidi i Zhohg, 2005a*). Takođe treba istaći da kod nerafinisanih ulja mogu biti prisutne komponente (razgradni produkti oksidacije, slobodne masne kiseline, metali i drugo) koje pogoršavaju održivost; ali da sa druge strane ta ulja poseduju veći sadržaj prirodnih sastojaka sa antioksidativnim svojstvima (tokoferoli, karotenoidi, fenolna jedinjenja) koji mogu doprineti boljoj održivosti ovih ulja.

Generalno, održivost se procenjuje određivanjem vremena tokom koga se ulje može sačuvati od jače izražene oksidacije. Metode koje se primenjuju za određivanje održivosti zasnivaju se na ubrzanoj oksidaciji ulja pod uticajem jednog ili više faktora koji ubrzavaju proces. U praksi su najveću primenu našle metode kod kojih se oksidacija ubrzava uticajem toplote i produvavanjem vazduha kroz uzorak.

3. CILJ RADA

Prema zvaničnim podacima Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije u periodu od 2005. do 2014. godine subvencionisano je preko 3000 hektara novih zasada vinove loze, a ukupne površine novih vinograda su znatno veće. Kao rezultat ove tendencije širenja površina pod vinovom lozom i jačanja vinogradarstva i vinarstva u Srbiji i regionu, iz godine u godinu nastaje sve veća količina otpada iz primarne prerade grožđa. Navedeni otpad se klasifikuje kao čvrst otpad i ukoliko se ne procesuira na adekvatan način predstavlja potencijalno veliki problem zbog mogućnosti negativnog uticaja na životnu sredinu; a samim tim predstavlja veliki teret i obavezu za prerađivače grožđa. Posmatrano sa druge strane navedeni otpad zbog svojih bioloških i energetskih vrednosti predstavlja izuzetnu sirovinu za proizvodnju veoma kvalitetnih namirnica i sirovina sa veoma širokim poljem upotrebe.

Cilj ovog rada je predstavljanje mogućnosti korišćenja semenke grožđa kao sekundarne sirovine koja se javlja u procesu proizvodnje vina i sokova i definisanje kvalitativnih parametara koji je svrstavaju među sirovine veoma iskoristljive za dobijanje ulja vrhunskog kvaliteta. Takođe, cilj rada je i karakterizacija dobijenog ulja iz semenki grožđa i predstavljanje metoda za njegovo izdvajanje.

S obzirom da sadržaj ulja u semenkama zavisi od sorte grožđa, klimatskih uslova i uslova gajenja vinove loze, cilj ovog rada je da se utvrdi potencijal semenki izdvojenih iz grožđa koje je proizvedeno na području centralne Srbije (rejon Tri Morave), sa aspekta ekstrakcionog prinosa i kvaliteta dobijenog ulja. Pored izdvajanja i karakterizacije ulja iz semenki internacionalnih crvenih sorti grožđa, poseban cilj ove disertacije je izdvajanje i karakterizacija ulja od semenki autohtone sorte grožđa Prokupac i poređenje sa kvalitetom ulja od semenki grožđa svetski priznatih crvenih sorti: Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Merlot i Gamay.

Kako postoji više metoda za izdvajanje ulja iz semenki grožđa, cilj ovog rada je ispitivanje uticaja metode izdvajanja na prinos i kvalitet izdvojenog ulja da bi potom bili predloženi tehnološki postupci koji će omogućiti optimizaciju određenih tehnika izdvajanja ulja. U ovom delu rada kao tehnike izdvajanja ulja iz semenki grožđa koristiće se hladno ceđenje, ekstrakcija organskim rastvaračem uz tretman ultrazvukom, natkritična ekstrakcija kao i ekstrakcija po Soxhletu.

Deo rada koji se bavi mogućnostima primene ultrazvuka u procesu ekstrakcije ulja ima za cilj utvrđivanje uticaja ultrazvučnih talasa na povećanje ekstrakcionog prinosa i na kvalitet dobijenog ulja; kao i utvrđivanje idealnog vremena izlaganja ultrazvuku sa aspekta ekstrakcionog prinosa i kvaliteta dobijenog ulja.

Ispitivanje uticaja uklanjanja spoljnjeg omotača semenke grožđa na prinos i fizičko–hemijske karakteristike ulja, ima za cilj utvrđivanje mogućnosti primene ove operacije kao predtretmana semenke u cilju optimizacije metode hladnog ceđenja ulja.

Kao završna faza svih navedenih eksperimenata predviđeno je određivanje ekstrakcionog prinosa, fizičko–hemijskih karakteristika, sastava masnih kiselina, sadržaja biološki aktivnih komponenti, oksidativne stabilnosti i antioksidativnog kapaciteta dobijenih uzoraka ulja. Pored korišćenja standardnih volumetrijskih analitičkih metoda, spektrofotometrijskih i hromatografskih tehnika, cilj ovog rada je i predstavljanje mogućnosti primene novih analitičkih – instrumentalnih metoda u određivanju otpornosti na oksidaciju i antioksidativne sposobnosti ulja primenom DSC metode i hemin-luminiscencije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Postavka eksperimenta

Savremeni svetski trendovi u proizvodnji i primeni prehrambenih proizvoda su sve više usmereni na procesuiranje i iskorišćenje sirovina koje su bogate biološki aktivnim komponentama u cilju dobijanja proizvoda sa pozitivnim dejstvom na zdravlje potrošača. Ukoliko se dodatno radi i o sirovinama koje predstavljaju sporedni proizvod neke proizvodnje i otpadni materijal kojim treba upravljati, značaj procesuiranja takvih sirovina je jako veliki. Internacionalna naučna istraživanja u ovoj oblasti su stavljala akcenat na pronalaženje pogodnih uslova izdvajanja - ekstrakcije ulja iz semenki grožđa sa aspekta povećanja ekstrakcionog prinosa, kao i na karakterizaciju ulja izdvojenog iz semenki grožđa sorti koje su poznate i rasprostranjene u celom svetu (Cabernet Sauvignon-a, Pinot Noir-a, i sličnih) kao i određenih autohtonih sorti karakterističnih za zemlju u kojoj se vrši ispitivanje. Do sada ispitivane tehnike izdvajanja – ekstrakcije ulja su često ograničavajuće sa aspekta izdvajanja ulja sa visokim sadržajem biološki aktivnih komponenti (polifenolnih jedinjenja, tokoferola) kojima raspolaže semenka grožđa kao sirovina.

Osnovna pretpostavka u ovom radu je da će se predloženim eksperimentima doći do rezultata koji će biti od koristi pri izboru metode izdvajanja ulja kako sa kvantitativnog tako i sa kvalitativnog aspekta. Predloženi eksperimenti treba da iskažu potencijal semenki najzastupljenijih crvenih sorti grožđa sa područja Centralne Srbije, za proizvodnju ulja. Posebna pažnja u ovom radu je posvećena izdvajanju i fizičko-hemijskoj karakterizaciji ulja iz semenki grožđa naše autohtone sorte Prokupac i poređenju sa kvalitetom ulja izdvojenih iz semenki svetski poznatih sorti grožđa. Pored navedenog, kroz disertaciju će biti predstavljene i mogućnosti primene metode koja omogućava brzu procenu otpornosti ulja na oksidaciju (diferencijalno skenirajuće kalorimetrije - DSC) i metode hemin-luminiscencije za određivanje antioksidativnog kapaciteta ulja.

Osnovni materijal korišćen u eksperimentima su semenke crvenih sorti grožđa Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Gamay i Prokupac. Grožđe iz kog su izdvojene semenke korišćene u eksperimetu proizvedeno je u vinogradima preduzeća

Rubin AD iz Kruševca na sledećim lokacijama: vinograd Dobričevo – Paraćinsko vinogorje i vinograd Grevci – Ražanjsko vinogorje u rejonu Tri Morave.

Izdvajanje ulja vršeno je hladnim ceđenjem i sledećim metodama ekstrakcije: po Soxhletu, organskim rastvaračem uz tretman ultrazvukom, i ugljenik(IV)-oksidom u natkritičnom stanju.

Hladnom ceđenju su podvrgnute cele semenke bez prethodnog usitnjavanja (mlevenja), dok je procesima ekstrakcije prethodito proces usitnjavanja – mlevenja semenki. Mlevenje semenki je obavljeno na mlinu za žitarice; dok je hladno ceđenje izvršeno na hidrauličkoj presi za ulje. U procesima ekstrakcije je korišćena aparatura za ekstrakciju po Soxhletu, ultrazvučno kupatilo i aparatura za natkritičnu ekstrakciju.

U procesima ekstrakcije po Soxhletu i u ekstrakciji organskim rastvaračem uz tretman ultrazvukom kao rastvarač je korišćen n-heksan hromatografske čistoće a razdvajanje ulja od organskog rastvarača vršeno je na rotacionom vakuum uparivaču. U procesu natkritične esktrakcije kao ekstragens (rastvarač) korišćen je ugljenik(IV)-oksid. Ekstrakcioni prinosi utvrđeni su merenjem na analitičkoj vagi.

Fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih uzoraka ulja vršena je primenom standardnih metoda: određivanje sadržaja ukupnih polifenola vršeno je spektrofotometrijskom metodom, određivanje sadržaja vitamina E (α-tokoferola) HPLC metodom, sastav masnih kiselina primenom metode gasne hromatografije. Održivost ulja (otpornost na oksidaciju) procenjivana je primenom DSC metode i rancimat testom a antioksidativni kapacitet ulja je utvrđen primenom hemin-luminiscencije i spektrofotometrijskom metodom (DPPH test).

Obrada dobijenih podataka vršena je primenom uobičajenih statističkih metoda. Veličina uzoraka za analize, kao i parametri koji su praćeni definisani su metodama analize koje se inače primenjuju u analitici ulja. Statistički su praćeni ekstrakcioni prinosi i kvalitet ulja u zavisnosti od primenjene metode za izdvajanje ulja a rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4.2. Materijali

U radu su korišćene semenke crvenih sorti grožđa proizvedenih u vinogradima fabrike Rubin AD iz Kruševca. Korišćene su semenke grožđa sledećih sorti:

- Cabernet Sauvignon (berba 2012) iz vinograda u Dobričevu

- Cabrenet Sauvignon (berba 2013) iz vinograda u Dobričevu
- Merlot (berba 2013) iz vinograda u Grevcima
- Pinot Noir (berba 2013.) iz vinograda u Dobričevu
- Gamay (berba 2013.) iz vinograda u Dobričevu
- Prokupac (berba 2013.) iz vinograda u Dobričevu

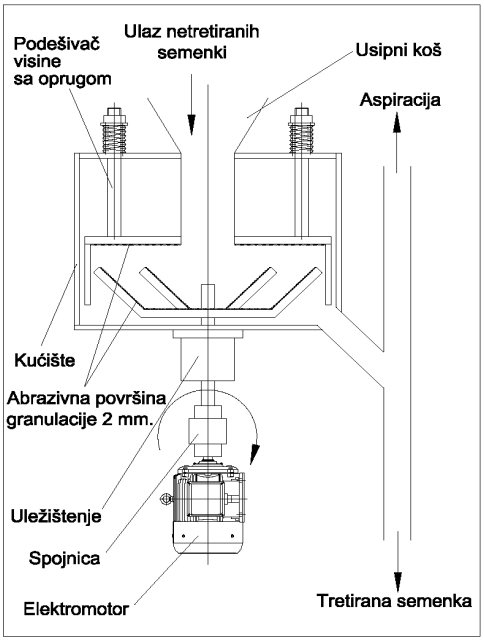
Grožđe je brano u punoj tehnološkoj zrelosti jer je bilo namenjeno proizvodnji crvenih vina. Postupak izdvajanja semenki iz kljuka kao i postupak sušenja, čuvanja i pripreme semenki do momenta izdvajanja ulja je bio identičan za sve sorte i obavljen je na sledeći način:

- semenke grožđa su izdvojene iz kljuka u toku alkoholne fermentacije (trećeg dana nakon njenog početka) putem posebnog ventila na vinifikatoru (Azzini, Italija) koji je predviđen za separaciju semenki;
- nakon izdvajanja, semenke su isprane u hladnoj vodi a zatim preko sistema sita odvojene od ostalih nečistoća (polomljenih delova semenke, ostataka pokožice);
- nakon toga semenke su skladištene u zamrzivaču kako bi se sprečile eventualne mikrobiološke promene;
- pre početka eksperimenta semenke su izvađene iz zamrzivača i osušene na suncu (pod atmosferskim uticajem) uz tri mešanja dnevno. U toku sušenja meren je sadržaj vlage a sušenje je prekinuto kada je sadržaj vlage pao ispod 10%.

Priprema semenki za ekstrakciju ulja n-heksanom i ugljenik(IV)-oksidom u natkritičnim uslovima, izvršena je mlevenjem na horizontalnom mlinu za kafu sa prirodnim kvarcnim kamenom prečnika 700 mm, kapaciteta 100 kg/h, pri 150 obrtaja u minuti (proizvođač Elektron Dublje, Srbija). Mlevene semenke su hvatane u hermetik kese za čuvanje uzoraka kako bi se uzorci do sprovođenja eksperimenta što bolje sačuvali od oksidativnih procesa. Semenke koje su korišćene za dobijanje hladno ceđenog ulja su do ceđenja čuvane u hermetik kesama bez mlevenja.

U cilju optimizacije procesa hladnog ceđenja, izvršen je tretman semenki autohtone sorte grožđa Prokupac na mašini za poliranje zrna - ribalici za žitarice. Tretmanom na ovoj mašini uklonjen je deo čvrstog spoljnjeg omotača semenke (kutikula sa delom epidermisa) sa ciljem otvaranja pora i olakšavanja procesa izdvajanja ulja tokom hladnog ceđenja. Za navedeni tretman korišćena je ribalica za žitarice, a tretman je izvršen propuštanjem celih semenki kroz mašinu pri broju obrtaja radnog kola ribalice

od 2000 u minutu; granulacija abrazivne površine radnog kola je bila 2 mm. Tretman je izvršen na 3 identična uzorka od po 3 kg semenki, pri čemu je svaki uzorak propušatan kroz mašinu po 5 puta i nakon svakog propuštanja merena je masa semenki kako bi se utvrdilo koliko je spoljnjeg omotača uklonjeno. Na slici 4.1 je prikazana detaljna skica mašine sa svim radnim elementima i tokovima semenke.



Slika 4.1 Skica ribalice za žitarice (Elektron Dublje, Srbija)

4.3. Hemikalije i aparati

U radu su korišćene sledeće hemikalije: n-heksan hromatografske čistoće proizvođača Merck i CO_2 čistoće 99% proizvođača Messer Tehnogas, za ekstarkcije ulja. Za hromatografske analize su korišćeni standardi i hemikalije hromatografske čistoće proizvođača Merck (metanol), Acros organics (α–tokoferol). Ostale hemikalije upotrebljavanje u ovom radu bile su analitičke čistoće i nabavljene su od sledećih proizvođača: Merck (etanol, H_2O_2, fenolftalein, sirćetna kiselina, KJ, skrob), Sigma Aldrich (aceton, luminol, hemin, hloroform, BF_3, Na_2CO_3, NaOH, $Na_2S_2O_3$, KOH, HCL, BrI), Alfa Easer (galna kiselina), Messer Tehnogas (sintetički vazduh sastava 22% O_2 i 78% N_2).

U radu se korišćene sledeće aparature: mašina za poliranje zrna - ribalica za žitarice (Elektron – Dublje, Srbija); hidraulička presa (Hanaro, Koreja); postrojenje za natkritičnu ekstrakciju (Autoclave Engineers SCE Screening System, SAD);

ultrazvučna kada (Bandelin Sonorex, Nemačka); aparatura za ekstrakciju po Soxhletu: vakuum uparivač (Senco, Kina); skenirajući elektronski mikroskop (SEM, JEOL JSM 6390 LV, Japan); Fluorimetar (Jenway 6200, Velika Britanija); rancimat aparat (Metrohm Rancimat 743, Engleska); spektrofotometar (Antelie Graphic Secomam, Francuska); Bischoff HPLC uređaj (Bischoff, Leonberg, Nemačka); DSC-TG uređaj (DSC111-TG Setaram, Francuska); GC uređaj (GC5160 gasni hromatograf Carlo Erba, Milano, Italija).

4.4. Izdvajanje ulja iz semenki grožđa

4.4.1. Izdvajanje ulja postupkom hladnog ceđenja

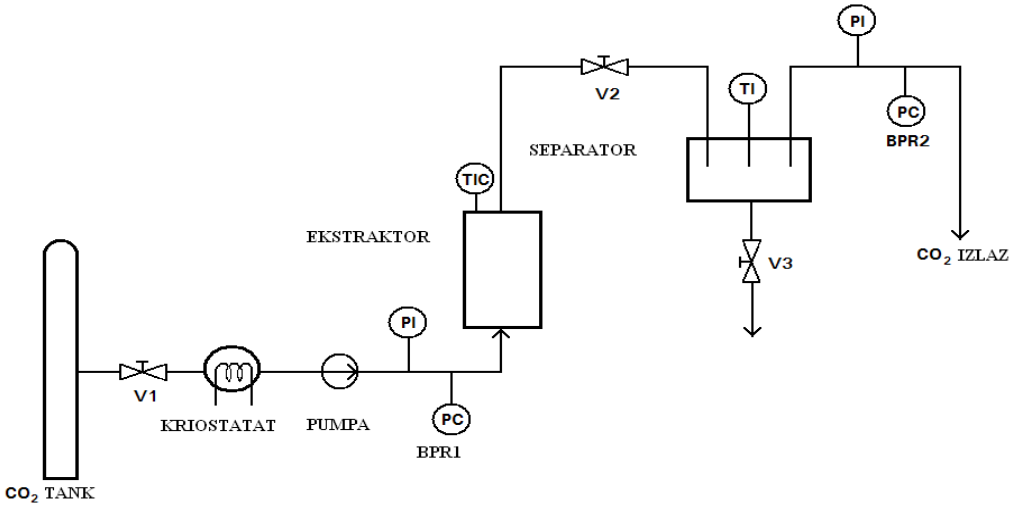
Hladno ceđenje (HC) ulja je izvršeno na hidrauličkoj presi korejanskog proizvođača Hanaro, Tip A (Slika 4.2). Ceđenje je izvršeno pod sledećim radnim uslovima: sadržaj vlage semenki je pre ceđenja podešen na vrednost od 8 - 10%, ceđene su cele semenke bez prethothodnog usitnjavanja (mlevenja). Radni pritisak u cilindru je bio 600 bara, dok je temperatura cilindra bila podešena na 50 ºC. Količina semenki ceđena u jednoj šarži je bila 3 kg, vreme ceđenja jedne šarže je bilo 1,5 h a temperatura ulja na izlazu iz prese je bila manja od 30 ºC. Ceđenje je ponovljeno po 3 puta za svaku sortu.

Slika 4.2. Hidraulička presa “Hanaro“ Tip A

4.4.2. Izdvajanje ulja natkritičnom ekstrakcijom

Natkritična ekstrakcija (NKE) je vršena na postrojenju *Autoclave Engineers SCE Screening System, SAD* (Slika 4.3), na katedri za Organsku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu. Kao natkritični fluid za ekstrakciju je korišćen komercijalni CO_2 (čistoće 99%, *Messer-Tehno-gas*, Beograd, Srbija).

Slika 4.3. Postrojenje Autoclave Engineers SC Screening System



Slika 4.4. Uprošćena šema postrojenja za natkritičnu ekstrakciju Autoclave Engineers SCE Screening System (*Žižović, 2009*)

Postupak

Kao mehanički predtretman ovoj ekstrakciji na prethodno opisan način je izvršeno mlevenje osušenih semenki grožđa. Kako je nakon usitnjavanja dobijen materijal u formi praha čije su čestice manje od 0,4 mm (promer pora najmanjeg sita), prosejavanje

nije bilo potrebno. Dobro zatvorena filter kesica sa 25,0 g odmerenog usitnjenog materijala uneta je u ekstraktor. Radna zapremina ekstraktora je 150 cm^3, a njegovo zagrevanje se vrši električnim grejačem koji je povezan sa indikatorom i uređajem za kontrolu temperature, kako bi se tokom ekstrakcije održavala željena temperatura. CO_2 je obezbeđen iz boce sa sifonom, iz koje ulazi u kriostat gde se hladi (Slika 4.4). Da bi CO_2 bio u tečnom stanju na ulasku u pumpu, kriostat se održava na temperaturi od -12˚C. Ohlađen CO_2 se pomoću pumpe (P_1), uvodi u zagrejan ekstraktor na temperaturu od 50˚C do postizanja pritiska od 25 MPa, protok je 0,3 kg CO_2/h. Regulacija pritiska u ekstraktoru se vrši pomoću povratnog regulatora pritiska (BPR-1) a protok CO_2 se podešava sistemom ventila. Po izlasku iz ekstraktora, CO_2 se, zajedno sa uljem iz semenki rastvorenim u njemu, preko redukcionog ventila (V_2) ispušta u separator, koji radi na sobnoj temeperaturi. Ventil se greje zato što je ekspanzija CO_2 endoterman proces. Nakon otpuštanja CO_2 u atmosferu, rastvorak ostaje u separatoru.

U slučaju ekstrakcije sprovedene u ovom radu, s obzirom na malu masu upotrebljenog biljnog materijala i očekivanu malu količinu dobijenog ulja, ekstrakt je sakupljan u epruveti odmah nakon prolaska kroz regulacioni ventil V_2 (kako bi se izbegli gubici ulja), a CO_2 je ispuštan u atmosferu. Proces ekstrakcije je završen kada je uzorak iscrpljen. Postupak je ponavljan za ekstrakciju semenki svih pet sorti grožđa.

4.4.3. Izdvajanje ulja ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom

Izdvajanje ulja ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom (UAE) je izvršeno na sledeći način: u uzorak samlevene semenke grožđa (50 ± 0,01 g) je dodato 100 mL rastvarača (hromatografske čistoće); uzorak je stavljen u erlenmajer i prekriven aluminijumskom folijom. U cilju utvrđivanja optimalnog vremena izlaganja uzorka ultrazvuku sa aspekta ekstrakcionog prinosa i kvaliteta dobijenog ulja, najpre su izvršene sledeće probe: erlenmajer sa uzorkom semenki sorte Cabernet Sauvignon iz berbe 2012. i rastvaračem stavljen je u ultrazvučnu kadu „BANDELIN SONOREX“, zapremine 3 litra, frekvencije 35 kHz (Slika 4.5) i tretiran ultrazvukom u trajanju od 15, 30, 45, 60, 75, 90,105, 120 i 135 min.

Slika 4.5. Ultrazvučna kada „BANDELIN SONOREX“, Rubin AD

U slučajevima gde su tretmani trajali duže od 15 minuta pravljeni su prekidi nakon svakih 15 minuta i vršena je zamena vode u ultrazvučnom kupatilu kako bi se izbeglo povećanje temeprature iznad 30°C. Nakon što je kao optimalno vreme trajanja ultrazvučne ekstrakcije usvojeno vreme od 90 minuta, za svaku narednu ekstrakciju (iz semenki ostalih sorti i semenki sorte Cabernet Sauvignon iz berbe 2013.) je korišćeno ovo vreme. Nakon završene ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakt iz uzorka je kvantitativno prenet u balon dekantiranjem ekstrakta kroz filter papir (plava traka), nakon toga sadržaj u erlenmajeru je više puta ispiran manjim porcijama heksana kako bi se kompletan ekstrakt odvojio od uzorka. Izdvajanje ulja iz ekstrakta (razdvajanje od rastvarača) izvršeno je na rotacionom vakuum uparivaču „SENCO“ na temperaturi od 37 °C, pritisku od -0,8 bara i sa brojem obrtaja od 150 u minutu do konstantne mase.

4.5. Metode

4.5.1. Morfologija i anatomija semenki

Morfologija i anatomija semenki ispitivane su primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM, JEOL JSM-6390 LV). Pre analize, uzorci uzdužno presečenih semenki prekriveni su zlatom primenom odgovarajućeg uređaja za nanošenje zlata (Baltec scd 005). Vreme nanošenja je bilo 100 ms uz primenu struje od 30 mA. Snimanje mikrografa je vršeno sa JEOL 2010 opremom na 200 kV, sa visokom rezolucijom. Vršena su uvećanja do hiljadu puta.

4.5.2. Određivanje sadržaja vlage u semenkama

Sadržaj vlage u semenkama je izmeren standardnom gravimetrijskom metodom (SRPS EN ISO 665:2008). Uzorci semenki su sušeni na 105 °C u sušnici „Insrtumentaria“ Zabreb, do konstantne mase. Sadržaj vlage je izračunat na osnovu gubitka mase koji je nastao usled sušenja.

4.5.3. Određivanje ukupnog sadržaja ulja u semenkama metodom po Soxhletu

Ukupni sadržaj ulja u semenkama je određen po Soxhletu (SRPS EN ISO 659:2011). Uzorak (10 g mlevene semenke, odmerene sa tačnošću od 0,001 g u celuloznim hilznama na čije dno je stavljena vata) je pokriven vatom i stavljen u ekstraktor pre sklapanja aparature; dok je čaša u kojoj je bio uzorak semenki isprana n-heksanom, koji je preko uzorka nasut u ekstraktor. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu se sastoji iz balona, ekstraktora (staklenog dela u koji se stavlja hilzna sa uzorkom) i kondenzatora. Aparatura je nakon sklapanja postavljena na vodeno kupatilo, a kondenzator je pomoću gumenih creva povezan sa česmom. Heksan je nakon toga dolivan u ekstraktor sve dok se preko cevi cela količina iz ekstraktora ne presifonira u balon. Aparatura je nakon toga zatvorena i postavljena na vodeno kupatilo.

Proces ekstrakcije se odvija na taj način što se heksan iz balona destiluje, kondenzuje u kondenzatoru i kaplje preko uzorka u ekstraktor. Kada heksan u ekstraktoru potpuno ispuni prelivnu cev on (sa rastvorenim uljem) automatski iscuri u balon. Ekstrakcija je izvedena na temperaturi od 80 °C u trajanju od 6 sati (dok heksan 6 do 10 puta ne pređe iz ekstraktora u balon). Aparatura na kojoj je izvedena ekstrakcija po Soxhletu je prikazana na slici 4.6.

Nakon završene ekstrakcije, aparatura je raskloplјena a balon sa rastvaračem i uljem je prenešen na rotacioni vakuum uparivač gde je izvršeno odvajanje rastvarača od ulja. Izdvajanje ulja iz ekstrakta (razdvajanje od rastvarača – heksana) izvršeno je na rotacionom vakuum uparivaču „SENCO“ na temperaturi od 50 °C, pritisku od -0.8 bara i brojem obrtaja od 150 u minutu, do konstantne mase.

Slika 4.6. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu i vakuum uparivač „SENCO“ (Rubin AD)

4.5.4. Određivanje prinosa ulja

Prinosi ulja su određeni gravimetrijskom metodom na analitičkoj vagi, merenjem mase semenke pre početka ceđenja ili ekstrakcije i mase izdvojenog ulja nakon ceđenja ili ekstrakcije. Kod dobijenih uzoraka ulja, prinosi ulja nakon ceđenja i ekstrakcije su izračunati po sledećoj formuli:

$$P(\%) = (M_u/M_s)x100 \qquad (4.1.)$$

i izraženi u %-ima dobijenog ulja u odnosu na masu semenke.

U formuli je: P – prinos ulja nakon ceđenja ili ekstrakcioni prinos izražen u %; M_u – masa izdvojenog ulja nakon ceđenja ili ekstrakcije (g); M_s – masa semenki pre ceđenja ili masa mlevenih semenki pre ekstrakcije (g).

4.5.5. Odredjivanje gubitka mase sušenjem (sadržaj vlage i isparljivih nečistoća u ulju)

Odredjivanje gubitka mase sušenjem kod ispitivanih uzoraka ulja je izvršeno je po standardnoj metodi (SRPS EN ISO 662:2009), na infracrvenoj vagi držanjem uzorka na konstantnoj temperaturi od 105 °C do postizanja konstantne mase.

4.5.6. Odredjivanje tačke dimljenja

Tačka dimljenja ispitivanih ulja određena je aparatom po Cleveland-u, model S-355 proizvođač HERZOG GmbH Nemačka (po metodi FM 5-519, 2000).

4.5.7. Određivanje relativne gustine

Gustina ispitivanih ulja određena je standardnom metodom (SRPS ISO 6883:2003) pomoću piknometra. Piknometar je staklena bočica određene zapremine, koja ima stakleni zatvarač kroz koji prolazi kapilarni kanal. Kada se piknometar napuni tečnošću i zatvori, višak tečnosti izađe kroz kapilaru i piknometar sadrži tačno određenu zapreminu tečnosti. Merenje gustine tečnosti vrši se tako što se opran i osušen piknometar zajedno sa zatvaračem najpre izmeri na analitičkoj vagi; potom se meri napunjen (tako da je tečnost napunila kapilaru) destilovanom vodom, i na isti način napunjen tečnošću čija se gustina određuje.

Gustina tečnosti određuje se kao:

$$\rho = \rho_o \frac{m_{\text{piknometra sa tecnoscu}} - m_{\text{praznog piknometra}}}{m_{\text{piknometra sa vodom}} - m_{\text{praznog piknometra}}} \tag{4.2}$$

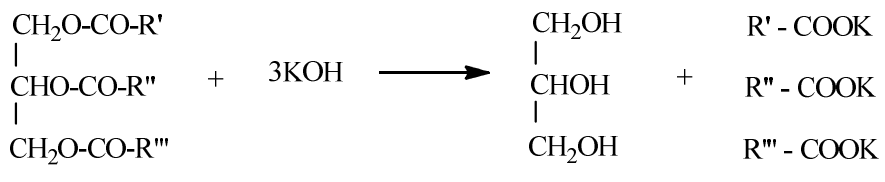
gde je ρ_o gustina vode na odgovarajućoj temperaturi; dok se relativna gustina (R_d) tečnosti određuje kao:

$$R_d = \frac{\rho}{\rho_o} \tag{4.3}$$

4.5.8. Određivanje saponifikacionog broja

Određivanje saponifikacionog broja izvršeno je po standardnoj metodi (SRPS EN ISO 3657:2002). Vrednost saponifikacionog broja, kao identifikacione konstante, zavisi od relativnih molekulskih masa masnih kiselina koje ulaze u sastav masti ili ulja. Ukoliko je relativna molekulska masa veća, saponifikacioni broj je manji i obrnuto. Kako masti i ulja sadrže uglavnom acilglicerole masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma, ne postoji značajna razlika u vrednostima saponifikacionog broja između masti i ulja, što nije slučaj i sa jodnim brojem. Na vrednost saponifikacionog broja utiče takođe i sadržaj neosapunjivih materija.

Saponifikacija masti i ulja se vrši pomoću alkoholnog rastvora kalijum-hidroksida a višak neutrošenih alkalija se retitrira rastvorom hlorovodonične kiseline.



(4.4)

Saponifikacija se dešava u 2 faze: u prvoj, masne kiseline alkoholizom prelaze u odgovarajuće etilestre, koji su rastvorljivi u alkalno-alkoholnoj sredini (iz tih razloga se upotrebljava alkoholni rastvor KOH);

$$C_3H_5(OCOR)_3 + 3\,C_2H_5OH \rightleftharpoons C_3H_5(OH)_3 + 3R\text{-}COOC_2H_5 \quad (4.5)$$

dok se u drugoj fazi nagrađeni estri lako saponifikuju, dajući sapune :

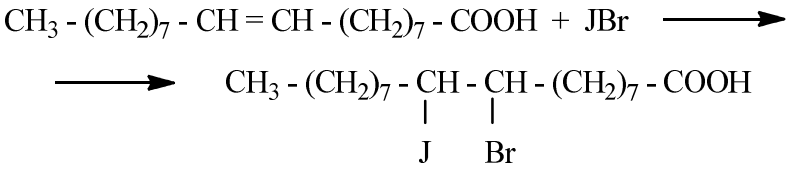
$$R\text{-}COOC_2H_5 + KOH \rightleftharpoons R\text{-}COOK + C_2H_5OH \quad (4.6)$$

Određivanje se vrši sa oko 2 g ulja u erlenmajeru od 300 mL u koji se doda 25 mL etanolnog rastvora KOH, erlenmajer se spoji sa vazdušnim kondenzatorom, stavi na peščano kupatilo i kuva najmanje 1 h uz povremeno mućkanje, dok saponifikacija ne bude završena. Istovremeno se uradi i slepa proba pod istim uslovima i na isti način, bez ulja. Posle završene saponifikacije, bistrom vrućem rastvoru doda se 0,5 mL indikatora i titrira sa 0,5 mol/L HCl do promene boje. Saponifikacioni broj **(Sb)** predstavlja broj mg KOH koji je potreban za potpunu saponifikaciju (slobodnih i estarski vezanih) masnih kiselina u 1 g masti ili ulja.

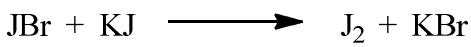
4.5.9. Određivanje jodnog broja (Jbr)

Jodni broj je određen standardnom metodom po Wijs-u (SRPS ISO 3961:2001). Jodni broj je karakterističan za masti i ulja i predstavlja jedan od analitičkih parametara za određivanje identiteta i čistoće masti i ulja. Nezasićene masne kiseline imaju osobinu da adiraju po jedan molekul halogena na svaku dvogubu vezu. Vrednost jodnog broja zavisi od sadržaja nezasićenih masnih kiselina i broja dvogubih veza u njima. Svi halogeni ne deluju na isti način na nezasićene masne kiseline. Slobodan hlor i brom pored adicije vrše i reakcije supstitucije. Da bi se izbegla reakcija supstitucije i vršila samo adicija, kod metoda za određivanje jodnog broja upotrebljavaju se rastvori jodmonohlorida u alkoholu ili glacijalnoj sirćetnoj kiselini, i jod-monobromida u glacijalnoj sirćetnoj kiselini.

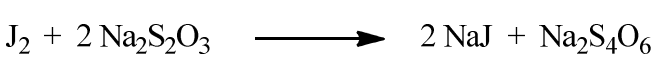
Pri određivanju jodnog broja, određena količina ispitivanog ulja rastvori se u indiferentnom rastvaraču (hloroformu) i tretira rastvorom jod-monobromida koji se adira na dvogube veze masnih kiselina. Dodatkom kalijum-jodida iz neutrošene količine jod-monobromida oslobađa se odgovarajuća količina joda, koji se titruje rastvorom natrijum-tiosulfata uz skrob kao indikator.



(4.7)



(4.8)



(4.9)

Uporedo se radi i slepa proba da se odredi ukupna količina halogena. Jodni broj označava broj grama joda koji se adira na nezasićene masne kiseline u 100 g masti ili ulja.

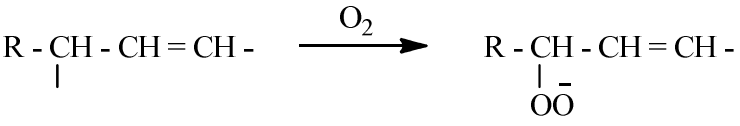
4.5.10. Određivanje kiselinskog broja (Kbr)

Kiselost ulja je određena standardnom metodom alkalimetrijske tiracije (SRPS EN ISO 660:2011), to jest titracijom ulja rastvorenog u rastvaraču etanol – dietil etar (1:1), standardnim rastvorom kalijum hidroksida. Titracija je vršena uz fenolftalein kao indikator, do promene boje (smeša etanol - dietil etar je prethodno neutralisana, jer dietil etar može da reaguje kiselo, pa bi se jedan deo baze utrošio na neutralizaciju kiselina iz dietil etra). Utrošak baze je direktno proporcionalan količini slobodnih masnih kiselina.

Sadržaj slobodnih masnih kiselina može da se izrazi kao kiselinski broj, kiselinski stepen ili u procentima oleinske kiseline (1 mL 1mol/L rastvora alkalnih hidroksida odgovara 0,2823 g oleinske kiseline). Kiselinski broj predstavlja broj mg KOH koji je potreban za neutralizaciju masnih kiselina u 1 g masti ili ulja. Kiselinski stepen označava broj mL 1mol/L rastvora alkalnih hidroksida potrebnih za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u 100 g masti ili ulja. U ovom radu su prikazane vrednosti kiselinskog broja ispitivanih ulja.

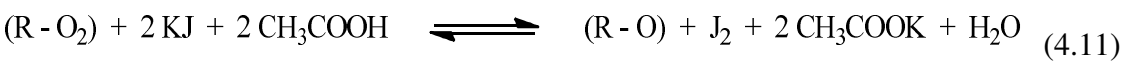
4.5.11. Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj (Pbr) ulja određen je standardnom jodometrijskom metodom (SRPS EN ISO 3960:2011), kojom se određuju produkti nastali oksidacijom ulja i masti. Na slobodne radikale masnih kiselina, koji nastaju u procesu autooksidacije masti i ulja vezuje se molekulski kiseonik.

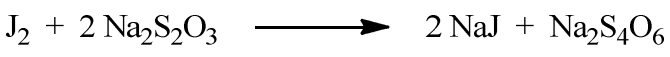


(4.10)

Određivanje količine nastalih produkata (hidroperoksida i peroksida ulja) vrši se na osnovu njihove reakcije sa jodovodoničnom kiselinom, koja se oslobađa iz KJ u kiseloj sredini. Peroksidi u kiseloj sredini oksidišu jodid u jod (čija je količina direktno proporcionalna količini prisutnih hidroperoksida) a koji se zatim titrira rastvorom natrijum tiosulfata uz skrob kao indikator.



(4.11)



(4.12)

Peroksidni broj predstavlja broj mL 0,002 mol/L rastvora natrijum-tiosulfata, koji se utroši na jod oslobođen iz kalijum-jodida dejstvom peroksida iz 1 g masti.

4.5.12. Određivanje anisidinskog broja (Abr)

Anisidinski broj daje informaciju o količini neisparljivih karbonilnih jedinjenja u ulju, to jest, o sadržaju sekundarnih proizvoda oksidacije. Određuje se standardnom UV-VIS spektrofotometrijskom metodom (SRPS EN ISO 6885:2011), kojom se direktno dobija sadržaj ovih jedinjenja. Određivanje anisidinskog broja se zasniva na reakciji *p*-anisidina sa višim nezasićenim aldehidima, pri čemu nastaju Schiff-ove baze koje apsorbuju u UV oblasti sa maksimumom pri talasnoj dužini od 350 nm. Dakle, apsorpcija svetlosti koju vrši rastvor ulja u izooktanu na 350 nm, a usled reakcije sa *p*-anisidinom, je merilo količine prisutnih karbonilnih jedinjenja. Anisidinski broj, izražen kao 100 puta vrednost apsorbancije 1%-nog rastvora u reakciji sa *p*-anisidinom na 350 nm, izračunava se kao:

$$Abr\ (100\ A^{1\%}_{350\,nm}) = 25\ \frac{[(1.2\,A_1 - A_2) - A_o]}{m} \tag{4.13}$$

gde su: Ao – apsorbancija rastvora uzorka bez *p*-anisidina, u odnosu na izooktan; A_1 – apsorbancija rastvora uzorka sa *p*-anisidinom, u odnosu na izooktan; A_2 – apsorbancija slepe probe, u odnosu na izooktan; m – masa uzorka za ispitivanje, u gramima; 25 i 1,2 su faktori razblaženja.

4.5.13. Određivanje oksidativne vrednosti (OV)

Oksidativna vrednost ulja je pokazatelj sadržaja primarnih i sekundarnih produkata oksidacije, i izračunava se pomoću sledeće formule (*Gordon, 2001*):

$$OV = 2 \text{ x peroksidni broj} + \text{anisidinski broj} \quad (4.14)$$

4.5.14. Određivanje sastava masnih kiselina primenom gasne hromatografije (GC)

Sadržaj masnih kiselina određen je primenom gasne hromatografije metil estara masnih kiselina, po standardnoj metodi (IUPAC 2.302, 1992). Pre hromatografske analize izvršena je transesterifikacija triacilglicerola ekstrahovanih iz ulja, primenom rastvora BF_3 u metanolu (12% v/v), po standardnoj metodi (IUPAC 2.301, 1992). Kvantitativna gasno hromatografska analiza vršena je primenom GC5160 gasnog hromatografa (Carlo Erba, Italija), primenjena je kapilarna kolona (30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm film) ZB-5 ms (Phenomenex, USA). Uslovi hromatografskog određivanja bili su sledeći: 1 μL splitless injekcija na 100 °C, 3 minuta izotermni režim, zagrevanje 10 °C/minutu do 220 °C, 20 minuta izotermni režim, drugo zagrevanje 40 °C/minutu do 300 °C. Temperatura injektora 270 °C a splitless vreme 60 s. Noseći gas helijum sa protokom 1,5 mL/minutu. Detekcija komponenti je vršena primenom plameno jonizujućeg detektora (flame ionization detector - FID), na 300 °C. Kvantitativna analiza je vršena primenom internih standarda, dok je kalibraciona kriva dobijena korišćenjem pentadekanske kiseline.

4.5.15. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja

Kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) vršeno je kolorimetrijskom metodom opisanom u literaturi (*Pardo et al., 2009; Ceci i Carelli, 2010*) i zasnovano je na reakciji Folin-Čikalteovog reagensa sa hidroksilnim grupama u molekulima fenolnih jedinjenja. Ekstrakcija TPC iz ulja vršena je saglasno proceduri opisanoj u literaturi (*Parry et al., 2005*) smešom vode i metanola: u 1 ± 0,0001 gram ulja dodavano je 5 mL smeše metanol – voda (90:10), sadržaj se zatim držan na ultrazvučnom kupatilu 5 minuta a zatim je kvantitativno prenet u kivetu za centrifugiranje gde je 10 minuta centrifugiran na 4000 obrtaja u minutu, kako bi se

izvršilo raslojavanje faza (ulja i rastvarača). Procedura ekstrakcije je ponovljena tri puta za svako ulje. Dobijeni metanolni ekstrakti su pomešani, profiltrirani kroz kvalitativni filter papir i na rotacionom vakuum uparivaču upareni do suva. Dobijeni suvi ostaci su rastvoreni sa 2,5 mL rastvora metanol – voda (10:90) i čuvani na -20 ºC do spektrofotometrijskog merenja; pre koga su rastvori centrifugirani na prethodno opisani način, kako bi se uklonio eventualni zaostatak uljne faze. Potom su u 0,5 mL tako dobijenog rastvora dodati Folin-Čikalteov reagens i 20%-ni rastvor natrijum karbonata u vodi, prema proceduri opisanoj u literaturi (*Bail et al., 2008; Faller i Fialho, 2010*). Apsorbanca dobijenog rastvora merena je na 730 nm. Kalibraciona kriva dobijena je korišćenjem galne kiseline, a dobijeni rezultati su predstavljeni kao miligrami galne kiseline na 100 grama ulja.

4.5.16. Određivanje sadržaja α - tokoferola HPLC - metodom

Sadržaj α-tokoferola u uzorcima određivan je primenom hromatografije tečnog stanja pod visokim pritiskom (high pressure liquid chromatography – HPLC) (*Freitas et al., 2008; Dabbou et al., 2010*). Odmereni uzorak ulja (0,0100 – 0,0200 g) rastvaran je u jednom mililitru 2-propanola. Analiza je rađena na sobnoj temperaturi na Bischoff HPLC uređaju (Bischoff, Leonberg, Nemačka). Instrument je opremljen sistemom za injektovanje sa petljom od 20 μL (Rheodyne 7725i), kompakt pumpom (model 2250) i UV/VIS Lambda 1010 detektorskim sistemom (Bischoff, Nemačka), sistemom za degaziranje (Bischoff, DG 1410) i interfejsom za kontrolu i akviziciju podataka LC-CaDI 22-14 (sa McDAcq32-Control softverom, Bischoff). α-tokoferol je iz ulja izdvojen primenom C18 kolone reverzne faze (250 mm x 4,6 mm, 120A, 5 μm, ProntoSil, Bischoff). Mobilna faza sastojala se od metanola u vodi (90:10 v/v), izokratski sistem, sa protokom od 1 mL u minuti. Analiza je rađena na 280 nm; kvantifikacija α-tokofeorola je izvršena metodom eksternog standarda.

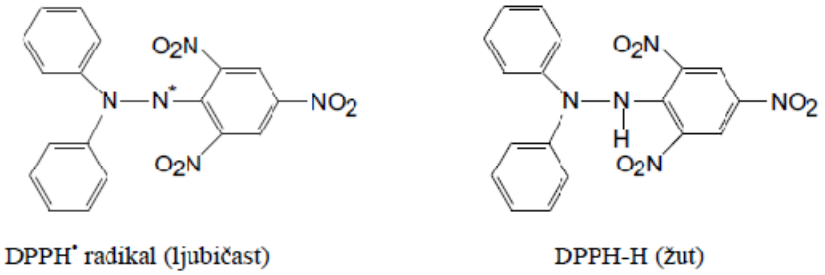
4.5.17. Određivanje antioksidativnog kapaciteta primenom luminol - hemiluminiscencije

Za određivanje antioksidative aktivnosti (antioksidativnog kapaciteta) ulja iz semenki grožđa primenjena je metoda hemiluminiscencije luminola (*Bezzi et al., 2008*). Metoda se zasniva na sukcesivnom dodavanju uzorka ulja (10-100 μL), rastvorenog u 1

mL smeše aceton:etanol (2:1) u rastvor luminol-hemina u Na_2CO_3 (1 mL) koji sadrži 25 μL H_2O_2 (5 mM), nakon čega je sledilo merenje intenziteta (I) hemiluminiscencije na Jenway 6200 fluorimetru. Prilikom merenja, lampa je bila isključena. Takođe je meren intenzitet emisije dobijen bez ikakvog dodatog ulja (I_0). Crtanje odnosa I_0/I u odnosu na količinu dodatog ulja dalo je linearnu zavisnost. Količina ulja koja smanjuje intenzitet hemiluminiscencije na 50% vrednosti, nazvana IC_{50}, računata je iz kalibracione jednačine prave dobijene za svako ulje ponaosob, na $I_0/I = 0$.

4.5.18. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala utvrđeno je primenom spektofotometrijske metode (*Martinez i Maestri, 2008*) koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH• radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H (Slika 4.7). Kapacitet „hvatanja" slobodnih radikala, odnosno „skevindžer" aktivnost (RSC, *Radical Scavengig Capacity*) ispitivanih ulja utvrđen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH radikale, a zatim je određena EC_{50} vrednost (količina ulja pri kojoj je neutralisano 50% početne koncentracije radikala).



Slika 4.7. Promena boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH• radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H

U cilju odredivanja vrednosti EC_{50}, koja predstavlja onu količinu ulja koja smanjuje početnu koncentraciju DPPH· radikala za 50%, pripremljene su 3 koncentracije rastvora ulja (25, 50 i 75 mg ulja u 1 mL toluena). Zatim je u svaki uzorak dodato 3,9 mL rastvora DPPH· radikala u toluenu, koncentracije 10^{-4} M. Absorbancija rastvora je merena u odnosu na slepu probu (čist toluen) pri talasnoj dužini od 515 nm nakon 30

minuta od mešanja. Konstruisana je kriva promene koncentracije DPPH· u zavisnosti od količine ulja, a vrednost EC_{50} je izražena u mg ulja/mg DPPH· radikala.

Antiradikalski kapacitet (ARC) ulja, prema *Siger et al.* (*2008*), je racunat kao:

$$ARC = 1/EC_{50} \quad (4.15)$$

4.5.19. Određivanje oksidativne stabilnosti primenom DSC – metode

Kako je oksidacija lipida egzotermna pojava, u ovom radu je otpornost ulja na oksidaciju procenjivana na osnovu utvrđene početne tačke (onset point) egzotermnog DSC signala koji je dobijen tokom oksidacije ulja koja se dešavala u režimu kontrolisanog grejanja. Procedura je opisana ASTM Standardom E2009-08, i u iste svrhe je već korišćena u literaturi (*Ulkowski et al., 2005*). Merenja su vršena na diferencijalno skenirajućem kalorimetru koji je povezan sa termovagom (DSC/TG111, Setaram, Francuska), pod atmosferskim pritiskom. Aparat je kalibrisan indijumom visoke čistoće; Setsoft softver (Setaram) je korišćen za akviziciju podataka i precizno određivanje temperature sa DSC krivih.

Eksperimenti su vršeni u struji sintetičkog vazduha (22% O_2 i 78% N_2, čistoće 99,99%), sa protokom od 40 cm^3/min. Uzorci ulja su grejani u temperaturskom opsegu 20 – 200 °C linearnim režimom (brzina grejanja β = 10°/min) u otvorenom nosaču uzorka od kvarca. Kao referentni materijal korišćen je prazni nosač uzorka, takođe od kvarca. Kako efikasnost reakcije ulja sa kiseonikom zavisi od veličine uzoka, u svim merenjima su korišćene vrlo slične mase uzoraka (10 ± 0,1 mg).

4.5.20. Rancimat test

Otpornost ulja na oksidaciju utvrđivana je određivanjem indukcionog perioda na aparatu Metrohm Rancimat 743 standardnom metodom (ISO 6886:2006). Kako ulje ubrzano oksidiše na povišenim temperaturama i pri produvavanju vazduha kroz uzorak; metoda se zasniva na određivanju indukcionog perioda oksidacije automatskim registrovanjem provodljivosti konduktometrijski, u funkciji vremena. U reakcione posude je mereno po 2,5 g ulja, temperatura zagrevanja je iznosila 100 °C, a protok vazduha 10 L/h.

4.5.21. Statistička analiza

Sva merenja su uradjena u tri ponavljanja. Za analizu podataka je korišćen statistički paket za društvene nauke (statistical package for social sciences, IBM SPSS Statistics 20), Chicago, IL, USA. Podaci o analiziranim parametrima su izraženi kao mean ± SDs (prosek ± standardna devijacija). Za proveravanje značajnosti razlike srednjih vrednosti po uzorcima, korišćena je jednofaktorska analiza varijanse po slučajnom planu. Ovaj model ima sledeći oblik:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad (4.16)$$

gde je X_{ij} vrednost promenljive (analiziranog parametra) kod *i*-tog trajanja ultrazvučne ekstrakcije i *j*-tog ponavljanja, μ je opšta srednja vrednost promenljive, α_i je efekat *i*-tog trajanja ultrazvučne ekstrakcije. Poslednji član modela predstavlja slučajnu grešku, koja po pretpostavci modela ima normalnu raspodelu sa nultim prosekom i varijansom σ^2, $\varepsilon_{ijk}: N(0; \sigma^2)$.

Nivo značajnosti je bio 0,05. Kod parametara kod kojih je pokazana značajnost razlike srednjih vrednosti po uzorcima, korišćen je Duncan-ov test za post hoc analizu.

Za svaki analizirani parameter IC_{50} (kod metode hemiluminiscencije) je određena granica detekcije (limit of detection, LOD = 3,3 S_a / b) i granica kvantifikacije (limit of quantification, LOQ = 10 S_a / b), gde su S_a i b , standardna greška odsečka (intercept) i nagib (slope) regresione prave (calibration curve). Za svaku kalibracionu pravu su određeni i koeficijenti determinacije, i svi su imali statističku značajnost $(p < 0{,}05)$.

Za ispitivanje uticaja sorte i načina ekstrakcije korišćena je dvofaktorska analiza varijanse po potpuno slučajnom planu. Model primenjen u analizi podataka ima sledeću formu:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}, \quad (4.17)$$

gde je X_{ijk} vrednost promenljive (analiziranog parametra) kod *i*-te sorte, *j*-tog načina ekstrakcije i *k*-tog ponavljanja, μ je opšta srednja vrednost promenljive, α_i je efekat *i*-te sorte, β_j je efekat *j*-tog načina ekstrakcije, dok $(\alpha\beta)_{ij}$ predstavlja efekat interakcije između sorte i načina ekstrakcije. Poslednji član u modelu predstavlja slučajnu grešku koja po pretpostavci modela ima normalnu raspodelu sa nultim prosekom i varijansom σ^2, $\varepsilon_{ijk}: N(0; \sigma^2)$. Kako je u analizi korišćen model po potpuno slučajnom planu, svaki

F količnik, kojih ima tri, jer se proveravaju tri hipoteze: uticaj sorte, uticaj načina ekstrakcije i prisustvo interakcije sorte i načina ekstrakcije, je dobijen deljenjem varijanse korespondirajućeg člana modela sa varijansom greške. Odluke o uticaju faktora ili prisustvu njihove interakcije donošene su na bazi *p*-vrednosti. Uticaj faktora, odnosno prisustvo interakcije, smatran je značajnim ukoliko je *p*-vrednost bila manja od 0,05.

U eksperimentima u kojima je bio značajan efekat interakcije upoređivane su srednje vrednosti analiziranih parametara ulja različitih sorti (prinos i fizičko-hemijski parametri kvaliteta) za svaku metodu ekstrakcije ponaosob, kao i upoređivanje srednjih vrednosti pojedinih metoda ekstrakcije za svaku sortu ponaosob. Za ova naknadna (post-hoc) poređenja, korišćen je Tukey-ev test.

U prikazivanju rezultata upoređivanja srednjih vrednosti parametara ulja različitih sorti za svaku metodu izdvajanja korišćena su velika slova (subskript). Mala slova (superskript) korišćena su za prikazivanje rezultata upoređivanja metoda izdvajanja ulja za svaku pojedinačnu sortu. Ukoliko srednje vrednosti za dve sorte nisu označene istim slovom, to znači da se statistički značajno razlikuju. Isto važi i za metode. Početna slova abecede su korišćena za niže srednje vrednosti. Na primer, A - znači da se ulje (ulja) određene sorte karakteriše nižom srednjom vrednošću parametra, od ulja onih sorti koja ne sadrže slovo A u subskriptu.

4.5.22. Matematički model Sovove za procese natkritične ekstrakcije

Uporedo sa istraživanjima u oblasti natkritične ekstrakcije, razvijali su se i matematički modeli za opisivanje ovih procesa. Uloga matematičkog modelovanja u procesima ekstrakcije je velika s obzirom na to da omogućava relativno brzo procenjivanje uticaja različitih procesnih vrednosti na izlazne parametre uz smanjenje broja potrebnih eksperimentalnih podataka (*Žižović, 2009; Filip, 2011*). Matematički modeli se primenjuju u cilju kvantitativnog opisa kinetike različitih ekstrakcionih procesa i proističe iz znanja o strukturi ekstrahovanog materijala i eksperimenta. Prema pristupu procesu natkritične ekstrakcije, modeli mogu biti empirijski, zasnovani na analogiji prenosa toplote i prenosa mase, ili na integraciji diferencijalnog bilansa mase za ekstraktor.

Najviše primenjivan model u literaturi za natkritičnu ekstrakciju iz biljnog materijala je predložila Sovova (*Sovova et al., 1994*). Ovaj model je primenljiv na natkritične ekstrakcije željenih komponenti iz bilo kog biljnog materijala, kako lakših frakcija (etarskih ulja) tako i težih (masnih ulja). Ovaj model je zasnovan na konceptu po kome tokom usitnjavanja (mlevenja) biljnog materijala deo biljnih ćelija (na površini čestica i u blizini njene površine) biva razoren a u unutrašnjosti ćelije zaostaju nerazorene ćelije (*Filip, 2011*). Iz razorenih i nerazorenih ćelija ulje (rastvorak) će se ekstrahovati različitim brzinama. Ulje iz razorenih ćelija je lako dostupno jer se nalazi na površini čestica, ono predstavlja slobodni deo rastvorka i prenosi se direktno u fluidnu fazu. Vezani rastvorak je onaj koji se nalazi u nerazorenim ili delimično razorenim ćelijama, pa tako vezani rastvorak najpre difunduje iz nerazorenih ćelija do razorenih a zatim odatle u fluidnu fazu. Ekstrahovana količina slobodnog rastvorka je ograničena njegovom rastvorljivošću u rastvaraču pri datim uslovima a brzina njegove ekstrakcije je ograničena brzinom spoljnjeg prenosa mase. Brzina ekstrakcije vezanog dela rastvorka je kontrolisana mehanizmom unutrašnjeg prenosa mase (*Filip, 2011*). Jasno je da proces izolovanja vezanog rastvorka (ulja) duže traje, i kao najsporiji, ovaj proces određuje ukupnu brzinu ekstrakcije.

Model Sovove posmatra klipno proticanje natkritičnog rastvarača kroz fikisiran sloj mlevenog biljnog materijala. Materijalni bilans za deo cevnog reaktora se može predstaviti sledećim jednačinama (*Žižović, 2009*):

$$-\frac{\rho_s(1-\varepsilon)\partial x}{\partial t} = J(x,y) \tag{4.18}$$

$$\rho\varepsilon\frac{\partial y}{\partial t} + \rho U\frac{\partial y}{\partial h} = J(x,y) \tag{4.19}$$

gde je:

t - vreme ekstakcije (s)

U - brzina strujanja ugljenik(IV)-oksida kroz sloj biljnog materijala (m/s),

ε - poroznost biljnog sloja

ρ - gustina natkritičnog fluida, rastvarača (kg/m^3),

ρ_s - gustina biljnog materijala (kg/m^3),

x – masa (kg) rastvorljivih supstanci po masi (kg) nerastvorljive čvrste faze, bezdimenziona veličina,

y – masa (kg) rastvorljivih supstanci po kg rastvarača, bezdimenziona veličina,

h - aksijalna koordinata ekstraktora (m),

J - brzina prenosa mase (kg $m^{-3}s^{-1}$)

Prvi član u bilansu za natkritičnu fazu jednačine (4.19) je odraz nestacionarnosti procesa prenosa mase i može se zanemariti, pa se dobija pojednostavljeni set jednačina:

$$-\frac{\rho_s(1-\varepsilon)\partial x}{\partial t} = J(x,y)$$

$$\rho U\frac{\partial y}{\partial h} = J(x,y) \tag{4.20}$$

Set jednačina (4.20) se rešava za granične uslove:

$$x\ (h,\ t=0) = x_o \tag{4.21}$$

$$y\ (h=0,\ t) = 0 \tag{4.22}$$

Na početku procesa ekstrakcije ukupna količina ulja u biljnom materijalu (O) se može podeliti na lako dostupnu količinu ulja (P) i količinu teže dostupnog ulja koja se nalazi unutar netaknutih ćelija (K) :

$$O = P + K \tag{4.23}$$

Količina ulja na početku procesa ekstakcije se može predstaviti kao:

$$x(t=0) = x_o = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} \tag{4.24}$$

gde je N masa nerastvorne čvrste biljne materije u natkritičnom fluidu.

Da bi se predstavila analitička rešenja sistema jednačina (4.20) potrebno je uvesti bezdimenzione promenljive r, Y, z, τ:

$$r = \frac{x}{x_k}, \qquad Y = 1 - \frac{y}{y_r}, \qquad z = \frac{k_f a_o}{U}h, \qquad \tau = \frac{k_f a_0 \rho y_r}{(1-\varepsilon)\rho_s x_k}t \tag{4.25}$$

gde je:

k_f - koeficijent prenosa mase za rastvarač to jest natkritični ugljenik(IV)-oksid, m/s

a_0 - specifična površina biljnih čestica, 1/m

y_r - ravnotežna rastvorljivost ulja u ugljenik(IV) – oksidu, kg ulja/kg CO_2

x_k - granična vrednost kg rastvorljivih supstanci po kg nerastvorljive čvrste faze.

Veličina x_k se može objasniti i na sledeći način: kada pri iscrpljivanju biljnog materijala lako dostupnim uljem masa rastvorljivih supstanci po masi nerastvorljive

čvrste faze opadne na vrednost x_k menja se mehanizam prenosa mase; tada se mogu napisati sledeće jednačine za brzinu prenosa mase *J*:

$$J\,(x > x_k\,,\, y) > J\,(x \le x_k\,,\, y) \tag{4.26}$$

$$J(x > x_k, y) = k_f a_0 \rho (y_r - y) \tag{4.27}$$

$$J(x \le x_k, y) = k_s a_0 \rho_s x \tag{4.28}$$

Jednačine (4.20) i granični uslovi (4.21) i (4.22) uvođenjem bezdimenzionih promenljivih dobijaju novu formu:

$$\frac{\partial r}{\partial \tau} = \frac{\partial Y}{\partial z} = -J^*(r, Y) \tag{4.29}$$

$$r(z, \tau = 0) = r_0 \tag{4.30}$$

$$Y(z = 0, \tau) = 1 \tag{4.31}$$

gde je:

$$J^*(r, Y) = \frac{J(x, Y)}{k_f a_0 \rho y_r} \tag{4.32}$$

Ovaj model definiše tri perioda koja obuhvata ekstrakcija. U početnom periodu ekstrakcija se odvija konstantnom brzinom i određena je otporom filma natkritičnog fluida (prvi period - konstantni, brz period). Konstantna brzina je posledica male brzine slobodnog rastvorka kroz sloj rastvarača i još uvek velike koncentracije slobodnog rastvorka u materijalu. Na kraju ovog perioda čestice na mestu ulaska fluida u ekstraktor su ostale bez slobodnog, lako dostupnog rastvorka. Brzina ekstrakcije u ovom periodu limitirana je rastvorljivošću ovog lako dostupnog ulja. Vezan rastvorak se ekstrahuje u drugom periodu u kome se i slobodni rastvorak uklanja sa svih ostalih čestica jer su čestice na kraju pakovanog sloja još uvek bogate ovim lako dostupnim uljem (II period - prelazni period). U trećem periodu ekstrakcije, nakon što je iscrpljena celokupna količina lako dostupnog ulja iz pakovanog, biljnog sloja, ekstrahuje se rastvorak koji je smešten dublje u unutrašnjosti ćelije gde je glavni mehanizam prenosa mase difuzija koja i određuje ukupnu brzinu procesa (III period - period difuzije) (*Vinatoru, 2001*).

Prinos ekstrakta biljne sirovine koji se ekstrahuje tokom prvog, drugog i trećeg ekstrakcionog perioda je predstavljen kao (*Žižović, 2009*):

$$Y=\begin{cases}\exp(-z) & za\ \ \tau<\tau_m \\ \dfrac{\tau_m\exp(z_w-z)}{(r_O-\exp(k(\tau_m-\tau)))} & za\ \ \tau_m\le\tau<\tau_n,\ z>z_w \\ \dfrac{r_O\exp(k(\tau-\tau_m))}{(\exp(r_Okz)+r_O\exp(k(\tau-\tau_m))-1)} & za\ \ \tau_m\le\tau<\tau_n,\ z\ge z_w,\tau\ge\tau_n,\end{cases} \tag{4.33}$$

gde je:

$$Z=\frac{k_f a_0 H}{U} \tag{4.34}$$

$$k=\frac{k_s\rho_s x_k}{k_f\rho y_r} \tag{4.35}$$

$$\tau_m = r_o - 1 \tag{4.36}$$

$$\tau_n=\frac{\tau_m+\frac{1}{k}ln(1+\tau_m\exp\,(r_0kZ))}{1+\tau_m} \tag{4.37}$$

$$z_w=\frac{1}{kr_0}ln\frac{r_0exp(k(\tau-\tau_m))-1}{r_0-1} \qquad za\ \tau_m\le\tau\le\tau_n \tag{4.38}$$

Karakteristika ovog modela je veliki broj parametara kojima se proces ekstrakcije opisuje, a koji se ne mogu izračunati. Vrednosti tih parametara se moraju pretpostaviti tako da se ekstrakcioni prinosi predskazani modelom poklapaju sa eksperimentalno dobijenim ekstrakcionim prinosima, odnosno ovi parametri se optimizuju. To su:

k_s - koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu (m/s);

y_r - ravnotežna rastvorljivost ulja u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu (kg ulja/kg CO_2);

x_k – kg ulja po kg nerastvorljive čvrste faze nakon iscrpljivanja biljnog materijala lako dostupnim uljem, bezdimenziona veličina;

x_0 – kg ulja po kg nerastvorljive čvrste faze na početku ekstrakcije, bezdimenziona veličina (*Žižović, 2009*).

Izračunavanje parametara modela Sovove

Za izračunavanje koeficijenta prenosa mase k_f u filmu oko čestice korišćena je Tanova korelacija (*Wan i Wakelyn, 1997*):

$$k_f = \frac{ShD_{12}}{dp} \tag{4.39}$$

pri čemu je:

$$Sh = 0{,}38 \cdot Re^{0{,}83} \cdot Sc^{1/3} \tag{4.40}$$

$$R_e = \frac{\rho \cdot d\rho \cdot u}{\mu} \tag{4.41}$$

$$S_c = \frac{\mu}{\rho \cdot D_{12}} \tag{4.42}$$

gde je:

ρ - gustina natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (kg/m^3);

μ - koeficijent viskoznosti natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (Pa s);

u - brzina strujanja ugljenik(IV)-oksida kroz sloj biljnog materijala (m/s);

d_p - prečnik čestice (m);

D_{12} - binarna difuzivnost za sistem ulje/CO_2 (m^2/s).

Viskoznost natkritičnog CO_2 je izračunata Jossi-evom empirijskom korelacijom:

$$\left[(\mu - \mu^*)\xi^* + 10^{-4}\right]^{1/4} = 0.10230 + 0.023364\rho + 0.058533\rho^2 - 0.040758\rho^3 + 0.0093324\rho^4 \tag{4.43}$$

gde je:

$$\mu^*\xi^* = 34.0\times10^{-5}T_r^{0.94} \qquad T_r \le 1.50$$

$$\mu^*\xi^* = 17.78\times10^{-5}(4.58T_r - 1.67)^{5/8} \qquad T_r > 1.50$$

μ^* - viskoznost natkritičnog ugljenik(IV)–oksida na pritiscima od 0,1 - 5 bar;

ξ^* = 0,0224 za ugljenik(IV)-oksid.

Binarna difuzivnost za sistem pseudokomponenta/CO_2 izračunata je iz sledeće jednačine:

$$D_{12} = 5.152\, D_c T_r (\rho_r^{-2/3} - 0.4510) R / X \quad 1<\rho_r<2.5 \tag{4.44}$$

gde je: $X = (1 + (V_{c2}/V_{c1})^{1/3})^2 / (1 + M_1/M_2)^{1/2}$

$$R = 1.0 \pm 0.1,\ X < 2$$

$$R = X^{0.17} \pm 0.1,\ 2 < X < 10$$

D_c – kritična difuzivnost ugljenik(IV)-oksida (m^2/s) ; 4,937*10^{-8} m^2/s;

T_r – redukovana temperatura (K);

ρ_r – redukovana gustina ugljenik(IV)-oksida (kg/m^3);

V_{c1}, V_{c2} – kritične molarne zapremine ugljenik(IV)-oksida i pseudokomponente (m^3/kmol);

M_1, M_2 – molarne mase ugljenik(IV)-oksida i pseudokomponente (kg/kmol).

Kriterijum za određivanje optimalnih parametara dat je jednačinom (4.45):

$$J = (1/m)\sum_{j=1}^{m}[Y_j - Y_{\mathrm{mod},j}]^2 \qquad (4.45)$$

gde je: m - broj eksperimentalnih tačaka;

Y_j - prinos u eksperimentalnoj tački j;

$Y_{mod,j}$ - prinos u tački j, prema modelu.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Uticaj variranja vremena trajanja tretmana ultrazvukom na ekstrakciju ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon n-heksanom

U cilju utvrđivanja optimalnog vremena izlaganja uzorka ultrazvuku s aspekta ekstrakcionog prinosa i dobijanja ulja sa najboljim antioksidativnim karakteristikama i najvećom otpornošću na procese autooksidacije, vreme trajanja ultrazvučnog tretmana u ekstrakciji ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon iz berbe 2012. je menjano od 15 do 135 minuta; dok su svi ostali parametri ekstrakcije (temperatura, odnos mase rastvarača i uzorka semenke, snaga i frekfencija ultrazvuka) držani konstantnim.

5.1.1. Sadržaj vlage i ukupan sadržaj ulja u semenkama

Sadržaj vlage u semenkama, određen neposredno pre početka eksperimenta bio je 7,23% m/m; dok je ukupan sadržaj ulja (određen metodom po Soxhletu) bio 11,25% m/m.

5.1.2. Ekstrakcioni prinos

Kao što je naglašeno u poglavlju 2.5 ovog rada, u literaturi su objavljeni rezultati koji pokazuju da sadržaj ulja u semenkama grožđa varira u širokom rasponu od 6-20%, i zavisi od sorte (*Luque-Rodriguez et al.,2005*) i stepena zrelosti grožđa, klimatskih i uslova gajenja vinove loze (*Mironeasa et al., 2010; Pardo et al., 2011*).

U istraživanjima koja su nedavno vršena pokazano je da povećanje snage ultrazvuka doprinosi povećanju ekstrakcionog prinosa ulja iz semenki grožđa (*Da Porto et al., 2013*). Stoga je u ovom radu korišćena maksimalna snaga ultrazvučne kade (150 W); a kako je već navedeno, ovde je razmatran uticaj vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije na prinos i sastav ulja, dok su ostali parametri od važnosti držani konstanatnim. Tabela 5.1.1 prikazuje dobijene ekstrakcione prinose.

Rezultati jasno ukazuju da primena ultrazvuka ima pozitivan uticaj na ekstrakcioni prinos i u skladu su sa prethodno publikovanim: u slučajevima ekstrakcije ulja iz lišća majčine dušice (*Kowalski i Wawrzykowski, 2009)*, čaja *(Shalmashi, 2009)* i lanenog semena *(Zhang Zh-Sh. et al., 2008)*, takođe je dokazano da ultrazvuk može doprineti povećanju efikasnosti ekstrakcije usled akustičnih kavitacija koje omogućavaju

razaranje ćelijskog zida (što je evidentirano primenom skenirajuće elektronske miksroskopije – SEM na uzorcima đumbira *(Balachandran et al., 2006)*, olakšavajući difuziju rastvarača u uzorak matriksa i oslobađanje intracelularne tečnosti.

Tabela 5.1.1. Prinos dobijenih uzoraka ulja

Uzorci ulja	**Trajanje ultrazvučne ekstrakcije (minuta)**	**Ekstrakcioni prinos (% w/w)**
O-15	15	6,61±0,1[a]
O-30	30	7,18±0,07[b]
O-45	45	7,29±0,05[c]
O-60	60	7,42±0,12[c]
O-75	75	7,73±0,11[d]
O-90	90	8,31±0,09[e]
O-105	105	8,42±0,07[e]
O-120	120	8,38±0,03[e]
O-135	135	8,39±0,03[e]
O-S	Soxhlet ekstrakcija, 6h	11,25±0,14[f]

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite superskripte su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Očigledno je da su u ovom radu primenom dužih intervala ultrazvučnog tretmana dobijeni veći ekstrakcioni prinosi; kao i da tretmani duži od 90 minuta nemaju dalji uticaj na povećanje prinosa. Prinosi dobijeni u ovom radu su nešto manji u odnosu na rezultate dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom izvedenom na 150 W u trajanju od 30 minuta koji su nedavno publikovani (*Da Porto et al., 2013*). Takođe, treba naglasiti da su dobijeni prinosi, u odnosu na ukupni sadržaj ulja u semenkama koji je određen metodom po Soxhletu, postignuti za znatno kraće vreme i sa znatno manjim utroškom rastvarača.

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na to da primena ultrazvuka utiče na smanjenje vremena ekstrakcije i potrošnje rastvarača, što ovom načinu ekstrakcije ulja daje ekološki aspekt. Naime, kako organski rastvarači nepovoljno utiču na životnu sredinu, ovde su u procesu ultrazvučne ekstrakcije korišćene male količine n-heksana (odnos rastvarača i uzorka 2:1), iako je poznato da se sa većim količinama rastvarača mogu postići veći prinosi. U istraživanjima koja su nedavno sprovedena o ekstrakciji ulja iz semenki čaja, kao najbolji utvrđen je odnos rastvarača i uzorka 6:1 *(Shalmashi A., 2009)*, dok je ekstrakcija ulja iz semenki grožđa sprovedena sa odnosom rastvarača i semenke 8:1 *(Da Porto et al., 2013)*.

Treba istaći da su svi eksperimentalni uslovi primenjeni kod ultrazvučne ekstrakcije u ovom radu (temperatura, vreme trajanja ekstrakcije, odnos rastvarača i uzorka) ekološki povoljniji u odnosu na uslove konvencionalne ekstrakcije po Soxhletu. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su ovi "blagi" i ekološki povoljniji uslovi ekstrakcije dali veoma zadovoljavajuće rezultate sa aspekta esktrakcionog prinosa. Kako ultrazvuk omogućava poboljšanje unutrašnje difuzije obezbeđujući bolji kontankt između rastvarača i rastvorka, ekstrakcioni prinos se može kontrolisati variranjem vremena ekstrakcije. Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da nakon određenog vremena ovaj fenomen dostiže maksimum.

5.1.3. Hemijska analiza dobijenih uzoraka ulja

Poznato je da se procesi autooksidacije ulja odvijaju preko slobodnoradikalskih lančanih reakcija koje se sastoje iz faza inicijacije, propagacije i terminacije. Slobodni peroksi radikali i hidroperoksidi, nastali tokom faze inicijacije, omogućavaju da dođe do lančane reakcije (*Adhvaryu et al., 2000; Choe i Min, 2006; Pardauil et al., 2011*). Dužina vremenskog intervala pred naglo intenziviranje procesa lipidne oksidacije je mera oksidativne stabilnosti i naziva se indukciono vreme ili indukcioni period (*Tan et al., 2002*). U ovom radu meren je sadržaj komponenti koje mogu da utiču na oksidativnu stabilnost ulja, bilo kao vrste koje su sklone oksidaciji, bilo kao antioksidanti.

5.1.3.1. Sastav masnih kiselina, jodni, kiselinski i peroksidni broj

Oksidativni procesi u uljima u najvećoj meri zavise od sadržaja i sastava nezasićenih masnih kiselina (*Min i Boff, 2002; Reische et al., 2002*). *Kamal-Edin* (*2006*), izveštava da oksidativna stabilnost ulja u najvećoj meri zavisi od stepena nezasićenja. Iz ovih razloga u ovom radu sastav masnih kiselina je određen kvantitativno, primenom GC metode, a dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 5.1.2. Pored sastava masnih kiselina određeni su kiselinski (Kbr), peroksidni (Pbr) i jodni brojevi (Jbr) za sve uzorke ulja. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 5.1.3.

Tabela 5.1.2. Sadržaj masnih kiselina u dobijenim uzorcima ulja, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

Uzorci ulja	Palmitinska kiselina (%)	Stearinska kiselina (%)	Oleinska kiselina (%)	Linolna kiselina (%)	Nezasićene kiseline (%)
O-15	10,40±0,79[a]	4,60±0,43[a]	12,80±1,13[a]	73,20±1,08[a]	86,00±0,90[a]
O-30	8,00±0,90[a]	4,10±0,26[a]	12,60±0,17[a]	75,30±0,26[a]	87,90±0,20[a]
O-45	8,50±0,95[a]	4,20±0,20[a]	13,50±1,03[a]	73,77±1,25[a]	87,27±1,89[a]
O-60	8,70±0,75[a]	4,40±0,36[a]	13,80±0,13[a]	73,10±0,26[a]	86,90±0,18[a]
O-75	8,80±0,82[a]	4,40±0,22[a]	13,60±0,09[a]	73,20±0,98[a]	86,80±0,92[a]
O-90	8,70±0,66[a]	4,20±0,36[a]	13,50±0,20[a]	73,60±0,18[a]	87,10±0,15[a]
O-105	8,60±0,79[a]	4,20±0,40[a]	13,40±0,09[a]	73,80±1,30[a]	87,20±1,30[a]
O-120	8,29±0,70[a]	4,00±0,46[a]	13,20±0,13[a]	74,50±1,17[a]	87,70±1,28[a]
O-135	8,10±0,60[a]	4,30±0,23[a]	13,20±0,09[a]	74,40±0,75[a]	87,60±0,68[a]
O-S	8,30±0,92[a]	4,20±0,43[a]	13,30±0,18[a]	74,30±0,46[a]	87,60±0,61[a]

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite superskripte su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Tabela 5.1.3. Kiselinski, jodni i peroksidni broj u uzorcima ulja

Uzorci ulja	Peroksidni broj (Pbr), mmol/kg	Kiselinski broj (Kbr), mg KOH/g	Jodni broj (Jbr), g I_2/100g
O-15	9,83±0,23[g]	6,80±0,18[b]	142
O-30	8,92±0,19[f]	6,90±0,22[b]	146,6
O-45	8,07±0,14[e]	7,00±0,12[b]	144,7
O-60	6,45±0,13[d]	6,90±0,09[b]	143,8
O-75	6,02±0,15[b,c]	6,90±0,19[b]	143,7
O-90	5,99±0,12[b,c]	7,10±0,22[b]	144,4
O-105	5,81±0,18[b]	6,90±0,13[b]	144,6
O-120	6,10±0,14[b,c]	6,90±0,32[b]	145,8
O-135	6,29±0,17[c,d]	6,80±0,20[b]	145,6
O-S	4,30±0,18[a]	6,10±0,22[a]	145,5

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite superskripte su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Dobijeni rezultati ukazuju da metoda ekstrakcije (primena ultrazvuka ili esktrakcija po Soxhlet-u) kao i vreme trajanja ultrazvučnog tretmana nemaju značajan uticaj na sastav masnih kiselina dobijenih ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon.

Najpre, poređenje rezultata prikazanih u tabeli 5.1.2 sa podacima iz literature koji su navedeni u poglavlju 2.7.1 ukazuje da je sastav masnih kiselina dobijenih ulja u skladu sa do sada publikovanim vrednostima. Potom, iz ovih podataka se jasno može uočiti da sadržaj i sastav nezasićenih masnih kiselina ne zavisi od dužine tretmana ultrazvukom niti od metode ekstrakcije. Shodno tome i vrednosti jodnog broja su takođe veoma

slične, što se može videti u tabeli 5.1.3. Iz tabele 5.1.3 se uočava da su vrednosti Kbr visoke (iznad granice predviđene pravilnikom), što ukazuje da je u samoj sirovini (semenkama) tokom čuvanja došlo do hidrolitičkih promena i nastanka veće količine SMK. Izmerene vrednosti ukazuju da među uzorcima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom nema značajnih razlika u vrednostima Kbr, što znači da vreme trajanja primene ultrazvuka ne utiče na kiselost ulja. Međutim, uočavaju se nešto veće vrednosti Kbr kod ulja dobijenih primenom ultrazvuka u odnosu na ulje dobijeno ekstrakcijom po Soxhlet-u.

5.1.3.2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola

Pošto mono- i polihidroksi fenoli sa različito supstituisanim prstenovima i tokoferoli deluju kao takozvani primarni antioksidansi (*Reische et al., 2002*), ova jedinjenja su takođe bila predmet istraživanja u ovom radu. U uzorcima dobijenih ulja iz semenki grožđa određivan je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola, koji je među svim ostalim tokoferolima prepoznat kao biološki najaktivniji antioksidans (*Reische et al., 2002*). Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 5.1.4.

Tabela 5.1.4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i α-tokoferola

Uzorci ulja	Ukupna fenolna jedinjenja (TPC), g/100g	α-tokoferol mg/kg
O-15	$1,70\pm0,06^{a}$	/*
O-30	$2,48\pm0,06^{b}$	/*
O-45	$3,06\pm0,09^{c}$	/*
O-60	$5,59\pm0,07^{f}$	$3,94\pm0,01^{a}$
O-75	$5,46\pm0,05^{e}$	$11,99\pm0,03^{b}$
O-90	$5,88\pm0,06^{g}$	$16,46\pm0,01^{e}$
O-105	$5,97\pm0,04^{g}$	$14,47\pm0,01^{d}$
O-120	$5,48\pm0,08^{e,f}$	$13,61\pm0,01^{c}$
O-135	$5,33\pm0,05^{d}$	$20,22\pm0,01^{f}$
O-S	$6,31\pm0,08^{h}$	$272,07\pm0,01^{g}$

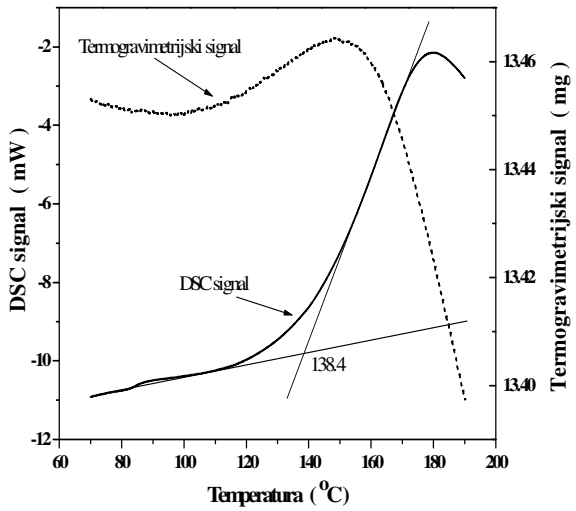
* - nije detektovano. Vrednosti u istoj koloni koje nose različite superskripte su značajno različite ($p<0,05$). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 5.1.4 ukazuje na trend porasta sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola sa produženjem vremena trajanja ultrazvučnog tretmana. Oučava se da primena ultrazvuka naročito olakšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja u uljanu fazu. Rezultati dobijeni u ovom radu su u skladu sa nedavno

objavljenim rezultatima: u slučaju ekstrakcije polifenola iz semenke grožđa etanolom (*Ghafoor et al., 2009*), kao i u slučaju ekstrakcije polifenola iz kore pomorandže (*Khan et al., 2010*), gde je pokazano da trajanje ultrazvučnog tretmana ima pozitivan uticaj na prinos ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrakovanih iz biljnih materijala. Bitno je istaći da su korišćenjem ultrazvučne ekstrakcije u ovom radu u uljima dobijene približno iste količine ukupnih fenolnih jedinjenja koje su dobijene i ekstrakcijom po Soxhletu. Sa druge strane, evidentno je da vreme trajanja ultrazvučne ekstrakcije primenjene u ovom radu nije dovoljno da omogući oslobađanje liposolubilnog α-tokoferola iz semenke grožđa u uljanu fazu: značajno niže vrednosti α-tokoferola su pronađene u svim uzorcima ulja dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom u odnosu na uzorak ulja dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u.

5.1.4. Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti ulja DSC metodom i antioksidativne aktivnosti ulja metodom luminol - heminluminiscencije

Kao što je predhodno pomenuto, oksidativna stabilnost (otpornost ulja na oksidaciju) je ispitivana korišćenjem DSC - metode, u režimu linearnog zagrevanja i u protoku sintetičkog vazduha. U takvom neizotermskom DSC eksperimentu, kraj indukcionog perioda je određen kao temperatura naglog porasta egzotermnog signala u DSC profilu praćenom tokom zagrevanja ulja u oksidativnoj atmosferi.



Slika 5.1.1. DSC (linija) i TG (tačkasta linija) profili neizotermske oksidacije ulja O-15 sa prikazanom definisanom vrednošću OOT (OOT = 138,4°C, dobijena ekstrapolacijom je uzeta kao temperatura početka oksidacije)

Slika 5.1.1 pokazuje jedan reprezentativni slučaj među 10 oksidativnih procesa praćenih u ovom radu. Početna temperatura oksidacije (OOT, od oxidation onset temperature) koja je dobijena ekstrapolacijom na način kako je prikazano na slici 5.1.1 može se posmatrati kao relativna mera oksidativne stabilnosti ispitivanih ulja. Slika 5.1.1 dodatno prikazuje i TG - profil praćen tokom zagrevanja jednog od ulja, istovremeno sa DSC merenjem.

Na slici 5.1.1 se jasno može uočiti da u početku dolazi do male promene mase koja se može pripisati gubitku vlage; dok od određene početne tačke, TG kriva pokazuje porast mase. Ova promena mase može biti posmatrana kao znak potrošnje kiseonika i formiranje hidroperoksida tokom inicijalne faze oksidacije, jer je evidentno da koincidira sa povećenjem egzotermnog DSC signala. Naime, poznato je da adicija kiseonika na alilne pozicije do dvostrukih veza u lancima masnih kiselina izaziva povećanje mase (*Knothe, 2005*). Ovaj fenomen je nedavno zabeležen termogravimetrijom u slučaju oksidacije biljnih ulja izvedenim u izotermnim uslovima (*Pardauil et al., 2011*). Međutim, kada dođe do razgradnje hidroperoksida u sekundarne produkte oksidacije, dolazi do novog gubitka mase, koji je izazvan isparavanjem aldehida, ketona i kiselina kratkih lanaca. Otuda, pozicija maksimalnog porasta TG - signala (označeno kao T_M) može takođe da posluži kao indikacija relativne oksidativne stabilnosti ulja.

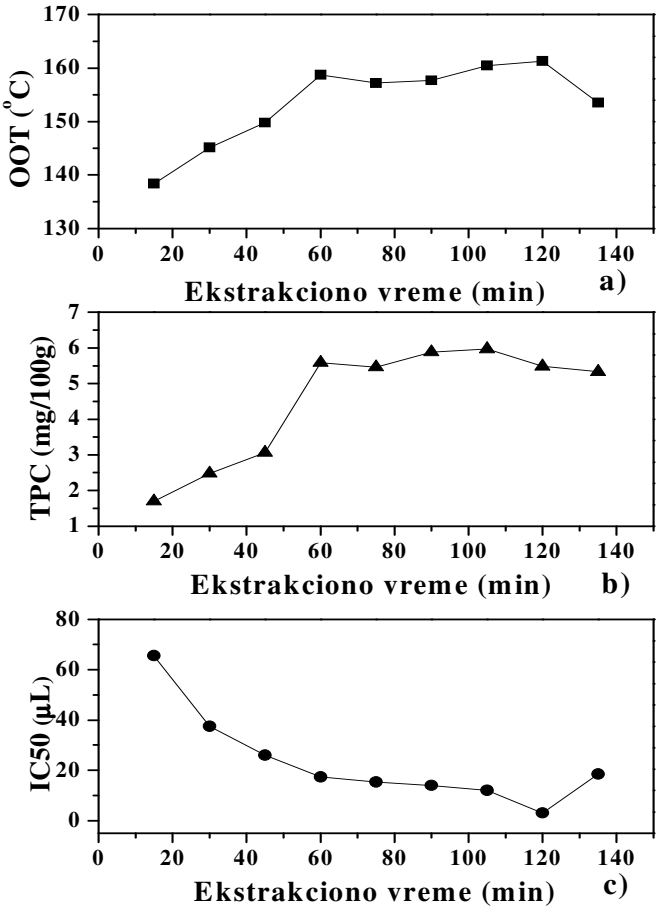
Tabela 5.1.5. Vrednosti početne temperature oksidacije (OOT) i temogravimetrijskog maksimuma (T_M)

Uzorci ulja	**Početna temperature oksidacije, OOT, °C**	**Temperatura maksimuma termogravimetrijskog signala, T_M, °C**
O-15	138,40±0,20[a]	151,00±0,52[a]
O-30	145,10±0,15[b]	154,00±0,26[b]
O-45	150,10±0,79[c]	165,00±0,46[d]
O-60	158,70±0,28[e,f]	167,00±0,26[e]
O-75	157,20±0,35[e]	169,00±0,30[g]
O-90	157,70±0,18[e]	168,00±0,18[f]
O-105	160,50±1,41[g]	168,00±0,31[f]
O-120	161,30±0,17[g]	170,00±0,49[h]
O-135	153,50±0,25[e]	162,00±0,26[c]
O-S	160,00±2,34[f,g]	169,00±0,20[g]

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite superskripte su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Tabela 5.1.5 prikazuje izmerene vrednosti OOT i T_M. Može se uočiti da su kod ulja koja su dobijena dužim ultrazvučnim tretmanom pronađene veće T_M vrednosti, što ukazuje da se (izuzev za najduže ekstrakciono vreme (O-135)) sa produženjem ultrazvučnog tretmana dobijaju ulja otpornija na oksidaciju. Pošto oksidacija ulja zavisi od različitih faktora, veoma je važno naglasiti da su svi uzorci ulja dobijeni iz sirovine (semenke grožđa) koja je čuvana pod istim uslovima. Pored toga, treba dodatno istaći da koncentracija kiseonika koja je korišćena u ovom radu (22% v/v) nije imala uticaja na oksidativne procese, pošto je poznato iz literature da samo niske koncentracije kiseonika u gasnim smešama imaju značajan uticaj na stepen autooksidativnih procesa, dok je stepen oksidacije nezavisan od ovih parametara pri visokim koncentracijama kiseonika (preko 10% v/v) (*Choe i Min, 2006*).

Rezultati dobijeni u ovom radu jasno pokazuju da porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, koji se uočava zbog produženja trajanja ultrazvučnog tretmana, korelira sa povećanjem oksidativne stabilnosti, na šta ukazuju OOT i T_M vrednosti kao relativne mere otpornosti na oksidaciju. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nedavno publikovanim, gde je porast sadržaja fenolnih jedninjenja u ulju semenke grožđa modifikovanog maceracijom praćen blagim porastom otpornosti na autooksidaciju (*Pardo et al., 2011*). Zavisnosti OOT i TPC vrednosti od vremena esktrakcije prikazane su na slikama 5.1.2 a i b. Uočljivo je da pri najdužem veremenu trajanja ultrazvučnog tretmana (uzorak O-135) dolazi do blagog pada vrednosti TPC i OOT. Evidentno, produženo vreme trajanja ultrazvučnog tretmana rezultira izvesnim smanjenjem sadržaja TPC u ulju, što uzrokuje i pad vrednosti OOT i T_M.



Slika 5.1.2a-c. Uticaj trajanja ultrazvučnog tretmana na oksidativnu stabilnost (vrednost OOT, crni kvadratići), na sadržaj TPC (ukupna fenolna jedinjenja, trouglići) i na antioksidativnu aktivnost (vrednosti IC_{50}, kružići)

Poređenjem podataka iz tabela 5.1.3 i 5.1.4, može se zaključiti da ne postoji korelacija između Kbr i Pbr vrednosti i sadržaja antioksidanata. Kako vrednosti Kbr i Pbr ukazuju na stepen oksidacije ulja (Kbr daje uvid u to koliko je masnih kiselina odvojeno iz molekula triacilglicerola dok Pbr ukazuje na sadržaj primarnih produkata oksidacije), njihove niže vrednosti se mogu očekivati kod uzoraka ulja sa visokim sadržajem antioksidanata i ukazuju na poboljšanu oksidativnu stabilnost. Nedostatak korelacije između ova dva parametra i OOT vrednosti jasno ukazuje da ovi parametri (Kbr i Pbr), odnosno, metode kojima se određuju, nisu dovoljno osetljivi da bi dali uvid o ulozi antioksidanata u zaštiti ulja od oksidacije.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti ulja u ovom radu je ispitivana mogućnost korišćenja nedavno predložene metode luminol – hemiluminiscencije; za seriju mešavina koje sadrže iste količine H_2O_2 i rastvora luminol-hemina u Na_2CO_3, ali sa različitim sadržajima istih uzoraka ulja (*Bezzi et al., 2008*). Kao što je prethodno

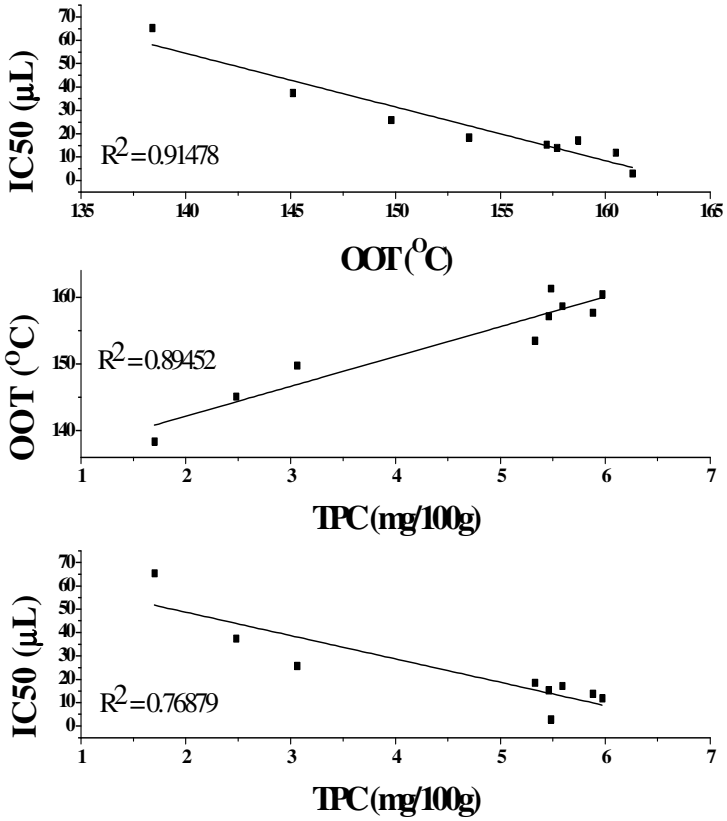
objašnjeno, sadržaj ulja koji smanjuje intenzitet emisije za 50%, označen je kao IC_{50} i pokazuje antioksidativno delovanje odgovarajućih uzoraka ulja. Ovo znači da manje neophodne zapremine ulja za smanjenje intenziteta emisije za 50% ukazuju na veću antioksidativnu aktivnost. Pošto su različite količine ulja dodavane u rastvor luminola kako bi se pronašla količina koja će smanjiti intezitet emisije za 50%, vrednosti IC_{50} su dobijene iz krive I_0/I u odnosu na količinu ulja. Rezutati dobijeni ovom metodom: kalibracione jednačine, koeficijenti determinacije (R^2), kao i granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) su predstavljeni u tabeli 5.1.6.

Tabela 5.1.6. Standardna validacija rezultata za određivanje vrednosti IC_{50}. Y – odnos inteziteta hemiluminiscecije I_0/I, X – količina ulja

The oil amount, μL	Sample	Calibration equation	LOD	LOQ	R^2	IC50
25-100	O-15	$Y = 0.402 + 0.024X$	21,659	65,633	0,990	65,62
25-100	O-30	$Y = 0.060 + 0.052X$	14,530	44,030	0,996	37,45
25-100	O-45	$Y = 0.563 + 0.055X$	20,109	60,935	0,992	25,93
25-100	O-60	$Y = -0.095 + 0.121X$	26,576	80,533	0,985	17,33
25-100	O-75	$Y = 0.129 + 0.122X$	18,527	56,141	0,992	15,37
25-100	O-90	$Y = 0.360 + 0.118X$	15,825	47,956	0,994	13,93
25-100	O-105	$Y = 1.322 + 0.057X$	5,862	17,762	0,999	11,95
25-100	O-120	$Y = 1.820 + 0.059X$	12,812	38,825	0,996	3,06
25-100	O-135	$Y = 0.980 + 0.060X$	5,373	16,281	0,999	17,06
10-25	O-S	$Y = -1.837 + 0.382X$	6,068	18,389	0,989	10,05

LOD – granica detekcije; LOQ – granica kvantifikacije; R^2 – kvadrat koeficijenta korelacije IC_{50} – količina ulja koja smanjuje intenzitet hemiluminiscencije za 50%

Na slici 5.1.2c je dat grafički prikaz zavisnosti vrednosti IC_{50} od vremena ekstrakcije. Očigledno, niže vrednosti IC_{50} (bolja antioksidativna aktivnost) pronađene su kod uzoraka ulja dobijenih dužim ultrazvučnim tretmanom (izuzev uzorka O-135). S obzirom da duži ultrazvučni tretman pri ekstrakciji pojačava oslobađanje antioksidanata u uljnu fazu, ovo zapažanje ukazuje i na postojanje korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja antioksidanata. Slika 5.1.3 pokazuje korelacije između: antioksidativne aktivnosti (vrednosti IC_{50}) i oksidativne stabilnosti (vrednosti OOT); oksidativne stabilnosti (OOT) i sadržaja TPC; antioksidativne aktivnosti (IC_{50}) i sadržaja TPC.



Slika 5.1.3. Korelacija između: oksidativne stabilnosti (OOT) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50}); sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i oksidativne stabilnosti (OOT) i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50})

Evidentno je da sadržaj TPC korelira sa oksidativnom stabilnošću (vrednostima OOT) i antioksidativnom aktivnošću (vrednostima IC_{50}) u ispitivanim uzorcima ulja. Pošto veće vrednosti sadržaja TPC doprinose većoj otpornosti ulja na oksidaciju, njihov porast rezultira povećanjem vrednosti OOT (Slika 5.1.3b). Takođe, veći sadržaj TPC doprinosi većoj antioksidativnoj aktivnosti ulja, što se odražava na niže vrednosti IC_{50} (Slika 5.1.3c). Takođe je bitno istaći i to da postoji i veoma dobra korelacija između vrednosti OOT i IC_{50}, što je rezultat prethodnih korelacija (Slika 5.1.3a). Očito je da su se ove dve metode: određivanje oksidativne stabilnosti primenom DSC metode i određivanje antioksidativne aktivnosti primenom metode na bazi luminol - heminluminiscencije, iako različite pokazale kao veoma osetljive i precizne, kao i da daju uporedive rezultate.

U skladu sa podacima iz literature (*Pardo et al., 2011; Ixtaina et al., 2012*), prezentovani rezultati jasno pokazuju da uzorci ulja sa većim sadržajem antioksidanata

pokazuju veću otpornost na oksidaciju. Uopšteno, antioksidanti deluju kao hvatači slobodnih radikala, prevodeći ih u stabilnije oblike ili u neradikalske forme i omogućavaju odlaganje ili inhibiciju faze inicijacije (*Reische et al., 2002*). Semenke grožđa su poznate po svom bogatstvu u fenolnim jedinjenjima, flavonoidima (monomeri Flavan-3-ola i proantocijanidini), fenolnim kiselinama (elaginska i galna kiselina) i stilbenima (resveratrol i njegov najvažniji derivat – piceid) (*Bakkalbas et al., 2005; Xu Ch. et al., 2010*). Većina ovih jedinjenja su planarni sistemi koji se karakterišu povećanom konjugacijom i delokalizacijom π-elektrona, koja uključuju aromatične prstenove i supstituente. Najčešće ova jedinjenja sadrže dva ili više supstituisana aromatična jezgra, što rezultuje efikasnijom delokalizacijom π-elektrona u poređenju sa tokoferolima koji poseduju samo jedan aromatičan prsten. Supstituenti na aromatičnim jezgrima su najčesće hidroksilne, alkil i alkoksi grupe. Sve ove grupe povećavaju elektronsku gustinu u aromatičnom jezgru rezonancionim (hidroksilne i alkoksi grupe) ili hiperkonjugacionim (alkil grupe) efektom. Ovi efekti su naročito favorizovani kada se hidroksilne grupe međusobno nalaze u orto položaju, što je čest slučaj kod ovih jedinjenja.

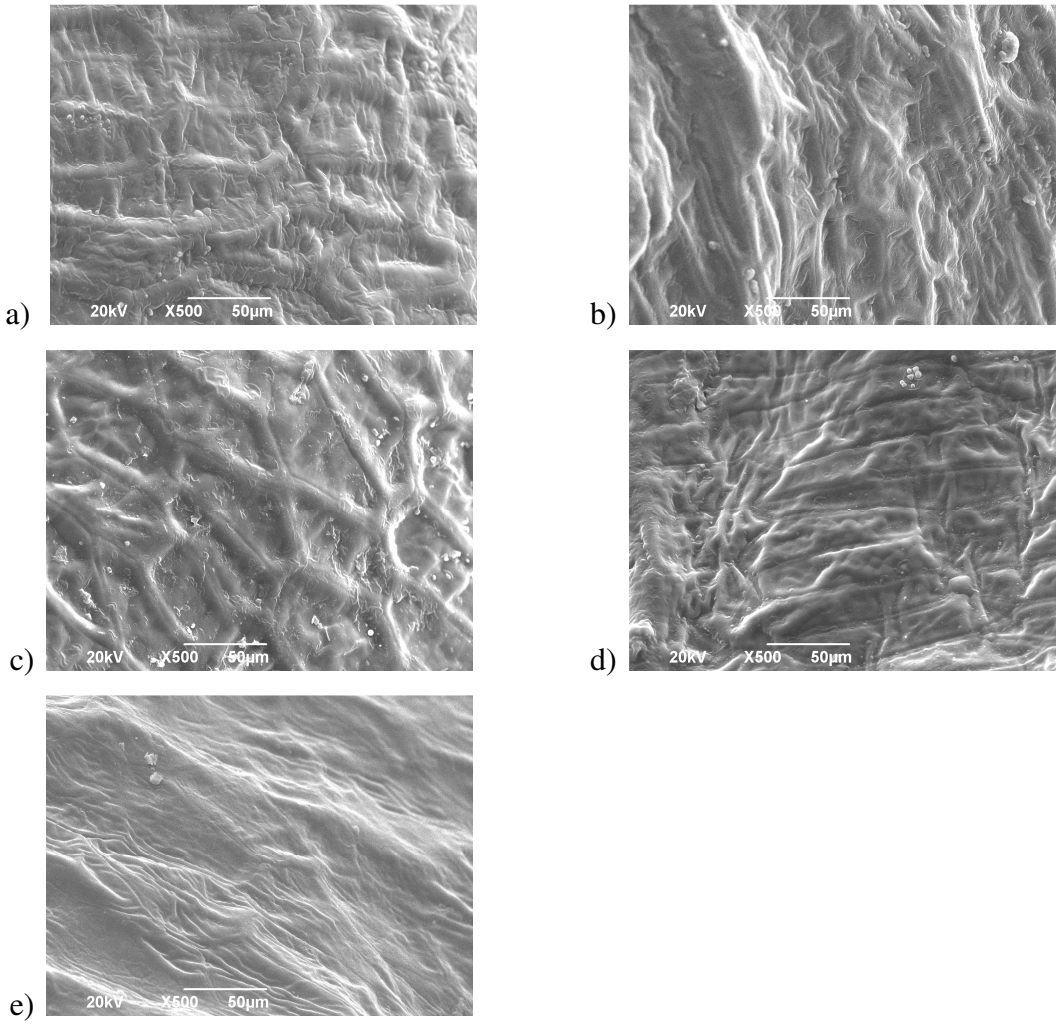
Osnovni mehanizmi delovanja fenolnih jedinjenja kao aktioksidanata koji se navode u literaturi su prenos H-atoma, prenos elektrona i kompleksiranje jona metala (*Leopoldini et al., 2011*). Polifenoli dovode slobodne radikale do stabilnijih oblika uklanjanjem vodonikovog atoma ili elektrona; nespareni elektron je delokalizovan preko celog molekula zahvaljujući planarnoj geometrijskoj konformaciji. Najefikasniji sistemi koji rade preko mehanizma prenosa H-atoma, pokazuju orto-dihidroksi funkcionalnost, što je čest slučaj kod ove klase jedinjenja.

Generalno, fenolna jedinjenja svoju antioksidativnu aktivnost mogu ispoljavati na više načina: prekidanjem lančane reakcije i vezivanjem za radikale lipida koje prevode u stabilnija jedinjenja (sa povećanjem broja supstituisanih aromatičnih jezgara, povećava se i stabilnost novonastalih radikala), kao redukujući agensi (dobijaju se stabilne hinonske strukture ako su hidroksilne grupe u orto i para položaju) i kao hvatači (quncher-i) slobodnog kiseoničnog radikala. Zbog svojih strukturnih osobina polifenolna jedinjenja, očekivano, pokazuju veći antioksidativni kapacitet od tokoferola i tokotrienola.

Kao što je već pomenuto, ultrazvučna ekstrakcija koja je primenjena i ispitivana u ovom radu nije se pokazala u istom stepenu efikasnom za sve vrste antioksidanata: dok su dobijene vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (naročito sa ultrazvučnom ekstrakcijom od 90 minuta) veoma bliske vrednostima dobijenim esktrakcijom po Soxhlet-u (u trajanju od 6 h), dobijeni sadržaj α-tokoferola je bio značajno niži. Ipak, veoma je bitno istaći da uprkos tome što je sadržaj α-tokoferola bio značajno viši kod uzorka dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u, izmerene vrednosti za OOT (oksidativna stabilnost) nisu više u odnosu na uzorke dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom, dok su dobijene vrednosti IC_{50} (antioksidativni kapacitet) veoma bliske kod oba načina ekstrakcije. Dakle, rezultati dobijeni u ovom radu jasno ukazuju na ulogu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja na povećanje oksidativne stabilnosti i antioksidativne aktivnosti, i ističu njihovu ulogu kao značajniju od uloge α-tokoferola.

5.2. Ispitivanje morfologije i anatomije semenki crvenih sorti grožđa skenirajućom elektronskom mikroskopijom

U ovom radu primenjena je skenirajuća elektronska mikroskopija u cilju ispitivanja morfologije i anatomije semenki crvenih sorti grožđa: Pinot Noir, Gamay, Prokupac, Cabernet Sauvignon i Merlot (berba 2013). Detaljniji uvid u eventualne razlike u morfologiji i anatomiji semenki različitih sorti grožđa koje bi se mogle naći u izgledu semenjače (epidermisa, spoljne i unutrašnje opne) ili endosperma mogu biti od koristi u tumačenju dobijenih prinosa ulja.

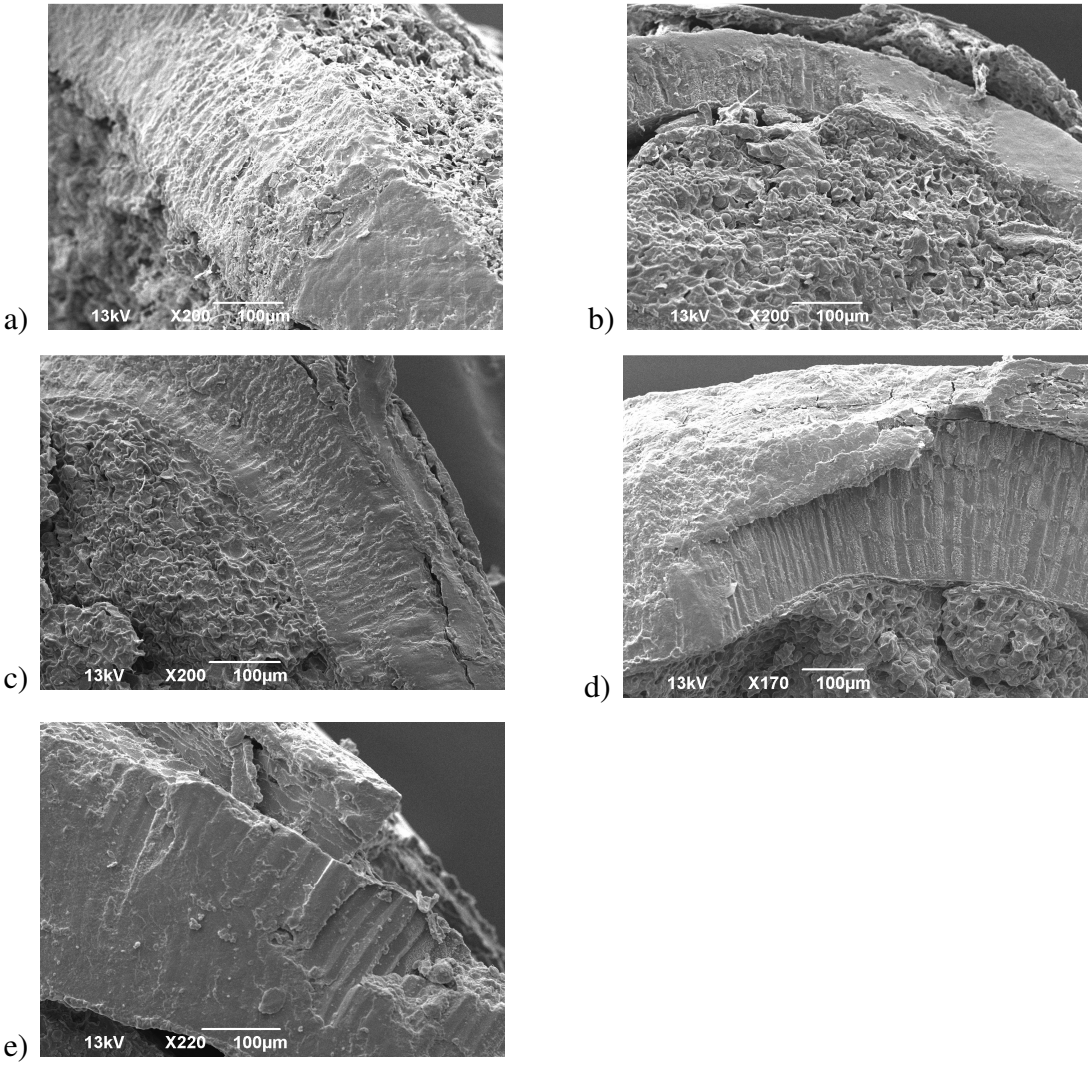


Slika 5.2.1. Skenirajući elektronski mikrografski snimci spoljašnje površine semenki pet crvenih sorti grožđa: a) Cabernet Sauvignon, b) Gamay, c) Merlot, d) Pinot Noir, e) Prokupac. Uvećanje 500 puta

Slika 5.2.1 pokazuje spoljnji izgled semenki sa uvećanjem od pet stotina puta. Na slikama se jasno uočava geografizam površine kutikule semenki. U tom smislu, izdvaja

se izgled površine semenki autohtone sorte Prokupac, kod kojih je uočena najkompaktnija i najravnija površina.

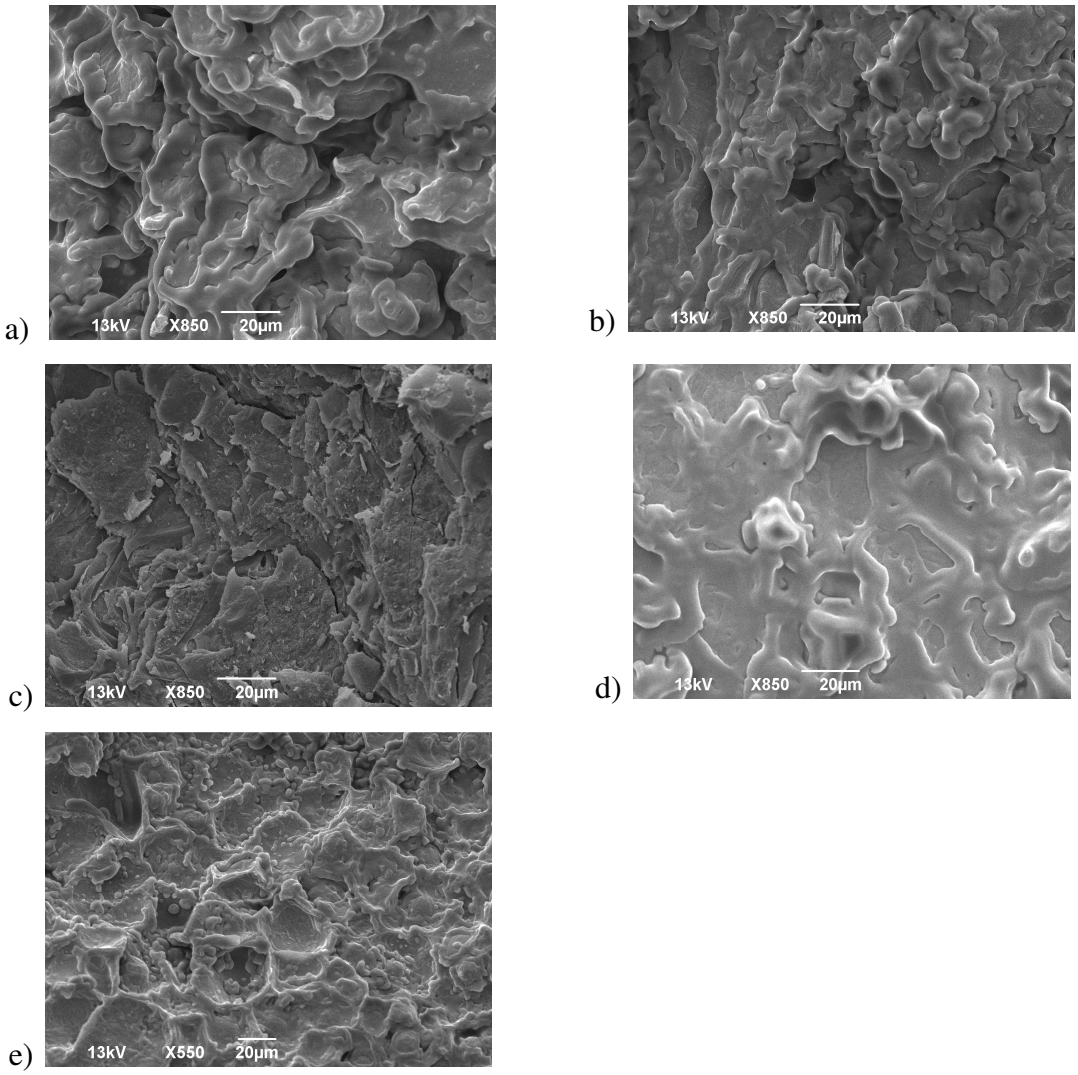
Slika 5.2.2 pokazuje vertikalne preseke semenki svih ispitivanih pet sorti, dok su na slici 5.2.3 prikazane slike njihovih endosperma



Slika 5.2.2. Skenirajući elektronski mikrografski snimci vertikalnih preseka semenki pet crvenih sorti grožđa: a) Cabernet Sauvignon, b) Gamay, c) Merlot, d) Pinot Noir, e) Prokupac. Uvećanja su označena na snimcima

Na slici 5.2.2 se mogu uočiti jasno izdiferencirani delovi semenke: jezgro ili unutrašnji sloj semenke – endosperm i omotač semenog jezgra – semenjača. Takođe se veoma jasno uočavaju tri izdiferencirana dela semenjače: spoljašnji deo koji se sastoji iz epidermisa, zatim središnji najdeblji deo semenjače i unutrašnji deo koji naleže na endosperm i koji je neznatan u odnosu na prva dva dela. Sa slike se mogu uočiti izvesne razlike u debljini epidermisa, posebno u debljini srednjeg dela semenjače a takodje i u

morfologiji unutrašnjih slojeva. Evidentno je da semenke Prokupca imaju najdeblji središnji deo semenjače, dok je kod semenki sorte Gamay semenjača najtanja u odnosu na ostale sorte. Snimak epidermisa semenke sorte Cabernet Sauvignon ukazuje na rastresitu, paučinastu strukturu epidermisa; dok se sa snimka dobijenih na semenkama sorti Gamay, Merlot i Prokupac uočavaju daleko kompaktnije strukture epidermisa. Takođe, uočljivo je da središnji deo semenjače kod Prokupca pokazuje izuzetno kompaktnu strukturu u odnosu na semenke ostalih sorti.



Slika 5.2.3. Skenirajući elektronski mikrografski snimci endosperma semenki pet crvenih sorti grožđa: a) Cabernet Sauvignon, b) Gamay, c) Merlot, d) Pinot Noir, e) Prokupac. Uvećanja su označena na snimcima

Na snimcima endosperma se uočavaju sferični oblici koji bi mogli da predstavljaju masti u obliku okruglih kapi i belančevine u obliku aleuronskih zrna. Snimci ponovo ukazuju na razlike među semenkama pet ispitivanih sorti: endospermi sorti Cabernet

Sauvignon i Gamay izgledaju rastresitije, endosperm semenke sorte Merlot pokazuje lisnatu strukturu, dok endospermi semenki sorti Pinot Noir i Prokupac deluju gušće. Pored toga, na snimku endosperma sorte Prokupac se najjasnije uočavaju brojne sferne strukture, koje najverovatnije predstavljaju granule masti.

5.3. Izdvajanje ulja iz semenki crvenih sorti grožđa metodom hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom

U ovom radu vršeno je izdvajanje i fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semenki crvenih sorti grožđa: Pinot Noir, Gamay, Prokupac, Cabernet Sauvignon i Merlot (berba 2013; na narednim slikama i u nekim tabelama su, zbog konciznijeg prikaza, nazivi sorti grožđa dati u skraćenom obliku: P.N., Gm, Pr, Mr i C.S., respektivno). Izdavajanje ulja je vršeno metodama hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u vremenu trajanja od 90 minuta. Kao što je prethodno naglašeno hladno ceđenje ulja je obavljeno na hidrauličkoj presi, pri pritisku od 600 bara i pri temepraturi cilindra od 50 °C. Ceđene su cele semenke bez prethodnog mlevenja. Ekstrakcija n-heksanom je izvedena pod uslovima opisanim u poglavlju 4.4.3 uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta, koje je na osnovu rezultata iz eksperimenta koji je opisan u poglavlju 5.1 odbarano kao najpogodnije sa aspekta ekstrakcionog prinosa i hemijskog sastava dobijenog ulja.

5.3.1. Sadržaj vlage i ukupni sadržaj ulja u semenkama

Neposredno pre početka izdvajanja ulja, vršeno je određivanje sadržaja vlage i njeno podešavanje na 8-10% m/m, kao i određivanje ukupnog sadržaja ulja metodom po Soxhletu. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 5.3.1.

Tabela 5.3.1. Sadržaj vlage i ukupni sadržaj ulja u semenkama

Uzorci ulja/sorta grožđa	Sadržaj vlage (%)	Ukupni sadržaj ulja (%)
Pinot Noir	8,26±0,05	$15,22_{D}$±0,04
Gamay	8,25±0,07	$14,25_{C}$±0,03
Prokupac	7,81±0,09	$11,84_{A}$±0,05
C. Sauvignon	9,43±0,06	$15,77_{E}$±0,04
Merlot	9,82±0,08	$12,84_{B}$±0,03

Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Utvrđeni sadržaj ulja u semenkama je u opsegu od 11,84 do 15,77%, što je u skladu sa podacima dostupnim u literaturi (poglavlje 2.5). Statistička obrada podataka potvrđuje da sadržaj ulja u semenkama zavisi od sorte grožđa. Iz tabele se može videti da semenke sorte Cabernet Sauvignon imaju najveći sadržaj ulja, dok je namanji sadržaj ulja utvrđen kod semenki autohtone sorte grožđa Prokupac.

5.3.2. Prinos ulja

Dobijeni prinosi su izraženi u procentima (%, m/m) izdvojenog ulja u odnosu na masu semenke, a rezultati su prikazani u tabeli 5.3.2, odakle se može uočiti da su u ovom radu metodom hladnog ceđenja dobijeni prinosi od 4,78 do 6,27%. Ove vrednosti su nešto niže u odnosu rezultate koje je publikovao *Pardo et al.* (*2011*), koji su na 4 različite sorte grožđa hladnim ceđenjem postigli prinose od oko 7%. Ova razlika se može objasniti time što su navedeni autori u svom radu koristili pužnu presu koja uobičajeno daje veće prinose u odnosu na hidrauličku presu koja je korišćena u ovom radu. Prinosi dobijeni ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom koji se nalaze u opsegu od 10,06 do 13,01% su uporedivi sa podacima dostupnim u literaturi (*Da Porto et al., 2013*).

Tabela 5.3.2. Prinosi ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijeni metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta i sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupni sadržaj ulja u semenkama

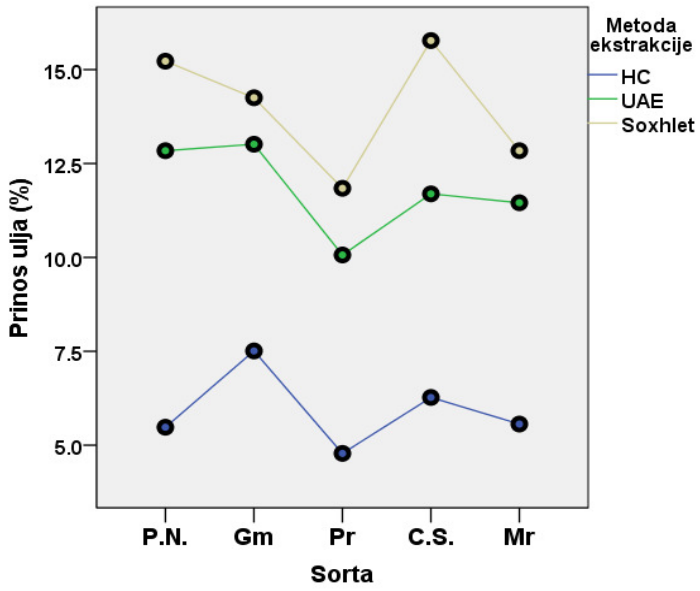
Ulje iz semenki grožđa od sorte	**HC**		**UAE**	
	Prinos ulja (% m/m)	**Sadržaj izdvojenog ulja* (%)**	**Prinos ulja (% m/m)**	**Sadržaj izdvojenog ulja* (%)**
Pinot Noir	$5{,}48_B{}^a \pm 0{,}11$	36,0	$12{,}84_C{}^b \pm 0{,}21$	84,4
Gamay	$7{,}51_D{}^a \pm 0{,}18$	52,7	$13{,}01_C{}^b \pm 0{,}15$	91,3
Prokupac	$4{,}78_A{}^a \pm 0{,}16$	40,4	$10{,}06_A{}^b \pm 0{,}12$	85,0
C. Sauvignon	$6{,}27_C{}^a \pm 0{,}15$	39,8	$11{,}69_B{}^b \pm 0{,}05$	74,1
Merlot	$5{,}56_B{}^a \pm 0{,}14$	43,3	$11{,}45_B{}^b \pm 0{,}23$	89,2
Prosek	5,92	42,4	11,81	87,8

*Sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama, izražen u procentima (%).
Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti ($p<0{,}05$). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Statistička obrada rezultata iz tabele 5.3.2 ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike u prinosu. Prinosi ulja dobijenih metodom hladnog ceđena se u zavisnosti od sorte mogu

klasifikovati u 4 grupe (A-D) i nalaze se u sledećem redosledu: Gamay > C.Sauvignon > Merlot = Pinot Noir > Prokupac; dok se prinosi ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C) po sledećem redosledu: Gamay = Pinot Noir > C.Sauvignon = Merlot > Prokupac.

Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja, što se jasno uočava sa slike 5.3.1 na kojoj su dati grafički prikazi prinosa ulja postignuti pomenutim metodama u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama. Analiza podataka iz tabele 5.3.2 i sa slike 5.3.1 ukazuje da je ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom značajno efiksanija u odnosu na metodu hladnog ceđenja. Ekstrakcijom n-heksanom izdvaja se, u zavisnosti od sorte, od 74,1 do 91,3% ulja od ukupnog sadržaja ulja u semenkama; dok se hladnim ceđenjem izdvajaju oko dva puta manje količine. Najveća efikasnost izdvajanja ulja zabeležena je kod semenki sorte Gamay, gde je hladnim ceđenjem izdvojeno 52,7% od ukupnog sadržaja ulja, a ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom 91,3%. Izdvajanje ulja je bilo najmanje efikasno kod sorti Pinot Noir (hladno ceđenje, 36,0%) i Cabernet Sauvignon (izdvajanje n-heksanom uz tretman ultrazvukom, 74,1%).



Slika 5.3.1. Grafički prikaz prinosa ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta u poređenju sa ukupnim sadržajem ulja u istim semenkama

5.3.3. Fizičko-hemijske karakteristike ulja

U ovom radu se određivane sledeće fizičko-hemijske karakteristike ulja: gubitak mase sušenjem, relativna gustina, tačka dimljenja, saponifikacioni broj, jodni broj i kiselinski broj. Vrednosti ovih parametara su definisane *Codex standardom* (*2005*) i *Pravilnikom o kvalitetu ulja* (*2013*), pa je shodno tome komentarisanje dobijenih rezultata vršeno u odnosu na vrednosti propisane ovim aktima i na literaturne podatke.

Gubitak mase sušenjem

Sadržaj vlage (vode) i isparljivih materija je izuzetno važan pokazatelj kvaliteta ulja. Prisustvo vlage u ulju je nepoželjno sa aspekta kvaliteta ulja, jer pri određenim uslovima povećani sadržaj vlage dovodi do hidrolitičkih promena usled čega raste kiselost; odnosno, povećava se sadržaj slobodnih masnih kiselina, što dovodi do pogoršanja kvaliteta ulja. Veći sadržaj vlage takođe može izazvati i zamućenje ulja (*Dimić i Turkulov, 2000*). U tabeli 5.3.3 su predstavljene vrednosti gubitaka mase sušenjem kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.

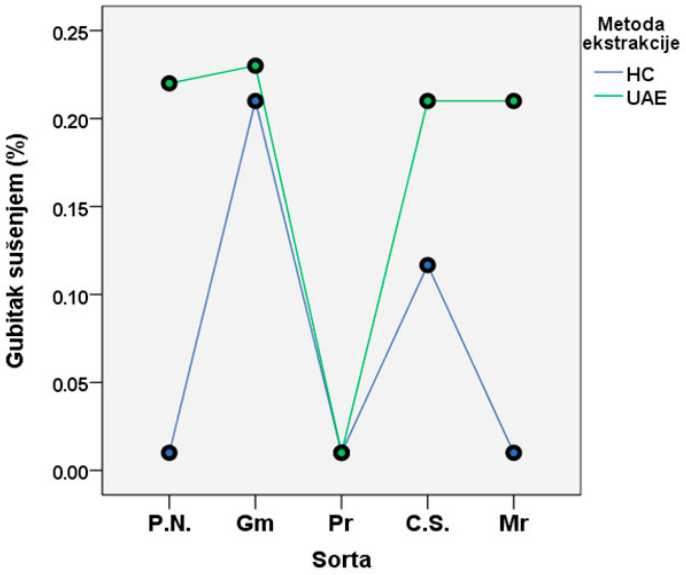
Iz tabele se uočava da su sve vrednosti gubitka mase sušenjem dobijene za hladno ceđena ulja u granicama propisanih vrednosti (*Codex standard 2005. i Pravilnik o kvalitetu 2013*), osim u slučaju ulja od semenke sorte Gamay gde je utvrđena vrednost bliska maksimalno dozvoljenoj vrednosti. Kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom sve vrednosti gubitka mase sušenjem su nešto iznad dozvoljene granice, osim kod ulja iz semenki sorte Prokupac.

Tabela 5.3.3. Gubitak mase sušenjem kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u procentima (% m/m)

Ulje iz semenki grožđa od sorte	Gubitak sušenjem (%, m/m)		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$0{,}010_A{}^a \pm 0{,}000$	$0{,}220_C{}^b \pm 0{,}000$	0,115
Gamay	$0{,}210_C{}^a \pm 0{,}010$	$0{,}230_D{}^b \pm 0{,}000$	0,220
Prokupac	$0{,}010_A{}^a \pm 0{,}000$	$0{,}010_A{}^a \pm 0{,}000$	0,010
C. Sauvignon	$0{,}117_B{}^a \pm 0{,}006$	$0{,}210_B{}^b \pm 0{,}000$	0,164
Merlot	$0{,}010_A{}^a \pm 0{,}000$	$0{,}210_B{}^b \pm 0{,}000$	0,110
Prosek	0,071	0,176	0,124

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iako se vrednosti gubitka mase sušenjem nalaze u veoma uskom intervalu, statistička obrada rezultata ukazuje da između ulja iz semenki različitih sorti dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja, osim kod ulja iz semenki sorte grožđa Prokupac, što se jasno uočava sa slike 5.3.2. Sa slike se takođe vidi da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, osim kod ulja iz semenki sorte Prokupac pokazuju veću vrednost gubitka mase sušenjem od hladno ceđenih ulja. Ovo se može objasniti eventulanim zaostatkom rastvarača u ulju nakon ekstrakcije, koji i ukoliko je prisutan u ovako malim koncentracijama ima zanemarljiv efekat na analize ostalih parametara kvaliteta (*Crews et al., 2006*).



Slika 5.3.2. Grafički prikaz rezultata gubitka mase sušenjem ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u procentima

Relativna gustina

U tabeli 5.3.4 su predstavljene vrednosti relativne gustine ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Utvrđene vrednosti su kod svih ulja (osim ulja iz semenki sorte grožđa Gamay dobijenog hladnim ceđenjem) ispod donje granice (0,920) definisane *Codex Standardom* (*2005*) i *Pravilnikom o kvalitetu ulja* (*2013*). S druge strane, vrednosti relativne gustine koje su dobijene u

ovom radu su uporedive sa literaturnim podacima gde se u zavisnosti od izvora navode vrednosti od 0,908 do 0,937 (*Dimić, 2005*). *Morvarid et al. (2013)* su u uljima semenki dve iranske sorte grožđa (Lal i Khalili) pronašli vrednosti relativne gustine 0,919 i 0,924, dok je vrednost relativne gustine u ulju od semenki grožđa koju su objavili *Mehmet et al. (2010)* bila 0,918 (takođe ispod donje granice predviđne pravilnikom). S obzirom da su svi ostali parametri kvaliteta, a prevashodno sastav masnih kiselina koji ima najveći uticaj na relativnu gustinu, u okviru Pravilnikom definisanih granica, uočena odstupanja vrednosti relativne gustine iz ovog rada u odnosu na pravilnik se ne mogu objasniti.

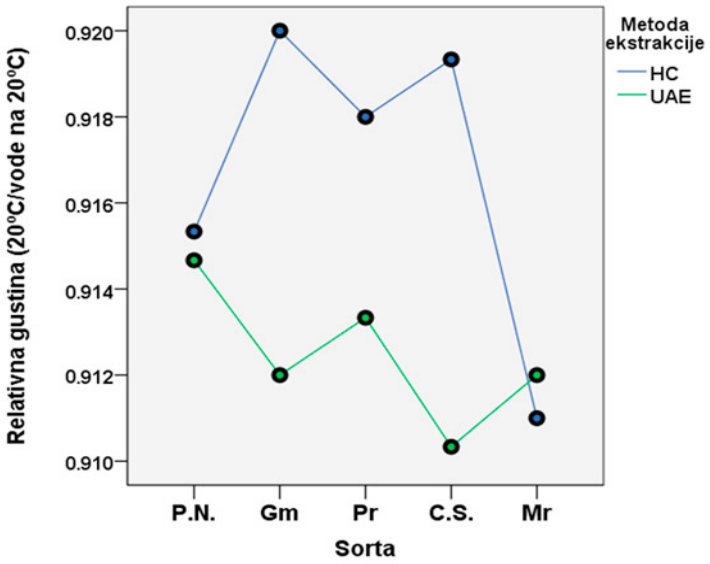
Statistička analiza dobijenih vrednosti realtivne gustine ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se i hladno ceđena i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C). Statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja su utvrđene kod ulja iz semenki grožđa sorti Prokupac, C. Sauvignon i Gamay, gde su kod hladno ceđenih ulja utvrđene veće vrednosti relativne gustine u odnosu na ulja iz semenki istih sorti dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Kod ulja iz semenki sorte grožđa Pinot Noir i Merlot nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja.

Tabela 5.3.4. Vrednosti relativne gustine ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Relativna gustina (20ºC/vode na 20ºC)**		
	HC	**UAE**	**Prosek**
Pinot Noir	$0{,}915_{B}^{a}$±0,001	$0{,}915_{C}^{a}$±0,001	0,915
Gamay	$0{,}920_{C}^{b}$±0,000	$0{,}912_{AB}^{a}$±0,000	0,916
Prokupac	$0{,}918_{BC}^{b}$±0,002	$0{,}913_{BC}^{a}$±0,002	0,916
C. Sauvignon	$0{,}919_{C}^{b}$±0,001	$0{,}910_{A}^{a}$±0,001	0,915
Merlot	$0{,}911_{A}^{a}$±0,001	$0{,}912_{AB}^{a}$±0,000	0,912
Prosek	0,917	0,912	0,915

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Na slici 5.3.3. je dat grafički prikaz gustine ulja iz semenki grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.3.3. Grafički prikaz gustine ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Tačka dimljenja

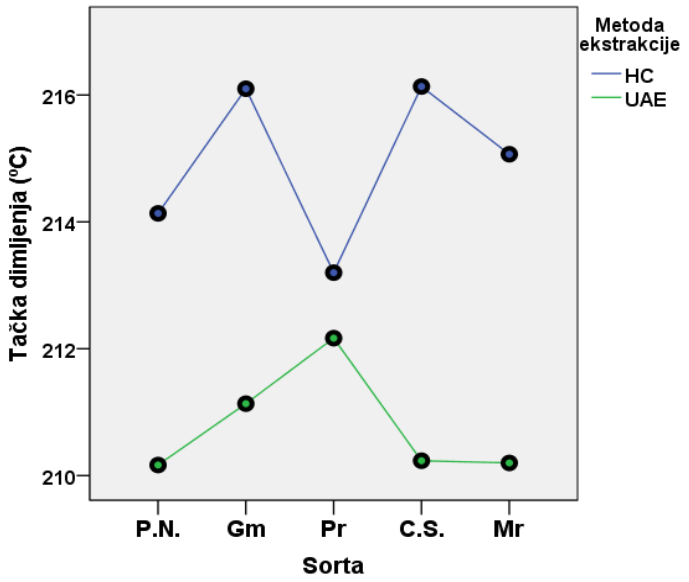
Tačka dimljenja je najniža temeperatura zagrejanog ulja ili masti na kojoj se vidljivo na površini razvija dim. Ovaj parametar je povezan sa sadržajem slobodnih masnih kiselina u ulju, zato što masne kiseline imaju veći napon pare od triacilglicerola. Ulja sa većim sadržajem slobodnih masnih kiselina ili kraćim lancima masnih kiselina imaju niže vrednosti tačke dimljenja (*Wang, 2002*). U tabeli 5.3.5 su predstavljene vrednosti tačke dimljenja kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.

Tabela 5.3.5. Tačka dimljenja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	Tačka dimljenja (°C)		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$214{,}13_B^b \pm 0{,}351$	$210{,}17_A^a \pm 0{,}058$	212,15
Gamay	$216{,}10_D^b \pm 0{,}000$	$211{,}13_B^a \pm 0{,}058$	213,62
Prokupac	$213{,}20_A^b \pm 0{,}200$	$212{,}17_C^a \pm 0{,}115$	212,68
C. Sauvignon	$216{,}13_D^b \pm 0{,}058$	$210{,}23_A^a \pm 0{,}058$	213,18
Merlot	$215{,}07_C^b \pm 0{,}058$	$210{,}20_A^a \pm 0{,}100$	212,63
Prosek	214,93	210,78	212,85

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Vrednosti tačke dimljenja koje su utvrđene u ovom radu, osim kod ulja iz semenki grožđa sorti Cabernet Sauvignon i Gamay su nešto niže od vrednosti koje se pominju u literaturi (216 ºC, *Pardo et al., 2009*). Statistička obrada ovih rezultata ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja i evidentno je da su kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem utvrđene veće vrednosti tačke dimljenja u odnosu na ulja iz semenki istih sorti dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, što se jasno može uočiti na slici 5.3.4. Ovaj rezultat je u skladu sa utvrđenim vrednostima kiselinskog broja koji su predstavljeni u nastavku rada, gde su kod hladno ceđenih ulja pronađene niže vrednosti kiselinskog broja u odnosu na ulja ekstrahovana n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.3.4. Grafički prikaz vrednosti tačke dimljenja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Saponifikacioni broj

Vrednost saponifikacionog broja zavisi od dužine lanca masnih kiselina u molekulu triacilglicerola i stoga daje izvestan uvid u lipidni sastav. Tako masti sa niskomolekularnim masnim kiselinama imaju visok saponifikacioni broj, dok masti koje u svom sastavu imaju masne kiseline dugačkog lanca imaju niži saponifikacioni broj

(*Dimić i Turkulov, 2000)*. U tabeli 5.3.6 su predstavljene vrednosti saponifikacionih brojeva kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.

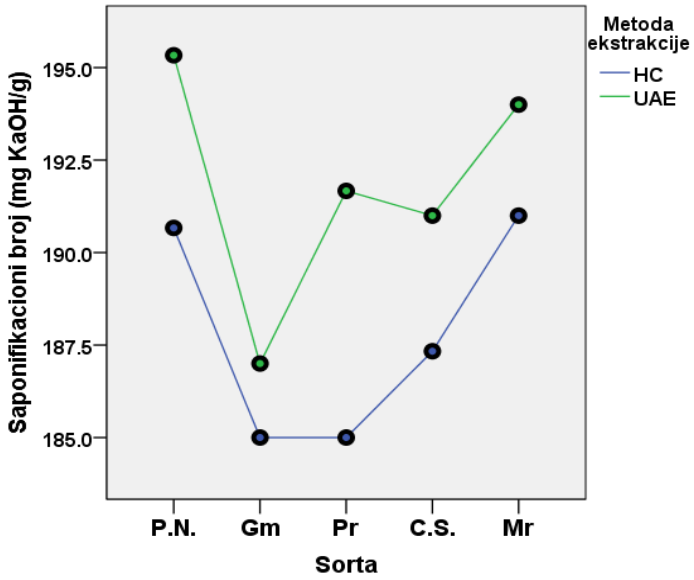
Granične vrednosti saponifikacionog broja, koje su definisane *Codex standardom* (*2005*) i *Pravilnikom o kvalitetu ulja* (*2013*), nalaze se u opsegu od 188 do 194. Podaci koji se nalaze u literaturi, u zavisnosti od izvora, nalaze se u znatno širem opsegu od 181 do 206 (*Dimić, 2005*). *Morvarid et al.* (*2013*) su u uljima semenki dve iranske sorte grožđa (Lal i Khalili) pronašli vrednosti saponifikacionog broja 190 i 187. Vrednosti koji su utvrđene u ovom radu nalaze se u opsegu od 185 do 195,33 što ukazuje na to da su neke vrednosti ispod donje granice propisane zakonskom regulativom, ali su okviru do sada objavljenih literaturnih podataka.

Statistička obrada ovih rezultata ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu su hladno ceđena ulja dosta homogenija i mogu se klasifikovati u 2 grupe (A i B), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja. Takođe, sa slike 5.3.5 se jasno uočava da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom imaju veći saponifikacioni broj u odnosu na hladno ceđenja ulja od semenki istih sorti grožđa.

Tabela 5.3.6. Saponifikacioni broj ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Saponifikacioni broj (mg KaOH/g)**		
	HC	**UAE**	**Prosek**
Pinot Noir	$190{,}67_{B}^{a}\pm1{,}15$	$195{,}33_{D}^{b}\pm0{,}58$	193,00
Gamay	$185{,}00_{A}^{a}\pm2{,}00$	$187{,}00_{A}^{a}\pm1{,}00$	186,00
Prokupac	$185{,}00_{A}^{a}\pm0{,}00$	$191{,}67_{BC}^{b}\pm1{,}53$	188,34
C. Sauvignon	$187{,}33_{A}^{a}\pm0{,}58$	$191{,}00_{B}^{b}\pm1{,}00$	189,17
Merlot	$191{,}00_{B}^{a}\pm0{,}00$	$194{,}00_{CD}^{b}\pm0{,}00$	192,50
Prosek	187,80	191,80	189,80

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD



Slika 5.3.5. Grafički prikaz vrednosti saponifikacionog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Jodni broj

Jodni broj je veoma važna karakteristika ulja ili masti jer ukazuje na njihovu nezasićenost, tj. na prisustvo nezasićenih veza u molekulu triacilglicerola. Jodni broj služi kao važan pokazatelj za identifikaciju, odnosno, dokazivanje vrste i porekla ulja. Takođe, jodni broj pokazuje različite vrednosti u zavisnosti od toga da li je ulje oksidovano ili polimerizovano, te se uspešno može koristiti za praćenje termooksidativnih promena tokom prženja hrane *(Dimić i Turkulov, 2000)*. U tabeli 5.3.7 su predstavljene vrednosti jodnog broja kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.

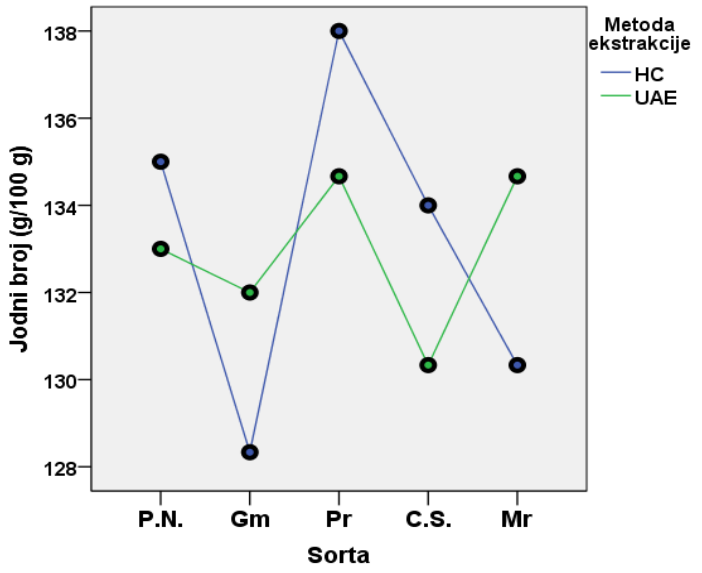
Tabela 5.3.7. Jodni broj ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	Jodni broj (g/100 g)		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$135{,}00_B{}^b \pm 0{,}000$	$133{,}00_B{}^a \pm 0{,}000$	134,00
Gamay	$128{,}33_A{}^a \pm 0{,}577$	$132{,}00_B{}^b \pm 0{,}000$	130,17
Prokupac	$138{,}00_C{}^b \pm 2{,}000$	$134{,}67_C{}^a \pm 0{,}577$	136,30
C. Sauvignon	$134{,}00_B{}^b \pm 0{,}000$	$130{,}33_A{}^a \pm 0{,}577$	132,17
Merlot	$130{,}33_A{}^a \pm 0{,}577$	$134{,}67_C{}^b \pm 0{,}577$	132,50
Prosek	133,13	132,93	133,02

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iz tabele 5.3.7 se može videti da se utvrđene vrednosti jodnog broja nalaze u veoma uskom opsegu od 128,33 do 135 i u okviru granica koje su definisane *Codex standardom* (*2005*) i *Pravilnikom o kvalitetu* (*2013*) (od 128 do 150). U literaturi se mogu naći i širi opsezi - *Dimić (2005)* navodi opseg od 121 do 157; dok su *Morvarid et al.* (*2013*) za ulja iz semenki dve iranske sorte grožđa (Lal i Khalili) pronašli vrednosti jodnih brojeva 123,55 i 126,13.

Statistička analiza rezultata vrednosti jodnog broja dobijenih u ovom radu ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se i hladno ceđena i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C). Statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja su takođe utvrđene, pri čemu se hladnim ceđenjem dobijaju ulja sa većim jodnim brojem u slučaju semenki grožđa od sorti Pinot Noir, Prokupac i Cabernet Sauvignon, dok se u slučaju semenki grožđa sorti Merlot i Gamay veće vrednosti jodnog broja dobijaju kada se ulje izdvaja ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Ovo se može lako uočiti na slici 5.3.6 na kojoj je dat grafički prikaz vrednosti jodnog broja ulja iz semenki grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.3.6. Grafički prikaz vrednosti jodnog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Kiselinski broj

Kiselinski broj je pokazatelj kiselosti ulja, koja potiče od prisustva slobodnih masnih kiselina u ulju i predstavlja jedan od osnovnih pokazatelja kvaliteta ulja. Slobodne masne kiseline prisutne u uljima su rezultat hidrolize, odnosno cepanja molekula triacilglicerola u prisustvu vode. Poznavanje njihovog sadržaja kod sirovih ulja je od posebnog značaja, jer direktno ukazuje na gubitke koji će nastati u fazi njihovog uklanjanja tokom neutralizacije ili fizičke rafinacije *(Dimić i Turkulov, 2000).*

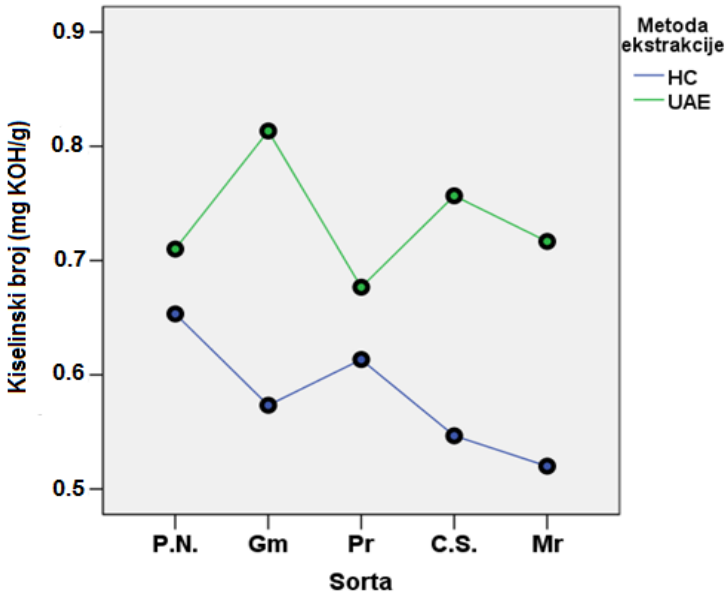
U tabeli 5.3.8 su predstavljene vrednosti kiselinskog broja kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Utvrđene vrednosti kiselinskog broja se nalaze u opsegu od 0,520 do 0,813 i ove vrednosti su daleko ispod maksimalne koju propisuju *Codex standard* (*2005*) i *Pravilnik o kvalitetu ulja* (*2013*) za hladno ceđena, devičanska i sirova ilja (4 mg KOH/g), čak su veoma bliske maksimalno dozvoljenoj vrednosti za rafinisana ulja (0,6 mg KOH/g), što ukazuje da su semenke bile sveže i dobro čuvane do momenta izdvajanja ulja.

Statistička analiza rezultata vrednosti kiselinskog broja dovodi do zaključka da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Takođe su utvrđene i statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja.

Tabela 5.3.8. Kiselinski broj ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Kiselinski broj (mg KOH/g)**		
	HC	**UAE**	**Prosek**
Pinot Noir	$0{,}653_{E}^{a}\pm0{,}006$	$0{,}710_{B}^{b}\pm0{,}010$	0,682
Gamay	$0{,}573_{C}^{a}\pm0{,}006$	$0{,}813_{D}^{b}\pm0{,}006$	0,693
Prokupac	$0{,}613_{D}^{a}\pm0{,}006$	$0{,}677_{A}^{b}\pm0{,}006$	0,645
C. Sauvignon	$0{,}547_{B}^{a}\pm0{,}006$	$0{,}757_{C}^{b}\pm0{,}006$	0,652
Merlot	$0{,}520_{A}^{a}\pm0{,}010$	$0{,}717_{B}^{b}\pm0{,}006$	0,618
Prosek	0,581	0,735	0,658

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD



Slika 5.3.7. Grafički prikaz vrednosti kiselinksog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Slika 5.3.7 pokazuje da ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom daje ulja sa većim kiselinskim brojem u odnosu na metodu hladnog ceđenja.

5.3.4. Biološki aktivne komponente ulja

5.3.4.1. Sastav masnih kiselina

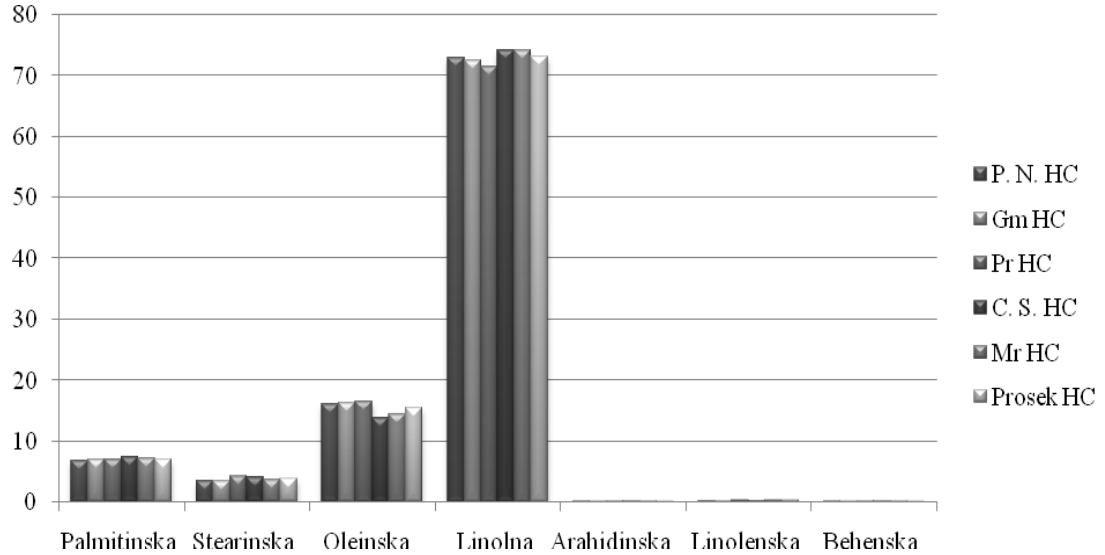
O značaju sastava masnih kiselina za oksidativnu stabilnost i nutritivnu vrednost ulja već je pisano u prethodnim poglavljima ovog rada. S tim u vezi u ovom delu rada izvršena je detaljna analiza sastava masnih kiselina u pogledu uticaja sorte grožđa i metode izdvajanja ulja na sastav masnih kiselina. U ispitivanim uljima, sastav masnih kiselina je određen kvantitativno, primenom GC metode, a dobijeni rezultati su predstavljeni u tabelama 5.3.9; 5.3.10; 5.3.11 i 5.3.12.

Tabela 5.3.9. Sadržaj masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom HC, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

Ulje od semenki sorte grožđa	Masne kiseline (%)						
	Palmitinska (C-16:0)	Stearinska (C-18:0)	Oleinska (C-18:1_c_9)	Linolna (C-18:2_9c_12c)	Arahidinska (C-20:0)	Linolenska (C-18:3_9c_12c_15c)	Behenska (C-22:0)
P. N. HC	$6,86_{A}$±0,01	$3,53_{A}$±0,009	$16,02_{C}$±0,032	$73,05_{C}$±0,073	$0,11_{AB}$±0,005	$0,28_{A}$±0,002	$0,15_{A}$±0,011
Gm HC	$6,96_{AB}$±0,17	$3,59_{B}$±0,002	$16,32_{D}$±0,023	$72,57_{B}$±0,092	$0,13_{BC}$±0,004	$0,29_{AB}$±0,013	$0,14_{A}$±0,035
Pr HC	$7,08_{ABC}$±0,18	$4,23_{E}$±0,015	$16,59_{E}$±0,041	$71,54_{A}$±0,109	$0,11_{ABC}$±0,005	$0,31_{B}$±0,004	$0,14_{A}$±0,020
C. S. HC	$7,39_{C}$±0,03	$4,09_{D}$±0,000	$13,84_{A}$±0,001	$74,17_{D}$±0,037	$0,10_{A}$±0,015	$0,29_{AB}$±0,021	$0,12_{A}$±0,010
Mr HC	$7,22_{BC}$±0,17	$3,70_{C}$±0,009	$14,36_{B}$±0,015	$74,15_{D}$±0,130	$0,14_{C}$±0,004	$0,31_{B}$±0,003	$0,13_{A}$±0,026
Prosek HC	7,10	3,83	15,43	73,09	0,12	0,30	0,13

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite subskripte su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Kao što je već rečeno, ulje semenki grožđa se ubraja u ulja sa visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina (oko 90%), pri čemu dominira linolna (C18:2, ω-6), a zatim oleinska (C18:1, ω-9) masna kiselina. U ovom radu u ispitivanim uljima od semenki crvenih sorti grožđa detektovane su, od zasićenih: palmitinska, stearinska, arahidinska i behenska masna kiselina, a od nezasićenih: oleinska, linolna i linolenska, što je u skladu sa navodima iz literature koji su detaljno obrađeni u poglavlju 2.7.1. Kao što je i bilo očekivano, na osnovu podataka iz literature (poglavlje 2.7.1), dominantno prisutne su nezasićene masne kiseline. Iz tabela 5.3.11 i 5.3.12 se može uočiti da su nezasićene masne kiseline pronađene u relativno uskom opsegu: 88,30 – 89,35% kod ulja dobijenih metodom hladnog ceđenja i u nešto širem opsegu (87,47 – 89,66%) kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



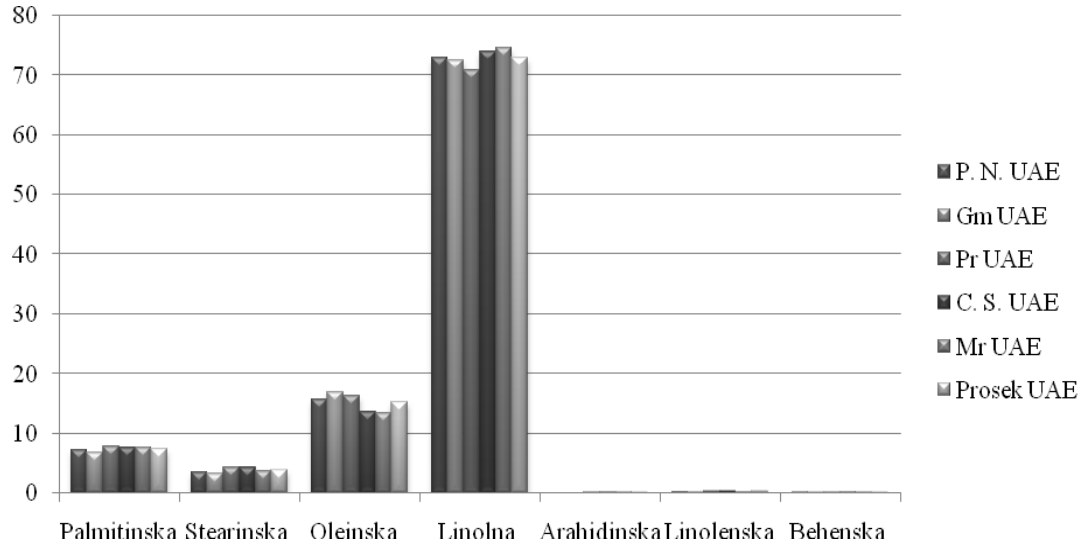
Slika 5.3.8. Grafički prikaz sadržaja masnih kiselina u hladno ceđenim uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, izražen u procentima (%)

Tabela 5.3.10. Sadržaj masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

Ulje od semenki sorte grožđa	Masne kiselina (%)						
	Palmitinska (C-16:0)	Stearinska (C-18:0)	Oleinska (C-18:1_c_9)	Linolna (C-18:2_9c_12c)	Arahidinska (C-20:0)	Linolenska (C-18:3_9c_12c_15c)	Behenska (C-22:0)
P. N. UAE	$7,27_{B}$±0,02	$3,52_{B}$±0,013	$15,69_{B}$±0,139	$73,05_{C}$±0,096	$0,08_{A}$±0,000	$0,26_{A}$±0,002	$0,14_{A}$±0,004
Gm UAE	$6,85_{A}$±0,02	$3,28_{A}$±0,006	$16,85_{D}$±0,034	$72,53_{B}$±0,005	$0,08_{A}$±0,002	$0,28_{A}$±0,022	$0,12_{A}$±0,005
Pr UAE	$7,75_{C}$±0,06	$4,37_{E}$±0,007	$16,28_{C}$±0,098	$70,83_{A}$±0,045	$0,20_{B}$±0,021	$0,36_{A}$±0,107	$0,21_{A}$±0,082
C. S. UAE	$7,59_{C}$±0,17	$4,29_{D}$±0,003	$13,58_{A}$±0,044	$73,92_{D}$±0,083	$0,17_{B}$±0,024	$0,31_{A}$±0,011	$0,14_{A}$±0,001
Mr UAE	$7,59_{C}$±0,02	$3,76_{C}$±0,030	$13,49_{A}$±0,040	$74,66_{E}$±0,066	$0,10_{A}$±0,017	$0,29_{A}$±0,010	$0,11_{A}$±0,005
Prosek UAE	7,41	3,84	15,18	73,00	0,13	0,30	0,15

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite subskripte su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Najveći sadržaj nezasićenih masnih kiselina pronađen je kod ulja iz semenki sorte Gamay dobijenog ekstrakcijom n-heksanom (89,66%), a najmanji kod ulja iz semenki sorte Prokupac takođe dobijenog ekstrakcijom n-heksanom (87,47%). Iz tabela 5.3.11 i 5.3.12 se takođe jasno može uočiti da je kod ulja dobijenih metodom hladnog ceđenja, osim kod ulja iz semenki sorte Gamay, utvrđen veći sadržaj nezasićenih masnih kiselina u odnosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.3.9. Grafički prikaz sadržaja masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih UAE metodom u trajanju od 90 minuta, izražen u procentima (%)

Tabela 5.3.11. Udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom HC

HC	Zasićene MK (%)	Mononezasićene MK (%)	Polinezasićene MK (%)	Nezasićene MK (ukupno) (%)
Pinot Noir	10,65	16,02	73,33	89,35
Gamay	10,82	16,32	72,86	89,18
Prokupac	11,56	16,59	71,85	88,44
C. Sauvignon	11,70	13,84	74,46	88,30
Merlot	11,18	14,36	74,46	88,82
Prosek	11,18	15,43	73,39	88,82

Tabela 5.3.12. Udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom UAE u trajanju od 90 minuta

UAE	Zasićene MK (%)	Mononezasićene MK (%)	Polinezasićene MK (%)	Nezasićene MK (ukupno) (%)
Pinot Noir	11,00	15,69	73,40	89,00
Gamay	10,34	16,85	72,81	89,66
Prokupac	12,53	16,28	71,19	87,47
C. Sauvignon	12,19	13,58	74,23	87,81
Merlot	11,56	13,49	74,91	88,44
Prosek	11,53	15,18	73,30	88,47

Dobijeni rezultati pokazuju da je u svim ispitivanim uljima dominantna linolna kiselina (C18:2, ω-6), koja je pronađena u opsegu 71,54 - 74,17% kod ulja dobijenih hladnim ceđenje i u opsegu 70,83 - 74,66% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-

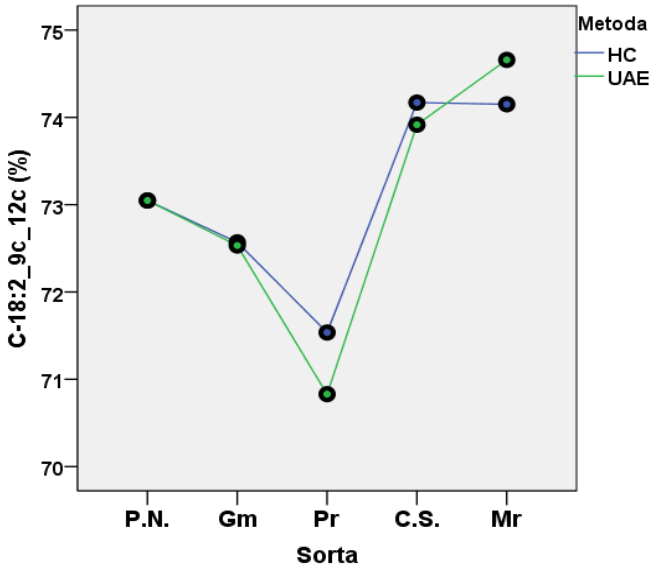
heksanom uz tretman ultrazvukom, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su obrađeni u poglavlju 2.7.1. Najveći sadržaj ove masne kiseline nađen je u ulju semenki sorte Merlot dobijenim ekstrakcijom n-heksanom, dok je u najmanjem procentu pronađen u ulju semenki sorte Prokupac dobijenim istom metodom. U tabeli 5.3.13 je dat prikaz statističke obrade rezultata za utvrđene vrednosti linolne kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu izdvajanja.

Tabela 5.3.13. Sadržaj linolne kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	**Linolna kiselina (C-18:2_9c_12c) (%)**		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$73{,}05_{C}^{a}$±0,073	$73{,}05_{C}^{a}$±0,096	73,05
Gamay	$72{,}57_{B}^{a}$±0,092	$72{,}53_{B}^{a}$±0,005	72,551
Prokupac	$71{,}54_{A}^{b}$±0,109	$70{,}83_{A}^{a}$±0,045	71,183
C. Sauvignon	$74{,}17_{D}^{b}$±0,037	$73{,}92_{D}^{a}$±0,083	74,043
Merlot	$74{,}15_{D}^{a}$±0,130	$74{,}66_{E}^{b}$±0,066	74,404
Prosek	73,09	73,00	73,046

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iako se sadržaj linolne kiseline kreće u relativno uskom opsegu statistička obrada rezultata ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E). U odnosu na metodu izdvajanja ulja, statistički značajne razlike su utvrđene kod ulja iz semenki grožđa sorti: Merlot, Prokupac i Cabernet Sauvignon, dok kod ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir i Gamay razlike nisu utvrđene. Ovo se jasno može videti sa slike 5.3.10 koja daje grafički prikaz sadržaja linolne kiseline u ispitivanim uljima u odnosu na sortu i metodu izdvajanja ulja.



Slika 5.3.10. Grafički prikaz sadržaja linolne kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

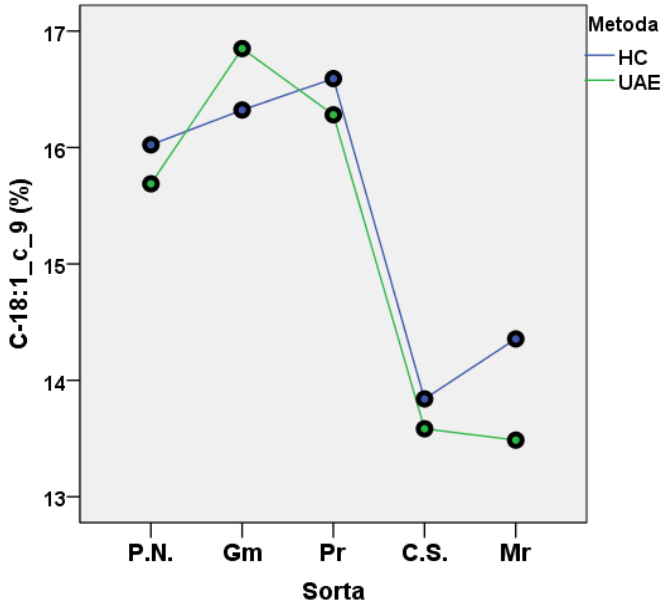
Druga po zastupljenosti je oleinska kiselina, koja je kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem pronađena u opsegu od 13,84% do 16,59%, a kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u opsegu od 13,49 do 16,85%. Utvrđene vrednosti su takođe u okviru literaturnih podataka koji su detaljno obrađeni u poglavlju 2.7.1. Najveći sadržaj ove kiseline pronađen je kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac dobijenog eskrtrakcijom n-heksanom, dok je najniži sadržaj zabeležen kod ulja iz semenki sorte Merlot i Cabernet Sauvignon, takođe dobijenih ekstrakcijom n-heksanom. U tabeli 5.3.14 je dat prikaz statističke obrade rezultata za utvrđene vrednosti sadržaja oleinske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja odnosu na sortu i metodu dobijanja.

Tabela 5.3.14. Sadržaj oleinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	**Oleinska kiselina (C-18:1_c_9) (%)**		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$16{,}02_{C}^{b}\pm0{,}032$	$15{,}69_{B}^{a}\pm0{,}139$	15,856
Gamay	$16{,}32_{D}^{a}\pm0{,}023$	$16{,}85_{D}^{b}\pm0{,}034$	16,586
Prokupac	$16{,}59_{E}^{b}\pm0{,}041$	$16{,}28_{C}^{a}\pm0{,}098$	16,436
C. Sauvignon	$13{,}84_{A}^{b}\pm0{,}001$	$13{,}58_{A}^{a}\pm0{,}044$	13,712
Merlot	$14{,}36_{B}^{b}\pm0{,}015$	$13{,}49_{A}^{a}\pm0{,}040$	13,921
Prosek	15,43	15,18	15,302

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Statistička obrada podataka vrednosti sadržaja oleinske kiseline ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja. Sa slike 5.3.11 se vidi da ulja dobijena hladnim ceđenjem (osim ulja iz semenki sorte Gamay) imaju viši sadržaj oleinske kiseline u odnosu na ulja ekstrahovana n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.3.11. Grafički prikaz sadržaja oleinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

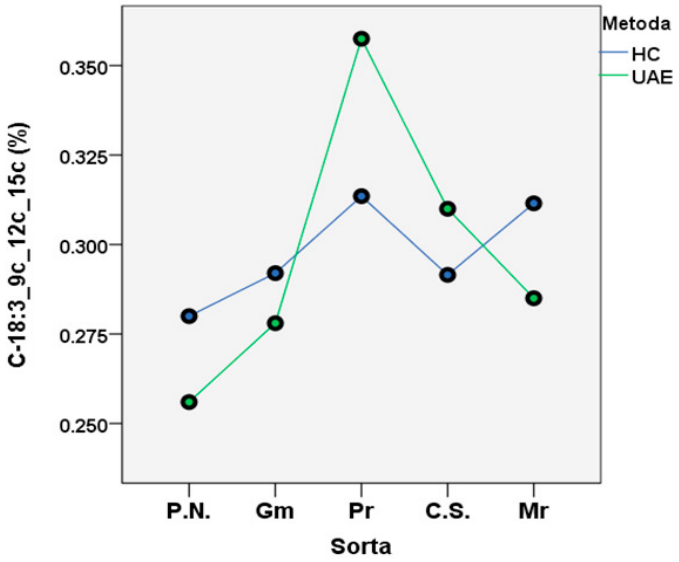
Linolenska masna kiselina (C18:3, ω-3) je u svim ispitivanim uljima nađena u malim količinama, u opsegu od 0,28 do 0,31% kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i od 0,26 do 0,36% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. U poređenju sa rezultatima drugih autora ovi opsezi su nešto niži: *Crews et al.* (*2006*) su linolensku kiselinu pronašli u opsegu 0,3 – 1,8%; *Pardo et al.* (*2009*) u opsegu 0,62 – 0,64%; a *Rubio et al.* (*2009)* u opsegu 0,35 – 0,97%. Sa aspekta otpornosti ulja na oksidaciju, prisustvo linolenske kiseline je nepoželjno u velikoj količini. Kako je polinezasićena, veoma je podložna autooksidaciji i može doprineti neprijatnom i nepoželjnom mirisu i ukusu ulja (*Baydar i Akkurt, 2001*). Prikaz statističke obrade rezultata za utvrđene vrednosti sadržaja linolenske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu dobijanja dat je u tabeli 5.3.15.

Tabela 5.3.15. Sadržaj linolenske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	Linolenska (C-18:3_9c_12c_15c) (%)		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$0,28_A{}^a \pm 0,002$	$0,26_A{}^a \pm 0,002$	0,268
Gamay	$0,29_A{}^a \pm 0,013$	$0,28_A{}^a \pm 0,022$	0,285
Prokupac	$0,31_A{}^a \pm 0,004$	$0,36_A{}^a \pm 0,107$	0,336
C. Sauvignon	$0,29_A{}^a \pm 0,021$	$0,31_A{}^a \pm 0,011$	0,301
Merlot	$0,31_A{}^a \pm 0,003$	$0,29_A{}^a \pm 0,010$	0,298
Prosek	0,30	0,30	0,298

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Statistička analiza rezultata pokazuje da na sadržaj linolenske kiseline ne utiče niti sorta niti metoda izdvajanja ulja. Na slici 5.3.12 je dat grafički prikaz sadržaja linolenske kiseline u ispitivanim uljima u odnosu na sortu i metodu izdvajanja ulja.



Slika 5.3.12. Grafički prikaz sadržaja linolenske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

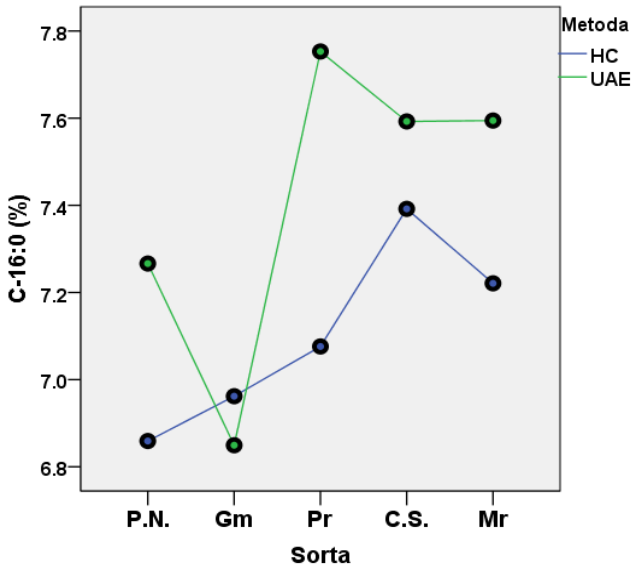
Od zasićenih masnih kiselina najzastupljenija je palmitinska koja je pronađena u opsegu 6,86 - 7,39%, kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i u opsegu 6,85 - 7,75% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, što je u okviru vrednosti publikovanih do sada. U tabeli 5.3.16 je dat prikaz statističke obrade rezultata za utvrđene vrednosti sadržaja palmitinske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu dobijanja.

Tabela 5.3.16. Sadržaj palmitinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	Palmitinska (C-16:0) (%)		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$6{,}86_{A}^{a}\pm0{,}01$	$7{,}27_{B}^{b}\pm0{,}02$	7,063
Gamay	$6{,}96_{AB}^{a}\pm0{,}17$	$6{,}85_{A}^{a}\pm0{,}02$	6,906
Prokupac	$7{,}08_{ABC}^{a}\pm0{,}18$	$7{,}75_{C}^{b}\pm0{,}06$	7,415
C. Sauvignon	$7{,}39_{C}^{a}\pm0{,}03$	$7{,}59_{C}^{a}\pm0{,}17$	7,492
Merlot	$7{,}22_{BC}^{a}\pm0{,}17$	$7{,}59_{C}^{b}\pm0{,}02$	7,408
Prosek	7,10	7,41	7,257

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Statistička analiza podataka o sadržaju palmitinske kiseline ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se i hladno ceđena i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C). Statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja su utvrđene kod ulja iz semenki sorti Pinot Noir, Merlot i Prokupac, dok kod ulja iz semenki ostale dve sorte metoda ne utiče na sadržaj palmitinske kiseline. Slika 5.3.13 pokazuje grafički prikaz sadržaja palmitinske kiseline u ispitivanim uljima u odnosu na sortu i metodu izdvajanja ulja.



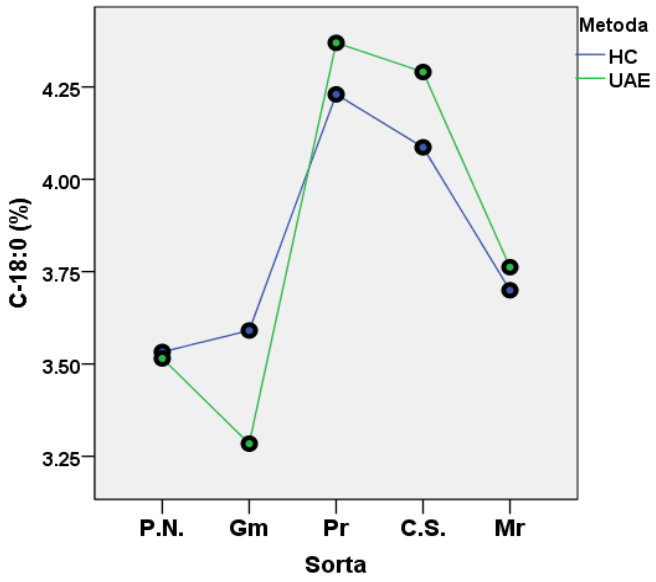
Slika 5.3.13. Grafički prikaz sadržaja palmitinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Sadržaj stearinske zasićene masne kiseline, je nađen u opsegu 3,53 - 4,23% kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i u opsegu 3,28 - 4,37% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, što je takođe u skladu sa literaturnim podacima. Prikaz statističke obrade rezultata za utvrđene vrednosti sadržaja stearinske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu dobijanja dat je u tabeli 5.3.17.

Tabela 5.3.17. Sadržaj stearinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	**Stearinska kiselina (C-18:0) (%)**		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$3,53_{A}^{a}$±0,009	$3,52_{B}^{a}$±0,013	3,524
Gamay	$3,59_{B}^{b}$±0,002	$3,28_{A}^{a}$±0,006	3,437
Prokupac	$4,23_{E}^{a}$±0,015	$4,37_{E}^{b}$±0,007	4,300
C. Sauvignon	$4,09_{D}^{a}$±0,000	$4,29_{D}^{b}$±0,003	4,189
Merlot	$3,70_{C}^{a}$±0,009	$3,76_{C}^{b}$±0,030	3,731
Prosek	3,83	3,84	3,437

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD



Slika 5.3.14. Grafički prikaz sadržaja stearinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Statistička obrada podataka o sadržaju stearinske kiseline ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se i hladno ceđena i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom

uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E). Statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja su utvrđene kod svih ulja, osim kod ulja iz semenki sorte Pinot Noir kod koje metoda izdvajanja nije uticala na sadržaj stearinske kiseline, što se lako može uočiti sa slike 5.3.14, na kojoj je dat grafički prikaz sadržaja stearinske kiseline u ispitivanim uljima u odnosu na sortu i metodu izdvajanja ulja.

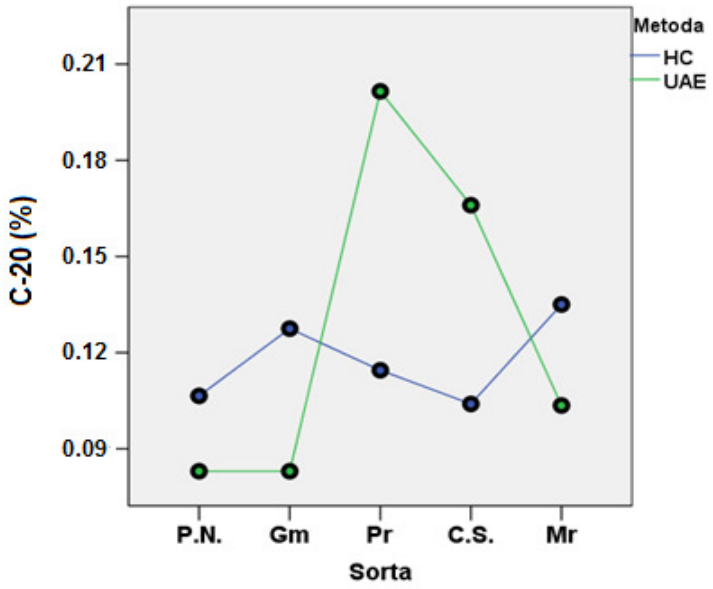
U ispitivanim uljima su utvrđene i vrlo male količine arahidinske u opsegu 0,11 - 0,14% kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i 0,08 – 0,20% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Pronađene vrednosti su takođe uporedive sa literatutnim podacima i u okviru su do sada objavljenih rezultata. U tabeli 5.3.18 su predstavljeni rezultati sadržaja arahidinske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu dobijanja.

Tabela 5.3.18. Sadržaj arahidinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	**Arahidinska kiselina (C-20:0) (%)**		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$0{,}11_{AB}{}^{b}\pm0{,}005$	$0{,}08_{A}{}^{a}\pm0{,}000$	0,095
Gamay	$0{,}13_{BC}{}^{b}\pm0{,}004$	$0{,}08_{A}{}^{a}\pm0{,}002$	0,105
Prokupac	$0{,}11_{ABC}{}^{a}\pm0{,}005$	$0{,}20_{B}{}^{b}\pm0{,}021$	0,158
C. Sauvignon	$0{,}10_{A}{}^{a}\pm0{,}015$	$0{,}17_{B}{}^{b}\pm0{,}024$	0,135
Merlot	$0{,}14_{C}{}^{b}\pm0{,}004$	$0{,}10_{A}{}^{a}\pm0{,}017$	0,119
Prosek	0,12	0,13	0,122

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iako se sadržaj arahidinske kiseline nalazi u veoma uskom opsegu, statistička analiza podataka ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom, statistički značajne razlike ipak postoje, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C), dok su ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom homogenija i mogu se klasifikovati u 2 grupe (A i B). Statistički značajne razlike u odnosu na metodu izdvajanja ulja su utvrđene samo kod ulja iz semenki sorti Prokupac i Cabernet Sauvignon, dok kod ostalih ulja metoda nije uticala na sadržaj arahidinske kiseline. Na slici 5.3.15 je dat grafički prikaz sadržaja arahidinske kiseline u ispitivanim uljima.



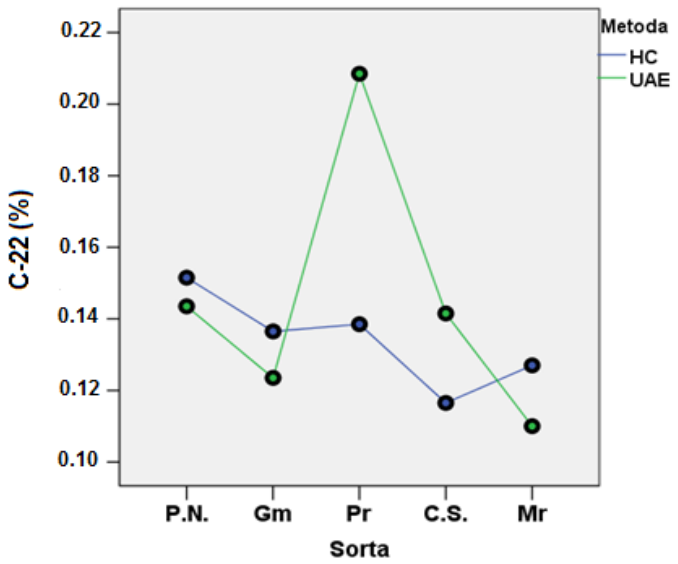
Slika 5.3.15. Grafički prikaz sadržaja arahidinske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Sadržaj behenske kiseline koja je takođe pronađena u veoma malim količinama se nalazi u opsegu 0,12 - 0,15% kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i 0,11 - 0,21% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. U tabeli 5.3.19 su predstavljeni rezulatati sadržaja arahidinske kiseline kod ispitivanih uzoraka ulja u odnosu na sortu i metodu dobijanja. Statistička obrada dobijenih rezultata za utvrđene vrednosti sadržaja behenske kiseline ukazuje da na sadržaj ove kiseline ne utiče ni sorta ni metoda izdavanja ulja. Grafički prikaz sadržaja behenske kiseline u ispitivanim uljima u odnosu na sortu i metodu izdvajanja ulja je dat na slici 5.3.16.

Tabela 5.3.19. Sadržaj behenske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje od semenki sorte grožđa	**Behenska kiselina (C-22:0) (%)**		
	Metoda		Prosek
	HC	UAE	
Pinot Noir	$0{,}15_A{}^a \pm 0{,}011$	$0{,}14_A{}^a \pm 0{,}004$	0,148
Gamay	$0{,}14_A{}^a \pm 0{,}035$	$0{,}12_A{}^a \pm 0{,}005$	0,130
Prokupac	$0{,}14_A{}^a \pm 0{,}020$	$0{,}21_A{}^a \pm 0{,}082$	0,174
C. Sauvignon	$0{,}12_A{}^a \pm 0{,}010$	$0{,}14_A{}^b \pm 0{,}001$	0,129
Merlot	$0{,}13_A{}^a \pm 0{,}026$	$0{,}11_A{}^a \pm 0{,}005$	0,119
Prosek	0,13	0,15	0,140

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD



Slika 5.3.16. Grafički prikaz sadržaja behenske kiseline u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Dobijeni rezultati ukazuju da kod ulja različtih sorti koja su dobijena istom metodom postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina, kao i to da za ulja od istih sorti koja su dobijena različitom metodom takođe postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina. Stoga se može zaključiti da sastav masnih kiselina zavisi i od sorte i od metode izdvajanja ulja; a takođe i to da se kod ulja koja su dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta dobijene vrednosti sadržaja masnih kiselina nalaze u širim opsezima, dok su ulja dobijena hladnim ceđenjem nešto homogenija po pitanju sastava masnih kiselina.

Sa nutritivnog aspekta, na bazi dobijenih rezultata može se reći da ulje iz semenki grožđa pripada grupi jestivih ulja linolnog tipa, što je u skladu sa literaturnim podacima. Opširna istraživanja o uticaju ω-6 polinezasićenih masnih kiselina na snižavanje nivoa koncentracije serum holesterola koja traju još od pedesetih godina XX veka dovela su do gledišta koje ove masne kiseline vidi kao dominantne u metabolizmu lipida. Ustanovljeno je da su ω-6 masne kiseline veoma značajne na polju kardiovaskularnih bolesti *(Hornstra, 1999; Rubba i Iannuzzi, 2001)*. U tom pogledu se za ulja iz semenki grožđa koja su ispitana u ovom radu može reći da su nutritivno visoko vredna, buduci da je sadržaj linolne ω-6 masne kiseline izuzetno visok i u proseku iznosi 73,09 % kod hladno ceđenih i 73% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Važno je istaći da je prisustvo esencijalne α -linolenske masne kiseline iz

familije ω-3 takođe utvrđeno u svim uzorcima ulja u proseku od 0,3%, a njeno prisustvo čak i u veoma malim količinama značajno doprinosi nutritivnoj vrednost ulja *(Connor, 2000; Simopoulos, 2002)*.

5.3.4.2. Sadržaj α-tokoferola

Podaci o sadržaju α-tokoferola u uljima iz semenki različitih crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom su predstavljeni u tabeli 5.3.20.

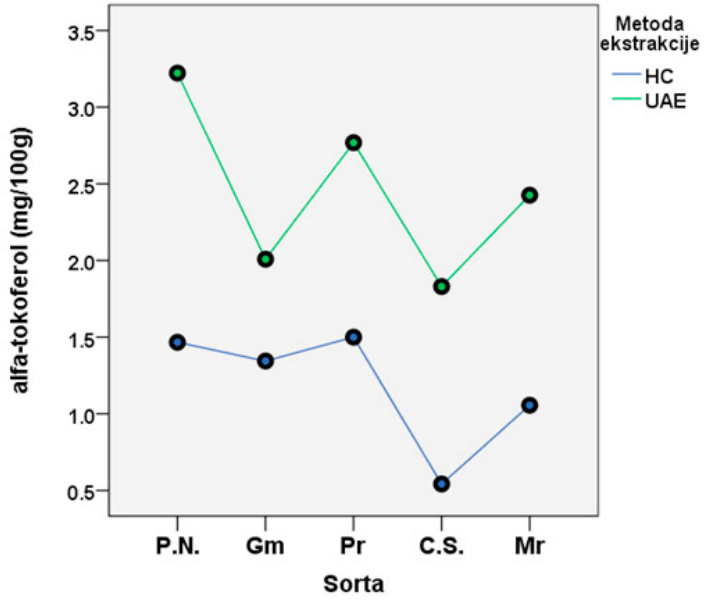
Tabela 5.3.20. Sadržaj α-tokoferola u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u mg/100 g

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Sadržaj α-tokoferola (mg/100 g)**		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$1{,}466_{C}^{a}$±0,158	$3{,}222_{D}^{b}$±0,118	2,344
Gamay	$1{,}344_{BC}^{a}$±0,040	$2{,}008_{A}^{b}$±0,148	1,676
Prokupac	$1{,}500_{C}^{a}$±0,057	$2{,}768_{CD}^{b}$±0,585	2,134
C. Sauvignon	$0{,}542_{A}^{a}$±0,258	$1{,}830_{A}^{b}$±0,092	1,186
Merlot	$1{,}056_{B}^{a}$±0,163	$2{,}426_{BC}^{b}$±0,138	1,741
Prosek	1,182	2,451	1,816

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Tokoferoli su veoma značajne komponente svih jestivih ulja, a o njihovoj ulozi u zaštiti nezasićenih masnih kiselina od oksidacije, kako *„in vivo“* u biološkim sistemima, tako i *„in vitro“* pri čuvanju ili korišćenju ulja, je pisano u poglavljima 2.2.3.2 i 2.7.4. Kao što se iz tabele 5.3.20 vidi, sadržaj α-tokoferola u uzorcima ulja dobijenim hladnim ceđenjem je pronađen u opsegu od 0,542±0,258 do 1,5±0,057 mg/100 g, pri čemu srednja vrednost iznosi 1,182 mg/100 g. Kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom utvrđene su nešto veće vrednosti koje se nalaze u opsegu od 1,803±0,092 do 3,222±0,118 mg/100 g, a prosečan sadržaj α-tokoferola iznosi 2,451 mg/100 g. Treba istaći da se po sadržaju α-tokoferola uzorci ulja od semenki različitih sorti grožđa, kod oba načina izdvajanja, statistički značajno razlikuju, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C), i nalaze se u sledećem redosledu: Prokupac = Pinot Noir ≥ Gamay ≥ Merlot > C. Sauvignon; dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D) po sledećem redosledu: Pinot Noir ≥ Prokupac ≥ Merlot > Gamay = C. Sauvignon. Statistički

značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja. Na slici 5.3.17, na kojoj je dat grafički prikaz sadržaja α-tokoferola u uzorcima ulja, jasno se može uočiti da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom imaju znatno veći sadržaj α-tokoferola u odnosu na hladno ceđenja ulja od semenki istih sorti grožđa, što ukazuje na značajan uticaj metode izdvajanja ulja na sadržaj α-tokoferola.



Slika 5.3.17. Grafički prikaz sadržaja α-tokoferola u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u mg/100 g

Literaturni podaci o sadržaju tokoferola u uljima od semenki grožđa koji su detaljno obrađeni u poglavlju 2.7.4 ukazuju na to da je u većini slučajeva α-tokoferol dominantan u odnosu na ostale tokoferole i da se javlja u jako širokom opsegu od 0 do 30,2 mg/100 g. Rezultati dobijeni u ovom radu uporedivi su sa rezultatima koje su objavili *Crews et al. (2006)* i *Freitas et al. (2008)*; ali su vrednosti niže u odnosu na rezultate koje su objavili *Beveridge et al. (2005), Bravi et al. (2007), Kim et al. (2008)* i *Ali Sabir et al. (2012)*. Ova izuzetno velika variranja u sadržaju α-tokoferola mogu se objasniti uticajem više faktora kao što su: sorta grožđa, metoda izdvajanja ulja, područje uzgoja vinove loze kao i uslovi čuvanja ulja do momenta analize, na šta ukazuju i pomenuti autori.

5.3.4.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

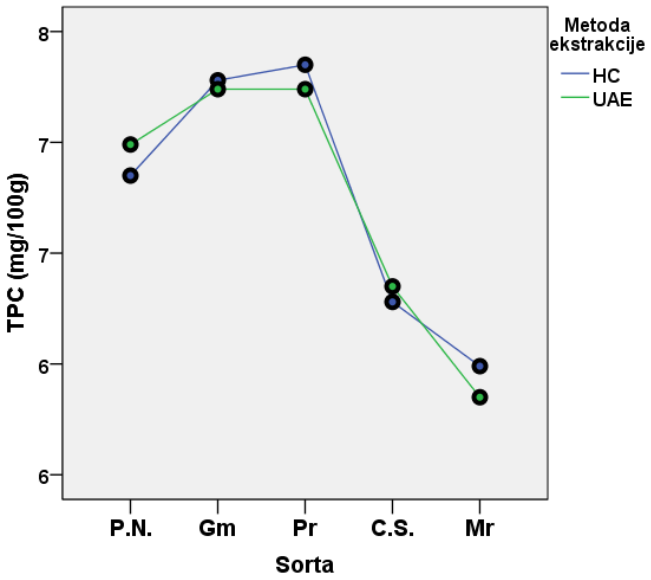
Podaci o sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u uljima iz semenki različitih crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom su predstavljeni u tabeli 5.3.21.

Tabela 5.3.21. Sadržaj TPC-a u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u mg/100 g

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Sadržaj ukupnih fenolnih jedninjenja (mg/100 g)**		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$6{,}85_{BC}^{a}\pm0{,}43$	$6{,}99_{BC}^{a}\pm0{,}27$	6,92
Gamay	$7{,}28_{C}^{a}\pm0{,}16$	$7{,}24_{C}^{a}\pm0{,}30$	7,26
Prokupac	$7{,}35_{C}^{a}\pm0{,}19$	$7{,}24_{C}^{a}\pm0{,}18$	7,29
C. Sauvignon	$6{,}28_{AB}^{a}\pm0{,}25$	$6{,}35_{AB}^{a}\pm0{,}28$	6,32
Merlot	$5{,}99_{A}^{a}\pm0{,}34$	$5{,}85_{A}^{a}\pm0{,}27$	5,92
Prosek	6,75	6,73	6,74

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

O ulozi ovih jedinjenja u zaštiti ulja od oksidacije i mehanizmu njihovog delovanja kao primarnih aktioksidanata je detaljno pisano u poglavlju 5.1.4 ovog rada, gde je i potvrđena visoka zavisnost oksidativne stabilnosti ulja i antioksidativnog kapaciteta sa sadržajem TPC-a. Kao što se iz tabele 5.3.21 može videti, sadržaj TPC-a u ispitivanim uzorcima ulja je pronađen u sledećim opsezima: od 5,99±0,34 do 7,35±0,19 mg/100 g sa prosekom od 6,75 mg/100 g kod hladno ceđenjih ulja i od 5,85±0,27 do 7,24±0,30 mg/100 g sa prosekom od 6,73 mg/100 g kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Iako su utvrđene vrednosti pronađene u veoma uskim opsezima, statistička analiza ukazuje na postojanje statistički zanačajnih razlika u sadržaju TPC-a kod ulja iz semenki različitih sorti dobijenih istom metodom, pri čemu se i hladno ceđena i ulja, kao i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom mogu klasifikovati u 3 grupe (A-C). Najviši sadržaj TPC-a (kod obe metode izdvajanja ulja) je pronađen kod ulja iz semenki grožđa autohtone sorte Prokupac i sorte Gamay dok je najniži sadržaj, takođe kod obe metode izdvajanja, dobijen kod ulja iz semenki sorti Merlot i Cabernet Sauvignon. Statistički značajne razlike u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na metodu izdvajanja ulja nisu utvrđene. Sa slike 5.3.18 se uočava da između ulja iz semenki istih sorti, dobijenih različitim metodama, praktično ne postoje razlike u sadržaju TPC-a.



Slika 5.3.18. Grafički prikaz sadržaja TPC-a u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta, izražen u mg/100 g

Poređenjem vrednosti TPC dobijenih u ovom radu sa podacima iz literature koji su obrađeni u poglavlju 2.7.2, može se uočiti da su utvrđene vrednosti sadržaja TPC iz ovog rada uporedive za rezultatima koje su objavili *Bail et al.* (*2008*) kod kojih se sadržaj polifenola nalazio u rasponu od 59,0 – 115,5 μg/g; a više u odnosu na rezultate koje su publikovali *Matthäus (2008*) i *Pardo et al.* (*2009*), utvrđeni opseg 10,68 - 34,43 mg/kg. Visoka zavisnost sadržaja polifenola u ulju od sorte grožđa iz kog potiče semenka, na koju su ukazali i pomenuti autori, je potvrđena i u ovom radu.

5.3.5. Antioksidativni kapacitet ulja

Prirodni antioksidanti privlače sve veću pažnju. To su supstance koje utiču i na ublažavanje stanja oksidativnog stresa, koji je definisan kao stanje pri kome prekomerne količine reaktivnih kiseoničnih i/ili azotnih vrsta prevazilaze endogeni antioksidativni kapacitet, što dovodi do oksidacije različitih biomakromolekula kao što su enzimi, proteini, DNK i lipidi. Naučnici su odavno otkrili da hrana može da ima uticaj na zdravlje: istraživanja o ishrani pokazala su kompleksnu interakciju hrane i našeg prirodnog sistema odbrane. Pri tome su višestruko istaknuti značaj i funkcija antioksidanata u prevenciji mnogih bolesti. Sa tim u vezi, jestiva ulja koja su bogata prirodnim antioksidansima mogu imati određenu ulogu u suzbijanju rizika mnogih

negativnih pojava koje nastaju kao posledica oksidativnog stresa. Stoga je određivanje antiradikalskog kapaciteta (ARC), to jest, antioksidativne aktivnosti ulja prema slobodnim radikalima od velikog značaja.

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti u odnosu na stabilne DPPH radikale (spektrofotometrijski), izraženi kao vrednost EC_{50}, kao i ARC ulja iz semenki grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, prikazani su u tabeli 5.3.22. Treba napomenuti da niže vrednosti EC_{50} i više vrednosti ARC ukazuju na veći antioksidativni kapacitet uzorka ulja.

Tabela 5.3.22. Vrednosti EC_{50} (mg ulja/mg DPPH radikala) i antiradikalski kapacitet u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

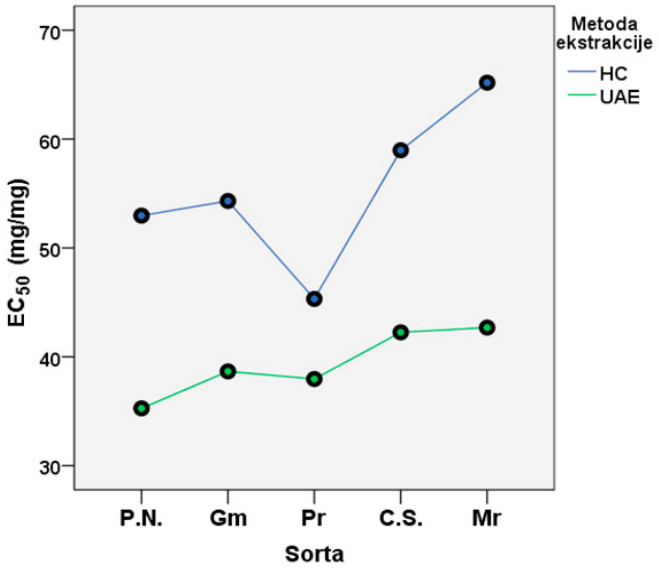
Ulje iz semenki grožđa od sorte	HC		UAE	
	EC_{50} (mg/mg)	**ARCx10^2**	**EC_{50} (mg/mg)**	**ARCx10^2**
Pinot Noir	$52{,}97_B{}^b$±0,656	1,888±0,023	$35{,}26_A{}^a$±1,25	2,838±0,101
Gamay	$54{,}31_B{}^b$±0,759	1,842±0,026	$38{,}66_B{}^a$±0,964	2,588±0,064
Prokupac	$45{,}32_A{}^b$±0,794	2,207±0,039	$37{,}96_B{}^a$±0,773	2,635±0,054
C. Sauvignon	$58{,}97_C{}^b$±1,123	1,696±0,032	$42{,}25_C{}^a$±0,751	2,367±0,042
Merlot	$65{,}18_D{}^b$±1,249	1,535±0,029	$42{,}68_C{}^a$±0,557	2,343±0,031
Prosek	55,350	1,833	39,362	2,554

EC_{50} – neophodna količina ulja za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50%.
Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Kao što se iz tabele 5.3.22 vidi, vrednosti EC_{50} za ispitivane uzorke hladno ceđenih ulja se nalaze u širokom intervalu od 45,32±0,794 do 65,18±1,249 mg ulja/mg DPPH radikala, dok se kod ulja ekstrahovanih n-heksanom uz tretman ultrazvukom nalaze u nešto užem opsegu od 35,26±1,25 do 42,68±0,557 mg ulja/mg DPPH radikala. Statistička obrada rezultata izmerenih vrednosti EC_{50} ukazuje na to da između uzoraka ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, što znači da postoji izražen uticaj sorte na antioksidativni kapacitet. Hladno ceđenja ulja se mogu klasifikovati u četiri grupe (*A*-*D*) i nalaze se u sledećem redosledu: Prokupac < Pinot Noir = Gamay < Merlot < Cabernet Sauvignon; dok se ulja ekstrahovana n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 3 grupe (*A*-*C*) i nalaze se u sledećem redosledu: Pinot Noir < Prokupac = Gamay < Cabernet Sauvignon = Merlot. Utvrđena variranja između ulja iz semenki različitih sorti grožđa su u saglasnosti sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, gde je kod ulja iz semenki grožđa sorti Merlot i Cabernet Sauvignon pronađen niži sadržaj ovih jedinjenja u

odnosu na ulja iz semenki ostalih sorti grožđa. Korelacija između sadržaja TPC i vrednosti EC_{50} je izraženija kod hladno ceđenih ulja (kvadrat koeficijenta korelacije R^2=0,76) u odnosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom (R^2=0,53). Između sadržaja α-tokoferola i vrednosti EC_{50} nije utvrđen visok stepen korelacije (R^2=0,18 kod hladno ceđenih ulja i R^2=0,39 kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom).

Na osnovu izračunatih R^2 vrednosti može se pretpostaviti sledeće: kod hladno ceđenih ulja, usled nižeg sadržaja α-tokoferola uticaj ovih jedinenja na antioksidativni kapacitet je značajno smanjen, dok sadržaj TPC ima dominantnu ulogu. U slučaju kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz ultrazvučni tretman njihov antioksidativni kapacitet je porastao usled evidentno većeg sadržaja α-tokoferola, pa se može reći da je antioksidatvini kapacitet ovih ulja rezultat interakcije sadržaja TPC i α-tokoferola. Statistički značajna razlika kod izmerenih vrednosti EC_{50} je utvrđena i u odnosu na metodu izdvajanja ulja, što se lako može uočiti sa slike 5.3.19 na kojoj je dat prikaz vrednosti EC_{50} u odnosu na sortu grožđa i na metodu izdvajanja ulja.



Slika 5.3.19. Grafički prikaz vrednosti EC_{50} (mg ulja/mg DPPH radikala) u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Sa slike se vidi da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom pokazuju značajno veći antioksidativni kapacitet u odnosu na ulja dobijena hladnim ceđenjem. U ovom slučaju razlike ne mogu biti vezane za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, jer je prethodno utvrđeno da u uljima iz semenki istih sorti grožđa dobijenih

primenjenim metodama ne postoje statistički značajne razlike u sadržaju ovih jedinjenja. Ukoliko posmatramo sadržaj α–tokoferola, evidentno je da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom imaju značajno viši sadržaj ovog antioksidansa u odnosu na ulja dobijena hladnim ceđenjem, što bi mogao biti indikator da je ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom omogućila i bolju ekstrakciju drugih jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost (β, γ i δ tokoferol, tokotrienoli, fitosteroli, biljni pigmeti) a koja nisu bila predmet istraživanja ovog rada.

Podaci koji se sreću u literaturi baziraju se na određivanju antioksidativnog kapaciteta metanolnog ekstrakta ulja iz semenki grožđa, pa shodno tome nisu uporedivi sa vrednostima utvrđenim u ovom radu, koji su dobijeni merenjen antioksidativnog pri čemu je antiradikalski kapacitet (ARC) iznosio 6,28 x 10^{-2}. *Lutterodt et al.,* (*2011*) su određivali DPPH· aktivnost metanolnih esktrakata ulja iz semenki različitih sorti grožđa, a rezultate su izrazili preko TEAC vrednosti (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Dobijene vrednosti relativnog DPPH· kapaciteta pronađene su u opsegu od 0,07 mmol TEAC/g ulja kod ulja iz semenki sorte Chardonnay do 2,22 kapaciteta direktno iz ulja. Prema *Sigeru et al.* (*2008*) DPPH· aktivnost metanolnog ekstrakta ulja semenke grožđa (određivana u vremenu od 15 minuta) iznosila je 13,4±2%; dok je vrednost EC_{50} metanolnog ekstrakta postignuta sa količinom od 15,9 μg, mmol TEAC/g ulja kod ulja iz semenki sorte Concord. Ovi autori su utvrdili i veoma visok stepen korelacije ovih rezultata sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja. *Bail et al.* (*2008*) su u metanolnim ekstraktima različitih ulja iz semenki grožđa sa tržišta utvrdili TEAC vrednosti u opsegu od 0,09 μg/g do 1,16 μg/g.

5.3.6. Oksidativni status i oksidativna stabilnost ulja

Autooksidacija biljnih ulja je neizbežan proces i dešava se pre ili kasnije u zavisnosti od sastava ulja, uslova čuvanja i prisutnosti komponenti koji ubrzavaju ili usporavaju ovaj proces *(Martin-Polvillo, 2004)*. U toku autooksidacije nastaju produkti oksidacije (alkoholi, aldehidi, ketoni) koji i u malim količinama daju uljima neprijatan miris i ukus i narušavaju njihova senzorska svojstva *(Gray, 1978)*. Iz navedenih razloga određivanje oksidativnog statusa i oksidativne stabilnosti ulja je od izuzetnog značaja.

5.3.6.1. Oksidativni status (Peroksidni broj - Pbr, anisidinski broj – Abr i oksidativna vrednost – OV)

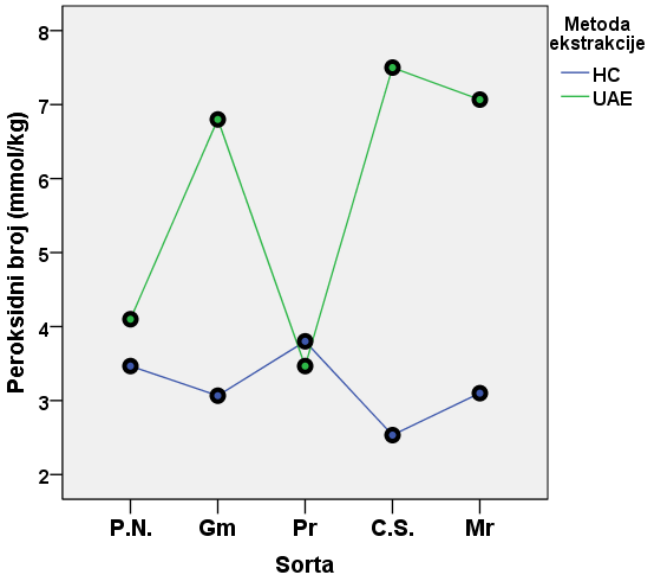
U tabelama 5.3.23 i 5.3.24 su predstavljeni rezultati određivanja peroksidnog (Pbr) i anisidinskog broja (Abr) ulja dobijenih metodom hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, dok su oksidativne vrednosti (OV) istih uzoraka prikazane u tabeli 5.3.25.

Tabela 5.3.23. Peroksidni broj ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	Peroksidni broj (mmol/kg)		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$3{,}467_{C}^{a}\pm0{,}058$	$4{,}100_{B}^{b}\pm0{,}100$	3,784
Gamay	$3{,}067_{B}^{a}\pm0{,}058$	$6{,}800_{C}^{b}\pm0{,}000$	4,934
Prokupac	$3{,}800_{D}^{b}\pm0{,}000$	$3{,}467_{A}^{a}\pm0{,}058$	3,634
C. Sauvignon	$2{,}533_{A}^{a}\pm0{,}058$	$7{,}500_{E}^{b}\pm0{,}000$	5,017
Merlot	$3{,}100_{B}^{a}\pm0{,}100$	$7{,}067_{D}^{b}\pm0{,}058$	5,084
Prosek	3,193	5,787	4,491

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Peroksidni broj jestivih nerafinisanih ulja je pokazatelj čija je maksimalna vrednost ograničena *Pravilnikom o kvalitetu* (*2013*) i iznosi 7,5 mmol/kg. Kao što se iz tabele 5.3.23 vidi, od svih ispitanih ulja samo je kod ulja iz semenki sorte Cabernet Sauvignon dobijenog ekstrakcijom n-heksanom utvrđena granična vrednost peroksidnog broja - 7,5 mmol/kg (za hladno ceđena, devičanska i nerafinisana jestiva biljna ulja). Kako se peroksidi formiraju tokom početne faze oksidacije, inicijacije, a utvrđene vrednosti Pbr kod svih uzoraka ulja u ovom radu su u granicama dozvoljenim pravilnikom, ovi rezultati potvrđuju da su ulja proizvedena iz sirovine dobrog kvaliteta i da su postupci izdvajanja ulja izvedeni na adekvatan način. Kod hladno ceđenih ulja vrednosti Pbr su nađene u granicama od 2,533 do 3,8 mmol/kg, dok je kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom Pbr utvrđen u opsegu od 3,467 do 7,5 mmol/kg. Na slici 5.3.20 je dat grafički prikaz vrednosti peroksidnog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta.



Slika 5.3.20. Grafički prikaz vrednosti peroksidnog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Statistička obrada rezultata peroksidnog broja ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se hladno ceđena ulja mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja, što se može uočiti sa slike 5.3.20, gde se jasno vidi da osim kod ulja iz semenki Prokupca, ulja dobijena hladnim ceđenjem imaju manji Pbr.

Literaturni podaci o peroksidnom broju ulja iz semenki grožđa su veoma oskudni. *Morvarid et al. (2013)* su u uljima semenki dve Iranske sorte grožđa (Lal i Khalili) pronašli vrednosti peroksidnog broja 9,3 i 10,63 meq/kg. *Madawala et al. (2012)* su objavili podatak od 1,0 meq/kg za ulje iz semenki grožđa nabavljeno sa tržišta. Pardo et al. (2009) su kod ulja iz semenki 4 različite sorte grožđa pronašli vrednosti peroksidnog broja u opsegu 5,99 – 13,50 meq/kg. *Oomah et al. (1998)* su za hladno ceđeno ulje semena grožđa objavili podatak od 1,9 meq/kg. *Gomez et al. (1996)* su pronašli daleko veće vrednosti peroksidnog broja (>100 meq/kg za ulje izdvojeno n-heksanom metodom po Soxhletu u trajanju od 20 h, i >380 meq/kg za ulje izdvojeno natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom, na 350 bara i 40 °C, u trajanju od 3 h). Ovako visoke vrednosti mogu biti objašnjene predtretmanom semenki toplom vodom u cilju uklanjanja zaostalog šećera (ova voda kasnije fermentiše i destiliše se).

Tabela 5.3.24. Anisidinski broj ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

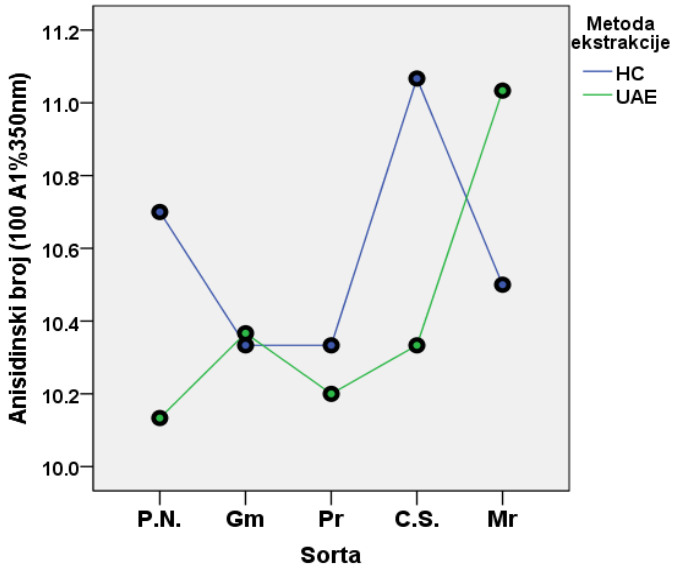
Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Anisidinski broj (100 $A^{1\%}_{350nm}$)**		
	HC	**UAE**	**Prosek**
Pinot Noir	$10,70_C{}^b$±0,000	$10,13_A{}^a$±0,058	10,42
Gamay	$10,33_A{}^a$±0,058	$10,37_C{}^a$±0,058	10,35
Prokupac	$10,33_A{}^b$±0,058	$10,20_{AB}{}^a$±0,000	10,27
C. Sauvignon	$11,07_D{}^b$±0,058	$10,33_{BC}{}^a$±0,058	10,70
Merlot	$10,50_B{}^a$±0,000	$11,03_D{}^b$±0,058	10,77
Prosek	10,59	10,41	10,50

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Analizirajući vrednosti anisidinskog broja (Tabela 5.3.24), kod svih uzoraka se može konstatovati i prisustvo sekundarnih neisparljivih produkata oksidacije koji nastaju razgradnjom hidroperoksida i dovode do povećanja anisidinskog broja. Iako se vrednosti anisidinskog broja nalaze u veoma uskom opsegu, statistička obrada rezultata ukazuje na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, pri čemu se i hladno ceđena i ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D).

Takođe su statistički značajne razlike utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja osim kod sorte Gamay gde metoda izdvajanja nema uticaja na vrednost anisidinskog broja. Ovo se može uočiti i sa slike 5.3.21 na kojoj je predstavljen grafički prikaz vrednosti anisidinskog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta.

Literaturni podaci o vrednostima anisidinskog broja u ulju semenke grožđa su veoma šturi: *Madawala et al. (2012)* su objavili podatak od 15,5 za ulje iz semenki grožđa nabavljeno sa tržišta i u poređenju sa ovim rezultatom, vrednosti utvrđene u ovom radu su nešto niže.



Slika 5.3.21. Grafički prikaz vrednosti anisidinskog broja ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

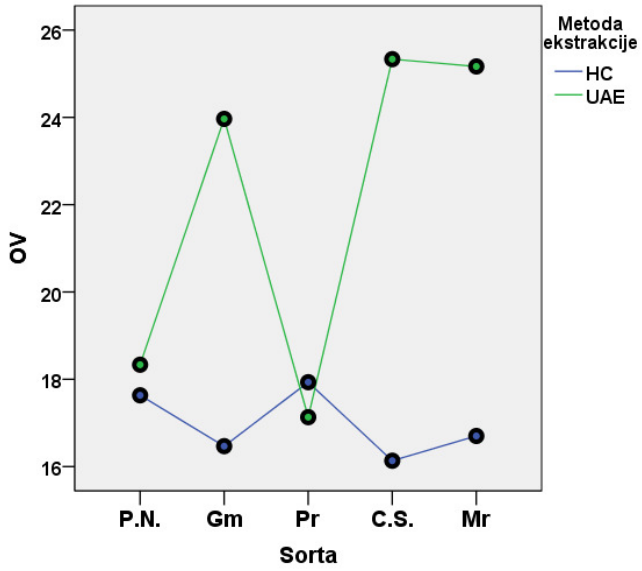
Različite vrednosti primarnih i sekundarnih proizvoda oksidacije ulja se jasno reflektuju i na oksidativnu vrednost (Tabela 5.3.25).

Tabela 5.3.25. Oksidativni status (OV – vrednost) ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Oksidativna vrednost (OV)**		
	HC	**UAE**	**Prosek**
Pinot Noir	$17{,}63_{C}^{a}\pm0{,}12$	$18{,}33_{B}^{b}\pm0{,}25$	17,98
Gamay	$16{,}46_{AB}^{a}\pm0{,}05$	$23{,}96_{C}^{b}\pm0{,}05$	20,21
Prokupac	$17{,}93_{C}^{b}\pm0{,}06$	$17{,}13_{A}^{a}\pm0{,}11$	17,53
C. Sauvignon	$16{,}13_{A}^{a}\pm0{,}15$	$25{,}33_{D}^{b}\pm0{,}05$	20,73
Merlot	$16{,}70_{B}^{a}\pm0{,}20$	$25{,}16_{D}^{b}\pm0{,}15$	20,93
Prosek	16,973	21,98	19,48

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

OV vrednosti hladno ceđenih ulja je utvrđena u veoma uskom rasponu od 16,13±0,12 do 17,93±0,06; dok su kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom utvrđene vrednosti u znatno širem opsegu od 17,13±0,11 do 25,33±0,05, što znači da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu imati veći sadržaj primarnih i sekundarnih produkata reakcija oksidacije. Na slici 5.3.22 je dat grafički prikaz oksidativnih vrednosti ispitivanih uzoraka ulja.



Slika 5.3.22. Grafički prikaz oksidativnog statusa (OV – vrednosti) ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

5.3.6.2. Oksidativna stabilnost ulja

Oksidativna stabilnost ili održivost biljnih ulja predstavlja vreme za koje se ona mogu sačuvati od intenzivnog procesa autooksidacije. Kvarenje biljnih ulja uzrokovano oksidativnim procesom je najčešci tip kvarenja, i predstavlja proces oksidacije nezasićenog ugljovodoničnog lanca masnih kiselina. Poznavanje stabilnosti ili održivosti biljnih ulja je važno kako bi se moglo unapred odrediti vreme bez bitnih promena kvaliteta. Rezultati određivanja indukcionog perioda na bazi Rancimat testa i određivanja početne temperature oksidacije (OOT) pomoću DSC-ja su dati u tabelama 5.3.26 i 5.3.27.

Tabela 5.3.26. Rezultati određivanja indukcionog perioda Rancimat testom pri temperatuti od 100 ºC i protoku vazduha od 10 L/h, kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

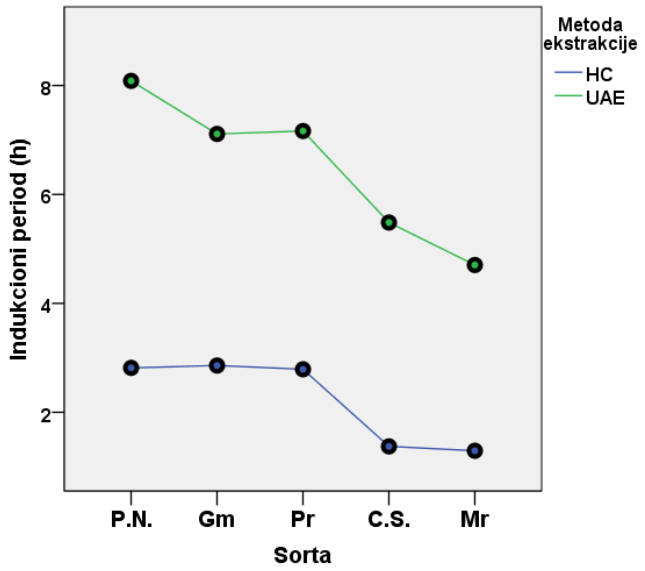
Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Indukcioni period (h)**		
	HC	UAE	Prosek
Pinot Noir	$2{,}82_{B}^{a}\pm0{,}14$	$8{,}09_{D}^{b}\pm0{,}08$	5,45
Gamay	$2{,}86_{B}^{a}\pm0{,}02$	$7{,}11_{C}^{b}\pm0{,}11$	4,98
Prokupac	$2{,}79_{B}^{a}\pm0{,}05$	$7{,}17_{C}^{b}\pm0{,}08$	4,98
C. Sauvignon	$1{,}38_{A}^{a}\pm0{,}01$	$5{,}48_{B}^{b}\pm0{,}18$	3,43
Merlot	$1{,}30_{A}^{a}\pm0{,}11$	$4{,}71_{A}^{b}\pm0{,}04$	3,01
Prosek	2,23	6,51	4,37

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Rezultati ispitivanja indukcionog perioda ukazuju na dosta slabiju oksidativnu stabilnost ulja dobijenih hladnim ceđenjem u onosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Vrednosti indukcionog perioda hladno ceđenih ulja su pronađene u veoma uskom intervalu od 1,30±0,11 h do 2,86±0,02 h. Statistička obrada podataka ukazuje na postojanje statistički značajnih razlika između hladno ceđenih ulja dobijenih iz semenki različitih sorti grožđa, pri čemu se ulja mogu klasifikovati u dve grupe (A i B). Hladno ceđena ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir, Prokupac i Gamay pripadaju grupi B i pokazala su zanačajno veću oksidativnu stabilnost u odnosu na ulja iz semenki grožđa sorti Merlot i Cabernet Sauvignon koja pripadaju grupi A. Kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom utvrđene vrednosti indukcionog perioda pokazuju veća variranja i nalaze se u opsegu od 4,71±0,04 h do 8,09±0,08 h. Statistička analiza podataka u slučaju ovih ulja ukazuje na značajne razlike oksidativne stabilnosti u odnosu na sortu grožđa, pri čemu se ulja mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Najveću oksidativnu stabilnost je pokazalo ulje iz semenki grožđa sorte Pinot Noir dok je najmanje otporno na oksidaciju ulje iz semenki grožđa sorte Merlot. U odnosu na metodu dobijanja ulja, statistička analiza takođe ukazuje na postojanje značajnih razlika. Ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta imaju znatno duži indukcioni period u odnosu na hladno ceđena ulja, što se može uočiti na slici 5.3.23, na kojoj je dat grafički prikaz vrednosti idukcionog perioda ispitivanih uzoraka ulja. Prosečni indukcioni period ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom je 6,51 h što ja za skoro tri puta više od hladno ceđenih ulja čiji prosečni indukcioni period iznosi 2,23 h. Ovo jasno pokazuje da ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom daje ulja otpornija na oksidaciju u odnosu na metodu hladnog ceđenja.

Literaturni podaci o indukcionom periodu ulja iz semenki grožđa se dosta razlikuju, pre svega zbog različitih uslova izvođenja testa (temperature i protoka vazduha). *Frega et al. (1998)* su određivali indukcioni period u zavisnosti od sadržaja slobodnih masnih kiselina. Indukcioni period koji je pronađen u početnom (originalnom) uzorku je bio 3,7 h, i u zavisnosti od povećanja sadržaja SMK (od 0 do 3%), indukcioni period se smanjivao od 3,7 do oko 3 h (pri 110 °C i 20 L/h). *Madawala et al. (2012)* su pri temperature od 100 °C i protoku vazduha 20 l/h utvrdili da je indukcioni period kod ulja semenke grožđa bio 8,9 h, pri istim uslovima su pronašli da orahovo ulje ima indukcioni

period 4,2 h; ulje badema - 10,2 h; ulje lešnika - 16 h; ulje avokada - 16,9 h; dok je ulje makadamije imalo indukcioni period čak - 37 h. Indukcioni period kod ulja iz semenki različitih sorti grožđa pri temperaturi od 80°C i protoku vazduha od 7 L/h je pronađen u intervalu od 19,7 do 40 h *(Lutterodt et al., 2011)*. Poređenje sa navedenim rezultatima ukazuje da su utvrđene vrednosti indukcionog perioda iz ovog rada nešto niže posebno kod hladno ceđenih ulja, dok su kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uporedive sa literaturnim podacima.



Slika 5.3.23. Grafički prikaz vrednosti indukcionog perioda, kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Pored Rancimat testa, za određivanje otpornosti ulja na oksidaciju korišćena je i DSC metoda, u režimu linearnog zagrevanja i u protoku sintetičkog vazduha, čija je pouzdanost dokazana u prethodnom eksperimentu ovog rada. Kao što je već objašnjeno u poglavlju 5.1.4, kraj indukcionog perioda je određen kao tačka (temperatura) naglog porasta egzotermnog signala u DSC profilu praćenom tokom zagrevanja ulja u oksidativnoj atmosferi; ova tačka je označena kao početna temepratura oksidacije (OOT). U tabeli 5.3.27 su date vrednosti OOT dobijene kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta.

Iz tabele se može uočiti da, kao i u slučaju rezultata merenja indukcionog perioda Rancimat testom, izmerene vrednosti OOT ukazuju na dosta slabiju oksidativnu

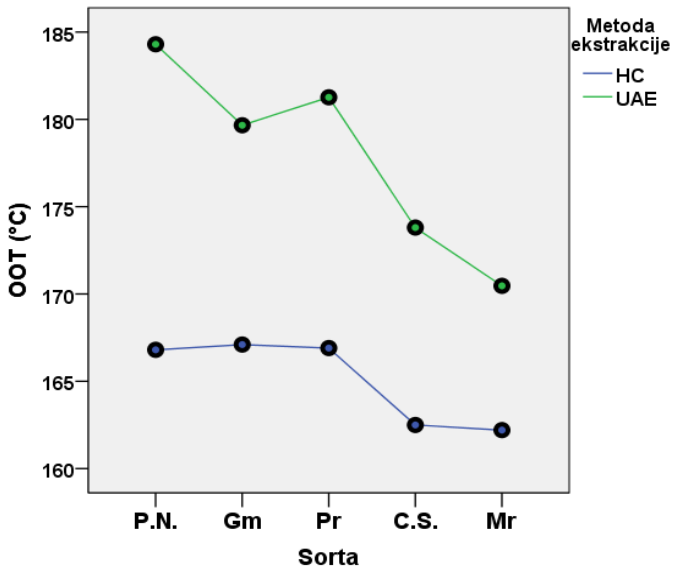
stabilnost ulja dobijenih hladnim ceđenjem u odnosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.

Tabela 5.3.27. Vrednosti početne temperature oksidacije (OOT) kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Ulje iz semenki grožđa od sorte	**Početna temperaura oksidacije, OOT, °C**		
	HC	**UAE**	Prosek
Pinot Noir	$166{,}80_{AB}{}^{a}\pm1{,}65$	$184{,}30_{D}{}^{b}\pm1{,}21$	175,55
Gamay	$167{,}10_{B}{}^{a}\pm1{,}61$	$179{,}67_{C}{}^{b}\pm1{,}27$	173,38
Prokupac	$166{,}90_{AB}{}^{a}\pm1{,}81$	$181{,}27_{CD}{}^{b}\pm1{,}55$	174,09
C. Sauvignon	$162{,}50_{AB}{}^{a}\pm2{,}23$	$173{,}80_{B}{}^{b}\pm1{,}05$	168,15
Merlot	$162{,}20_{A}{}^{a}\pm1{,}75$	$170{,}47_{A}{}^{b}\pm1{,}03$	166,34
Prosek	165,10	177,90	171,50

Vrednosti u istoj koloni i u istom redu koje nose različite oznake u subskriptu (sorte) i superskriptu (metode) su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Utvrđene vrednosti OOT se nalaze u relativno uskom opsegu od 162,20±1,75 do 167,10±1,61 °C kod hladno ceđenih ulja i u znatno širem opsegu od 173,8±1,05 do 184,3±1,21 °C kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, što je u saglasnosti sa rezultatima Rancimat testa. Najveću otpornost na oksidaciju kod hladno ceđenih ulja pokazuje ulje iz semenki grožđa sorte Gamay, a najmanje otporno je ulje iz semenki sorte Merlot, dok su kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom najotpornija na oksidaciju ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir i Prokupac a najmanju otpornost pokazuje takođe ulje iz semenki grožđa sorte Merlot. Statistička obrada rezultata vrednosti OOT ukazuje na postojanje statistički značajnih razlika između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom, pri čemu su hladno ceđena ulja nešto homogenija i mogu se svrstati u dve grupe (A i B), dok se ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Statistički značajne razlike su utvrđene i u odnosu na metodu izdvajanja ulja, pri čemu ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom imaju veće vrednosti OOT i samim tim pokazuju veću otpornost na oksidaciju u odnosu na hladno ceđenja ulja od semenki istih sorti grožđa, što je očigleno sa slike 5.3.24.



Slika 5.3.24. Grafički prikaz vrednosti početne temperature oksidacije (OOT), kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama HC i UAE u trajanju od 90 minuta

Oksidacija ili užegnuće, kao glavni uzrok pogoršanja kvaliteta ulja u toku čuvanja, je proces koji nastaje delovanjem kiseonika iz vazduha na nezasićene veze masnih kiselina bez obzira da li su one slobodne ili su esterifikovane u molekulu triacilglicerola. Ovaj proces se takođe naziva i autooksidacija jer su energije aktivacije u prva dva koraka reakcije veoma niske. Izlaganje vazduhu, zagrevanje, svetlost, tragovi metala, prisustvo SMK i vlaga pospešuju ove hemijske reakcije *(Ceci i Carelli, 2010)*. Dva faktora koja određuju podložnost ulja oksidaciji su sastav masnih kiselina i prisustvo pro- ili anti- oksidanata (pre svega fenolnih jedinjenja, tokoferola i tokotrienola, sterola, fosfolipida i td.). Vrste masnih kiselina koje su prisutne u ulju, naročito broj njihovih dvostrukih veza, određuju vrstu i obim hemijskih reakcija koje se javljaju tokom perioda čuvanja ulja. Polinezasićene masne kiseline kao što su linolna (C-18:2) i linolenska (C-18:3) su daleko više osetljive na procese autooksidacije od mononezasićene oleinske kiseline (C-18:1) *(Frankel, 1985)*.

Sa slika 5.3.23 i 5.3.24 se pored evidentne razlike u oksidativnoj stabilnosti između ulja dobijenih različitim metodama jasno može uočiti i izuzetno visok stepen korelacije između vrednosti indukcionog perioda i OOT kod ulja iz semenki istih sorti grožđa izdvojenih dvema različitim metodama izdvajanja (R^2=0,99 i za hladno ceđena i za ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom). Bez obzira da li su dobijena hladnim ceđenjem ili ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, evidentno je da ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir, Prokupac i Gamay pokazuju viši

stepen otpornosti na oksidaciju u odnosu na ulja iz semenki sorti Merlot i Cabernet Sauvignon.

Varijacije u vrednostima indukcionog perioda i OOT-a u zavisnosti od sorte grožđa koje su utvrđene u ovom radu mogu se objasniti razlikama u hemijskom sastavu ulja, pre svega razlikama u sastavu masnih kiselina i sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja. Ukoliko posmatramo sastav masnih kiselina, uočava se da ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir, Prokupac i Gamay imaju značajno viši sadržaj mononezasićene oleinske (C-18:1) i manji sadržaj polinezasićene linolne kiseline (C-18:1) u odnosu na ulja iz semenki grožđa sorti Merlot i Cabernet Sauvignon, što u najvećoj meri može objasniti razlike u oksidativnoj stabilnosti ovih ulja. Između sadržaja linolne kiseline i indukcionog perioda je utvrđen koeficijent korelacije R^2=0,66 za hladno ceđena ulja i R^2=0,31 za ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz prisustvo ultrazvuka. Između sadržaja oleinske kiseline i indukcionog perioda kod hladno ceđenih utvrđen je visok koeficijent korelacije od R^2=0,91; dok je kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom ponovo utvrđen nešto niži koeficijent korelacije - R^2=0,61. Ukoliko analiziramo sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kao primarnih antioksidanata sa snažnim antioksidacionim dejstvom, evidentno je da ulja iz semenki grožđa sorti Merlot i Cabernet Sauvignon imaju značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja od ostala tri ulja, što ih takođe određuje kao ulja podložnija oksidaciji. Veliki uticaj sadržaja TPC na oksidativnu stabilnost potvrđuje i visok stepen korelacije između sadržaja TPC i vrednosti indukcionog perioda (R^2=0,83 za hladno ceđena ulja i R^2=0,74 za ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom).

Sa druge strane, razloge za utvrđene razlike u oksidativnoj stabilnosti između ulja dobijenih dvema ispitivanim metodama je veoma teško naći u prethodno određenim parametrima kvaliteta ulja. Kako je prethodno utvrđeno da između ulja iz semenki istih sorti grožđa dobijenih dvema primenjenim metodama ne postoje statistički značajne razlike u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, uticaj ovih jedinjenja se isključuje. Razlike u sastavu masnih kiselina u odnosu na metodu izdvajanja ulja su neznatne u odnosu na stepen utvrđenih razlika kod otpornosti na oksidaciju. Uzimajući u obzir činjenicu da α-tokoferol ispoljava snažno biološko dejstvo dok je njegovo antioksidativno dejstvo najslabije u poređenju sa ostalim tokoferolima *(Gunston, 2005; Shahidi i Zhong, 2005)*, veći sadržaj α-tokoferola u uljima dobijenim ekstrakcijom n-

heksanom u odnosu na hladno ceđena ulja se takođe ne može smatrati odgovornim za stepen utvrđenih razlika u oksidativnoj stabilnosti između ulja dobijenih dvema korišćenim metodama. Ako se u razmatranje uključe i činjenice da oksidativni procesi ulja zavise od prisustva i sadržaja mnogobrojnih jedinjenja koja mogu delovati kao anti- ili pro- oksidantni, od kojih mnoga nisu bila predmet ovog istraživanja (β, γ i δ tokoferol, tokotrienoli, fitosteroli, biljni pigmeti), može se doći do zaključka da utvrđene razlike mogu biti rezultat razlika u sadržaju upravo ovih jedinjenja, kao i njihove međusobne interakcije u jednom složenom sistemu kao što su biljna ulja.

5.4. Ispitivanje uticaja uklanjana spoljneg omotača na povećanje prinosa i na kvalitet izdvojenog ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, postupkom hladnog ceđenja

Ispitivanje uticaja ukljanjanja spoljnjeg omotača semenke grožđa na povećanje prinosa i na kvalitet izdovojenog ulja, imalo je za cilj da utvrdi mogućnost primene ove operacije kao predtretmana semenke u cilju optimizacije metode izdvajanja ulja postupkom hladnog ceđenja. S obzirom na značaj Prokupca kao naše autohtone sorte grožđa, a uzimajući u obzir činjenicu da je u prethodnim eksperimentima u semenkama ove sorte grožđa utvrđen najniži sadržaj ulja, u ovom radu su upravo semenke ove sorte tretirane na mašini za poliranje zrna (ribalici), pre izdvajanja ulja metodom hladnog ceđenja. U eksperimentu su korišćene semenke grožđa sorte Prokupac, iz berbe 2013. godine, identične kao i u prethodnom eksperimentu. Postupak uklanjanja dela spoljnjeg omotača je urađen na mašini za poliranje zrna (ribalici) po postupku koji je opisan u poglavlju 4.2; dok je hladno ceđenje izvršeno na istoj presi i pod istim uslovima kao u prethodnom eksperimentu, kako bi rezultati bili uporedivi.

5.4.1. Rezultati tretmana na mašini za poliranje zrna (ribalici)

Postupak ljuštenja semenki grožđa u cilju optimizacije postupka hladnog ceđenja je u svetu odavno poznat; naime, poznato je da francuski proizvođači ovog ulja, semenke grožđa ljušte a zatim presuju. Postupak se bazira na tome da se semenke pre ljuštenja dovedu do određenog sadržaja vlage, a zatim se ljušte na ljuštilici. Mešavina ljuske i jezgra prenosi se na vibraciona sita gde se ljuska aspirira, a izdvojena jezgra se zatim

suše u rotacionoj sušnici. Nakon sušenja jezgra se melju i hladno presuju. Iskorišćenje pri ceđenju na ovaj način je 50-60% od ukupno prisutnog ulja *(Dimić, 2005)*.

S obzirom da se kod sazrelih semenki spoljna opna sa epidermisom lako skida (*Milosavljević, 1998*), cilj primene postupka ljuštenja u ovom radu je bio da se ukloni upravo ovaj deo spoljnjeg omotača, tj. da se ukloni sloj kutikule i epidermisa do spoljne opne, kako bi se umanjili eventualni gubici delova u kojima se nalaze biološki aktivne komponente (pre svega fenolna jedinjenja) i kako bi semenka kao sirovina u potpunosti sačuvala svoj biološki potencijal a stvorili uslovi za olakšano izdvajanje ulja iz unutrašnjih slojeva (endosperma).

U cilju određivanja količine spoljnjeg omotača koji je uklonjen ljuštenjem, urađena je serija tretmana na ribalici uz merenje mase semenke nakon svakog propuštanja kroz mašinu. Kao što je prethodno objašnjeno, tretirane su cele semenke, a tretman je rađen pri brzini okretanja radnog kola ribalice od 2000 obrtaja u minutu. Izvršena su tri eksperimenta sa po pet propuštanja semenki kroz ribalicu. Početna masa semenki koje su tretirane u sva tri ekperimeta bila je 3000 g, a nakon svakog propuštanja kroz ribalicu merena je masa semenki i određivan gubitak u odnosu na početnu masu semenki. Rezultati su predstavljeni u tabeli 5.4.1.

Tabela 5.4.1. Prosečan gubitak mase nakon tretmana ribalici

Broj tretmana na ribalici	Prosečni gubitak mase (%)
1. Tretman	$1,68^{a}$±0,16
2. Tretman	$2,45^{b}$±0,17
3. Tretman	$2,72^{bc}$±0,12
4. Tretman	$2,94^{c}$±0,12
5. Tretman	$3,05^{c}$±0,11

Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različiti (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iz tabele 5.4.1 se uočava da se najveći gubitak mase javlja nakon prvog i drugog tretmana kada se od ukupnog gubitka mase izgubi 55% odnosno 80,3% respektivno, dok se u naredna 3 tretmana gubi manje od 20% od ukupnog gubitka mase. Rezultati statističke obrade podataka ukazuju da između čevrtog i petog tretmana na ribalici praktično i neme razlike.

Vizuelnom analizom otpada (Slika 5.4.1) nastalog nakon svakog od tretmana, a koji je sakupljen na izlazu iz aspiratora, dolazi se do zaključka da najveću količinu otpada koji nastaje nakon prvog tretmana na ribalici čine primese tj. delovi suve pokožice i peteljke, kao i sitni delovi oštećenih zrna koji nisu iskoristljivi za proizvodnju ulja. U

otpadu koji nastaje nakon drugog tretmana takođe su uočljivi tragovi primesa ali u daleko manjoj meri u odnosu na jasno učljive delove ljuske spoljneg omotača semenki koji predstavlja sloj epidermisa sa kutikulom. Otpad koji nastaje u preostala tri tretmana ne sadrži ostatke primesa i sastoji se isključivo od delova spoljnjeg omotača semenki (epidermisa sa kutikulom). Na površini semenki koja zaostaje nakon petog tretmana (Slika 5.4.2), jasno su uočljivi tragovi uklanjanja površinskog sloja spoljnjeg omotača.

Slika 5.4.1. Otpad koji se izdvaja nakon tretmana semenke grožđa na ribalici

Slika 5.4.2. Semenke grožđa sorte Prokupac pre i nakon tretmana na ribalici

5.4.2. Prinos ulja

U cilju utvrđivanja uticaja uklanjanja spoljnjeg omotača semenke na povećanje prinosa ulja, izvršeno je hladno ceđenje semenki koje su prethodno bile podvrgnute tretmanu na ribalici (u nastavku Prokupac-Tr-HC) a rezultati su poređeni sa prethodno utvrđenim prinosom ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, gde semenke pre ceđenja

nisu bile podvrgnute tretmanu na ribalici (u nastavku Prokupac-HC). Dobijeni prinosi su izraženi u procentima (%, m/m) izdvojenog ulja u odnosu na početnu masu semenke, a rezultati su prikazani u tabeli 5.4.2.

Tabela 5.4.2. Prinos ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac sa i bez tretmana na ribalici, metodom hladnog ceđenja

Uzorci ulja	**Prinos ulja % (m/m)**	**Sadržaj izdvojenog ulja*** **(%)**
Prokupac-HC	$4{,}780^{a}$±0,155	40,37
Prokupac-Tr-HC	$6{,}170^{b}$±0,066	52,11

*Sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama, izražen u procentima (%).
Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Kao što se može videti iz tabele, dobijeni rezultati pokazuju da se nakon izvršenog tretmana na ribalici, prinos ulja hladnim ceđenjem povećao sa 4,78±0,155% na 6,17±0,066%. Pri tome je stepen iskorišćenja, to jest, sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama povećan sa 40,37% na 52,11%, što predstavlja povećanje za oko 12%. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je uklanjanje dela spoljnjeg omotača semenke grožđa tretmanom na ribalici, koji je izvršen kao predtreman izdvajanju hladnim ceđenjem, značajno doprinelo povećanju prinosa ulja iz semenki autohtone sorte grožđa Prokupac

5.4.3. Fizičko-hemijska analiza ulja

U cilju određivanja uticaja uklanjanja dela spoljnjeg omotača semenke na kvalitet izdvojenog ulja, kod ulja dobijenog hladnim ceđenjem semenki koje su prethodno tretirane na ribalici određivani su sledeći fizičko-hemijski parametri: gubitak mase sušenjem, relativna gustina, tačka dimljenja, saponifikacioni broj, jodni broj i kiselinski broj. Pored navedenih parametara određivan je i sadržaj biološki aktivnih komponenti (sastav masnih kiselina, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola), oksidativni status (peroksidni i anisidinski broj), antioksidativni kapacitet i oksidativna stabilnost ulja. Rezultati su upoređivani sa prethodno utvrđenim parametrima kvaliteta hladno ceđenog ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, gde semenke pre ceđenja nisu prošle tretman na ribalici.

5.4.3.1. Fizičko-hemijski parametri kvaliteta ulja

U tabeli 5.4.3. su predstavljene vrednosti fizičko-hemijskih parametara kvaliteta hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, sa i bez prethodnog tretmana semenki na ribalici.

Tabela 5.4.3. Fizičko-hemijski parametri kvaliteta hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac sa i bez tretmana na ribalici

Parametar kvaliteta	**Uzorci ulja**	
	Prokupac HC	**Prokupac Tr HC**
Relativna gustina (20ºC/vode na 20ºC)	$0,918^{a}$±0,002	$0,920^{a}$±0,002
Gubitak sušenjem (%, m/m)	$0,010^{a}$±0,000	$0,017^{a}$±0,006
Tačka dimljenja (ºC)	$213,20^{a}$±0,200	$213,53^{a}$±0,351
Saponifikacioni broj (mg KaOH/g)	$185,00^{a}$±0,000	$187,00^{a}$±0,000
Jodni broj (g/100 g)	$138,00^{a}$±2,000	$139,33^{a}$±1,155
Kiselinski broj (mg KOH/g)	$0,613^{a}$±0,006	$0,65^{b}$±0,020

Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Utvrđeni rezultati svih parametara kvaliteta su u okviru pravilnikom definisanih granica (*Pravilnik o kvalitetu ulja, 2013*). Statistička obrada podataka ukazuje da statistički značajne razlike postoje jedino kod rezultata za kiselinski broj, gde je kod ulja dobijenog iz tretiranih semenki pronađena veća vrednost kiselinskog broja. Kako su obe utvrđene vrednosti ispod maksimalno dozvoljenih koje propisuju pravilnici i kako je razlika između utvrđenih vrednosti, reda veličine greške merenja, utvrđena razlika se može smatrati zanemarljivom. Na osnovu analize dobijenih rezultata, može se zaključiti da tretman uklanjanja spoljnjeg omotača nije uticao na promene fizičko-hemijskih parametara kvaliteta ulja.

5.4.3.2. Biološki aktivne komponente ulja

Sastav masnih kiselina

U tabeli 5.4.4 su predstavljene vrednosti sastava masnih kiselina hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, sa i bez prethodnog tretmana semenki na ribalici.

Tabela 5.4.4. Sadržaj masnih kiselina hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac sa i bez tretmana na ribalici, izražen u procentima (%)

Masna kiselina (%)	Uzorci ulja	
	Prokupac HC	**Prokupac Tr HC**
Palmitinska (C-16:0)	$7{,}076^{a}$±0,175	$7{,}171^{a}$±0,171
Stearinska (C-18:0)	$4{,}230^{a}$±0,015	$4{,}239^{a}$±0,074
Oleinska (C-18:1_c_9)	$16{,}592^{a}$±0,041	$16{,}606^{a}$±0,005
Linolna (C-18:2_9c_12c)	$71{,}536^{a}$±0,109	$71{,}425^{a}$±0,081
Arahidinska (C-20:0)	$0{,}114^{a}$±0,006	$0{,}113^{a}$±0,002
Linolenska (C-18:3_9c_12c_15c)	$0{,}314^{a}$±0,004	$0{,}316^{a}$±0,002
Behenska (C-22:0)	$0{,}139^{a}$±0,020	$0{,}131^{a}$±0,008

Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Evidentno, tretman uklanjanja dela spoljanjeg omotača nije uticao na promene sastava masnih kiselina kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac. Statističkom analizom podataka nisu utvrđene statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina.

Sadržaj α-tokoferola ukupnih i fenolnih jedinjenja

U tabeli 5.4.5. su predstavljene vrednosti sadržaja α-tokoferola i ukupnih fenolnih jedinjenja hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, sa i bez prethodnog tretmana semenki na ribalici.

Tabela 5.4.5. Sadržaj α-tokoferola i ukupnih fenolnih jedinjenja hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac sa i bez tretmana na ribalici

Uzorci ulja	**Sadržaj α-tokoferola (mg/100 g)**	**Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg/100g)**
Prokupac HC	$1{,}500^{a}$±0,057	$7{,}350^{a}$±0,19
Prokupac Tr HC	$2{,}86^{b}$±0,117	$7{,}390^{a}$±0,07

Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iz tabele se vidi da tretman na ribalici nije uticao na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju. Kod oba uzorka ulja su utvrđene približne vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedninjenja, između kojih nisu utvrđene statistički značajne razlike. U pogledu sadržaja α-tokoferola, u ulju dobijenog iz semenki koje su prošle tretman na ribalici pronađen je skoro dva puta veći sadržaj u odnosu na ulje iz semenki koje nisu prošle tretman. Ovo se može objasniti time da je uklanjanje čvrstog sloja epidermisa sa kutikulom, koji inače predstavljaju veoma kompaktan, čvst i nepropusni sloj, dovelo do

olakšane difuzije uljne faze iz epidermisa ka površini, što je pored povećanja stepena iskorišćenja ulja uzrokovalo i povećano izdvajanje liposolubilnog α-tokoferola sa uljem.

5.4.3.3. Oksidativni status, antioksidativni kapacitet i oksidativna stabilnost ulja

U tabeli 5.4.6. su predstavljene vrednosti koje definišu oksidativno stanje, oksidativni kapacitet i oksidativnu stabilnost hladno ceđenih ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, sa i bez prethodnog tretmana semenki na ribalici.

Tabela 5.4.6. Peroksidni broj (Pbr), Anisidinski broj (Abr), Oksidativna vrednos (OV), vrednost indukcionog perioda, početna temperatura oksidacije (OOT) i oksidativni kapacitet (EC_{50}) ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac sa i bez tretmana na ribalici, izražen u procentima (%)

Parametar kvaliteta	**Uzorci ulja**	
	Prokupac HC	**Prokupac Tr HC**
Pbr (mmol/kg)	$3,80^{a}$±0,00	$4,70^{b}$±0,20
Abr (100 $A^{1\%}_{350nm}$)	$10,33^{a}$±0,06	$10,23^{a}$±0,06
OV	$17,93^{a}$±0,06	$19,63^{b}$±0,45
Indukcioni period, h	$2,790^{a}$±0,05	$2,89^{a}$±0,21
OOT,°C	$166,90^{a}$±1,81	$167,80^{a}$±2,05
EC_{50}, mg ulja/mg DPPH radikala	$45,32^{a}$±0,61	$44,89^{a}$±1,15

Vrednosti u istom redu koje nose različite oznake u superskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Dobijeni rezultati ukazuju da je tretman na ribalici uticao samo na vrednost peroksidanog broja, gde je kod ulja dobijenog od semenki grožđa koje su prošle tretman izmerena nešto veća vrednost peroksidnog broja. Ovo je automatski uslovilo i veću oksidativnu vrednost kod ovog ulja. S obzirom da se peroksidi formiraju tokom ranih, početnih faza oksidacije ulja, a da je utvrđena vrednost Pbr od 4,7 u granicama dozvoljenim pravilnikom, može se zaključiti je ulje sveže proizvedeno i da kod njega nije došlo do oksidativnih promena koje mogu uticati na kvalitet. Ostale vrednosti koje određuju antioksidativni kapacitet i oksidativnu stabilnost ulja su ostale nepromenjene u odnosu na uzorak ulja dobijen hladnim ceđenjem semenki koje nisu tretirane na ribalici. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da tretman na ribalici nije uticao na promenu oksidativnog stanja i otpornost na oksidaciju ulja dobijenog iz semenke autohtone sorte grožđa Prokupac.

5.5. Natkritična ekstrakcija ulja iz semenki crvenih sorti

U ovom delu rada prikazani su rezultati dobijeni natkritičnom ekstrakcijom ulja iz semenki pet ispitivanih crvenih sorti grožđa. Natkritična ekstrakcija je vršena ugljenik(IV)-oksidom na pritisku od 25 MPa (250 bara), temperaturi od 50˚C i protoku od 0,3 kg CO_2/h. Semenke su prethodno samlevene do veličine čestice od 0,4 mm, a ekstrakcija je vršena do potpunog iskorišćenja biljnog materijala.

5.5.1. Ekstrakcioni prinos

Dobijeni prinosi su izraženi u procentima (%, m/m) izdvojenog ulja u odnosu na masu semenke, a rezultati su prikazani u tabeli 5.5.1.

Tabela 5.5.1. Ekstrakcioni prinosi ulja dobijeni metodom NKE

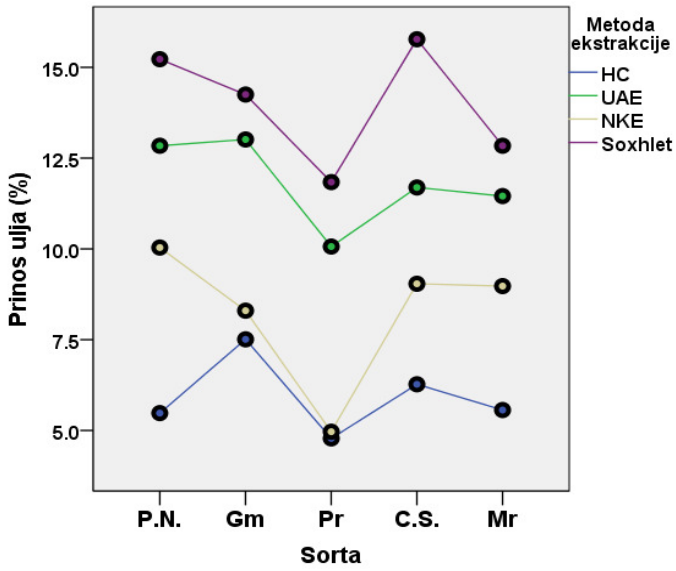
Uzorci ulja/sorta grožđa	Ekstrakcioni prinos (%, m/m)	Sadržaj izdvojenog ulja* (%)
Pinot Noir	$10,04_D \pm 0,25$	66,0
Gamay	$8,3_B \pm 0,18$	58,2
Prokupac	$4,96_A \pm 0,15$	41,9
C. Sauvignon	$9,04_C \pm 0,19$	57,3
Merlot	$8,98_C \pm 0,20$	69,9
Prosek	8,26	58,66

*Sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama, izražen u procentima (%).
Vrednosti u istoj koloni koje nose različite oznake u subskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Kao što se može videti iz tabele, postignuti ekstrakcioni prinosi se nalaze u opsegu od 4,96 do 10,04%. Statistička obrada rezultata ukazuje da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih metodom NKE postoje statistički značajne razlike u prinosu. Ekstrakcioni prinosi ulja se, u zavisnosti od sorte, mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D) i nalaze se u sledećem redosledu: Pinot Noir > C.Sauvignon = Merlot > Gamay > Prokupac. Očigledno je, da je ova metoda ekstrakcije najmanje efikasna kod semenki sorte Prokupac, gde je izdvojeno samo 41,93% od ukupnog sadržaja ulja, skoro isto koliko se izdvaja i hladnim ceđenjem; a najefikasnija je kod semenki sorte Merlot gde je izdvojeno 69,9% ulja.

Na slici 5.5.1 je dat grafički prikaz poređenja ekstrakcionih prinosa ulja iz ispitivanih semenki grožđa, dobijenih metodom NKE u poređenju sa prinosima

ostvarenim hladnim ceđenjem, ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom i ukupnim sadržajem ulja koji je utvrđen metodom po Soxhletu.



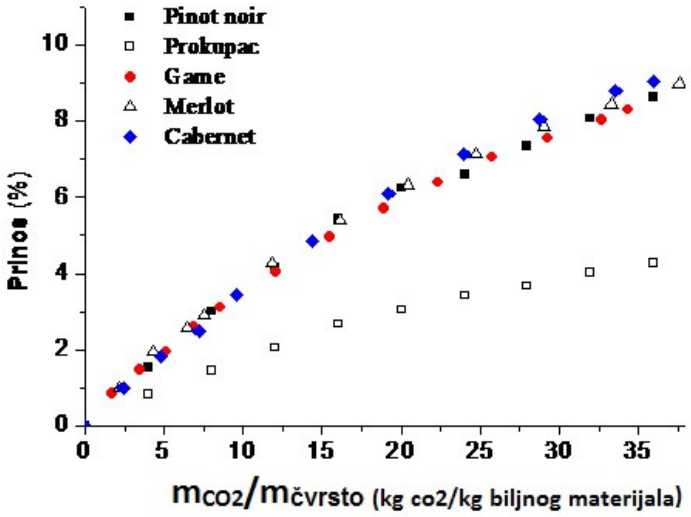
Slika 5.5.1. Grafički prikaz ekstrakcionog prinosa ulja iz semenki pet sorti grožđa dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom (NKE) u poređenju sa ostalim metodama izdvajanja (HC i UAE) i ukupnim sadržajem ulja (Soxhlet)

Sa slike se može uočiti da su prinosi dobijeni natkritičnom ekstrakcijom niži od prinosa koji se postižu ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, a viši u odnosu na prinose koji se postižu hladnim ceđenjem. Takođe je uočljivo, da ne postoji korelacija između ukupnog sadržaja ulja u semenkama i ostvarenog prinosa. Nezavisno od ukupnog sadržaja ulja u semenkama, a u zavisnosti od izabrane metode izdvajanja ulja, postignuti ekstrakcioni prinosi se razlikuju za svaku sortu. Ukoliko se uzme u obzir da su semenke svih sorti čuvane pod istim uslovima, može se zaključiti da na efikasnost izdvajanja ulja pored metode i uslova ekstrakcije, predtretmana semenke i ukupnog sadržaja ulja u semenci, uticaj ima i sama struktura i sastav semenke.

Polu-kontinualna natkritična ekstrakcija, koja je primenjena u ovom radu, može se predstaviti krivom koja se dobija prikazivanjem količine dobijenog ekstrakta u funkciji količine rastvarača koji protekne kroz aparat za ekstrakciju (*Sovová, 2005*). Ova vrsta ekstrakcije obuhvata dve faze: prvu, koja se karakteriše ubrzanom ekstrakcijom ulja i drugu, koja se odlikuje sporom ili veoma sporom ekstrakcijom ekstrahovanog ulja. Brza ekstrakcija ulja se dešava sa površine i iz slojeva odmah ispod površine gde su ćelijski zidovi oštećeni predtretmanom zrna. Nasuprot ovome, centralni delovi zrna sadrže neoštećene ćelije pa je iz dubljih slojeva, usled ometene difuzije, do površine zrna

ekstrakcija ulja spora (*Beveridge et al., 2005*). Otpor transferu materija kroz ćelijske zidove je veoma visok, što objašnjava razliku u brzini ekstrakcije ulja iz navedenih slojeva (*Sovová, 2005*).

Slika 5.5.2 prikazuje grafik zavisnosti prinosa ulja od specifične količine rastvarača ugljenik(IV)-oksida ($m_{CO2}/m_{čvrsto}$(kg CO_2/kg biljnog materijala)). Sa slike je vidljivo, da je kinetika ekstrakcije ulja iz semenki četiri sorti grožđa vrlo slična, dok je značajna razlika uočena u slučaju ekstrakcije iz semenki sorte Prokupac.

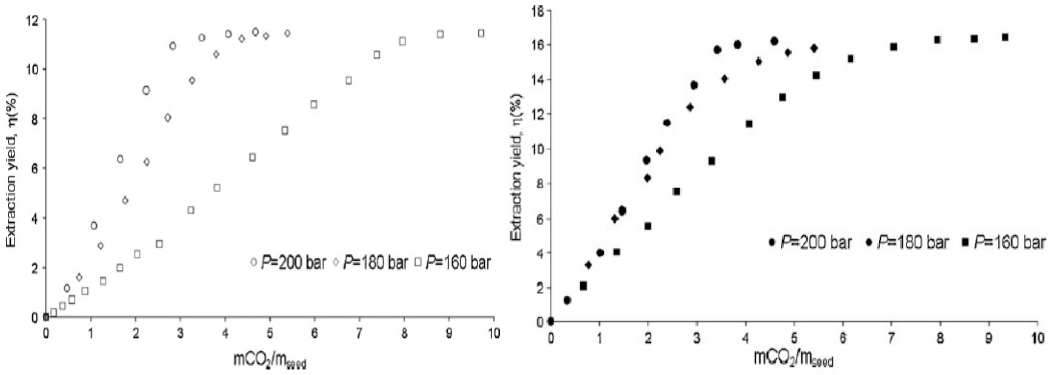


Slika 5.5.2. Grafik zavisnosti ekstrakcionog prinosa ulja iz ispitivanih semenki grožđa od specifične količine rastvarača ugljenik(IV)-oksida ($m_{CO2}/m_{čvrsto}$ (kg CO_2/kg biljnog materijala))

Kako je natkritična esktrakcija ugljenik(IV)-oksidom ekološka metoda, poslednjih godina objavljeno je više radova na temu primene ove metode za dobijanje ulja iz semenki grožđa. Na primer, *Beveridge et al.* (*2005*) su ispitivali mogućnost primene natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom i ekstrakcije petrol-etrom za izdvajanje ulja iz semenki 8 različitih crvenih sorti grožđa. Prinosi koje su tom prilikom dobili natkrtitičnom ekstrakcijom bili su u opsegu od 5,85%±0,33 do 13,6%±0,46 dok su prinosi koji su dobijeni ekstrakcijom petrol-etrom bili u opsegu od 6,64%±0,16 do 11,17%±0,05. Treba napomenuti da se među 8 ispitivanih sorti koje je su u svom radu ispitali pomenuti autori, nalaze i 4 internacionalne sorte koje su korišćene i u ovom radu (Pinort Noir, Gamay, Merlot i C.Sauvignon). Prinosi ulja dobijeni u ovom radu razlikuju se od prinosa navedenih autora, što se može objasniti činjenicom da su iste sorte grožđa uzgajane na drugom lokalitetu (Kanada), a takođe su korišćeni i različiti

uslovi natkritične ekstrakcije (65˚C, 37MPa, protok CO_2 60 g/minutu, u trajanju od 6 h; predtretman semenki: sušenje smrzavanjem). Prinosi dobijeni u ovom radu su u poređenju sa rezultatima navedenih autora niži za sorte Merlot i C.Sauvignon i neznatno za sortu Pinot Noir, dok je za sortu Gamay utvrđen znatno viši prinos (8,3±0,18% prema 5,85±0,33%).

Veoma interesantna istraživanja na istu temu su izvršili *Passos et al.* (*2009*), koji su ispitivali uticaj enzimskog predtretmana zrna na povećanje prinosa ulja. Tretiranje semenki je vršeno koktelom enzima koji razgrađuju ćelijske zidove (pektinaze, ksilanaze, proteaze i celulaze). Eksperiment je vršen na semenkama crvene sorte grožđa „Touriga National“ iz oblasti Bairrada Appelation (Anadia, Portugalija), iz berbe 2007. Natkritična ekstrakcija na enzimski tretiranoj i netretiranoj semenci je sprovedena na konstantnoj temepraturi od 40°C i na različitim pritiscima od 160, 180 i 200 bara. Ekstrahovana je mlevena semenka sa prosečnom veličinom čestice od 0,75 mm. Kod netretirane semenke maksimalan prinos ekstrakta bio je 11,5%, dok je kod tretirane bio 16,5%, što predstavlja povećanje za 43,5%. Ekstrakcione krive dobijene tokom merenja u oba procesa pokazale su prvi linearni deo procesa ekstrakcije i drugi asimptotski deo u kome je izdvojeno samo 3 - 8% od ukupno dobijenog ulja. Eksperimenti su pokazali i veliki uticaj pritiska na proces ekstrakcije; najpre, masa CO_2 potrebna za postizanje maksimalnog prinosa se znatno smanjuje pri povećanju pritiska i potom sa porastom pritiska, linearni deo krive (prva i glavna faza ekstrakcije) kod tretiranog i netretiranog semena se skoro poklapaju. Poređenjem rezultata ovih autora, pre svega poređenjem oblika krivih esktrakcionih prinosa koje su dobili ovi autori (Slika 5.5.3), sa oblikom krivih ekstrakcionih prinosa koje su dobijene u ovom radu (Slika 5.5.2), može se zaključiti da oblici ekstrakcionih krivih iz ovog rada najviše odgovaraju obliku ekstrakcione krive koja je u radu pomenutih autora dobijena pri pritisku od 160 bara. Ovo navodi na zaključak da bi, iako je u ovom radu korišćen pritisak od 250 bara, eventualno povećanje pritiska moglo da dovede do smanjenja utroška CO_2 potrebnog za postizanje maksimalnog prinosa ulja. Dakle, iz svega prethodno navedenog, a imajući u vidu da su pomeniti autori ispitivali iste sorte grožđa koje su bile predmet ispitivanja i ovog rada, moglo bi se zaključiti da prinos ulja dobijenog metodom NKE zavisi od parametara ekstrakcije, područja uzgajanja grožđa, kao i načina tretmana semenki u procesu pripreme za ekstrakciju.



Slika 5.5.3. Ekstrakcione krive natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom enzimski netretirane i tretirane semenke grožđa (*Passos et al., 2009*)

5.5.2. Rezultati matematičkog modelovanja natkritične ekstrakcije (model Sovove)

Za izračunavanje parametara ekstrakcije ulja iz semenki grožđa korišćen je model Sovove. Proračun je rađen za dve sorte: Prokupac i Pinot Noir. Na osnovu dijagrama zavisnosti prinosa ekstrakcije ulja iz semenki grožđa od specifične količine rastvarača ugljenik(IV)-oksida (Slika 5.5.2) zapaženo je da ulje iz semenki grožđa sorte Prokupac ima izraženo manji prinos od ulja iz semenki ostalih sorti i da kriva zavisnosti ekstrakcije ulja iz semenki ove sorte odskače od ostalih, koje su međusobno približne. Zbog očekivane približne kinetike ekstrakcije preostale četiri sorte grožđa (Pinot Noir, C. Sauvignon, Gamay i Merlot), ispitivana je kinetika ekstrakcije ulja jedne od ove četiri sorte (Pinot Noir) i sorte koja vidno odstupa od gore pomenute četiri sorte, Prokupca. Za izračunavanje parametara modela Sovove prema jednačinama od (4.39) do (4.42) potrebni su sledeći podaci: veličina čestice biljnog materijala, glavna komponenta ekstrakta (pseudokomponenta), protok, viskoznost gustina i brzina strujanja ugljenik(IV)-oksida.

Tabela 5.5.2. Podaci potrebni za izračunavanje parametara za model Sovove

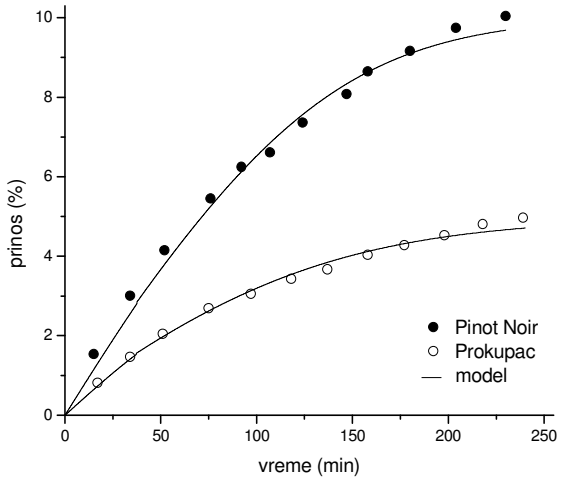
Sorta grožđa	**P (MPa)/ T(K)**	**d_p (mm)**	**Protok CO^2 (g/s)**	**ε (poroznost ekstrakcionog sloja)**	**Glavna komponenta**
Prokupac	25/ 323,15	0,40	0,3	0,545	Linolna kiselina
Pinot Noir	25/ 323,15	0,40	0,3	0,43	Linolna kiselina

Za određivanje veličine čestice samlevenih semenki (srednjeg prečnika čestica) korišćena je metoda sita (između 0,3 i 0,5 mm), a za određivanje poroznosti sloja korišćena je standardna metoda ukapavanja.

Tabela 5.5.3. Vrednosti izračunatih parametara za model Sovove

Sorta grožđa	**Prokupac**	**Pinot Noir**
Izračunati parametri		
$u \cdot 10^5$ (m/s)	6,56	6,56
$D_{12} \cdot 10^8$ (m^2/s)	1,01	1,01
Re	0,2809	0,2809
Sc	9,25	9,25
Sh	0,276	0,276
$kf \cdot 10^5$ (m/s)	0,7	0,7

Na slici 5.5.4 grafički su prikazane eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakata u funkciji specifičnog utroška rastvarača (masa CO_2/masa uzorka) i modelom Sovove izračunate ekstrakcione krive za superkritičnu ekstrakciju ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir i Prokupac.



Slika 5.5.4. Modelovane krive kinetike ekstrakcije ulja iz semenki grožđa sorti Pinot Noir i Prokupac

Kao što se vidi sa slike, model Sovove dobro modeluje eksperimentalne podatke. Na ekstrakcionim krivama se uočavaju dva perioda:

- period brze ekstrakcije, kada je brzina procesa limitirana rastvorljivošću lako dostupnog ulja; na početku ekstrakcije je sadržaj ulja (lako dostupnog) u semenkama najveći, razlika koncentracija ulja u biljnom materijalu i

natkritičnom fluidu (pogonska sila za difuziju) je maksimalna zbog čega je i brzina ekstrakcije veća a grafički je to prikazano većim nagibom krive na početku i

- period sporije ekstrakcije, kada ukupnu brzinu procesa određuje difuzija unutar čestice; kako vreme prolazi, količina ulja u semenkama se smanjuje, pogonska sila za difuziju ulja je manja što posledično smanjuje brzinu ekstrakcije i grafički je taj deo procesa prikazan delom krive gde se prinos sporije menja.

Parametri modela Sovove izračunati su optimizacijom eksperimentalnih podataka i to: koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu k_s (m/s), ravnotežna rastvorljivost ulja u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu y_r (kg ulja/kg CO_2) i udeo teže dostupne faze x_k (kg ulja/kg nerastvorne čvrste faze nakon iscrpljivanja biljnog materijala lako dostupnim uljem). Optimalne vrednosti tih parametara prikazani su u tabeli 5.5.4.

Tabela 5.5.4. Parametri modela Sovove

	Prokupac	**Pinot noir**
$\mathbf{x_k \cdot 10^2}$	0,40	0,86
$\mathbf{k_s \cdot 10^8}$ **(m/s)**	4,5	5,5
$\mathbf{yr \cdot 10^2 (kg_{extract}/kg_{CO2})}$	0,12	0,17

Nagib krive u brzom periodu ekstrakcije je proporcionalan ravnotežnoj rastvorljivosti ulja i veći je što je veća količina lako dostupnog ulja u semenkama. U eksperimentu sa semenkama Prokupca dobijena je kriva čiji je nagib manji od nagiba ekstrakcione krive Pinot Noir-a (i ostale tri sorte) a ujedno, dobijena vrednost rastvorljivosti ulja semenki sorte Pinot Noir je veća nego kod ulja sorte Prokupac. Dakle, semenke Prokupca sadrže manje lako dostupnog ulja u odnosu na četiri ostale sorte. Zbog toga je, prilikom ekstrakcije ulja iz ovih semenki, ostvaren manji prinos na početku procesa, u poređenju sa ekstrakcijama ulja iz semenki preostalih sorti. Brzina ekstrakcije bi mogla da se definiše kao masa ekstrahovane komponente u jedinici vremena a kako su semenke Prokupca dale gotovo dvostruko manji prinos ulja (za isto vreme i pri istoj početnoj masi sirovine) u odnosu na ostale sorte i sama ekstrakcija ulja iz semenki Prokupca je drastično sporija nego u ostala četiri slučaja.

Brzina ekstrakcije određena je brzinom difuzije ulja iz unutrašnjosti čestice u natkritičan fluid. Brzina unutrašnje difuzije zavisi od temperature, dodirne površine između biljnog materijala i natkritičnog fluida (rastvarača) i od razlike koncentracija

ulja u biljnom materijalu i natkritičnom rastvaraču. Ako uzmemo u obzir da se ekstrakcija svih sorti obavlja na istoj temperaturi, jasno je da razlika u brzini ekstrakcije ulja iz semenki različitih sorti potiče od razlike u dodirnoj površini materijala i rastvarača i različite brzine promene koncentracije ulja u materijalu i natkritičnom fluidu. Kada je u pitanju dodirna površina materijala sa rastvaračem, utvrdili smo da je srednji prečnik čestica različitih sorti jednak kao i količina upotrebljenog biljnog materijala ali su gustina i poroznost biljnog sloja različiti. Biljni sloj mlevenih semenki Prokupca ima veću gustinu, manju poroznost pa će i fluidu trebati nešto više vremena da stvori film oko čestica i obezbedi dobar kontakt za prenos mase. Dobijene vrednosti koeficijenta prenosa mase kroz biljni materijal (k_s) se takođe, očekivano razlikuju između sorti, pri čemu je niža vrednost koeficijenta dobijena za Prokupac. Ovaj koeficijent se odnosi na difuziju ulja iz unutrašnjosti čestice do njene površine i filma fluida koji je okružuje pa se dolazi do zaključka da je u slučaju semenki ove sorte ulju potrebno da pređe veći put iz unutrašnjosti čestice do njene površine i samim tim više vremena za migraciju u natkritičan fluid što uslovljava sporiju ekstrakciju.

Udeo teže dostupne faze (x_k), iz izračunatih parametara predloženog modela, duplo je veći u slučaju sorte Pinot Noir nego sorte Prokupac. Ova razlika se javlja upravo zbog toga što je ukupna masa semena ista a ulja ima mnogo više u semenkama francuske sorte.

5.5.3. Hemijska analiza uzoraka ulja iz semenki različitih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom

Zbog ograničenosti malom količinom uzorka, u ovom delu radu, akcenat je stavljen na određivanje biološki aktivnih komponenti koje mogu da utiču na oksidativnu stabilnost ulja, bilo kao vrste koje su podložne oksidaciji, bilo kao antioksidanti. S tim u vezi je u ispitivanim uzorcima ulja određivan sastav masnih kiselina, sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj α-tokoferola i vršeno je određivanje oksidativne stabilnosti uzoraka primenom DSC metode.

5.5.3.1. Sastav masnih kiselina

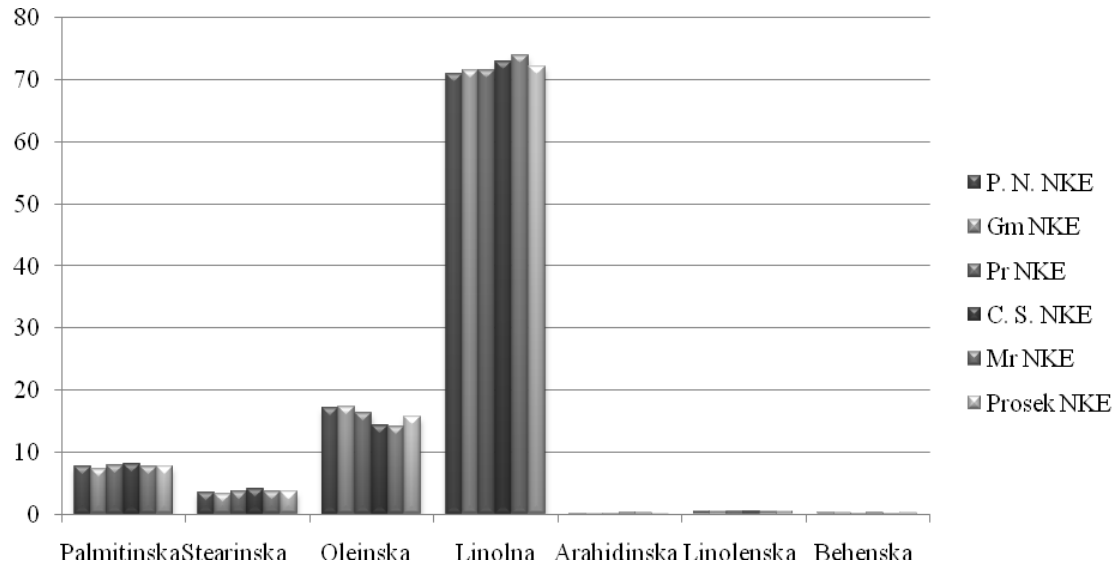
U ispitivanim uljima sastav masnih kiselina je određen kvantitativno, primenom GC metode, a dobijeni rezultati su predstavljeni u tabelama 5.5.5 i 5.5.6. Kao što se iz tabele

5.5.5 može videti, u ispitivanim uljima bile su prisutne sledeće masne kiseline: palmitinska, stearinska, arahidinska i behenska od zasićenih masnih kiselina i oleinska, linolna i linolenska od nezasićenih masnih kiselina. Dominantne su nezasićene masne kiseline, čiji se sadržaj kretao u opsegu od 87,59 do 89,07%, što se može videti u tabeli 5.5.6. Najveći sadržaj nezasićenih masnih kiselina, među ispitivanim uljima, utvrđen je kod ulja iz semenki sorte Gamay (89,07%), a najmanji kod ulja iz semenki sorte Cabernet Sauvignon (87,59%).

Tabela 5.5.5. Sadržaj masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom NKE, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

Ulje od semenki sorte grožđa	Masna kiselina (%)						
	Palmitinska (C-16:0)	Stearinska (C-18:0)	Oleinska (C-18:1_c_9)	Linolna (C-18:2_9c_12c)	Arahidinska (C-20:0)	Linolenska (C-18:3_9c_12c_15c)	Behenska (C-22:0)
P. N.	$7,73_{B}\pm0,03$	$3,53_{B}\pm0,014$	$17,19_{D}\pm0,023$	$70,89_{A}\pm0,003$	$0,12_{A}\pm0,001$	$0,36_{A}\pm0,006$	$0,18_{C}\pm0,006$
Gm	$7,33_{A}\pm0,04$	$3,31_{A}\pm0,003$	$17,25_{E}\pm0,011$	$71,47_{E}\pm0,014$	$0,12_{A}\pm0,004$	$0,35_{A}\pm0,013$	$0,17_{C}\pm0,020$
Pr	$7,87_{C}\pm0,03$	$3,59_{C}\pm0,002$	$16,25_{C}\pm0,008$	$71,61_{C}\pm0,032$	$0,14_{B}\pm0,004$	$0,42_{C}\pm0,008$	$0,13_{AB}\pm0,002$
C. S.	$7,99_{D}\pm0,03$	$4,10_{E}\pm0,005$	$14,30_{B}\pm0,023$	$72,90_{D}\pm0,074$	$0,16_{D}\pm0,006$	$0,39_{B}\pm0,018$	$0,16_{BC}\pm0,006$
Mr	$7,65_{B}\pm0,01$	$3,66_{D}\pm0,006$	$14,06_{A}\pm0,005$	$73,99_{E}\pm0,005$	$0,15_{C}\pm0,002$	$0,37_{AB}\pm0,002$	$0,12_{A}\pm0,011$
Prosek	7,72	3,64	15,81	72,17	0,14	0,38	0,15

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite subskripte su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD



Slika 5.5.5. Grafički prikaz sadržaja masnih kiselina u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom NKE, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

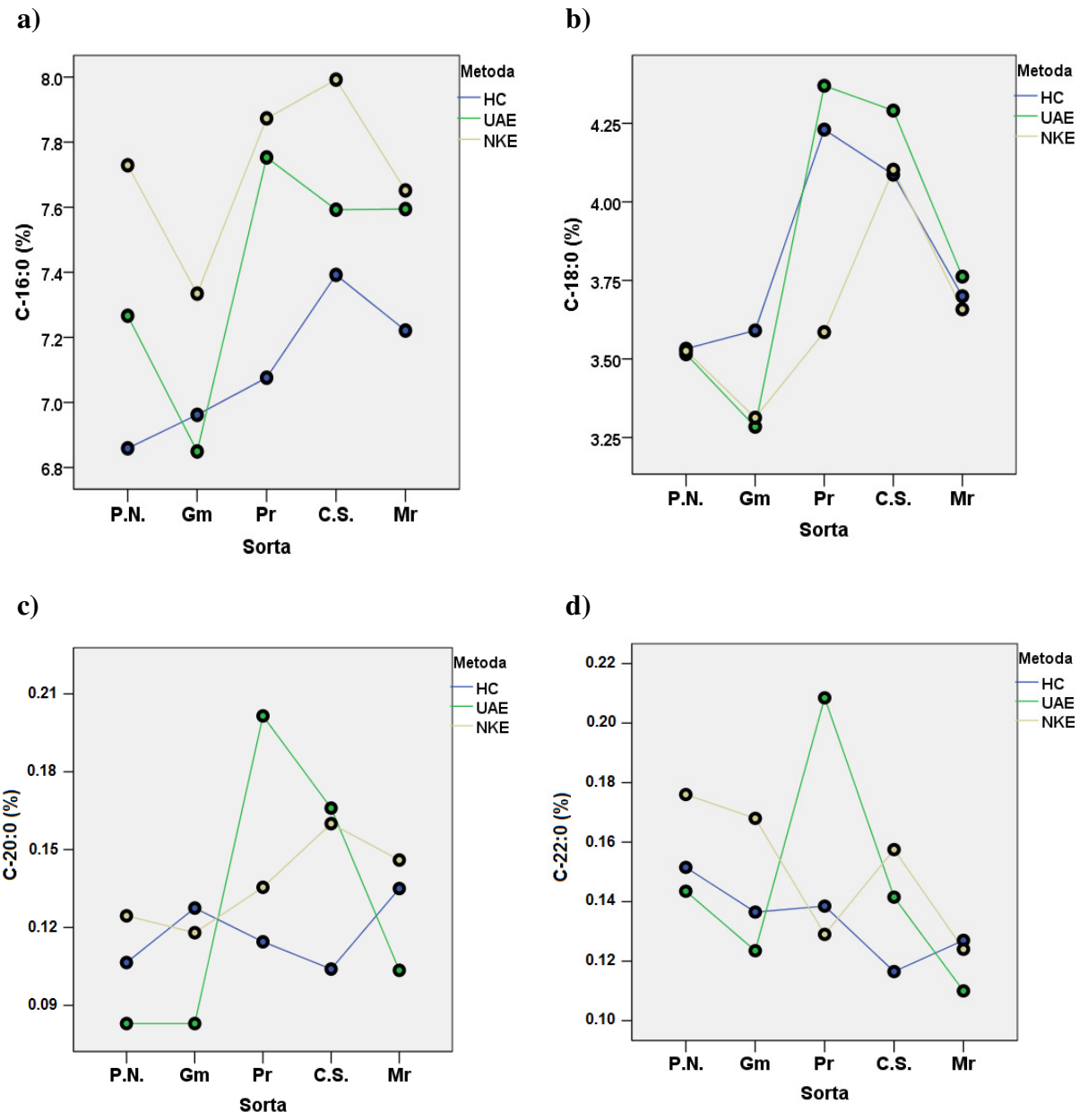
Tabela 5.5.6. Udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u uljima ispitivanih semenki grožđa, izražen u procentima (u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina)

Ulje od semenki sorte grožđa	Zasićene MK (%)	Mononezasićene MK (%)	Polinezasićene MK (%)	Nezasićene MK (ukupno) (%)
Pinot Noir	11,56	17,19	71,25	88,44
Gamay	10,93	17,25	71,82	89,07
Prokupac	11,73	16,25	72,02	88,27
C. Sauvignon	12,41	14,30	73,29	87,59
Merlot	11,58	14,06	74,21	88,42
Prosek	11,64	15,81	72,55	88,36

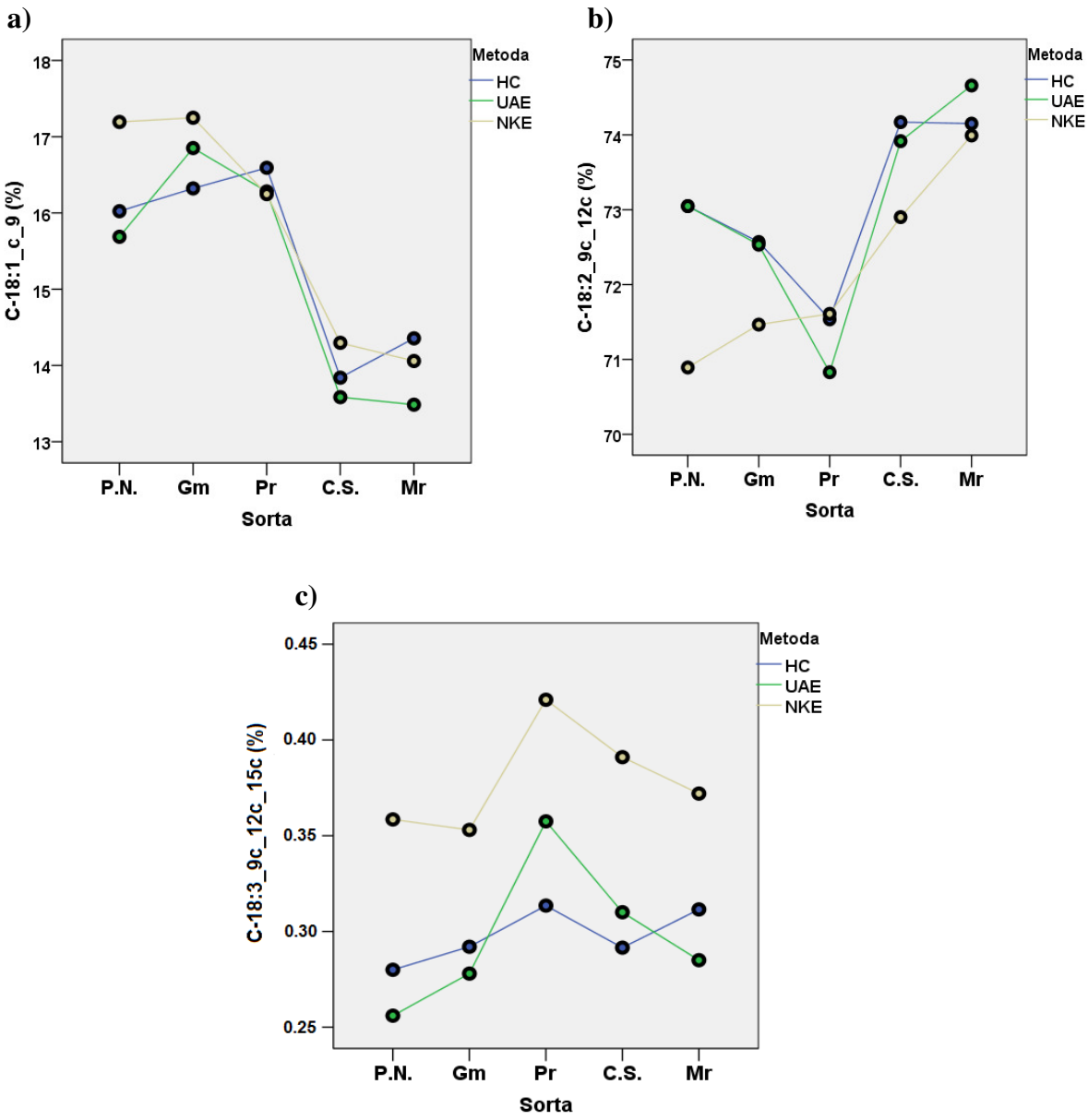
Iz tabele 5.5.5 se jasno može uočiti da je u svim ispitivanim uljima dominantna linolna kiselina (C18:2, ω-6), koja je nađena u opsegu koncentracija od 70,89 do 73,99%. Najveća količina ove masne kiseline nađena je u ulju semenki sorte Merlot, dok je u najmanjem procentu pronađena u ulju semenki sorte Pinot Noir. Oleinska kiselina je u ispitivanim uljima prisutna u opsegu od 14,06% do 17,25%, pri čemu je najveći sadržaj ove kiseline utvrđen kod ulja iz semenki sorte Gamay dok su ulja iz semenki sorte Merlot i C. Sauvignon najsiromašnija ovom masnom kiselinom. Linolenska masna kiselina (C18:3, ω-3) je u svim ispitivanim uljima nađena u malim količinama u opsegu od 0,35 do 0,42%.

Od zasićenih masnih kiselina utvrđeno je prisustvo: palmitinske u opsegu 7,34 - 7,99%, zatim stearinske u opsegu 3,56 - 4,10%, arahidinske u veoma malim količinama u opsegu 0,118 - 0,16%, kao i behenske u opsegu 0,124 - 0,176%. Statistička obrada podataka pokazuje da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina. Ovo jasno ukazuje na uticaj sorte na sastav masnih kiselina, što je posebno izraženo kod najdominantnijih kiselina (linolne i oleinske). Na osnovu statističke analize sadržaja ovih kiselina, ulja se mogu klasifikovati u 5 grupa (A-D), što se može videti u tabeli 5.5.5.

Na slikama 5.5.6 i 5.5.7 su dati grafički prikazi sastava masnih kiselina ulja iz semenki grožđa dobijenih natkritičnom ekstrakcijom u poređenju sa uljima iz semenki istih sorti grožđa dobijenim hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.5.6. Grafički prikaz sadržaja zasićenih masnih kiselina u uzorcima ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih metodama NKE, HC i UAE



Slika 5.5.7. Grafički prikaz sadržaja nezasićenih masnih kiselina u uzorcima ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih metodama NKE, HC i UAE

Sa ovih slika se jasno uočava da metoda izdvajanja ulja ima uticaj na sastav masnih kiselina. Ulja dobijena natkritičnom ekstrakcijom imaju nešto viši sadržaj palmitinske, oleinske (osim kod ulja iz semenki Merloa i Prokupca) i linolenske masne kiseline u odnosu na ulja dobijena metodama hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Sadržaj dominantne linolne masne kiseline kod ulja dobijenih natkritičnom ekstrakcijom (osim u slučaju ulja iz semenki Prokupca) je niži u odnosu na ulja dobijena ostalim dvema metodama. Što se tiče ostalih masnih kiselina, varijacije u

zavisnosti od metode izdvajanja ulja su evidentne ali ne postoji jasna diferencijacija u odnosu na metodu.

S obzirom na način ekstrakcije koji je primenjen u ovom radu interesantno je dobijene rezultate porediti sa rezultatima *Beveridga et al.* (*2005*), koji su u svom radu za izdvajanje ulja iz semenki grožđa takođe koristili metodu natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom i ispitivali sastav masnih kiselina ulja iz semenki četiri internacionalne sorte grožđa (Pinot Noir, Gamay, Merlot i C. sauvignon) a koja su ispitana i u ovom radu. Rezultati ispitivanja koje su objavili ovi autori su prikazani u tabeli 5.5.7.

Tabela 5.5.7. Sastav masnih kiselina četiri sorte grožđa: Gamay, C. Sauvignon, Pinot Noir i Merlot, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom (65˚C, 37 MPa, protok CO_2 60 g/minutu, u trajanju od 6 h), (*Beveridge et al., 2005*)

Masna kiselina	Sorta grožđa			
	Gamay	C. Sauvignon	Pinot Noir	Merlot
C-14:0	0,12	0,06	0,09	0,05
C-16:0	7,82	6,82	7,61	7,07
C-16:1	0,14	0,06	0,15	0,08
C-18:0	3,60	4,92	4,15	3,95
C-18:1	14,38	12,71	14,74	13,13
C-18:2	68,94	72,57	70,13	73,23
C-18:3 (α)	1,12	0,48	0,65	0,44
C-20:0	0,26	0,21	0,21	0,17
Ukupno	96,38	97,83	97,72	98,14

U poređenju sa rezultatima navedenih autora, ulja iz semenki grožđa sorte Merlot sadrže približne količine palmitinske, stearinske, oleinske, linolne, linolenske i arahidinske kiseline. Kod ulja iz semenki sorte Pinot Noir je utvrđeno više oleinske, manje stearinske, linolne i arahidinske, a utvrđene količine palmitinske i linolne kiseline su približne. Sadržaj linolne masne kiseline je bio približno isti u uzorku ulja iz semenki sorte C. Sauvignon ispitivanog u ovom radu i uzorku ulja iz semenki iste sorte koji su ispitivali *Beveridge et al.,* dok su sadržaji palmitinske i oleinske kiseline bili viši, a sadržaji stearinske, linolne i arahidinske niži u odnosu na rezultate pomenutih autora. Kod ulja iz semenki sorte Gamay, utvrđene vrednosti sadržaja stearinske i palmitinske kiseline u oba rada su bile približne, dok su u ovom radu utvrđene vrednosti sadržaja oleinske, linolne, linolenske i arahidinske masne kiseline nešto veće. Interesantno je istaći da su ovi autori u sva četiri uzorka detektovali palmitoleinsku kiselinu (C-18:1) u opsegu od 0,06 - 0,14%, koja u uljima ispitivanim u ovom radu nije utvrđena, dok je u

uzorcima ulja koja su ispitivana u ovom radu pronađena behenska kiselina u opsegu od 0,124 – 0,176%, koja u uzorcima pomenutih autora nije detektovana.

I u ovom radu i u rezultatima pomenutih autora, ulja iz semenki sorte Merlot su imala najviši sadržaj linolne masne kiseline u odnosu na ulja iz semenki ostalih sorti grožđa. Najviši sadržaj oleinske kiseline u ovom radu je utvrđen u ulju semenki sorte Gamay, dok je u slučaju pomenutih autora ove kiseline bilo najviše u ulju semenki sorte Pinot Noir.

Iz navedenog poređenja se može zaključiti da sastav masnih kiselina ulja iz semenki istih sorti grožđa dobijenih istom metodom esktrakcije (pod različitim uslovima) varira, što može biti rezultat različitog područja uzgajanja grožđa, razlika u zrelosti ploda, sastavu zemljišta i sličnih razloga. Međutim, najvažnije je istaći da je natkritična ekstrakcija sa ugljenik(IV)-oksidom kao metoda za izdvajanje ulja iz semenki grožđa prihvatljiva sa aspekta sastava masnih kiselina dobijenih ulja.

5.5.3.2. Sadržaj α-tokoferola i ukupnih fenolnih jedinjenja

S obzirom na značaj ovih jedinjenja kao primarnih antioksidanata (*Reische et al., 2002*), čiji je sadržaj u ulju direktno povezan sa otpornošću ulja na oksidaciju o čemu je već opširno pisano u poglavljima (2.2.3.2, 2.7.2 i 2.8) ovog rada, a što je i potvrđeno rezultatima koji su predstavljeni u poglavljima (5.1 i 5.3), ova jedinjenja su i u ovom delu rada takođe bila predmet ispitivanja.

Sadržaj α-tokoferola

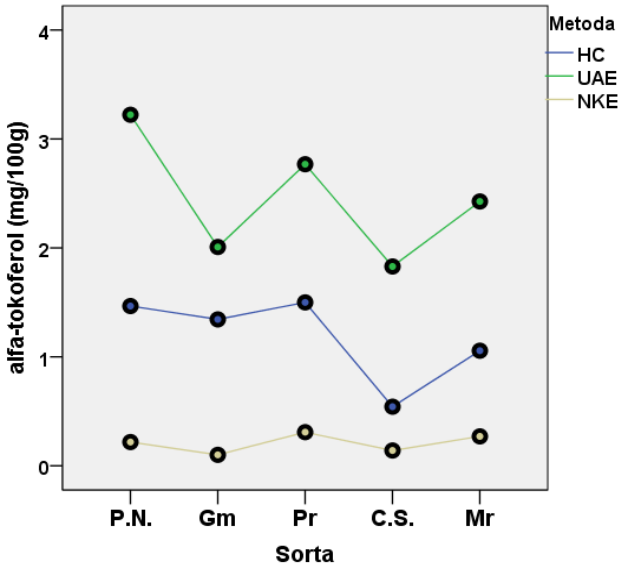
Podaci o sadržaju α-tokoferola u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom, su prikazani u tabeli 5.5.8.

Tabela 5.5.8. Sadržaj α-tokoferola u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom

Ulje od semenki sorte grožđa	α-tokoferol, mg/100gr
Pinot Noir	$0{,}218_{C}$±0,07
Gamay	$0{,}100_{A}$±0,000
Prokupac	$0{,}308_{E}$±0,011
C. Sauvignon	$0{,}140_{B}$±0,007
Merlot	$0{,}270_{D}$±0,007
Prosek	0,207

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite oznake u subskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Kao što se iz tabele vidi, sadržaj α-tokoferola u uzorcima ulja dobijenim natkritičnom ekstrakcijom se kreće u veoma uskom opsegu od 0,100 mg/100 g do 0,308±0,011 mg/100 g, pri čemu srednja vrednost iznosi 0,207 mg/100 g. Iako se vrednosti nalaze u relativno uskom opsegu statistička analiza je ukazala na statistički značajna variranja u sadržaju α-tokoferola u zavisnosti od sorte grožđa, pri čemu se ulja mogu klasifikovati u 5 grupa (A-E). Najviši sadržaj α-tokoferola je zabeležen kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, dok je najniži sadržaj α-tokoferola dobijen kod ulja iz semenki grožđa sorte Gamay. Na slici 5.5.8 je predstavljen grafički prikazi sadržaja α-tokoferola u uljima iz semenki grožđa dobijenih natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom u poređenju sa sadržajem α-tokoferola u uljima iz semenki istih sorti grožđa dobijenim hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.5.8. Grafički prikaz sadržaja α-tokoferola (izražen u mg/100 g) u uljima iz semenki pet sorti grožđa dobijenih metodom NKE u poređenju sa metodama HC i UAE

Pored variranja u sadržaju α-tokoferola, koja su rezultat izdvajanja ulja iz različitih sorti grožđa, sa slike 5.5.8 se jasno mogu uočiti još značajnija variranja u sadržaju α-tokoferola koja se javljaju između različitih metoda izdvajanja ulja. Evidentno je da je natkritična ekstrakcija ugljenik(IV)-oksidom, u odnosu na hladno ceđenje i ekstrakciju n-heksanom uz tretman ultrazvukom, u ovom radu dala ulja sa najnižim sadržajem α-tokoferola. Na osnovu ovih rezultata i u poređenju sa rezultatima iz literature koji su obrađeni u poglavlju 2.7.4 ovoga rada, a koji se odnose na sadržaj tokoferola u uljima

semenki grožđa dobijenim natkritičnom ekstrakcijom (*Beveridge et al.,2005; Bravi et al., 2007*) gde je sadržaj α-tokoferola pronađen u širokom opsegu od 70,67 do 30,9 mg/100 g, može se zaključiti da uslovi natkritične esktrakcije koji su primenjeni u ovom radu nisu omogućili dovoljno oslobađanje liposolubilnog α-tokoferola iz semenki grožđa u uljnu fazu; vrednosti sadržaja α-tokoferola koje su utvrđene u ovom radu su značajno niže u odnosu na rezultate navedenih autora. Niži sadržaj α-tokoferola u uljima dobijenim natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom u odnosu na rezultate navedenih autora, može se obrazložiti uslovima ekstrakcije (niži pritisak i temperatura ekstrakcije koji su primenjeni u ovom radu). Naime *Beveridge et al.,* (*2005*) su ekstrakciju vršili na temperaturi od 65ºC i pod pritiskom od 370 bara, dok su *Bravi et al.,* (*2007*) najbolje rezultate u pogledu sadržaja tokoferola dobili na temperaturi od 80 ºC i pritisku od 250 bara.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Podaci o sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom, su prikazani u tabeli 5.5.9.

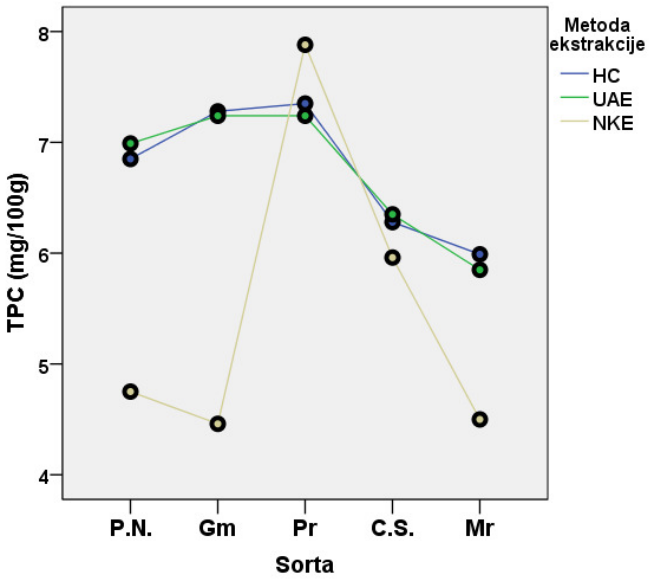
Tabela 5.5.9. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom

Ulje iz semenki grožđa od sorte	Ukupna fenolna jedinjenja (TPC), g/100g
Pinot Noir	$4,75_B \pm 0,06$
Gamay	$4,46_A \pm 0,05$
Prokupac	$7,88_D \pm 0,07$
C. Sauvignon	$5,96_C \pm 0,09$
Merlot	$4,50_A \pm 0,05$
Prosek	5,51

Vrednosti u istoj koloni koje nose različite oznake u subskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Utvrđeni rezultati sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja se nalaze u opsegu od 4,6 mg/100 g do 7,88 mg/100 g, pri čemu je prosečna vrednost 5,51 mg/100 g. Iz tabele se mogu uočiti variranja u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja kod različitih sorti grožđa, pri čemu se na bazi statističke analize sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja ulja mogu klasifikovati u 4 grupe (A-D). Najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je zabeležen kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac, dok je najniži sadržaj dobijen kod ulja iz

semenki grožđa sorte Gamay. Na slici 5.5.9 je dat grafički prikazi sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u uljima iz semenki grožđa dobijenih natkritičnom ekstrakcijom u poređenju sa uljima dobijenim hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.5.9. Grafički prikaz sadržaja TPC (izražen u mg/100 g) u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodama NKE, HC i UAE

Sa slike se može uočiti da je ulje semenki autohtone sorte grožđa Prokupac, vidljivo bogatije fenolnim jedinjenjima u odnosu na ulja iz semenki ostale četiri sorte; efekat je vidljiv za sve tri metode izdvajanja ulja. Takođe je uočljivo da je metoda natkritične esktrakcije dala viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale dve metode (HC i UAE) samo u slučaju ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac; približno isti sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale dve metode je postignut kod ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon, dok je kod ostalih ulja dobijenih metodom natkritične esktrakcije zabeležen značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale dve metode. Poređenjem prosečnih vrednosti sadržaja TPC-a kod ulja dobijenih različitim metodama (NKE – 5,51 mg/100 g; HC – 6,75 mg/100 g i UAE – 6,73 mg/100 g), dolazi se do zaključka da se metodom natkritične ekstrakcije dobijaju ulja sa nižim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale dve metode.

S obzirom da u do sada publikovanim rezultatima o uljima iz semenke grožđa dobijenim postupkom natkritične ekstrakcije nema podataka o sadržaju polifenola, poređenje vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja dobijenih u ovom radu vršeno je sa

podacima iz literature (*Bail et al., 2008; Matthäus, 2008; Pardo et al., 2009*), gde je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određivan kod ulja iz različitih sorti grožđa, koja su dobijena postupkom hladnog ceđenja. U poređenju sa rezultatima ovih autora, može se uočiti da su vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja koje su utvrđene u ovom radu generalno niže u odnosu na vrednosti koje su objavili *Bail et al.* (*2008*) a koje su se kretale u opsegu 59,0 – 115,5 μg/g, dok su u odnosu na vrednosti koje su objavili *Matthäus* (*2008*) i *Pardo et al.* (*2009*) a koje su se kretale u opsegu 10,68 – 34,43 mg/kg, više. Zavisnost sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja od sorte koju su istakli navedeni autori, je dokazana i u ovom radu pri izdvajanju ulja metodom natkritične ekstrakcije.

5.5.3.3. Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti ulja primenom DSC metode

Kako su metodom natkritične ekstrakcije dobijene male količine ulja, za određivanje oksidativne stabilnosti je odabrana DSC metoda koja je u prethodnim slučajevima pokazala izuzetno dobru korelaciju sa ostalim relevantnim metodama ispitivanja otpornosti ulja na oksidaciju. DSC eksperiment je kao i u prethodnim slučajevima, sproveden u režimu linearnog zagrevanja u protoku sintetičkog vazduha. Kraj indukcionog perioda je određen kao temperatura naglog porasta egzotermnog signala u DSC profilu praćenom tokom zagrevanja ulja u oksidativnoj atmosferi. Ova temperatura je označena kao početna temperatura oksidacije (OOT), i može se posmatrati kao relativna mera oksidativne stabilnosti ispitivanih ulja, i dobijena je ekstrapolacijom. U tabeli 5.5.10 su predstavljene vrednosti početne temperature oksidacije (OOT) kod ulja iz semenki crvenih sorti grožđa dobijenih natkritičnom esktrakcijom ugljenik(IV)-oksidom.

Tabela 5.5.10. Vrednosti početne temperature oksidacije (OOT) u uljima iz semenki crvenih sorti grožđa, dobijenih metodom NKE

Ulje iz semenki grožđa od sorte	OOT, °C
Pinot	$161,67_A \pm 0,96$
Gamay	$161,00_A \pm 0,98$
Prokupac	$170,33_B \pm 1,45$
Cabernet Sauvignon	$162,43_A \pm 0,68$
Merlot	$161,13_A \pm 1,23$
Prosek	163,31

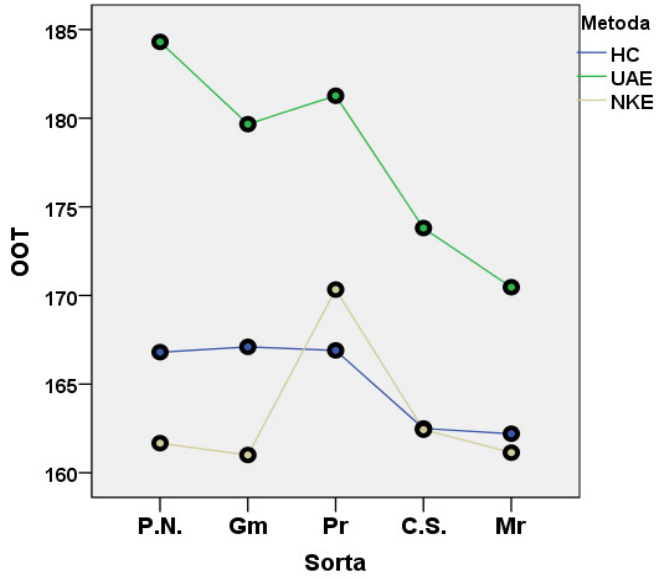
Vrednosti u istoj koloni koje nose različite oznake u subskriptu su značajno različite (p<0,05). Kod svih uzoraka merenja su izvršena po tri puta. Podaci su izraženi kao srednje vrednosti ±SD

Iz tabele se uočava da najveću oksidativnu stabilnost pokazuje ulje iz semenki grožđa sorte Prokupac sa izmerenom OOT vrednošću od 170,33±1,45°C. Kod ulja iz semenki ostalih sorti grožđa utvrđene su značajno niže OOT vrednosti, koje se nalaze u veoma uskom opsegu od 161,00±0,98 do 162,43±0,68°C. Statistička obrada podataka je potvrdila da ulje iz semenki Prokupca ima statistički značajno veću vrednost OOT u odnosu na ulja iz semenki ostalih sorti grožđa, između kojih nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Ukoliko se dobijene vrednosti OOT analiziraju u funkciji utvrđenih biološki aktivnih jedinjenjenja u ispitivanim uljima, može se uočiti sledeće: korelacija između sadržaja sadržaja dominantnih masnih kiselina (linolne i oleinske) i vrednosti OOT je u ovom slučaju izostala, između obe masne kiseline i OOT vrednosti je utvrđen nizak stepen korelacije (R^2=0,25 za linolnu i 0,32 za oleinsku). Kada se posmatra odnos sadržaja dominantnih masnih kiselina (linolne i oleinske) među ispitivanim uljima, uočljivo je da ulja iz semenki grožđa od sorti Pinot Noir, Gamay i Prokupac imaju viši sadržaj mononezasićene oleinske kiseline (C-18:1) i niži sadržaj polinezasićene linolne kiseline (C-18:2) u odnosu na ulja iz semenki grožđa sorti Cabernet Sauvignon i Merlot, što ih kategoriše kao ulja manje podložna oksidaciji. Suprotno masnim kiselinama, između TPC i OOT vrednosti je utvrđen visok stepen korelacije (R^2=0,88). Analizom sadržaja TPC kao glavnih primarnih antioksidanata u ulju, uočava se da ulja iz semenki Prokupca i Cabernet Sauvignona imaju značajno viši sadržaj TPC u odnosu na ulja iz semenki sorti Gamay, Merlot i Pinot Noir, što sa aspekta sadržaja primarnih antioksidanata ova dva ulja kategoriše kao otpornija na oksidaciju. Sadržaj tokoferola je kod ovih ulja bio izuzetno nizak pa shodno tome i njihov uticaj na otpornost na oksidaciju je u ovom slučaju izostao. Utvrđeno je da korelacije između sadržaja α-tokoferola i OOT vrednosti nema (R^2=0,19). Međutim, ukoliko se analizira njihov sadržaj, evidentno je da α-tokoferola najviše ima kod ulja iz semenki Prokupca i Merlota. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da dominacija različitih parametara kvaliteta, različita ulja kategoriše kao manje ili više otporna na oksidativne promene. Shodno tome, može se zaključiti da su utvrđene vrednosti OOT, kao relativne mere oksidativne stabilnosti ulja, rezultat međusobne interakcije svih biološki aktivnih komponenti ulja sa istaknutim značajem ukupnih fenolnih jedinjenja. Treba istaći i to da je najveća utvrđena vrednost OOT kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac

očekivana, uzimajući u obzir parametre kvaliteta ovog ulja koji ga karakterišu kao najotpornije na oksidaciju.

Usled nedostatka literaturnih podataka o rezultatima merenja oksidativne sposobnosti ulja iz semenki grožđa DSC metodom, dobijeni rezutati su upoređivani sa prethodno izmerenim OOT vrednostima ulja iz semenki istih sorti grožđa dobijenih hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Na slici 5.5.10 je dat grafički prikaz OOT vrednosti u uljima iz semenki grožđa dobijenih natkritičnom ekstrakcijom u poređenju sa uljima dobijenim hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.



Slika 5.5.10. Grafički prikaz vrednosti OOT u uljima iz semenki grožđa, dobijenih metodama NKE, HC i UAE

Sa slike je jasno uočljivo da ulja dobijena natkritičnom ekstrakcijom imaju sličnu oksidativnu stabilnost sa hladno ceđenim uljima, dok ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom pokazuju značajno veću oksidativnu stabilnost. Objašnjenje za ovakav rezultat oksidativne stabilnosti ulja u odnosu na metodu ekstrakcije, takođe treba tražiti u međusobnoj interakciji svih biološki aktivnih komponenti ulja. Razlike u sastavu masnih kiselina između ulja dobijenih metodom natkritične ekstrakcije i ulja dobijenih metodama hladnog ceđenja i ekstrakcije n-heksanom uz tretman ultrazvukom, ne mogu opredeliti ulja dobijena metodom natkritične ekstrakcije niti kao otpornija niti kao manje otporna na oksidaciju. Generalno, ova ulja imaju nešto viši sadržaj mononezasićenih masnih kiselina (manje

osetljivih na oksidaciju), nešto niži sadržaj polinezasićene linolne kiseline (osetljive na oksidaciju) ali ujedno imaju i nešto viši sadržaj polinezasićene linolenske kiseline (najosetljvije na oksidaciju) u odnosu na ulja dobijena hladnim ceđenjem i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. S druge strane, evidentno je da je kod ovih ulja pronađen značajno manji sadržaj primarnih antioksidanata (ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola), što ih karakteriše kao ulja sa manjim antioksidativnim kapacitetom. Takođe, u obzir treba uzeti i činjenicu da na oksidativnu stabilnost utiču i druga jedinjenja (β, γ i δ tokoferol, tokotrienoli, fitosteroli, biljni pigmeti) koja nisu bila predmet istraživanja ovog rada a čiji su antioksidativni mehanizami naučno dokazani.

6. ZAKLJUČAK

• Istraživanja koja su obuhvaćena ovom disertacijom izvršena su u potpunosti prema postavljenim zadacima vezanim za izolovanje i fizičko-hemijsku karakterizaciju ulja iz semenki različitih crvenih sorti grožđa. U eksperimentima su korišćene semenke crvenih sorti grožđa proizvedenog u vinogradima fabrike Rubin AD iz Kruševca. Istraživanja su podeljena u četiri eksperimenta a iz dobijenih rezultata se mogu izvesti zaključci dati narednim tekstom.

• Prvi eksperiment je imao za cilj utvrđivanje mogućnosti primene ultrazvuka u podsticanju ekstrakcije ulja iz semenki grožđa, uz korišćenje relativno male količine n-heksana kao rastvarača (odnos rastvarača i uzorka 2:1).

U cilju utvrđivanja optimalnog vremena izlaganja uzorka ultrazvuku iz aspekta ekstrakcionog prinosa i dobijanja ulja sa najboljim antioksidativnim karakteristikama i najvećom otpornošću na procese autooksidacije, vreme trajanja ultrazvučnog tretmana u ekstrakciji ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon iz berbe 2012. godine je menjano od 15 do 135 minuta; dok su svi ostali parametri ekstrakcije (temperatura, odnos mase rastvarača i uzorka semenke, snaga i frekfencija ultrazvuka) držani konstantnim. Sadržaj vlage u semenkama bio je 7,23% m/m; dok je ukupan sadržaj ulja (određen metodom po Soxhletu) bio 11,25% m/m.

Dobijeni rezultati su pokazali da se primenom dužih intervala ultrazvučnog tretmana dobijaju veći ekstrakcioni prinosi; kao i da tretmani duži od 90 minuta nemaju dalji uticaj na povećanje prinosa. Ultrazvučnim tretmanom od 90 minuta postignut je ekstrakcioni prinos od 8,31±0,09% m/m, što predstavlja stepen iskorišćenja od 74% u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama

Pokazano je da primena ultrazvuka nema uticaj na sastav masnih kiselina dobijenih ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon, što ovu metodu kategoriše kao pogodnu za praktičnu primenu. Dobijeni rezultati su ukazali na trend porasta sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i α-tokoferola sa produženjem vremena trajanja ultrazvučnog tretmana. Uočava se da primena ultrazvuka naročito olakšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja u uljnu fazu. **Bitno je istaći da su ekstrakcijom uz primenu ultrazvučnog tretmana, u ovom radu, u uljima dobijene približno iste količine ukupnih fenolnih jedinjenja koje su dobijene i ekstrakcijom po Soxhletu. Sa druge strane, evidentno je da vreme trajanja ultrazvučne**

ekstrakcije primenjene u ovom radu nije dovoljno da omogući oslobađanje liposolubilnog α-tokoferola iz semenke grožđa u uljnu fazu - značajno niže vrednosti α-tokoferola su pronađene u svim uzorcima ulja dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom u odnosu na uzorak ulja dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u. Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti, da se ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom koja je primenjena i ispitivana u ovom radu, nije pokazala u istom stepenu efikasnom za sve vrste antioksidanata. Ipak, veoma je bitno istaći da uprkos tome što je sadržaj α-tokoferola bio značajno viši kod uzorka dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u, izmerene vrednosti za OOT (oksidativna stabilnost) nisu više u odnosu na uzorke dobijene ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta, dok su dobijene vrednosti IC_{50} (antioksidativni kapacitet) veoma bliske kod oba načina ekstrakcije. Dakle, **rezultati dobijeni u ovom radu jasno ukazuju na ulogu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u povećanju oksidativne stabilnosti i antioksidativne aktivnosti i ističu njihov veći značaj u odnosu na α-tokoferol.**

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da ultrazvučni tretman primenjen u relativno ekološkim uslovima (korišćenje veoma niskog odnosa rastvarača i semenke, 2:1) u trajanju od 90 minuta, omogućava efikasnu esktrakciju ulja iz semenki grožđa.

Takođe, u ovom eksperimetu je ukazano na mogućnost primene dve moderne komplementarne metode, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i luminol - heminluminiscencije, u određivanju oksidativne stabilnosti ulja i antioksidativnog kapaciteta.

• Drugi eksperiment je imao za cilj fizičko-hemijsku karakterizaciju ulja iz semenki crvenih sorti grožđa: Pinot Noir, Prokupac, Gamay, Merlot i Cabernet Sauvignon (berba 2013), izdvojenih metodama hladnog ceđenja i ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u vremenu trajanja od 90 minuta; zatim, utvrđivanje uticaja sorte grožđa na sadržaj ulja u semenkama, kao i utvrđivanje uticaja sorte i metode izdvajanja na: ekstrakcione prinose, fizičko-hemijske karakteristike, sadržaj biološki aktivnih komponenti i održivost ulja iz semenki grožđa.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sadržaj ulja u semenkama zavisi od sorte grožđa. Najveći sadržaj ulja je utvrđen u semenkama grožđa sorte Cabernet Sauvignon (15,77% m/m), dok je namanji sadržaj utvrđen kod semenki autohtone sorte grožđa Prokupac (11,84% m/m).

Utvrđeni rezultati ekstrakcionog prinosa pokazali su da prinos ulja iz semenki grožđa zavisi i od sorte i od metode izdvajanja. Dokazano je da je ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom značajno efiksanija u odnosu na metodu hladnog ceđenja. Hladnim ceđenjem su postignuti prinosi od 4,78 do 6,27% m/m, dok su ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom dobijeni prinosi od 10,06 do 13,01% m/m. Ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ulktrazvukom izdvaja se, u zavisnosti od sorte, od 74,1 do 91,3% ulja od ukupnog sadržaja ulja u semenkama; dok se hladnim ceđenjem izdvajaju oko dva puta manje količine. Najveća efikasnost izdvajanja ulja, kod obe metode izdvajanja, zabeležena je kod semenki sorte Gamay gde je hladnim ceđenjem izdvojeno 52,7% od ukupnog sadržaja ulja, a ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, 91,3%. Sa druge strane, metoda hladnog ceđenja je najmanje bila efikasna kod sorte Pinot Noir (36,0%); a ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom je najmanju efikasnost pokazala kod semenki sorte Cabernet Sauvignon (74,1%).

Rezultati određivanja fizičko-hemijskih parametara kvaliteta (gubitak mase sušenjem, relativna gustina, tačka dimljenja, saponifikacioni broj, jodni broj i kiselinski broj) ukazali su na uticaj sorte grožđa i metode izdvajanja na fizičko-hemijske karakteristike ulja iz semenki grožđa. Kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem generalno su utvrđene više vrednosti tačke dimljenja i relativne gustine i niže vrednosti gubitka sušenjem, saponifikacionog i kiselinskog broja u odnosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, dok su vrednosti jodnog broja pokazale veće varijacije u odnosu na sortu nego na metodu izdvajanja. Bez obzira na prisutne razlike, treba istaći da su sve vrednosti bile karakteristične za vrstu ulja i u okviru ili neznatno van granica predviđenih pravilnikom o kvalitetu i apsolutno u skladu sa do sada objavljenim literaturnim podacima.

Analizom sastava masnih kiselina detektovane su, od zasićenih: palmitinska, stearinska, arahidinska i behenska masna kiselina, a od nezasićenih: oleinska, linolna i linolenska. Kao što je i bilo očekivano, dominantno prisutne su nezasićene masne

kiseline koje su pronađene u relativno uskom opsegu: 88,30 - 89,35% kod ulja dobijenih metodom hladnog ceđenja i u nešto širem opsegu (87,47 - 89,66 %) kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Kod svih ulja dominantna je linolna kiselina (C18:2, ω-6), koja je pronađena u opsegu 71,54 - 74,17% kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem i u opsegu 70,83 - 74,66% kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Druga po zastupljenosti je oleinska kiselina koja je kod ulja dobijenih hladnim ceđenjem pronađena u opsegu od 13,84% do 16,59%, a kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u opsegu od 13,49 do 16,85%. **Dobijeni rezultati su ukazali da kod ulja iz semenki različtih sorti grožđa koja su dobijena istom metodom postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina, kao i to da za ulja iz semenki istih sorti koja su dobijena različitom metodom takođe postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina. Na osnovu toga se može zaključiti da na sastav masnih kiselina utiče i sorta i metoda izdvajanja ulja.**

Sadržaj α-tokoferola kao posebno značajne bioaktivne komponente, je u uzorcima ulja dobijenim hladnim ceđenjem, u zavisnoti od sorte, pronađen u opsegu od 0,542±0,258 (Cabernet Sauvignon) do 1,5±0,057 mg/100 g (Prokupac). Kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom utvrđene su nešto veće vrednosti koje se nalaze u opsegu od 1,803±0,092 (Cabernet Sauvignon) do 3,222±0,118 mg/100 g (Pinot Noir). **Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se metodom ekstrakcije n-heksanom uz tretman ultrazvukom dobijaju ulja sa većim sadržajem α-tokoferola, u odnosu na metodu hladnog ceđenja.**

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je pronađen u sledećim opsezima: od 5,99±0,34 do 7,35±0,19 mg/100 g kod hladno ceđenih ulja i od 5,85±0,27 do 7,24±0,30 mg/100 g kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom. Najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je utvrđen kod ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac i Gamay, a najniži kod ulja od sorti Merlot i Cabernet Sauvignon. **Statistička analiza dobijenih rezultata je potvrdila uticaj sorte grožđa na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju iz semenki grožđa, dok uticaj metode izdvajanja ulja nije utvrđen.**

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti prema stabilnim DPPH radikalima (na bazi spektrofotometrijske metode), izraženi kao vrednost EC_{50}, kod hladno ceđenih

ulja se nalaze u širokom intervalu od 45,32±0,794 do 65,18±1,249 mg ulja/mg DPPH radikala, dok se kod ulja ekstrahovanih n-heksanom uz tretman ultrazvukom nalaze u nešto užem opsegu od 35,26±1,25 do 42,68±0,557 mg ulja/mg DPPH radikala. Statistička obrada rezultata izmerenih vrednosti EC_{50} ukazuje na to da između uzoraka ulja iz semenki različitih sorti grožđa dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike, što ukazuje da postoji izražen uticaj sorte na antioksidativni kapacitet. Objašnjenje za ovakve rezultate je nađeno u sadržaju komponenti koje imaju antioksidativna svojstva. **Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da antioksidativni kapacitet pored toga što zavisi od sorte grožđa, takođe zavisi i od metode izdvajanja ulja, pri čemu ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom pokazuju značajno veći antioksidativni kapacitet u odnosu na ulja dobijena hladnim ceđenjem.**

Vrednosti peroksidnog broja (Pbr), ukazuju na zavisnost sadržaja primarnih produkata oksidacije od sorte grožđa kao i od metode izdvajanja ulja. Kod hladno ceđenih ulja vrednosti Pbr su nađene u vrlo uskom opsegu od 2,533 do 3,8 mmol/kg, dok je kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom Pbr utvrđen u opsegu od 3,467 do 7,5 mmol/kg. **Utvrđeni rezultati ukazuju da ulja dobijena hladnim ceđenjem imaju niže vrednosti Pbr u odnosu na ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom.** Na osnovu vrednosti anisidinskog broja koje se nalaze u veoma uskom opsegu od 10,33 do 11,07 kod hladno ceđenih ulja i od 10,13 do 11,03 kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom, može se konstantovati da su u svim uzorcima prisutni i sekundarni neisparljivi produkti oksidacije. Različite vrednosti primarnih i sekundarnih proizvoda oksidacije ulja se jasno reflektuju i na oksidativnu vrednost (OV). Oksidativne vrednosti hladno ceđenih ulja se nalaze u rasponu od 6,13 do 17,93, a kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom od 17,13 pa čak i do 25,33, što je dokaz da ulja dobijena ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom mogu imati znatno veći sadržaj produkata reakcija oksidacije.

Otpornost ulja na oksidaciju je merena Rancimat testom (pri temperaturi od 100 °C i protoku vazduha od 10 L/h) i DSC metodom; a dobijeni rezultati su pokazali da na oksidativnu stabilnost ulja značajno utiču i sorta i metoda izdvajanja. Vrednosti indukcionog perioda (utvrđenih Rancimat testom) hladno

ceđenih ulja su pronađene u intervalu od 1,30 do 2,86 h dok se kod ulja dobijenih ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom uočavaju veća variranja vrednosti koje se nalaze u opsegu od 4,71 do 8,09 h.

Na osnovu dobijenih rezultata može se doneti zaključak da se ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom dobijaju ulja otpornija na oksidaciju u odnosu na ulja dobijena metodom hladnog ceđenja. Objašnjenje za utvrđene razlike u oksidativnoj stabilnosti između ulja iz semenki različitih sorti grožđa je nađeno u sadržaju i sastavu bioaktivnih sastojaka ulja, koje mogu znatno uticati na oksidativnu stabilnost. S obzirom da je otpornost na oksidaciju određivana dvema metodama, treba istaći da je između Rancimat testa i DSC metode utvrđen izuzetno visok stepen korelacije.

• U ovom radu je ispitivana tekstura semenki pet sorti grožđa primenom skenirajuće elektronske mikroskopije. Rezultati su ukazali na jasnu diferencijaciju različitih delova semenke. Na snimcima se uočavaju endosperm i svi slojevi semenjače (utrašnja opna, srednja opna i epidermis sa kutikulom). Uočene su razlike u debljini i strukturi epidermisa i središnjeg dela semenjače, kao i u strukturi endosperma u zavisnosti od sorte. Kod semenki autohtone sorte grožđa Prokupac uočena je najkompaktnija i najravnija površina epidermisa (kutikula), kao i najdeblji i najkompaktniji sloj središnjeg dela semenjače (srednje opne), što navodi na zaključak da kod semenki ove sorte postoji značajno veći udeo semenjače u odnosu na endosperm, u poređenju sa semenkama ostalih ispitivanih sorti.

Imajući u vidu ove rezultate, treći eskperiment izvršen u ovom radu je imao za cilj utvrđivanje uticaja ukljanjanja spoljašnjeg omotača semenke grožđa autohtone sorte Prokupac na povećanje prinosa kao i na kvalitet ulja dobijenog metodom hladnog ceđenja (fizičko-hemijske karakteristike, sadržaj biološki aktivnih komponenti i održivost). Dobijeni rezultati ukazali su da je tretman uklanjanja dela spoljnjeg omotača na mašini za poliranje zrna (ribalici) pokazao višestruko pozitivno dejstvo: uočeno je da se tretmanom na ribalici uklanjaju sve eventualno prisutne nečistoće u semenci (prašina, suvi delovi pokožice i peteljke grožđa, sitni - polomljeni delova zrna koji mogu biti izvor kvarenja ulja i tako dalje), čime se značajno olakšava proces ceđenja. Krajnji rezultat tretmana je bilo uklanjanje kutikule i dela epidermisa do spoljne membrane (bogata polifenolima – taninima), čime

je uklonjen najčvršći deo spoljnjeg omotača, a da pri tom nije narušen biološki potencijal semenke kao sirovine. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon izvršenog tretmana na ribalici prinos ulja hladnim ceđenjem povećan sa 4,78±0,066% na 6,17±0,66%; pri čemu je stepen iskorišćenja (to jest, sadržaj izdvojenog ulja u odnosu na ukupan sadržaj ulja u semenkama) povećan sa 40,37% na 52,11%.

Analizom fizičko-hemijskih parametara dobijenog ulja potvrđeno je da tretman na ribalici nije uticao na kvalitet izdvojenog ulja u odnosu na uzorak sa kojim je vršeno poređenje (ulje dobijeno hladnim ceđenjem iz netretiranih semenki iste sorte). Svi mereni parametri kvaliteta su u skladu sa *Codex stanadardom* (*2005*) *i Pravilnikom o kvalitetu ulja* (*2013*). Analiza biološki aktivnih komponenti ukazala je na povećani sadržaj α-tokoferola kod uzorka ulja dobijenog hladnim ceđenjem prethodno tretiranih semenki. Uticaj predtretmana na promenu sastava masnih kiselina i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nije utvrđen.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je uklanjanje navedenog dela spoljnjeg omotača omogućilo olakšanu difuziju ulja iz unutrašnjeg dela semenke (endosperma) ka površinskim slojevima što je rezultiralo olakšanim izdvajanjem ulja i značajnim povećanjem prinosa (stepena iskorišćenosti ulja) metodom hladnog ceđenja, a da pri tom nije utvrđen negativan uticaj ovog predtretmana na fizičko-hemijske karakteristike ulja.

Pored uklanjanja dela površinskog sloja semenke (kutikule i endosperma), tretmanom na ribalici se mogu ukloniti i eventualno prisutne plesni koje nastaju usled mikrobiološke aktivnosti tokom skladištenja semenki sa povećanim sadržajem vlage. Na taj način se može izvršiti jedna vrsta prevencije pojavi mikotoksina u gotovom proizvodu.

Treba istaći da je tretman na ribalici rađen samo pod jednim režimom rada ove mašine (2000 obrtaja u minuti i sa granulacijom abrazivne površine radnog kola od 2 mm), što ostavlja mogućnost za dalji rad na ovoj mašini u smislu ispitivanja uticaja menjanja broja obrataja i granulacije abrazivne površine radnog kola na prinos i kvalitet izdvojenog ulja iz semenki grožđa. Takođe, uticaj uklanjanja spoljnjeg omotača semenke na prinos i kvalitet ulja treba ispitati i kod drugih metoda izdvajanja ulja (natkritična ekstrakcija i ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom).

• Četvrti eksperiment je imao za cilj utvrđivanje mogućnosti primene natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom za izdvajanje ulja semenki crvenih sorti grožđa: Pinot Noir, Prokupac, Gamay, Merlot i Cabernet Sauvignon (berba 2013). Kroz ovaj eksperiment izvršeno je: utvrđivanje ekstrakcionog prinosa ulja natkritičnom ekstrakcijom, ispitivanje kinetike ekstrakcije i njeno matematičko modelovanje po modelu Sovove, kao i utvrđivanje sadržaja biološki aktivnih komponenti i oksidativne stabilnosti ulja DSC metodom.

Postignuti ekstrakcioni prinosi se nalaze u opsegu od 4,96 do 10,04%. Ekstrakcioni prinos ulja iz semenki autohtone sorte grožđa Prokupac dobijen natkritičnom ekstrakcijom pri datim uslovima, je približno duplo manji nego u slučaju semenki grožđa preostale četiri ispitivane sorte, a u odnosu na literaturne podatke ispod proseka. Ovaj rezultat može biti tumačen prethodno pomenutom kompaktnom teksturom površine epidermisa i veoma izraženom i kompaktnom semenjačom, kod semenki Prokupca, koja je uočena primenom skenirajuće elektronske mikroskopije. Najveći ekstrakcioni prinos ulja postignut je iz semenki grožđa sorte Pinot Noir.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da:

- **ekstrakcioni prinosi ulja iz semenki grožđa, dobijeni metodom natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom, zavise od sorte grožđa i od uslova ekstrakcije;**
- **prinosi dobijeni natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom niži su od prinosa koji se postižu ekstrakcijom n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta i viši u odnosu na prinose koji se postižu hladnim ceđenjem;**
- **ne postoji korelacija između ukupnog sadržaja ulja i ostvarenog prinosa - nezavisno od ukupnog sadržaja ulja u semenkama, a u zavisnosti od izabrane metode izdvajanja ulja, postignuti ekstrakcioni prinosi se razlikuju za svaku sortu (ovo jedino ne važi za semenke sorte Prokupac, kod kojih je utvrđen najniži ukupni sadržaj ulja i kod svih metoda izdvajanja postignut najniži ekstrakcioni prinos u odnosu na ostale ispitivane sorte).**

Sastav ulja iz semenki grožđa i sadržaj komponenti u njemu takođe varira u zavisnosti od sorte i uslova ekstrakcije. Analizom sastava masnih kiselina u ispitivanim

uljima, dobijenim metodom natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom, pronađene su sledeće masne kiseline: palmitinska, stearinska, arahidinska i behenska od zasićenih masnih kiselina i oleinska, linolna i linolenska od nezasićenih masnih kiselina. Kao i prethodno ispitivana ulja i ova ulja imaju veoma visok udeo nezasićenih masnih kiselina, koje su pronađene u opsegu od 87,59 do 89,07%. Od nezasićenih masnih kiselina, linolna (kao dominatna) je pronađena u opsegu od 70,89 do 73,99%; oleinska u opsegu od 14,06 do 17,25% i linolenska u opsegu od 0,35 do 0,42%. Od zasićenih masnih kiselina: palmitinska je utvrđena u opsegu od 7,34 do 7,99%; stearinska od 3,56 do 4,10%; arahidinska od 0,118 do 0,16% i behenska u opsegu od 0,124 do 0,176%. Statistička obrada podataka i kod ove metode je ukazala na to da između ulja iz semenki različitih sorti grožđa postoje statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina. **Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ulja dobijena natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom u poređenju sa uljima dobijenim primenom ostale dve metode koje su primenjene u ovom radu imaju nešto viši sadržaj palmitinske, oleinske (osim kod ulja iz semenki sorti Merlot i Prokupac) i linolenske masne kiseline; dok je sadržaj dominantne - linolne masne kiseline kod ulja dobijenih metodom natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom (osim u slučaju ulja iz semenki Prokupca) niži u odnosu na ulja dobijena ostalim dvema metodama.**

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je utvrđen u opsegu od 4,6 mg/100 g do 7,88 mg/100 g u zavisnosti od sorte. Ulje semenki sorte Prokupac je najbogatije fenolnim jedinjenjima među ispitivanim uljima, sa sadržajem gotovo duplo većim nego kod ostalih sorti (nasuprot duplo manjeg prinosa), dok je najniži sadržaj utvrđen kod ulja iz semenki grožđa sorte Gamay. **Poređenje prosečnih vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u uljima dobijenim različitim metodama (natkritična ekstrakcija ugljenik(IV)-oksidom – 5,51 mg/100 g; hladno ceđenje – 6,75 mg/100 g i ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta – 6,73 mg/100 g), dovodi do zaključka da se metodom natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom dobijaju ulja sa nižim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale dve metode.**

Analiza sadržaja α-tokoferola u ispitivanim uljima pokazala je da ulja dobijena natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom, pod datim uslovima, ne sadrže visoke

količine ovog jedinjenja. Sadržaj α-tokoferola je pronađen u veoma uskom opsegu od 0,100 mg/100 g do 0,308±0,011 mg/100 g, što je značajno manje od podataka koji se nalaze u literaturi. Najviši sadržaj α-tokoferola je utvrđen kod ulja iz semenki sorte Prokupac, a najniži kod ulja iz semenki grožđa sorte Gamay. U poređenju sa drugim metodama izdvajanja ulja, utvrđeno je da su natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom u odnosu na hladno ceđenje i ekstrakciju n-heksanom uz tretman ultrazvukom u trajanju od 90 minuta dobijena ulja sa najnižim sadržajem α-tokoferola. **Nizak sadržaj α-tokoferola u uljima dobijenim natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom u odnosu na druge dve metode korišćene u ovom radu i u odnosu na literaturne podatke, navodi na zaključak da primenjeni uslovi ekstrakcije (pritisak od 25 MPa (250 bara), temperatura od 50˚C i protok od 0,3 kg CO_2/h) nisu omogućili potpuno izdvajanje ovog izuzetno važnog bioaktivnog jedinjenja.**

Kinetika ekstrakcije ulja iz semenki grožđa sorte Prokupac razlikuje se od kinetike ekstrakcije ulja iz semenki ostale četiri sorte. Primenjeni matematički model Sovove je dobro opisao eksperimentalne podatke. Na dobijenim ekstrakcionim krivama uočeni su periodi spore i brze ekstrakcije. **Analiza poroznosti i gustine biljnog sloja kao i parametara modela Sovove, izračunatih optimizacijom eksperimentalnih podataka, pokazala je da je u slučaju semenki Prokupca potrebno više vremena da se ostvari dobar kontakt čestica semenki sa natkritičnim fluidom, da semenke ove sorte sadrže manju količinu lako dostupnog ulja, i da je ovom ulju potrebno više vremena da difunduje do površine čestice a onda i u natkritični fluid, što sve uslovljava značajno manji prinos ovog ulja na početku procesa i njegovu sporiju ekstrakciju, u odnosu na ulja ostale četiri sorte.**

• Iz svega navedenog, može se doneti važan zaključak da semenke grožđa danas zaista ne predstavljaju otpadni materijal, već veoma kvalitetnu sirovinu za dobijanje ulja. Ulje iz semenki grožđa se zbog karakteristika koje su potvrđene u ovom radu može svrstati u red veoma kvalitetnih jestivih biljnih ulja.

Kroz ovaj rad je ukazano na mogućnost primene različitih metoda izdvajanja ulja sa ciljem razvoja tehnike koja će omogućiti izdvajanje kvalitetnog ulja u ekološki prihvatljivim uslovima. Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, različite metode izdvajanja su dale različite rezultate; međutim, svaka od ispitivanih metoda izdvajanja

ulja se može okarakterisati kao praktično primenljiva pa je teško izdvojiti jednu, kao najbolju. U radu je takođe utvrđeno da se ulja iz semenki različitih sorti grožđa međusobno razlikuju po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama, ali je teško istaći semenke neke od ispitanih sorti kao izvor najboljeg ulja. Najveći sadržaj ulja je izdvojen iz semenki sorte Cabernet Sauvignon a najniži iz semenki sorte Prokupac, dok je s druge strane ulje iz semenki Prokupca najbogatije bioaktivnim komponentama. Evidentno je da tokom procesa izdvajanja ulja iz semenki grožđa samo jedan deo bioaktivnih materija (polifenoli i tokoferoli) iz semenki prelazi u ulje, dok veliki deo ovih jedinjenja zaostaje u pogači nakon ceđenja ili ekstrakcije.

Rezultatima koji su dobijeni u radu, kao i zaključcima koji se iz njih mogu izvesti ova disertacija trasira i buduća istraživanja: u budućem radu trebalo bi posebnu pažnju obratiti na uslove procesa ekstrakcije koji će omogućiti da se iz semenke grožđa, kao sirovine koja obiluje bioaktivnim jedinjenjima, izdvoji ulje sa maksimalnim količinama ovih komponenti. Ovde treba posebno naglasiti uslove pod kojima se vrši natkritična ekstrakcija: bilo bi značajno ispitati uticaj različitih vrednosti pritiska i temperature, mogućnost primene različitih kosolvenata, kao i uticaj uklanjanja spoljnjeg omotača (na ribalici) kao predtretmana ovoj ekstrakciji. Takođe, bilo bi važno nastaviti ispitivanja koja bi omogućila iskorišćavanje pogače koja zaostane nakon izdvajanja ulja. Ova istraživanja omogućila bi utvrđivanje biološkog potencijala pogače kao i razradu tehnoloških postupaka za izdvajanje biološki aktivnih komponenti iz pogače i njihovu primenu u prehrambenoj industriji.

7. LITERATURA

1. Abuja, P.M., Albertini, R., (2001): Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Cli. Chim. Acta 306:1-17.

2. Acworth, I.N., (2003): The Handbook of Redox Biochemistry. ESA, Inc., Chelmsford, USA.

3. Adhvaryu, A., Erhan, S.Z., Liu, Z.S., Perez, J.M. (2000): Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Thermochim Acta 364:87-97.

4. Andreasen, A.A., Stier, T.J.B. (1953): Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. J.of Cellular and Comaparative Physiology 41:23-36.

5. Andreasen, A.A., Stier, T.J.B. (1954): Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. J.of Cellular and Comaparative Physiology 43:271-281.

6. AOCS (American Oil Chemisct's Society) (1997): Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 5th edition. Champaign, Illinois.

7. Bagchi, K., Puri, S., (1998): Free radicals and antioxidants in health and disease. Eastern Mediterranean Health Journal 4(2):350 – 360.

8. Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G., (2008): Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. Food Chem. 108:1122–113.

9. Bakkalbas, E., Yemis, O., Aslanova, D., Artik, N. (2005): Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey. Eur. Food Res. Technol. 221:792–797.

10. Balachandran, S., Kentish, S.E., Mawson, R., Ashokkumar, M. (2006): Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. Ultrasonics Sonochemistry 13:471–479.

11. Baydar, G. N., Akkurt, M., (2001): Oil content and oil quality properties of some grape seeds. Turk. J. Agric. For. 25:163–168.

12. Beveridge, T.H.J., Girard, B., Kopp, T., Drover, J.C.G. (2005): Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. J. Agric. Food Chem. 53:1799–1804.

13. Bezzi, S., Loupassaki, S., Petrakis, Ch., Kefalas, P., Calokerinos, A. (2008): Evaluation of peroxide value of olive oil and antioxidant activity by luminol chemiluminescence. Talanta 77:642–646.

14. Bockish, M. (1998): Fats and oils handbook. AOCS Press, Champaign, Illinois

15. Bockisch, M. (1993): Nahrungsfette und -öle. Stuttgart: Ulmer Verlag.

16. Bonanome, A., Grundy, G.M. (1988): Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. New Engl. J. Med. 319:1244-1248.

17. Bragadóttir, M. (2001): Endogenous antioxidants in fish, A literature review submited in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in food science. Department of Food Science, University of Iceland.

18. Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G. (1999): Vitamin E: Function and metabolism. FASEB Journal, 13(10):1145-1155.

19. Bravi, M., Spinoglio, F., Verdone, N., Adami, M., Aliboni, A., Andrea, D.A., De Santis, A., Ferri, D. (2007): Improving the extraction of α-tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO2. Optimisation of the extraction conditions. Journal of Food Engineering 78:488–493.

20. Burić, D. (1981): Vinogradastvo I. Ćirpanov, Novi sad.

21. Cao, X., Ito, Y. (2003): Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A 1021:117–124.

22. Ceci, L.N. and Carelli, A.A. (2010): Relation between oxidative stability and composition in Argentinian olive oils. J. Am. Oil. Chem. Soc. 87:1189–1197.

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

24. Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Shum Cheong Sing, A., Smadja, J. (2004): High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. Ultrason. Sonochem. 11:281–285.

25. Christie, W. W. (1982): Lipid Analysis. Pergamon Press, New York, p. 1.

26. Choe, E., Min, D.B. (2006): Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Compr. Rev. in Food Sci. and Food Saf. 5:169–186.

27. Choi, H.S., Cha, Y.N., Kim, C. (2006): Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of p47(phox). Int. Imunopharmac. 6:1431 - 1440.

28. Choi, Y., Lee, J. (2009): Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seed. Food Chem. 114:1385–1390.

29. Commission Regulation (EEC) (1991): No 2568/91, Off. J. Eur. Communities, L248, 1-83.

30. Connor, W.E. (2000): Importance of n-3 fatty acids in health and disease. American Journal of Clinical Nutrition 71 (1):171S-175S.

31. Da Porto, C., Decorti, D., Kikic, I. (2009): Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparion of three diferent extraction metods. Food Chemistry 112:1072-1078.

32. Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, E. (2013): Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) seeds. Ultrason. Sonochem. 20:1076-1080.

33. Daayf, F., Lattanzio, V. (2008): Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 1. Blackwell Publishing Ltd.

34. Dabbou, S., Brahmi, F., Taamali, A., Issaoui, M., Ouni, Y., Braham, M., Zarrouk, M., Hammami, M. (2010): Extra virgin olive oil components and oxidative stability from olives grown in Tunisia. J. Am. Oil Chem. Soc. 87:1199–1209.

35. Deak, M. (2008): Visoko pritisna tečna hromatografija (HPLC), Tehnologija hrane, magazine posvećen tehnologiji proizvodnje hrane.

36. De Panfilis, F., Toschi, G.T, Lercker, G. (1998): Quality control for cold-pressed oils. INFORM 9:212-221.

37. Dimić, E. (2005): Hladno ceđena ulja, monografija. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

38. Dimić, E., Turkulov, J. (2000): Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

39. Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson S.P. (2003): Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. Aust. J. Grape Wine Res. 9:15–27.

40. Dunnuck, J. (1991): NTP technical report on the toxicity studies of of n-hexane in B6C3F1 mice. Toxicity Report Series 2:1–32.

41. Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G. (2000): Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet, Niš.

42. Faller, A.L.K., Fialho, E. (2010): Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. J. Food Compos. Anal. 23:561–568.

43. FAO (2010): Fao Food and Nutrition Paper 91, Fats and fatty acids in human nutrition Report of an expert consultation, 10 – 14 November 2008 Geneva.

44. FAO-STAT (2014): Food and Agriculture Organization. Rome (Italy).

45. Filip, S. (2014): Ekstrakcija bosiljka (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) ugljenik(IV)-oksidom u superkritiĉnom stanju i modelovanje ekstrakcionog sistema. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet.

46. FM 5-519 (2000): Florida Method of Test for SMOKE POINT.

47. Firestone, D., Fedeli, E., Emmons, E.W. (1996): Olive oil. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edited by Y.H. Hui, Volume 2, Edible oils and fat products: Oils and oil seeds, Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 241-269.

48. Firestone, D. (Ed.) (1997): Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes. AOCS Press, Champaign, IL (USA), pp 44-45.

49. Food fats and oils (9 ed.) (2006): Prepared by the Technical Committee of the Institute of Shortening and Edible Oils, Inc., 1750 New York Avenue, NW, Suite 120 Washington, DC 20006.

50. Forss, D.A. (1969): Role of lipids in flavors. J. of Agricultural and Food Chemistry 17:681-685.

51. Frankel, E.N., (1985): Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. Prog. Lipid Res. 23:197–221.

52. Frankel, E.N. (1996): Antioxidants in lipid foods and their impact of the food quality. Food Chemistry 57:51-55.

53. Frankel, E.N. (1999): Antioxidants and hydroperoxides. INFORM 10(9):889-896.

54. Frega, N., Mozzon, M., Lercker, G. (1999): Effects of Free Fatty Acids on Oxidative Stability of Vegetable Oil. Journal of American Oil Chemist's Society 76:325-239.

55. Freitas, L.S., Jacques, R.A., Richter, M.F., Silva, A.L., Caramao, E.B. (2008): Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. Journal of Chromatography A 1200:80–83.

56. Fuleki, T., Da Silva, J.M.R. (1997): Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. J. Agric. Food Chem. 45:1156–1160.

57. Gallender, J.F., Peng, A.C. (1980): Lipid and fatty acid compositions of different grape types. American J. Enol.Vitic. 31:24–27.

58. Gatellier, P., Anton, M., Renerre, M. (1995): Lipid Peroxidation Induced by H2O2-Activated Metmyoglobin and Detection of a Myoglobin-Derived Radical. J. Agric. Food Chem. 43:651 - 656,

59. Ghaderi, R. (2000): A Supercritical Fluids Extraction Process for the Production of Drug Loaded Biodegradable Microparticles. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 234, Acta Universitatis Upsaliensis.

60. Ghafoor, K., Choi, J.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009): Optimization ofultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds. J. Agr. Food Chem. 57:4988–4994.

61. Girotti, A.W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. JLR 39:1529 -1542.

62. Gomez, A.M., Lopez, C.P., De La Ossa, E.M. (1996): Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: A comparison with conventional solvent extraction. Chem. Eng. J. 61:227-231.

63. Gordon, M. (2001): Measuring antioxidant activity. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Antioxidants in food, Practical aplications. Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 71-84.

64. Grande, F., Anderson, J.T., Keys, A. (1970): Comparison of effects of palmitic and stearic acids in the diet on serum cholesterol in men. Am. J. Clin. Nutr. 23:1184-1193.

65. Gray, J.I. (1978): Measurement of lipid oxidation: A review. Journal of American Oil Chemist's Society 55:539-546.

66. Gunstone, F.D. (2000): Edible Oil Processing, in Hamm W. and Hamilton R.J. (Ed.). Sheffield Academic Press, Sheffield, U.K., pp. 1–33.

67. Gunstone, F.D. (2004): The Chemistry of Oils and Fats; Sources, Composition, Properties and Uses . Blackwell Publishing, Ltd., USA and Canada, pp 23-24,107-112.

68. Gunston, F.D. (2005): Vegetable Oils, In Shahidi F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc. pp. 213-267.

69. Gurr, M.I., James, A.T. (1971): Lipid Biochemistry: An Introduction. Cornell University Press, Ithaca, NY, p. 1.

70. Haines, P.J. (Ed.) (2002): Principles of Thermal Analysis and Calorimetry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

71. Halliwel, B. (1999): Antioxidant defense mechanisms: From the begining to the end. Free Radical Research 31:261-272.

72. Halliwel, B., Whiteman M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. Br. J. Pharmacol. 142:231-255.

73. Hamid, H., Hamdard, J., Hamdard, N. (2007): Pharmaceutical Analysis, Ultraviolet and Visible Spectrophotometry. Dept. of Chemistry, Faculty of Science, New Delhi - 110062.

74. Hayasaka, Y., Waters, E. J., Cheynier, V., Herderich, M.J., Vidal, S. (2003): Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17:9-16.

75. Hites, R.A. (1997): Gas Chromatography-Mass Spectrometry, chapter 31. In: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Ed., Frank, A. Settle.

76. Hayes, K.C. (2000): Dietary fatty acids, cholesterol and lipoprotein profile. Br. J. Nutr. 84:397-399.

77. Heinemann, T., Axtmann, A., Von Bergmann, K. (1993): Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur. J. Clin. Invest. 23:827-831.

78. Hoffman, G. (1989): The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and Their High Fat Products. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 8-10.

79. Hornstra, G. (1999): Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. Fett-Lipid 101(12):456-466.

80. ISO 6886:2006. Animal and vegetable fats and oils - Determination of oxidative stability (Accelerated oxidation test). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

81. Isobe, S., Zuber, F., Uemura, K., Noguchi, A. (1992): A new twin-screw press design for oil extraction of dehulled sunflower seeds. J. Am. Oil Chem. Soc. 69:884-889.

82. Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M., Tomas, M.C. (2012): Oxidative stability of chia (Salvia hispanica L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. Journal of American Oil Chemist's Society 89:1077–1090.

83. IUPAC (1992) Standard methods for the analysis of oils, fats and derivates, 7th edn. In: Paquot C, Hautffenne A (eds) International union of pure and applied chemistry. Blackwell Scientific, Oxford.

84. Jašić, M. i Begić, L. (2008): Biohemija hrane I. Univerzitet u Tuzli.

85. Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., Bagchi, D. (2001): The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. Curr. Pharm. Biotechnol. 2:187-200.

86. Kamal-Eldin, A. (2005): Minor components of fats and oils. In: Shahidi F. (ed), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 319-359.

87. Kamal-Eldin, A, Appelqvist, L-A. (1996): The chemistry and antioksidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 31:671-701.

88. Kamal-Eldin, A. (2006): Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. European Journal of Lipid Science and Technology 58(12):1051-1061.

89. Kamel, B.S., Dawson, H. (1985): Characterestics and composition of melons and grape seeds oils and cakes. Journal of American Oil Chemist's Society 62(5):881-883.

90. Kanofsky, J.R., Hooglandli, H., Weverl, R., Weissll, S.J. (1988): Singlet Oxigen Production by Human Eosinphils. Biol. Chem. 263:9692-9696.

91. Kates, M. (1986): Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. Elsevier, New York, p. 1.

92. Kemper, T.G. (2005): Oil Extraction. In: Shahidi, F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volume 6, Edible oils and fat products: Oils and oil seeds, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 57-97.

93. Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L. (2000): Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry 55:77-85,

94. Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles O., Chemat F. (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel. Food Chem. 119:851-858.

95. Kim, H., Kim, S-G., Choi, Y., Jeong, H-S., Lee, J. (2008): Changes in Tocopherols, Tocotrienols, and Fatty Acid Contents in Grape Seed Oils during Oxidation. J. Am. Oil. Chem. Soc. 85:487-489.

96. Kinsella, J.E. (1974): Grapeseed oil, A rich source of linoleic acid. Food Technol. 28:58-60.

97. Knothe, G. (2005): Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Process Technol. 86:1059-1070.

98. Kohlmeier, L., Hastings, S.B. (1995): Epidemiological evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. Am. J. Clin. Nutr. 62:1370S-1376S.

99. Kovač, V., Alonso, E., Revilla, E. (1995): The Effects of Adding Suplementary Seeds During fermentation on the Phenolic Composition of Wines. American Journal of Enolology and Viticulture 46(3):363-367.

100. Kow, Y.W. (1999): Oxidative Stress, DNA Damage and Human Diseases. Dojindo Newsletters, 2.

101. Kowalski, R., Wawrzykowski J. (2009): Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme Thymus vulgaris L. Flavour Frag. J. 24:69-74.

102. Kumar, S. (2006): Spectroscopy of Organic Compounds, Organic Chemistry, Dept. of Chemistry Guru Nanak Dev. University Amritsar – 143005.

103. Lang, Q., Wai, C.M. (2001): Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. Talanta 53:771-782.

104. Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003): Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresour Technol. 87:167-198.

105. Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011): The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chem. 125:288-306.

106. Lepojević, Ž. (2000): Praktikum hemije tehnologije farmaceutskih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

107. Lepšanović, L., Lepšanović, LJ. (2000): Klinička lipidologija, Savremena administracija, Beograd.

108. Li, H., Pordesimo, L., Weiss J. (2004): High intensity ultrasoundassisted extraction of oil from soybeans. Food Res. Int. 37:731-738.

109. Luque-Rodriguez, J. M., Castro L.M. D., Perez-Juan, P. (2005): Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. Talanta 68:126-130.

110. Luque-Garcıa, J.L., De Castro, M.D.L. (2003): Ultrasound: a powerful tool for leaching. Trends in Analytical Chemistry 22(1):41-47.

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

112. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990): Fruit Phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

113. Madawala, S.R.P., Kochhar, S.P., Dutta P.C. (2012): Lipid components and oxidative status of selected specialty oils, Grasas y aceites 63(2):143-151.

114. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle. R. (2009): Residues of grape (Vitis vinifera L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. Food Chemistry 112:551-559.

115. Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K. (2007): Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. J. Food Comp. Anal. 20:125-132.

116. Marjanović, N., Krstić, B. (1998): Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima. Tehnološki i Prirodno matematički fakultet, Novi Sad.

117. Marjanović, N. (2001): Instrumentalne metode analize – metode razdvajanja. Tehnološki fakultet, Banja Luka.

118. Martinez, M., Maestri, D. (2008): Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110:1183-1189.

119. Martin-Polvillo, M., Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C. (2004): Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. Journal of American Oil Chemist's Society 81: 577-583.

120. Massanet, G., Montiel, J.A., Pando, E., Rodriguez, L.F. (1986): Study of agricultural by-products. II. Fatty acid composition of Palomino grapeseed oil. Grasas Aceites 37:233-236.

121. Matthäus, B. (2008): Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight?. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110:645-650.

122. Matijašević, B.O., Turkulov J. (1980): Tehnologija ulja i masti I deo. Tehnološki Fakultet Novi Sad.

123. Matijašević, B.O., Turkulov J. (1971): Sadržaj linolne kiseline i α–tokoferola – pokazatelja biološke vrednosti u suncokretovom ulju. Bilten: Biljna ulja i masti 8(1-2):5-9.

124. Mauricio, J.C., Arroyo, M., Millan, C., Ortega, J.M. (1990): Realtionship between the phospholipid and sterol content in Saccharomyces cerevisiae and Torulospora delbrueckii, and their permanence during the fermentation of must from grapes of the "Pedro Ximenez" variety. Biotechology Letters 12(4):265-270.

125. Mc. Murray, J. (2000): in "Organic Chemistry", Fifth edition. Brooks/Cole, Pacific Grove, pp. 1118-1120.

126. Mehmet, M.O., Zuleyha, E., Fatih, E. (2010): Physical and Chemical Properties of Some Seed and Kernel Oils. Asian Journal of Chemistry 22(8):6531-6536.

127. Miele, A., Bouard, J., Bertrand, A. (1993): Fatty acids from lipid fractions of leaves and different tissues of Cabernet sauvignon. American Journal of Enology and Viticulture 44:180-186.

128. Milosavljević, M. (1998): Biotehnika vinove loze. Institut za istraživanja u poljoprivredi, Srbija, Beograd. Izdavačka kuća: Draganić, Zemun.

129. Milosavljević, S.M. (2004): Strukturne instrumentalne metode. Univerzitet u Beogradu, Hemijski Fakutet, Beograd.

130. Mironeasa, S., Leahu, A., Codină, G.G., Stroe, S.G., Mironeasa, C. (2010): Grape Seed: physico-chemical, structural characteristics and oil content. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 16(1):1-6.

131. Mimić-Oka, J., Simić, D.V., Simić T.P. (1999): Free radicals in cardiovascular diseases. Facta Univ., Series: Medicine and Biology 6(1):11-22.

132. Mićić, V., Novaković, D., Lepojević, Ž., Jotanović, M., Pejović, B., Dugić, P., Petrović, Z. (2011): Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. Contemporary Materials II, pp. 84-87.

133. Millan, C., Vargas A. (1992): Fatty acid content of unripe and ripe (Pedro Ximenez) Vitis vinifera L. Grapes. J. of Wine Research 3:235-240.

134. Min, D.B., Boff, J.M. (2002): Lipid oxidation of edible oil. In: Akoh CC, Min DB (Eds.) Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. Marcel Dekker Inc, New York, pp 353–382.

135. Morin, O. (1996): Corn and grapeseed oil. In: A. Karleskind (Ed.), Oil and fats manual. Hampshire: Andover, pp. 143–146.

136. Morvarid, Y., Leila, N., Mohammad G. (2013): Physicochemical properties of two type of shahrodi grape seed oil (Lal and Khalili). European Journal of Experimental Biology 3(5):115-118.

137. Murkovic, M. Pfannhauser W. (2000): Stability of pumpkin seed oil. European Journal of Lipid Science and Technology 102(10):607-611.

138. Mustakas, G.C. (1980): Recovery of oil from soybeans. In: D.R. Erickson (Ed.), Handbook of soy oil processing and utilization, St. Louis: American Soybean Association and American Oil Chemists' Society.

139. Naczk, M., Shahidi, F. (1991): Critical evaluation of quantification methods of rapeseed tannins. In: GCIRC Eighth International Rapeseed Congress, Vol.5, (Mc Gregor DI, ed.), Organizing Committee, Saskatoon, Canada, pp. 1385–1391.

140. Nair, S., Pullammanappallil, P. (2003): Value added products from vineyards wastes – A review, Proceedings of ORBIT 2003, Centrefor Organic Waste Management, P-108, Murdoch University, South Street, WA6150, Australia.

141. Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. (2003): Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. J. Health Sci. 49:45-54.

142. Norhuda, I., Jusoff, K. (2009): Supercritical carbon dioxide (SC-CO2) as a clean technology for palm kernel oil extraction. Journal of Biochemical Technology 1:75-78.

143. Nyam, K.L., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., Che Man, Y.B. (2009): Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils. LWT - Food Science and Technology 42(8):1396-1403.

144. Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G. (1993): Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. Clin. Investig. 91:2546-2551.

145. Ohlrogge, J., Browse J. (1995): Lipid Biosynthesis. The plant cell 7:957-970.

146. O'Keefe, S.F. (2002): Nomenclature and Classification of Lipids. In: Casimir C. Akoh, David B. Min (Eds.), "Food Lipids, Chemisty, Nutrition and Biotechnology", 2nd. Marcel Dekker, Inc. New York.

147. Oomah, B.D., Liang, J., Godfrey, D., Mazza, G. (1998): Microwave heating of grapeseed: Effect on oil quality. J. Agric. Food Chem. 46:4017-4021.

148. Pao, P.U. (1994): Nutritient Copmosition of some less-familiar oil seeds. Food Chemistry 50:379-382.

149. Pardauil, J.J.R., Souza, L.K.C., Molfetta, F.A., Zamian, J.R., Rocha Filho, G.N., Da Costa, C.E.F. (2011): Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. Bioresource Technol. 102:5873-5877.

150. Pardo, J.E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., Alonso, G.L. (2009): Characterization of grape seed oil from differentgrape varieties (*Vitis vinifera*). Eur. J. Lipid Sci. Technol. 111:188–193.

151. Pardo, J.E., Rubio, M., Pardo, A., Zied, D.C., Alvarez-Orti, M. (2011): Improving the quality of grape seed oil by maceration with grinded fresh grape seeds. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113:1266-1272.

152. Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M.P., Whittaker, P., Yu. L. (2005): Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed

marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. J. Agr. Food Chem. 53:566-573

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

154. Peter, A.M., Botham, K.M. (2003): Lipids of Physiologic Significance. In: Harper's Illustrated Biochemistry, 26. Ed.

155. Piletić, M.V., Milić, B.Lj., Đilas, S.M. (1993): Organska hemija II deo. Prometej, Novi Sad.

156. Pićurić-Jovanović, K., Milovanović, M. (2005): Autooksidacija lipida i antioksidanti flore Srbije. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.

157. Pokorny, J. (2001): Introduction. In: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., (Eds.), Antioxidants in Food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 1-3.

158. Pokorny, J., Parkányiová, J. (2005): Lipids with antioxidant properties. In: Akoh, C.C., Lai, O-M (Eds), Healthful Lipids. AOCS Press., pp. 273-300.

159. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode, "Sl. list SCG", br. 23/2006 i "Sl. glasnik RS", br. 43/2013 – dr. pravilnik.

160. Pruthi, J.S., (1977): Processing of grape juice, juice products and by-products. Indian Food Packer 25(1):38-44.

161. Puiggròs, F, Llópiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., Salvadó M.J. (2005): Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. J. Agr. Food Chem. 53:6080–6086

162. Rac, M. (1964): Ulja i masti, sirovina, kemija i tehnologija ulja i masti, Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.

163. Radovanović, V. (1986): Tehnologija vina. Iro, Građevinska knjiga, Beograd.

164. Rajić, N. (2004): Praktikum neorganske hemije. Tehnološko-metalurški Fakultet, Beograd, str. 119-142.

165. Rayan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R. (2007): Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. Plant Foods for Human Nutrition 62:85-91.

166. Raven, P.H., Johnson, G.B. (1999): in "Biology", Fifth edition, McGraw-Hill Companies, USA, pp 45-46.

167. Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R. (2002): Antioxidants. In: Akoh C.C., Min D.B. (eds) Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp 507–534.

168. Reverchon, E., De Marco, I. (2006): Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. Journal of Supercritical fluids 38:146-166.

169. Rice, A.C., (1976): Solid-waste generation and by-product recovery potential from winery residues. American Journal of Enology and Viticulture 27(1):21-26.

170. Rodriguez-Amaya, D.B. (2001): A guide to carotenoid analysis in foods. Ph.D., Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. C.P. 6121, 13083-970 Campinas, SP., Brasil.

171. Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003): Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. J. Chromatogr. A 1012:119–128.

172. Rounds, M.A., Greqory, J.F. (1998): High Performance Liquid Chromatography. In: S. Suzanne Nielsen (Ed.), Food Analysis 2nd ed. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

173. Rouessac, F., Rouessac, A. (2007): Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd,

174. Rubba, P., Iannuzzi, A. (2001): N-3 to n-6 fatty acids for managing hyperlipidemia, diabetes, hypertension and atherosclerosis: Is there evidence?. European Journal of Lipid Science and Technology 103(6):407-418.

175. Rubio, M., Alvarez-Orti, M., Alvarruiz, A., Fernandez, E., Pardo, J.E. (2009): Characterization of Oil Obtained from Grape Seeds Collected during Berry Development. J. Agric. Food Chem. 57:2812–2815

176. Sabir, A., Unver, A., Kara, Z. (2012): The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (Vitis spp.). J Sci Food Agric 92:1982-1987.

177. Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2009): Application of supercritical CO2 in lipid extraction – A review. Journal of Food Engineering 95:240-253.

178. Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., Yamaji, N. (1998): Anti ulceractivity of grape seed extract and procyanidins. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46:1460-1464.

179. Schieber, A., Muller, D., Rohrig, G., Carle, R. (2002): Influence of grape cultivar and processing method on the quality of cold-pressed grape seed oils. Mitteilungen Klosterneuburg 52(1-2):29-33.

180. Scrimgeour, C. (2005): Chemistry of fatty acids. In: Shahidi F. (ed), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-43.

181. Shahidi, F., Zhong, Y. (2005): Antioxidants: Regulatory status. In: Shahidi F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 491-512.

182. Shahidi, F., Zhong, Y. (2005a): Lipid Oxidation: Measerement methods. In: Shahidi F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 357-385.

183. Shalmashi, A. (2009): Ultrasound-assisted extraction of oil from tea seeds. J. Food Lipids 16:465-474.

184. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y. (2003): Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. J. Med. Food 6(4):291-299.

185. Siger, A., Nogala-Kalucka, M. Lampart-Szczapa, E. (2008): The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. Journal of Food Lipids 15(2):137-149.

186. Simopoulos, A.P. (2002): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomedicine & Pharmacotherapy 56:365-379.

187. Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J. (1995): Pepitas de uva como fuente de aceite y proteína. Aliment. Equipos Tecnol. 14:49-56.

188. Singh, J., Bargale, P.C. (1990): Mechanical expression of oil linseed (*Linum usitatissimum L.*). J. Oilseed Res. 7:106-110.

189. Singh, K.K., Wiesenborn, D.P., Tostenson, K., Kangas, N. (2002): Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. Journal of American Oil Chemist's Society 79(2):165-170.

190. Singh, M.S., Farsai, A., Stewart, L.E., Douglass, L.W. (1984): Development of mathematical models to predict sunflower oil expression. Trans. ASAE 27:1190-1194.

191. Singleton, V.L. (1980): Grape and wine phenolics: background and prospects. In: Proceedings of the University of California, Davis, Grape and Wine Centenary Symposium. University of California, Davis, pp. 215–227.

192. Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S. (2002): Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji. Hemijska industrija 56(5):179-190.

193. Solinas, V., Ferino, I. (1998): Microcalorimetric characterisation of acid-basic catalysts. Catalysis Today 41:179-189.

194. Sovilj, M. (2004): Difuzione operacije. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

195. Sovová, H. (2005): Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. J. Supercrit. Fluids 33(1):35–52.

196. Sovová, H., Stateva, R.P. (2011): Supercritical fluid extraction from vegetable materials. Rev. Chem. Eng. 27:79-156.

197. Sovova, H., Kučera, J., Jež, J. (1994): Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO_2. II. Extraction of grape oil. Chemical Engineering Science 49(3):415-420.

198. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1992): Phenolics of apple, pear, and white grape juice and their changes with processing and storage - a review. J Agric Food Chem. 40:1478-1487.

199. SRPS ISO 3961:2001. Masti i ulja životinjskog i biljnog porekla - Određivanje konvencionalne zapreminske mase ("litarske mase na vazduhu"). Institut za Standardizaciju Srbije.

200. SRPS ISO 6883:2003. Masti i ulja životinjskog i biljnog porekla - Određivanje jodnog broja. Institut za Standardizaciju Srbije.

201. SRPS EN ISO 665:2008. Seme uljarica, određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija. Institut za Standardizaciju Srbije.

202. SRPS EN ISO 3657:2008. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje saponifikacionog broja. Institut za Standardizaciju Srbije.

203. SRPS EN ISO 662:2009. Masti i ulja životinjskog i biljnog porekla - Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija. Institut za Standardizaciju Srbije.

204. SRPS EN ISO 659:2011. Seme uljarica – Odredjivanje sadržaja ulja (Referentna metoda). Institut za Standardizaciju Srbije.

205. SRPS EN ISO 660:2011. Masti i ulja životinjskog i biljnog porekla – Određivanje kiselinskog broja i kiselosti. Institut za Standardizaciju Srbije.

206. SRPS EN ISO 3960:2011. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla — Određivanje peroksidnog broja — Jodometrijsko (vizuelno) određivanje završne tačke. Institut za Standardizaciju Srbije.

207. SRPS EN ISO 6885:2011. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla — Određivanje anisidinskog broja. Institut za Standardizaciju Srbije.

208. Swern, D. (1972): Industrijski proizvodi ulja i masti po Baileyju. Nakladni Zavod Znanje Zagreb.

209. Tan, C.P., Che Man, Y.B., Selamat, J., Yusoff, M.S.A. (2002): Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. Food Chem. 76:385–389.

210. Tiscornia, E., Bertini, G.C. (1973): Composition of the sterol fraction of lipids extracted from oilseeds. Riv. Ital. Sostanze Grasse 50:251-268.

211. Toppel, A.L. (1997): Vitamin E as a biological lipid antioxidant. INFORM 8(4).392-395.

212. Trautwein, E.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., Mel'nikov, S.M., Molhuizen, H.O.F., Ntanios, F.Y. (2003): Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. European Journal of Lipid Science and Technology 105(3-4):171-185.

213. Udayasekhara Rao, P. (1994): Nutritient composition of some less-familiar oil seeds. Food Chemistry 50:379-382.

214. Ulkowski, M., Musialik, M., Litwinenko, G. (2005): Use of differential scanning calorimetry to study lipid oxidation. 1. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid. Jour. Agr. Food Chem. 53:9073–9077.

215. Vaya, J., Aviram, M. (2001): Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications, Curr. Med. Chem. - Immun. Endoc. & Metab. Agents 1:99–117.

216. Veličković, D.T. (2007): Ultrazvučna ekstrakcija žalfije. Zadužbina Andrejević, Beograd, str. 23-27.

217. Viljanen, K., Sundberg, S., Ohshima, T., Heinonen, M. (2002): Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104:353-359.

218. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L.,Bates, D. (2008): Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. Innov. Food Sci. Emerg. 9:161-169.

219. Vinatoru, M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry 8(3):303-313.

220. Voet, D., Voet, J. G. (2005): Biochemistry, (3 ed). Wiley.

221. Vollhard, K.P., Schore, E.N. (2003): Organic Chemistry: Structure and function. Fourth edition, W.H. Freeman and Company.

222. Wandall, B. (2008): The controversy over trans fatty acids: Effects early in life. Food and Chemical Toxicology 46 (12):3571-3579.

223. Wan, P.J., Wakelyn, P.J. (1997): Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils. AOCS Press, Champaign, IL.

224. Wang, T. (2002): Soybean oil. In: Gunston F.D. (Ed.), Vegetable oils in food technology, composition, properties and uses. Blackwell Publishing Ltd. pp. 43-44.

225. Watkins, B.A., Li, Y., Henning, B., Toborek, M. (2005): Dietary lipids and health. In: Shahidi, F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 577-606.

226. Watson, K. (1982): Unsaturated fatty acid but not ergosterol is essential for high ethanol production in Saccharomyces. Biotecnology Letters 4(6):397-402.

227. Wildenradt, H.L., Christensen, E.N., Stackler, B., Caputi, A., Slinkard, K., Scutt, K. (1975): Volatile constituens of grape Leaves. I. Vitis vinifera variety Chenin blanc. A.J. of Enology and Viticulture 24:148-153.

228. Wu, D., Cederbaum, A.I. (2003): Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Research & Health 27:277-284.

229. Wu, J., Lin, L., Chau, F.T. (2001): Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. Ultrason. Sonochem. 8:347-352.

230. Xu, Ch., Zhang, Y., Wanga, J., Lu, J. (2010): Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. Food Chem. 122:688-694.

231. Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001): Inhibiting oxidation, In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 22-70.

232. Yanishlieva, N.V., Raneva, V.G., Marinova, E.M. (2001): β–karoten in sunflower oil oxidation. Grasas y Aceites 52(1):10-16.

233. Youings, A., Rose, A.H. (1989): Sterol uptake by anaerobically grown Saccharomyces cerevisiae. Yest 5:459-465.

234. Zhang, X., Cambrai, A., Miesch, M., Roussi, S., Raul, F., Aoude-Werner, D., Marchioni, E. (2006): Separation of Δ5-and Δ7-phytosterols by adsorpition chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:1196-1202.

235. Zhang, Zh-Sh., Wang, L-J, Li D., Jiao, Sh-Sh., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008): Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. Sep. Purif. Technol. 62:192-198.

236. Zirojević, T., Jović, S., Čeleketić, D., Petrović, A. (2002): Slobodni radikali i njihov biološki značaj. Zbornik radova VI savetaovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Vrnjačka Banja, str. 45-54.

237. Žižović, I.T. (2009): Ekstrakcija etarskih ulja natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom; Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

238. Žižović, I., Stamenković, M., Orlović, A., Skala, D. (2007): Supercritical carbon dioxide exstraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the microscale. Journal of Supercritical fluids 39:338-346.

PRILOG 1. Skraćenice

Abr - Anisidinski broj

ANOVA - Analiza varijanse (*eng.* Analysis of Variance)

ARC - Antiradikalski kapacitet

C.S. - Cabernet Sauvignon

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (*eng.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DSC - Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (*eng.* Differential Scanning Calorimetry)

EC_{50} - Količina ulja koja smanjuje početnu koncentraciju DPPH· radikala za 50%

(*eng.* Half maximal effective concentration)

EMK - Esencijalne masne kiseline

GC - Gasna hromatografija (*eng.* Gas Chromatography)

Gm - Gamay

HC - Hladno ceđenje

HPLC - Visokoperformansna tečna hromatografija (*eng.* High Performance Liquid Chromatography)

IC_{50} - Količina ulja koja smanjuje intenzitet hemiluminiscencije na 50% vrednosti (*eng.* Half maximal inhbitory concentration)

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (*eng.* International organization for standardization)

IUPAC - Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (*eng.* International union of pure and applied chemistry)

Jbr - Jodni broj

Kbr - Kiselinski broj

LOD - Limit detekcije (*eng.* Limit of Detection)

LOQ - Limit kvanitifikacije (*eng.* Limit of quantification)

MS - Masena spektroskopija (*eng.* Mass spectrometry)

MK - Masne kiseline

Mr - Merlot

NKE - Natkritična ekstrakcija ugljenik ugljenik(IV)-oksidom

OOT - Početna temperature oksidacije (*eng.* Oxidation onset temperature)

OV - Oksidativna vrednost

Pbr - Peroksidni broj

P.N. - Pinot Noir

Pr - Prokupac

Sbr - Saponifikacioni broj

SEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija

SD - Standardna devijacija (*eng.* Standard Deviation)

SMK - Slobodne masne kiseline

TG - Termogravimetrija (*eng.* Thermogravimetry)

TPC - Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja (*eng.* Total phenolic compounds)

Tr-HC - Hladno ceđenje uz prethodni tretman na ribalici

UAE - Ekstrakcija n-heksanom uz tretman ultrazvukom (*eng*. Ultrasound-assisted extraction)

BIOGRAFIJA AUTORA

Marko V. Malićanin je rođen 10.10.1979. godine u Kraljevu, opština Kraljevo. Osnovnu školu završio je u Počekovini, opština Trstenik a gimnaziju u Trsteniku. Osnovne studije je završio 2004. godine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na odseku Prehrambena tehnologija biljnih proizvoda sa prosečnom ocenom za vreme studiranja 8,19. Licencu odgovornog projektanta prehrambeno tehnoloških procesa je stekao 2008. godine. U periodu 2005 - 2006. godine je radio u preduzeću A.D.″Vino Župa″ iz Aleksandrovca, na poslovima diplomiranog tehnologa u proizvodnji vina i jakih alkoholnih pića. Od 2006. godine prelazi u preduzeće Rubin AD iz Kruševca, gde je do 2007. godine radio na poslovima diplomiranog tehnologa u razvoju i u proizvodnji vina. Od 2007. godine prelazi na mesto Direktora sektora tehničko tehnološkog razvoja na kom je radio do 2013. godine, kada je postavljen na mesto Tehničkog direktora, na kom radi i danas. Od 2012. godine je član ocenjivačke komisije MPŠV u okviru Panela za senzorno ocenjivanje šire, vina i drugih proizvoda. Doktorske studije je upisao 2008. godine na studijskom programu Prehrambena tehnologija. Autor je jednog rada objavljenog u naučnom časopisu sa SCI liste. Oženjen je i otac je dvoje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Марко Малићанин**

Број уписа **08/46**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изоловање и физичко-хемијска карактеризација уља из семена црвених сорти грожђа

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио-ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 18.09.2014.

Потпис докторанда

М. Малићанин

Прилог 2.

Изјава о истоветности

штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Малићанин

Број уписа 08/46

Студијски програм Прехрамбена технологија биљних производа

Наслов рада Изоловање и физичко-хемијска карактеризација уља из семена црвених сорти грожђа

Ментор проф. др. Весна Ракић

Потписани Марко Малићанин

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране докторског рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 18.09.2014.

Потпис докторанда

М. Малићанин

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Изоловање и физичко-хемијска карактеризација уља из семена црвених сорти грожђа

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, 18.09.2014.

М. Манојловић