



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

Prehrambeno inženjerstvo



UTICAJ KVALITETA SEMENKI GROŽĐA NA BIOAKTIVNE KOMPONENTE I ODRŽIVOST HLADNO PRESOVANOG ULJA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Etelka Dimić

Kandidat:

Miloš M. Bjelica

Novi Sad, 2019.

Velika je stvar u životu obogatiti se u znanju toliko da se možeš nazvati doktorom nauka, stoga, veliku zahvalnost dugujem svima koji su mi pomogli da to postanem.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru, poštovanoj profesorici dr Etelki Dimić, koja mi je dala priliku da učim od nje, nesebično deleći svoje znanje. Onoj koja me je savetovala, usmeravala i inspirasala da nastavim sa školovanjem. Hvala joj na razumevanju, na strpljenju, na posvećenosti, na profesionalnosti, na svemu.

Zahvaljujem se gospodinu Damiru Jablanovskom na svesrdnoj pomoći u sakupljanju polaznog materijala, na ustupanju kapaciteta za preradu semenki i proizvodnju ulja, kao i za nesebičnu pomoć i deljenje znanja i stečenog iskustva u preradi.

Hvala profesoru dr Vladimiru Puškašu na korisnim savetima i smernicama u radu. Profesorici dr Biljani Rabrenović na pomoći u realizaciji ispitivanja sterola. Katarini Suturović, šefici studentske službe, na pomoći, savetima i smernicama u toku studiranja. Danijeli Relić-Miškov na pomoći pri realizaciji ispitivanja.

Hvala kolegama i prijateljima iz Vinarije Kovačević iz Iriga, Vinarije Šijački iz Banoštora i posebno kolegama sa Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad i vinarije u Sremskim Karlovcima.

Veliko i neizmerno hvala mojim roditeljima, Mladenu i Radi, što su me podstakli i omogućili mi da se školujem. Hvala im na žrtvi, na podršci, na razumevanju, na strpljenju, na ljubavi. Takođe, veliko hvala i mojoj sestri Dubravki.

Hvala mojoj porodici na ljubavi i podršci, supruzi Jeleni i mojim ćerkicama, Kalini, Lani i Eleonori.

Miloš Bjelica

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Miloš M. Bjelica
Mentor: MN	Prof. dr Etelka Dimić, redovni profesor
Naslov rada: NR	Uticaj kvaliteta semenki grozđa na bioaktivne komponente i održivost hladno presovanog ulja
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje:	AP Vojvodina

UGP	
Godina: GO	2019
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja / 169 stranica / 32 slike / 32 tabele / 153 reference
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ulje semenki grožđa, nusproizvodi industrije vina, upravljanje otpadom, masne kiseline, boja ulja, oksidativna stabilnost, tokoferoli, fenolna jedinjenja, steroli, antioksidativni kapacitet, Rancimat test, Schaal-oven, fluorescentni test.
UDK	665.32:[634.86+581.48 (043.4)]
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Podizanje novih zasada i povećanje kapaciteta prerade grožđa povećava količinu otpada sa kojim se suočava industrija proizvodnje vina i rakije. Najbolji i najodgovorniji način upravljanja otpadom je njegovo dalje iskorišćenje kao nusproizvoda.

U ovoj disertaciji sagledavana je mogućnost iskorišćenja nusproizvoda iz različitih faza proizvodnje u vinarijama i destilerijama za dobijanje semenki grožđa koje su korišćene za proizvodnju hladno presovanog ulja. Hipoteza se zasniva na činjenici da semenke grožđa raznih sorti iz različitih faza proizvodnje vina (bela, roze ili crvena vina), odnosno, rakije mogu imati sasvim različit hemijski sastav i kvalitet koji svakako može da se reflektuje na kvalitet, bioaktivne komponente i održivost hladno presovanog ulja.

Ovakav proizvod, obzirom da je dobijen hladnim presovanjem, može biti veoma atraktivan za potrošače, zbog svojih specifičnih senzorskih i nutritivnih karakteristika.

Za potrebe izrade disertacije prikupljeni su nusproizvodi i pripremljeni su uzorci iz vinarija i destilerija fruškogorskog vinogorja. Dobijene su semenke i proizvedeno hladno presovano ulje od semenki crnog grožđa sorte Merlot, belog grožđa sorte Italijanski rizling i belog grožđa sorte Sila, kao autohtone sorte vinove loze. Hladno presovana ulja su proizvedena od semenki grožđa koje nisu prošle nikakav tretman, odnosno dobijene su nakon presovanja, prilikom proizvodnje belih (Italijanski rizling i Sila) i roze (Merlot) vina, zatim od semenki koje su prošle proces fermentacije prilikom proizvodnje crvenih vina (Merlot) i od semenki koje su prošle proces fermentacije i destilacije prilikom proizvodnje rakije (Merlot, Italijanski rizling i Sila). Pored navedenih semenki i ulja, pripremljen je i prosečan proizvodni uzorak koji predstavlja uzorak dobijen od svih prikupljenih semenki. Kao uporedni uzorci korišćeno je nerafinisano i rafinisano ulje od semenki grožđa nabavljeno na tržištu.

Za realizaciju postavljenog cilja, rad na izvođenju ove disertacije obuhvatio je različite faze. U prvoj fazi prikupljene su semenke grožđa i ispitivane su njihove tehničko-tehnološke karakteristika i kvalitet. Zatim su od navedenih semenki proizvedena hladno presovana ulja.

U sledećim fazama, ovako dobijena uja, zajedno sa uzorkom nerafinisanog i rafinisanog ulja od semenki grožđa sa tržišta ispitivana su sa aspekta senzorskog i nutritivnog kvaliteta i praćene su razlike u održivosti ulja. Izvršena je senzorska analiza, određivane su frakcije pigmenata, karotenoidi i hlorofili, merena je transparentija, a parametri boje ulja određivani su i instrumentalno. Nutritivni kvalitet ulja sagledavan je na osnovu sadržaja i sastava bioaktivnih komponenti, pre svega tokoferola i tokotrienola, fenola i sterola. Budući da ova jedinjenja ispoljavaju značajne antioksidativne aktivnosti izvršeno je i ispitivanje antiradikalske aktivnosti uzoraka. Održivost ulja od semenki grožđa sagledana je na osnovu početnog kvaliteta i oksidativnog stanja, kao i rezultata ubrzanih testova, kao što je Rancimat test, Schaal-oven test i fluorescentni test.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se konstatovati da su svi dobijeni uzorci semenki imali dobru skladišnu vlagu, koja, obzirom na mali sadržaj ulja u semenkama, može da osigura čuvanje semenki u dužem periodu. Sadržaj ulja u semenkama, pored uticaja sorte vinove loze, zavisi i od uticaja procesa kome su podvrgnute semenke pre presovanja (fermentacija, destilacija).

Senzorska analiza ulja od semenki grožđa pokazala je značajne razlike u karakteristikama koje su posledica ne samo načina dobijanja ulja (hladno presovano ili

rafinisano), sorte vinove loze, već i postupka dobijanja, porekla i kvaliteta semenki grožđa. Uslovi kojima su semenke grožđa izložene u toku alkoholne fermentacije i posebno destilacije utiču na formiranje specifične arome hladno presovanog ulja. I pored toga što se pojavljuje izuzetno širok spektar različitih aroma, mirisa i ukusa u ulju i što postoje značajne razlike u aromi ulja u zavisnosti od sorte grožđa, moguće je prepoznati da li je hladno presovano ulje dobijeno od semenki grožđa bez fermentacije, posle fermentacije ili posle destilacije. Takođe, sa aspekta boje ulja može se kazati da rafinisano ulje od semenki grožđa ima svetlo žutu boju sa zelenkastom nijansom, dok su hladno presovana ulja intenzivnijih boja i kreću se od žuto-zelenkaste, preko zelenkasto žute i svetlo zelenkaste do tamno zelene. Veći udeo zelene boje imaju hladno presovana ulja od semenki grožđa dobijenih posle destilacije.

U radu je pokazano da sadržaj pigmenata (karotenoida i hlorofila) u velikoj meri zavisi od porekla semenki. Postupak fermentacije doprinosi povećanju sadržaja pigmenata, dok postupak destilacije, zbog visokih temperatura ima negativan efekat.

Transparencija uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa proizvedenih za potrebe disertacije kretala se od 32,8% do 53,8%.

Sadržaj nezasićenih masnih kiselina u svim uzorcima ulja od semenki grožđa veći je od 90%, pri čemu dominantnu masnu kiselinu čini linolna, omega-6, masna kiselina.

Sadržaj tokotrienola je veći od sadržaja tokoferola u

uljima od semenki grožđa, a dominantni tokoferol je alfa-tokoferol. Njegov sadržaj je veći u uzorcima ulja dobijenim iz semenki nakon fermentacije i destilacije.

Sadržaj fenolnih jedinjenja, u zavisnosti od sorte, u proseku je nešto viši u hladno presovanim uljima dobijenim od crvene sorte grožđa, ali uočava se i značajan porast (akumulacija) fenola u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki grožđa nakon procesa fermentacije i destilacije. Najveći pojedinačni sadržaju u ulju od semenki grožđa ima ursolna kiselina, a pored nje značajniji sadržaj, mada mnogo manji, pokazuju rezveratrol, kemferol i vanilinska kiselina.

Najzastupljeniji steroli ulja semenki grožđa su β -sitosterol sa udelom od 62,59-69,74%, stigmasterol sa udelom od 12,13-15,00% i kampesterol sa udelom od 6,59-11,94% u ukupnim sterolima. Na sadržaj fitosterola u uljima od semenki grožđa nemaju uticaja procesi fermentacije i destilacije kojima su podvrgnute semenke pre preosvanja.

U radu je dokazan negativan uticaj procesa fermentacije i destilacije kojima su povrgnute semenke grožđa na antiradikalni potencijal dobijenih ulja. Antiradikalni potencijal ulja od semenki grožđa zavisi i od sorte vinove loze, kao i od načina dobijanja ulja (hladno presovano ili rafinisano).

Procesi fermentacije i destilacije utiču i na osnovni hemijski kvalitet dobijenih hladno presovanih ulja na način da dovode do povećanja kiselinskog i peroksidnog broja.

Hladno presovana ulja od semenki grožđa pokazuju dobru oksidativnu stabilnost. Rancimat test je pokazao

	<p>razlike u indukcionom periodu hladno presovanih ulja od semenki grožđa kao posledicu razlike u sorti, kao i u načinu dobijanja semenki. Proces fermentacije utiče na povećanje, a proces destilacije na smanjenje indukcionog perioda.</p> <p>Na osnovu svih dobijenih rezultata istraživanja može se konstatovati da su hladno presovana ulja od semenki grožđa pokazala različit nutritivni kvalitet i oksidativnu stabilnost, zbog specifičnih razlika koje su posledica razlika u sorti i poreklu semenki, tj. zbog specifičnog efekta fermentacije i destilacije na semenke od kojih je ulje proizvedeno, čime je i potvrđena hipoteza.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	22.06.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>Predsednik: Prof. dr Vladimir Puškaš, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: Prof. dr Etelka Dimić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: Prof. dr Biljana Rabrenović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet</p>

University of Novi Sad
Faculty of Technology Novi Sad
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. thesis
Author: AU	Miloš M. Bjelica
Mentor: MN	Dr Etelka Dimić, Full professor
Title: TI	Impact of grape seed quality on bioactive components and stability of cold pressed oil
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication:	Vojvodina Province

LP	
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters / 169 pages / 32 figures / 32 tables / 153 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food Engineering
Subject, Key words SKW	Grape seed oil, wine industry by-products, waste management, fatty acids, oil colour, oxidative stability, tocopherols, phenolic compounds, sterols, antioxidant capacity, Rancimat, test, Schaal-oven, fluorescence test.
UC	665.32:[634.86+581.48 (043.4)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	Raising new plantations and increasing the grape processing capacity increases the amount of waste faced by the wine and brandy industry. The best and most responsible way of waste management is its further exploitation as by-products. In this dissertation, the possibility of using by-products from

different stages of production in wineries and distilleries for obtaining grape seeds, which were used for the production of cold pressed oil, was examined. The hypothesis is based on the fact that grape seeds of various varieties from different stages of wine production (white, rose or red wine), that is, brandy can have a completely different chemical composition and quality that can certainly be reflected on the quality, bioactive components and stability of cold pressed oil.

Such a product, as it is obtained by cold pressing, can be very attractive to consumers, due to its specific sensory and nutritional characteristics.

For the needs of the dissertation, the by-products were collected and samples were prepared from the wineries and distilleries of the Fruška Gora vineyard. Seeds were obtained and cold pressed oil produced from Merlot grape seed, as representatives of red grape varieties, Italian Riesling, as representatives of white grape varieties and Sila, as new white grape varieties. Cold pressed oils were produced from grape seeds that did not undergo any treatment, that is, they were obtained after pressing, during the production of white (Italian Riesling and Sila) and rose (Merlot) wines, then from the seeds that were fermented during the production of red wines (Merlot) and seeds that have undergone fermentation and distillation process during the production of brandy (Merlot, Italian Riesling and Sila). In addition to the mentioned seeds and oils, an average production sample was prepared, which is a sample obtained from all collected seeds. Unrefined and refined grape seed oil purchased on the market was used as comparative samples.

For realization of the set goal, the work on the performance of this dissertation encompassed different phases. In the first phase, grape seed were collected and their technical and technological characteristics and quality were examined. Then cold-pressed oils were produced from these seeds.

In the following phases, the resulting ear, together with a sample of unrefined and refined grape seed oil from the market, were examined from the aspect of sensory and nutritional quality and differences in oil stability were observed. Sensory analysis was performed, pigmentate fractions, carotenoids and chlorophylls were determined, transparency was measured, and oil color parameters were also determined instrumentally. The nutritive oil quality was examined based on the content and composition of bioactive components, primarily tocopherols and tocotrienols, phenols and sterols. Since these compounds exhibit significant antioxidant activities, the antiradical activity of the samples was also tested. The stability of grape seed oils was examined based on the initial quality and the oxidative state, as well as the results of accelerated tests, such as Rancimat test, Schaal-oven and fluorescence test.

On the basis of the obtained results, it can be concluded that all the obtained seed samples had good storage moisture, which, given the small content of oil in the seeds, can ensure the storage of seeds for a longer period. The content of oil in the seed, in addition to the influence of the grape variety, depends on the influence of the process to which the seeds are subjected to pressing (fermentation, distillation).

Sensory analysis grape seed oils showed significant differences in characteristics that are due not only to the method of obtaining oil (cold pressed or refined), grape varieties, but also the method of obtaining, the origin and quality of grape seed. The conditions for grape seeds exposed during fermentation and especially distillation affect the formation of a specific cold pressed oil. Although an extremely wide range of different flavors, odors and flavors in oil appear, and there are significant differences in the aroma of the oil, depending on the grape variety, it is possible to recognize whether the cold-pressed oil is derived from the grape seed without fermentation, after fermentation or after distillation. Also, from the aspect of oil color it can be said that refined grape seed oil has a light yellow color with a greenish shade, while cold pressed grape seed oils have more intense colors range from yellowish-greenish, over greenish yellow and light greenish to dark green. A higher proportion of green color has cold pressed grape seed oils obtained after distillation.

The thesis has shown that the content of pigments (carotenoids and chlorophyll) depends to a great extent on the origin of the seed. The fermentation process contributes to increasing the content of pigments, while the distillation process has a negative effect due to high temperatures.

Transparency of cold pressed grape seed oils produced for the dissertation ranged from 32.8% to 53.8%.

The content of unsaturated fatty acids in all samples of grape seed oil is greater than 90%, with the dominant fatty acid being linoleic, omega-6, fatty acid.

The content of tocotrienols is higher than the content of tocopherols in grape seed oils, and the dominant tocopherol is alpha-tocopherol. Its content is higher in oil samples obtained from the seed after fermentation and distillation.

The content of phenol compounds, depending on the variety, is somewhat higher in cold pressed oils obtained from red grape varieties, but there is also a significant increase in accumulation of phenol in cold pressed oils obtained from the grape seed after the fermentation and distillation process. The largest individual oil content of grape seeds has ursolic acid, and besides it, significant content, although much smaller, shows rezveratrol, kemferol and vanillinic acid.

The most prevalent sterols of grape seed oils are β -sitosterol with a share of 62.59-69.74%, stigmasterol with a share of 12.13-15.00% and campesterol with a share of 6.59-11.94% in total sterols. Fermentation and distillation processes, to which the seeds have been exposed, have no effect on the content of phytosterols in grape seed oils.

The paper has shown the negative influence of the fermentation and distillation process, to which the seeds have been exposed, onto the antiradical potential of the obtained oils. The antiradical potential of grape seed oils depends on grape varieties, as well as on the way oil is obtained (cold pressed or refined).

Processes of fermentation and distillation also affect the basic chemical quality of obtained cold pressed oils in such a way as to increase the acid and peroxide values.

Cold pressed grape seed oils show good oxidative

	<p>stability. The Rancimat test showed differences in the induction period of cold pressed grape seed oils as a result of the variation in the variety, as well as in the method of obtaining the seed. The fermentation process affects the increase, and the process of distillation decreases the induction period.</p> <p>Based on all the obtained results, it can be concluded that cold pressed grape seed oils showed different nutritional quality and oxidative stability due to specific differences resulting from differences in variety and seed origin, i.e. due to the specific effect of fermentation and distillation processes on the seeds from which the oil was produced, thus confirming the hypothesis.</p>
Accepted on Senate on: AS	22.06.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr Vladimir Puškaš, Associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Dr Etelka Dimić, Full professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad.</p> <p>Member: Dr Biljana Rabrenović, Associate professor, University of Belgrade, Faculty of Agriculture.</p>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1 VINOGRADARSTVO I VINARSTVO U REPUBLICI SRBIJI	5
2.2 PROIZVODNJA GROŽĐA I VINA I UPRAVLJANJE OTPADOM U VINARIJAMA.....	10
2.3 PRERADA OTPADA IZ VINARIJA	15
2.4 PROCES DOBIJANJA SEMENKI GROŽĐA	16
2.5 HEMIJSKI SASTAV SEMENKI GROŽĐA	26
2.6 MOGUĆNOSTI IZDVAJANJA ULJA SEMENKI GROŽĐA	27
2.7 TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE HLADNO PRESOVANOG ULJA OD SEMENKI GROŽĐA.....	31
2.8 SENZORSKA SVOJSTVA I BOJA HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA.....	35
2.8.1 Senzorska svojstva ulja	35
2.8.2 Lipohromi – pigmenti u ulju	38
2.9 MASNOKISELINSKI PROFIL I BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA.....	39
2.9.1 Sastav masnih kiselina	41
2.9.2 Tokoferoli i tokotrienoli	45
2.9.3 Steroli.....	47
2.9.4 Fenolna jedinjenja.....	49
2.10 NUTRITIVNA SVOJSTVA ULJA SEMENKI GROŽĐA	51
2.11 ODRŽIVOST ULJA SEMENKI GROŽĐA	52
3. ZADATAK RADA.....	55
3.1 Ispitivanje kvaliteta semenki grožđa	57
3.2 Senzorska analiza i karakterizacija boje ulja	57
3.3 Ispitivanje nutritivne vrednosti ulja	57
3.4 Ispitivanje održivosti ulja.....	58
4. MATERIJAL I METODE RADA	59
4.1 MATERIJAL.....	60

4.1.1	Sakupljanje otpadnog materijala u vinarijama.....	60
4.1.2	Proizvodnja hladno presovanog ulja	61
4.2	METODE ISPITIVANJA.....	64
4.2.1	ISPITIVANJE TEHNIČKO-TEHNOLOŠKIH KARAKTERISTIKA I KVALITETA SEMENKI GROŽĐA	64
4.2.2	ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA ULJA	66
4.2.3	NUTRITIVNA VREDNOST ULJA.....	69
4.2.4	ODRŽIVOST ULJA	78
4.3	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	81
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	82
5.1	ISPITIVANJE SEMENKI GROŽĐA.....	83
5.1.1	TEHNIČKO-TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE SEMENKI GROŽĐA .	83
5.1.2	HEMIJSKI KVALITET SEMENKI GROŽĐA	84
5.2	ISPITIVANJE ULJA OD SEMENKI GROŽĐA	88
5.2.1	ISPITIVANJE BOJE I SENZORSKIH SVOJSTAVA ULJA	88
5.2.2	MASNOKISELINSKI PROFIL I BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA.....	99
5.3	ODRŽIVOST ULJA OD SEMENKI GROŽĐA	120
5.3.1	KVALITET I OKSIDATIVNI STATUS ULJA OD SEMENKI GROŽĐA .	120
5.3.2	INDUKCIONI PERIOD ULJA OD SEMENKI GROŽĐA.....	122
5.3.3	SCHAAL-OVEN TEST	125
5.3.4	FLUORESCENTNI TEST (FL-TEST).....	135
6.	ZAKLJUČAK	145
	LITERATURA	154

1. UVOD

Mnogi proizvođači i prerađivači hrane imaju problem sa velikom količinom biomase koja predstavlja otpad u njihovoj proizvodnji. Ovaj otpad se dugo vremena samo minimalno tretirao tek toliko da se umanje negativni ekološki efekti izazvani njegovim odlaganjem. Danas otpad od proizvodnje hrane i pića predstavlja izvor nove vrednosti. Postoji veliki potencijal za korišćenje ove biomase, odnosno ostataka iz proizvodnje hrane i pića. Otpadni material se može iskoristiti kao hrana za životinje (uz doradu, mešanje ili drugo..), zatim za proizvodnju humusa ili organskog đubriva, za dobijanje toplotne energije (briketiranje, peletiranje), za dobijanje alkohola (fermentacijom i/ili destilacijom), biogoriva (anaerobnom fermentacijom), za proizvodnju papira i ambalaže, za izdvajanje aktivnih materija za kozmetičke svrhe, za izradu ukrasnih ili drugih građevinskih predmeta (blokova, tapiserija, slamnatih šešira i dr.), kao i za razne druge svrhe.

Procena je da svetska proizvodnja grožđa iznosi više od 67 miliona tona, pri čemu su Kina, SAD, Italija, Francuska i Španija, najveći svetski proizvođači. Više od 20% proizvodnje grožđa obično postaje otpad tokom proizvodnje vina. Iz tog razloga vinarije imaju ekonomske teškoće sa upravljanjem otpadom.

U proizvodnji i preradi grožđa i vina, na više mesta se generiše velika količina biomase, koja se uglavnom ne koristi ili se koristi u malom obimu. Ovi ostaci su visokog organskog opterećenja i nalaze se u tečnom ili čvrstom stanju. Činjenica da se uklanjaju iz proizvodnog procesa kao nepoželjni definiše ih kao otpad. Ipak, to što je takva biomasa okarakterisana kao otpad ne ograničava njeno ponovno korišćenje u prehrambenom lancu. Iz tog razloga, izraz "nusproizvodi" se sve više koristi da bi se okarakterisao otpad od hrane i pića koji može dalje da se koristi kao sirovina za dobijanje novih proizvoda sa tržišnom vrednošću.

Usled podizanja novih zasada i povećanja proizvodnje i prerade grožđa povećava se i količina nusproizvoda koji zaostaju nakon proizvodnje. Ovi nusproizvodi mogu imati višestruku upotrebu, ali obzirom da novi trendovi u ishrani konstantno povećavaju tražnju za "egzotičnim, novim, manje poznatim, nedovoljno istraženim" gurmanskim uljima, pre svega hladno presovanim, sa izraženim senzorskim karakteristikama, proizvodnja hladno presovanih ulja od semenki grožđa ima veliki potencijal. Ulje od semenki grožđa dobija sve veću popularnost ne samo kao obično

kulinarsko ulje već i kao izvor ulja specijalnog lipidnog profila. Do sada se rafinisano ulje od semenki grožđa proizvodilo samo u Italiji, Francuskoj i Španiji, ali u poslednje vreme značajno je povećana potražnja za ovim uljem i u drugim delovima Evrope. Međutim, treba naglasiti, da je potražnja za nerafinisanim, hladno presovanim uljima u poslednje vreme, takođe, u ekspanziji, kako sa kulinarskog, zdravstvenog, tako i sa kozmetičkog aspekta.

U literaturi nema dovoljno podataka o načinu prerade nusproizvoda iz vinarije i destilerije u cilju izdvajanja semenki za proizvodnju hladno presovanih ulja. Takođe, ne postoje nikakvi podaci o kvalitetu semenki iz različitih nusproizvoda vinarije, kao ni podaci o hladno presovanim uljima dobijenim od takvih semenki. Naime, poznato je da se semenke mogu izdvojiti iz različitih nusproizvoda industrije vina. U toku redovne proizvodnje u vinarijama moguće je izdvojiti semenke iz materijala koji zaostaje nakon presovanja grožđa prilikom proizvodnje belih i roze vina (semenke koje nisu izložene fermentativnim procesima), zatim nakon proizvodnje crvenih vina (semenke koje su bile u procesu fermentacije) i nakon proizvodnje rakije (semenke koje su prošle proces fermentacije i destilacije).

U skladu sa navedenim podacima i činjeničnim stanjem u vinarijama i destilerijama, cilj ove disertacije je upravo bio da sagleda uticaj kvaliteta semenki grožđa, koje nastaju u različitim fazama, kao otpadni materijal u vinarijama i destilerijama, na bioaktivne komponente i održivost hladno presovanog ulja proizvedenih od takvog otpada (semenki kao nusproizvoda). Hipoteza se zasniva na činjenici da semenke grožđa raznih sorti iz različitih faza proizvodnje vina (crvenih, roze ili belih vina), odnosno rakije, mogu imati sasvim različit hemijski sastav i kvalitet koji svakako može da se reflektuje i na kvalitet hladno presovanog ulja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 VINOGRADARSTVO I VINARSTVO U REPUBLICI SRBIJI

Voćarstvo i vinogradarstvo spadaju u privredne grane koje datiraju iz davne prošlosti. Voće je poznato još iz neolita, ali se ono nije uzgajalo, nego koristilo. Sa razvojem ljudskog društva voćarstvo je među ostalim granama poljoprivrede zauzimalo sporedno mesto a voće se smatralo kao luksuz. Trebalo je da prođe mnogo vremena da bi voće postalo sastavni deo ljudske ishrane, a voćarstvo značajna privredna grana (Milić i Lukač Bulatović, 2017).

Fosilni ostaci semenki vinove loze i posude za vino na arheološkim nalazištima na obali Dunava kod Grocke, u Vinči i drugim mestima ukazuju da je vinova loza na prostorima današnje Srbije bila prisutna pre više hiljada godina. Za širenje kulture gajenja vinove loze zaslužni su stari narodi, Tračani i Grci, ali prvi pisani podaci o vinovoj lozi, sortama i načinu gajenja potiču iz rimskog doba (Ivanišević i sar., 2015).

Vinova loza, grožđe i vino, na ovim prostorima prihvaćeni su kao kulturno nasleđe Vizantije, koja vodi poreklo iz antičke epohe. Ipak, na značaju vino na ovim prostorima dobija sa pojavom hrišćanstva i korišćenjem vina u obredne svrhe. Vinogradarstvo i vinarstvo u srednjovekovnoj Srbiji doživljavaju pravi uspon jačanjem crkve i razvojem monaškog života. U to vreme, nosioci razvoja poljoprivrede, pa i vinogradarstva i vinarstva, bili su manastiri, koji su uzdigli vino na veoma visok nivo. Širenje hrišćanstva u ranom srednjem veku je posebno pozitivno uticalo na razvoj vinogradarstva i vinarstva na našim prostorima, a sa ekonomskim osnaživanjem manastira i feudalnih poseda, širila se i kultura vina (Ivanišević i sar., 2015; Jakšić i sar., 2015). Među prvim manastirima u srednjovekovnoj Srbiji koji su širili znanje o gajenju vinove loze pominju se zadužbine velikog župana Stefana Nemanje (1166–1196) u topličkom kraju – manastir Presvete Bogorodice i manastir Sv. Nikole iz XII veka (Jakšić i sar., 2015).

U drugoj polovini XIV veka nastaje sveopšta stagnacija srpske privrede, pa i vinogradarstva i vinarstva. Sve vreme uspona i stagnacije srpske srednjovekovne privrede, manastiri neprestano proizvode vino za hrišćanske obrede, šire znanja o gajenju vinove loze i proizvodnji grožđa i vina među lokalnim stanovništvom, i deluju kao vrsta škole i rasadnika (Jakšić i sar., 2015).

Prema istorijskim dokumentima, u razdoblju od kraja XII do kraja XV veka, u Srbiji je bilo više od 400 aktivnih manastira koji su se bavili poljoprivredom. U tom periodu procvata srpskog vinogradarstva i vinarstva gotovo da nije bilo manastira koji nije imao manji ili veći metoh (ekonomiju) sa rukovodiocem proizvodnje (ikonom). Srednjovekovni vinogradarski rejoni takođe su bili raspoređeni u zonama oko manastira ili vladarskih prestonica, u predelima gde postoje povoljni uslovi za gajenje vinove loze (Jakšić i sar., 2015).

Veliki razvoj ove grane početkom XV veka opisuje Konstantin Filozof koji svedoči da su u Srbiji „zasađeni mnogi vinogradi, nigde tako bez velikih trudova, kao u ovoj zemlji“, a o mnogobrojnim vinogradima i jako kvalitetnom vinu koje se proizvodilo u srednjovekovnoj Srbiji piše i putopisac iz Burgundskog vojvodstva 1457. godine Bertrandon de la Brokijer u svom delu „Putovanje preko mora“, načinjenom nakon prolaska kroz Srbiju (Ivanišević i sar., 2015).

Vino nije predstavljalo samo piće koje je bilo sastavni deo obroka, već se u našoj srednjovekovnoj medicini smatralo i lekom – postojali su brojni recepti za lečenje raznih bolesti upravo ovim pićem (najpoznatije je lečenje aromatizovanim vinom „Bermet“ sa Fruške gore) (Jakšić i sar., 2015).

O načinu gajenja i sortimentu vinove loze u Srbiji, sve do početka XIX veka ne postoji značajniji broj pisanih podataka. Prvi značajniji pisani dokument o vinogradarstvu i vinu Srbije je knjiga Zaharija Orfelina „Iskusni podrumar“ koja je objavljena 1783. godine. Tek nekih 30 godina kasnije, 1816. godine, arhimandrit manastira Rakovac, Prokopije Bolić, objavio je u Budimu knjigu „Soveršen vinodelac“ (Jakšić i sar., 2015).

U XX veku veliki preokret u načinu gajenja vinove loze rezultat je revolucije, koja nije bila ni na koji način u prirodnoj vezi sa vinogradarstvom – novo društveno uređenje uticalo je u celoj srednjoj i istočnoj Evropi na nov, zakonom uređen, način gajenja vinove loze. Ovaj način gajenja, koji se uvodi i u Srbiji nakon Drugog svetskog rata, podrazumeva gajenje loze samo na velikim društvenim imanjima (Jakšić i sar., 2015). Osnivaju se velika državna imanja, a izgrađuju se i velike vinarije („Navip“, „Rubin“, „Vinožupa“ i dr.). Međutim, u tom periodu se zapostavlja

proizvodnja vina u individualnom sektoru i dolazi do prekida tradicije tržišne proizvodnje vina u okviru porodičnih gazdinstava. Od 1970. godine zakonom je zabranjeno da vinogradari sami proizvode i prodaju vino, već su proizvedeno grožđe predavali velikim vinarijama, pa dolazi do delimičnog krčenja vinograda i smanjivanja površina pod vinovom lozom (Ivanišević i sar., 2015).

Međutim, u poslednjih desetak godina u Srbiji dolazi do kvalitativnog napretka u vinogradarstvu, naročito na privatnom posedu. Zahvaljujući podsticajnim merama države, razvoju savetodavne službe i aktivnostima naučno-obrazovnih ustanova, tehnologija vinogradarsko-vinarske proizvodnje se osavremenjuje. Postepeno se uvode nove tehnologije u vinogradarsku praksu i koristi se kvalitetniji, klonski selekcionisan i sertifikovan sadni materijal, a izboru sorti, podizanju i negovanju vinograda se posvećuje veća pažnja. Pažljivo i stručno se izvode sve agro- i ampelo-tehničke mere. Postepeno se uvodi integralni koncept proizvodnje, a raste interesovanje vinogradara i za uvođenje organske proizvodnje grožđa i vina. Unapređuje se takođe i tehnologija prerade grožđa i proizvodnje vina. Pažljivo se prate svetski trendovi u proizvodnji vina, nabavlja se kvalitetna vinarska oprema i uvode savremeni tehnološki postupci (Ivanišević i sar., 2015). Izbor sorti, podizanje i negovanje vinograda ponovo su prioritet i briga malih, posvećenih vinara (Jakšić i sar., 2015).

Voćarstvo i vinogradarstvo su jedna od najproduktivnijih poljoprivrednih grana. Zahvaljujući velikom broju voćnih vrsta omogućeno je korišćenje brojnih lokacija i područja sa veoma različitim zemljišnim i klimatskim uslovima za voćarsku i vinogradarsku proizvodnju, pa i zemljišta slabijih fizičkih, hemijskih i drugih osobina, kao i zemljišta sa većim nagibom (Milić i Lukač Bulatović, 2017).

U našoj zemlji postoje dobri uslovi za vinogradarsku proizvodnju. Srbija zauzima položaj između 41°50' i 46°10' severne geografske širine. Vinogradi su uglavnom raspoređeni na nadmorskim visinama od 80 do 500 m. Temperaturni uslovi za vreme vegetacije nisu ograničavajući faktor uspešnog gajenja vinove loze. Sume aktivnih temperatura iznose od 3186 do 3754°C. Prosečan broj dana sa temperaturama iznad 10°C u vinogorjima Srbije iznosi od 185 do 213. Godišnja suma padavina se u proseku kreće od 548 do 786 mm, a u toku vegetacije od 282 do 480 mm. Većina

vinogorja po klimatskim elementima svrstava se u C2 vinogradarsku zonu sa retkim izuzecima koji inkliniraju ka C1 zoni. Veći deo vinogradarskih površina nalazi se na reljefno izraženim terenima na kojima se najuspešnije gaji vinova loza. Zemljišta na kojima se gaji vinova loza su takođe veoma različita po fizičkim, hemijskim i biološkim osobinama. Ove raznolikosti su od bitnog uticaja na ispoljavanje kvalitativnih osobina grožđa i proizvedenog vina. U poslednje vreme izražena tendencija formiranja vinograda i vinarija u područjima sa manjom tradicijom gajenja vinove loze, značajno je doprinela popularizaciji vinogradarstva (Žunić i sar., 2012).

Kao radno intenzivna kultura, vinova loza omogućava angažovanje većeg broja ljudi, kao i ostvarivanje znatnijih prihoda po jedinici površine u odnosu na većinu poljoprivrednih kultura koje se gaje u Srbiji. Upravo zbog toga, nesporan je značaj trenutnog intenzivnog razvoja vinogradarstva i njegov doprinos ekonomskom napretku naše zemlje, a važnost vinogradarstva je još veća ako se ima u vidu da ono doprinosi afirmaciji ruralnih područja i promociji oblasti u kojima se proizvodi vino (Ivanišević i sar., 2015). Od ove i drugih pratećih grana (vinarstvo, proizvodnja žestokih alkoholnih pića, prerađivačka industrija i dr.) država ostvaruje značajan prihod preko poreza i izvoza (Žunić i sar., 2012). Veliki broj zaposlenih u proizvodnji, preradi i prometu voća i grožđa i njihovih prerađevina, kao i delatnostima koje se naslanjaju na ove grane poljoprivrede (ugostiteljstvo, turizam, industrija ambalaže, hemijska industrija i drugo) ostvaruju svoju egzistenciju iz ovih proizvodnji (Milić i Lukač Bulatović, 2017).

Poznavanje stvarnog stanja kada su u pitanju površine pod vinovom lozom, sortiment, starost zasada, klimatski i zemljišni uslovi, potencijali vinogradarskih geografskih proizvodnih područja, pojedini statistički podaci i struktura vinograda i gazdinstava, kao i analiza ostalih važnih aspekata vinogradarstva je neophodan preduslov za dalje unapređivanje i planski razvoj ovog sektora (Ivanišević i sar., 2015).

Popisom poljoprivrede, koji je Republički zavod za statistiku sproveo tokom 2012. godine u okviru projekta IPA 2011 (Instruments for Pre-accessions Assistance, 2011), nakon više od 50 godina prikupljeni su podaci o stvarnom stanju poljoprivrede, a samim tim i vinogradarstva. U gotovo istom periodu, Ministarstvo poljoprivrede,

šumarstva i vodoprivrede, u okviru Tvinig projekta (Capacity Building and Technical Support for the Renewal of Viticulture Zoning and for the System of Designation for Wine with Geographical Indications), nakon više od 40 godina, u cilju usaglašavanja domaćeg zakonodavstva sa EU regulativom, organizovalo je izradu nove rejonizacije vinogradarskih geografskih proizvodnih područja Srbije (Ivanišević i sar., 2015).

Time se omogućava jasno sagledavanje stanja i potencijala vinogradarstva u Republici Srbiji, a pruža se i osnova za pojedinačna programiranja, izbor sortimenta i lokacija za podizanje vinograda. Prirodni potencijali, klimatski uslovi, tradicija i drugo omogućavaju postepeno oživljavanje i rehabilitaciju vinogradarstva, a u narednim godinama očekuje se da se dostigne bar 50 hiljada hektara. Vredi napomenuti da je Srbija u drugoj polovini XX veka imala preko 100 hiljada hektara pod vinogradima (Ivanišević i sar., 2015).

Struktura vinogradarskog i vinarskog sektora u Srbiji se značajno izmenila početkom 21. veka. Vinogradi u punoj rodnosti dostižu udeo od 40% do 50%, vinograda u rastućoj rodnosti ima oko 10%, a vinograda u opadajućoj rodnosti oko 40% ukupnih površina. Statistički podaci o površinama pod vinovom lozom u Srbiji govore da pod vinogradima ima oko 58.000 ha, od čega u centralnom području oko 48.000 ha, u Vojvodini oko 10.000 ha, što čini 1% poljoprivrednih površina. Aktivne površine pod vinogradima su oko 30.000 ha (Žunić i sar., 2012). Popis poljoprivrede iz 2012. god. otklonio je višegodišnje sumnje u stvarne površine pod vinogradima i potvrdio da su one značajno manje te da iznose svega 22.150 hektara (Ivanišević i sar., 2015).

U regionu Centralna Srbija vinova loza se gaji na 17.118 ha, a u regionu Vojvodina na 5.032 ha. Od površina pod vinovom lozom koje su obuhvaćene Popisom 2012, 77,3% se nalazi u regionu Centralna Srbija, a 22,7% u regionu Vojvodina. Najviše vinograda se nalazi u okviru rejona Tri Morave, a na nivou opština najviše vinograda se nalazi u opštini Trstenik (Ivanišević i sar., 2015).

Vinske sorte se gaje na 17.483 ha, što čini 75,7% ukupnih površina pod vinogradima. Sorte čije je grožđe namenjeno potrošnji u svežem stanju gaje se na ukupno 4667 ha, odnosno na 24,3% ukupnih površina pod vinogradima. U Centralnoj

Srbiji stone sorte se gaje na čak 30,1% površina pod vinogradima, dok se u Vojvodini stone sorte gaje na 16% površina pod vinogradima (Ivanišević i sar., 2015).

U Republici Srbiji, proizvodnjom grožđa se bavi 80.341 poljoprivredno gazdinstvo, što je 12,7% od ukupnog broja gazdinstava. Poljoprivredno gazdinstvo koje se bavi proizvodnjom grožđa u proseku ima 0,28 ha pod vinovom lozom. Prosečna površina vinograda koju obrađuje jedno gazdinstvo u Centralnoj Srbiji iznosi 0,23 ha, dok je u Vojvodini ona znatno veća i iznosi 0,85 ha (Ivanišević i sar., 2015).

U okviru vinorodne Srbije, prema novoj rejonizaciji, nalaze se tri vinogradarska regiona: Region Centralna Srbija, region Vojvodina i Region Kosovo i Metohija. U okviru tri regiona nalaze se 22 rejon sa 77 vinogorja i više vinogradarskih oaza (Ivanišević i sar., 2015).

2.2 PROIZVODNJA GROŽĐA I VINA I UPRAVLJANJE OTPADOM U VINARIJAMA

Istorijski gledano, vinova loza se na globalnom nivou oduvek gajila na velikim površinama različitih tipova zemljišta. Procenjuje se da se vinova loza ukupno gaji na oko 75.000 km² (7.500.000 ha), od čega je najveći deo površine pod vinskim sortama (Johnson i sar., 2012).

Sorta je u vinogradarstvu, kao i u drugim granama biljne proizvodnje, glavni činilac prinosa i kvaliteta grožđa. Postojeći fond sorti *Vitis vinifera* L. i fond loznih podloga i pored izuzetne brojnosti još ne zadovoljava kako postojeću ekonomičnost gajenja vinove loze, tako i savremene potrebe potrošnje grožđa, vina i prerađevina od grožđa i vina. Zbog toga se već duži niz godina, u mnogim zemljama sveta, stvaranju novih sorti vinove loze posvećuje velika pažnja (Nikolić, 2006). Procenjuje se da danas postoji skoro 9.500 vinskih sorti, blizu 4.500 stonih sorti, više od 1.200 sorti kombinovanih svojstava (stone i vinske), oko 110 sorti za sušenje i blizu 1.400 loznih podloga (Töpfer i sar., 2011). U Srbiji postoje veoma povoljni agroekološki uslovi za

gajenje velikog broja sorti vinove loze, od ranih do veoma poznih stonih i vinskih sorti (Nikolić i sar., 2007).

Ukupna proizvodnja grožđa u svetu je u 2012. godini bila 67 miliona tona, 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 (FAOSTAT, 2014). Evropski kontinent je najveći proizvođač i izvoznik vina u svetu (Dougherty, 2012).

Proizvodnja grožđa je najzastupljenija u umereno toplim klimatskim zonama kao što su Italija (9,256.814 t/god.), Francuska (6,787.000 t/god.), SAD (6,414.610 t/god.), Španija (5,880.800 t/god.) i Kina (5,698.000 t/god.) (FAOSTAT, 2007). Prema Yang i sar. (2009) oko 80% grožđa se koristi za proizvodnju vina, dok se oko 13% konzumira kao stono grožđe.

Bobice grožđa *Vitis vinifera* L. ssp *sativa* se od davnina koriste u različite svrhe. Grožđe se danas sve više konzumira, kako sveže tako i sušeno, koristi se u vinarstvu ili u proizvodnji sokova, dok se ekstrakti iz njihove kožice i semenki koriste u farmaceutske svrhe zbog velikog sadržaja fenola i resveratrola (Bail i sar., 2008).

Proizvodnja grožđa odvija se prvenstveno u svrhu dobijanja vina. Procenjuje se da se oko 80% proizvedenog grožđa prerađuje u vinarijama (Maier i sar., 2009). U tom procesu generiše se velika količina materijala, koji, ukoliko se naknadno ne valorizuje, postaje otpad (Bjelica i Vujasinović, 2017). Više od 20% proizvodnje grožđa obično postaje otpad tokom proizvodnje vina (Fernández i sar., 2010). Od sporednih proizvoda koji nastaju preradom grožđa, odnosno iz komine i vinskog taloga mogu se dobiti ulje, alkohol, boja, tanini, vinska kiselina, kompost i dr. Nusproizvod iz proizvodnje vina se uglavnom koristi za pripremu alkohola, ali s obzirom na viškove Evropske Unije, alkohol se efikasnije dobija od vina. Alternativno, ekstrakcija ulja iz ostatka već se koristi na nekim zemljama i obično se vrši pomoću organskih rastvarača (Pardo i sar., 2009). S obzirom na to, semenke grožđa predstavljaju značajan poljoprivredni i industrijski otpad, a ulje grožđa je visoko vredan proizvod koji proizilazi iz korištenja i valorizacije otpada iz vinarije (Freitas i sar., 2008; Kim i sar., 2008; Luque-Rodríguez i sar., 2005; Lutterodt i sar., 2011;

Ovcharova i sar., 2014). Na taj način se rešava problem velikih količina otpada i zaštite životne sredine, a istovremeno se dobija proizvod sa novom vrednošću. Imajući u vidu da se radi o novoj proizvodnji, što znači i novo zapošljavanje, proizvodnja ulja iz semenki grožđa ima i pozitivne društvene implikacije.

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 kompletno iskorišćenje grožđa, uključujući i semenke veoma važno sa dva aspekta: ekonomskog i ekološkog (Malićanin, 2014).

Podizanje novih zasada, odnosno povećanje proizvodnje i prerade grožđa uzrokuje povećanu količinu nusproizvoda koji zaostaju nakon proizvodnje. Nusproizvodi često predstavljaju veliki ekološki problem koji nastoji da se reši iskorišćenjem otpada u neke druge svrhe. U savremenoj koncepciji održivog razvoja i zaštite životne sredine, krajnji cilj svake industrije je proizvodnja sa maksimalnim iskorišćenjem resursa i praktično bez otpada, odnosno realizacija ideje "nulte emisije". Kreiranje industrije sa nultom emisijom je veliki izazov, kako za visoko razvijene zemlje, tako i za zemlje u razvoju. Ovo omogućava održivi razvoj, sigurnu sadašnjost i velike šanse realne budućnosti, s obzirom na to da se istovremeno smanjuje potreba za energijom i materijom (Vujasinović i sar., 2016).

U svetlu ovih činjenica, iskorišćenje nusproizvoda različitih tehnologija proizvodnje hrane i pića, pa tako i pri preradi grožđa, je u svetu odavno postalo potreba u smislu proizvodnje novog proizvoda umesto kreiranja otpada. Iskorišćenje nusproizvoda je takođe postalo sastavni deo redovnog procesa proizvodnje, kako zbog povećanja efikasnosti prerade, tako i zbog iskorišćenja energije. Jestivi nusproizvodi dobijeni pri izdvajanju ulja različitih uljarica, kao što su soja, uljana repica, suncokret, kokos, pamuk, palma, susam i lan su već našli široku primenu, kako u prehrambenoj, tako i u farmaceutskoj industriji (Pickard, 2005; Vujasinović i sar., 2016).

Nepropisno odlaganje vinske komine može predstavljati veliki rizik za životnu sredinu pa stroge ekološke direktive EU nalažu da se otpad s više od 5% organskog ugljenika zbrinjava na specifičan način na odlagalištima. Kako se u vinskoj komini nalazi više od 20 mg/L organskog ugljenika, obvezno je, u skladu sa propisima, odlaganje takvog otpada na odlagalištima (Voća, 2008).

Pravni okvir u Europskoj Uniji, Okvirna direktiva Evropske Unije o otpadu (Waste Framework Directive, WFD -2008/98/EU) se specifično ne odnosi na otpad od hrane i pića ali daje opšte definicije i smernice za organski otpad, nusproizvode i glavne obaveze. Okvirna direktiva o otpadu postavlja definicije za nekoliko uslova vezanih za otpad i propisuje opšta načela za organizaciju upravljanja otpadom. Ona definiše otpad kao svaku materiju ili predmet koju proizvođač odbacuje ili namerava ili mora da odbaci. Član 5. daje definiciju za nusproizvod kao pojam koji se široko primjenjuje za organske ostatke iz industrije hrane i pića.

Nusproizvod se definiše kao materija ili predmet koji proizlazi iz procesa proizvodnje, kojim se ne proizvodi taj proizvod, a može se smatrati da nije otpad samo ako su ispunjeni sledeći uslovi: da je sigurna dalja upotreba; da se može koristiti direktno bez ikakve dalje obrade, osim uobičajene industrijske prakse; da nastaje kao sastavni deo proizvodnog procesa; i da je dalje korišćenje dozvoljeno, npr. ispunjava sve relevantne zahteve proizvoda, zaštite životne sredine i zaštite zdravlja za specifičnu upotrebu i neće dovesti do ukupnih štetnih učinaka za životnu sredinu ili zdravlje ljudi (Službeni list Evropske Unije, 2008).

Najčešća upotreba otpada od hrane i pića kao nusproizvoda je kao hrana za životinje (npr. ostaci od voća i povrća). Organski ostaci od proizvođača hrane i pića mogu biti otpad ili nusproizvod, zavisno od njihove upotrebe. Direktiva isključuje nusproizvode životinjskog porekla od kako su pokriveni specijalnom regulativom.

Direktiva takođe određuje da svaka zemlja članica mora promovisati odvojeno sakupljanje bio (biološkog) otpada za kompostiranje ili anaerobnu fermentaciju i osigurati korišćenje ekološki prihvatljivih materijala proizvedenih iz bio otpada. Specifični zahtjevi za otpad od hrane i pića nisu navedeni u direktivi o otpadu (Službeni list Evropske Unije, 2008).

Paket propisa EU vezan za cirkularnu (kružnu) ekonomiju (The Circular Economy Package), usvojen od strane Europske komisije u decembru 2015. god., uključuje revidirane predloge zakona o otpadu, među kojima je i Okvirna direktiva o otpadu. Akcioni plan za cirkularnu ekonomiju postavlja mjere za "zatvaranje kruga" kružne ekonomije i rešavanje svih faza u životnom ciklusu proizvoda: od proizvodnje i potrošnje do upravljanja otpadom i tržišta sekundarnih sirovina. Akcioni plan je takođe uključivao niz aktivnosti koje će biti usmerene na tržišne prepreke ili povećati cirkularnost u određenim sektorima ili materijalnim tokovima, kao što su kao plastika, otpad od hrane, kritične sirovine, izgradnja i rušenje, biomasa i bio-bazirani proizvodi, kao i horizontalne mere u oblastima kao što su inovacije i investicije. U cilju modernizacije sistema za upravljanje otpadom u Uniji i konsolidacije evropskog modela kao jednog od najefikasnijih u svetu, revidirani zakonodavni okvir o otpadu stupio je na snagu u julu 2018. godine. Ovo uključuje:

- nove ambiciozne, ali realne stope recikliranja: do 2030. godine, 70% ukupnog ambalažnog otpada i 60% komunalnog otpada (65% do 2035. godine) bi trebalo reciklirati, uz istovremeno smanjenje odlaganja komunalnog otpada na 10%.
- pojednostavljenje i usklađivanje definicija i metoda obračuna i razjašnjeni pravni status za reciklirane materijale i nusproizvode;
- ojačana pravila i nove obaveze za odvojeno sakupljanje (bio-otpada, tekstila i opasnog otpada koji proizvode domaćinstva, građevinski otpad i otpad od rušenja);
- minimalni zahtjevi za produženu odgovornost proizvođača;
- ojačane mere za sprečavanje nastajanja otpada i upravljanje otpadom, uključujući morski otpad, otpad od hrane i proizvode koji sadrže ključne sirovine (MEMO, 2019).

2.3 PRERADA OTPADA IZ VINARIJA

Procenjuje se da danas pri preradi grožđa na svetskom nivou nastaje oko 10 miliona tona komine u vremenu od svega par nedelja tokom kampanje. Dok je nekada ovaj ostatak od proizvodnje vina i sokova predstavljao zaista samo otpad i najčešće se odlagao rasipanjem po njivama, 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 (Matthäus, 2008). Prerada komine u razvijenim zemljama se usmerava u pravcu proizvodnje ulja iz semenki i proizvodnje bioaktivnih komponenata, kako iz ljuske, tako i iz semenki. U zemljama sa najvećom proizvodnjom grožđa u Evropi: Francuska, Španija, Italija, Portugal i Švajcarska, izdvajanje semenki grožđa i njihova prerada datiraju od 1935. godine. Danas su vodeće zemlje proizvođači ulja od semenki grožđa Italija i Francuska (Dimić, 2005). Francuska, na primer, godišnje preradi 32.000-40.000 tona semenki grožđa i proizvodi 6.000-7.000 tona ulja (Nikićević i Paunović, 2013).

Udeo semenki u komini je značajan, iznosi oko 38-52% na bazi suve materije (Yang i sar., 2009; Brenes i sar., 2016; Beres i sar., 2017), dok se po drugim autorima komina grožđa sastoji od 20-26% semenki, oko 7-11% proteina i 10-20% ulja u zavisnosti od uslova presovanja (Bockish, 1993; Schieber i sar., 2002). Ulje od semenki grožđa se proizvodi uglavnom u Italiji, Francuskoj i Španiji, međutim u poslednje vreme je značajno povećana potražnja za ovim uljem i u drugim delovima Evrope (Kamel i sar., 1985).

Pri prosečnom prinosu grožđa od 6 t/ha dobija se oko 300 kg koštica po hektaru, od čega bi se moglo dobiti 35-40 kg ulja. Računato sa cenom ulja koštica grožđa na svetskom tržištu to iznosi oko 150 €/ha (Dimić, 2005).

Zbrinjavanje otpada vinarima predstavlja veliki problem jer dodatno opterećuje ekonomski bilans proizvodnje. Rešenje ovog problema nalazi se u kvalitetnom korišćenju otpada koje značajno povećava ekonomičnost proizvodnje, s jedne strane smanjenjem količine otpada, a s druge strane stvaranjem dodatne vrednosti na osnovu prikupljanja i komercijalizacije na primer fenolnih jedinjenja iz pokožice i

semenki, te ulja iz semenki. Studija u Portugalu pokazala je da jedna tona prerađenog grožđa može proizvesti 0,13 tona komine, 0,06 tona taloga i 0,03 tona ostataka stabljike (Oliveira i Duarte, 2016).

Poslednjih nekoliko godina semenke grožđa su sve više u centru interesovanja zato što sadrže značajnu količinu polifenolnih jedinjenja. Ova grupa jedinjenja je poznata po svojim antioksidativnim i antiradikalnim svojstvima koja imaju pozitivan efekat na bolesti izazvane oksidativnim stresom (Matthäus, 2008).

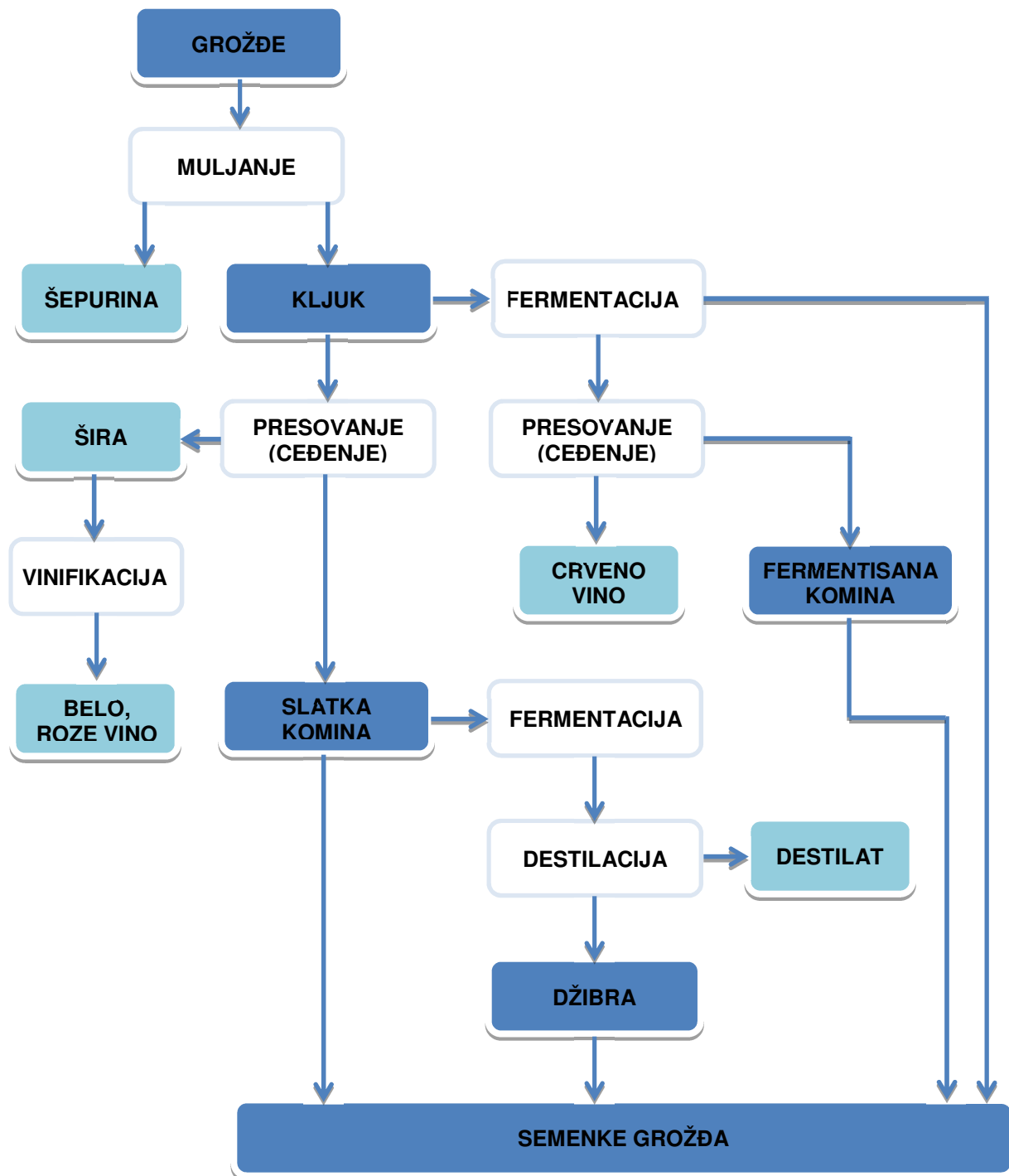
2.4 PROCES DOBIJANJA SEMENKI GROŽĐA

Prilikom standardne prerade grožđa u vinarijama i destilerijama semenke grožđa se, kao otpad, generišu u različitim fazama: pre fermentacije kljuka, prilikom proizvodnje belih i roze vina, zatim nakon fermentacije kljuka, kod proizvodnje crnih (crvenih) vina, i nakon fermentacije i destilacije komine prilikom proizvodnje rakije.

Faze procesa proizvodnje vina i mesta/pozicije na kojima se mogu izdvojiti semenke grožđa, a da se pri tome ne remeti proizvodnja, prikazani su na slici 1.

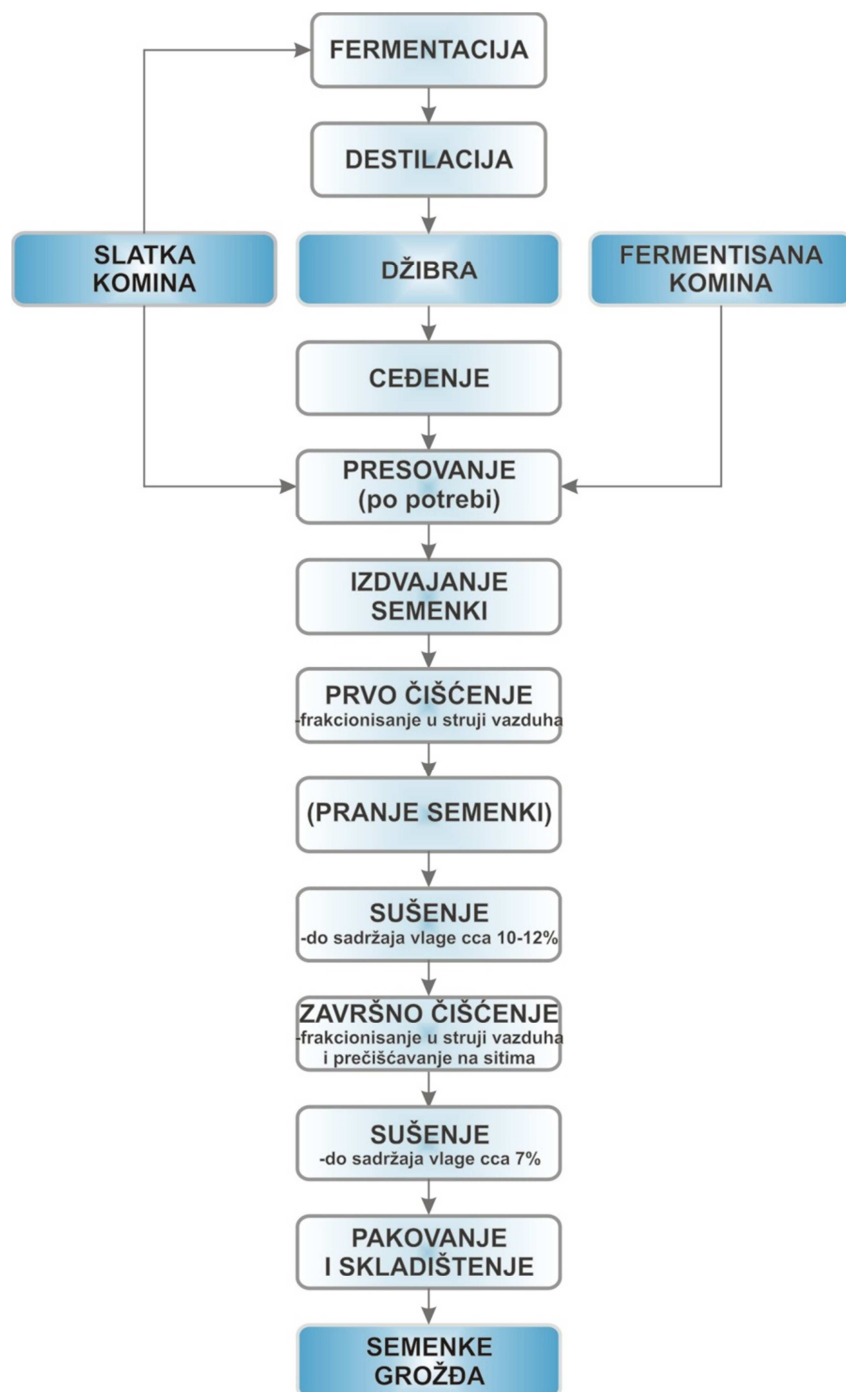
Nakon prijema u vinariju grožđe se ubacuje u muljaču. Muljanje grožđa obavlja se radi dobijanja kljuka koji se zatim oceduje i cedi. Pri muljanju, bobice treba da se što bolje zgnječe, kako bi se postigao veći randman šire, ali pri tome ne smeju da se kidaju peteljke niti da se drobe semenke. Naime, grožđe se ubacuje u muljaču, gde se vrši muljanje grožđa i odvajanje šepurine na jednu stranu i kljuka na drugu. Kljuk se zatim prebacuje na fermentaciju (kod proizvodnje crvenih vina) ili u presu (slika 7) gde se vrši ceđenje, odnosno presovanje kljuka, pri čemu se na jednu stranu odvađa groždani sok - šira, koja se dalje upućuje na vinifikaciju i od nje se dobija belo ili roze vino (u zavisnosti od upotrebene sirovine). Po završetku presovanja iz prese se izbacuje slatka komina. U tom momentu takav suvi ostatak, postaje otpad za vinariju. Takođe, ostatak nakon fermentacije pri proizvodnji crvenih vina bilo da nastaje direktno iz fermentora ili nakon presovanja (fermentisana komina) postaje otpad za vinariju. Ostatak nakon proizvodnje belih i roze vina može dalje da se prerađuje tako što se ostavi da fermentira i nakon fermentacije iz njega se destilacijom proizvodi

destilat za proizvodnju rakije ili može da se dalje obrađuje u cilju izdvajanja semenki grožđa i ljuske (Ribéreau-Gayon i sar., 2006; Nikićević i Paunović, 2013).



Slika 1. Prikaz mogućih mesta za izdvajanje semenki grožđa u toku proizvodnog procesa u vinarijama (slika adaptirana od: Devesa-Rey i sar., 2011; Vardaneg i sar., 2015; Bjelica i sar., 2019)

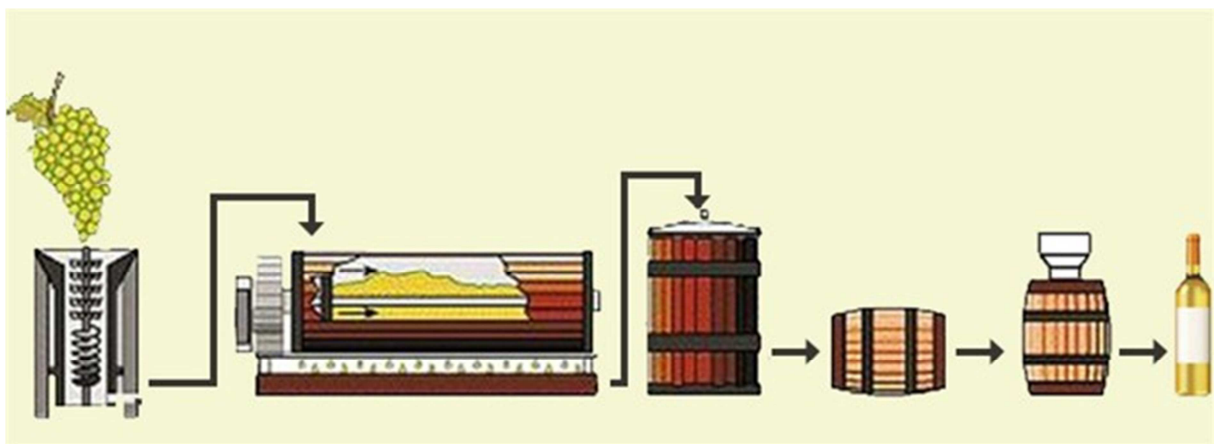
U svakom slučaju, otpad koji se generiše u vinarijama i destilerijama pre fermentacije kljuka, nakon fermentacije kljuka i nakon fermentacije i destilacije komine prikuplja se u specijalne posude i odvozi (odnosi) iz vinarija u pogon za doradu.



Slika 2. Postupci obrade semenki grožđa nastalih pri proizvodnje vina i rakije (slika adaptirana od: Jordan, 2002; Leber, 2009; Bjelica i sar., 2019)

Dalji postupak obrade semenki grožđa prikazan je na slici 2. Blok šema na slici 2 prikazuje preradu otpada i proizvodnju semenki grožđa iz otpada nastalog pre fermentacije u proizvodnji belog i roze vina (slatka komina), posle fermentacije u proizvodnji crvenih vina (fermentisana komina) i otpada nastalog tokom proizvodnje rakije (džibra), odnosno posle fermentacije i destilacije (Jablanovski, 2016; Bjelica i sar., 2019).

Suvi ostatak koji nastaje nakon presovanja kljuka (slatka komina) nije u potpunosti suv. Isceđena komina sadrži oko 30% šire (Ribéreau-Gayon i sar., 2006). Veoma je važno da materijal preuzet iz vinarije nakon proizvodnje belih ili roze vina (slika 3) bude prerađen u roku od 24h, da ne bi došlo do fermentacije polaznog materijala ili još gore do kvarenja istog, odnosno pojave plesnivosti. Takođe, da bi se postigao dobar efekat razdvajanja semenki od ljuske i pulpe, potrebno je da polazni materijal bude što suvlji, odnosno da sadržaj zaostalog soka nije veći od 30% (Jablanovski, 2016.).

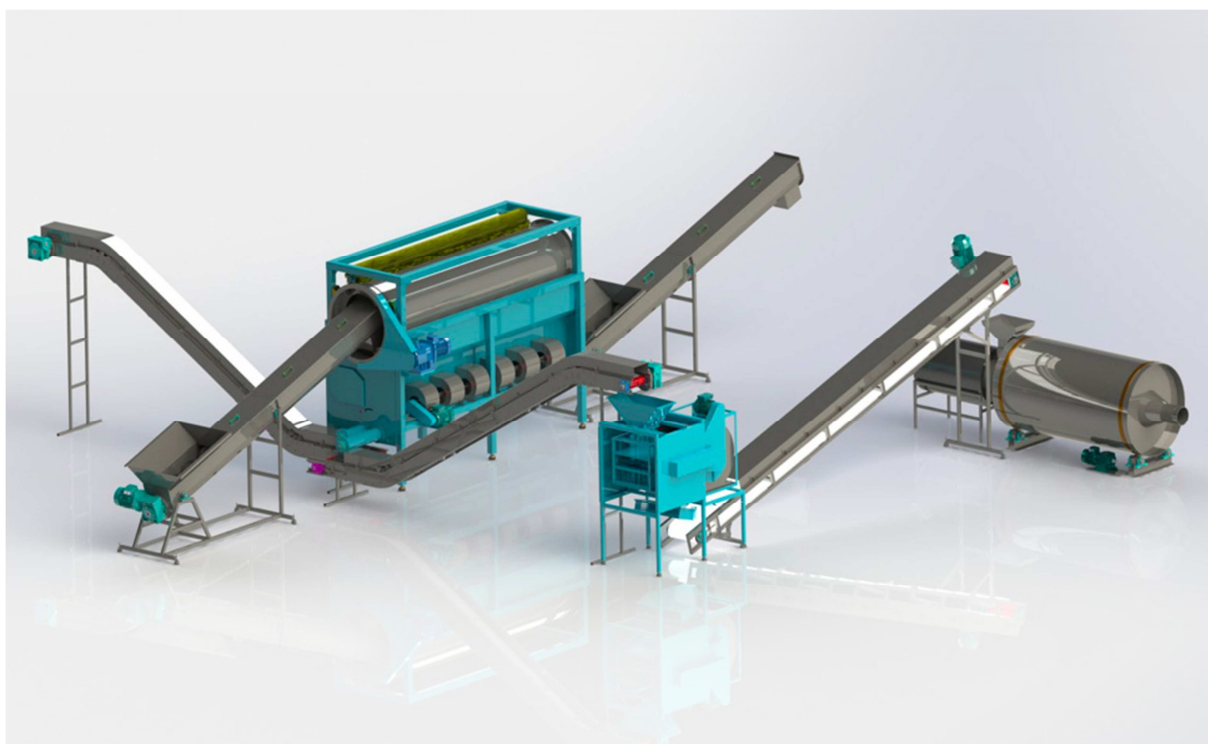


Slika 3. Proces proizvodnje belih vina

(http://www.vinopivorakija.com/media/1135/proizvodnja_belog_vina_678x246.jpg)

Takav materijal se prerađuje u mašini sa rotacionim perforiranim bubnjem (slika 4 i 5), pri čemu se na taj način prvo vrši grubo razdvajanje semenki grožđa i ljuske. Do razdvajanja dolazi tako što prilikom rotacije bubnja semenke ispadaju sa strane, a ostatak pulpe i ljuska ispadaju na kraju bubnja. Nakon odvajanja semenki, zajedno sa njima prolazi i deo ljuske, tako da takav materijal ide u sledeću mašinu kojim se vrši

prvo prečišćavanje semenki strujom bočnog vazduha, pri čemu se odvaja zaostala ljuska, sitne i lagane nečistoće i zakržljale semenke, dok zdrave semenke, kao teže, padaju direktno dole. Posle prvog prečišćavanja, s obzirom da je materijal još veoma vlažan, u malom procentu zaostaju teži delovi bobice i deo ljuske koja se zalepila za semenku. Takav materijal ide dalje na sušenje. Sušenje se vrši prostiranjem u tankom sloju uz slobodnu cirkulaciju vazduha, pri normalnim uslovima. Nakon dva do tri dana sušenja, odnosno kada sadržaj vlage padne na oko 10% pristupa se finalnom prečišćavanju semenki. Materijal se ubacuje u mašinu za selektovanje, gde se prvo u struji vazduha izbacuju delovi ljuske, a zatim se kroz sistem sita odvajaju zdrave i dobro razvijene semenke na jednu stranu, a zakržljale semenke i ostale nečistoće na drugu. Tako dobijene semenke se suše do sadržaja vlage od oko 7% i skladište u džakove do presovanja (Jordan, 2002; Leber, 2009; Jablanovski, 2016; Taseri i sar., 2018).



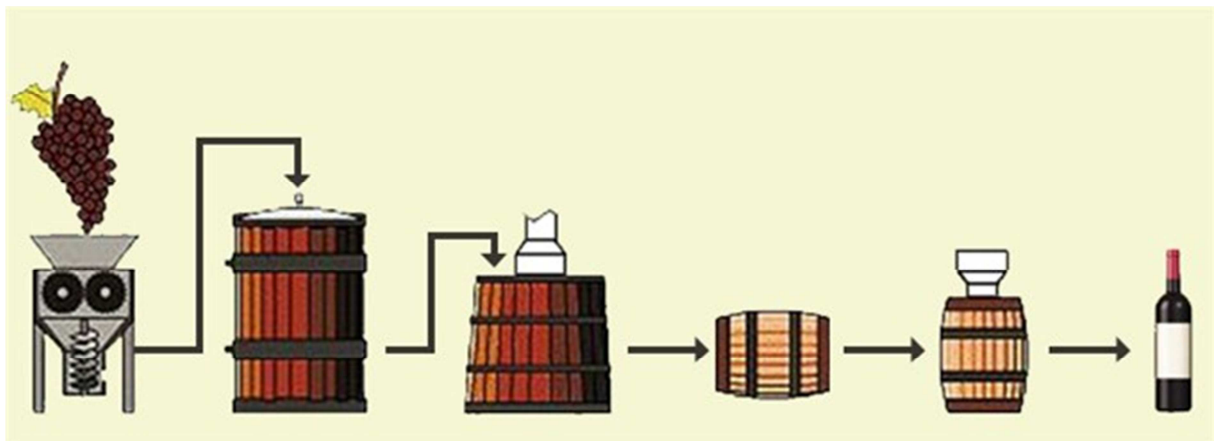
Slika 4. Postrojenje za preradu semenki grožđa
(<http://www.nebraskascrewpress.com/images/grapeseed8.jpg>)



Slika 5. Mašina sa rotirajućim bubnjem (<https://cdn.sare.org/wp-content/uploads/20171204135039/9844780912131856a.jpg>)

Dobijanje semenki grožđa posle fermentacije, koje se izdvajaju u toku proizvodnje crvenog vina prikazano je na slici 6 (veza: slika 2). Pre nego što se sipa u tank za fermentaciju, grožđe se izmulja u muljači, čime se sok bolje iscedi i olakšava proces vrenja, kao i ekstrakcija boje i drugih sastojaka iz grožđa. Muljanjem se u kljuk unosi vazduh, neophodan za proces fermentacije. Grožđe se mulja tako da ne ostanu cele (neraspuknute) bobice i da se semenke ne izlome. Prilikom muljanja odvajaju se bobice od šepurine, što utiče na kvalitet dobijenog vina. Tako dobijen kljuk prenosi se u tank za fermentaciju. Tank za vrenje puni se kljukom do 4/5 zapremine. Punjenje tanka kljukom treba da se obavi u što je moguće kraćem vremenu, da bi vrenje celokupne mase kljuka počelo istovremeno. Alkoholno vrenje je biohemijski proces u toku kojeg se šećer pretvara u alkohol i izdvajaju se ugljen-dioksid, toplota i drugi nusprodukti. Alkoholno vrenje izazivaju kvasci, koji se prirodno nalaze na pokožici grožđa, odakle prelaze u kljuk ili su namenski dodati radi usmerene i kontrolisane fermentacije. Prilikom alkoholne fermentacije oslobađa se velika količina toplote. Naročito je velika količina ugljen-dioksida, koji izaziva previranje ili vrenje kljuka. Vrenje se odvija najbrže pri temperaturama od 20-26°C, a potpuno prestaje pri

temperaturi od 40°C. Kada alkohol u vinu pređe 13%vol., smanjuje se aktivnost kvasaca, a kod sadržaja alkohola od 18%vol., kod mnogih sojeva kvasaca i pri nižim, fermentacija prestaje. Alkoholno vrenje protiče u dve etape. Prvo ide burna fermentacija koja traje 6-7 dana i karakteriše je brzo razlaganje šećera i povećanje temperature. Druga etapa je tiha fermentacija koja traje 2-3 nedelje i tokom nje se formira mlado vino. U tanku za fermentaciju dolazi do razdvajanja ostataka bobica grožđa i to tako da semenke padaju na dno tanka, dok se ljuska i perikarp isplivava na vrh tanka. Upravo na ovom mestu je moguće direktno izdvojiti semenke grožđa, ukoliko za to postoje uslovi u vinariji, tako što se pumpom sa dna tanka, preko sita prvo izdvajaju semenke grožđa, a nakon toga ostatak iz tanka prebacuje u presu na ceđenje. Semenke sakupljene na situ po potrebi se peru čistom vodom, da bi se odvojila zaostala ljuska i ispralo vino. Ukoliko ne postoji mogućnost direktnog izdvajanja semenki iz fermentora, sadržaj tanka se nakon fermentacije prebacuje u presu na ceđenje, gde se na jednu stranu odvaja vino, a na drugu fermentisana komina. Iz fermentisane komine se daljim postupkom obrade izdvajaju semenke grožđa prema predhodno opisanom postupku (Ribéreau-Gayon i sar., 2006).



Slika 6. Proces proizvodnje crvenih vina

(http://vinopivorakija.com/media/1134/proizvodnja_crvenog_vina_678x246.jpg)

Dobijene semenke nakon fermentacije, bez obzira na način izdvajanja, prvo idu na sušenje. Sušenje se vrši pri normalnom pritisku u ambijentalnim uslovima 2-3 dana do postizanja vlage od oko 10%. Zatim se vrši finalno prečišćavanje semenki u selektoru, gde se u struji vazduha prvo izdvajaju delovi ljuske i fine nečistoće, a zatim

na sistemu sita zdravo i jedro seme od zaostalih i zakržljalih semenki. Tako sakupljeno čisto i zdravo seme osuši se do sadržaja vlage od oko 7% i uskladišti do presovanja (Jordan, 2002; Leber, 2009; Jablanovski, 2016; Taseri i sar., 2018).

Semenke grožđa posle destilacije dobijaju se prikupljanjem i preradom džibre (slika 2). Nakon muljanja grožđa, slatka komina sa sadržajem soka od 35-40% se prikuplja i transportuje u pogon za preradu. Tu se rastresa i smešta u bazen za vrenje i čuvanje komine i to nabijanjem sloja na sloj, da se istisne vazduh. Nakod završetka punjenja, pokriva se sintetičnim platnom i preko toga nasipa sloj sitnog peska da se zaštiti od kvarenja. Nakon tri nedelje fermentacije dobije se fermentisana komina koja se destiliše u pogonu za proizvodnju rakije. Iz prevrele komine se destilacijom dobija rakija komovica. Destilacija se obavlja šaržno. Prilikom destilacije prevrele komine izdvaja se destilat, koji se koristi za dobijanje rakije komovice, dok se na kraju procesa iz kazana izbacuje tzv. džibra. Tako dobijena džibra se prikuplja radi izdvajanja semenki grožđa. Semenke se izdvajaju direktnim ubacivanjem džibre u vodu i mešanjem i tom prilikom dolazi ispiranja semenki ili se po završetku destilacije džibra prosipa iz kazana na beton, gde se vrši njeno prirodno ceđenje. Tako delimično ocedena džibra može dodatno da se presuje na presi, slika 7 ili korišćenjem ocedivača, slika 8, radi lakšeg izdvajanja semenki u mašini sa rotacionim bubnjem. Delimično ocedena džibra se može i direktno prerađivati. Gubici koji nastaju preradom još vlažne džibre nisu značajni, tako da je moguće prerađivati džibru koja je samo prirodno ocedena. Nakon odvajanja semenki u mašini sa rotacionim bubnjem i prvog čišćenja, moguće je po potrebi izvršiti pranje semenki (slika 9) pre sušenja, ukoliko se proceni da je miris posle destilacije neprijatan i da bi zaostali sadržaj nepoželjnih sastojaka negativno uticao na kvalitet semenki. Nakon prvog sušenja, finalno čišćenje radi se na selektor mašini (slika 10). Semenke se zatim osuše do sadržaja vlage od oko 7%, pakuju i skladište do presovanja (Jordan, 2002; Jablanovski, 2016; Ribéreau-Gayon i sar., 2006; Nikićević i Paunović, 2013).

Iz komine se može dobiti dobiti još i vinska kiselina, te iskorišćeni ostaci komine služe za pripremu organskih đubriva, a ređe i kao stočna hrana (Ribéreau-Gayon i sar., 2006; Nikićević i Paunović, 2013).



Slika 7 . Presa

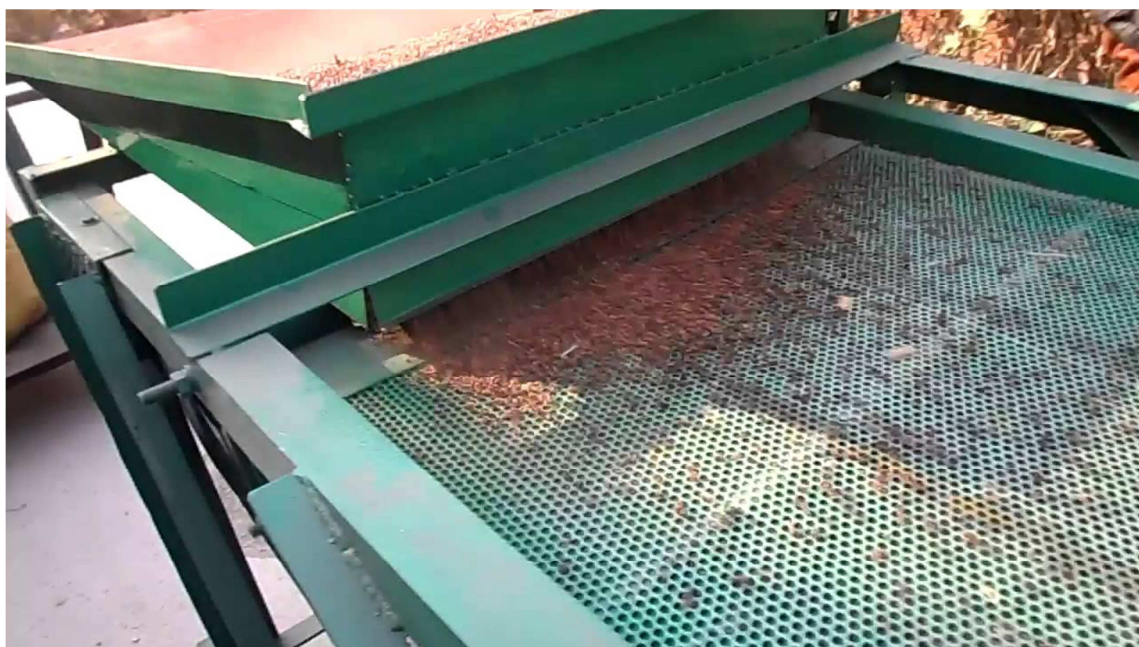
(https://www.wineandbeverage.co.nz/uploads/images/presses/04_V-50-80_06.jpg)



Slika 8. Očeđivač komine/džibre (<https://www.dgt.uns.ac.rs/download/pgp02p.pdf>)



Slika 9. Pranje semenki gožđa
(<https://i.ytimg.com/vi/xQhi6pymLqE/maxresdefault.jpg>)



Slika 10. Selector mašina (<https://i.ytimg.com/vi/aDcbyl6GjnQ/maxresdefault.jpg>)

2.5 HEMIJSKI SASTAV SEMENKI GROŽĐA

Za semenke grožđa je karakterističan veoma veliki udeo čvrste "ljuske", čak 75%, dok udeo jezgra/klice iznosi 25%. Sadržaj ulja u semenkama grožđa evropskih sorti je 12-18%, a prosečan sadržaj ulja u semenkama grožđa domaćih sorti je oko 13%. Sastav semenki grožđa prikazan je u tabeli 1 (Dimić, 2005). Za proizvodnju ulja od semenki grožđa koriste se semenke sa sadržajem ulja od 7-20%. Udeo semenki u komini čini 38 do 52% suve materije, što zavisi od metode proizvodnje i rukovanja otpadom. Prosečno, osušene semenke sadrže do 40% vlakana, 16% ulja, 11% proteina, 7% kompleksnih fenolnih komponenti kao što su tanini, materije poput šećera i minerala (3%) i 7% vode (Matthäus, 2008; Teixeira i sar., 2014).

Tabela 1. Hemijski sastav semenki grožđa (Dimić, 2005)

Pokazatelj (%)	Vlažna semenska	Suva semenska
Vlaga	30-52	-
Ulje	8-12	12-22
Pepeo	1,2-2,0	-
Sirovi protein	-	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

2.6 MOGUĆNOSTI IZDVAJANJA ULJA SEMENKI GROŽĐA

Ulje od semenki grožđa je tradicionalno ulje koje postoji još iz vremena starog zaveta. Žene u Evropi su ga vekovima koristile u svojim kuhinjama, za pripremu obroka. Italijanski imperator Maksimilijan II je ovo ulje smatrao toliko važnim da je 1569 god. uveo monopol za njegovu proizvodnju (<http://markojovasevic.rs/2014/12/ulje-od-semenki-grozda/>).

Na slici 11 prikazani su različiti mogući načini izdvajanja ulja iz semenki grožđa.



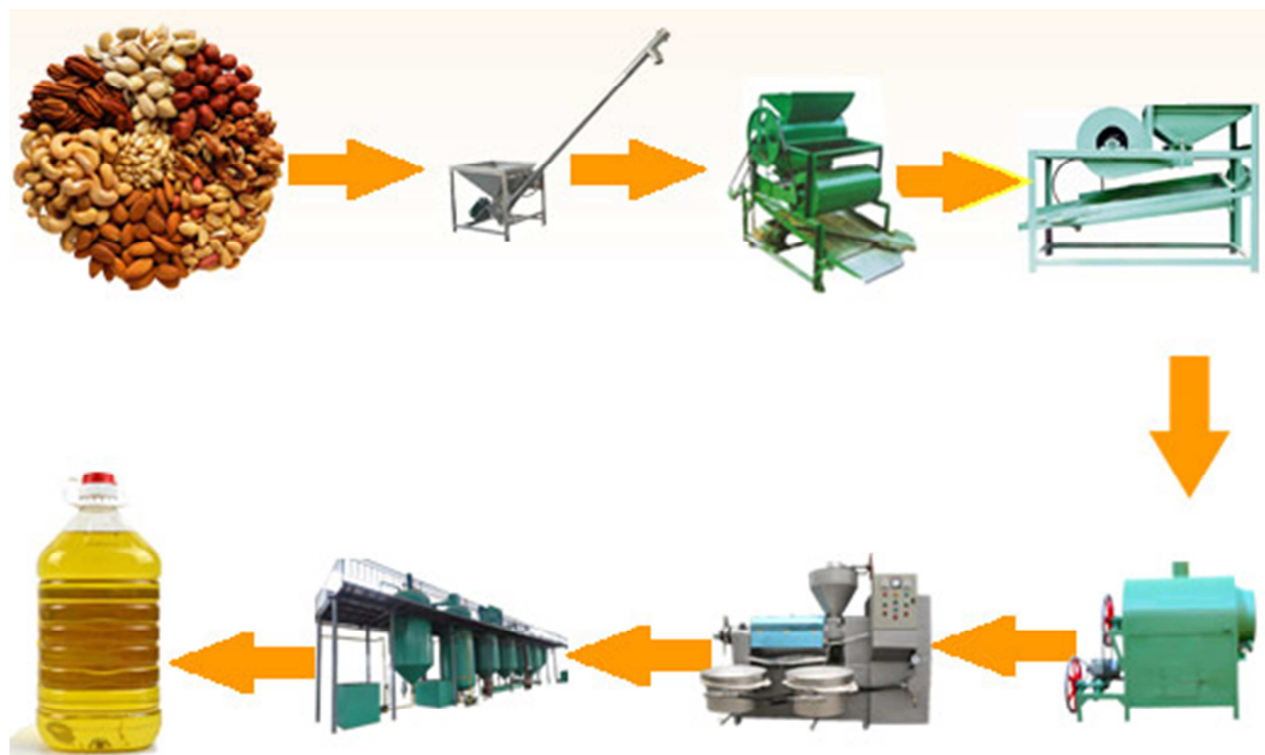
Slika 11. Različiti načini izdvajanja ulja (Mariana i sar., 2013)

Ulje od semenki grožđa može se dobiti svim uobičajenim postupcima, ali se kao najbolji nameću mehanički postupak na pužnim presama i hemijski, ekstrakcija ulja organskim rastvaračima, kao najekonomicniji i najrasprostranjeniji.

Najčešći način dobijanja jestivog ulja, koji se praktikuje hiljadama godina, je mehaničko presovanje semena uljarica. Presovanjem se ulje izdvaja pod dejstvom mehaničkog pritiska, odnosno delovanjem spoljašnjih sila koje nastaju u posebnim mašinama nazvanim prese. Kao glavni nedostatak ove metode navodi se mala efikasnost, odnosno činjenica što velika količina ulja zaostaje u pogači (Mariana i sar., 2013), Ovo je posebno važno za proizvodnju ulja iz semenki sa malim sadržajem ulja, kao što je ulje od semenki grožđa.

Pored izdvajanja ulja na pužnim presama (slika 12) gde uglavnom nema posebne pripreme pre presovanja, ukoliko se koristi hidraulična presa postupak pripreme

podrazumeva da se suvo seme uz dodatak vode fino samelje, zatim se u dobijenu masu ponovo dodaje voda i uz stalno mešanje zagreva-kuva dok se ne opazi početak "odvajanja" (oslobađanja) ulja. Masa se potom sipa u vreće i presuje na hidrauličnoj presi (Dimić, 2005).



Slika 12. Proces proizvodnje presovanog ulja
(<http://www.gcmachines.com/groundnut-oil-processing.html>, 1,3,2019)

Dobijanje ulja od semenki grožđa presovanjem, koje se potom prečišćava prirodnom sedimentacijom ili filtracijom ponovo postaje sve popularnije. Tako dobijeni proizvod je ulje sa vinskim i voćnim aromama koje se uglavnom koristi za pripremu salata. Prinos ulja u ovom slučaju je mnogo niži u poređenju sa ekstrakcijom pomoću rastvarača, a proizvodnja je znatno teža, budući da proizvođač mora voditi računa i o kvalitetu sirovine za presovanje. Ukoliko proizvođač ne koristi sirovine visokog kvaliteta, nije moguće proizvesti kvalitetno ulje od semenki grožđa. Naime, tokom procesa izdvajanja ulja ne postoji mogućnost poboljšanja njegovog kvaliteta (Matthäus, 2008).

Budući da semenke grožđa imaju relativno nizak sadržaj ulja u poređenju sa ostalim uljaricama, metoda ekstrakcije organskim rastvaračima je veoma značajna sa ekonomske tačke gledišta (Malićanin, 2014; Matthäus, 2008; Vujasinović i sar., 2016). Presovanje nakon čega sledi ekstrakcija rastvaračem je metoda koja se najčešće koristi za izdvajanje ulja iz širokog spektra uljarica. Na taj način se proizvodi skoro 50% ukupnog biljnog ulja u svetu (Bhosle i Subramanian, 2005; Fernández i sar., 2010).

Ekstrakcija rastvaračem je proces izdvajanja tečnosti iz sistema tečno-čvrste supstance upotrebom rastvarača. Najčešće korišćen rastvarač za ekstrakciju jestivih ulja iz biljnih sirovina je komercijalni n-heksan, smeša ugljovodonika koja ključa pri temperaturi od 65-69°C. Nakon ekstrakcije pomoću organskog rastvarača, najčešće heksana, ulje se prečišćava rafinacijom, budući da tokom ekstrakcije mnogo neželjenih komponenata prelazi u ulje i one se moraju ukloniti. Tokom rafinacije ulje je u pojedinim fazama izloženo dejstvu hemikalija ili raznih agenasa (fosforna kiselina, limunska kiselina, baza, voda, aktivna zemlja), kao i uticaju visokih temperatura (oko 200-240°C pri visokom vakuumu). Pod uticajem ovih faktora može doći do promene izvornog hemijskog sastava i nutritivne vrednosti ulja. Osim toga pojedini nusproizvodi mogu predstavljati problem pri njihovoj daljoj preradi ili eliminaciji. Na ovaj način dobija se ulje neutralnog ukusa i mirisa. Ovo je ipak najefikasnija tehnika za dobijanje ulja iz uljarica. Pri ovom procesu uobičajeno je da preostalo ulje u pogači bude manje od 1%. Postoje, međutim, neka ograničenja i nedostaci vezani za ekstrakciju ulja rastvaračem. Hemijski rastvarači (ili pojedine njihove komponente) mogu biti štetni za ljudsko zdravlje, zatim lako su zapaljive i opasnost od požara i eksplozije uvek postoji. Osim toga, početni kapital i operativni troškovi procesa su visoki, zahtevi za energijom su takođe visoki, a opšti kvalitet dobijeng ulja je niži od kvaliteta presovanog ulja (Dimić, 2005; Malićanin, 2014; Mariana i sar., 2013).

U novije vreme je u porastu upotreba drugih, ekoloških rastvarača za ekstrakciju, kao što su alkoholi (etanol i izopropanol) i natkritični ugljen (IV)-oksid. Primena ultrazvuka za ekstrakciju ulja semenki grožđa se takođe sve više izučava (Malićanin, 2014).

Uzimajući u obzir zabrinutost zbog opasnosti po životnu sredinu i zdravlje ljudi koje prouzrokuju organski rastvarači i njihovi ostaci u ulju, radi se na uvođenju i zameni rastvarača sa superkritičnim fluidima. Ekstrakcija superkritičnim fluidima je tehnika slična konvencionalnoj ekstrakciji sa rastvaračem, ali rastvarač nije tečnost, već gas iznad kritične tačke. Supkrična tečnost koja se, za sada, najčešće koristi u ekstrakciji ulja je CO₂. To je superkrična tečnost koja se najviše koristi u analitičkim primenama jer ne ekstrahuje molekularni kiseonik i nije toksična tečnost. U tehnici superkritičnog ugljen-dioksida, seme se meša sa ugljen-dioksidom u tečnom stanju pri visokom pritisku (na temperaturi od 31°C i pritisku od 7,3MPa), pri čemu se ulje rastvara u ugljen-dioksidu. Kada se otpušta pritisak iz sistema, ugljen-dioksid se vraća u gasnu fazu i ulje se taloži iz smeše CO₂-ulje. Efikasnost ekstrakcije zavisi od temperature, pritiska, vremena kontakta između tečnosti za ekstrahovanje i semena, kao i rastvorljivosti ulja u tečnosti za ekstrakciju. Prednosti ove metode su: niska radna temperatura, a time i smanjena toplotna degradacija većine labilnih jedinjenja; kraći period ekstrakcije; visoka selektivnost u ekstrakciji jedinjenja; nema ostatka rastvarača sa negativnim efektima na kvalitet ulja (Mariana i sar., 2013).

U druge metode koje se koriste za izdvajanje ulja spada destilacija parom koja se koristi najčešće za ekstrakciju eteričnih ulja. Destilacija parom primenjuje se uglavnom za izdvajanje ulja u farmaceutske svrhe.

Pored toga koristi se i hemijska metoda koja obuhvata ekstrakciju ulja pomoću enzima. Ovu metodu primenjuju uglavnom velike kompanije koje u svom asortimanu imaju proizvode visoke vrednosti. Prvi korak je kuvanje semena u vodi. Zatim sledi enzimski obrada ćelija kuvanog biljnog materijala, radi oslobađanja ulja, i na kraju odvajanje rezidualnih enzima i ulja (centrifuga/separator) (Mariana i sar., 2013).

2.7 TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE HLADNO PRESOVANOG ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

Za proizvodnju kvalitetnog hladno presovanog ulja od semenki grožđa neophodno je obezbediti kvalitetno seme. Budući da se seme dobija kao nusproizvod pri proizvodnji vina i sokova potrebno ga je na adekvatan način doraditi.

Ostatak nakon presovanja grožđa sastoji se od semenki uz koje prijanjaju delovi bobica grožđa (pulpa i ljuska). Ovi delići bobica imaju znatno veći sadržaj vlage što ih čini podložnim mikrobiološkom kvarenju. Osim toga, u prijanjajućim voćnim delovima se i enzimi brzo aktiviraju. Kao rezultat aktivnosti mikroorganizama i enzima mogu nastati aromatske komponente. S obzirom na to da je ulje veoma dobar nosač aromatskih komponentata, te iste prelaze u ulje tokom presovanja, što svakako utiče na kvalitet izdvojenog ulja. Neke od tih komponenti mogu imati i negativan uticaj. Samo nekoliko sati između proizvodnje vina i sušenja semenki dovoljno je da se pokrene razvoj neprijatnih aromatskih komponenti, uglavnom etil-acetata, sirćetne kiseline i etanola (Matthäus, 2008).

“Suvi ostatak” koji nastaje nakon presovanja još uvek sadrži 30-40% šire i potrebno ga je preraditi u roku od 24h, da ne bi došlo do neželjenih promena u vidu kvarenja, odnosno pojave plesnivosti. Prvo se grubo razdvajaju semenke grožđa i ljuske, Nakon toga se izdvajaju lakše nečistoće, delovi ljuske i zakržljale semenke. Zatim se semenke suše do sadržaja vlage od oko 10% i kroz sistem sita odvajaju zdrave i dobro razvijene semenke na jednu stranu, a zakržljale semenke i ostale nečistoće na drugu. Tako dobijene semenke suše se do sadržaja vlage od oko 7% i skladište u džakovima do presovanja (Bjelica i sar., 2017). Čiste i suve semenke mogu da se čuvaju dosta dugo bez promena koje bi uticale na senzorski kvalitet izdvojenog ulja.

Sušenje semenki grožđa zagrejanim vazduhom pre izdvajanja ulja daje viši hemijski kvalitet, viši sadržaj ukupnih fenola i veću 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 (Malićanin, 2014).

Čiste i suve semenke efikasno se presuju pomoću pužnih presa. Budući da su semenke grožđa tvrde i da sadrže malo ulja, veoma je važan odabir pužne prese. Naime, zbog velike čvrstine i malih dimenzija semenci masa se lako zaguši (zapeče) u delovima prese, a zbog malog sadržaja ulja, ulje može da se apsorbuje (i time izgubi) u pogači.

Glavni konstitutivni elementi pužnih presa su: vodoravni puž, koš koji se nalazi oko puža, uređaj za punjenje i doziranje materijala, uređaj za regulaciju debljine pogace, 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). 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.

Pri proizvodnji hladno presovanih 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. Da bi se to postiglo potrebne su prese posebnih konstrukcija ili se presovanje 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 (Dimić, 2005).

Najvažniji faktori koji utiču na efikasnost presovanja su:

1. vrsta i karakteristike sirovine;
2. priprema materijala za presovanje; granulometrijski sastav, udeo zaostale ljuske i uslovi kondicioniranja, tj. hidrotermičke obrade. Kondicioniranjem u funkciji temperature, sadržaja vlage i dužine trajanja procesa može se uticati na plastična svojstva materijala i viskozitet ulja;
3. konstrukcija i snaga prese;
4. uslovi, odnosno parametri presovanja: 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. Univerzalna presa za sve vrste sirovina ne postoji.

Veoma bitan faktor koji utice na efikasnost 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).

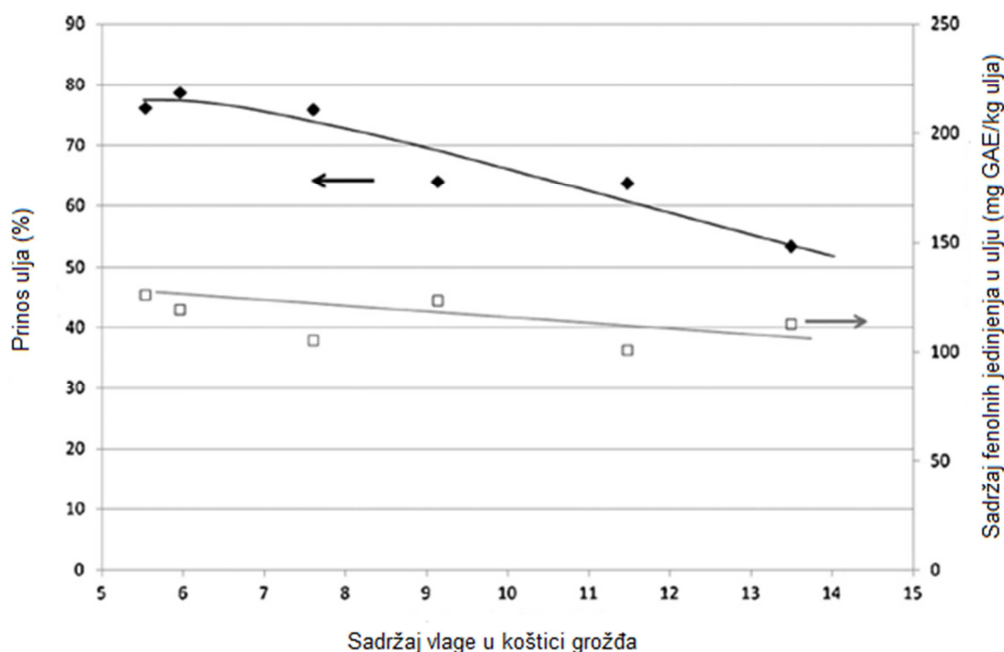
Takođe, jedan od najvažnijih faktora koji utiče na efikasnost ceđenja je i sadržaj vlage u sirovini. Stalna kontrola sadržaja vlage u procesu ceđenja je od izuzetnog značaja, jer vlaga neposredno utiče, kako na kapacitet prese i sadržaj zaostalog ulja u pogači, tako i na kvalitet ceđenog ulja. Veoma mala odstupanja sadržaja vlage u materijalu za ceđenje, daju velika odstupanja u sadržaju zaostalog ulja (Dimić, 2005; Vujasinović i sar., 2016),

Prema literaturnim navodima, veći sadržaj vlage povećava plastičnost materijala usled čega se smanjuje nivo kompresije što se ogleda u slabijem izdvajanju ulja. Takođe, neki autori smatraju da vlaga deluje kao "mazivo" tako da njen veći sadržaj ne obezbeđuje dovoljno trenje tokom ceđenja (Dimić, 2005).

Prema grupi autora (Rombaut i sar., 2015), glavni uticaj na prinos ulja i ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ulju ima vrsta semenki grožđa. Porastom sadržaja vlage u semenci smanjuje se procenat izdvojenog ulja (slika 13). Optimalni parametri procesa hladnog presovanja za maksimalan prinos ulja i polifenolni sadržaj, prema ovim autorima, zavise od pripreme sirovine (Vujasinović i sar., 2016).

Prednosti primene postupka hladnog presovanja za proizvodnju jestivih ulja u odnosu na konvencionalan način koji podrazumeva upotrebu organskog rastvarača za ekstrakciju ulja su sledeći:

- dobijanje "čistijeg" proizvoda, bez prisustva organskog rastvarača;
- dobijanje ulja sa svojim izvornim senzorskim karakteristikama (boja, ukus, miris, aroma);
- dobijanje ulja koje zadržava svoju karakterističnu hranljivu vrednost;
- nije dozvoljeno dodavanje nikakvih aditiva u ulje.



Slika 13. Uticaj sadržaja vlage na prinos ulja i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju semenki grožđa (Rombaut i sar., 2015)

Nedostaci procesa hladnog presovanja su: mali prinos ulja, proizvod je skuplji za krajnjeg potrošača, tokom ceđenja se stvara velika količina toplote, kao rezultat trenja, što može uništiti određena svojstva ulja (zbog toga, mnoge kompanije ugrađuju u prese sistem za hlađenje što povećava troškove), proizvodnja je znatno skuplja jer proizvođač mora da obezbedi visok kvalitet sirovine (Dimić, 2005). Iako je prinos niži nego kod konvencionalne ekstrakcije rastvaračem, ne postoji zabrinutost zbog ostataka rastvarača u ulju, što daje sigurniji i poželjniji proizvod (Shinagawa i sar., 2015).

2.8 SENZORSKA SVOJSTVA I BOJA HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA

2.8.1 Senzorska svojstva ulja

Senzorska ocena obezbeđuje informacije koje su u najvećoj meri povezane sa kvalitetom ulja. Nedostaci mirisa ili arome mogu biti otkriveni od strane ocenjivača pre nego što se prepoznaju hemijskim ili instrumentalnim metodama.

Senzorska svojstva hladno presovanog ulja semenki grožđa zavise, pre svega, od vrste i kvaliteta semenki. Ulje se odlikuje prijatnom aromom, slično maslinovom ulju, sa jače ili slabije izraženim vinsko-voćnim tonovima. Boja ulja, u zavisnosti od vrste semenki i načina dobijanja, kreće se od svetlo žute sa zelenkastom nijansom, preko zelenkasto-žute, zlatno-žute, zelene do tamno zelene. Dužim stajanjem ulja boja može da pređe i u braonkastu. Svetla boja je karakteristična za rafinisana ulja, dok su intenzivnije boje karakteristične za hladno presovana ulja (Dimić, 2005; Malićanin, 2014; Matthäus, 2008; Vujasinović i sar., 2016a; Vujasinović i sar., 2016b).

Boja ulja zavisi od prisutnih pigmenata, karotenoida i hlorofila, čija količina zavisi od načina dobijanja ulja, odnosno od procesa koji su primenjeni. Tako na primer, ulje od semenki grožđa je tamno zelene boje kada se koristi modifikator (10% etanola) u natkritičnoj ekstrakciji sa CO₂, dok je svetlo žute boje kada se ekstrahuje bez modifikatora (Lampi i Heinonen, 2009).

Vujasinović i saradnici (2016b) utvrdili su da postoje značajne razlike u senzorskim karakteristikama između hladno presovanih i rafinisanog ulja semenki grožđa. Autori su ispitivali senzorska svojstva hladno presovanih ulja semenki crnog i belog grožđa u poređenju sa rafinisanim uljem semenki grožđa i uočili su da hladno ceđena ulja karakterišu svojstvena intenzivna boja, miris i ukus, dok je rafinisano ulje neutralnog mirisa i ukusa i znatno svetlije boje. Ove karakteristike su u potpunosti u skladu sa svojstvima jestivih nerafiniranih i rafiniranih ulja (Dimić, 2005). Pored toga, značajne razlike u pojedinim senzorskim atributima autori su utvrdili i između ulja od semenki belog grožđa bez fermentacije u odnosu na ulje od semenki crnog grožđa nakon fermentacije. Boja ulja od semenki belog grožđa bila je tamnija i izrazito zelena,

slično boji devičanskog maslinovog ulja proizvedenog od zelenih plodova masline, dok je boja ulja od semenki crnog grožđa bila znatno svetlija i žućkasto-zelena. Miris i aroma hladno presovanih ulja dobijenih od različitih sirovina imali su različite note. Ulje dobijeno od semenki belog grožđa imalo je „voćnu“ aromu, dok je ulje od semenki crnog grožđa bilo intenzivnijeg mirisa sa „vinskom“ aromom.

Rezultati instrumentalnog određivanja boje, prikazani u tabeli 2, potvrđuju postojanje razlika u boji ulja od semenki grožđa u zavisnosti od načina dobijanja, kao i porekla semenki (sorte vinove loze). Transparentija hladno presovanih ulja je daleko manja u odnosu na rafinisano (88%), što je u direktnoj korelaciji sa različitim bojom ulja, odnosno prisustvom različitih vrsta i količine pigmenata u ulju. Hladno presovano ulje od semenki belog grožđa ima znatno manju transparentiju u odnosu na ulje od semenki crnog grožđa. Svetloća boje rafinisanog ulja mnogo je veća u odnosu na hladno ceđena, a različiti udeli crvene i žute boje ukazuju na formiranje dominantne svojstvene boje naročito nerafiniranih ulja (Vujsinović i sar., 2016b).

Tabela 2. Karakteristike boje prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu i transparentija ulja semenki grožđa (Vujsinović i sar., 2016b)

Parametar	Hladno presovano ulje od semenki belog grožđa*	Hladno presovano ulje od semenki crnog grožđa**	Rafinisano ulje
Svetloća boje (%), L^*	18,58	18,55	25,67
Udeo crvene boje, a^*	1,77	1,50	-0,96 ¹
Udeo žute boje, b^*	1,65	3,33	2,42
Transparentija (%)	20,26	38,65	88,78

*bez fermentacije; **nakon fermentacije; ¹ negativna vrednost označava udeo zelene boje

Zahvaljujući izraženoj aromi i prijatnih senzorskih svojstava, hladno ceđena ulja semenki grožđa koriste se kao salatna ulja, a mogu se svrstati u grupu tzv, gurmanskih ulja (Lampi i Heinonen, 2009),

Međutim ta prijatna aroma može da se promeni u neprijatnu, oštru, gorku ili da dobije druge negativne senzorske osobine usled prisustva etil-acetata ili sirćetne

kiseline koji nastaju tokom skladištenja sirovine, kao rezultat metabolizma mikroorganizama ili oksidativnih procesa. Ovo ima veliki uticaj na ukupni senzorski kvalitet i aromu ulja (Matthäus, 2008). Ukoliko se ne koristi kvalitetna sirovina nije moguće proizvesti hladno presovano ulje visokog senzorskog kvaliteta, budući da tokom procesa dobijanja ulja nema mogućnosti za poboljšanje njegovog kvaliteta, kao što je to slučaj kod rafiniranih ulja (Vujasinović i sar., 2016).

S obzirom na to da se semenke izdvajaju prilikom prerade grožđa i nalaze se u vlažnoj sredini koja pogoduje mikrobiološkim i enzimatskim procesima, da ne bi došlo do kvarenja i drugih nepoželjnih promena u vidu razvoja aroma-aktivnih jedinjenja kao što su etanol, etil acetat ili sirćetna kiselina, semenke je potrebno u najkraćem roku očistiti i osušiti. Rezultat aktivnosti mikroorganizama i enzima je razvoj neprijatnih aroma koje tokom presovanja prelaze u ulje. Dakle, proizvodnja jestivog nerafiniranog ulja visokog senzorskog kvaliteta uslovljena je brzo osušenom sirovinom (Matthäus, 2008).

Koristeći HS-SPME-GC-MS, grupa autora (Bail i sar., 2008) ispitivali su mogućnost karakterizacije različitih vrsta ulja semenki grožđa u pogledu sastava isparljivih komponenti. Prema njihovim rezultatima u grupi devičanskih ulja koja su proizvedena iz komine dobijene prilikom proizvodnje belog vina, sorte „Welschriesling“ identifikovani su veći sadržaji sirćetne kiseline, etil acetata, heksanola, heksil acetata i 2,3-butandiola, dok su kod ulja dobijenog od sorte „Chardonnay“ identifikovane veće koncentracije 3-metilbutanola, izoamil acetata, 2-heptanona, benzaldehida, etil heksanoata i etil oktanoata kao i manje koncentracije 3-hidroksibutanola. Od isparljivih komponenata među devičanskim uljima detektovane su alkoholne i esterifikovane komponente kao što je 2,3-butandiol (0,4–1,1%) koji može biti detektovan u svim devičanskim uljima koja se dobijaju iz semenki nakon fermentacije grožđa. Komponente kao što su *trans*-2-heksenal i *trans*-2-heptenal koje daju ulju voćnu, zelenu notu su detektovane u većini ulja semenki grožđa, dok su komponente kao što su heksanska kiselina, *trans*-2-heksenal, heptanal i 2-heptanon pronađene u uzorcima i rafiniranog i nerafiniranog ulja (Vujasinović i sar., 2016).

2.8.2 Lipohromi – pigmenti u ulju

Lipohromi su supstance prirodnog porekla koje su odgovorne za boju ulja. Boja ulja je uslovljena prisustvom malih količina u ulju rastvorljivih pigmenata, kao što su: karotenoidi, hlorofil i gosipol. To su karakteristične bojene materije za npr. crvenu boju sirovog palminog, zelenkastu maslinovog i smeđe-čilibarnu boju pamukovog ulja. Kad je reč o boji ulja, kao i sastavu i sadržaju pigmenata radi se, svakako, o sirovim uljima. Naime, pigmenti su negliceridni sastojci koji se uklanjaju iz sirovog ulja procesom beljenja (najčešće obradom aktivnom zemljom), pošto rafinisano jestivo ulje mora biti uobičajene svetlo-žute boje prihvaćene od potrošača za ovu vrstu proizvoda (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980; Gunstone, 2000).

Boja hladno presovanih ulja zavisi od sirovine i načina dobijanja ulja, a formira se kombinacijom prisutnih pigmenata i u direktnoj vezi je sa odnosom sadržaja hlorofila i karotenoida u semenu (Dimić, 2005). Pored specifičnih senzorskih osobina, hladno presovano ulje od semenki grožđa odlikuju se karakterističnim sastavom lipohroma. Ova vrsta ulja takođe sadrži i karotenoide i hlorofile, pri čemu su hlorofili daleko dominantniji. Sadržaj pigmenata je znatno veći u hladno presovanim uljima nego u rafinisanom (Bjelica i Vujasinović, 2017),

Poslednjih godina karotenoidima se poklanja posebna pažnja, Utvrdeno je da ovi sastojci deluju kao prirodni antioksidansi, slično tokoferolima. Imajući to u vidu može se konstatovati da jestiva nerafinisana ulja bogata pigmentima imaju određenu prednost u odnosu na rafinisana ulja gde su isti najvećim delom uklonjeni ili razloženi (Dimić, 2005).

Karotenoidi imaju važnu ulogu za ljudsko zdravlje jer deluju kao biološki antioksidansi i štite ćelije i tkiva od štetnog delovanja slobodnih radikala i nascentnog kiseonika. Sadržaj karotenoida se menja tokom skladištenja sirovine posle berbe, kao i za vreme obrade biljnog materijala i skladištenja gotovog proizvoda. Zbog svoje visoko nezasićene strukture, karotenoidi su skloni degradaciji tokom obrade i čuvanja. Posebno termičkom obradom može doći do promene sadržaja karotenoida, najčešće smanjenja, pri čemu je bitno i vreme delovanja i visina temperature obrade.

Međutim, termička obrada može biti i povoljna jer dolazi do razaranja ćelijskih zidova i membrana, što olakšava izdvajanje i solubilizaciju karotenoida (Maiani i sar., 2009).

Hlorofili su prirodni pigmenti u ulju i nosioci su zelene boje. Njihov sadržaj posebno varira tokom termičke obrade. Poznato je da na visokim temperaturama dolazi do termičkog razlaganja obojenih pigmenata, odnosno dolazi do smanjenja sadržaja i ukupnih hlorofila. Ispitivanjem uticaja termičke obrade na sadržaj pigmenata devičanskog ulja semena tikve golice (Bjelica, 2011) došlo se do zaključka da pri delovanju nižih temperatura u toku kraćeg vremena dolazi do slabijeg izdvajanja hlorofila iz biljnog materijala i njihovog prelaska u ulje. Ukoliko je vreme hidrotermičke obrade-pečenja semena dovoljno dugo i temperatura pečenja dovoljno visoka, hlorofili se intenzivnije izdvajaju, odnosno njihov sadržaj u ulju raste. Međutim, ukoliko je delovanje visokih temperatura produženo (duže vreme pečenja) dolazi do smanjenja sadržaja hlorofila, odnosno dolazi do njihove termičke razgradnje.

Prema ispitivanjima Lutterodt i sar, (Lutterodt i sar., 2011) u hladno presovanom ulju semenki crnog grožđa beta-karoten, lutein i zeaxantin nisu nađeni (Bjelica i Vujasinović, 2017).

2.9 MASNOKISELINSKI PROFIL I BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA

Pored osnovne funkcije obezbeđivanja energije, biljna ulja doprinose razvoju ukusa hrane, izvor su esencijalnih masnih kiselina, vitamina, kao i mnogih drugih bioaktivnih mikrokomponenti.

Najznačajnije komponente ulja semenki grožđa, na osnovu kojih se procenjuje njegova nutritivna vrednost, predstavljaju razna biološki aktivna jedinjenja. Ovde spadaju: specifične masne kiseline, fitosteroli, tokoferoli, tokotrienoli, fenolna jedinjenja, karotenoidi i dr. Ovi sastojci, iako su najvećim delom prisutni u veoma malim količinama u ulju, mogu imati povoljne efekte na ljudsko zdravlje, odnosno imaju veliki metabolički značaj u organizmu, ispoljavajući antioksidativno dejstvo,

antiradikalnu aktivnost, vitaminsko delovanje, zaštitni efekat i slično (Bjelica i Vujasinović, 2017; Vujasinović i sar., 2016).

Bioaktivna jedinjenja biljnih ulja su od velikog interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju zbog njihovih anti-inflamatornih, antikarcinogenih i antimutagenih efekata, kao i zbog njihove povezanosti sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Neki karotenoidi se vrednuju po aktivnosti pro-vitamina A (β -karoten) ili njihovoj zaštiti od makularne degeneracije (lutein) i brojne studije su izvršene da bi se uloga ovih jedinjenja procenila u hrani. Karotenoidi su takođe povezani sa važnim funkcionalnim svojstvima, posebno sa antioksidativnom aktivnošću i uključeni su u prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Assumpção i sar., 2016).

Svaka vrsta ulja pokazuje karakterističan sadržaj tokoferola, koji zavisi od genotipa biljke, klimatskih uslova i rasta useva, sadržaja polinezasićenih masnih kiselina i uslova prerade i skladištenja. Takođe, sadržaj tokoferola i tokotrienola u ulju semenki grožđa drugačiji je za svaku sortu vinove loze. Ulje semenki grožđa je dobar izvor tokoferola i tokotrienola, izomera vitamina E (Fernandes i sar., 2013; Pardo i sar., 2009). Zbog svojih antioksidativnih svojstava, ova jedinjenja inhibiraju procese peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina i drugih jedinjenja koja utiču na ćelijsku membranu, a sprečavaju i užeglost ulja tokom skladištenja (Assumpção i sar., 2016).

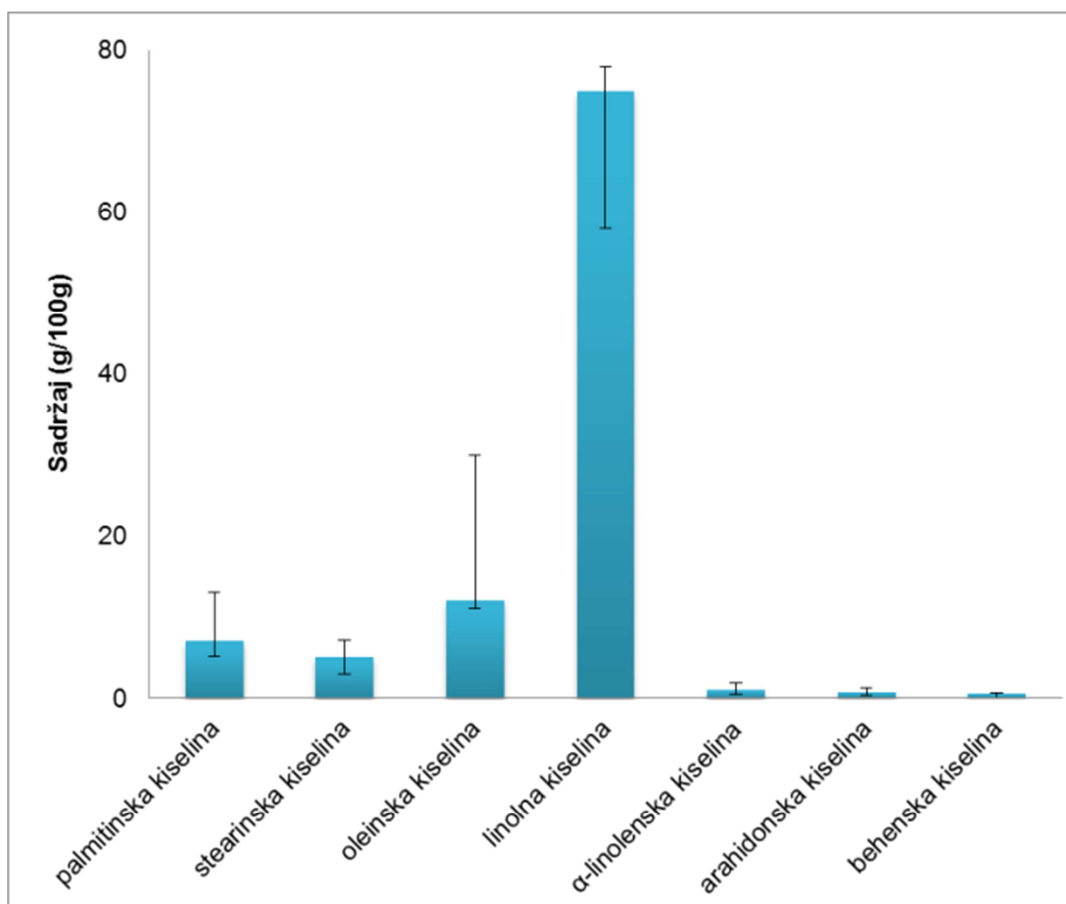
Važan argument za korišćenje ulja semenki grožđa u zdravstvenom pogledu je visok sadržaj oligomernih fenolnih jedinjenja (Matthäus, 2008). Takođe, ulje semenki grožđa obiluje i biljnim sterolima, iako postoje velike varijacije u sadržaju ovih jedinjenja u zavisnosti od sorte vinove loze (Lampi i Heinonen, 2009).

Ulje od semenki grožđa proučavano je kao mogući izvor posebnih lipidnih komponenti, poput esencijalne linolne masne kiseline (Vujasinović i sar., 2016).

2.9.1 Sastav masnih kiselina

Sastav masnih kiselina ulja je veoma važan faktor za kvalitet ulja. Odnos pojedinih masnih kiselina u ulju utiče na stabilnost ulja, kao i na ispoljavanje njene nutritivne vrednosti. Literaturni podaci ukazuju na značajne varijacije u sastavu masnih kiselina u ulju semenki grožđa, u zavisnosti od sorte vinove loze, geografskog porekla i načina dobijanja ulja (Lutterodt i sar., 2011; Vujašinić i sar., 2016). Međutim, može se reći da ulje iz semenki grožđa pripada biljnim uljima sa veoma visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina i ima sličan sastav kao i suncokretovo ulje (Matthäus, 2008). Prema rezultatima prikazanim u tabeli 3, ukupan sadržaj nezasićenih masnih kiselina kreće se do 90%, pri čemu je najveći sadržaj esencijalne linolne, n-6 masne kiseline. Značajne razlike u sadržaju linolne kiseline javljaju se u zavisnosti od vrste ulja (hladno presovanog ili rafinisanog), sorte vinove loze, kao i načina dobijanja (pripreme) semenki za proizvodnju hladno presovanih ulja. Sadržaj zasićenih masnih kiselina od oko 10% je samo malo veći nego kod uljane repice, ali sličan kao kod drugih uobičajeno korišćenih jestivih biljnih ulja. Ostale masne kiseline prisutne su samo u malim količinama.

Ovi rezultati su u skladu i sa drugim podacima iz literature (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006; Kamel i sar., 1985). Grupa autora (Beveridge i sar., 2005) su ispitujući 7 ulja od semenki grožđa različitih sorti utvrdili udeo linolne kiseline od 66,8–73,6%. Takođe su utvrdili i sadržaj oleinske kiseline od 12% do 19%, kao i sadržaj palmitinske i stearinske kiseline od 6,28% do 8,62% i od 3,60% do 5,26%, respektivno. Neki autori su, međutim objavili veće ili manje vrednosti u zavisnosti od sorte vinove loze i porekla semenki i načina izdvajanja ulja. Sastav masnih kiselina hladno presovanih ulja od semenki grožđa različitih sorti iz SAD (Spooner, Wisconsin), (Lutterodt i sar., 2011), pokazuje sadržaj oleinske kiseline od 13,9-21,9 g/100g i sadržaj linolne kiseline, 66,0-75,3 g/100g. Hussein i Abdrabba (2015) pronalaze 55,3% linolne i 25,81% oleinske kiseline u ulju dobijenom iz semenki grožđa Sultana Cultivar iz regije El-Gabal-Al-Akhader iz grada EL-Bieda, Libija. El-shami i Mohamed (1992) u uljima poreklom iz Egipta otkrili su veći sadržaj oleinske kiseline. Rezultati koje su predstavili Crews i saradnici (2006) pokazali su različite odnose prisutnih masnih kiselina u ulju grožđa iz Francuske, Italije i Španije.



Slika 14. Sastav masnih kiselina ulja od semenki grožđa (Matthäus, 2008)

Slika 14 i tabela 3 pokazuju varijabilnost glavnih masnih kiselina ulja semenki grožđa. Može se reći da je sa ovakvim masno-kiselinskim profilom ulje od semenki grožđa veoma slično suncokretovom ulju koje sadrži 60-70% linolne kiseline i 15-25% oleinske kiseline, kao i veoma male količine alfa-linolenske kiseline (Matthäus, 2008).

Iz podataka prikazanih u tabeli 3 vidi se da je sadržaj esencijalne n-3, α-linolenske kiseline mali, a da je n-6 linolna kiselina prisutna u značajnoj količini. To daje veoma visok odnos n-6/n-3, što nije povoljno sa nutritivnog aspekta (Radočaj i Dimić, 2013). Prema Matthäus-u (2008), unos linolne kiseline ubrzava upalne procese, dok α-linolenska kiselina utiče na njihovo smanjenje, što je veoma važno za lečenje inflamatornih bolesti. Takođe, neke studije sa eksperimentalnim životinjama su

pokazale da prekomerne količine linolenske kiseline promovišu kancerogenezu (Kubow, 1990).

Tabela 3. Profil masnih kiselina ulja semenki grožđa prema raznim autorima

Sastav masnih kiselina ulja semenki grožđa različitih sorti (g/100g)								
Izvor	(Lutterodt i sar., 2011)				(Pardo i sar., 2009)			
Sorta	Ruby red	Muscadine	Concord	Chardonnay	Monastrell	Garnacha Tintorera	Petit Verdot	Syrah
C 14:0					0,04	0,08	0,07	0,06
C 16:0	7,10	7,70	7,05	7,75	7,86	8,47	9,19	7,95
C 16:1								
C 18:0	4,24	4,72	2,52	3,63	5,75	5,75	4,70	4,42
C 18:1	21,9	15,4	13,9	19,3	18,43	18,43	16,07	21,84
C 18:2	66,0	70,2	75,3	68,8	67,11	67,11	69,16	64,53
C 18:3	0,29	1,14	0,41	0,25	0,36	0,36	0,45	0,64
C 20:0	0,15	0,15	<0,1	<0,1	0,21	0,21	0,18	0,17
C 20:1	0,18	0,59	0,57	0,12				
C 20:4	<0,1	0,12	0,12	<0,1				
SFA	11,5	12,6	9,6	11,4	13,9	14,5	14,1	12,6
MUFA	22,1	16,0	14,5	19,4	18,4	18,4	16,1	21,8
PUFA	66,3	71,5	75,8	69,1	67,5	67,5	69,6	65,2
Izvor	(Ovcharova i sar., 2016)				(Hassanien i sar., 2014)	(Bjelica i Vujasinović, 2017)		
Sorta	Bolgar	Superan Bolgar	Mavroud	Široka melniška loza		HPU semenki belog grožđa	HPU semenki crnog grožđa	Rafinirano ulje
C 14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,04			
C 16:0	11,5	8,8	8,8	10,0	8,62	6,15	7,15	9,44
C 16:1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,65			
C 18:0	1,0	0,8	1,0	0,7	4,4	4,46	4,24	4,76
C 18:1	17,6	17,3	18,7	16,3	16,77	14,69	15,93	17,92
C 18:2	68,5	72,2	70,1	71,3	66,6	74,7	72,38	66,42
C 18:3	0,3	<0,1	0,2	0,5	2,41			
C 20:0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,06	<0,1	0,11	0,20
C 20:1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,07	<0,1	0,11	0,13
C 20:4								
SFA	12,8	9,8	9,9	10,8	13,1	10,6	11,5	14,4
MUFA	17,9	17,5	19,0	16,9	17,5	14,7	16,0	18,1
PUFA	68,8	72,2	70,3	71,8	69,0	74,7	72,4	66,4

HPU-hladno presovano ulje; SFA-zasićene masne kiseline; MUFA-mononezasićene masne kiseline; PUFA-polinezasićene masne kiseline

Pre nekoliko godina biljna ulja sa visokim sadržajem linolne kiseline imala su prednost u ljudskoj ishrani zbog pozitivnog efekta na smanjenje ukupnog nivoa holesterola u krvi kao i LDL holesterola. Danas, međutim, ova masna kiselina se smatra još kompleksnijom. Važna činjenica je da je linolna kiselina znatno osetljivija na oksidaciju nego mononezasićena oleinska kiselina. Pošto su monoenske masne kiseline prvenstveno integrisane u LDL česticama, veći unos oleinske kiseline rezultuje manjim stepenom oksidacije LDL-holesterola koji je odgovoran za formiranje ateroskleroze. Sa druge strane, esencijalne masne kiseline linolna i linolenska konvertuju se u različita hormonima slična jedinjenja, takozvane eikosanoide, daljim uvođenjem dvostrukih veza i produžavanjem ugljovodoničnog lanca. Eikosanoidi kontrolišu različite procese u organizmu i javljaju se kao posrednici u pojedinim metaboličkim procesima. Eikosanoidi koji potiču od linolne kiseline učestvuju u zgrušavanju krvi, dok eikosanoidi koji su formirani od α -linolenske kiseline pokazuju suprotan efekat, Važno je istaći i da su eikosanoidi iz linolne kiseline dominantni prilikom posredovanja u upalnim procesima za razliku od onih koji su sintetisani iz α -linolenske kiseline. Unos linolne kiseline pospešuje upalne procese, dok α -linolenska kiselina prilikom ishrane utiče na smanjenje istih. Ovo je veoma važno za lečenje upalnih oboljenja, na primer reumatoidnog artritisa (Liepa i sar., 2000; Matthäus, 2008; Vujasinović i sar., 2016)

Naučna javnost je tek od 2000. godine počela da ističe razliku između „zdravih“ i „nezdravih“ ulja/masti i postalo je jasno da je mnogo važnije pitanje vrste, a ne sadržaj masti u ishrani. Svi nutricionistički vodiči od 2005. godine preporučuju da unos masti treba biti na onom nivou koji će obezbediti 20-35% od ukupnih energetske potreba organizma, a pri tom treba da su izvor PUFA i MUFA masnih kiselina (riblja ulja, ulja jezgrastog voća i biljna ulja). Ovo je veoma značajno jer se zvanično prvi put prepoznaju zdrave masti u vodičima za pravilnu ishranu (Shukla, 2003).

Od 2010. godine vodiči ishrane predlažu zamenu zasićenih masti (masti sa pretežno zasićenim masnim kiselinama u sastavu) sa MUFA i PUFA uljima, u smislu da energetska potreba organizam od zasićenih masti obezbeđuje na nivou od svega 10%, sa tendencijom daljeg smanjenja do 7%. Preporuke za svakodnevnu

konzumaciju masnoće su dosta različite u raznim delovima sveta i imaju svoje specifičnosti, međutim sve zemlje su saglasne za smanjenje ukupnog unosa, a naročito zasićenih masnih kiselina. Posebne preporuke vezane za svakodnevni alimentarni unos masti u Evropskoj Uniji su sledeće:

- unos zasićenih masnih kiselina treba da je što niži;
- 4% od ukupnih energetske potrebe je zadovoljavajući nivo za unos linolne (omega-6) masne kiseline;
- 0,5% od ukupnih energetske potrebe je zadovoljavajući nivo za unos alfa-linolenske (omega-3) masne kiseline (Piller, 2011).

2.9.2 Tokoferoli i tokotrienoli

Tokoferoli i tokotrienoli su značajni sastojci biljnih ulja, pa tako i ulja semenki grožđa, Tokoferoli spadaju u grupu prirodnih antioksidanasa fenolnog tipa, Njihov doprinos ogledava se u usporavanju procesa oksidacije ulja i masti, a u organizmu sprečavaju, odnosno, blokiraju štetno dejstvo slobodnih radikala (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996).

Osnovna razlika između tokoferola i tokotrienola je u zasićenosti bočnog lanca, Poliizoprenski lanac sa 16 ugljenikovih atoma kod tokoferola je zasićen, a kod tokotrienola su u lancu prisutne tri nezasićene dvostruke veze. Izomerni oblici tokoferola i tokotrienola, koji se označavaju kao α , β , γ , i δ se međusobno razlikuju po broju i položaju metil grupa, Pojedini tokoferoli se bitno razlikuju po biološkom i antioksidativnom delovanju, pri čemu je biološki aktivitet u obrnutoj srazmeri sa antioksidativnim dejstvom. Najbolje vitaminsko dejstvo pokazuje α -tokoferol, koji je i dobio naziv **vitamin E**, dok najsnažnije antioksidativno dejstvo imaju δ -i γ -tokoferol (Atkinson i sar., 2008; Dimić, 2005; Seppanen i sar., 2010).

U poređenju sa drugim uljima ulje semenki grožđa sadrži dosta tokoferola i tokotrienola. Ukupan sadržaj ovih jedinjenja znatno je veći u hladno presovanim uljima nego u rafinisanom, gde se njihov sadržaj redukuje tokom rafinacije. Visok nivo tokoferola, koji osigurava značajnu oksidativnu stabilnost ulja semenki grožđa,

zavisi od klimatskih uslova, uslova gajenja, prerade i skladištenja sirovine (Assumpção i sar., 2016). Ulje semenki grožđa predstavlja ulje u kome su u velikoj meri zastupljeni i tokotrienoli, a kao dominantni javlja se γ -tokotrienol (Lampi i Heinonen, 2009). Sadržaj α -tokotrienola, kao i α -, β - i γ -tokoferola je relativno mali (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006).

Tabela 4. Sastav tokoferola i tokotrienola u ulju semenki grožđa (Shinagawa i sar., 2015)

Sadržaj (mg/kg)	Navas (2009)	Fernandes i sar. (2013)	Crews i sar., 2006		
			Francuska	Italija	Španija
α -tokoferol	47 – 56	86 – 244	18 – 229	14 – 160	trag. – 75
β -tokoferol	38 – 48	nd	nd – 109	nd – 133	nd – 127
γ -tokoferol	17 – 29	3 – 28	nd – 61	nd – 119	nd – 168
Δ -tokoferol	nd – 3	trag. – 1	nd – 47	nd	nd – 69
α -tokotrienol	216 – 278	69-319	nd – 163	nd – 352	nd – 60
β -tokotrienol	-	4 – 18	nd – 67	nd – 22	nd – 125
γ -tokotrienol	482 – 556	499 – 1575	nd – 500	nd – 785	nd – 399
Δ -tokotrienol	13 – 17	6 – 18	nd	nd	nd – 82

nd – nije detektovan

Ukupan sadržaj tokoferola i tokotrienola u osam uzoraka ulja semenki grožđa prema Beveridge i saradnici (2005) kreće se od 600 do 1000 mg/kg ulja, dok sadržaj tokoferola i tokotrienola u uzorcima ove vrste ulja iz 3 različite zemlje prema Crews i sar. (2006) (tabela 4) iznosi od 60 do 1210 mg/kg, što ukazuje na varijacije među sortama i u proizvodnom poreklu. Matthäus (2008) je u devičanskom ulju semenki grožđa našao 100 mg α -tokoferola/kg, kao i 350 mg tokotrienola/kg ulja. Tokotrienoli takođe pokazuju izvesnu biološku i antioksidativnu aktivnost, ali slabijeg intenziteta od tokoferola. U poređenju sa drugim jestivim uljima, ukupan iznos aktivnih komponenti vitamina E (aktivnost svih izomernih oblika tokoferola i tokotrienola izražen kao α -tokoferol) u ulju semenki grožđa je znatno niži. Dok ulje semenki grožđa sadrži oko 500 mg aktivnih komponenti vitamina E u kg ulja, repičino i sojino ulje sadrže 700 i 1500 mg/kg (Vujasinović i sar., 2016).

Prema Kim i saradnici (2008), ukupan sadržaj tokoferola i tokotrienola u tri uzorka ulja od semenki grožđa kretao se od 628 do 748 mg/kg, od čega sadržaj α -tokoferola iznosio od 151 do 237 mg/kg.

U Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti (Pravilnik, 2006) za ulje semenki grožđa definisan je ukupan sadržaj tokoferola i tokotrienola od 240-410 mg/kg.

2.9.3 Steroli

Steroli (visokomolekularni ciklični alkoholi) su grupa jedinjenja sa osnovnom strukturom ciklopentanofenantrena. Steroli prisutni u biljnim uljima nazivaju se fitosterolima i predstavljaju glavne frakcije neosapunjivih materija. Sadržaj sterola u biljnim uljima se kreće od 0,03 do 1,0%. Najrasprostranjeniji fitosteroli su: campesterol, stigmasterol i sitosterol (Dimić, 2005).

Sadržaj neosapunjivih materija u ulju semenki grožđa, od kojih su najzastupljeniji steroli i tokoferoli, kreće se između 0,8 i 1,5% (Malićanin, 2014).

Steroli imaju blagotvoran efekat na prevenciju ateroskleroze i koronarnih srčanih oboljenja smanjenjem nivoa holesterola u plazmi. El-shami i Mohamed (1992) i Fedeli i saradnici (1966) navode da je dominantni sterol u frakciji sterola β -sitosterol sa sadržajem oko 70% (73,8%), zatim stigmasterol (13,7%) i kampesterol (10,6%). Piironen i saradnici (2003) našli su da je ukupna količina sterola u suvoj komini 1390 mg/kg, a glavni sastojci su β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol. Prema istraživanjima grupe autora (Madawala i sar., 2012) sadržaj ukupnih sterola u ulju semenki grožđa iznosi 2665 μ g/g, odnosno oko 0,27%, a sterolna frakcija sadrži 0,5% brasikasterola, 10,3% kampesterola, 9,2% stigmasterola, 74,9% β -sitosterola, 5,1% 5-avenasterola, dok holesterol nije detektovan. U ulju od semenki grožđa bugarskih sorti Super ran bolgar, Bolgar, Mavroud i Široka melniška loza nađen je ukupan sadržaj sterola u količini od 0,3-0,4%, dok je, očekivano, najveći deo sterola (više od 90%) bio u slobodnom obliku. Utvrđeno je da je količina slobodnih sterola

viša u odnosu na suncokretovo ulje, kao i ulje semena paradajza gde je taj sadržaj oko 70-75% (Ovcharova i sar., 2014).

Crews i saradnici (2006) našli su da se ukupan sadržaj sterola u ekstrahovanom ulju od semenki grožđa iz Francuske kreće od 3233-11251 mg/kg, u ulju od semenki grožđa iz Italije 2576-9612 mg/kg, a u ulju od semenki grožđa iz Španije 4449-8492 mg/kg. Njihovi rezultati potvrdili su da je β -sitosterol glavni sterol pronađen u ulju semenki grožđa i to u količini od 66,9-77,4%. U relativno većim količinama prisutni su kampesterol (6,6-10,2%) i stigmasterol (5,4-12,3%), dok je sadržaj stanola (2,4-4,8%), Δ^5 -avenasterola (0,3-4,5%), Δ^7 -stigmasterola (0,4-4,3%) i Δ^7 -avenasterola (0,2-1,6%) nizak, što je veoma slično sa rezultatima do kojih je došao i Matthäus (2008).

U tabeli 5 prikazan je udeo desmetilsterola u ukupnim sterolima za nerafinisano ulje semenki grožđa prema našim zakonskim propisima (Pravilnik, 2006).

Tabela 5. Udeo desmetilsterola u ukupnim sterolima nerafinisanog ulja semenki grožđa (Pravilnik, 2006)

Naziv	Sadržaj/Udeo (%)
Holesterol	nd – 0,5
Brasikasterol	nd – 0,2
Kampesterol	7,5 – 14,0
Stigmasterol	7,5 – 12,0
Beta-sitosterol	64,0 – 70,0
Delta-5-avenasterol	1,0 – 3,5
Delta-7-stigmasterol	0,5 – 3,5
Delta-7-avenasterol	0,5 – 1,5
Ostalo	nd – 5,1
Ukupni steroli (mg/kg)	2,000 – 7,000

nd – Nedetektovan, prema određivanju $\leq 0,05\%$

2.9.4 Fenolna jedinjenja

Fenolne materije su posebno važna biološki aktivna jedinjenja. Veoma su rasprostranjena i poznat je veliki broj fenolnih jedinjenja, koja spadaju u proizvode sekundarnog metabolizma biljaka. U širem smislu nazivaju se polifenolima. Po svojoj strukturi međusobno se znatno razlikuju. Mogu biti jednostavni molekuli, kao što su fenolne kiseline, ili pak visoko polikondenzovana jedinjenja, kao što su tanini. Iako se radi o veoma heterogenoj grupi jedinjenja, osnovno obeležje svih polifenola je prisutnost jedne ili više hidroksilnih grupa vezanih za aromatični prsten (Berend i Grabarić, 2008; Boskou, 2006; Pićurić-Jovanović i Milovanović, 2005; Vujasinović, 2011; Vujasinović i sar., 2016).

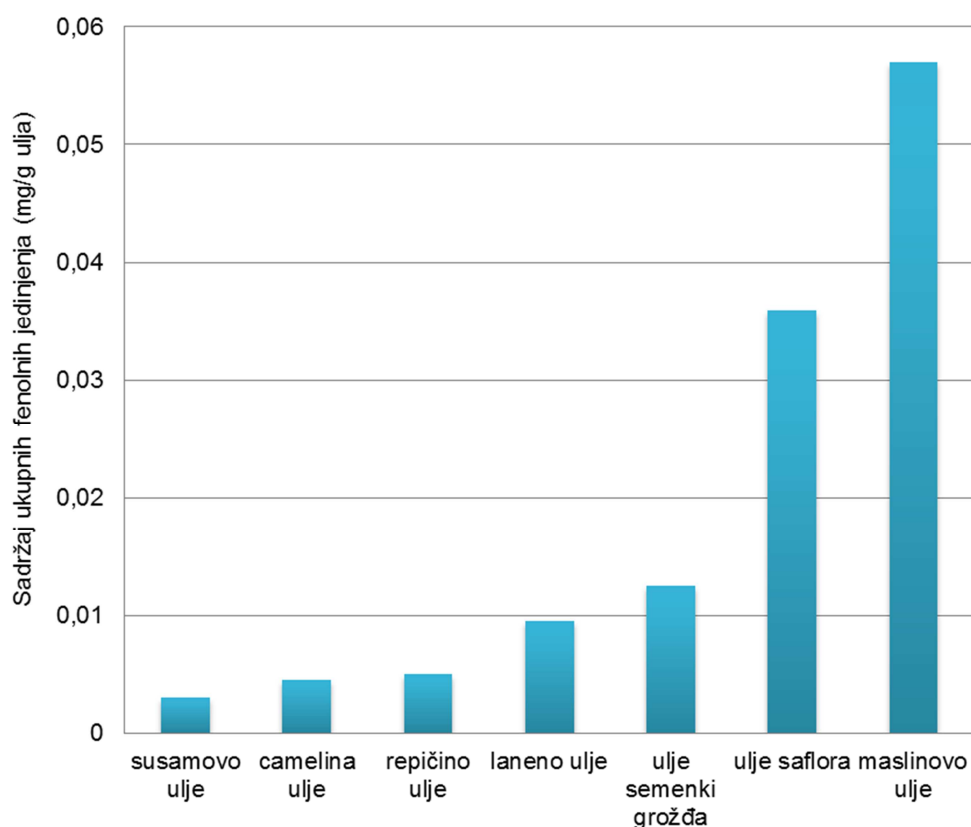
Ova grupa jedinjenja ima važnu fiziološku i morfološku ulogu. Pored toga što doprinose boji i senzorskim karakteristikama imaju antioksidativna i druga važna svojstva, kao što su hormonska, antikancerogena, kardioprotektivna, antimikrobna i antivirusna (Berend i Grabarić, 2008).

Tokom sazrevanja u bobicama grožđa dolazi do brzog nakupljanja fenolnih jedinjenja (Malićanin, 2014). Downey i saradnici (2003) ističu da seme sadrži oko 60% ukupnih fenolnih jedinjenja grožđa, stabljika oko 20%, dok je sadržaj ovih jedinjenja u ljusci (opni) u rasponu od 15-20%. Prema Kovaču i saradnicima (1995) polifenoli u grožđu su prisutni u pulpnoj bobici sa samo 10% ili manje, sa 60-70% u semenu i od 28-35% u ljusci. Sadržaj polifenola u semenu kreće se od 5 do 8% njegove mase. Iako je sadržaj polifenola u semenkama grožđa dominantan, njihov sadržaj u ulju je mali. To je zato što za vreme procesa presovanja samo mala količina polifenola prelazi u ulje (oko 10 mg/kg), dok najveći deo zaostaje u pogači. Sadržaj polifenola u pogači je 2000 puta veći i posledica je njihove ograničene rastvorljivosti u uljima (Dimić, 2005; Matthäus, 2008). Niže vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja u uljima mogu se objasniti niskom rastvorljivošću fenola niske molekulske mase u uljima u kombinaciji sa vezivanjem nekih fenolnih kiselina sa semenom (Matthäus, 2002; Matthäus, 2008). Sastav polifenola ulja semenki grožđa je veoma složen. Izolovani su katehin, epikatehin i epikatehin-3-O-galat, kao monomerni flavanoli, kao i različiti oligomerni proantocijanidini (Matthäus, 2008).

Različiti načini dobijanja ulja uslovljavaju i razlike u sadržaju polifenola. Tako na primer, rafinisana ulja imaju znatno niži sadržaj fenolnih materija od hladno presovanih (Malićanin, 2014; Vujašinović, 2011). Polifenolni profil ulja semenki grožđa može biti pod uticajem i drugih varijabli, kao što su različite sorte vinove loze i uslovi gajenja, odnosno klimatski uslovi, a ne samo procedure ekstrakcije (Cicero i sar., 2018).

Pardo i saradnici (2009) su ispitivali hladno presovana ulja semenki grožđa različitih sorti i zaključili da je mala oksidativna stabilnost, najverovatnije, posledica malog sadržaja fenolnih jedinjenja.

Kada se poredi sa maslinovim uljem, količina polifenola u ulju semenki grožđa nije naročito visoka, međutim u odnosu na neka druga ulja njihov sadržaj nije zanemarljiv (slika 15).



Slika 15. Sadržaj fenolnih jedinjenja u različitim devičanskim biljnim uljima (Matthäus, 2008)

Lutterodt i saradnici (2011) ispitivali su ulja i brašna od semenki grožđa i našli su da je sadržaj ukupnih fenola u uljima od 0,16-0,80 mgGAE/g, a u brašnima (pogači) od 5,93-89,6 mgGAE/g (GAE – ekvivalent galne kiseline).

Hladno presovana ulja semenki grožđa prema Siger i saradnicima (2008) imaju najniži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (5,1 mg/kg), u poređenju sa 12 mg/kg u hladno presovanom suncokretovom ulju, 14,8 mg/kg u sojinom ulju, 13,1 mg/kg u ulju od uljane repice ili 24,6 mg/kg u ulju semena tikve.

Demirtas i saradnici (2013) našli su da se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uljima od semenki grožđa turskih sorti vinove loze, dobijenim na pužnoj presi, kreće u rasponu od 21,9 do 47,0 mg GAE/kg.

Prema Malićaninu i saradnicima (2014), vrednosti sadržaja ukupnih fenola kretale su se u rasponu od 17,0 do 63,1 mg/kg u uljima od semenki grožđa dobijenim ekstrakcijom ultrazvukom. Veći sadržaj ukupnih fenola nađen je u uzorcima ulja sa dužim vremenima ekstrakcije.

Cicero i saradnici (2018) ispitali su hemijske karakteristike raznih hladno presovanih i devičanskih ulja iz brazilskog regiona Minas Gerais. Našli su da hladno presovano ulje od semenki grožđa ima najniži sadržaj ispitivanih polifenola. Najveći sadržaj detektovan je kod galne kiseline (2,97 mg/kg), zatim kod flavonoida apigenin 7-glukozida (0,74 mg/kg) i luteolina (0,63 mg/kg), kao i fenolnih kiselina, p-kumarinske (0,19 mg/kg) i kafeinske (0,27 mg/kg).

2.10 NUTRITIVNA SVOJSTVA ULJA SEMENKI GROŽĐA

Sa nutritivnog aspekta ulje semenki grožđa se može koristiti u funkcionalnoj ishrani jer poseduje razna bioaktivna jedinjenja. Ono sadrži vitamin E (tokoferole), koji su važni inhibitori oksidacije lipida u hrani i biološkim sistemima, zatim fenolna jedinjenja i masne kiseline, posebno linolnu masnu kiselinu (Assumpção i sar., 2016) koja se smatra esencijalnom masnom kiselinom jer je telo ne sintetiše, a učestvuje u transportu kiseonika u krvnu plazmu i u proizvodnji hemoglobina (Gauer i sar., 2018).

Literaturni podaci pokazuju da vitamin E povećava efikasnost uklanjanja holesterola od strane monocita. Ovo svojstvo povezano je sa prevencijom ateroskleroze, sprečavanjem nagomilavanja plakova na zidovima krvnih sudova, koji uzrokuju mnoge kardiovaskularne problem. Takođe, alimentarni unos nezasićenih masnih kiselina povezana je sa smanjenjem kardiovaskularnih bolesti, raka, hipertenzije i autoimunih poremećaja (Binzer i sar., 2011).

Istraživanja Ben Mohamed i saradnika (2016) pokazala su da količina bioaktivnih supstanci u ulju semenki grožđa u velikoj meri zavisi od sorte, a da je u određenoj meri zavisna i od načina izdvajanja ulja. Do ovih rezultata došli su i Rombaut i saradnici (2015). Njihovi rezultati su pokazali da tip semenki grožđa ima najveći uticaj na prinos ulja i ukupan sadržaj polifenola u ulju. Ulje od semenki grožđa je dobar izvor tokola, naročito α -tokoferola i α - i γ -tokotrienola. Dokazane su i značajne pozitivne korelacije između lipofilne antioksidativne aktivnosti, sadržaja karotenoida, ukupnih tokoferola i tokotrienola i sadržaja hlorofila (Ben Mohamed i sar., 2016). Dominantni sterol u ulju semenki grožđa čini β -sitosterol (Demirtas i sar., 2013).

Mada se u ulju od semenki grožđa nalaze u malim količinama, značajnu nutritivnu i biološku vrednost ovog ulja čine i polifenoli (kao što su fenolne kiseline, flavan-3-ols ili kondenzovani tanini) (Davidov-Pardo i McClements, 2015). Ova jedinjenja deluju kao hvatači slobodnih radikala, imaju ulogu u smanjenju oksidativnog stresa i mogu biti odgovorna za smanjenje učestalosti srčanih bolesti (Matthäus, 2008).

Postoje brojni literaturni navodi o prednostima potrošnje ulja od semenki grožđa za zdravlje ljudi, kao što je smanjenje biohemijskih parametara krvi, tako da se može reći da ulje od semenki grožđa predstavlja obećavajuće alternativno biljno ulje u lečenju hiperholesterolemije (Shinagawa i sar., 2015).

2.11 ODRŽIVOST ULJA SEMENKI GROŽĐA

Kvalitet ulja, iz nutritivne i zdravstvene perspektive u pogledu profila i sadržaja masnih kiselina, veoma je važan za savremenu ishranu širom sveta. Nedavno je korišćen i sadržaj esencijalnih masnih kiselina za određivanje nutritivnog kvaliteta

ulja. Uopšteno, poželjan je veći sadržaj mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Međutim, što je viši stepen nezasićenosti ulja, to su ulja više podložna oksidativnom kvarenju. Pored toga, minorne komponente ulja, kao što su fenoli i tokoferoli, igraju važnu ulogu u zaštiti ulja od oksidacije (Hassanien i sar., 2014; Radočaj i Dimić, 2013). Podaci o sastavu masnih kiselina daju samo indikativne informacije o oksidativnoj stabilnosti ulja. Dodatak ili prirodno prisustvo antioksidativnih komponenti i njihova sinergistička snaga u ulju ima snažan uticaj na termičku stabilnost ulja (Gertz i Kochhar, 2001).

Za procenu oksidativne stabilnosti ulja često se koristi Rancimat test. To je metoda ubrzanog starenja, tj. ubrzane oksidacije ulja izazvane pod specifičnim uslovima (povišene temperature i prisustvo kiseonika). Dobijeni rezultat koji se izražava u vidu indukcionog period karakteriše oksidacionu stabilnost ulja i masti.

Literaturni podaci za indukcionu period ulja od semenki grožđa se veoma razlikuju, a to se prvenstveno ogleda u različitim uslovima za izvođenje eksperimenta (temperatura i protok vazduha). Madawala i saradnici (2012) su pri temperaturi od 100°C i protoku vazduha od 20l/h, utvrdili da je indukcionu period za ulje od semenki grožđa 8,9h, dok je za ulje oraha utvrđena vrednost od 4,2h, za bademovo ulje 10,2h, ulje lešnika 16h, a za ulje avokada 16,9h. Lutterodt i saradnici (2011) navode da se indukcionu period za ulje od semenki grožđa različitih sorti, pri temperaturi od 80°C i protoku vazduha od 7 l/h, kreće u rasponu od 19,7 do 40 h.

S obzirom na to da ulje semenki grožđa ima veoma sličan sastav masnih kiselina sa suncokretovim uljem (Bjelica i Vujasinović, 2017; Matthäus, 2008), kao i da sadrži značajne količine tokoferola (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006; Matthäus, 2008), može se pretpostaviti da je održivost ovog ulja slična suncokretovom.

U tabeli 6 prikazani su rezultati oksidativnog stanja nekih jestivih ulja.

Tabela 6. Oksidativno stanje i održivost različitih jestivih nerafinisani ulja (Dimić, 2000; Dimić i sar., 2008; Madawala i sar., 2012)

Vrsta ulja	Pbr (mmol/kg)	Abr	Oksidativna vrednost (Totox)	Indukcioni period (h pri 100°C)
Bademovo ulje	1,1	12,6	14,8	10,2
Lešnikovo ulje	1,1	7,5	9,7	16,0
Orahovo ulje I	0,9	3,9	5,7	4,2
Orahovo ulje II	0,49	4,25	5,23	5,45
Ulje avokada	1,2	1,2	3,6	16,9
Ulje semenki grožđa	1,0	15,5	17,5	8,9
Susamovo ulje I	0,6	10,9	12,1	18,0
Susamovo ulje II	1,67	0,68	4,02	36,55
Suncokretovo ulje	1,84	0,37	4,05	8,28
Hladno presovano ulje semena tikve	1,61	3,27	6,49	22,80
Devičansko ulje semena tikve	0,56	0,96	2,08	18,30
Sojino ulje	2,95	2,13	7,03	8,77

3. ZADATAK RADA

Kao što je navedeno u Uvodu i Pregledu literature, može se konstatovati da je iskorišćenje nusproizvoda pri preradi grožđa odavno postalo potreba u smislu proizvodnje novog proizvoda umesto kreiranja otpada. Iskorišćenje otpada od grožđa, uključujući semenke izuzetno je važno, kako sa ekološkog, tako i ekonomskog aspekta. Izdvajanje ulja postupkom ekstrakcije organskim rastvaračem, zbog malog sadržaja ulja u semenkama, je najefikasnija metoda za dobijanje ulja od semenki grožđa. Međutim, u novije vreme prirodna jestiva nerafinisana ulja su sve više tražena na tržištu. Iz tih razloga, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije vezana su za definisanje senzorskog i hemijskog kvaliteta, karakteristika boje, sadržaja i sastava bioaktivnih komponenata i oksidativne stabilnosti hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa koje nastaju kao otpad u različitim fazama proizvodnje u vinarijama. U skladu sa navedenim, glavni deo istraživanja je fokusiran na sagledavanju mogućnosti iskorišćenja otpada i stvaranju nove vrednosti kroz proizvodnju visoko vrednog proizvoda – hladno presovanog ulja od semenki grožđa.

U dostupnoj literaturi nema podataka o sagledavanju kvaliteta semenki grožđa dobijenih kao otpad iz različitih faza tehnološkog postupka pri preradi grožđa u vinarijama, kao ni o kvalitetu hladno presovanih ulja proizvedenih iz takvih semenki.

S obzirom na mesta generisanja otpada u vinarijama, semenke grožđa je moguće prikupiti pre alkoholne fermentacije kljuka (otpad pri proizvodnji belih i roze vina), posle fermentacije kljuka (otpad pri proizvodnji crnih vina) i posle fermentacije i destilacije komine (iz džibre koja nastaje prilikom pečenja rakije). Predpostavka je da se od tako prikupljenih semenki dobija hladno presovano ulje različitih karakteristika. Cilj ovog rada je da se sagledaju razlike koje nastaju pri proizvodnji hladno presovanih ulja od semenki grožđa, kao sirovine različitog kvaliteta. Posmatraće se razlike između semenki i ulja dobijenog od iste sorte grožđa od otpada iz različitih faza tehnološkog postupka u vinarijama, zatim razlike između semenki i ulja dobijenih od crvenih i belih sorti grožđa, kao i razlike između semenki i ulja dobijenih od dve bele sorte grožđa. Za očekivati je da postoje razlike, kako u kvalitetu semenki, tako i hemijskom kvalitetu, senzorskim karakteristikama i nutritivno vrednim sastojcima izdvojenih ulja. Dobijeni rezultati treba da pokažu da li je i u kojem meri moguće

iskoristiti svu raspoloživu sirovinu dobijenu iz otpada u vinarijama za proizvodnju visoko vrednog hladno presovanog ulja semenki grožđa.

Za realizaciju postavljenog cilja, rad na izvođenju ove disertacije obuhvatio je sledeće faze:

3.1 Ispitivanje kvaliteta semenki grožđa

U okviru ove faze proveren je kvalitet semenki grožđa kroz određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija, kiselinskog i peroksidnog broja. Takođe, određen je i sadržaj ulja u semenkama. U okviru sagledavanja potencijalnih razlika između semenki belog i crnog grožđa, kao i razlika između različitih sorti vinove loze u okviru belog grožđa ispitane se tehničko-tehnološke karakteristike semenki i to masa 1000 zrna, litarska masa i specifična masa, koje su bitne karakteristike pri manipulaciji sa semenkama.

3.2 Senzorska analiza i karakterizacija boje ulja

U okviru ove faze izvršena je senzorska analiza ulja na bazi izgleda, boje, mirisa i ukusa, odnosno, arome. Takođe, izvršena je i karakterizacija boje ulja što je posebno važan segment potrošačkog kvaliteta. Određivane su frakcije pigmenata, karotenoidi i hlorofili, merena je transparentija, a parametri boje ulja određivani su i instrumentalno.

3.3 Ispitivanje nutritivne vrednosti ulja

U cilju sagledavanja nutritivnih vrednosti ulja vršena je analiza sastava masnih kiselina i određen je jodni broj. Obzirom da su nutritivna svojstva ulja uslovljena vrstom i količinom prisutnih bioaktivnih komponenata, određen je sadržaj i sastav tokoferola i fenolnih jedinjenja, kao i sastav sterola. Budući da ova jedinjenja ispoljavaju značajne antioksidativne aktivnosti izvršeno je i ispitivanje antiradikalne aktivnosti uzoraka.

3.4 Ispitivanje održivosti ulja

Održivost uzoraka ispitana je na bazi početnog oksidativnog stanja, kao i rezultata ubrzanih testova, kao što je Rancimat test. Osim toga izvršeno je ispitivanje stabilnosti ulja pod uticajem umerenih temperatura, 63 ± 2 °C, kao i pri uslovima izlaganja fluorescentom svetlu, odnosno, ispitana je fotostabilnosti ulja.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1 MATERIJAL

4.1.1 Sakupljanje otpadnog materijala u vinarijama

Za potrebe eksperimentalnog dela rada vršeno je sakupljanje otpadnog materijala u vinarijama na obroncima Fruške gore. Otpadni materijal sakupljan je sa ciljem izdvajanja semenki grožđa za potrebe proizvodnje ulja. Materijal je sakupljan prilikom redovne proizvodnje i prerade grožđa iz berbe 2016. god. u vinarijama. Obzirom na plan istraživanja i zastupljenost sorti vinove loze na fruškogorskom vinogorju, prikupljane su semenke crnog grožđa sorte Merlot, semenke belog grožđa sorte Italijanski rizling i semenke belog grožđa autohtone sorte Sila (novostvorena sorta razvijena na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu). Mesta generisanja otpada iz kog su izdvajane semenke su bila pre fermentacije kljuka, prilikom proizvodnje belih i roze vina, zatim nakon fermentacije kljuka kod proizvodnje crvenih vina i nakon fermentacije i destilacije komine prilikom proizvodnje rakije.

Prema tome, nakon obrade prikupljenog otpadnog materijala, dobijeni su sledeći uzorci semenki:

1. semenke grožđa sorte Merlot pre fermentacije
2. semenke grožđa sorte Merlot posle fermentacije
3. semenke grožđa sorte Merlot posle destilacije
4. semenke grožđa sorte Italijanski rizling pre fermentacije
5. semenke grožđa sorte Italijanski rizling posle destilacije
6. semenke grožđa sorte Sila pre fermentacije
7. semenke grožđa sorte Sila posle destilacije

Semenke crnog grožđa sorte Merlot pre fermentacije (uzorak 1) dobijene su obradom ostatka nakon presovanja prikupljenog u Vinariji Kovačević doo Irig prilikom proizvodnje roze vina.

Semenke grožđa sorte Merlot posle fermentacije (uzorak 2), koje se izdvajaju u toku proizvodnje crnog vina, prikupljene su u Vinariji Šijački u Banoštoru. U pomenutoj vinariji postoji mogućnost izdvajanja semenki grožđa nakon fermentacije, tako što se pumpom sa dna tanka, preko sita prvo izdvajaju semenke grožđa, a

nakon toga ostatak tanka prebacuje u presu na ceđenje. Semenke sakupljene na situ najpre su oprane čistom vodom, da bi se odvojila zaostala ljuska i ispralo vino. Nakon toga su prevežene u pogon za dalju obradu.

Semenke grožđa sorte Merlot posle fermentacije i destilacije (uzorak 3) dobijene su prikupljanjem i preradom kljuka od grožđa sorte Merlot dobijenog u Vinariji Kovačević doo Irig. Nakon završene fermentacije kljuka i destilacije, odnosno proizvodnje rakije, džibra je sipana u vodu, gde je došlo do izdvajanja semenki grožđa. Ovom prilikom izvršeno je i pranje semenki.

Semenke belog grožđa sorte Sila i Italijanski rizling pre fermentacije (uzorci 4 i 6), dobijene su nakon prerade ostatka od prve šarže presovanja kljuka u vinariji Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, koja se nalazi u okviru oglednog polja Departmana za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu u Sremskim Karlovcima.

Slatka komina dobijena iz druge šarže presovanja kljuka grožđa sorte Italijanski rizling i Sila ostavljena je da fermentira u velikim kacama. Nakon završene fermentacije komina je iskorišćena za proizvodnju rakije, a od dobijene džibre izdvojene su semenke grožđa. Ovom prilikom nije vršeno pranje semenki, jer je procenjeno da miris posle destilacije nije neprijatan i da zaostali sadržaj ne bi trebalo da negativno utiče na kvalitet semenki. Na taj način dobijene su semenke belog grožđa sorte Sila i Italijanski rizling posle fermentacije i destilacije (uzorci 5 i 7).

Sav prikupljeni otpadni materijal obrađen je u pogonu za preradu semenki grožđa u Starim Ledincima na Fruškoj gori. Izlazni proizvod su predstavljale čiste i suve semenke sa sadržajem nečistoća oko 0,2%.

4.1.2 Proizvodnja hladno presovanog ulja

Od prikupljenih semenki proizvedeno je hladno presovano ulje za potrebe ispitivanja. Uzorci ulja dobijeni su presovanjem očišćenih i osušenih semenki na pužnoj presi (Koprulu Machine, Type KYP20D, Turkey), sa elektromotorom od 1,8

kW, kapaciteta 5-7 kg/h u pogonu mini uljare za proizvodnju hladno presovanih ulja u Sremskim Karlovcima. U početku, glava za presovanje se zagreva do 90°C. Nakon toga se grejači isključe i materijal za presovanje se ubacuje u mašinu. Brzina puža je 25 o/min. Kada ulje počne da teče, brzina se smanjuje na 20 o/min. Tada je temperatura glave za presovanje oko 40°C, dok je temperatura izlaznog ulja, usled pritiska i trenja, oko 50°C. Nakon presovanja ulja su ostavljena na tamnom i hladnom mestu tri dana na sobnoj temperaturi radi prirodnog taloženja nerastvorljivih nečistoća i zatim su dekantirana. Ulja su napunjena u boce do vrha i zatvorena. Tako pripremljeni prosečni uzorci hladno presovanih ulja iz nekoliko serija presovanja, su do ispitivanja čuvani u frižideru pri temperaturi $6\pm 1^\circ\text{C}$. Neposredno pre samih ispitivanja, uzorci ulja su temperirani pri sobnoj temperaturi.

Pored navedenih semenki grožđa i hladno presovanih ulja dobijenih od njih, u analizu su uključene semenke i hladno presovano ulje dobijeno iz mešanog semenki belog i crnog grožđa, kao prosečan proizvodni uzorak u pogonu mini uljare u Sremskoj Kamenici.

Kao uzorci za poređenje ispitivani su i nerafinisano ulje od semenki grožđa poreklom iz Srbije i rafinisano ulje od semenki grožđa poreklom iz Italije, koji su nabavljeni na tržištu metodom slučajnog izbora.

U skladu sa gore navedenim za ispitivanje su pripremljeni sledeći uzorci (tabela 7).

Tabela 7. Informacije o oznakama uzoraka

Oznaka uzorka	Naziv	Izvor
MBF	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Merlot bez fermentacije	proizvodnja roze vina
MPF	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Merlot posle fermentacije	proizvodnja crvenog vina
MPD	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Merlot posle destilacije	proizvodnja rakije
RBF	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Italijanski rizling bez fermentacije	proizvodnja belog vina
RPD	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Italijanski rizling posle destilacije	proizvodnja rakije
SBF	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Sila bez fermentacije	proizvodnja belog vina
SPD	Semenke i hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije	proizvodnja rakije
PPU	Prosečan proizvodni uzorak semenki i hladno presovanog ulja dobijen mešanjem semenki belog i crnog grožđa	prosečan proizvodni uzorak dobijen mešanjem semenki u pogonu mini uljare
NU	Nerafinisano ulje od semenki grožđa poreklom iz Srbije	uzorak sa tržišta Republike Srbije
RU	Rafinisano ulje od semenki grožđa poreklom iz Italije	uzorak sa tržišta Republike Srbije

4.2 METODE ISPITIVANJA

4.2.1 ISPITIVANJE TEHNČKO-TEHNOLOŠKIH KARAKTERISTIKA I KVALITETA SEMENKI GROŽĐA

4.2.1.1 MASA 1000 ZRNA (SEMENA)

Masa 1000 zrna je veoma važna karakteristika jer daje informacije o fiziološkom stanju semena. Promena u masi 1000 zrna povlači sa sobom u izmenu oblika i dimenzije semena. Trenutno ne postoji standardizovana metoda, već se metod zasniva na brojanju semena, koje se može obaviti ručno ili pomoću specijalnih aparata za brojanje.

Masa 1000 zrna predstavlja masu 1000 neoštećenih zrna preračunato na apsolutnu suhu masu semena.

Postupak rada se sastoji u sledećem. Prvo se slučajnim izborom odvadi 100 potpuno očišćenih semena i izmeri njihova masa. Zatim se seme suši pri temperaturi 103 ± 2 °C i nakon hlađenja izmeri njegova masa. Masa 1000 zrna izračunava se pomoću formule:

$$m_s = \frac{m_0 \cdot 1000}{n}$$

gde je:

m_0 – masa uzorka posle sušenja u g;

n – broj semena.

Potrebno je uraditi 3 određivanja, a rezultat predstavlja njihovu srednju vrednost (Karlović i Andrić, 1996).

4.2.1.2 ZAPREMINSKA (LITARSKA) MASA SEMENA

Litarska masa je pokazatelj kvaliteta semena i koristi se za procenu zapreminske mase semena u skladištima, a predstavlja masu semena zapremine 1l, izražene u kg. Određivanje se vrši pomoću Šoperove (Schopper) vage.

Šoperova vaga je obična dvokraka vaga koja na jednom kraju ima metalni cilindar za merenje u kojem se meri određena zapremina semena uljarice, obično 0,25l ili 1l.

Litarska masa (LM) izmerenog uzorka semena izračunava se na sledeći način:

$$LM = \frac{M}{V} \left(\frac{kg}{l} \right)$$

gde je:

M – izmerena masa uzorka u kg;

V – zapremina cilindra za merenke (0,25l ili 1l).

Određivanje se vrši dva puta, a ukoliko je razlika između dva merenja veća od dozvoljene mora se izvršiti i treće određivanje, pa se onda uzima aritmetička sredina sva tri merenja (Karlović i Andrić, 1996).

4.2.1.3 SPECIFIČNA MASA SEMENA

Specifična masa predstavlja zapreminu određene mase semena. Metoda se sastoji od uzimanja određene odvage semena (neoštećene semenke bez nečistoća) koje se sipaju u odmerni sud od 100ml u koji se iz birete dodaje 60%-ni etanol do oznake. Očita se utrošena zapremina etanola i izračuna specifična masa prema formuli (Ržehin i Sergeev, 1965):

$$\text{Specifična masa} \left(\frac{g}{cm^3} \right) = \frac{m}{100 - V}$$

gde su:

m - masa semena u odmernom sudu u g;

V - zapremina 60%-nog etanola dodata u odmerni sud (očitan sa birete)

Za ovo određivanje može se uzeti i seme izdvojeno za analizu mase 1000 zrna.

4.2.1.4 SADRŽAJ VLAGE U SEMENU

Sadržaj vlage i isparljivih materija u semenu određen je standardnom metodom SRPS EN ISO 665:2008.

4.2.1.5 SADRŽAJ ULJA U SEMENU

Sadržaj ulja u semenu određen je referentnom metodom SRPS EN ISO 659:2011.

4.2.1.6 KISELINSKI BROJ

Kiselinski broj (Kbr) određen je nakon tople ekstrakcije ulja iz semena. Za određivanje Kbr primenjena je standardna metoda SRPS ISO 729:1992 (identičan sa ISO 729:1988).

4.2.1.7 PEROKSIDNI BROJ

Peroksidni broj (Pbr) određen je nakon hladne ekstrakcije ulja iz semenki (Dimić i Turkulov, 2000). Za određivanje Pbr primenjena je standardna metoda SRPS EN ISO 3960.

4.2.2 ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA ULJA

4.2.2.1 DESKRIPTIVNA SENZORSKA ANALIZA

Prema odgovarajućem tehničkom propisu, Čl. 19 Pravilnika o kvalitetu (2006), jestiva biljna ulja, koja se stavljaju u promet, moraju biti prijatnog ukusa i mirisa svojstvenog sirovini ili neutralnog, bez stranog mirisa i bez mirisa i ukusa na užeglost.

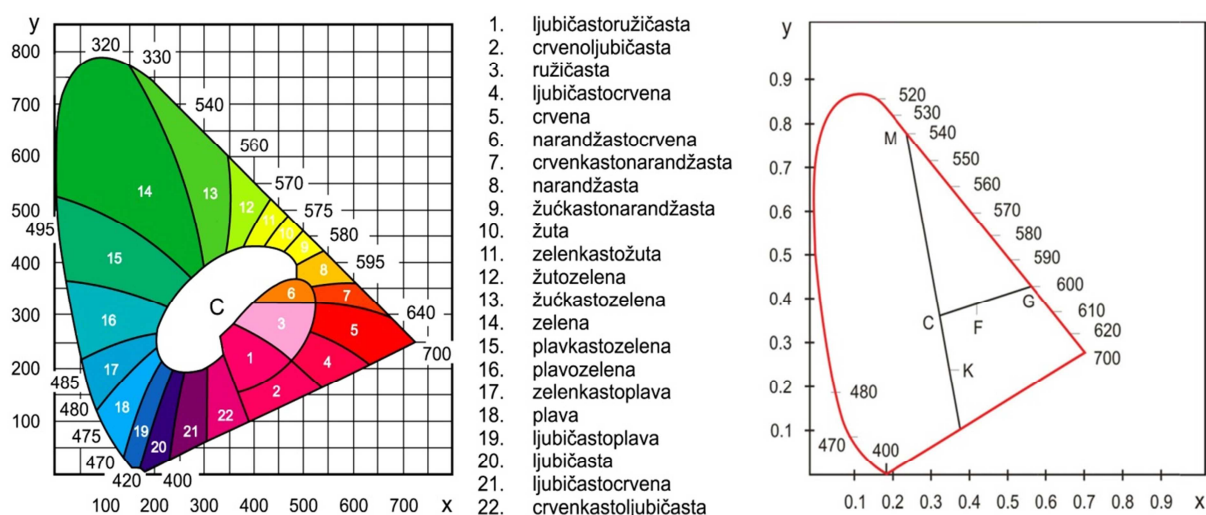
Za potrebe deskriptivne senzorske analize, uzorci ulja su pripremljeni u skladu sa standardnom metodom AOCS (Cg 2-83, 1983). U staklene čaše sa poklopcem sipa se po 20ml ulja i temperira 30min. pri $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ u sušnici. Nakon toga panel senzornih ocenjivača opisno definiše karakteristična svojstva (boju, miris, ukus i aromu) ulja.

4.2.2.2 INSTRUMENTALNO ODREĐIVANJE BOJE

Boja ulja merena je fotokolorimetrom Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co. Ltd, Osaka, Japan). Korišćen je svetlosni izvor D65 sa standardnim uglom posmatranja od 2° i sa otvorom merne glave od 8mm. Skala boja izražena je kao L*a*b*. Karakteristike boje su iskazane u CIE Yxy sistemu i CIE L*a*b* sistemu. L* (psihometrijska svetlost) predstavlja svetloću, a* (psihometrijski ton) predstavlja udeo crvene i zelene boje i b* (psihometrijska hroma) predstavlja udeo žute i plave boje. S druge strane, prema CIE Yxy sistemu boja je definisana sa Y koja predstavlja sjajnost u %, λ koja definiše dominantnu talasnu dužinu u nm i čistoćom boje u %.

Merenje se izvodi pomoću aparata koji je predhodno zagrejan i pripremljen prema uputstvu proizvođača. Uzorci ulja se sipaju u staklene kivete za merenje tečnih uzoraka i sa aparata se direktno očitavaju vrednosti CIE L*a*b*, CIE Y i λ , dok se čistoća boje računa pomoću koordinate xy sa dijagrama hromatičnosti (slika 16) pomoću formule (CIE, 1976):

$$\text{Čistoća boje (\%)} = \frac{CF}{CG} \cdot 100$$



Slika 16. Dijagram hromatičnosti po CIE sistemu sa prikazom boja koje obuhvata spektralna kriva (Schubert, 2006).

4.2.2.3 TRANSPARENCIJA

Boja ulja u korelaciji sa transparentijom određivana je spektrofotometrijski na UV/VIS spektrofotometru model T80+ (PG Instruments Limited, London). Merena je vrednost transparentije pri talasnoj dužini od 455nm u odnosu na rastvarač heksan. Za merenje se koriste staklene kivete u koje se sipaju pripremljeni 10 %-ni rastvori ulja u heksanu i čist rastvarač sa kojim se podešava 100% transparentije. Merenje se ponavlja tri puta po uzorku, a kao rezultat daje srednja vrednost (T%).

4.2.2.4 SADRŽAJ UKUPNIH KAROTENOIDA

Sadržaj ukupnih karotenoida određivan je prema standardnoj metodi (BMS, 1977). Metoda se sastoji u merenju apsorbancije (A) uzoraka ulja rastvorenih u rastvaraču-cikloheksan pri talasnoj dužini od 445nm u odnosu na čist rastvarač. Za merenje se koriste staklene kivete u koje se sipaju pripremljeni rastvori ulja (u odmerni sud od 10 ml odvaže se 0,5-1g ulja i tikvica se dopuni cikloheksanom do oznake). Sadržaj ukupnih karotenoida (izraženih kao β -karoten), u miligramima po kilogramu, računa se:

$$\text{Sadržaj ukupnih karotenoida (mg/kg)} = \frac{383 \cdot A_{445}}{d \cdot C}$$

gde je:

A_{445} – apsorbancija na talasnoj dužini od 445 nm;

d – širina kivete u cm;

C – koncentracija ulja u rastvoru za merenje.

4.2.2.5 SADRŽAJ UKUPNIH HLOROFILA

Određivanje sadržaja hlorofila vrši se po metodi koju je predložio Franzke (1972). Metoda se zasniva na merenju apsorbancije ulja ili rastvora ulja u hloroformu na talasnoj dužini od 667nm u odnosu na čist rastvarač (hloroform), a rezultati se

izražavaju kao feofitin a. Za merenje se pripremi 10 %-ni i 1 %-ni rastvori ulja u hloroformu i čisto ulje. Količina ukupnog hlorofila računa se:

$$\text{Ukupni hlorofil} = \frac{A_{667}}{0,053 \cdot d}$$

gde je:

A_{667} – vrednost apsorbancije nerazređenog uzorka pri talasnoj dužini od 667nm;

d – širina kivete u cm.

4.2.3 NUTRITIVNA VREDNOST ULJA

4.2.3.1 SASTAV MASNIH KISELINA

Sastav masnih kiselina određen je metodom gasne hromatografije - masene spektrometrije (GC-MS) u skladu sa standardom SRPS EN ISO 12966-1: 2015, korišćenjem gasnog hromatografa GC7890B (Agilent Technologies) sa MSD5977A (Agilent Technologies) single quadrupole masenim spektrometrom. Korišćena je kapilarna kolona SP-2560 (100m x 0,25mm, 0,20 μ m) da bi se odvojili pripremljeni metil estri masnih kiselina (SRPS EN ISO 12966-2:2017) koji su karakterisani visoko polarizovanim bis-cijanopropil-polisiloksanom (Supelco Inc., Bellenfonte, PA).

Uslovi GC-MS analize bili su:

- zapremina uzorka: 1 μ l
- gas nosač: helijum, Q= 0,58cm³/min.
- odnos razdvajanja SR= 1:40
- SCAN mod: m/z 40-400 a.m.u.
- temperatura masenog spektrometra= 180°C
- temperatura injektora= 230°C
- temperaturni program: početna temperatura kolone od 100°C (5min.), povećanje temperature brzinom od 6°C/min. do konačne temperature od 240°C (20min.)

- kvantitativno određivanje: modifikovana metoda 100%.

4.2.3.2 JODNI BROJ

Jodni broj (Jbr) određen je računski na osnovu sastava masnih kiselina prema formuli (Krishnamurthy i Kellens, 1996):

$$Jbr (g/100g) = (0,86 \cdot \%C_{18:1}) + (1,732 \cdot \%C_{18:2}) + (2,616 \cdot \%C_{18:3})$$

4.2.3.3 SARŽAJ I SASTAV TOKOFEROLA

4.2.3.3.1 Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola

Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola određen je spektrofotometrijskom metodom prema Paqout i saradnici (Paqout i sar., 1967). Metoda se zasniva na redukcionim osobinama tokoferola, koji redukuju Fe^{3+} iz $FeCl_3$ u prisustvu 2-2'dipiridila i stvaraju kompleks crvene boje sa jonima Fe^{2+} . Pošto je reakcija veoma osetljiva, moraju se ukloniti iz ulja svi drugi antioksidanti i redukcionne supstance izuzev tokoferola. Pošto se određivanje vrši iz neosapunjivih materija, prvo se izvrši saponifikacija ulja i ekstrakcija neosapunjivih materija, a zatim se iz benzenskog rastvora neosapunjivih materija razvija bojena reakcija čija se apsorbancija meri na talasnoj dužini od 520nm na UV/VIS spektrofotometru model T80+ (PG Instruments Limited, London) uz slepu probu.

Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola računa se pomoću formule:

$$\text{Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola } \left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(A_1 - A_0) \cdot V \cdot 10^4}{39,2 \cdot v \cdot m}$$

gde su:

A_1 – apsorbancija uzorka;

A_0 – apsorbancija slepe probe koja se priprema identično, ali bez ulja;

V – zapremina benzenskog rastvora neosapunjivih materija, 50 ml;

v – zapremina rastvora za razvijanje boje u ml;

m – masa uzorka za ispitivanje u g.

4.2.3.3.2 Sastav tokoferola – izomerni oblici

Određivanje tokoferolnih izomera izvršeno je korišćenjem fluorescentnog detektora RF-535 (Shimadzu, Fluorescence HPLC) vezanog za HPLC (Vaters M600E, SAD) na reverzno-faznoj Nucleosil 50-5 C18 koloni (Macherei-Nagel, Nemačka), korišćenjem metode zasnovane na procedure koju je opisao Carpenter (1979) sa izvesnim modifikacijama (Rabrenović i sar., 2014). Primenjena je sledeća procedura: 20 mL 96% etanola, 0,12g pirogalola i 3ml rastvora KOH (8,9 mol/l) dodato je u 0,5ml ulja, nakon čega je rastvor zagrevan 30min na 60°C sa refluksom i mešanjem. Po završetku procesa saponifikacije, sadržaj se ohladi, prenese u volumetrijsku bocu (50ml) i na kraju se doda 96% etanol. Alikvot od 5ml sipa se u levak za odvajanje. Doda se i zapremina od 5ml hladne dejonizovane vode i 5ml heksana. Smeša se mućka pomoću vorteksa u trajanju od 3min. Nakon toga 4ml rastvora se suši strujanjem gasa (azota). Suva materija se onda rastvara u 4ml metanola. Zatim se uzorak filtrira pomoću membranskog filtera i pomoću šprica ubrizgava u HPLC sistem.

Uslovi rada HPLC sistema:

- mobilna faza: 95% CH₃OH
- brzina protoka: 1,0ml/min.
- temperatura kolone: cca 20°C
- talasna dužina: λ_{ex} = 295nm, λ_{em} = 330nm

Za identifikaciju tokoferola u uzorcima ulja korišćeno je retenciono vreme i maksimalne vrednosti apsorbpcije u datom retencionom vremenu.

Komercijalni standardi tokoferola su pogodno razblaženi i primenjeni za validaciju metode (serija rastvora od 0,01 do 0,5 mg/ml) i kvantifikaciju (serije rastvora od 1,0 do 20,0 mg/ml). Ukupno vreme hromatografske analize iznosilo je 15 minuta. Obrada

signala izvršena je softverom "Clarify". Pored toga, sadržaj tokoferola je izračunat na osnovu komparativne analize pikova standarda i uzoraka. Prema tabeli 8, metoda je dovoljno osetljiva i specifična za određivanje prihvatljivih nivoa tokoferola.

Tabela 8. Analitički učinak metode zasnovane na HPLC sa fluorescentnim detektorom

Izomer tokoferola	Linearnost	Kalibracioni opseg (n=6) (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Recovery (%) pri nivou od 5µ/ml	RSD (%)
α	0,9994	1,0 – 20,0	0,05	0,17	98,4	1,43
β+γ	0,9991	1,0 – 20,0	0,03	0,10	97,2	2,11
δ	0,9992	1,0 – 20,0	0,03	0,10	97,5	0,78

4.2.3.4 SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA

4.2.3.4.1 Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je prema spektrofotometrijskoj metodi koju su opisali Haiyan i saradnici (Haiyan i sar., 2007). Ulja su prvo rastvorena u heksanu i ekstrahovana metanolom (tri puta). Uzorak je zatim ostavljen da stoji preko noći. Metanolni ekstrakt je ispran heksanom i alikvot od 1 ml je prebačen u odmerni sud od 10ml u koji je dodato 0,5ml Folin-Ciocalteu reagens. Rastvor se promućka i ostavi da stoji 3 minuta pre dodavanja zasićenog rastvora natrijum karbonata i razblaživanja vodom. Posle 1h, merena je apsorbanacija na 725nm u odnosu na slepu probu na UV/VIS spektrofotometru model T80+ (PG Instruments Limited, London). Slepa proba se priprema paralelno na isti način, međutim, umesto ekstrakta uzima se metanol.

Rezultati određivanja se dobijaju korišćenjem kalibracione krive, pripremljene sa rastvorom galne kiseline u opsegu koncentracija 0÷100 µg/10 ml.

Na bazi izmerenih vrednosti apsorbanacije pri 725 nm, direktno sa kalibracione krive ili pomoću jednačine prave, $y = 124,3x + 0,080$; $R^2 = 0,9988$, se dobija sadržaj ukupnih fenola, kao galna kiselina u µg/10 ml. Budući da je zapremina reakcione

smeše $V_{rs}=10$ ml, sadržaj ukupnih fenola, izražen kao ekvivalent galne kiseline, se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$\text{Sadržaj ukupnih fenola } \left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{c \cdot V_{rs}}{6 \cdot m}$$

gde su:

c – vrednost očitana sa kalibracione krive ili izračunata pomoću dobijene jednačine

prave, tj. sadržaj ukupnih fenola ($\mu\text{g}/10\text{ml}$);

V_{rs} – zapremina reakcione smeše, 10 ml;

m – masa uzorka za ispitivanje u g.

Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao ekvivalent galne kiseline u mg/kg ulja (Radočaj i sar., 2014).

4.2.3.4.2 Sadržaj pojedinačnih fenola

Sadržaj pojedinačnih polifenola iz uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa ekstrahovani su u skladu sa modifikovanom procedurom Gouvinhas i saradnici (2014) i analizirani pomoću Agilent Technologies 1200 HPLC-DAD u kombinaciji sa Agilent Technologies 6410A ESI-QqQ-MS/MS. Priprema uzoraka je bila sledeća: približno 800 μl uzorka ulja je preneto je u vial od 4ml i razblaženo sa 400 μl heksana. Smeša je ekstrahovana 80% metanolom (600 μl) uz energično mućkanje na vorteksu. Nakon centrifugiranja (10min pri 2500 rpm), vodeno-metanolni sloj je prenet u normalni sud od 2ml, a uljani sloj je ekstrahovan još dva puta sa 80% metanolom. Spojeni ekstrakti dopunjeni sa 80% metanolom do krajnje zapremine od 2ml, filtriraju se kroz 0,45mm membranski filter od regenerisane celuloze i analiziraju na LC-DAD-MS/MS. Svi uzorci su propremljeni u triplikatu. Sadržaj odabranih polifenola određen je metodom LC-DAD-MS/MS, prema prilagođenoj proceduri Orčić i saradnici (2014). Injektirano je 5 μl uzorka. Razdvajanje je izvršeno pomoću Zorbax Eclipse XDB-C18 kolone (50mm x 4,6mm, 1.8 μm) termostatoranoj na 50°C. Komponente su eluirane sa mobilnom fazom na bazi 0,05% vodenog rastvora

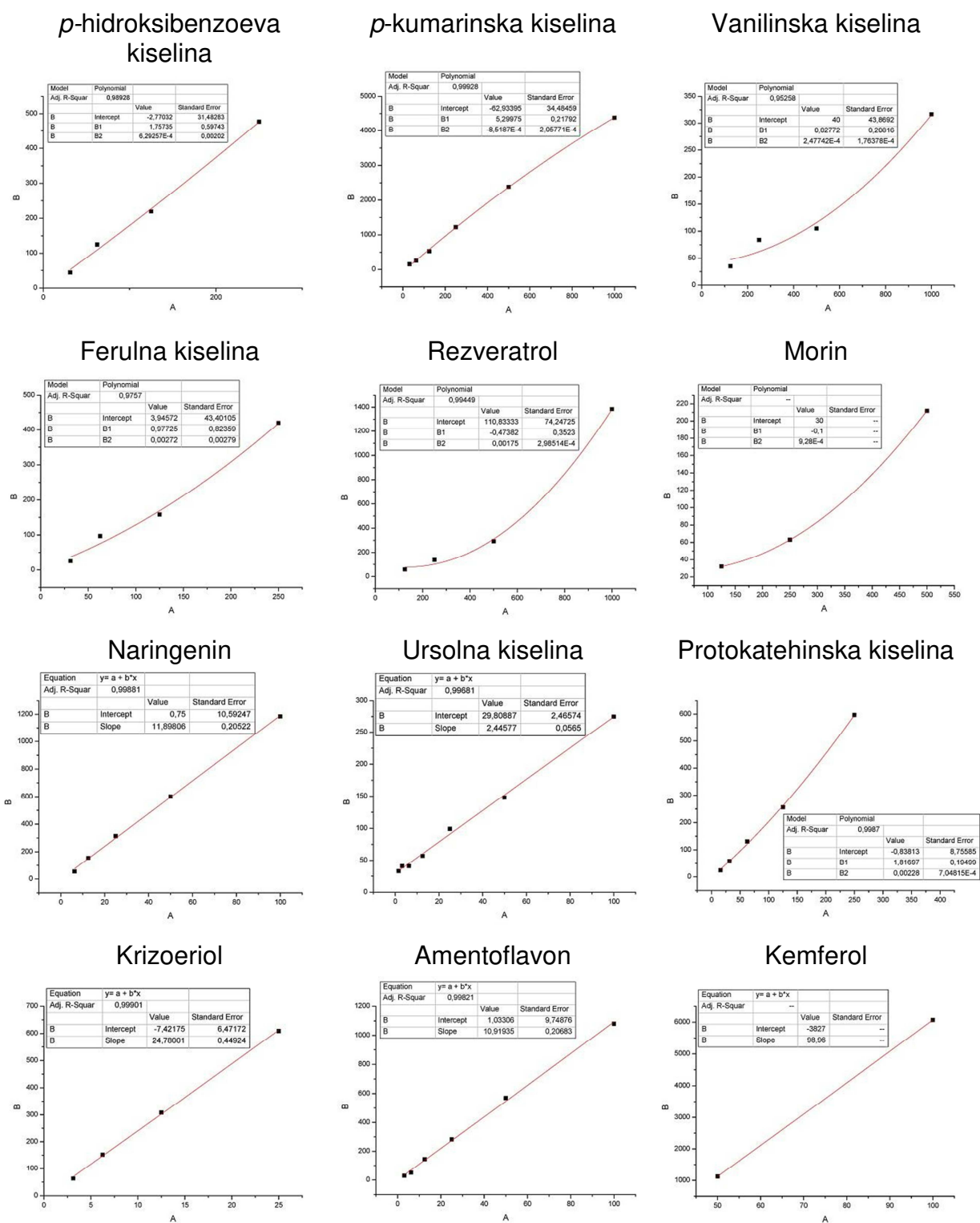
mravlje kiseline (A) i metanola (B) pri brzini protoka od 1,0 mL/min, u gradijentnom modu: 0min. 30%B, 6min. 70%B, 9min. 100%B, 12min. 100% B, vreme re-ekvilibracije 3min. U svrhu eventualne potvrde identiteta, UV/VIS signal je praćen u opsegu od 190-700nm. Efluens je prosleđen na MS/MS detektor bez deljenja toka. Parametri jonskog izvora bili su: pritisak nebulajzera 50psi, temperatura i protok gasa za sušenje (N₂) 350°C i 10l/min, napon na kapilari 4000V, negativni polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom SRM modu (select reaction monitoring), sa optimizovanim parametrima datim u tabeli 9.

Tabela 9. Optimizovani parametri SRM-a prilagođeni komercijalnom standardu

Jedinjenje	V _{fragmentor} [V]	m/z prekursor	V _{col} [V]	m/z produkt
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	80	137	10	93
<i>p</i> -kumarinska kiselina	90	163	9	119
Vanilinska kiselina	100	67	15	108
Ferulna kiselina	90	193	11	134
Rezveratrol	130	227	15	185
Morin	120	301	29	149
Naringenin	130	271	16	151
Ursolna kiselina	300	455	12	455
Protokatehinska kiselina	105	153	9	109
Krizoeriol	125	299	20	284
Amentoflavon	220	537	35	375
Kemferol	130	285	0	285

Sekvencijalnim razblaženjem 1:1 pripremljena je serija standardnih rastvora u opsegu koncentracija od 1,53ng/ml do 25,0µg/ml. Koncentracija analita određene su metodom eksternog standarda, koristeći kalibracione krive u užem opsegu

prilagođenom koncentraciji u uzorku (slika 17). U većini slučajeva, zavisnost nije bila linearna već kvadratna.



Slika 17. Kalibracione krive pojedinačnih polifenola

Za sva jedinjenja, površine pikova (kalibracione krive) su obrađene pomoću MassHunter Workstation Qualitative Analysis softvara, ver. B.06.00 (Agilent Technologies). Kalibracione krive su konstruisane i koncentracije uzoraka su očitane korišćenjem softvera Origin Pro, ver. 8.0 (OriginLab).

4.2.3.5 SADRŽAJ STEROLA

Za određivanje sterola u ulju, potrebno je njihovo razdvajanje od masnih kiselina. Nakon saponifikacije masti, izolovani steroli su derivatizovani i dalje analizirani kao silil-derivati.

Pre saponifikacije u uzorak se dodaje standard holesterola i dalje se vrši transformacija masti u sapune. Nakon saponifikacije vrši se ekstrakcija pomoću smeše voda/dietil-etar, pri čemu u vodeni sloj prelaze sapuni, a u organskom sloju ostaju fitosteroli. Organski sloj se posle ekstrakcije suši anhidrovanim Na₂SO₄. Osušeni uzorak se upari do suva, rastvori u dihlormetanu i podvrgava reakciji sililovanja.

Za sililovanje je odmereno 100µl uzorka rastvorenog u dihloretanu i dodato je 50µl reagensa BSTFA (N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida). Rastvor se zagreva 20min. pri temperaturi od oko 70°C. Ovako pripremljen uzorak analiziran je GC/MS tehnikom.

Identifikacija sterola rađena je na Agilent 7890A GC sa FID detektorom, kao i MS detektorom (5975C inertnim XL EI/CI). Korišćena je HP-5MSI Agilent Technologies kapilarna kolona (0,25mm x 30m, 0,25µm). Uzorci su injektovani u splitless modu.

Uslovi rada bili su:

- zapremina uzorka: 1µl;
- gas nosač: helijum;
- brzina protoka gasa: 3ml/min.;
- temperatura FID detektora: 300°C;

- temperatura inleta: 250°C;
- temperaturni program: 40°C (1min.), povećanje temperature brzinom od 10°C/min do konačne temperature od 315°C (16,5min.).

Elektronski maseni spektar (70eV) dobijen je snimanjem jona u oblasti od 35-550m/z. Snimanje MS spektra počinje od 3. minuta. Identifikacija snimljenih fitosterola izvršena je poređenjem sa bazom podataka NIST05 (Verleyen, 2002).

4.2.3.6 ODREĐIVANJE DPPH AKTIVNOSTI

Antioksidativni kapacitet određuje se primenom spektrofotometrijske metode koju su predložili Martínez i Maestri (2008). Metoda se zasniva na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora u žuto, odnosno na prelasku stabilnog DPPH• radikala u redukovanu formu DPPH-H. Kapacitet "hvatanja" slobodnih radikala, RSC (Radical Scavenging Capacity), određuje se merenjem sposobnosti ulja da neutrališe DPPH• radikale. Količina ulja pri kojoj je neutralisano 50% početne koncentracije radikala predstavlja vrednost EC₅₀.

Za određivanje vrednosti EC₅₀ pripremljene su koncentracije rastvora ulja od 25, 50 i 75mg ulja u 1ml toluena. Zatim se u svaki uzorak dodaje 3,9ml rastvora DPPH• radikala u toluenu, koncentracije 10⁻⁴M i mesa 30min. Apsorbancija rastvora meri se pri talasnoj dužini od 515nm u odnosu na slepu probu (čist toluen). Nakon konstruisanja krive promene koncentracije DPPH• radikala u zavisnosti od količine ulja, očitava se vrednost EC₅₀ u mg ulja/mg DPPH• radikala. Antiradikalni kapacitet (ARC) ulja računa se prema formuli (Siger i sar., 2008):

$$ARC = \frac{1}{EC_{50}}$$

4.2.4 ODRŽIVOST ULJA

4.2.4.1 KISELINSKI BROJ

Kiselost ulja se obično izražava kao Kiselinski broj (Kbr), koji se određuje standardnom metodom SRPS EN ISO 660.

4.2.4.2 PEROKSIDNI BROJ

Količina hemijski vezanog kiseonika za ulja, kao peroksid i hidroperoksid, određena je jodometrijskom titracijom prema metodi SRPS EN ISO 3960 – Određivanje peroksidnog broja (Pbr).

4.2.4.3 ANISIDINSKI BROJ

Sekundarni produkti oksidacije određuju se standardnom metodom SRPS EN ISO 6885 za određivanje anisidinskog broja (Abr), koji predstavlja meru količine aldehida.

4.2.4.4 OKSIDATIVNA VREDNOST

Oksidativna vrednost (OV) ili Totox vrednost predstavlja sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja. OV vrednost se izračunava prema sledećoj formuli (Dimić i Turkulov, 2000):

$$OV = 2 \cdot Pbr + Abr$$

gde je:

OV – oksidativna vrednost ulja;

Pbr – peroksidni broj (mmol/kg);

Abr – anisidinski broj ($100A^{1\%}_{350nm}$).

4.2.4.5 INDUKCIONI PERIOD – RANCIMAT TEST

Oksidativna stabilnost ulja pri višim temperaturama ispitana je pomoću aparata Metrohm Rancimat model 743 (Herisau, Switzerland) prema metodi ISO 6886, Dimić i Turkulov (2000), i uputstvu proizvođača (Metrohm, 2013). Za ispitivanje se odmeri po 2,5g uzorka i sipa u reakcione kivete. Temperatura određivanja iznosila od 100°C, a protok vazduha 20 l/min. Mera otpornosti ulja prema oksidaciji predstavlja indukcioni period, IP, koji se automatski očitava na aparatu u funkciji promene električne provodljivosti usled povećanja isparljivih komponenti oslobođenih prilikom oksidacije ulja.

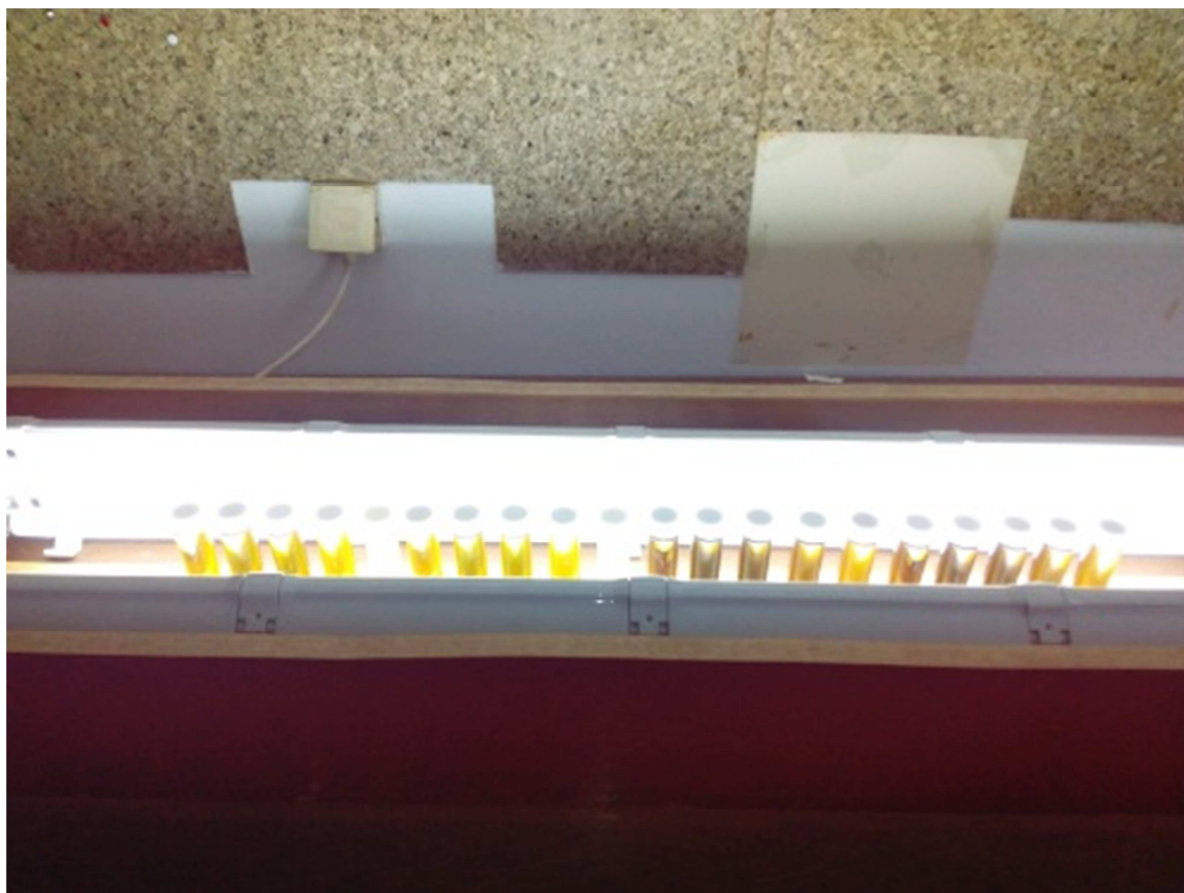
4.2.4.6 SCHAAL-OVEN TEST

Oksidativna stabilnost ulja pri umerenim temperaturama od 63±2°C analizirana je primenom Schaal-oven testa (Pokorny i sar., 1985; Dimić i Turkulov, 2000). Metoda se sastoji u izlaganju 50ml ulja dejstvu toplote, ali bez uticaja svetla, u otvorenim staklenim posudicama u periodu od 2, 4 i 8 dana i praćenju promena koje nastaju u karakteristikama boje, transparentiji, sadržaju ukupnih fenola i tokoferola, antiradikalnom kapacitetu i oksidativnom statusu ulja.

4.2.4.7 TEST NA BAZI FLUORESCENTNOG SVETLA – FL TEST

Fluorescentni test radi se prema metodi razvijenoj na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu. Metod se sastoji u izlaganju ulja dejstvu fluorescentnog svetla i određivanju promena koje nastaju u zavisnosti od vremena izlaganja. Uzorci ulja sipaju se u zatvorene staklene posudice zapremine 40ml (transparentne i obojene) i postave između dve fluorescentne lampe (neonske cevi od po 40w), tako da udaljenost između posude sa uljem i lampe iznosi približno 10cm (slika 18). Nakon određenog perioda (1, 4, 8 i 12 dana) neprekidnog izlaganja fluorescentnom svetlu prate se promene koje nastaju u uljima u karakteristikama boje (transparentija i

Minolta), sadržaju pigmenata (karotenoida i hlorofila), oksidativnom stanju (promene Pbr) i promena sadržaja mikrokomponenti (fenola i tokoferola).



Slika 18. Osvetljavanje uzoraka ulja fluorescentnim svetlom

4.3 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Podaci dobijeni u eksperimentalnim istraživanjima su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). Za određivanje značajnih razlika između podataka na nivou značajnosti $p < 0,05$ korišćena je analiza varijanse One way ANOVA sa Duncan-ovim testom. Takođe kod pojedinih analiza, Two way ANOVA sa Tukey testom izvedena je na statistički značajnom nivou $p < 0,05$. Stepen linearne veze između dve varijable meren je korišćenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (r). Statistička analiza izvedena je korišćenjem softvera SPSS Statistica 20 (IBM Corporation, Armonk, Nev Iork, U.S.). Pored toga za obradu podataka korišćen je Microsoft Excel 2010 i OriginPro v.9.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1 ISPITIVANJE SEMENKI GROŽĐA

5.1.1 TEHNIČKO-TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE SEMENKI GROŽĐA

Analiza tehničko-tehnoloških karakteristika semenki rađena je na osnovu analize mase 1000 zrna (semenki), zapreminske (litarske) mase semenki i specifične mase semenki. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Tehničko-tehnološke karakteristike semenki grožđa

Semenke grožđa	Masa 1000 zrna (g)	Litarska masa (kg/dm ³)	Specifična masa (g/cm ³)
MBF	27,22 ± 0,13	0,65 ± 0,004	1,10 ± 0,004
MPF	27,24 ± 1,17	0,65 ± 0,000	1,07 ± 0,004
MPD	22,55 ± 0,24	0,55 ± 0,000	0,97 ± 0,001
RBF	23,99 ± 0,47	0,62 ± 0,004	1,06 ± 0,002
RPD	22,54 ± 0,68	0,51 ± 0,000	0,94 ± 0,006
SBF	24,19 ± 0,43	0,67 ± 0,002	1,14 ± 0,002
SPD	19,96 ± 0,90	0,58 ± 0,002	1,02 ± 0,010
PPU	32,45 ± 0,30	0,62 ± 0,001	1,09 ± 0,002

Masa 1000 zrna (semenki grožđa) kretala se u opsegu od 19,96g do 32,45g, litarska masa u znatno užem opsegu od 0,51kg/dm³ do 0,67kg/dm³, dok je specifična masa iznosila od 0,94g/cm³ do 1,14g/cm³. Najmanju masu (19,96g) ima uzorak semenki grožđa sorte Sila dobijenim posle destilacije (SPD), dok najveću (32,45g) pokazuje prosečni proizvodni uzorak semenki grožđa (PPU). Kod litarske mase, najmanju vrednost pokazuje uzorak RPD, koji ujedno ima i najmanju specifičnu masu semenki, dok najveću litarsku (0,67kg/dm³) i specifičnu (1,14g/cm³) masu ima uzorak SBF.

Dobijeni rezultati ukazuju da proces fermentacije nije imao uticaja na masu 1000 zrna, kao ni na litarsku i specifičnu masu semenki grožđa, dok je proces destilacije

uticao na smanjenje ovih parametara. U toku postupka destilacije došlo je do izdvajanja dela rastvorljivih materija iz semenki čime su one postale lakše.

U cilju procene korelacije između litarske i specifične mase semenki grožđa određen je stepen korelacije korišćenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (r), pri nivou značajnosti od $p=0,01$ i on je iznosio $r= +0,968$. Dobijeni rezultat ukazuje na jaku korelaciju između litarske i specifične mase semenki.

Najveći kvalitet, prema rezultatima za litarsku masu pokazuje uzorak semenki grožđa sorte Sila bez fermentacije.

Što se tiče specifične mase ili relativne gustine semenki, prema navodima Oštrić-Matijašević i Turkulov (1980), semena sa vrednostima za specifičnu masu manjim od 1 su bogatija uljem. Relativna gustina uja iznosi $0,92\text{g/cm}^3$ i samim tim semena sa većim sadržajem ulja imaju manju relativnu gustinu.

Prema navodima istih autora, semenke grožđa pokazuju vrednost litarske mase koja se kreće između vrednosti za suncokret ($0,35\text{-}0,45\text{kg/dm}^3$) i soju ($0,60\text{-}0,75\text{kg/dm}^3$) i uljanu repicu ($0,66\text{-}0,71\text{kg/dm}^3$).

U ovom slučaju, međutim, ne sme se zanemariti činjenica da semenke grožđa nisu „tipične“ uljarice. Osim toga, navedene tehničko-tehnološke karakteristike su u tesnoj korelaciji, kako sa sastavom (npr. udeo celuloze), tako i dimenzijama semenki. U svakom slučaju, ispitane karakteristike mogu imati veliki praktični značaj pri manipulaciji sa semenkama (pakovanje, skladištenje itd.).

5.1.2 HEMIJSKI KVALITET SEMENKI GROŽĐA

Kvalitet semenki grožđa sagledavan je na osnovu osnovnih tehnoloških parametara kao što su analize sadržaja vlage i sadržaja ulja u semenu, kao i na osnovu kiselinog (Kbr) i peroksidnog broja (Pbr). Dobijeni rezultati navedeni su u tabeli 11.

Sadržaj vlage i isparljivih materija je važan pokazatelj kvaliteta semena i ima značajan uticaj na održivost semena, kao i na količinu izdvojenog ulja (Dimić, 2005). U ispitanim uzorcima pripremljenih semenki sadržaj vlage kretao se od 7,48–12,80%. Najmanji sadržaj vlage imale su semenke grožđa sorte Merlot posle destilacije (MPD), a najveći sadržaj vlage imale su semenke grožđa sorte Sila posle destilacije (SPD). Malićanin (2014) prikazao je vrednosti za vlagu u semenkama crnog grožđa različitih sorti od 8-10%. Veći sadržaj vlage u semenkama pre presovanja može dovesti do kvarenja istih i pojave plesnivosti tokom skladištenja, kao i do hidrolitičkih promena na ulju. Za dobijene vrednosti, obzirom na mali sadržaj ulja u semenkama, može se reći da je veoma dobra skladišna vlaga, što znači da može osigurati sigurno čuvanje semenki u dužem periodu bez velikih promena kvaliteta ulja u njima.

Tabela 11. Rezultati osnovnog hemijskog kvaliteta semenki grožđa

Semenke grožđa	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj ulja (%)	Kbr* (mg KOH/g)	Pbr** (mmol/kg)
MBF	10,12 ± 0,05	7,87 ± 0,14	3,06 ± 0,21	12,68 ± 1,45
MPF	10,29 ± 0,21	7,74 ± 0,29	2,48 ± 0,12	14,69 ± 0,56
MPD	7,48 ± 0,00	8,39 ± 0,27	2,33 ± 0,05	41,03 ± 0,14
RBF	10,02 ± 0,04	6,93 ± 0,69	3,10 ± 0,28	21,55 ± 0,38
RPD	12,40 ± 0,03	7,73 ± 0,67	20,71 ± 1,65	19,51 ± 1,62
SBF	8,62 ± 0,03	7,64 ± 0,40	3,82 ± 0,14	55,97 ± 0,30
SPD	12,80 ± 0,04	6,57 ± 0,47	9,19 ± 0,84	1,99 ± 0,06
PPU	9,14 ± 0,06	9,89 ± 0,36	7,37 ± 0,08	6,50 ± 0,03

*- u ulju nakon tople ekstrakcije; **- u ulju nakon hladne ekstrakcije

Sadržaj ulja u semenkama grožđa veoma varira i zavisi od više faktora kao što su sorta vinove loze, stepen zrelosti, klimatski uslovi, uslovi gajenja vinove loze i dr. (Dimić, 2005; Luque-Rodríguez i sar., 2005; Pardo i sar., 2009), a prema literaturnim podacima, kreće se od 6-20% (Crews i sar., 2006), 7-20% (Matthäus, 2008), 10-16% (Luque-Rodríguez i sar., 2005), 7-20% (Shinagawa i sar., 2017), 12-18% (Dimić, 2005). Dimić (2005) navodi da je prosečan sadržaj ulja semenki grožđa evropskih sorti oko 13%.

Dobijene vrednosti za sadržaj ulja kretale su se od 6,57% do 9,89% i nešto su niže nego prosečne vrednosti. Pored razlika koje su posledica razlike u sorti vinove loze, pojavljuje se razlika u sadržaju ulja u semenkama grožđa iste sorte koje su prošle proces fermentacije i destilacije. Proces destilacije, najverovatnije zbog delovanja visoke temperature, može dovesti do gubitka dela ulja iz semenki.

Kiselinski broj određen je u ulju izdvojenom nakon ekstrakcije iz semenki pomoću organskog rastvarača. On je veoma bitan pokazatelj kvaliteta ulja i sa aspekta proizvodnje hladno presovanih ulja, te njegova kontrola u semenu, kao sirovini za proizvodnju ulja, je neophodna.

Prema rezultatima koji su prikazani u tabeli 11, kiselinski broj ulja u semenkama grožđa kretao se od $2,33 \pm 0,05 \text{mgKOH/g}$ do $20,71 \pm 1,65 \text{mgKOH/g}$. Literaturni podaci koje navodi Malićanin (2014) daju opseg za kiselinski broj od $6,10 \text{mgKOH/g}$ do $7,10 \text{mgKOH/g}$. Obzirom da je Pravilnikom o kvalitetu (2006) dozvoljena vrednost za kiselinski broj maksimalno 4mgKOH/g za hladno presovana ulja, može se konstatovati da semenke grožđa dobijene od sorte Italijanski rizling i Sila posle destilacije (RPD i SPD), kao i semenke grožđa dobijene kao prosečan proizvodni uzorak (PPU) ne zadovoljavaju kvalitetom za proizvodnju hladno presovanih ulja.

Promene koje nastaju u kiselinskom broju semenki grožđa su verovatno posledica hidrolitičkih procesa, zbog povećane vlage kome je seme izloženo, tokom procesa proizvodnje vina ili rakije. To se posebno ogleda u povećanju kiselinskog broja kod semenki dobijenih posle destilacije. Spoljašnja opna semenki je narušena u procesu fermentacije i takve semenke su dalje izložene visokim temperaturama destilacije u vodenoj sredini, što dalje dovodi do povećanja kiselinskog broja. Pored navedenog, jako važan faktor, pri pripremi semenki za presovanje, koji utiče na kvalitet semenki u pogledu kiselinskog broja je i proces sušenja. Usled produženog procesa sušenja semenki, zbog visokog sadržaja vlage, dolazi do povećanja kiselinskog broja. Ovo je posebno bitno kod semenki dobijenih nakon fermentacije i destilacije, obzirom da je spoljašnja opna semenki narušene strukture, pa je kontakt ulja iz unutrašnjosti semenke sa vlagom olakšan.

Peroksidni broj je određivan nakon hladne ekstrakcije ulja iz semenki grožđa. Sve dobijene semenke grožđa pokazuju visoke vrednosti peroksidnog broja, osim uzorka semenki sorte Sila posle destilacije (SPD). Vrednosti peroksidnog broja kretale su se od $1,99 \pm 0,06 \text{ mmol/kg}$ do $55,97 \pm 0,30 \text{ mmol/kg}$. Ove vrednosti su daleko veće nego što je očekivano.

5.2 ISPITIVANJE ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

5.2.1 ISPITIVANJE BOJE I SENZORSKIH SVOJSTAVA ULJA

5.2.1.1 DESKRIPTIVNA SENZORSKA ANALIZA

Deskriptivna senzorska analiza spada u osnovne pokazatelje ispravnosti i kvaliteta proizvoda. Kad god je potrebno na osnovu senzorskih svojstava oceniti kvalitet proizvoda, može se primeniti deskriptivna senzorska analiza. Ovakva ocena odabranih senzorskih svojstava proizvoda može se koristiti u definisanju karakteristika proizvoda standardnog kvaliteta, kao i za predstavljanje i definisanje novih proizvoda.

Senzorsko ocenjivanje uzoraka ulja od semenki grožđa izvedeno je samo kao deskriptivna analiza bez primene bodovnog sistema i standardnih ocenjivačkih listi. Standarda ocenjivačka lista nije primenjiva zbog razlika u uzorcima koje potiču ne samo od načina dobijanja, već su u pitanju različite polazne sirovine koje za posledicu daju ulja potpuno različitih senzorskih karakteristika. Osim toga, hladno presovano ulje semenki grožđa je relativno nov proizvod na tržištu, nedovoljno ispitan u naučnim krugovima, te za sada ne postoje ni literaturni podaci o senzorskim svojstvima ulja različitih sorti vinove loze, a ni po pitanju porekla semenki.

Kao referentni uzorak ulja korišćeno je rafinisano ulje od semenki grožđa, a ocenjivači su prethodno bili upoznati sa prirodom proizvoda i ciljem ispitivanja. Posmatrane karakteristike su boja, izgled, miris, ukus i aroma ulja. Redosled ocenjivanja bio je postavljen tako da se prvo oceni rafinisano ulje, a zatim hladno presovana ulja. Nakon ocenjivanja hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa pre fermentacije, sledilo je ocenjivanje hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa posle fermentacije i ocena hladno presovanog ulja nabavljenog na tržištu za koje se predpostavlja da je dobijeno od semenki posle fermentacije. Hladno presovano ulja koje je dobijeno kao prosečan proizvodni uzorak iz mini uljare, a koje je proizvedeno od semenki belog i crvenog grožđa različitih sorti dobijenih pre fermentacije, posle fermentacije i posle destilacije ispitano je kao sledeći uzorak. Na samom kraju ocenjeni su uzorci hladno presovanog ulja dobijenog od semenki

grožđa koje su dobijene nakon postupka fermentacije i destilacije. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Rezultati deskriptivne senzorske analize ulja od semenki grožđa

Oznaka uzorka	Karakteristika	Opazanje
RU	Boja	svetlo žuta sa zelenkastom nijansom
	Izgled	proziran, bistar, ali ne kristalno bistar
	Miris	neutralan, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	neutralan, uljast, mastan, svojstven, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	bez arome
MBF	Boja	žuto-zelenkasta
	Izgled	bistar, blago zagasit
	Miris	prijatan, voćni, blag, na vinsko sirće, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	prijatan, svojstven, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	blago izražena aroma (ukus) ulja od semenki grožđa, cvetni, voćni tonovi
RBF	Boja	žuta sa zelenom nijansom
	Izgled	bistar, zagasit, mat
	Miris	prijatan, na lišće, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	prijatan, svojstven, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	drvenasti tonovi
SBF	Boja	zelena sa žutom nijansom
	Izgled	bistar, mat, zagasit
	Miris	intenzivan, prijatan, zeleni tonovi, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	blago izražen, prijatan, svojstven, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	jače izražene arome, orašast

Tabela 12. Rezultati deskriptivne senzorske analize ulja od semenki grožđa (nastavak tabele)

Oznaka uzorka	Karakteristika	Opažanje
MPF	Boja	zelenkasto-žuta
	Izgled	bistar, vrlo blago zagasit
	Miris	intenzivan, vinski, oštar, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	svojtven, prijatan, blago kiseo, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	vinaska aroma
NU	Boja	zelenkasto-žuta
	Izgled	bistar, jasan, sjajan
	Miris	slabije izražen, svojtven, uljast, veoma blago vinski, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	uljast, bez izražene arome, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	specifična, kiselkasta, zelenkasta, cvetna, retronazalno se oseća blaga užeglost
PPU	Boja	zelenkasto-žuta
	Izgled	bistar, vrlo blago zagasit
	Miris	svojtven, prijatan, zaokružen, intenzivan, vinski, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost, medni, cvetni (ne lepršav)
	Ukus	prijatan, izražen na zeleno, drvenasto, blago gorči, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	mešavina voćnih i vinskih aroma
MPD	Boja	svetlo zelena
	Izgled	bistar, mat, zagasit
	Miris	jasno izražen miris na kljuk, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	prijatan, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	izražene arome

Tabela 12. Rezultati deskriptivne senzorske analize ulja od semenki grožđa (nastavak tabele)

Oznaka uzorka	Karakteristika	Opazanje
RPD	Boja	zelena
	Izgled	bistar, jasan, sjajan, svetlucač
	Miris	jasno izražen miris na kljuk, oštar (blago neprijatan), teških tonova, bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	jak, izražen ukus, odgovara, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	izražena aroma, fermentativni tonovi
SPD	Boja	tamno zelena
	Izgled	bistar, sjajan
	Miris	jasno izražen miris na kljuk (jače izražen u odnosu na MPD), bez stranog mirisa i bez mirisa na užeglost
	Ukus	opor, jak, gorak, bez stranog ukusa i bez ukusa na užeglost
	Aroma	teški zemljani tonovi, plesan

Analizom dobijenih rezultata vidi se da sva ulja zadovoljavaju zahteve Pravilnika (2006) u pogledu senzorske ocene. Mora se, međutim reći da je senzorski kvalitet jestivih ulja prema navedenom Pravilniku veoma uopšteno definisan, te prema Čl. 19, stoji: „Jestiva biljna ulja, koja se stavljaju u promet moraju biti prijatnog ukusa i mirisa svojstvenog sirovini ili neutralnog, bez stranog mirisa i bez mirisa i ukusa na užeglost.“ Prema dobijenim rezultatima u okviru ovih istraživanja, jasno se uočavaju ozbiljne razlike u senzorskim karakteristikama pojedinih ulja. Pored razlika koje potiču od sorte vinove loze, uočavaju se razlike između rafinisanog i nerafiniranih ulja, kao i razlike koje su posledica različitog tretmana koje su prošle semenke grožđa pre presovanja ulja. Pored navedenih razlika, panel senzorskih ocenjivača primetio je i određene sličnosti između hladno ceđenih ulja proizvedenih od semenki grožđa koje su dobijene na isti način (bez fermentacije, posle fermentacije i posle destilacije). Na slici 19 mogu se jasno videti razlike u boji ispitivanih uzoraka ulja.



Slika 19. Uzorci ulja od semenki grožđa sa vizuelnim utiskom boje

Boja ulja kretala se od svetlo žute sa zelenkastom nijansom do izrazito tamno zelene. Rafinisano ulje je najsvetlije boje, dok su nerafinisana ulja znatno intenzivnijih boja. Kod hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa bez fermentacije (MBF, RBF i SBF) preovladavaju svetliji tonovi žute i zelene boje, dok kod ulja dobijenih od semenki grožđa posle fermentacije (MPF) i posle destilacije (MPD, RPD, SPD) preovladavaju tamnije nijanse.

Kada se posmatraju ulja u okviru iste sorte vinove loze (Merlot), vidi se razlika u boji koja je posledica tretmana (tehnološkog postupka u vinarijama) koje su prošle semenke pre presovanja. To je posledica delovanja temperatura prilikom postupka fermentacije i destilacije. Pri višim temperaturama očigledno dolazi do raspadanja karotenoida sa jedne strane, a nakupljanja hlorofila sa druge strane, čime se boja ulja menja od žuto-zelenkaste, preko zelenkasto-žute do svetlo zelene.

Miris i ukus, odnosno aroma ulja takođe jako zavisi od porekla semenki (BF, PF, PD) i kreće se od blago izražene prijatne arome ulja od semenki grožđa, sa cvetnim i voćnim tonovima (MBF), preko jače izraženih vinskih aroma sa fermentativnim tonovima (MPF, RPF, SPD) do izrazito jakih aroma sa jasno izraženim mirisom na kljuk i fermentaciju, gorkim i oporim ukusom i sa teškim zemljanim tonovima (MPD, RPD, SPD). Povišene temperature u toku postupka fermentacije i posebno destilacije utiču na formiranje arome.

I pored toga što se pojavljuje izuzetno širok spektar aromatskih materija i što postoje značajne razlike u zavisnosti od sorte vinove loze, moguće je prepoznati da li je hladno presovano ulje dobijeno od semenki grožđa bez fermentacije (MBF), posle fermentacije (MPF) ili posle destilacije (MPD).

5.2.1.2 INSTRUMENTALNO ODREĐIVANJE BOJE

Imajući u vidu razlike koje se pojavljuju u boji ulja od semenki grožđa, a koje je zbog specifičnosti vizuelno teško definisati, izvršeno je instrumentalno određivanje boje pomoću aparata Minolta Chroma Meter CR-400. U tabeli 13 dati su rezultati pojedinih parametara boje u CIE Yxy i CIE L*a*b* sistemu.

Rezultati prikazani u tabeli 13 za parametre boje prema CIE Yxy sistemu i posebno definisane oblasti spektralne boje za dominantnu talasnu dužinu koje su očitane sa dijagrama hromatičnosti prema CIE Yxy sistemu se ne poklapaju sa rezultatima deskriptivne senzorske analiza i vizuelno definisane boje. Razlog tome je najverovatnije u metodologiji instrumentalnog određivanja boje, jer su uzorci ulja transparentni, pa ukoliko bi se očitavanje vršilo u odnosu na neku pozadinu, rezultati bi sigurno bili drugačiji. U ovom slučaju očitavanje je vršeno bez postavljanja pozadine jer je to uobičajen način određivanja kod biljnih ulja.

Tabela 13. Parametri boje ulja od semenki grožđa definisani prema CIE Yxy i CIE L*a*b* sistemu

Uzorak	CIE Yxy sistem			CIE L*a*b* sistem			Oblast spektralne boje za λ na dijagramu hromatičnosti po CIE Yxy
	Y (%)	λ (nm)	Čistoća boje (%)	L*(%)	a*	b*	
MBF	4,00 ±0,00	578,65 ±0,08	18,35 ±0,12	23,69 ±0,00	0,81 ±0,02	5,06 ±0,01	žučkasto-narandžasta
MPF	3,59 ±0,06	583,99 ±0,44	11,32 ±0,30	22,29 ±0,23	1,29 ±0,04	2,37 ±0,24	narandžasta
MPD	3,52 ±0,06	580,47 ±0,21	5,50 ±0,07	22,02 ±0,22	0,59 ±0,07	2,00 ±0,16	narandžasta
RBF	4,00 ±0,05	578,88 ±0,15	7,48 ±0,09	23,66 ±0,16	0,90 ±0,07	5,20 ±0,10	žučkasto-narandžasta
RPD	3,47 ±0,00	578,96 ±0,47	9,34 ±0,13	21,84 ±0,02	0,44 ±0,10	2,35 ±0,11	žučkasto-narandžasta
SBF	3,50 ±0,03	585,65 ±0,50	9,01 ±0,12	21,94 ±0,17	1,48 ±0,03	2,21 ±0,17	narandžasta
SPD	3,44 ±0,03	582,63 ±0,12	5,59 ±0,06	21,72 ±0,08	0,88 ±0,01	1,97 ±0,07	narandžasta
PPU	3,46 ±0,01	584,49 ±0,01	12,20 ±0,28	21,79 ±0,02	1,46 ±0,07	2,50 ±0,13	narandžasta
NU	3,86 ±0,06	579,64 ±0,00	14,51 ±0,11	23,20 ±0,21	1,06 ±0,01	4,67 ±0,03	žučkasto-narandžasta
RU	5,09 ±0,04	570,70 ±0,04	17,15 ±0,21	26,98 ±0,10	-2,26 ±0,01	6,96 ±0,00	zelenkastožuta

Najveću čistoću boje pokazuje uzorak hladno presovanog ulja sa oznakom MBF (18,35%), dok je najmanju pokazuje uzorak MPD (5,50%). Najveću svetloću (L*) ima uzorak rafinisanog ulja (26,98), a najmanju pokazuje uzorak hladno ceđenog ulja od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije (SPD= 21,72). Hladno presovana ulja od semenki grožđa pre fermentacije imaju veću svetloću od hladno presovanih ulja od semenki grožđa posle destilacije. Najveći udeo crvene boje (a*) ima uzorak sa oznakom SBF, a najmanji rafinisano ulje (RU), dok je udeo žute (b*) boje najveći kod RU, a najmanji kod uzorka SPD. Ako se posmatraju ulja dobijena od semenki crvenog grožđa sorte Merlot vidi se da je udeo crvene boje (a*) najveći kod uzorka

dobijenog posle fermentacije (MPF). To je, najverovatnije, zato što je tokom postupka fermentacije seme apsorbavalo deo bojenih materija iz pokožice. Kod uzoraka ulja dobijenih od semenki posle destilacije (MPD, RPD, SPD) udeo crvene boje je manji usled njene razgradnje pri temperaturama destilacije.

Boja jestivih nerafinisanih ulja je, svakako, jedan od ključnih elemenata potrošačkog kvaliteta ulja. Naime, svaki konzument po svom sopstvenom mišljenju, pre svega o boji, donosi odluku o prihvatanju ili odbijanju proizvoda. Izuzetan značaj boje kod devičanskih maslinovih ulja je već dobro poznat sa svih aspekata. Studiju, fokusiranu na karakterizaciji frakcije pigmenata devet španskih ekstra devičanskih maslinovih ulja, sprovedli su Gandul-Rojas i Minguez-Mosquera (1996), a dodatno, neke studije su fokusirane na sastavu pigmenata devičanskih maslinovih ulja iz različitih italijanskih (Giuffrida i sar., 2007; Lazzerini i Domenici, 2017) i grčkih sorti masline (Psomiadou i Tsimidou, 2001). Autori su saglasni da je potrebno povećati bazu podataka o karakterizaciji pigmenata devičanskih maslinovih ulja. Nadalje, Melgosa i sar. (2004) su utvrdili da je boja povezana sa drugim hemijskim i fizičkim osobinama devičanskog maslinovog ulja. Oni ukazuju na to da proizvođači ulja treba da obrate veću pažnju na preciznim specifikacijama boje svojih proizvoda. Shodno tome, rigorozna kolorimetrijska karakterizacija boje ulja će biti korisna u kontroli kvaliteta ovog proizvoda. Nedavno Becerra-Herrera i sar. (2018) izvršili su karakterizaciju i ocenu boje i fenolnih profila kao potencijalnih diskriminirajućih karakteristika među španskim ekstra devičanskim maslinovim uljima sa zaštićenim oznakom porekla.

Karakteristike boje devičanskih maslinovih ulja sa različitih maslinarskih područja Libije su bile u sledećim granicama: svetloća L od 22,37 do 23,81%; a^* vrednost od -1,2 do 0,25; b^* vrednost od 7,94 do 8,83 (Esalami, 2018). Vrednosti koordinata po CIE $L^*a^*b^*$ za druga biljna ulja, poput palme, soje, suncokreta, masline i ulja kukuruznih klica, su od 63,4 do 69,5% za L^* - svetloću, od 3,8 do 4,4 za a^* vrednost, i od 9,2 do 10,4 za b^* vrednost (Hsu i Yu, 2002).

Određivanjem boje ulja po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu Dimić i sar. (2018) su došli do zaključka da je u ulju suncokreta dobijenom hladnim presovanjem iz materijala različitog sastava i kvaliteta svetloća veoma ujednačena i iznosi 22-24%. Boja ulja se

formira prisustvom pigmenata karotenoida i hlorofila, pri čemu vrednosti parametra a^* variraju u opsegu od $-1,65 \pm 0,02$ do $0,36 \pm 0,04$, a vrednosti parametra b^* od $7,48 \pm 0,08$ do $10,69 \pm 0,13$. Svetloća ispitivanih ulja po CIE Y-xy sistemu ima vrednosti od $3,71 \pm 0,08$ do $4,09 \pm 0,05\%$, dominantna talasna dužina, se kreće od 571 do 574 nm, a vrednost čistoće boje ulja je relativno mala, kreće se u intervalu od $24,08 \pm 0,06$ do $32,50 \pm 2,30\%$.

U skladu sa ovim činjenicama, parametri boje hladno presovanih ulja semenki grožđa prikazanih u tabeli 13 mogu korisno poslužiti za formiranje baze podataka u cilju definisanja boje ulja u korelaciji sa kvalitetom.

5.2.1.3 BOJENE MATERIJE I TRANSPARENCIJA ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

Dominantne bojene materije ulja od semenki grožđa čine lipohromi, tj. pigmenti karotenoidi i hlorofili. Njihov sadržaj u ulju od semenki groža zavisi od mnogo faktora, kao što su način dobijanja ulja (rafinisano ili nerafinisano), sorta vinove loze (crno ili belo grožđe) od koje su dobijene semenke za proizvodnju ulja, kao i procesa koji su eventualno prošle semenke grožđa pre presovanja, kao što su fermentacija i/ili destilacija. U tabeli 14 date su vrednosti sadržaja pigmenata i transparentije uzoraka ulja od semenki grožđa.

Sadržaj ukupnih karotenoida, generalno posmatrano, nije se mnogo razlikovao između uzoraka hladno ceđenih ulja, a kretao se od $0,17 \text{ mg/kg}$ kod nerafinisanog ulja (NU) do $0,37 \text{ mg/kg}$ kod uzoraka hladno presovanih ulja pod oznakom MPF i SPD. Sadržaj ukupnih karotenoida bio je najniži kod rafinisanog ulja (RU), $0,06 \text{ mg/kg}$. Takođe, može se primetiti da je sadržaj ukupnih karotenoida nešto veći kod uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijenih posle fermentacije i destilacije u odnosu na uzorke hladno presovanih ulja dobijenih od semenki bez fermentacije.

Tabela 14. Bojene materije i transparentija ulja od semenki grožđa

Uzorak	Sadržaj ukupnih karotenoida (mg/kg)	Sadržaj ukupnih hlorofila (mg/kg)	Transparentija (% transparentije u odnosu na heksan)
MBF	0,22 ±0,006	33,77 ±0,60	37,6
MPF	0,37 ±0,004	72,52 ±0,09	36,0
MPD	0,27 ±0,003	48,79 ±0,56	45,5
RBF	0,25 ±0,006	29,36 ±0,26	38,3
RPD	0,36 ±0,005	48,08 ±0,29	53,8
SBF	0,36 ±0,004	61,57 ±0,10	32,8
SPD	0,37 ±0,003	67,44 ±0,13	47,6
PPU	0,29 ±0,005	72,69 ±0,04	39,9
NU	0,17 ±0,002	35,93 ±0,32	24,7
RU	0,06 ±0,013	0,54 ±0,01	64,4

Sadržaj ukupnih hlorofila kretao se od 0,54mg/kg kod RU do 72,69mg/kg kod PPU. Takođe, sadržaj ukupnih hlorofila veći je kod uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijenih posle fermentacije i destilacije u odnosu na uzorke hladno presovanih ulja dobijenih od semenki bez fermentacije. Ovde se može primetiti da je sadržaj hlorofila u uzorku hladno presovanog ulja od semenki grožđa sa oznakom MPF znatno veći nego kod MBF i MPD, a ujedno sadržaj hlorofila kod MBF je manji nego kod uzorka MPD. Ovo se može objasniti činjenicom da u toku postupka fermentacije dolazi do nakupljanja pigmenata u ulju usled čega je sadržaj pigmenata kod MPF veći nego kod MBF, a u toku postupka destilacije deo tih pigmenata se razgrađuje pod uticajem visokih temperatura, zbog čega je sadržaj istih kod MPD manji nego kod MPF. U svakom slučaju postupak fermentacije doprinosi povećanju ukupnog sadržaja pigmenata, zbog čega je taj sadržaj veći čak i kod uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa posle destilacije u odnosu na uzorke hladno presovanih ulja bez fermentacije.

Najveću vrednost transparentije ima uzorak rafinisanog ulja od semenki grožđa (64,4%), što je i očekivano, jer ovaj uzorak sadrži i najmanju količinu pigmenata. Najmanju transparentiju pokazuje uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa koji je nabavljen na tržištu Republike Srbije, a nosi oznaku NU (24,7%). Uzorci

proizvedeni za potrebe ove doktorske disertacije imali su transparentiju od 32,8% do 53,8%. Ovde se može primetiti da postupak destilacije kojim su podvrgnute semenke grožđa utiče na povećanje transparentije dobijenih ulja.

Stepen linearne veze između dve varijable meren je korišćenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (r), pri nivou značajnosti od $p=0,01$, u cilju procene korelacije između sadržaja pigmenata (ukupnih karotenoida i ukupnih hlorofila) i transparentije uzoraka ulja od semenki grožđa. Primećena je pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih karotenoida i ukupnih hlorofila. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je $r=+0,876$ ($p=0,01$). S druge strane, korelacija između sadržaja ukupnih karotenoida i transparentije uzoraka ulja od semenki grožđa bila je negativna, ali beznačajna ($r=-0,245$), kao i korelacija između sadržaja ukupnih hlorofila i transparentije uzoraka ulja od semenki grožđa koja je takođe bila negativna ($r=-0,402$).

Urađena je i two-way ANOVA sa Tukey testom pri nivou značajnosti od $p=0,05$. Faktori su bili sorte (Merlot, Rizling i Sila) i procesi (BF-bez fermentacije i PD- posle destilacije). Proces posle fermentacije (PF) nije razmatran jer u toku redovne proizvodnje u vinarijama nije bilo moguće izdvojiti seme i proizvesti ulje od belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila posle fermentacije. Postupak proizvodnje belih vina po tehnologiji proizvodnje crvenih se ne primenjuje u našoj zemlji. Tukey test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih hlorofila u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki grožđa sorti Merlot i Sila, kao i sorti Sila i Rizling, dok ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki grožđa sorti Rizling i Merlot. Takođe, postoji statistički značajna razlika između procesa BF i PD.

Što se tiče sadržaja ukupnih karotenoida Tukey test je pokazao da postoji statistički značajna razlika između svih proizvedenih uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa sorti Merlot, Rizling i Sila, kao i između procesa BF i PD.

5.2.2 MASNOKISELINSKI PROFIL I BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE HLADNO PRESOVANOG ULJA SEMENKI GROŽĐA

5.2.2.1 SASTAV MASNIH KISELINA

Masnokiselinski profil ulja važan je parameter u sagledavanju sveobuhvatnog kvaliteta i identifikacije ulja. Odnos različitih masnih kiselina utiče na stabilnost ulja, kao i na njegovu nutritivnu i biološku vrednost. Prema rezultatima datim u tabeli 15, sadržaj nezasićenih masnih kiselina u svim uzorcima ulja od semenki grožđa veći je od 90%. Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina kretao se od 8,52–15,43%, dok je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina iznosio od 78,50–86,26%. Dominantna masna kiselina ulja semenki grožđa je esencijalna linolna, n-6, odnosno omega-6, masna kiselina. Njen sadržaj u ispitivanim uzorcima kretao se od 78,34–86,03%. Statistički značajne razlike u sadržaju linolne kiseline javljaju se u zavisnosti od vrste ulja (hladno presovano ili rafinisano), sorti vinove loze (Merlot i Italijanski rizling u poređenju sa Silom) i prekla semenki za proizvodnju hladno presovanog ulja (pre fermentacije, nakon fermentacije ili nakon destilacije). Sadržaj oleinske kiseline u hladno presovanim uljima kretao se od 8,52–13,81%, dok je u rafinisanom ulju iznosio 15,30%. Rezultati do kojih je došao Malićanin (Malićanin, 2014) pokazuju da se sadržaj nezasićenih masnih kiselina u uzorcima ulja od semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon kretao od 86,00-87,90%, dok je linolna kiselina takođe dominantna i kretao se od 73,10-75,30%, a oleinska od 12,60-13,80%. Sastav masnih kiselina hladno presovanih ulja od semenki grožđa različitih sorti iz SAD (Spooner, Visconsin), koji su predstavili Lutterodt i sar. (Lutterodt i sar., 2011), pokazuje nešto viši sadržaj oleinske kiseline, od 13,9–21,9g/100g, i nešto niži sadržaj linolne kiseline, 66,0–75,3g/100g. Hussein i Abdrabba (Hussein i Abdrabba, 2015) pronalaze 55,3% linolne i 25,81% oleinske kiseline u ulju dobijenom iz semenki grožđa sorte Sultana Cultivar iz regije El-Gabal-Al-Akhader iz grada EL-Bieda u Libiji. El-shami i Mohamed (1992) otkrili su veći sadržaj oleinske kiseline u uljima poreklom iz Egipta. Rezultati predstavljeni od strane Crews i saradnici (2006) pokazali su različite nivoe masnih kiselina prisutnih u ulju od semenki grožđa poreklom iz Francuske, Italije i Španije. Ispitana ulja od semenki grožđa sadržala su veoma mali procenat esencijalne n-3, alfa-linolenske kiseline, ispod 0,3%, što daje veoma visok odnos n-6/n-3. Ovo nije povoljno sa nutritivnog aspekta. Trenutni odnos u hrani n-6 i

n-3 masnih kiselina je oko 20-30/1, dok se preporučeni odnos procenjuje na 2-4/1 (Radočaj i Dimić, 2013; Simopoulos, 2002; Strandvik, 2011).

Tabela 15. Sastav masnih kiselina ulja semenki grožđa

Masne kiseline (%m/m)	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
C16:0	3,56 ^d ±0,08	3,53 ^d ±0,04	3,62 ^e ±0,01	3,42 ^c ±0,02	3,39 ^c ±0,01	3,12 ^b ±0,00	3,00 ^a ±0,00	3,65 ^e ±0,01	3,65 ^e ±0,01	3,56 ^d ±0,01
C16:1	<0,04	<0,04	<0,04	0,06 ^c ±0,01	0,10 ^d ±0,01	<0,04	0,05 ^b ±0,00	0,04 ^a ±0,01	0,04 ^a ±0,00	<0,04
C18:0	1,80 ^d ±0,01	1,72 ^c ±0,04	1,72 ^c ±0,03	2,15 ^{ef} ±0,03	2,17 ^f ±0,01	1,50 ^b ±0,01	1,39 ^a ±0,00	2,25 ^g ±0,02	2,12 ^e ±0,01	2,26 ^g ±0,00
C18:1c	9,72 ^e ±0,18	8,52 ^a ±0,10	8,94 ^b ±0,09	13,81 ^h ±0,04	13,33 ^g ±0,02	9,40 ^d ±0,01	9,11 ^c ±0,00	10,31 ^f ±0,01	10,42 ^f ±0,01	15,30 ⁱ ±0,01
C18:2c	84,51 ^e ±0,22	86,00 ^g ±0,20	85,55 ^f ±0,15	80,21 ^b ±0,13	80,66 ^c ±0,04	85,59 ^f ±0,03	86,03 ^g ±0,00	83,30 ^d ±0,01	83,32 ^d ±0,02	78,34 ^a ±0,03
C18:3n3	0,20 ^{cde} ±0,02	0,18 ^{abc} ±0,02	0,17 ^{ab} ±0,02	0,19 ^{bcd} ±0,02	0,21 ^{de} ±0,01	0,20 ^{bcdde} ±0,00	0,22 ^e ±0,00	0,21 ^{cde} ±0,01	0,19 ^{bcd} ±0,00	0,16 ^a ±0,01
C20:0	0,12 ^d ±0,02	0,06 ^a ±0,00	<0,04	0,07 ^{ab} ±0,01	0,07 ^{ab} ±0,01	0,08 ^c ±0,01	0,08 ^c ±0,00	0,10 ^c ±0,00	0,13 ^d ±0,02	0,13 ^d ±0,00
C20:1	0,09 ^b ±0,01	<0,04	<0,04	0,08 ^{ab} ±0,01	0,08 ^a ±0,01	0,11 ^c ±0,01	0,12 ^{cd} ±0,00	0,13 ^e ±0,01	0,12 ^{cde} ±0,02	0,13 ^{de} ±0,00
C22:0	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	0,13 ^a ±0,00
SFA	5,48 ^d ±0,07	5,31 ^c ±0,09	5,35 ^c ±0,05	5,64 ^e ±0,06	5,63 ^e ±0,03	4,70 ^b ±0,02	4,46 ^a ±0,00	6,00 ^g ±0,00	5,90 ^f ±0,02	6,07 ^g ±0,02
MUFA	9,81 ^e ±0,17	8,52 ^a ±0,10	8,94 ^b ±0,09	13,96 ^h ±0,05	13,50 ^g ±0,01	9,51 ^d ±0,01	9,28 ^c ±0,00	10,48 ^f ±0,02	10,58 ^f ±0,01	15,43 ⁱ ±0,02
PUFA	84,71 ^e ±0,24	86,18 ^g ±0,19	85,72 ^f ±0,13	80,40 ^b ±0,10	80,87 ^c ±0,03	85,79 ^f ±0,03	86,26 ^g ±0,00	83,51 ^d ±0,02	83,51 ^d ±0,02	78,50 ^a ±0,04

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± standardna devijacija (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05). SFA- zasićene masne kiseline; MUFA- mononezasićene masne kiseline; PUFA- polinezasićene masne kiseline.

Prema Matthäus-u (2008), unos linolne kiseline ubrzava upalne procese, dok alfa-linolenska kiselina utiče na njihovo smanjenje, što je veoma važno za lečenje upalnih procesa. Takođe, neke studije sa eksperimentalnim životinjama pokazale su da unos prekomerne količine linolne kiseline promoviše kancerogenezu (Kubow, 1990).

Literaturni podaci ukazuju na značajnu varijaciju u sastavu masnih kiselina u ulju od semenki grožđa, u zavisnosti od sorte vinove loze, geografskog porekla i procesa ekstrakcije ulja (Lutterodt i sar., 2011; Vujasinović i sar., 2016). Međutim, može se reći da ulje od semenki grožđa pripada biljnim uljima sa veoma visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina i ima sličan sastav kao i suncokretovo ulje.

Malićanin (2014) je ispitivao različite načine izdvajanja ulja od semenki grožđa i prema dobijenim rezultatima može se reći da metoda ekstrakcije (primena ultrazvuka ili ekstrakcija po Soxhlet-u) kao i vreme trajanja ultrazvučnog tretmana nemaju značajan uticaj na sastav masnih kiselina dobijenih ulja iz semenki grožđa sorte Cabernet Sauvignon.

5.2.2.2 JODNI BROJ

Jodni broj daje podatak o stepenu nezasićenosti i on se u ispitanim uzorcima kretao od 149–157g/100g (tabela 16). Poređenja radi, jodni broj svinjske masti iznosi 46-66, a recimo maslinovog ulja oko 85g/100g. Esalami (2018) prikazao je vrednost Jbr od $83,73 \pm 0,05$ g/100g do $95,01 \pm 0,30$ g/100g kod devičanskih maslinovih ulja proizvedenih u različitim regionima Libije.

Tabela 16. Jodni broj ulja od semenki grožđa

Uzorak	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
Jodni broj (g/100g)	155 ^{cd} ±1	157 ^e ±1	156 ^{de} ±1	151 ^b ±1	152 ^b ±1	157 ^e ±1	157 ^e ±1	154 ^c ±1	154 ^c ±1	149 ^a ±1

Rezultat predstavlja srednju vrednost ± standardna devijacija zaokružena na ceo broj (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05).

Malićanin (2014) je našao da se jodni broj ulja od semenki grožđa različitih sorti kreće u veoma uskom opsegu od 128,33 do 135. Pravilnikom o kvalitetu (2006) definisane vrednosti jodnog broja za ulja od semenki grožđa su u opsegu od 128 do 150. Upoređujući podatke fizičkih i hemijskih karakteristika nerafinisanih (sirovih)

biljnih ulja, Tabela 2, navedenog Pravilnika, može se konstatovati da je po vrednosti jednog broja ulje od semenki grožđa najbližije suncokretovom ulju linolnog tipa (118-141). Ove rezultate potvrđuju svakako i sličnosti u sastavu masnih kiselina. U literaturi se mogu naći i širi opsezi za Jbr, pa tako Dimić (2005) navodi opseg od 121 do 157. Yousefi i saradnici (2013) za ulja iz semenki grožđa dve iranske sorte (Lal i Khalili) pronašli su niže vrednosti jednih brojeva i to 123,55 i 126,13.

Kada se na dobijene rezultate primeni two-way ANOVA sa Tukey testom pri nivou značajnosti od $p=0,05$, dobija se da postoji statistički značajna razlika u jednom broju između hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa različitih sorti (Merlot, Rizling i Sila), dok ne postoji statistički značajna razlika između procesa BF i PD. Drugim rečima sorta vinove loze ima uticaja na Jbr dobijenog ulja, dok procesi fermentacije i destilacije semenki pre presovanja nemaju uticaja na Jbr. Do ovih rezultata došao je i Malićanin koji kaže da statistička analiza dobijenih rezultata vrednosti jednog broja ukazuje na to da između ulja iz semenki grožđa različitih sorti dobijenih istom metodom postoje statistički značajne razlike.

5.2.2.3 SARŽAJ I SASTAV TOKOFEROLA

Studije o oksidaciji prirodnih ulja pokazuju da je kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata, kao što su tokoferoli i tokotrienoli, koje direktno učestvuju u antioksidativnim procesima može pružiti razumna predviđanja o stabilnosti (Carpenter, 1979).

Podaci o sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola, kao i podaci o sadržaja i sastavu pojedinih izomernih oblika tokoferola ulja od semenki grožđa prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Sadržaj i sastav tokoferola ulja od semenki grožđa

Tokoferoli (mg/kg)	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
α	38,4 ^d ±1,15	49,8 ^e ±1,49	22,1 ^b ±0,66	64,0 ^h ±1,92	76,6 ⁱ ±2,29	47,6 ^e ±1,42	54,5 ^f ±1,63	27,5 ^c ±0,7	10,4 ^a ±0,3	60,0 ^g ±1,8
$\beta+\gamma$	3,0 ^a ±0,09	6,2 ^e ±0,18	3,3 ^b ±0,09	7,6 ^g ±0,2	10,1 ^h ±0,3	4,6 ^d ±0,1	7,5 ^g ±0,2	3,9 ^c ±0,1	6,8 ^f ±0,19	4,1 ^c ±0,12
δ	1,2 ^b ±0,03	0,8 ^a ±0,02	<0,5	2,8 ^c ±0,08	4,7 ^e ±0,1	3,9 ^d ±0,1	15,3 ^f ±0,4	<0,5	<0,5	1,0 ^{ab} ±0,05
E-vit. aktivnost	39,16	51,43	22,93	65,93	79,17	48,79	56,53	28,48	12,11	61,04
Udeo α-tok. (%)	98,1	96,8	96,4	97,1	96,7	97,6	96,4	96,6	85,9	98,3
Ukupni tokoferoli i tokotrienoli	575,23 ^g ±4,46	568,64 ^g ±2,25	373,77 ^b ±0,88	463,99 ^f ±2,57	333,81 ^a ±8,08	438,77 ^e ±5,37	362,41 ^b ±0,55	423,59 ^d ±9,30	410,87 ^d ±19,87	391,06 ^c ±7,64

Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05).

Kao što se vidi na slici 20, a na čega ukazuju dobijeni rezultati prikazani u tabeli 17, sadržaj α -tokoferola je dominantan u odnosu na ostale tokoferole prisutne u uljima, što potvrđuju i rezultati drugih autora prikazani u pregledu literature. Sadržaj alfa-tokoferola u ispitanim uljima u okviru ovih istraživanja kretao se od 10,4 \pm 0,3mg/kg do 76,6 \pm 2,29mg/kg. Može se primetiti da je sadržaj α -tokoferola veći u uzorcima ulja dobijenim iz semenki nakon fermentacije (MPF) i destilacije (RPD i SPD). Sadržaji $\beta+\gamma$ -tokoferola i δ -tokoferola su relativno mali i kreću se od 3,0 \pm 0,09mg/kg do 10,1 \pm 0,3mg/kg za $\beta+\gamma$ -tokoferol i od <0,5 do 15,3 \pm 0,4mg/kg za δ -tokoferol. Navedeni izomeri tokoferola imaju blagotvorni uticaj na zdravlje, nezavisno od aktivnosti vitamina E.

Nova metodologija izražavanja E-vitaminske aktivnosti uzima u obzir sve izomere tokoferola i tokotrienola (Mag i Reichert, 2002; Bjelica, Dimić, i Vujasinović, 2018; Kellens i De Greyt, 2000). Na osnovu dobijenog sastava tokoferola izračunata je E-vitaminska aktivnost svih prisutnih tokoferola, odnosno ekvivalent vitamina E, što je posebno važan podatak za nutritivnu vrednost ulja. Naime, ekvivalent vitamin E kod ispitanih uzoraka iznosio je 12,11mg/kg kod NU do 79,17mg/kg kod RPD. Ovi

rezultati su u skladu sa udelom alfa-tokoferola koji je kod uzorka NU najmanji i izosio je 85,9%. Kod ostalih uzoraka udeo alfa-tokoferola je preko 96%. Najveću E-vitaminsku aktivnost imalo je hladno presovano ulje od semenki grožđa sorte Italijaski rizling (RBF i RPD).

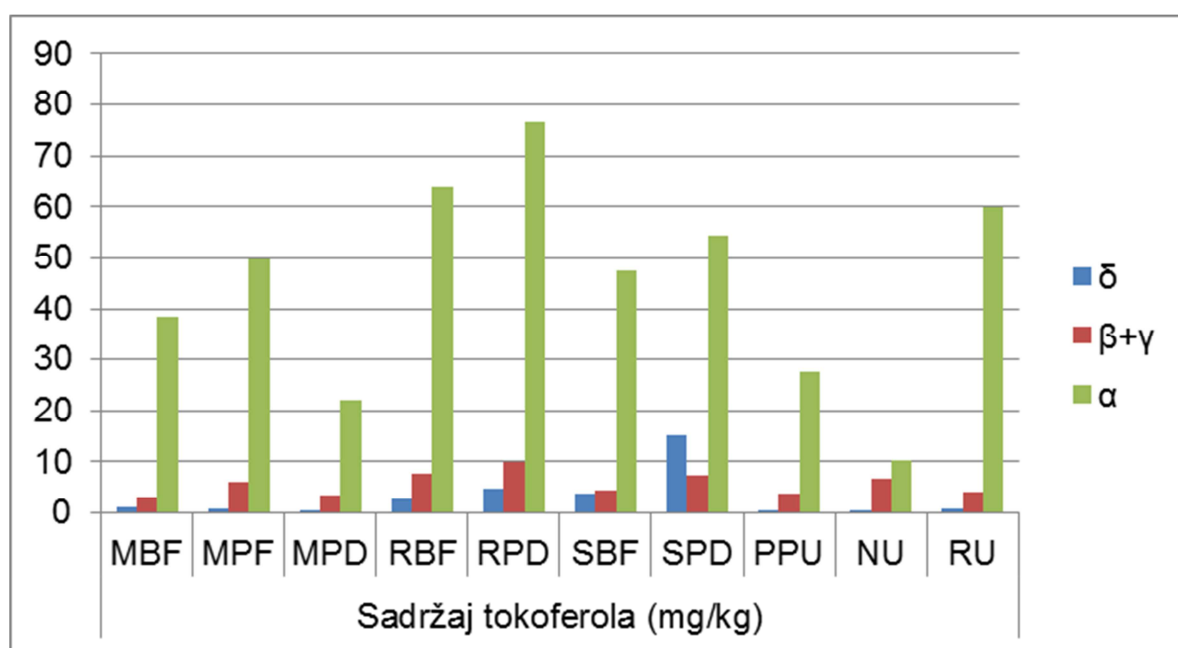
Prema Pravilniku o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Sl. glasnik RS, br. 19/2017 i 16/2018), u Prilogu 12 propisana je nutritivna referentna vrednost (NRV) za vitamin E i ona iznosi 12mg. Takođe, prema istom propisu, za proizvode koji nisu pića, može se reći da sadrže značajnu količinu vitamina ukoliko je sadržaj minimum 15% NRV na 100g. Dalje, prema Prilogu 1, Pravilnika o prehrambenih i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane (Sl. glasnik RS, br. 51/2018 i 103/2018) izjava da je neka hrana izvor vitamina i svaka izjava za koju je verovatno da ima isto značenje za potrošača, može se stavljati samo ako taj proizvod sadrži najmanje značajnu količinu koja je definisana u propisu koji bliže uređuje oblast deklarisanja, označavanja i reklamiranja hrane. U skladu sa navedenim za sva ulja koja sadrže više od 18mg/kg vitamina E i koja se smatraju značajnim izvorom, prema pomenutim propisima i referentnom mišljenju (2010:8(10):1816 EFSA-e Journal) prilikom deklarisanja može se koristiti zdravstvena izjava: Vitamin E doprinosi zaštiti ćelija od oksidativnog stresa. Ovaj uslov zadovoljavaju svi ispitani uzorci ulja od semenki grožđa, osim uzorka nerafinisanog ulja (NU).

S druge strane, prema CFIA (1996) ulja koja sadrže vitamin E u količini većoj od 0,5mg po 10g ulja (konzumna porcija), odnosno koja obezbeđuju između 5 i 15% od preporučenog dnevnog unosa, mogu se označiti kao "Izvor vitamina E". U ovom slučaju to su uzorci ulja sa oznakama MPF, RBF, RPD, SPD i RU. Sa ovog aspekta ulje od semenki grožđa je uporedivo sa uljem kikirikija, palminim i sojinim ulje, za razliku od kukuruznog i repičinog ulja koji su "Dobar izvor vitamina E", odnosno od suncokretovog i pamukovog ulja koji su "Izvanredan izvor vitamina E" (Mag i Reichert, 2002; Bjelica i sar., 2018).

Analizirajući dobijene rezultate za sadržaj pojedinačnih izomera tokoferola sa jedne strane i sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola sa druge strane, može se konstatovati da je sadržaj tokotrienola dominantan u uzorcima hladno presovanog ulja od semenki grožđa.

Tokotrienoli su u velikoj meri prisutni ulju semenki grožđa (Lampi i Heinonen, 2009). U raznim studijama γ -tokotrienol je označen kao dominantni tokol ovog ulja, a praćen je nižim sadržajem α -tokotrienola, kao i α -, β - i γ -tokoferola (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006).

Boso i saradnici (2018) proučavali su hladno presovana ulja od semenki belog grožđa tri sorte iz regiona Galicija u Španiji i dobili vrednosti za sadržaj α -tokoferola od 29,5–50,5mg/kg, a za sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola od 360–445,5mg/kg.

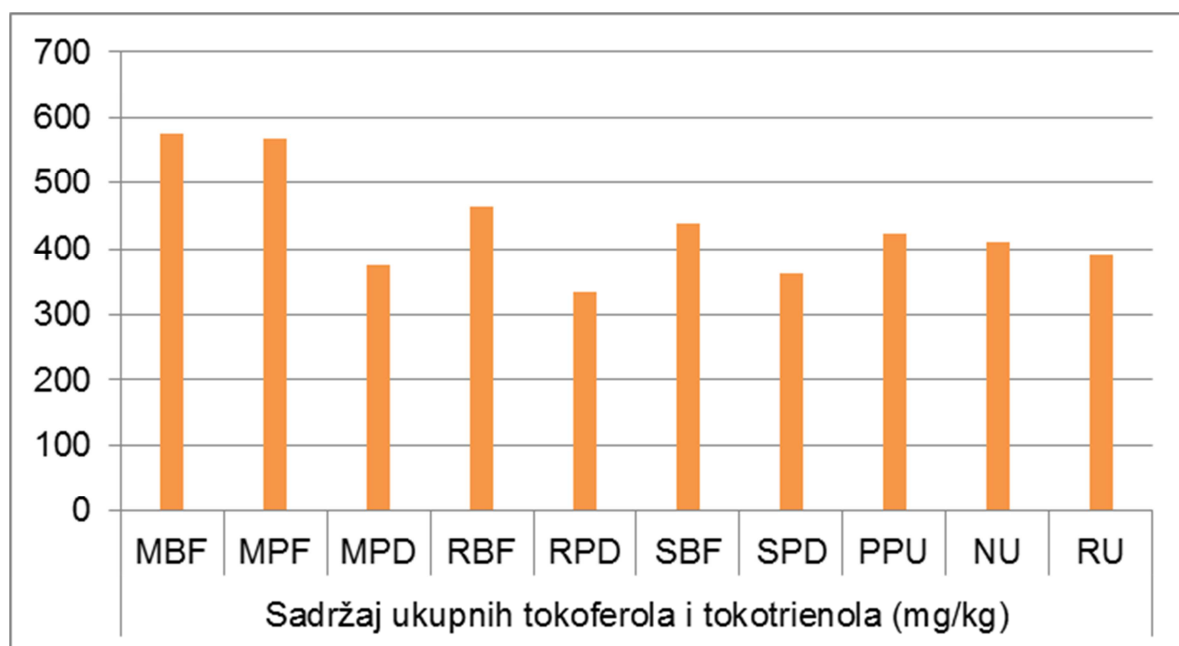


Slika 20. Sastav tokoferola ulja od semenki grožđa

Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola u ispitivanim uzorcima kretao se od $333,81 \pm 8,08$ mg/kg (RPD) do $575,23 \pm 4,46$ mg/kg (MBF) i ove vrednosti su uporedive sa suncokretovim uljem domaćih hibrida (Dimić, 2018). Prema dobijenim rezultatima prikazanim na slici 21 može se lako uočiti da se ukupni sadržaj tokoferola i tokotrienola smanjuje u ulju dobijenom iz semenki nakon destilacije (MPD, RPD, SPD). Udeo smanjenja tokoferola iznosio je 17,40% kod ulja od semenki grožđa sorte Sila, 28,06% kod ulja od semenki grožđa sorte Italijanski rizling i 35,02% kod ulja od semenki grožđa sorte Merlot. Ovo se može objasniti činjenicom da se tokom

procesa destilacije semenke grožđa izlažu povećanoj temperaturi, što ubrzava procese termičke oksidacije ulja, što dalje dovodi do smanjenja sadržaja tokoferola. To potvrđuju rezultati koje su predstavili Kim i saradnici (2008) gde se sugerije da vitamin E deluje kao antioksidant u ulju od semenki grožđa, pošto oksidacija aktivno napreduje kako se sadržaj vitamina E smanjuje.

Pored toga, može se primetiti da je došlo do blagog pada u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola u uzorku hladno presovanog ulja dobijenom od semenki grožđa sorte Merlot posle fermentacije. Ovo se može objasniti hidrolitičkim promenama koje se dešavaju tokom fermentacije. Do sličnih podataka došli su i Ovcharova i saradnici (2014) kada su ispitivali uticaj fermentacije na seme i kvalitet dobijenih ulja od semenki grožđa bugarske sorte Mavroud. Sadržaj ukupnih tokoferola u ulju od semenki grožđa pre fermentacije iznosio je $359,8 \pm 10,8 \text{ mg/kg}$, a posle fermentacije je opao na vrednost od $232,5 \pm 9,3 \text{ mg/kg}$.



Slika 21. Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola ulja od semenki grožđa

Assumpção i saradnici (2016) došli su do zaključka da ulje od semenki grožđa sadrži visoke nivoe tokoferola, koji obezbeđuju značajnu oksidativnu stabilnost ovog

ulja, ali taj sadržaj tokoferola u uljima zavisi od klimatskih uslova, uslova gajenja, prerade i skladištenja sirovina.

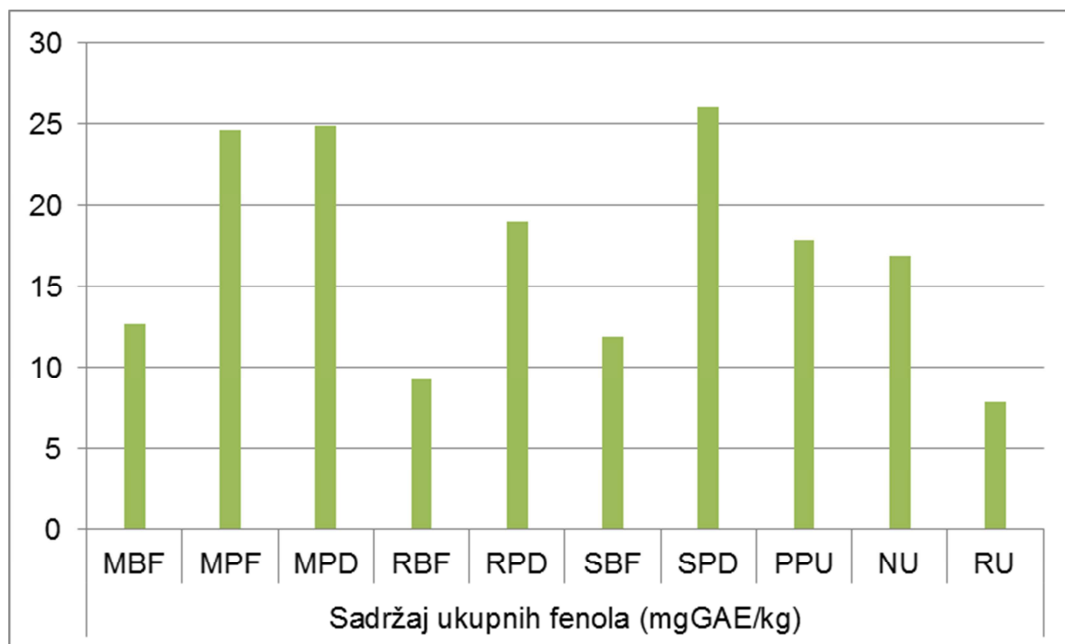
Iako faktorska analiza nije bila u fokusu rada, izvršena je two-way ANOVA, a zatim Tukey test na nivou značajnosti $p < 0,05$. Relevantni faktori bili su sorte (Merlot, Italijanski rizling i Sila) i procesi (BF-bez fermentacije i PD-posle destilacije). Proces posle fermentacije (PF) nije razmatran jer u toku redovne proizvodnje u vinarijama nije bilo moguće izdvojiti seme i proizvodi ulje od belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila posle fermentacije. Proces proizvodnje belih vina po tehnologiji proizvodnje crvenih vina ne primenjuje se u našoj zemlji. Rezultati dobijeni na ovaj način potvrdili su prethodna tumačenja. Tukey test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki grožđa sorti vinove loze Italijanski rizling i Merlot, kao i između sorti Sila i Merlot, dok ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki belog grožđa sorti, Italijanski rizling i Sila. Pored toga, postoji statistički značajna razlika između procesa BF i PD. Kao što je već rečeno, proces destilacije značajno smanjuje sadržaj tokoferola.

5.2.2.4 SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA

Jedna od glavnih prednosti u reklamiranju ulja od semenki grožđa je prisustvo fenolnih jedinjenja, koji imaju jaku antioksidativnu aktivnost. Matthäus (2008), je objavio da semenke grožđa sadrže veliki broj i značajnu količinu fenolnih komponenti, ali da zbog njihove ograničene rastvorljivosti, samo manji deo ovih jedinjenja se prenosi u ulje. Tokom procesa presovanja ulja, glavna količina ovih jedinjenja zaostaje u pogači (Bjelica i sar., 2019; Maier i sar., 2009; Matthäus, 2008).

U tabeli 18 prikazani su dobijeni rezultati za sadržaj ukupnih fenola kao i pojedinih polifenola prisutnih u ulju od semenki grožđa, a na slici 22 data je grafička ilustracija sadržaja ukupnih fenola.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 18, sadržaj ukupnih fenola kretao se od $7,92 \pm 1,50 \text{ mg/kg}$ u rafinisanom ulju do $26,07 \pm 1,53 \text{ mg/kg}$ u hladno presovanom ulju od semenki grožđa sorte Sila dobijenih nakon procesa destilacije (SPD).



Slika 22. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ulju od semenki grožđa

Na slici 22 vidi se da je sadržaj ukupnih fenola u zavisnosti od sorte vinove loze, u proseku nešto viši u hladno presovanim uljima dobijenim od crnog grožđa sorte Merlot, ali uočava se i značajan porast (akumulacija) fenola u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki grožđa nakon procesa fermentacije i destilacije (MPF, MPD, RPD, SPD). Ukupan sadržaj fenola u hladno presovanom ulju dobijenom iz semenki grožđa sorte Merlot bez fermentacije (MBF) iznosio je $12,66 \pm 1,07 \text{ mg/kg}$, posle fermentacije (MPF) ukupni sadržaj fenola povećan je na $24,60 \pm 0,52 \text{ mg/kg}$, a nakon destilacije (MPD) povećao se na $24,92 \pm 0,93 \text{ mg/kg}$. Takođe, uočeno povećanje sadržaja fenola primećeno je i u uzorcima od belog grožđa sorti, Italijanski rizling i Sila, gde je vrednost ukupnog sadržaja fenola u hladno presovanom ulju dobijena iz semenki bez fermentacije (RBF, SBF) od $9,29 \pm 0,84 \text{ mg/kg}$, odnosno $11,94 \pm 1,72 \text{ mg/kg}$, povećano na $19,01 \pm 0,14 \text{ mg/kg}$, odnosno $26,07 \pm 1,53 \text{ mg/kg}$ kod hladno presovanih ulja dobijenih iz semenki posle destilacije (RPD, SPD). Porast ukupnog sadržaja fenola nakon fermentacije i destilacije može se objasniti činjenicom

da se za vreme gore navedenih operacija povećava poroznost spoljašnjeg sloja semenki, čime se olakšava presovanje i izdvajanje ulja, a time se povećava i izdvajanje materija koje su slabije rastorljive u uljima. Na to prvenstveno utiče proces fermentacije, jer alkohol rastvara spoljašnju opnu semenke i mikrokomponente se tada lakše izdvajaju. Ovo se dešava tokom fermentacije, ali i nakon ovog procesa. S druge strane, proces destilacije ima pozitivan uticaj na izdvajanje mikrokomponenti, ali istovremeno utiče na smanjenje njihovog sadržaja usled termičke i druge degradacije (Bjelica i sar., 2019).

Bail i saradnici (2008) su odredili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u 9 uzoraka hladno presovanih ulja dobijenih iz semenki grožđa različitih sorti i tom prilikom utvrdili sadržaj fenolnih jedinjenja u rasponu od $59,0 \pm 0,02$ do $115,5 \pm 0,005$ mg/kg. Niže vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja pokazala su rafinisana ulja, zatim ulja iz semenki grožđa koje su temperirane pri 60°C , 30 minuta, pre presovanja, kao i ulje dobijeno iz semenki belog grožđa različitih sorti.

Ispitivanjem hladno presovanih ulja od semenki belog grožđa tri sorte (Albarino, Caino Blanco i Loureira) dobijenih od dve berbe (2015-2016) Boso i sar. (2018) dobili su vrednosti za sadržaj ukupnih fenola od $14 \pm 8,49$ mg/kg do $22,50 \pm 10,61$ mg/kg.

Dobijene niže vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja u uljima mogu se objasniti niskom rastvorljivošću fenola male molekulske mase u uljima u kombinaciji sa vezivanjem nekih fenolnih kiselina sa semenom. Slična zapažanja su objavljena i u publikacijama Matthäus-a (2002; 2008) i Parry i saradnika (2005).

Najveći sadržaj od jedinjenja prikazanih u tabeli 18 ima ursolna kiselina. Sadržaj ursolne kiseline kretao se od $34,1$ mg/kg kod rafinisanog ulja do 247 mg/kg kod hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Slla posle destilacije (SPD). Veći sadržaj ursolne kiseline dobijen je u uzorcima hladno presovanog ulja od semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila. Povećanje sadržaja ursolne kiseline uočeno je i kod uzoraka dobijenih nakon destilacije, dok fermentacija, kao i rafinacija, negativno utiče na sadržaj ursolne kiseline u ulju od semenki grožđa.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih fenolnih materija i pojedinih polifenola u uju od semenki grožđa

Fenoli (mg/kg)	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	<0,08	<0,08	<0,08	<0,09	0,275 ^c ±0,049	<0,09	0,393 ^d ±0,033	0,136 ^a ±0,040	0,209 ^b ±0,053	<0,09
<i>p</i> -kumarinska kiselina	<0,08	0,241 ^{bc} ±0,040	0,171 ^{ab} ±0,008	<0,09	0,443 ^d ±0,034	0,126 ^a ±0,007	0,531 ^d ±0,022	0,836 ^e ±0,159	0,306 ^c ±0,013	<0,09
Vanilinska kiselina	<0,3	0,698 ^a ±0,218	1,70 ^d ±0,08	<0,3	0,885 ^b ±0,107	<0,3	1,50 ^c ±0,23	<0,3	<0,3	<0,3
Ferulna kiselina	<0,08	0,144 ^b ±0,016	0,191 ^c ±0,024	<0,09	0,372 ^d ±0,027	<0,09	0,390 ^d ±0,004	0,149 ^b ±0,057	0,126 ^{ab} ±0,016	<0,09
Rezveratrol	<0,3	2,16 ^d ±0,05	2,890 ^e ±0,114	<0,3	0,888 ^b ±0,082	<0,3	<0,3	1,11 ^c ±0,06	0,514 ^a ±0,056	<0,3
Morin	<0,3	0,874 ^a ±0,017	0,842 ^a ±0,109	<0,3	0,842 ^a ±0,018	<0,3	1,19 ^b ±0,03	<0,3	<0,3	<0,3
Naringenin	0,008 ^a ±0,0008	0,125 ^d ±0,008	0,149 ^e ±0,005	0,015 ^a ±0,003	0,129 ^d ±0,009	0,032 ^b ±0,003	0,168 ^f ±0,005	0,052 ^c ±0,015	0,036 ^b ±0,003	<0,004
Ursolna kiselina	82,3 ^b ±12,5	136,3 ^c ±2,8	205 ^d ±10	159 ^c ±32	242 ^e ±7	212 ^d ±17	247 ^e ±6	219 ^d ±9	206 ^d ±6	34,1 ^a ±5,3
Protokatehinska kiselina	<0,04	0,073 ^a ±0,011	0,068 ^a ±0,019	<0,04	<0,04	<0,04	0,159 ^c ±0,022	0,165 ^c ±0,008	0,092 ^b ±0,008	<0,04
Krizoeriol	0,023 ^e ±0,003	0,017 ^{bcd} ±0,004	0,011 ^a ±0,001	0,010 ^a ±0,001	0,018 ^{cd} ±0,002	0,015 ^b ±0,001	0,019 ^d ±0,001	0,016 ^{bc} ±0,002	0,011 ^a ±0,001	<0,009
Amentoflavon	0,216 ^b ±0,133	0,056 ^a ±0,018	0,025 ^a ±0,008	0,016 ^a ±0,0008	0,009 ^a ±0,002	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009
Kemferol	<0,3	1,80 ^b ±0,14	2,63 ^c ±0,22	<0,3	1,92 ^b ±0,17	<0,3	8,19 ^d ±0,36	0,226 ^a ±0,037	0,141 ^a ±0,024	<0,3
Ukupni fenoli (mgGAE/kg)	12,66 ^b ±1,07	24,60 ^e ±0,52	24,92 ^e ±0,93	9,29 ^a ±0,84	19,01 ^d ±0,14	11,94 ^b ±1,72	26,07 ^e ±1,53	17,87 ^{cd} ±1,32	16,95 ^c ±0,65	7,92 ^a ±1,50

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± standardna devijacija (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05).

Istražen je određen broj potencijalnih biohemijskih efekata ursolne kiseline, ali nije bilo kliničke studije koja bi pokazala koristi za zdravlje ljudi. Postoji mnogo studija na životinjama koje su pokazale značajan efekat na inhibiciju različitih tipova ćelija raka. Ursolna kiselina pojačava regeneraciju jetre miša nakon parcijalne hepatektomije (Jin i sar., 2012). Miševi koji su primili ursolnu kiselinu ojačali su mišiće, a da nisu istovremeno povećali sopstvenu telesnu masu. Naprotiv, odnos telesne masti i šećera u krvi je smanjena sa ursolnom kiselinom (Kunkel i sar., 2011). Takođe ova kiselina pokazuje potencijalnu kardioprotekciju (Kunkel i sar., 2012).

Ursolna kiselina ima mnoge korisne efekte kao što su apoptoza i zastoj ćelijskog ciklusa, antimetastatski, anti-inflamatorni, antioksidativni, antiangiogeni, antimikrobni, antikancerogeni, analgetski, hepatoprotektivni, gastro-intestinalni, anti-čir, anti-HIV, kardiovaskularni, antiaterosklerotični i imunomodulatorni efekti, o čemu svedoče mnogi objavljeni radovi (Kashyap i sar., 2016; López-Hortas i sar., 2018; Woźniak i sar., 2015).

Druga fenolna jedinjenja u ulju od semenki grožđa koja pokazuju značajan sadržaj su rezveratrol, kemferol, vanilinska kiselina, mada je njihov sadržaj daleko niži u odnosu na ursolnu kiselinu.

Kemferol je važno jedinjenje izolovano iz ulja od semenki grožđa. To je polifenolni antioksidant koji se nalazi u voću i povrću. Mnoge studije opisuju korisne efekte kaempferola u smanjenju rizika od hroničnih bolesti, posebno raka. Epidemiološke studije su pokazale inverzni odnos između unosa kemferola i raka (Chen i Chen, 2013).

Chen i Chen (2013) su kategorizovali brojna antikancerogena svojstva kemferola i ćelijskih procesa. Kemferol može pomoći u povećanju antioksidativne odbrane organizma od slobodnih radikala, koji promovišu razvoj raka. Na molekularnom nivou, za kemferol je objavljeno da modulira brojne ključne elemente u putevima transdukcije ćelijskog signala koji su povezani sa apoptozom, angiogenezom, upalom i metastazama. Važno je da kaempferol inhibira rast ćelija raka i angiognozu i indukuje apoptozu ćelija, ali s druge strane, izgleda da kemferol održava normalno preživljavanje ćelija, a u nekim slučajevima ima i zaštitni efekat (Chen i Chen, 2013).

Sadržaj kemferola u uzorcima RU, MBF, RBF i SBF bio je ispod granice detekcije, dok je u drugim ispitanim uzorcima iznosio od 0,141–8,19mg/kg. Ovde, kao i kod drugih fenola, primećeno je da je sadržaj ovih jedinjenja veći u uzorcima hladno presovanih ulja iz semenki grožđa dobijenih posle fermentacije i destilacije, što je u skladu sa ukupnim sadržajem fenola.

Jedan od ključnih tipova polifenola u grožđu, rezveratrol, prisutan je u ograničenoj količini u ulju od semenki grožđa. Sadržaj je veći u ulju dobijenom od semenki crnog grožđa sorte Merlot, posebno u ulju dobijenom nakon fermentacije i destilacije. U tim slučajevima semenke su u kontaktu sa pokožicom duže vreme. Poznato je da je rezveratrol prisutniji u pokožici (ljusci) grožđa. S druge strane, to je mogući razlog zašto nije detektovan u ulju dobijenom od semenki grožđa pre fermentacije (<0,3 mg/kg). Rezveratrol se očitava samo u uzorcima hladno presovanih ulja koja su dobijena od semenki grožđa koje su prošle proces fermentacije i/ili destilacije izuzev kod uzorka dobijenog od sorte Sila, što može biti i sortna karakteristika.

Primenom two-way ANOVA na dobijene rezultate za sadržaj p-kumarinske kiseline, rezveratrola i ursolne kiseline i nakon analize rezultata pomoću Tukey testa ($p < 0,05$), može se utvrditi statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki grožđa sorte Italijanski rizling i Merlot, kao i sorte Sila i Merlot. Međutim, ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki belog grožđa sorti, Italijanski rizling i Sila. Nadalje, postoji statistički značajna razlika između procesa BF i PD. Za razliku od tokoferola, ovi procesi doprinose povećanju sadržaja fenolnih jedinjenja. Naime, u ispitanim uzorcima hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa nakon procesa destilacije, došlo je do povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja.

Na polifenolni profil ulja od semenki grožđa u većoj meri mogu da utiču razne varijable, kao što su sorta vinove loze, uslovi gajenja, klimatski uslovi i sl. (Cicero i sar., 2018). Takođe, na osnovu prikazanih rezultata, može se pretpostaviti da polifenolni profil hladnog presovanog ulja od semenki grožđa zavisi od toga da li je seme grožđa bilo pod uticajem procesa fermentacije i/ili destilacije pre presovanja.

5.2.2.5 SADRŽAJ STEROLA

Pored tokoferola, tokotrienola i polifenola, veoma značajna bioaktivna komponenta ulja od semenki grožđa su fitosteroli. U tabeli 19 prikazan je sastav fitosterola hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijenih presovanjem semenki grožđa koje su dobijene kao nusproizvod različitih faza tehnoloških postupaka u vinarijama i koje su bile podvrgnute procesima fermentacije i destilacije.

Tabela 19. Sadržaj fitosterola u različitim hladno presovanim uljima od semenki grožđa

Fitosteroli (mg/kg)	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD
Skvalen	159 ^b ±11	93 ^a ±11	107 ^a ±12	124 ^a ±16	154 ^b ±25	103 ^a ±16	122 ^a ±21
Kampesterol	309 ^c ±16	320 ^c ±12	329 ^c ±16	200 ^a ±17	270 ^b ±24	321 ^c ±17	245 ^b ±21
Stigmasterol	314 ^a ±10	411 ^{bc} ±14	391 ^b ±13	386 ^b ±21	451 ^d ±24	434 ^{cd} ±30	343 ^a ±28
β-sitosterol	1.620 ^b ±35	1.716 ^c ±16	1.742 ^c ±21	2.116 ^d ±59	2.368 ^e ±40	2.119 ^d ±55	1.523 ^a ±38
Stigmastanol	58 ^a ±12	82 ^{ab} ±9	90 ^{bc} ±18	82 ^{ab} ±12	114 ^c ±12	100 ^{bc} ±17	73 ^{ab} ±19
NI 1	54 ^{bc} ±7	46 ^{abc} ±10	41 ^{ab} ±8	56 ^{bc} ±13	69 ^c ±19	42 ^{ab} ±12	24 ^a ±13
3β-stigmasta- 7,24(28)-dien-3-ol	36 ^a ±8	31 ^a ±8	38 ^a ±9	36 ^a ±15	34 ^a ±14	72 ^b ±20	35 ^a ±15
NI 2	38 ^{bc} ±12	41 ^c ±10	45 ^c ±15	34 ^{bc} ±14	27 ^{abc} ±11	18 ^{ab} ±7	13 ^a ±5
Ukupno	2.588 ^a ^b ±120	2.740 ^b ±113	2.783 ^b ±140	3.034 ^c ±207	3.487 ^d ±218	3.209 ^c ±226	2.378 ^a ±196

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± standardna devijacija (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05); NI1– neidentifikovani sterol 1 (slika 17); NI2– neidentifikovani sterol 2 (slika 18)

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 19, sadržaj ukupnih sterola hladno presovanih ulja od semenki grožđa kretao se u opsegu od 2.378mg/kg do 3.487mg/kg. Najveći sadržaj od pojedinačnih fitosterola u ispitanim uzorcima ima β-sitosterol. Njegov sadržaj se kretao od 1.523mg/kg kod SPD do 2.368mg/kg kod RPD. Udeo β-sitosterola u ukupnim sterolima iznosio je 62,59–69,74%. Prema zastupljenosti sledeći fitosterol je stigmasterol sa udelom od 12,13–15,00%, odnosno

sa sadržajem od 343mg/kg do 451mg/kg. Kampesterola je bilo nešto manje, 200mg/kg do 329mg/kg, sa udelom od 6,59–11,94%.

Ukupni sadržaj sterola bio je unutar granica od 2.000–7.000 mg/kg koje je postavio Codex Alimentarius (1999) i koje su prijavili drugi autori za ulja od semenki grožđa različitih sorti (Beveridge i sar., 2005; Boso i sar., 2018; Crews i sar., 2006; Pardo i sar., 2009; Yang i sar., 2018).

Boso i sar. (2018) ispitivanjem hladno presovanih ulja od belog grožđa tri sorte (Albarino, Caino Blanco i Loureira) dobili su sadržaj ukupnih sterola na nivou od 2.571,50 mg/kg do 2.699,50mg/kg, pri čemu je sadržaj β -sitosterola iznosio 67,6–69,8%, sadržaj kampesterola od 9,05–10,30%, a stigmasterola 11,20–12,75%.

Sličan sadržaj su prijavili Yang i sar. (2018) koji su našli 1.455mg/kg β -sitosterola, 390mg/kg kampesterola i 249mg/kg stigmasterola u ulju od semenki grožđa poreklom iz Kine. Sadržaj ukupnih sterola bio je na nivou od 2.094mg/kg.

Firestone (1997) navodi da je ukupan sadržaj sterola u ulju od semenki grožđa oko 5800mg/kg, a najzastupljeniji su β -sitosterol (>60%) koji je i dominantan po sadržaju, zatim kampesterol (9–14%), stigmasterol (9–17%) i Δ 5-avenasterol (1–3%).

Ispitivanjem ulja od semenki belog i crnog grožđa bugarskih sorti, Bolgar, Super ran bolgar, Mavroud i Široka melniška loza, Ovcharova i sar. (Ovcharova i sar., 2016) našli su 70,0–72,1% β -sitosterola, 18,5–19,9% kampesterola i 3,4–3,5% stigmasterola, dok su ostali sterol nađeni u manjem sadržaju.

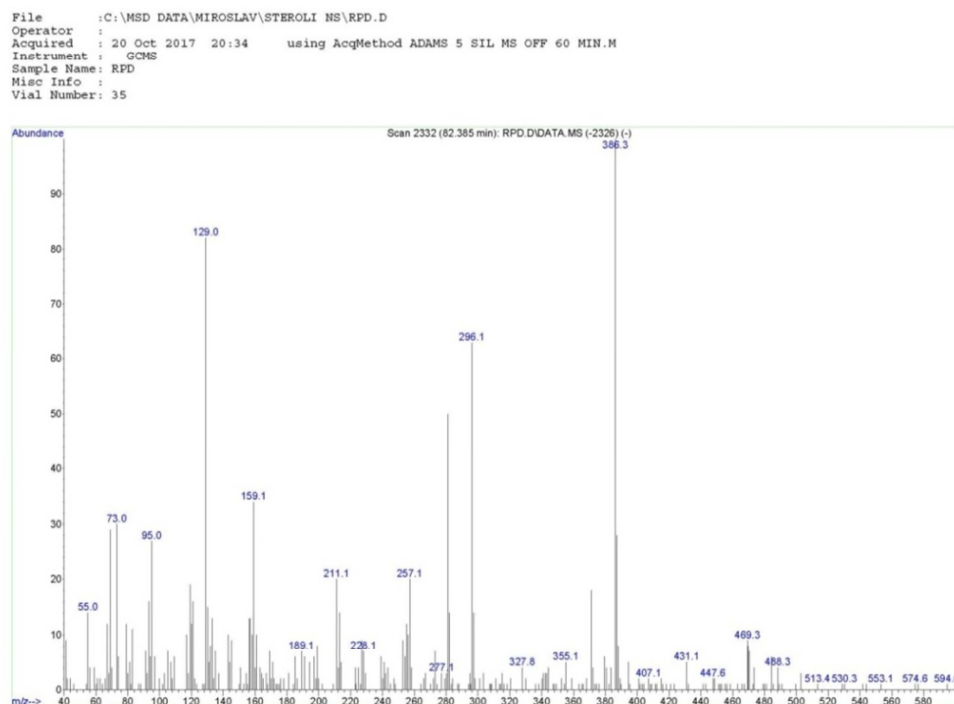
Beveridge i sar. (2005) su, u zavisnosti od načina ekstrakcije ulja (primenom natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom ili ekstrakcije petrol-etrom) iz semenki 8 uzoraka crnog grožđa različitih sorti, pronašli fitosterole u opsegu od 4.103–18.617mg/kg (kod ulja dobijenih primenom ugljenik(IV)-oksida kao rastvarača) i u opsegu od 3.165–11.065mg/kg (kod ulja dobijenih primenom petrol-etra kao rastvarača).

Kao jedan od najčešćih fitosterola u biljnim uljima, poznato je da kampesterol ima efekte koji smanjuju holesterol zbog svoje strukturne sličnosti sa holesterolom, što ga

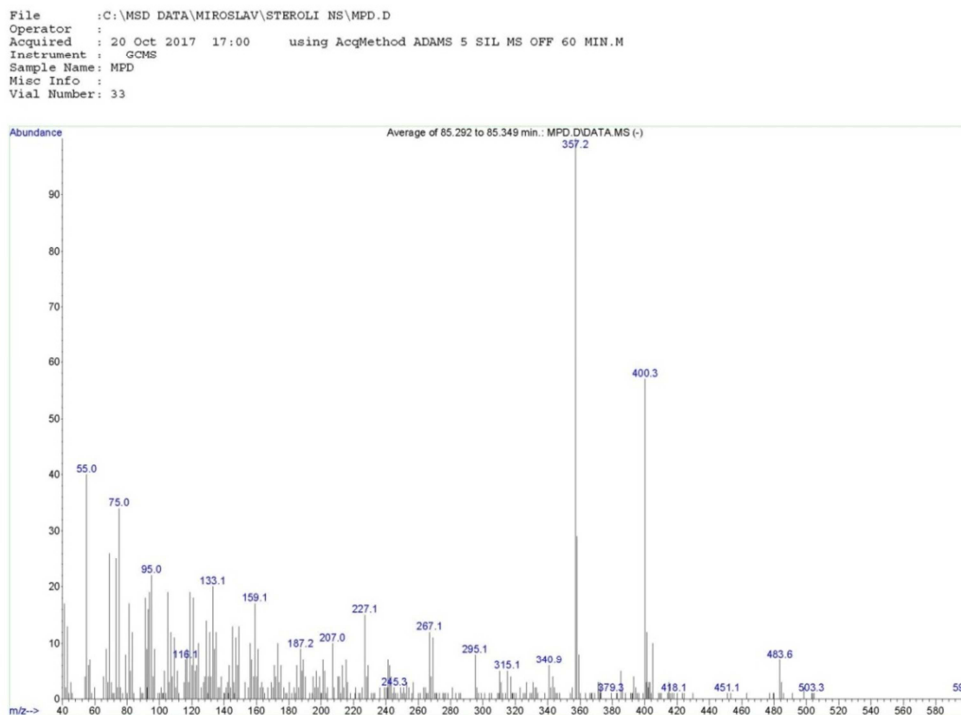
čini antiangiogenim kandidatom za prevenciju i lečenje bolesti povezanih sa angiogenezom (Choi i sar., 2007; Yang i sar., 2018).

Primenom two-way ANOVA analize na dobijene rezultate i nakon analize rezultata pomoću Tukey testa ($p < 0,05$), može se utvrditi da ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki grožđa bez fermentacije (BF) i semenki grožđa posle destilacije (PD), odnosno procesi fermentacije i destilacije kojima su podvrgnute semenke grožđa pre presovanja nemaju uticaja na sadržaj fitosterola u hladno presovanim uljima. Ovo potvrđuju i rezultati do kojih su došli Ovcharova i sar. (2014) koji su utvrdili da nema praktičnih promena u sastavu i sadržaju slobodnih sterola pre i posle fermentacije semenki.

Prema tome, može se reći da je sadržaj pojedinih fitosterola kao i sadržaj ukupnih sterola u proseku veći u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila, u odnosu na hladno presovano ulje dobijeno od semenki crnog grožđa sorte Merlot.



Slika 23. Hromatograf neidentifikovanog sterola N11



Slika 24. Hromatograf neidentifikovanog sterola NI2

5.2.2.6 DPPH AKTIVNOST

DPPH aktivnost i antiradikalni kapacitet ulja daje uvid u sadržaje bioaktivnih komponenti u ulju semenki groža. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti, izraženi kao vrednost EC_{50} , i antiradikalni kapacitet, izražen kao ARC, prikazani su u tabeli 20. Niže vrednosti EC_{50} i više vrednosti ARC ukazuju na veću antiradikalnu aktivnost ulja.

Najmanju vrednost EC_{50} (65,34mg ulja/mgDPPH), a samim tim i najveću antiradikalnu aktivnost ARC ($1,530 \times 10^{-2}$ mgDPPH/mg ulja) ima uzorak hladno presovanog ulja dobijenog od semenki sorte Merlot pre fermentacije (MBF). S druge strane, najveće vrednosti EC_{50} i najmanji antiradikalni potencijal ima uzorak rafinisanog ulja od semenki grožđa (RU).

Tabela 20. DPPH aktivnost ulja semenki grožđa izražena preko EC₅₀ i ARC

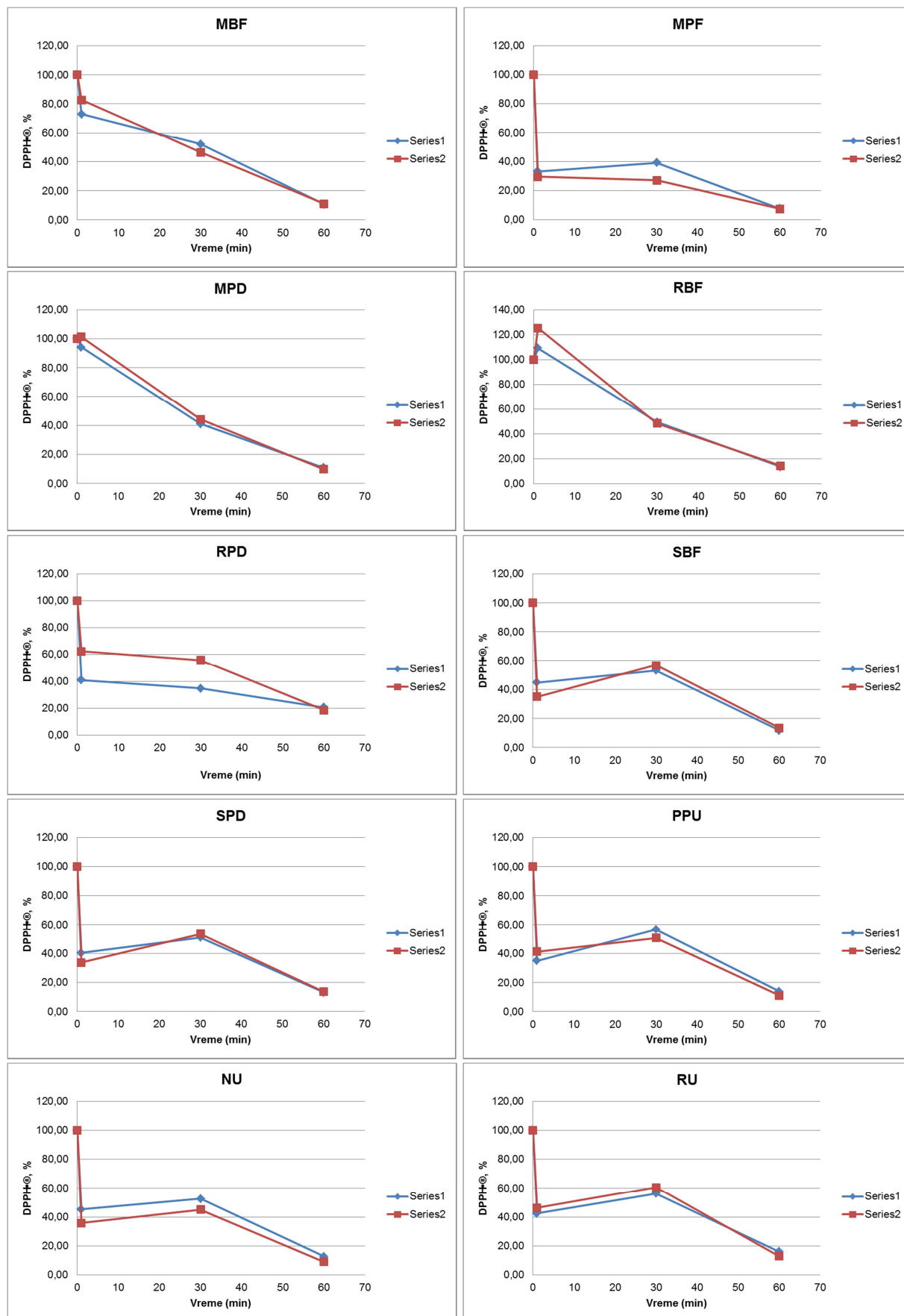
Oznaka uzorka	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
EC₅₀ (mg ulja / mgDPPH)	65,34 ^a ±0,32	72,13 ^b ±1,43	75,64 ^c ±1,73	95,63 ^f ±1,48	97,61 ^g ±1,16	89,45 ^d ±1,03	92,50 ^e ±1,17	98,11 ^g ±0,28	102,77 ^h ±1,12	127,17 ⁱ ±1,23
ARCx10⁻² (mgDPPH / mg ulja)	1,530 ±0,00	1,386 ±0,00	1,322 ±0,00	1,046 ±0,00	1,024 ±0,00	1,118 ±0,00	1,081 ±0,00	1,019 ±0,00	0,973 ±0,00	0,786 ±0,00

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± standardna devijacija (n = 3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05).

Primenom two-way ANOVA na dobijene rezultate za vrednost EC₅₀, koja predstavlja količinu ulja potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50% i analizom rezultata pomoću Tukey testa (p<0,05), može se utvrditi da postoji statistički značajna razlika između hladno presovanih ulja dobijenih od semenki različitih sorti vinove loze (Merlot, Italijanski rizling i Sila), kao i između procesa BF (bez fermentacije) i PD (posle destilacije).

Posmatranjem vrednosti u okviru iste sorte (Merlot), može se konstatovati da proces fermentacije i proces destilacije negativno utiču na antiradikalni potencijal ulja. Negativan uticaj procesa destilacije uočava se i kod uzoraka dobijenih od sorti Italijanski rizling i Sila. Pored toga, ukoliko se uporede vrednosti dobijene za hladno presovana (MBF, MPF, MPD, RBF, RPD, SBF, SPD i PPU) i nerafinisano ulje (NU), jasno se može uočiti negativan uticaj rafinacije ulja i smanjenje antiradikalnog potencijala kod RU.

Promena sadržaja DPPH radikala u uzorcima ulja prikazana je na slici 25.



Slika 25. Promena sadržaja DPPH radikala u uzorcima ulja od semenki grožđa (n=2)

Velika razlika u antiradikalskom potencijalu između jestivog nerafinisanog i rafinisanog ulja semenki grožđa, što je u direktnoj korelaciji sa prisustvom biomolekula sa snažnim antioksidativnim efektom, je značajan dokaz o većoj zdravstveno-nutritivnoj vrednosti hladno presovanih ulja. Upravo ova činjenica, između ostalog, daje značajan doprinos i za sve veću potražnju i upotrebu hladno presovanog ulja semenki grožđa u savremenoj ishrani.

5.3 ODRŽIVOST ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

U cilju sagledavanja održivosti ulja izvršena je provera kvaliteta i oksidativnog stanja polaznog uzorka, određen je indukcioni period ulja, a zatim je ulje podvrgnuto Shaal-Oven testu pri umerenim temperaturama i fluorescentnom testu.

5.3.1 KVALITET I OKSIDATIVNI STATUS ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

Sagledavanje polaznog kvaliteta ulja veoma je važno kada se govori o njegovoj održivosti. S tim u vezi, izvršeno je ispitivanje određenih parametara kvaliteta ulja od semenki grožđa. Rezultati ispitivanja kiselinskog (Kbr), peroksidnog (Pbr) i anisidinskog broja (Abr), kao i oksidativne vrednosti (OV vrednost) ulja od semenki grožđa dati su u tabeli 21.

Tabela 21. Kiselinski, peroksidni i anisidinski broj i OV vrednost ulja od semenki grožđa

Ulje od semenki grožđa	Kbr* (mgKOH/g)	Pbr* (mmol/kg)	Abr (100A ^{1%} _{350nm})	OV vrednost (Totox)
MBF	0,66 ±0,09	1,12 ±0,01	0,65	2,89
MPF	0,91 ±0,05	3,08 ±0,17	0,56	6,72
MPD	1,03 ±0,05	18,31 ±1,11	2,72	39,34
RBF	0,66 ±0,08	2,73 ±0,17	2,12	7,58
RPD	2,81 ±0,01	13,71 ±0,02	2,46	29,88
SBF	0,73 ±0,00	3,47 ±0,09	1,89	8,83
SPD	16,85 ±0,17	10,76 ±0,11	3,26	24,78
PPU	2,82 ±0,13	4,16 ±0,11	1,91	10,23
NU	1,30 ±0,06	3,49 ±0,29	1,74	8,72
RU	0,36 ±0,05	1,21 ±0,04	13,31	15,73

* Rezultat predstavlja srednju vrednost ± standardna devijacija (n=3).

Kiselinski i peroksidni broj predstavljaju osnovne pokazatelje kvaliteta ulja. Njihova vrednost definisana je i odgovarajućim tehničkim propisom (Pravilnik, 2006). Prema Čl.19, Tabela 3, Pravilniku o kvalitetu vrednost kiselinskog broja za hladno presovana

ulja iznosi najviše 4mgKOH/g, dok za rafinisano ulje iznosi najviše 0,6mgKOH/g. Peroksidni broj za hladno presovana ulja definisan je na najviše 7,5mmol/kg, a za rafinisana ulja najviše 5,0mmol/kg.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 22 vidi se da se kiselinski broj kretao od $0,36 \pm 0,05$ mgKOH/g kod uzorka rafinisanog ulja (RU) do čak $16,85 \pm 0,17$ mgKOH/g kod hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije (SPD). Osim uzorka SPD svi ostali ispitani uzorci odgovaraju zahtevu pomenutog pravilnika o kvalitetu.

Ukoliko posmatramo uticaj procesa fermentacije i destilacije na kvalitet dobijenog ulja vidi se da i jedan i drugi proces utiču na povećanje kiselinskog broja.

Oksidacija je uzrok pojave najčešćeg kvara koji se javlja kod ulja, a to je užeglost. Određivanjem peroksidnog broja (Pbr), ispituje se prisustvo primarnih proizvoda procesa oksidacije (hidroperoksida i peroksida) (Vujasinović i sar., 2016). Peroksidni broj ispitanih uzoraka ulja kretao se od $1,12 \pm 0,01$ mmol/kg kod MBF do $18,31 \pm 1,11$ mmol/kg kod MPD. Ispitani uzorci hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijeni posle destilacije nisu u skladu sa zahtevima pravilnika o kvalitetu, zbog povećane vrednosti peroksidnog broja. I ovde se može uočiti kako vrednost Pbr u ulju raste usled izglanja semenki procesima fermentacije i destilacije.

Prema Malićaninu (2014) peroksidni broj ulja od semenki crnog grožđa različitih sorti kretao se prosečno od 3,19 do 5,79mmol/kg. Kod Pardo i sar. (2009) vrednost peroksidnog broja ulja od semenki grožđa četiri različite sorte kretao se od 5,99–13,50meq/kg. Yousefi i saradnici (2013) su u uljima od semenki grožđa dve iranske sorte (Lal i Khalili) pronašli vrednosti peroksidnog broja 9,3 i 10,63meq/kg.

Tokom oksidacije lipida, hidroperoksidi, primarni reakcioni proizvodi, razlažu se do proizvoda sekundarne oksidacije (alifatske aldehide, ketone, alkohole, kiseline i ugljovodonike) koji su stabilniji tokom procesa zagrevanja, a odgovorni su za netipične i neprijatne mirise jestivih ulja. Da bi se osigurao bolji monitoring procesa oksidacije lipida za vreme zagrevanja, neophodna je simultana detekcija kako primarnih, tako i sekundarnih produkata oksidacije (Poiana, 2012). Anisidinski broj

govori o količini sekundarnih produkata oksidacije koji nastaju razgradnom hidroperoksida. Njihov sadržaj u ispitanim uzorcima ulja kretao se od 0,56–13,31.

Opštu sliku o oksidativnom stanju ulja daje oksidativna vrednost (OV) ili Totox vrednost. Ova vrednost daje uvid u količinu primarnih i sekundarnih produkata oksidacije (Poiana, 2012).

Najveću OV vrednost ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot posle destilacije (39,34), dok najmanju vrednost ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot bez fermentacije (2,89). Ovde se uočava da je OV vrednost veća kod svih ulja dobijenih od semenki posle destilacije. Prema dobijenim rezultatima može se konstatovati da što je veća OV vrednost to je ulje lošijeg oksidativnog stanja.

Ispitivajući oksidativne parametre različitih specijalnih ulja Madawala i saradnici (2012) dobili su podatke za ulje semenki grožđa i to Pbr= 1,0 meq; Abr= 15,5 i OV= 17,5.

Malićanin (2014) utvrdio je OV vrednosti za hladno presovana ulja u uskom rasponu od $16,13 \pm 0,12$ do $17,93 \pm 0,06$.

5.3.2 INDUKCIONI PERIOD ULJA OD SEMENKI GROŽĐA

Rancimat metoda je test ubrzanog starenja jestivih ulja. U ovom procesu primenjenog testa masne kiseline se oksiduju pod dejstvom temperature od 100°C i protoku vazduha od 18-20l/h. Rezultat se izražava kao indukcionni period (IP) u satima (h). Rezultati za indukcionni period ulja od semenki grožđa prikazani su u tabeli 22 i na slici 26.

Tabela 22. Indukcioni period ulja od semenki grožđa

Oznaka uzorka	MBF	MPF	MPD	RBF	RPD	SBF	SPD	PPU	NU	RU
IP (h)	9,78 ^h ±0,12	10,72 ⁱ ±0,27	6,44 ^c ±0,08	9,07 ^g ±0,11	5,48 ^b ±0,02	7,51 ^e ±0,23	4,48 ^a ±0,36	7,86 ^f ±0,11	9,11 ^g ±0,09	6,77 ^d ±0,19

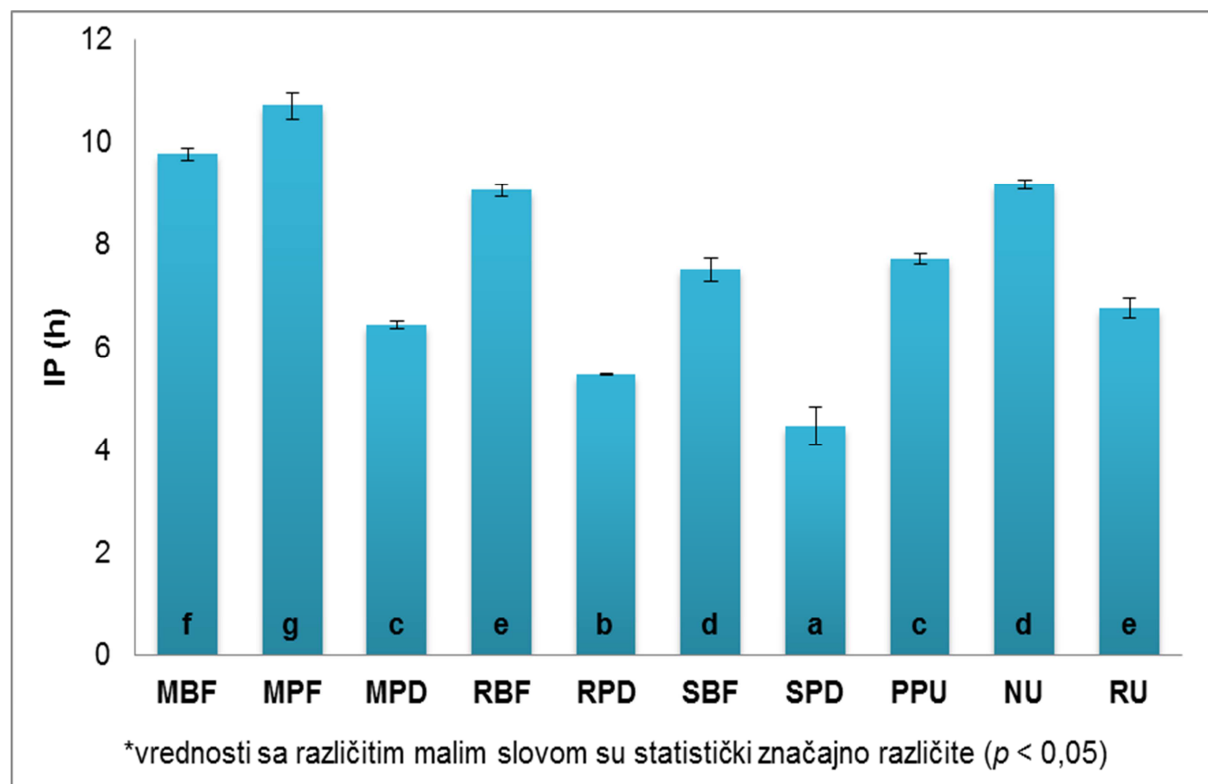
Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± standardna devijacija (n=3); Različita slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike u rezultatu (p<0,05).

Dobijeni rezultati ukazuju na to da hladno presovana ulja od semenki grožđa imaju relativno dobru oksidativnu stabilnost. Posebno dobru stabilnost pokazuje uzorak MPF gde je indukcioni period iznosio 10,72±0,27h. Značajno niže vrednosti pokazuju uzorci hladno presovanih ulja dobijeni od semenki grožđa posle destilacije i to 6,44h kod MPD, 5,48h kod RPD i svega 4,48h kod SPD. Sem navedenih, svi ostali uzorci pokazuju veće vrednosti indukcionog perioda od rafinisanog ulja. Takođe, iz dobijenih rezultata i sa slike 22 jasno se uočava da sorta vinove loze ima značajan uticaj na oksidativnu stabilnost hladno presovanih ulja. Iz toga sledi da procesi fermentacije i destilacije imaju značajan uticaj na održivost hladno presovanog ulja. Proces fermentacije utiče na povećanje, ali proces destilacije utiče na drastično smanjenje indukcionog perioda.

Navedeno potvrđuju i rezultati dobijeni primenom two-way ANOVA. Upoređivanjem dobijenih rezultata primenom Tukey testa (p<0,05) primetno je da postoji statistički značajna razlika u indukcionom periodu između hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa različitih sorti (Merlot, Italijanski Rizling i Sila), kao i u hladno presovanim uljima dobijenim od semenki koje su bile podvrgnute različitim procesima pre presovanja (fermentacija, destilacija).

Podaci o indukcionom periodu ulja semenki grožđa u relevantnoj naučnoj literaturi značajno se razlikuju, pre svega zbog različitih uslova za izvođenje testa (temperatura i protok vazduha). Madawala i saradnici (2012) pri temperaturi od 100°C i protoku vazduha od 20l/h našli su da je indukcioni period za ulje od semenki grožđa 8,9h, dok za orahovo ulje iznosi 4,2h, za bademovo ulje 10,2h, ulje lešnika 16h, a za ulje avokada 16,9h. Lutterodt i saradnici (2011) našli su da indukcioni

period za ulja od semenki grožđa različitih sorti, pri temperaturi od 80°C i protoku vazduha od 7l/h, iznosi od 19,7 do 40h.



Slika 26. Indukcioni period ulja od semenki grožđa

Poznato je, takođe, da i povećan sadržaj slobodnih masnih kiselina u ulju može imati pro-oksidativni efekat, odnosno da može da utiče na smanjenje indukcionog perioda. U ispitanim uzorcima upravo ulja sa najnižim vrednostima IP (MPD, RPD i SPD) imala su i velike vrednosti kiselosti (tabela 22).

Da bi se procenila korelacija između indukcionog perioda i sadržaja tokoferola i fenola korišćen je Pearsonov koeficijent korelacije (r). Uočena je veoma jaka pozitivna korelacija između IP i ukupnog sadržaja tokoferola. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je +0,935 ($p=0,01$). S druge strane, korelacija između IP i sadržaja ukupnih fenola bila je negativna, i beznačajna ($r= -0,273$). Treba napomenuti da dobra korelacija između sadržaja ukupnih tokoferola i IP ne znači apsolutni dokaz da dobra oksidativna stabilnost proizlazi isključivo iz prisustva tokoferola, već potvrđuje pretpostavke o antioksidativnoj ulozi tokoferola (Bjelica i sar., 2019).

5.3.3 SCHAAL-OVEN TEST

Promena pojedinih parametara kvaliteta ulja od semenki grožđa praćena je pod uslovima Schaal-oven testa. Testu je podvrgnuto sedam uzoraka ulja i to oni uzorci koji su pokazali zadovoljavajući polazni kvalitet. Tačnije, iz daljeg ispitivanja su isključeni uzorci hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa posle destilacije (MPD, RPD i SPD).

Uzorci su izlagani delovanju temperature od $63\pm 2^{\circ}\text{C}$ i praćene su promene koje nastaju u senzorskim karakteristikama, karakteristikama boje, transparentije, sadržaja ukupnih tokoferola i fenola, oksidativni status i antiradikalni kapacitet nakon 2, 4 i 8 dana pri uslovima testa.

5.3.3.1 Senzorska analiza

U tabeli 23 prikazani su rezultati deskriptivne senzorske analize uzoraka ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa.

Tabela 23. Promene senzorskih karakteristika ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Oznaka uzorka	Vreme (dan)	Opazanje
MBF	0	Miris i ukus su prijatni, sa blagim voćnim notama, na vinsko sirće, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost, sa blago izraženom aromom ulja semenki grožđa, cvetnih i voćnih tonova.
	2	Miris je blag voćni, slabije izražen na vinsko sirće, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Gubi se karakteristična aroma (ukus) na ulje od semenki grožđa.
	4	Miris je izražito blag, bez sirćetne kiseline i bez arome. Ukus je prihvatljiv.
	8	Miris je bez izražene svojstvene arome, uljast, bez sirćetne kiseline, miris na odstajalo, početak oksidacije sa blagom užeglosti. Retronazalno se oseća ukus i miris na užeglost. Uzorak je neprihvatljiv.

Tabela 23. Promene senzorskih karakteristika ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa (nastavak tabele)

Oznaka uzorka	Vreme (dan)	Opazanje
RBF	0	Miris i ukus su prijatni, svojstveni, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost, sa mirisom na lišće i aromom sa drvenastim tonovima.
	2	Znatno slabije izraženog mirisa. Blage arome i ukusa. Primetan je gubitak lakše isparljivih komponenti arome.
	4	Slabije izražena aroma, slabog mirisa sa vrlo blagom užeglosti, prihvatljivog ukusa bez užeglosti.
	8	Na mirisu i ukusu se oseća užeglost. Aroma je prisutna, ali je ukus kiseo i neprihvatljiv.
SBF	0	Miris je intenzivan, zelenih tonova, prijatan, prijatnog, slabije izraženog, svojstvenog ukusa, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Aroma je intenzivna, specifična, zaokružena, izuzetno prijatna, svojstvena uzorku.
	2	Miris je bez intenziteta i osobenosti. Ukus je blago kiseo sa karakterističnim tonovima. Primetan je gubitak dela lakše isparljive arome.
	4	Bez mirisa, slabije izraženog ukusa. Bez karakterističnih tonova. Aroma je blaga, uljasta.
	8	Na mirisu se oseća blaga užeglost. Ukus je prihvatljiv. Retronazalno se oseća blaga oksidacija, zaostao ukus.
MPF	0	Uzorak je intenzivnog, vinskog, mirisa na vinsko sirće, oštar, svojstvenog, prijatnog, blago kiselog ukusa, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Aroma je sa vinskim tonovima.
	2	Vrlo sličnih karakteristika kao i 0. dana, sa slabijim, veoma blagim mirisom, bez lako isparljivih komponenti. Veoma blage svojstvene, lepršave arome, orašastog ukusa, uljast.
	4	Miris i ukus su slabije izraženi, bez užeglosti. Orašast ukus dominira.
	8	Slabijeg intenziteta mirisa sa jače izraženim orašastim ukusom. Jače nego 4. dana. Bez užeglosti.
PPU	0	Uzorak je svojstvenog, zaokruženog, prijatnog, intenzivan, vinskog mirisa i ukusa, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Na mirisu se osećaju medni, cvetni tonovi, dok se na ukusu osežaju zeleni i drvenasti tonovi. Uzorak blago gorči. Aroma je mešavina voćnih i vinskih komponenti.
	2	Miris je bez lakše isparljivih komponenti. Ukus je orašast. Bez mirisa i ukusa na užeglost.
	4	Uzorak je bez promena u odnosu na 2. dan. Bez mirisa i ukusa na užeglost.
	8	Miris je bez užeglosti. Ukus je orašast, blago užegao.

Tabela 23. Promene senzorskih karakteristika ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa (nastavak tabele)

Oznaka uzorka	Vreme (dan)	Opazanje
NU	0	Slabije izraženog, svojstven, uljast, mirisa i ukusa, sa veoma blago vinskim tonovima, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Aroma je specifična, cvetna, zelenkasta, kiselkasta. Retronazalno se oseća blaga užeglost.
	2	Miris je značajno slabije izražen u odnosu na 0. dan. Izgubila se osnovna aroma. Orašast ukus.
	4	Na mirisu se oseća blaga užeglost. Ukus je užegao.
	8	Na mirisu i ukusu se oseća užeglost.
RU	0	Uzorak je neutralnog mirisa i ukusa, bez stranog mirisa i ukusa i bez mirisa i ukusa na užeglost. Ukus je svojstven, uljast. Bez arome.
	2	Prisutan miris. Prisutna prijatna aroma, kiselkasta, lepo izražena.
	4	Miris i ukus iz 2. dana blago prisutni, jedva izraženi. Ulje nije neutralno. Bez oksidacije.
	8	Miris i ukus je užegao i neprihvatljiv.

Opšta zapažanja vezana za promene senzorskih svojstava ulja semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa:

- *boja i izgled ulja*: ostali su nepromenjeni kod svih uzoraka sve vreme (8 dana) trajanja testa;
- *senzorska prihvatljivost ulja*: svi uzorci su ostali prihvatljivi po senzorskim svojstvima u periodu do 4 dana;
- *aroma ulja*: nakon 4 dana aroma ulja postaje slabo izražena, neutralna. Kasnije se pojavljuje užeglost u aromi;
- *ulje od semenki grožđa sorte Merlot bez fermentacije (MBF)*: intenzitet mirisa slabi proporcionalno tokom testa;
- *ulje od semenki grožđa sorte Italijanski rizling bez fermentacije (RBF)*: intenzitet mirisa je izrazito oslabljen nakon dva dana, da bi se iza toga miris stabilizovao;
- *ulje od semenki grožđa sorte Sila bez fermentacije (SBF)*: miris ulja se gubi nakon dva dana testa.

5.3.3.2 Karakteristike boje i transparentija ulja

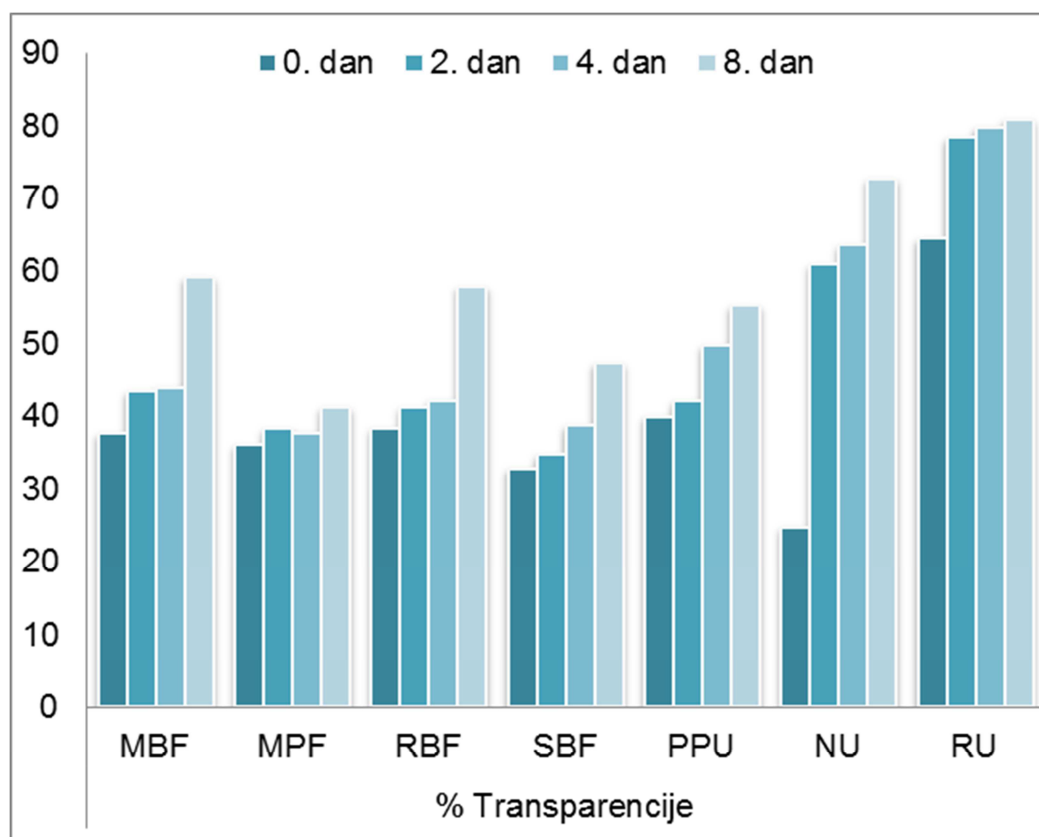
Temperiranjem uzoraka ulja od semenki grožđa pri $63\pm 2^\circ\text{C}$ dolazi do određenih promena u sadržaju pigmenata u zavisnosti od vremena izlaganja umereno povišenoj temperaturi. U tabeli 24 predstavljene su karakteristike boje po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu pri uslovima Schaal-oven testa. Svetloća uzoraka je bila najveća kod rafinisanog ulja (RU) od početka do kraja testa. Takođe, može se uočiti da svetloća raste sa porastom vremena trajanja testa.

Tabela 24. Pomene karakteristika boje po CIE $L^*a^*b^*$ pri uslovima Schaal-oven testa

Oznaka uzorka	Karakteristike boje											
	0. dan			2. dan			4. dan			8. dan		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
MBF	23,68	0,81	5,06	24,86	0,97	4,50	23,88	1,06	5,56	24,02	0,77	5,76
MPF	22,29	1,29	2,37	22,74	1,46	2,27	24,20	1,14	1,70	22,16	1,33	2,54
RBF	23,65	0,90	5,20	24,19	1,03	5,32	24,36	0,99	5,24	25,19	0,53	5,01
SBF	21,94	1,48	2,21	22,09	1,66	2,35	22,63	1,52	2,26	22,91	1,15	2,69
PPU	21,78	1,46	2,50	22,00	1,59	2,07	21,94	1,50	2,35	21,96	1,44	2,39
NU	23,20	1,05	4,67	23,42	1,07	4,67	24,24	0,88	4,20	24,92	0,65	3,62
RU	26,98	-2,26	6,96	27,19	-1,98	6,76	27,57	-1,90	6,50	27,12	-1,77	6,96

Udeo crvene (+) i zelene boje (-), predstavljen parametrom a^* i udeo žute (+) i plave (-) boje predstavljen parametrom b^* menjao se tokom trajanja testa. Ta promena uzrokovana je promenom u sadržaju pigmenata (hlorofila i karotenoida), što je rezultiralo i promenu transparentije ulja (slika 27). Najnižu vrednost za parametar a^* kod hladno presovanih ulja pokazuju uzorci MBF i RBF. Najnižu vrednost 0. i 2. dana ima MBF, a 4. i 8. dana RBF. S tim u vezi, ova ulja pokazuju najveće vrednosti za parametar b^* .

Transparencija uzoraka proveravana je pri uslovima Schaal-oven testa, izloženosti temperaturi $63\pm 2^{\circ}\text{C}$ u periodu od 2, 4 i 8 dana. Rezultati su prikazani grafički na slici 27.

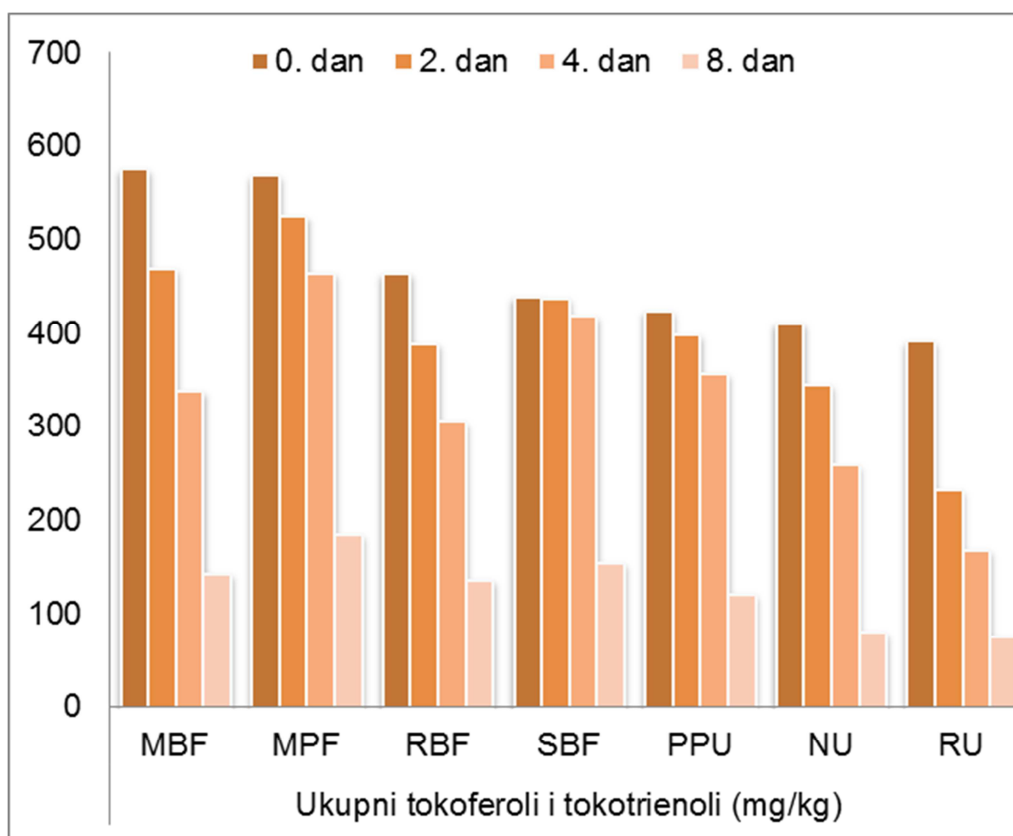


Slika 27. Promena transparencije uzoraka ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Analizom dobijenih rezultata, jasno se uočava da najveću transparenciju ima uzorak rafinisanog ulja. Takođe, na slici 27 vidi se da transparencija uzoraka raste sa porastom vremena temperiranja (vremena trajanja testa). Shodno tome, najveću transparenciju pokazuju uzorci ulja nakon 8 dana temperiranja pri $63\pm 2^{\circ}\text{C}$, što je uslovljeno gubitkom pigmenata. Najmanju vrednost transparencija nakon 8 dana testa pokazuje uzorak MPF (41,14%). Ovaj uzorak pokazuje i najmanju promenu transparencije tokom trajanja testa.

5.3.3.3 Promena sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola

Delovanje temperature pospešuje oksidativne procese u uljima, usled čega dolazi i do smanjenja sadržaja materija sa antioksidativnim delovanjem. Obzirom da tokoferoli i tokotrienoli imaju zaštitnu ulogu u sprečavanju oksidacije ulja, očekivano, zbog oksidativnih procesa koji se dešavaju u toku Schaal-oven testa, njihov sadržaj se smanjuje. Smanjenje ukupnog sadržaja tokoferola i tokotrienola ilustrovano je grafički na slici 28.



Slika 28. Promena sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Kao što se može primetiti na slici 28, sadržaj tokoferola i tokotrienola u svim uzorcima ulja od semenki grožđa je najveći samo na početku primene temperiranja, odnosno (0. dan). Nakon toga sadržaj se smanjuje, da bi naglo opao 8. dana.

Najmanji pad u sadržaju tokoferola pokazuje uzorak SBF, dok je najveći pad u sadržaju tokoferola kod uzorka MBF (sa 575,23mg/kg 0. dana na 142,13mg/kg 8. dana). Uzorak MPF u toku trajanja testa sve vreme ima najveći sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola.

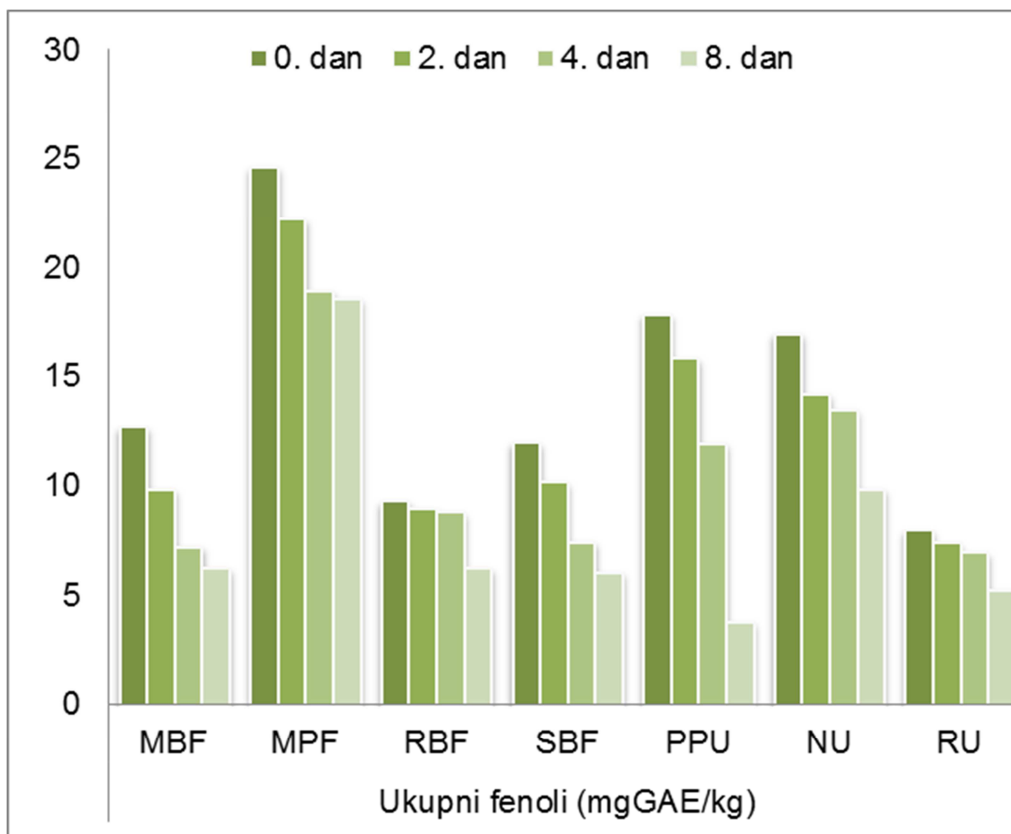
5.3.3.4 Promena sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj polifenola u uljima od semenki grožđa opada u toku Schaal-oven testa. Kao što je već pomenuto, polifenoli su značajni zbog svoje antioksidativne aktivnosti, koja se ovde ispoljava na način da dolazi do smanjenja njihovog sadržaja u ulju (tabela 25) zbog oksidacije koja se javlja tokom temperiranja uzoraka na $63\pm 2^{\circ}\text{C}$ u periodu od 2, 4 i 8 dana.

Tabela 25. Smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih materija ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Oznaka uzorka	Smanjenje ukupnih fenola (%)			
	0. dan	2. dan	4. dan	8. dan
MBF	0	22,27	43,21	50,95
MPF	0	9,72	23,13	24,47
RBF	0	3,88	5,49	33,26
SBF	0	14,99	38,02	49,58
PPU	0	11,47	33,24	78,74
NU	0	16,17	20,41	41,95
RU	0	7,20	12,63	34,09

Sa slike 29 se uočava da uzorak RBF pokazuje najmanje smanjenje sadržaja ukupnih fenola u toku trajanja Shaal-Oven testa. Takođe, ovde se uočava da uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot posle fermentacije (MPF) sve vreme testa ima najveći sadržaj ukupnih fenola.



Slika 29. Sadržaj ukupnih fenola ulja od semenki grožđa pri uslovima Shaal-Oven testa

5.3.3.5 Promena oksidativnog statusa

U tabeli 26 prikazana je promena u sadržaju primarnih (Pbr) i sekundarnih (Abr) produkata oksidacije ulja u toku izvođenja Schaal-oven testa. Na osnovu dobijenih rezultata izračunata je oksidativna vrednost i prikazana grafički na slici 30.

U svim ispitanim uzorcima došlo je do povećanja i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja. Peroksidni broj kod uzorka rafinisanog ulja, od početnih 1,21mmol/kg, nakon 8 dana testa dostigao je vrednost od 75,93mmol/kg. To je ujedno i najveća promena Pbr u toku testa. Mada kod svih uzoraka dolazi do naglog rasta Pbr, on raste konstantno do 4. dana, nakon čega se vrednost Pbr značajnije uvećava. Razlog tome je što se u toku intenzivne oksidacije stvara više peroksida i hidroperoksida nego što ih se razgrađuje.

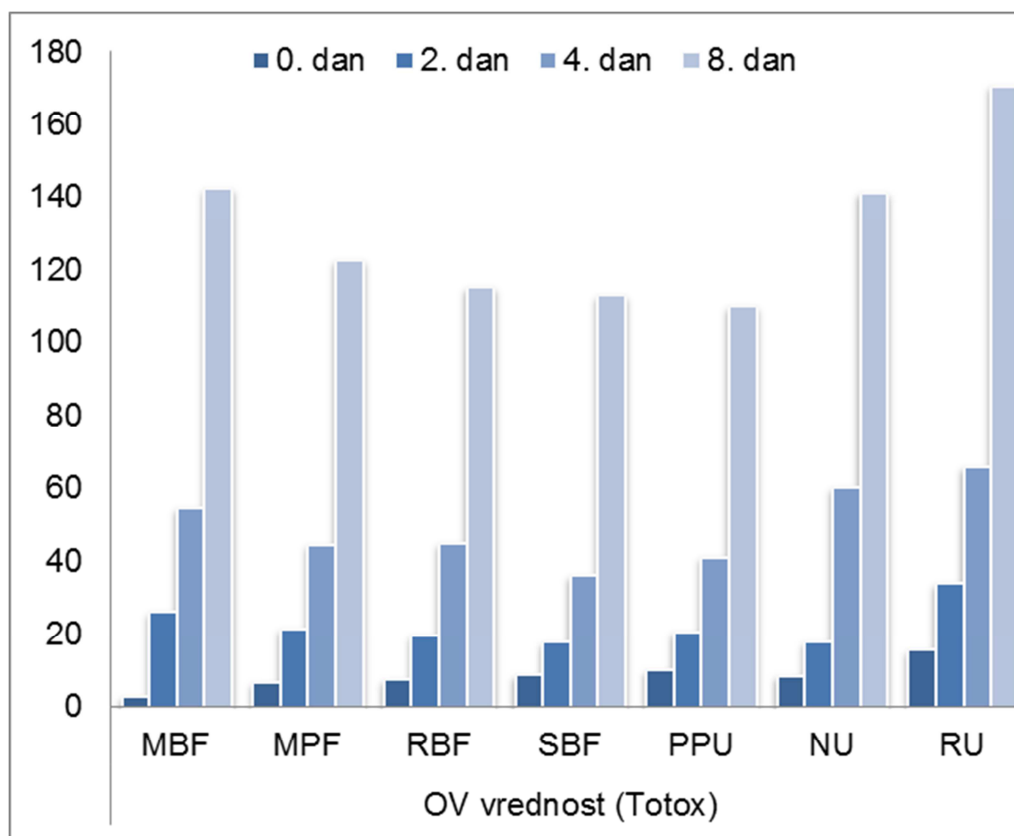
Anisidinski broj je, očekivano, na startu bio najveći kod rafinisanog ulja (13,31) i srazmerno tome, nakon 8 dana testa i dalje je bio na najvećem nivou kod uzorka rafinisanog ulja (18,80). Vrednost anisidinskog broja nije naglo rasla, kako bi bilo očekivano, a razlog tome je brzina razlaganja peroksida i hidroperoksida, kao i činjenica da tokom termostatiranja uzoraka verovatno dolazi do isparavanja dela lakše isparljivih sekundarnih produkata oksidacije. Osim toga, temperature pri uslovima Schaal-oven testa (ispod 100°C) nisu dovoljno visoke da bi izazvale potpuno termičko razlaganje primarnih produkata oksidacije.

Tabela 26. Promena sadržaja primarnih i sekundarnih oksidativnih produkata ulja semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Oznaka uzorka	Oksidativni status							
	0. dan		2. dan		4. dan		8. dan	
	Pbr	Abr	Pbr	Abr	Pbr	Abr	Pbr	Abr
MBF	1,12	0,65	11,87	2,39	26,26	2,09	68,43	5,58
MPF	3,08	0,56	10,33	0,83	21,71	1,08	59,55	3,62
RBF	2,73	2,12	8,90	1,95	20,79	3,18	56,03	3,16
SBF	3,47	1,89	6,88	4,05	16,94	2,18	55,08	2,88
PPU	4,16	1,91	9,48	1,81	19,64	1,76	54,25	1,54
NU	3,49	1,74	8,45	1,16	27,55	5,07	68,32	4,68
RU	1,21	13,31	11,36	11,20	26,42	12,95	75,93	18,80

Pbr- mmol/kg; Abr- $100 * A_{350nm}^{1\%}$

Promena peroksidnog i anisidinskog broja u toku Schaal-oven testa bila je najveća kod uzorka rafinisanog ulja, što za rezultat ima, očekivano, najveću promenu OV vrednosti (slika 30). Svi ispitani uzorci pokazuju nagli skok OV vrednosti 8. dana testa. Do 4. dana testa povećanje je proporcionalno, a nakon toga dolazi do naglog propadanja uzoraka.



Slika 30. Promena OV vrednosti ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

5.3.3.6 Promena antiradikalnog potencijala

Antiradikalni potencijal ulja od semenki grožđa u toku Schaal-oven testa praćen je preko promene vrednosti EC_{50} . Obzirom da u toku testa dolazi do značajnog porasta produkata oksidacije i da se sadržaj zaštitnih jedinjenja (tokoferola i fenola) smanjuje, očekivano raste vrednost EC_{50} , što znači da opada antiradikalni potencijal ulja. Rezultati promene vrednosti EC_{50} navedeni su u tabeli 27.

Najmanju vrednost EC_{50} na kraju testa ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot posle fermentacije (MPF). Ovo se može objasniti činjenicom da je ovaj uzorak sve vreme u toku trajanja testa imao i najveći sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola i ukupnih fenola, koji štite nezasićene masne kiseline od oksidacije (Prisacaru, 2016).

Tabela 27. Promena antiradikalskog potencijala ulja od semenki grožđa pri uslovima Schaal-oven testa

Oznaka uzorka	EC ₅₀ (mg ulja / mg DPPH)			
	0. dan	2. dan	4. dan	8. dan
MBF	65,34	140,59	164,60	255,19
MPF	72,13	155,00	166,10	182,80
RBF	95,63	196,70	208,17	311,29
SBF	89,45	175,20	191,29	250,43
PPU	98,11	207,40	199,86	264,70
NU	102,77	187,46	250,10	223,35
RU	127,17	243,65	312,46	329,81

5.3.4 FLUORESCENTNI TEST (FL-TEST)

Fluorescentni test je, takođe, značajan sa aspekta procene održivosti ulja u smislu određivanja roka trajanja, odnosno, očuvanja biološki aktivnih komponenata nekog ulja. On simulira efekte koji se dešavaju u prometu jestivih ulja (npr. na rafovima prodavnica). Temperatura u toku eksperimenta iznosila je do maksimum 35°C. Ulja su napunjena u svetle i tamne boce i izlagana dejstvu fluorescentnog svetla neprekidno u periodu od 12 dana. U toku eksperimenta praćene su promene koje nastaju u boji, transparentiji, sadržaju pigmenata, peroksidnom broju i sadržaju ukupnih fenola i tokoferola. Ispitivanje je vršeno nakon 1 dana, 4 dana, 8 dana i 12 dana izlaganja ulja uticaju fluorescentnog svetla.

5.3.4.1 Promena karakteristika boje i transparentije ulja

Tokom FL testa pod uticajem svetlosti dolazi do razgradnje pigmenata (posebno hlorofila) u ulju što se manifestuje promenama u karakteristikama boje. U tabeli 28 prikazani su rezultati promene parametara boje po CIE L*a*b* sistemu. Obzirom da je eksperiment predviđao izlaganje ulja u transparentnim (svetlim) i obojenim

(tamnim) bocama očekivano je bilo da dejstvo svetlosti na pigmente bude različito. Međutim, ako posmatramo parametar svetloću (L^*) osim početne razlike gde je nakon 1 dana trajanja testa svetloća bila nešto veća kod ulja u svetlim bocama, ta razlika se u manjoj ili većoj meri zadržala do kraja trajanja testa. Znači nije došlo do značajnog odstupanja u svetloći boje između uzoraka u svetlim i tamnim bocama.

Dalje, ukoliko se posmatra promena u udelima određenih boja, parametar a^* (udeo crvene (+) i zelene boje (-)) i parametar b^* (udeo žute (+) i plave (-) boje) može se konstatovati da je u toku trajanja testa dolazilo do promene u sadržaju pigmenata. Parametar a^* se, u zavisnosti od vremena trajanja testa, menjao na način da se smanjivao udeo crvene boje, a povećavao udeo zelene. Najveća promena u parametru a^* je kod uzorka PPU u svetloj boci, koji je od 1. do 4. dana promenio vrednost sa +1,70 na -1,81.

Tabela 28. Promene karakteristika boje po CIE $L^*a^*b^*$ pri uslovima FL-testa

Oznaka uzorka	Karakteristike boje											
	1. dan			4. dan			8. dan			12. dan		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
Svetla boca												
MBF	23,04	1,73	8,02	23,00	1,53	8,99	26,08	1,31	7,75	27,32	0,99	5,79
MPF	20,46	2,16	4,47	21,17	1,92	4,75	24,83	1,96	5,48	25,25	1,68	5,21
RBF	25,11	1,53	7,16	25,63	1,21	7,75	26,20	1,14	7,87	27,43	0,84	5,97
SBF	23,50	1,97	4,30	24,68	1,71	5,45	25,52	1,31	5,17	25,66	1,34	5,74
PPU	23,05	1,70	3,99	27,35	-1,81	4,88	25,32	0,93	5,68	26,13	0,85	5,71
NU	25,35	0,74	7,64	26,19	0,36	7,41	26,81	0,17	7,57	26,88	0,05	7,15
RU	27,59	-1,93	5,52	27,52	-1,50	3,88	27,83	-1,45	4,08	28,33	-1,23	2,95

Tabela 28. Pomene karakteristika boje po CIE L*a*b* pri uslovima FL-testa (nastavak tabele)

Oznaka uzorka	Karakteristike boje											
	1. dan			4. dan			8. dan			12. dan		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Tamna boca												
MBF	21,86	1,57	6,66	22,73	1,33	7,91	25,79	1,12	7,19	26,17	1,03	7,18
MPF	20,79	1,68	2,35	20,99	1,91	4,87	25,59	1,47	4,34	24,69	1,48	4,94
RBF	24,90	1,29	6,85	25,31	1,28	7,61	26,78	1,03	6,61	26,64	0,90	6,69
SBF	22,91	1,68	3,40	24,37	1,48	5,14	25,75	1,24	5,45	25,44	1,17	6,11
PPU	22,31	1,86	2,72	24,46	1,19	4,80	25,16	0,83	5,24	25,13	0,87	5,58
NU	24,40	0,97	6,16	26,25	0,43	7,25	26,28	0,09	7,65	26,16	0,00	7,61
RU	27,48	-2,18	6,64	27,18	-1,60	4,19	27,91	-1,66	4,34	27,75	-1,52	3,89

Uopšteno za sve rezultate može se konstatovati da se najveća promena dešava između 1. i 4. dana, a da je nakon toga promena manja. Može se, takođe, zaključiti da su karotenoidi (nosioci žute boje ulja) osetljiviji na uticaj fluorescentnog svetla, što može da izazove i "efekat izbeljivanja" (Armstrong i Hearst, 1996).

U tabeli 29 prikazani su rezultati promene transparentije uzoraka ulja od semenki grožđa u toku trajanja FL-testa.

Tabela 29. Promena transparentije (%) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

Oznaka uzorka	Svetla boca				Tamna boca			
	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan
MBF	47,19	42,80	44,95	44,14	42,26	40,23	43,35	44,05
MPF	28,07	28,20	31,20	28,07	24,59	29,04	29,98	28,93
RBF	42,60	43,33	45,46	43,44	43,18	40,56	45,15	43,13
SBF	35,93	36,38	37,72	35,73	31,56	36,27	37,65	36,07
PPU	58,01	59,34	51,10	48,24	54,19	54,20	47,26	47,62
NU	73,05	70,16	61,64	64,48	72,05	64,63	59,39	62,04
RU	99,96	99,97	91,62	83,36	99,97	99,77	78,80	84,59

Za vreme trajanja fluorescentnog testa nije došlo do značajnijih promena u transparentiji uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa. Transparentija se menjala u skladu da promenom u sadržaju pigmenata, a značajnija promena se uočava kog uzorka nerafinisanog i rafinisanog ulja od semenki grožđa. Kod ovih uzoraka došlo je do pada transparentije uzoraka. Kod NU u svetloj boci na kraju predviđenog trajanja testa transparentija se smanjila za 8,57%, a u tamnoj boci za 10,01%. Kod uzorka rafinisanog ulja RU, transparentija se smanjila za 16,6% u svetloj boci i 15,38% u tamnoj boci. Uzrok smanjenja transparentije uzoraka verovatno je povećanje razgradnih produkata fotooksidacije u ulju.

5.3.4.2 Promena u sadržaju pigmenata

Osnovne pigmente ulja od semenki grožđa čine karotenoidi i hlorofili. Pod uticajem svetla dolazi do njihove razgradnje i popadanja. Promene koje su nastale u toku izvođenja fluorescentnog testa prikazane su u tabelama 30 i 31.

Tabela 30. Promene u sadržaju karotenoida (mg/kg) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

Oznaka uzorka	Svetla boca				Tamna boca			
	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan
MBF	1,28	1,34	1,79	1,33	1,38	1,38	1,17	1,66
MPF	2,06	1,99	1,90	1,98	2,29	2,01	1,99	2,33
RBF	1,25	1,47	1,30	1,44	1,62	1,78	1,25	1,35
SBF	1,96	1,58	1,45	1,96	2,25	1,71	0,47	2,07
PPU	1,49	1,04	1,32	1,27	1,79	1,13	1,30	1,47
NU	0,84	0,77	0,95	0,91	0,92	0,66	0,92	0,81
RU	0,47	0,10	0,16	0,42	0,52	0,11	0,21	0,37

Na osnovu prikazanih rezultata može se konstatovati da nije došlo do značajne promene u sadržaju karotenoida. Njihov sadržaj se skoro da nije menjao izuzev što je na blago višem nivou u tamnim bocama. Ovo je veoma važna činjenica, obzirom na zdravstveni efekat karotenoida (Rodriguez-Amaya, 2015).

Sadržaj hlorofila, međutim, značajno opada tokom trajanja testa i u svetlim i u tamnim bočicama. Propadanje se dešava konstantno, a najizraženije je između 1. i 4. dana trajanja testa.

U prvim danima testa, sadržaj hlorofila je veći kod uzoraka ulja od semenki grožđa u tamnim bocama, dok je na kraju testa nivo približno izjednačen u svetlim i tamnim bocama. Takođe, uočljivo je da se hlorofili kod uzorka RU u svetloj boci razgrade već nakon 1 dana testa.

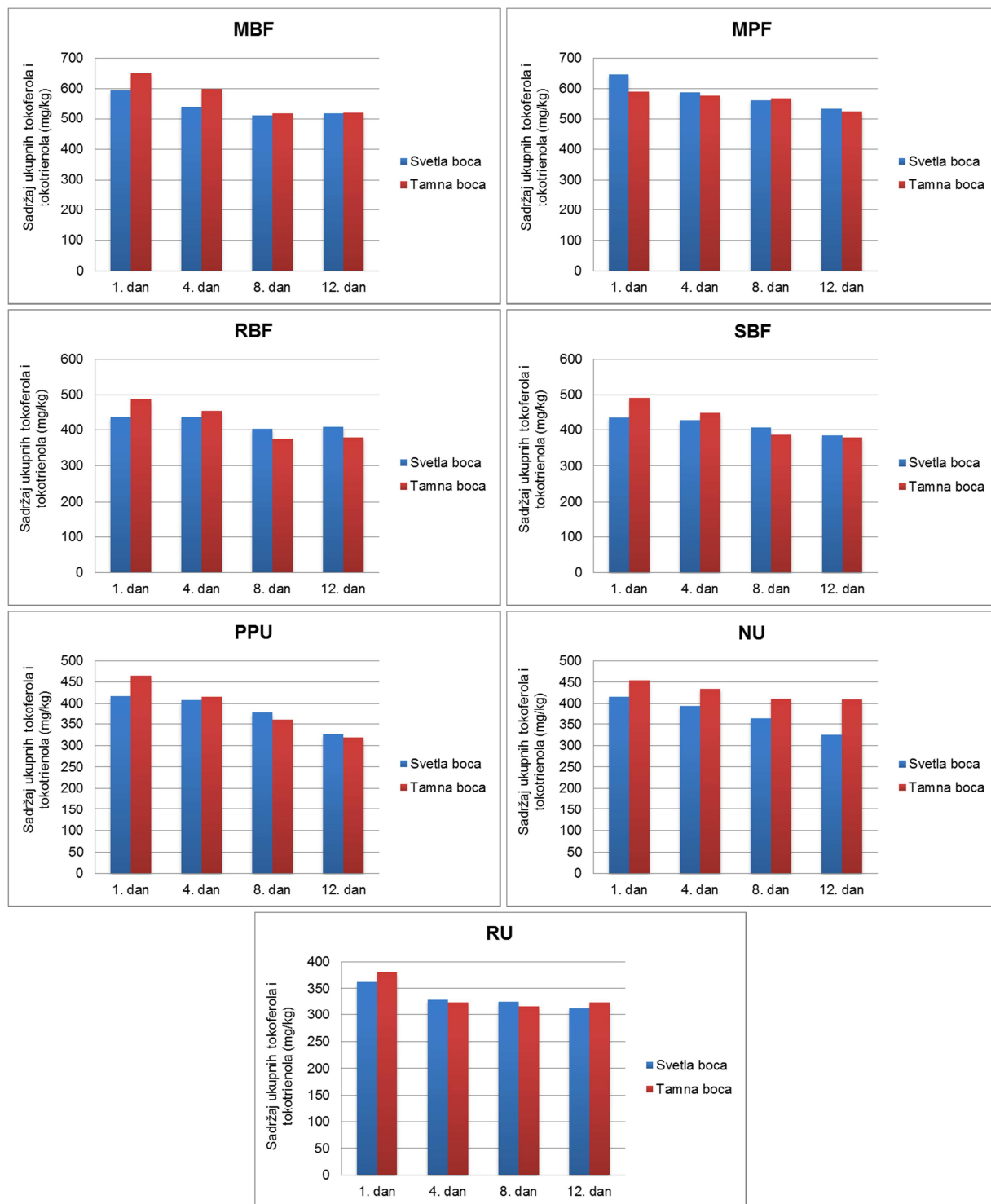
Hlorofili su posebno osetljivi na dejstvo svetla u UV oblasti, pri čemu deluju kao fotosenziteri i izazivaju foto-oksidaciju ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

Tabela 31. Promene u sadržaju hlorofila (mg/kg) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

Oznaka uzorka	Svetla boca				Tamna boca			
	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan
MBF	0,26	0,14	0,07	0,03	1,97	0,32	0,22	0,07
MPF	1,40	0,35	0,43	0,19	2,64	0,47	0,48	0,40
RBF	0,41	0,09	0,07	0,05	6,08	0,17	0,09	0,10
SBF	1,29	0,14	0,14	0,10	21,70	0,43	0,26	0,40
PPU	1,26	1,02	0,91	0,70	26,92	0,83	0,67	0,57
NU	0,31	0,10	0,10	0,07	0,95	0,17	0,12	0,14
RU	0,02	0,02	0,02	0,02	0,09	0,07	0,03	0,02

5.3.4.3 Promene u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola

Prikazani rezultati promene u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola pri uslovima FL-testa (slika 31) pokazuju da dolazi do smanjenja njihovog sadržaja. Takođe, ovde se može primetiti da je inicijalni sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola veći u uzorcima ulja u tamnim bocama. Kao i kod sadržaja hlorofila, do kraja trajanja testa kod većine uzoraka nivo tokoferola i tokotrienola u ulju približno je izjednačen u svetlim i tamnim bocama. Samo uzorak nerafinisanog ulja NU od početka do kraja testa pokazuje značajnije viši nivo ukupnih tokoferola i tokotrienola u uzorcima u tamnoj boci.



Slika 31. Promene u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola (mg/kg) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

Bez obzira na boju boce, može se konstatovati da kod svih uzoraka ulja od semenki grožđa dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola.

Ukupno smanjenje sadržaj tokoferola i tokotrienola na kraju predviđenog vremena trajanja testa kreće se od 6,42% kod uzorka RBF u svetloj boci do 31,61% kod uzorka PPU u tamnoj boci.

5.3.4.4 Promene u sadržaju ukupnih fenolnih materija

Sadržaj ukupnih fenolnih materija menjao se tokom trajanja eksperimenta pri definisanim uslovima FL testa. Promene koje su se dešavale nisu oslikale razliku u načinu pakovanja ulja od semenki grožđa (svetle ili tamne boce). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 32.

Tabela 32. Promene u sadržaju ukupnih fenola (mg/kg) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

Oznaka uzorka	Svetla boca				Tamna boca			
	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan	1. dan	4. dan	8. dan	12. dan
MBF	11,63	14,91	17,28	19,46	9,21	12,95	14,99	29,34
MPF	21,93	26,31	32,56	28,05	12,65	23,71	24,87	19,65
RBF	10,69	19,53	11,69	12,87	12,33	14,58	12,40	11,52
SBF	14,14	18,84	15,64	13,62	14,13	29,26	16,05	13,07
PPU	13,88	14,39	14,80	15,06	21,44	17,74	16,59	19,13
NU	13,42	16,94	16,42	15,95	14,86	13,57	18,16	14,60
RU	7,62	4,90	7,77	7,77	7,49	4,96	9,70	7,54

Promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja pod uticajem fluorescentnog svetla u svim uzorcima ulja su sasvim neočekivane, u smislu da dolazi do povećanja njihovog sadržaja tokom testa. Objašnjenje za ovu pojavu, međutim, treba dovesti u korelaciju sa promenom sadržaja hlorofila, kao i metodom određivanja ukupnih fenola. Naime, za određivanje ukupnih fenola je u ovom slučaju primenjena spektrofotometrijska metoda, koristeći Folin-Chiocalteu reagens. Prisustvo hlorofila kod ove metode na bazi bojene reakcije, najverovatnije, negativno utiče na rezultat, te gubitak hlorofila tokom testa prividno rezultira povećanje sadržaja fenola. Velike

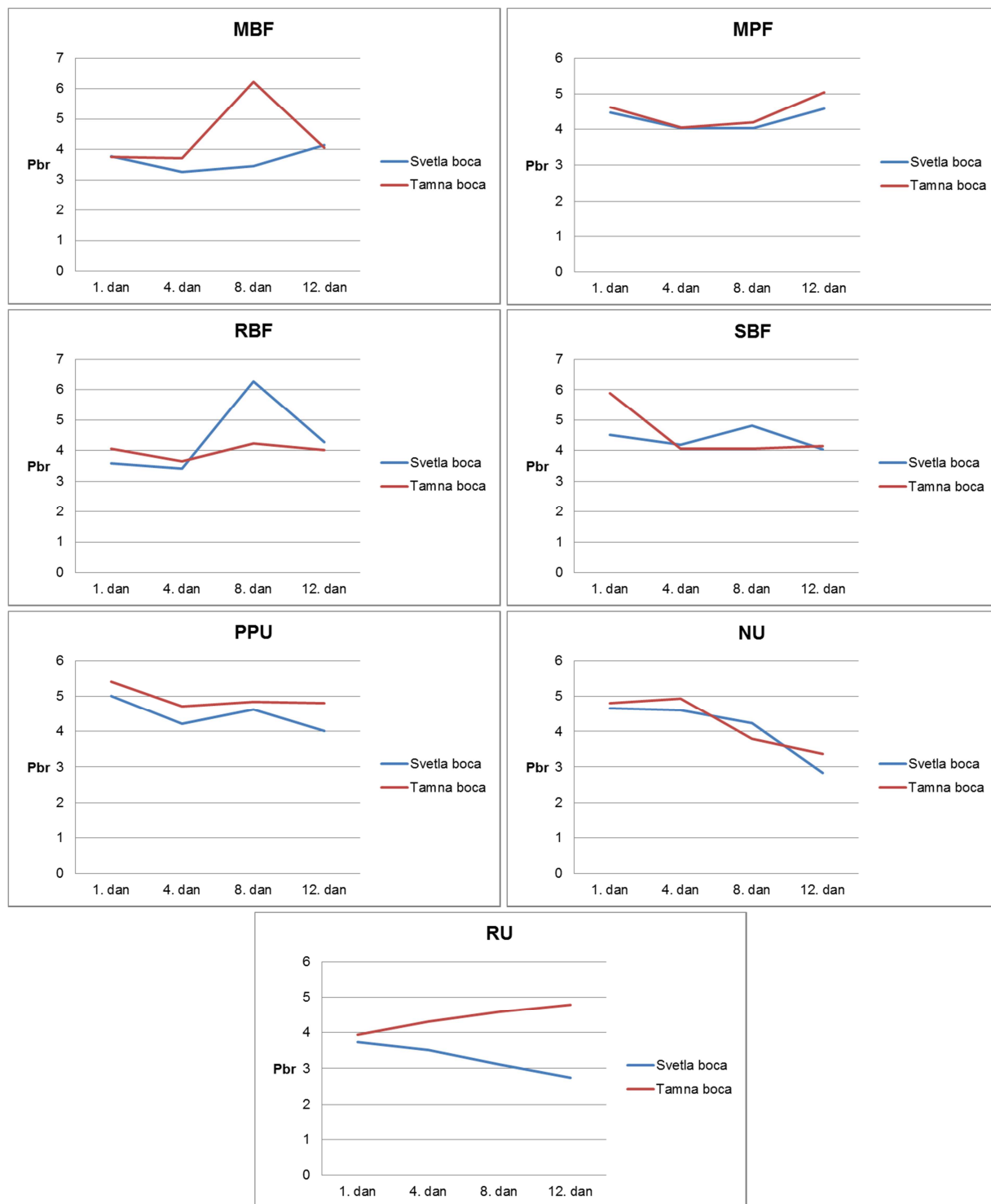
razlike u sadržaju, zavisno od primenjene metode, uočene su i kod tokoferola (tabela 17).

5.3.4.5 Promene u sadržaju peroksidnog broja

Za potrebe praćenja promena koje nastaju u hemijskom kvalitetu ulja pod dejstvom fluorescentne svetlosti određivan je peroksidni broj. Na slici 32 ilustrovana je promena Pbr svakog ispitanog uzorka u svetlim i tamnim bocama.

Kao što se može primetiti, Pbr se menjao iz dana u dan, ali ukupna promena Pbr, uglavnom nije bila značajna, odnosno pri definisanim uslovima izvođenja FL-testa nije došlo do značajne promene u Pbr. Svi uzorci ulja od semenki grožđa su na kraju predviđenog vremena trajanja testa (12 dana) bili ispod maksimalno dozvoljene vrednosti definisane Pravilnikom o kvalitetu (2006). Takođe, prisutne razlike u vrednosti Pbr između ulja iz svetlih i ulja iz tamnih boca, pri uslovima izvođenja testa ne oslikavaju početnu pretpostavku da će ulje iz tamnijih bočica biti i bolje održivo. Razlog tome je verovatno nedovoljno vreme trajanja testa.

Analizom rezultata dobijenih u okviru izvođenja FL-testa i njihovom statističkom obradom, Two way ANOVA sa Tukey testom pri $p < 0,05$, dolazi se do zaključka da nema statistički značajnih razlika između rezultata dobijenih za ulja od semenki grožđa u svetlim i tamnim bocama. To je pomalo neočekivano, ali pored razlike u početnim sadržajima, koje su najizraženije i javljaju se nakon 1. dana testa, do kraja testa razlike u sadržaju ispitanih komponenti se smanjuju - nestaju. Razlog ovome može biti nedovoljno vreme trajanja eksperimenta, a svakako bi bilo potrebno i kompleksno sagledavanje istovremenog uticaja razgradnje hlorofila, smanjenja antiradikalskog kapaciteta ulja i stvaranja sekundarnih produkata oksidacije.



Slika 32. Promene u sadržaju peroksidnog broja (mmol/kg) ulja od semenki grožđa pri uslovima FL-testa

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih u okviru disertacije ispitivanjem uticaja kvaliteta semenki grožđa na senzorska svojstva, bioaktivne komponente i održivost hladno presovanog ulja i diskusije tih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analizom tehničko-tehnoloških pokazatelja semenki, premda nisu u pitanju tipične uljarice, došlo se do značajnih podataka o semenkama grožđa koje su važne pri manipulaciji (pakovanje, skladištenje) i ove vrste sirovine za proizvodnju ulja.
- Masa 1000 zrna (semenki) grožđa kretala se u opsegu od 19,96g do 32,45g. Najmanju masu (19,96g) ima uzorak semenki grožđa sorte Sila dobijenim posle destilacije, a najveću (32,45g) pokazuje prosečni proizvodni uzorak semenki grožđa.
- Dobijeni rezultati ukazuju na jaku korelaciju između litarske i specifične mase semenki grožđa. Najmanju vrednost litarske mase ($0,51\text{kg/dm}^3$) pokazuje uzorak semenki grožđa sorte Rizling posle destilacije, koji ujedno ima i najmanju specifičnu masu ($0,94\text{g/cm}^3$). Najveću litarsku ($0,67\text{kg/dm}^3$) i specifičnu ($1,14\text{g/cm}^3$) masu ima uzorak semenki od sorte Sila bez fermentacije.
- Dobijeni rezultati ukazuju da proces fermentacije nije imao uticaja na masu 1000 zrna, kao ni na litarsku i specifičnu masu semenki grožđa, dok je proces destilacije uticao na smanjenje ovih parametara. U toku postupka destilacije došlo je do izdvajanja dela rastvorljivih materija iz semenki čime su one postale lakše.
- Najmanji sadržaj vlage i isparljivih materija (7,48%) imale su semenke grožđa sorte Merlot posle destilacije, a najveći (12,80%) semenke grožđa sorte Sila posle destilacije. Za dobijene vrednosti, s obzirom i na mali sadržaj ulja u semenkama, može se reći da je veoma dobra skladišna vlaga, koja može da osigura čuvanje semenki u dužem periodu.
- Sadržaj ulja u semenkama grožđa kretao se od 6,57% do 9,89%. Ove vrednosti su nešto niže nego prosečne vrednosti za sadržaj ulja u semenkama grožđa prema literaturnim podacima. Uočene su razlike u sadržaju ulja kod semenki grožđa dobijenim od različitih sorti. Pored toga, postoji razlika u sadržaju ulja u semenkama od iste sorte vinove loze, što je posledica porekla semenki, odnosno uticaja procesa fermentacije i destilacije. Proces destilacije, najverovatnije zbog delovanja visoke temperature, može dovesti do gubitka dela ulja iz semenki.

- Prema rezultatima kiselinskog broja može se konstatovati da semenke grožđa dobijene od sorte Italijanski rizling i Sila posle destilacije, kao i semenke grožđa dobijene kao prosečan proizvodni uzorak (obzirom da nastaje mešanjem i pomenutih semenki) ne zadovoljavaju kvalitetom za proizvodnju hladno presovanih ulja. Povećanje kiselinskog broja ovih uzoraka verovatno je posledica delovanja visokih temperatura u vodenoj sredini u toku procesa destilacije, usled čega dolazi do hidrolitičkih procesa. Spoljašnja opna semenki narušava se u procesu fermentacije, što dalje može dovesti do nepoželjnih promena u kvalitetu.
- Senzorska analiza ulja od semenki grožđa je jasno ukazala na velike razlike u senzorskim karakteristikama koje su posledica ne samo načina dobijanja ulja (rafinisano ili hladno presovano), sorte vinove loze od koje su dobijene semenke, već i postupka dobijanja i kvaliteta semenki grožđa. Zahvaljujući tome što se pojavljuje izuzetno širok spektar različitih aroma, mirisa i ukusa u ulju i što postoje značajne razlike u aromi ulja u zavisnosti od sorte vinove loze, moguće je prepoznati da li je hladno presovano ulje dobijeno od semenki grožđa bez fermentacije, posle fermentacije ili posle destilacije. Takođe, treba istaći da uslovi kojima su semenke grožđa izložene u toku postupka fermentacije i posebno postupka destilacije utiču na formiranje arome hladno presovanog ulja.
- Jedan od najvažnijih elemenata hladno presovanih ulja je boja. Ona može da ukaže (sugeriše) na način dobijanja i poreklo ulja od semenki grožđa. Rafinisano ulje od semenki grožđa je svetlo žute boje sa zelenkastom nijansom, dok su hladno presovana ulja intenzivnijih boja i kreću se od žuto-zelenkaste, preko zelenkasto žute i svetlo zelenkaste do tamno zelene. Veći udeo zelene boje imaju hladno presovana ulja od semenki grožđa dobijenih posle destilacije.
- Hladno presovana ulja od semenki grožđa pre fermentacije imaju veću svetloću od hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijenih posle destilacije.
- Najveći udeo crvene boje (a^*) ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Sila bez fermentacije, a najmanji rafinisano ulje, dok je udeo žute (b^*) boje najveći kod rafinisanog ulja, a najmanji kod uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije.
- U okviru sorte Merlot, najveći udeo crvene boje (a^*) ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa dobijenih posle fermentacije, što je posledica apsorpcije dela bojenih materija iz pokožice u toku fermentacije.

- Ispitani uzorci hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijenih posle destilacije imaju manji udeo crvene boje usled njene razgradnje pri temperaturama destilacije.
- Osnovni pigmenti ulja od semenki grožđa su karotenoidi (0,06-0,37mg/kg) i hlorofili (0,54-72,69mg/kg). Njihov sadržaj u ulju u velikoj meri zavisi od porekla semenki.
- Sadržaj hlorofila u uzorku hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot dobijenim posle fermentacije znatno je veći nego u uzorku hladno presovanog ulja od semenki grožđa dobijenim bez fermentacije i bez destilacije. Takođe, sadržaj hlorofila je veći u uzorku hladno presovanog ulja od semenki grožđa dobijenim posle destilacije nego u uzorku hladno presovanog ulja od semenki grožđa dobijenim bez fermentacije.
- U toku postupka fermentacije dolazi do nakupljanja pigmenata u ulju usled čega je sadržaj pigmenata veći kod uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa posle fermentacije nego kod uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa bez fermentacije.
- U toku postupka destilacije deo pigmenata se razgrađuje pod uticajem visokih temperatura, zbog čega je sadržaj istih kod uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa posle destilacije manji nego kod uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa posle fermentacije.
- Postupak fermentacije doprinosi povećanju ukupnog sadržaja pigmenata, zbog čega je taj sadržaj veći čak i kod uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa posle destilacije u odnosu na uzorke hladno presovanih ulja bez fermentacije.
- Najveću vrednost transparentije očekivano pokazuje uzorak rafinisanog ulja od semenki grožđa (64,4%), dok najmanju transparentiju pokazuje uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa koji je nabavljen na tržištu Republike Srbije (24,7%). Uzorci proizvedeni za potrebe ove doktorske disertacije imali su transparentiju od 32,8% do 53,8%.
- Iz dobijenih rezultata proizilazi da postupak destilacije kojim su podvrgnute semenke grožđa utiče na povećanje transparentije dobijenih hladno presovanih ulja.

- Sadržaj nezasićenih masnih kiselina u svim uzorcima ulja od semenki grožđa veći je od 90%. Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina kretao se od 8,52–15,43%, dok je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina iznosio od 78,50–86,26%. Dominantna masna kiselina ulja semenki grožđa je esencijalna linolna, omega-6, masna kiselina. Statistički značajne razlike u sadržaju linolne kiseline javljaju se u zavisnosti od vrste ulja (hladno presovano ili rafinisano), sorti vinove loze (Merlot i Italijanski rizling u poređenju sa Silom) i porekla semenki za proizvodnju hladno presovanog ulja (pre fermentacije, nakon fermentacije ili nakon destilacije).
- Sorta vinove loze od koje su dobijene semenke ima uticaja na jodni broj dobijenog ulja, u skladu sa masnokiselinskim profilom, dok procesi fermentacije i destilacije semenki pre presovanja nemaju uticaja na isti. Jodni broj ulja se kreće u opsegu od 149 do 157.
- Sadržaj α -tokoferola je dominantan u odnosu na ostale tokoferole prisutne u uljima od semenki grožđa. Udeo α -tokoferola se kreće od 10,4mg/kg do 76,6mg/kg. Takođe, njegov sadržaj je veći u uzorcima ulja dobijenim iz semenki nakon fermentacije i destilacije.
- Analizom dobijenih rezultata za sadržaj pojedinačnih izomera tokoferola sa jedne strane i sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola sa druge strane, može se konstatovati da je sadržaj tokotrienola dominantan u uzorcima hladno presovanog ulja od semenki grožđa.
- Sadržaj ukupnih tokoferola i tokotrienola u hladno presovanim uljima od semenki grožđa nađen je u intervalu od 333,81mg/kg do 575,23mg/kg, međutim na njihov sadržaj utiče, kako sorta vinove loze, tako i poreklo semenki.
- Tokom procesa destilacije semenke grožđa izlažu se povišenoj temperaturi, što ubrzava procese termičke oksidacije ulja, a to dalje dovodi do smanjenja sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola u ulju dobijenom iz semenki grožđa nakon destilacije.
- Promene na uljima do kojih dolazi u procesu fermentacije utiču na smanjenje sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola u hladno presovanim uljima dobijenom od semenki grožđa posle fermentacije.
- Postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih tokoferola i tokotrienola u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki grožđa sorti Italijanski rizling i

Merlot, kao i između sorti Sila i Merlot, dok ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila.

- Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u hladno presovanim uljima kreće se od 9,29mg/kg do 26,07mg/kg. Njihov sadržaj, u zavisnosti od sorte, u proseku je nešto viši u hladno presovanim uljima dobijenim od crnog grožđa sorte Merlot, ali uočava se i značajan porast (akumulacija) fenola u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki grožđa nakon procesa fermentacije i destilacije. Uočeno povećanje sadržaja fenola primećeno je i u uzorcima od semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila. U svim ispitanim uzorcima hladno presovanih ulja dobijenih od semenki grožđa nakon procesa destilacije, došlo je do povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja.
- Ursolna kiselina je dominantni polifenol u ulju semenki grožđa i njen sadržaj se kretao od 34,1mg/kg kod rafinisanog ulja do 247mg/kg kod hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije. Veći sadržaj ursolne kiseline dobijen je u uzorcima od semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila. Povećanje sadržaja ursolne kiseline uočeno je i kod uzoraka dobijenih nakon destilacije, dok fermentacija, kao i rafinacija, negativno utiče na sadržaj ursolne kiseline u ulju od semenki grožđa.
- Pored ursolne kiseline, značajan sadržaj u ulju od semenki grožđa pokazuju resveratrol (0,514–2,89mg/kg), kemferol (0,141–8,19mg/kg) i vanilinska kiselina (0,698–1,70), mada je njihov sadržaj daleko manji.
- Sadržaj rezveratrola je veći u ulju dobijenom od semenki crnog grožđa sorte Merlot, posebno u ulju dobijenom od semenki nakon procesa fermentacije i destilacije. U tim slučajevima semenke su u kontaktu sa pokožicom duže vreme, a poznato je da je ovo jedinjenje prisutnije u pokožici (ljusci) grožđa. S druge strane, to je mogući razlog zašto nije detektovan u ulju dobijenom od semenki grožđa pre fermentacije (<0,3 mg/kg). Rezveratrol je nađen samo u uzorcima hladno presovanih ulja koja su dobijena od semenki grožđa koje su prošle proces fermentacije i/ili destilacije izuzev kod uzorka dobijenog od sorte Sila, što može biti i sortna karakteristika.
- Kao i kod ukupnih tokoferola i tokorienola, tako i kod fenola postoji statistički značajna razlika u sadržaju ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim

iz semenki grožđa sorte Italijanski rizling i Merlot, kao i sorte Sila i Merlot, međutim, ne postoji statistički značajna razlika između sadržaja ovih jedinjenja u hladno presovanim uljima dobijenim iz semenki belog grožđa sorti Italijanski rizling i Sila.

- Polifenolni profil hladnog presovanog ulja od semenki grožđa zavisi od toga da li je seme grožđa bilo pod uticajem procesa fermentacije i/ili destilacije pre presovanja.
- Sadržaj ukupnih sterola hladno presovanih ulja od semenki grožđa kretao se u opsegu od 2.378mg/kg do 3.487mg/kg. Najveći sadržaj od pojedinačnih fitosterola u ispitanim uzorcima ima β -sitosterol sa udelom od 62,59–69,74% u ukupnim sterolima. Pored njega najzastupljeniji su stigmasterol sa udelom od 12,13–15,00% i kampesterol sa udelom od 6,59–11,94%.
- Procesi fermentacije i destilacije kojima su podvrgnute semenke grožđa pre presovanja nemaju uticaja na sadržaj fitosterola u hladno presovanim uljima.
- Vrednosti EC_{50} uzoraka hladno presovanih ulja kreće se u interval od 65,34 do 102,77 mg ulja/mgDPPH, a za rafinisano ulje iznosi 127,17 mg ulja/mgDPPH. Analizom dobijenih vrednosti za antiradikalni potencijal može se konstatovati da postoji statistički značajna razlika između hladno presovanih ulja dobijenih od semenki različitih sorti vinove loze (Merlot, Italijanski rizling i Sila). Takođe, značajan uticaj na antiradikalni potencijal ima proces fermentacije i proces destilacije koji imaju negativan uticaj. Pored toga, ukoliko se uporede vrednosti dobijene za hladno presovana ulja i rafinisano ulje, jasno se može uočiti negativan uticaj rafinacije ulja na smanjenje antiradikalnog potencijala.
- Procesi fermentacije i destilacije utiču i na osnovni hemijski kvalitet dobijenih hladno presovanih ulja na taj način što dovode do povećanja kiselinskog i peroksidnog broja.
- Kiselinski broj uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa kretao se od 0,66mgKOH/g do 16,85mgKOH/g. Osim uzorka hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Sila posle destilacije svi ostali ispitani uzorci odgovaraju zahtevu pravilnika o kvalitetu.
- Peroksidni broj ispitanih uzoraka hladno presovanih ulja kretao se od 1,12mmol/kg do 18,31mmol/kg. Ispitani uzorci hladno presovanih ulja od semenki grožđa dobijeni posle destilacije nisu u skladu sa zahtevima pravilnika o kvalitetu,

zbog povećane vrednosti peroksidnog broja. Vrednost peroksidnog broja u ulju raste usled izglanja semenki procesima fermentacije i destilacije.

- Oksidativna vrednost (OV) ulja je veća kod svih uzoraka dobijenih od semenki posle destilacije, što znači da su ta ulja lošijeg oksidativnog stanja. Najveću OV vrednost ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot posle destilacije (39,34), dok najmanju vrednost ima uzorak hladno presovanog ulja od semenki grožđa sorte Merlot bez fermentacije (2,89).
- Hladno presovana ulja od semenki grožđa imaju relativno dobru oksidativnu stabilnost. Indukcioni period se kretao od 4,48h do 10,72h i može se konstatovati da sorta vinove loze ima značajan uticaj na oksidativnu stabilnost hladno presovanih ulja. Takođe, procesi fermentacije i destilacije imaju značajan uticaj na održivost i to proces fermentacije na povećanje, a proces destilacije na smanjenje indukcionog perioda. Uočena je i veoma jaka pozitivna korelacija između IP i ukupnog sadržaja tokoferola, međutim, treba napomenuti da dobra korelacija između sadržaja ukupnih tokoferola i IP ne znači apsolutni dokaz da dobra oksidativna stabilnost proizlazi isključivo iz prisustva tokoferola, već potvrđuje pretpostavke o antioksidativnoj ulozi tokoferola
- Ispitivanjem uzoraka pod uslovima Schaal-oven testa, temperiranje pri $63\pm 2^{\circ}\text{C}$ u toku 8 dana, praćene su promene pojedinih parametara kvaliteta ulja od semenki grožđa. Što se tiče senzorskih promena, vizuelna boja i izgled ulja su ostali nepromenjeni kod svih uzoraka sve vreme trajanja testa. Ulja su senzorski bila prihvatljiva u periodu do 4 dana, nakon čega je aroma ulja postala slabo izražena do neutralne i pojavila se užeglost. Ostala zapažanja su sledeća: intenzitet mirisa ulja se gubi tokom trajanja testa. Transparentija uzoraka raste sa porastom vremena temperiranja. Obzirom da tokoferoli i tokotrienoli imaju zaštitnu ulogu u sprečavanju oksidacije ulja, očekivano, zbog oksidativnih procesa koji se dešavaju u toku Schaal-oven testa, njihov sadržaj se smanjuje. Takođe, dolazi do smanjenja sadržaja polifenola u ulju, što dovodi do opadanja antiradikalskog potencijala. U svim ispitanim uzorcima došlo je do povećanja i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije, te do povećanja ukupnog oksidativnog statusa. Do 4. dana testa povećanje OV vrednosti je proporcionalno, a nakon toga dolazi do naglog pogoršanja kvaliteta uzoraka.

- Pored Schaal-oven testa primenjen je i fluorescentni test (FL). Posmatrana je promena određenih parametara kvaliteta ulja u svetlim i tamnim bocama u periodu od 12 dana izloženih uticaju fluorescentnog svetla. Tokom trajanja testa nije došlo do značajnog odstupanja u svetloći boje između uzoraka u svetlim i tamnim bocama. Uopšteno za sve rezultate može se konstatovati da se najveća promena parametara boje dešava između 1. i 4. dana, a da je nakon toga promena manja. Za vreme trajanja FL testa došlo je do manjeg smanjenja u transparentiji uzoraka hladno presovanih ulja od semenki grožđa. Pored toga, na osnovu prikazanih rezultata može se konstatovati da nije došlo do značajne promene u sadržaju karotenoida. Njihov sadržaj se skoro da nije menjao izuzev što je na blago višem nivou u tamnim bocama. Međutim, sadržaj hlorofila značajno opada tokom trajanja testa i u svetlim i u tamnim bočicama. Propadanje se dešava konstantno, a najizraženije je između 1. i 4. dana trajanja testa. Bez obzira na boju boce, kod svih uzoraka ulja od semenki grožđa dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih tokoferola i tokotrienola. Promene u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja pod uticajem fluorescentnog svetla u svim uzorcima ulja su sasvim neočekivane, u smislu da dolazi do povećanja njihovog sadržaja tokom testa. Prisutne razlike u vrednosti Pbr između ulja iz svetlih i ulja iz tamnih boca, pri uslovima izvođenja testa ne oslikavaju početnu pretpostavku da će ulje iz tamnijih bočica biti i bolje održivo. Razlog tome je verovatno dužina izvođenja testa.
- Sagledavanjem svih dobijenih rezultata može se konstatovati da su hladno presovana ulja od semenki grožđa pokazala različiti nutritivni kvalitet i oksidativnu stabilnost, zbog specifičnih razlika koje su posledica razlika u sorti vinove loze i poreklu semenki, tj. zbog specifičnog efekta fermentacije i destilacije na semenke od kojih je ulje proizvedeno.
- Za proizvodnju visoko kvalitetnog hladno presovanog ulja, semenke grožđa dobijene kao nusproizvod iz različitih otpadnih materijala u vinarijama ne treba mešati. Posebno se ne preporučuje korišćenje semenki grožđa nakon destilacije, zbog njihovog potencijalnog negativnog uticaja na kvalitet hladno presovanog ulja.

LITERATURA

1. Armstrong, G.A., J. E. Hearst (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228–237.
2. Assumpção, C. F., I. L. Nunes, T. A. Mendonça, R. C. Bortolin, A. Jablonski, S. H. Flôres, A. de Oliveira Rios (2016). Bioactive Compounds and Stability of Organic and Conventional *Vitis labrusca* Grape Seed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93 (1): 115–124.
3. Atkinson J., R. F. Epand, R. M. Epand (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (5): 739–764.
4. Bail, S., G. Stuebiger, S. Krist, H. Unterweger, G. Buchbauer (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108 (3): 1122–1132.
5. Becerra-Herrera, M., A. Velez-Martin, A. Ramos-Merchante, P. Richter, R. Beltran, A. Sayago (2018). Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. *Food Chemistry*, 241: 328-337.
6. Ben Mohamed, H., K. S. Duba, L. Fiori, H. Abdelgawed, I. Tlili, T. Tounekti, A. Zrig (2016). Bioactive compounds and antioxidant activities of different grape (*Vitis vinifera* L.) seed oils extracted by supercritical CO₂ and organic solvent. *LWT - Food Science and Technology*, 74: 557–562.
7. Berend, S., Z. Grabarić (2008). Determination of Total Polyphenol Content in Food with the Flow-Injection Method. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59 (3): 205–212.
8. Beres, C., G. N. S. Costa, I. Cabezudo, N. K. da Silva-James, A. S. C. Teles, A. P. G. Cruz, C. Mellinger-Silva, R. V. Tonon, L. M. C. Cabral (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management* 68: 581–594.
9. Beveridge, T. H. J., B. Girard, T. Kopp, J. C. G. Drover (2005). Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 53 (5): 1799–1804.
10. Bhosle, B. M., R. Subramanian (2005). New approaches in deacidification of edible oils – a review. *Journal of Food Engineering* 69: 481–494.
 11. Binzer, L., R. Brinsko, J. Cha, Z. Chen, S. Green, K. Grob, J. Hao, C. Hitz, L. Li, S. Swamy, M. Wolf, M. Xu, M. Yanik (2011). Incorporating grape seed antioxidants into a functional food model. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Gemstone Program. University of Maryland, College Park.
 12. Bjelica, M. (2011). Uticaj termičke obrade na kvalitativne karakteristike devičanskog ulja semena tikve golice. Diplomski rad. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
 13. Bjelica, M., V. Vujasinović (2017). Uporedna karakterizacija sastava i nutritivne vrednosti hladno presovanog i rafinisanog ulja semenki grožđa. XXII savetovanje u biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku. Zbornik radova 2: 521–526.
 14. Bjelica, M., V. Vujasinović, M. Ačanski, S. Dimić, E. Dimić (2017). Semenke grožđa - potencijalna sirovina za proizvodnju hladno presovanog ulja. 58. savetovanje proizvodnja i prerada uljarica – sa međunarodnim učešćem, Nerceg Novi. Zbornik radova, 149–155.
 15. Bjelica, M., S. Dimić, V. Vujasinović (2018). E-Vitaminska aktivnost hladno presovanih ulja semenki grožđa. 59. savetovanje proizvodnja i prerada uljarica – sa međunarodnim učešćem, Herceg Novi. Zbornik radova, 175–183.
 16. Bjelica, M., V. Vujasinović, B. Rabrenović, S. Dimić (2019). Some Chemical Characteristics and Oxidative Stability of Cold Pressed Grape Seed Oils Obtained From Different Winery Waste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, ejlt.201800416. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800416>
 17. Bockish, M. (1993). *Nahrungsfette und Öle*, Ulmer Verlag, Stuttgart.
 18. Boskou, D. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (9): 505–512.
 19. Boso, S., P. Gago, J. L. Santiago, E. Rodríguez-Canas, M. C. Martínez (2018). New monovarietal grape seed oils derived from white grape bagasse

- generated on an industrial scale at a winemaking plant. *LWT - Food Science and Technology*, 92: 388–394.
20. Brenes, A., A. Viveros, S. Chamorro, I. Arijia (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211: 1-7.
 21. Carpenter, A. P. (1979). Determination of tocopherols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56 (7): 668–671.
 22. CFIA (1996). Canadian Food Inspection Agency, Guide to food labeling and advertising, Nutrient claims, Secion VI-53, Table 6.2.6.3.1.
 23. Chen, A. Y., Y. C. Chen (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138 (4): 2099–2107.
 24. Choi, J.-M., E.-O. Lee, H.-J. Lee, K.-H. Kim, K.-S. Ahn, B.-S. Shim, N.-I. Kim, M.-C. Song, N.-I. Baek, S.-H. Kim (2007). Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its Antiangiogenic Activities. *Phytotherapy Research*, 21 (10): 954–959.
 25. Cicero, N., A. Albergamo, A. Salvo, G. D. Bua, G. Bartolomeo, V. Mangano, A. Rotondo, V. Di Stefano, G. Di Bella, G. Dugo (2018). Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. *Food Research International*, 109: 517–525.
 26. CIE (1976). International commission on illumination, Colorimetry: Official recommendation of the International commission on illumination. Publication CIE No. E-1.31, Bureau Central de la CIE, Paris, France.
 27. Crews, C., P. Hough, J. Godward, P. Brereton, M. Lees, S. Guiet, W. Winkelmann (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (17): 6261–6265.
 28. Davidov-Pardo, G., D. J. McClements (2015). Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*, 167: 205–212.
 29. Demirtas, I., E., Pelvan, I. S. Ozdemir, C. Alasalvar, E. Ertas (2013). Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey.

- European Journal of Lipid Science and Technology, 115 (6): 641–647.
30. Devesa-Rey, R., X. Vecino, J. L. Varela-Alende, M. T. Barral, J. M. Cruz, A. B. Moldes (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management* 31 (11): 2327-2335.
 31. Dimić, E. (2000). Kontrola kvaliteta hladno presovanih ulja. *Acta Periodica Technologica*, 31A: 165–174.
 32. Dimić, E. (2005). Hladno ceđena ulja, Monografija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
 33. Dimić, E., V. Vujasinović, R. Romanić, B. Janoš (2008). Održivost hladno presovanog ulja semena tikve golice *Cucurbita pepo* L. *Uljarstvo*, 39 (1–2): 17–25.
 34. Dimić E., T. Premović, O. Radočaj, V. Vujasinović, A. Takači (2018). Influence of seed quality and storage time on the characteristics of cold-pressed sunflower oil: impact on bioactive compounds and color. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 95 (1): 23-36.
 35. Dougherty, P. H. (2012). Introduction to the Geographical Study of Viticulture and Wine Production. *The Geography of Wine*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 3–36.
 36. Downey, M. O., J. S. Harvey, S. P. Robinson (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9 (1): 15–27.
 37. El-shami, B. S. M., S. S. Mohamed (1992). Studies on the lipid constituents of grape seeds recovered from pomace resulting from white grape processing. *Grasas y Aceites*, 43 (3): 157–160.
 38. Esalami, S. M. A. (2018). Karakterizacija kvaliteta , nutritivne vrednosti i stabilnosti devičanskih maslinovih ulja proizvedenih u različitim regionima Libije. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
 39. FAOSTAT, FAO–Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Database, <http://www.fao.org/home/en/>.
 40. Fedeli, E., A. Lanzani, P. Capella, G. Jacini (1966). Triterpene alcohols and sterols of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43 (4): 254–256.

41. Fernández, C. M., M. J. Ramos, Á. Pérez, J. Francisco Rodríguez (2010). Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource Technology*, 101: 7019-7024.
42. Fernandes, L., S. Casal, R. Cruz, J. A. Pereira, E. Ramalhosa (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50 (1): 161–166.
43. Firestone, D. (1997): *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 44-45.
44. Freitas, L. dos S., R. A. Jacques, M. F. Richter, A. Loviane da Silva, E. B. Caramão (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, 1200 (1): 80–83.
45. Gandul-Rojas B, Ml. Minquez-Mosquera (1996). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72: 31-39.
46. Gauer, P. O., M. C. A. Silva, S. Hoffmann (2018). Evaluation of oil and flour for human nutrition obtained from conventional and organic grape seed Bordo from a winery in the South of Brazil. *Grasas Y Aceites*, 69 (1): 1–9.
47. Gertz, C., S. P. Kochhar (2001). A new method to determine oxidative stability of vegetable fats and oils at simulated frying temperature. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 8 (1): 82–98.
48. Giuffrida D, F. Salvo, A. Salvo, L. L. Pera, G. Dugo (2007). Pigments Composition in Monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101: 833-837.
49. Gouvinhas, I., J. Machado, S. Gomes, J. Lopes, P. Martins-Lopes, A. I. R. N. A. Barros (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of monovarietal and commercial portuguese olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91 (7): 1197–1203.
50. Gunstone, F. D. (2000). *Composition and properties of edible oils*. Edible Oil Processing. Sheffield Academic Press, England, 1-33.
51. Haiyan, Z., D. R. Bedgood, A. G. Bishop, P. D. Prenzler, K. Robards (2007). Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food*

- Chemistry, 100 (4): 1544–1551.
52. Hassanien, M. M. M., A. G. Abdel-Razek, M. Rudzińska, A. Siger, K. Ratusz, R. Przybylski (2014). Phytochemical contents and oxidative stability of oils from non-traditional sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (11): 1563–1571.
 53. Hsu, S. Y., S. H. Yu (2002). Comparisons on 11 Plant Oil Fat Substitutes for Low-fat Kung-wans. *Journal of Food Engineering*, 51: 215-220.
 54. Hussein, S., S. Abdrabba (2015). Physico-chemical Characteristics, Fatty Acid, Composition of Grape Seed Oil and Phenolic Compounds of Whole Seeds, Seeds and Leaves of Red Grape in Libya. *International Journal of Applied Science and Mathematics*, 2 (5): 2394–2894.
 55. ISO 6886 (1996). Animal and vegetable fats and oils - Determination of oxidative stability (Accelerated oxidation test). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 56. Ivanišević, D., D. Jakšić, K. Nada (2015). *Poljoprivreda u Republici Srbiji: Popis poljoprivrede 2012. Vinogradarski atlas*. Republički zavod za statistiku, Beograd.
 57. Jablanovski D. (2016). *Interna komunikacija - neobjavljeni podaci*.
 58. Jakšić, D., D. Ivanišević, V. Đokić, M. Brbaklić Tepavac (2015). *Poljoprivreda u Republici Srbiji: Popis poljoprivrede 2012. Vinski atlas*. Republički zavod za statistiku, Beograd.
 59. Jin, Y.-R., J. Jin, C.-H. Li, X.-X. Piao, N.-G. Jin (2012). Ursolic acid enhances mouse liver regeneration after partial hepatectomy. *Pharmaceutical Biology*, 50 (4): 523–528.
 60. Johnson, L. F., R. Nemani, J. Hornbuckle, W. Bastiaanssen, B. Thoreson, B. Tisseyre, L. Pierce (2012). Remote sensing for viticultural research and production. *The Geography of Wine: Regions, Terroir and Techniques*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 209–226.
 61. Jordan R. (2002). Grape Marc Utilisation – Cold Pressed Grapeseed Oil and Meal. *The Cooperative Research Centre for International Food Manufacture and Packaging Science*, 1-118.
 62. Kamal-Eldin, A., L.-Å. Appelqvist (1996). The chemistry and antioxidant

- properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31 (7): 671–701.
63. Kamel, B. S., H. Dawson, Y. Kakuda (1985). Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62 (5): 881–883.
 64. Karlović, Đ., N. Andrić (1996). *Kontrola kvaliteta semena uljarica*, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd.
 65. Kashyap, D., H. S. Tuli, A. K. Sharma (2016). Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*, 146: 201–213.
 66. Kellens, M., W. De Greyt (2000). Deodorization. *Introduction to Fats and Oils Technology*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 2nd ed.: 235–268.
 67. Kim, H., S.-G. Kim, Y. Choi, H.-S. Jeong, J. Lee (2008). Changes in Tocopherols, Tocotrienols, and Fatty Acid Contents in Grape Seed Oils during Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 487–489.
 68. Kovac, V., E. Alonso, E. Revilla (1995). The Effect of Adding Supplementary Quantities of Seeds During Fermentation on the Phenolic Composition of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (3): 363–367.
 69. Krishnamurthy, R., M. Kellens (1996). Fractionation and winterization. *Bailey's industrial oil and fat products*. John Wiley and Sons, New York, 4: 324.
 70. Kubow, S. (1990). Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science & Technology*, 1: 67–71.
 71. Kunkel, S. D., C. J. Elmore, K. S. Bongers, S. M. Ebert, D. K. Fox, M. C. Dyle, A. A. Bullard, C. M. Adams (2012). Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS ONE*, 7 (6): e39332.
 72. Kunkel, S. D., M. Suneja, S. M. Ebert, K. S. Bongers, D. K. Fox, S. E. Malmberg, F. Alipour, R. K. Shields, C. M. Adams (2011). mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass. *NIH Public Access*, 13 (6): 627–638.
 73. Lampi, A.-M., M. Heinonen (2009). *Berry Seed and Grapeseed Oils. Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*. *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*. AOCS Press, Champaign, Illinois, Urbana IL: 215–235.
 74. Lazzerini, C., V. Domenici (2017). *Pigments in Extra-Virgin Olive Oils*

- produced in Tuscany (Italy) in Different Years. *Foods*, 6 (4): 25-35
75. Leber, E. (2009). Presentaion: Recovering Value from Organic Waste Materials...Winecycling. AprèsVin Enterprises Inc. FruitSmart Inc., Prosser, Washington.
http://www.pacificbiomass.org/documents/BeyondWaste_Winecycling_Leber.pdf
 76. Liepa G.U., T.L. Han-Markey, M. Sutton (2000). Nutritional and health effect aspects of dietary lipids. In *Introduction to fats and oils technology*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 63-81.
 77. López-Hortas, L., P. Pérez-Larrán, M. J. González-Muñoz, E. Falqué, H. Domínguez (2018). Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Research International*, 103: 130–149.
 78. Luque-Rodríguez, J. M., M. D. Luque de Castro, P. Pérez-Juan (2005). Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, 68 (1): 126–130.
 79. Lutterodt, H., M. Slavin, M. Whent, E. Turner, L. Yu (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128 (2): 391–399.
 80. Madawala, S. R. P., S. P. Kochhar, P. C. Dutta (2012). Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceites*, 63 (2): 143–151.
 81. Mag, T. K., R. D. Reichert (2002). A new recommended calculation of vitamin E activity: Implications for the vegetable oil industry. *INFORM*, 13: 836–839.
 82. Maiani, G., M. J. P. Castón, G. Catasta, E. Toti, I. G., Cambrodón, A. Bysted, F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, P. Knuthsen, M. Valoti, V. Böhm, E. Mayer-Miebach, D. Behsnlian, U. Schlemmer (2009). Review Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: 194–218.
 83. Maier, T., A. Schieber, D. R. Kammerer, R. Carle (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112 (3): 551–559.
 84. Malićanin, M. V. (2014). Izolovanje i fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz

- semena crvenih sorti grožđa. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
85. Malićanin, M., V. Rac, V. Antić, M. Antić, L. M. Palade, P. Kefalas, V. Rakić (2014). Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91 (6): 989–999.
 86. Ionescu, M., N. Ungureanu, S. S. Biriş, G. Voicu, M. Dilea (2013). Actual methods for obtaining vegetable oil from oilseeds. 2nd International Conference of Thermal Equipment, Renewable Energy and Rural Development TE-RE-RD 2013, Băile Olăneşti, Romania. Section 2: 167-172.
 87. Martínez, M. L., D. M. Maestri (2008). Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (12): 1183–1189.
 88. Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12): 3444–3452.
 89. Matthäus, B. (2008). Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (7): 645–650.
 90. Melgosa M, R. Huertas, E. Hita, J. M. Roa, F. J. Heredia, J. Alba, J. M. Moyano (2004). Proposal of a uniform color scale for virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81: 323-329.
 91. MEMO (2019). European Commission - Fact Sheet Circular Economy Package Report: Questions & Answers. Retrieved from http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-19-1481_en.htm?locale=FR
 92. Metrohm (2013). Oxidation stability of oils and fats – Rancimat method.
 93. Milić, D., M. Lukač Bulatović (2017). Menadžment voćarsko - vinogradarske proizvodnje. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
 94. Nikolić, D., M. Milutinović, V. Rakonjac (2007). Morphological and disease resistance characteristics of table grape hybrids. *Acta Horticulturae*, 760: 415–418.
 95. Nikolić, D. (2006). Components of variability and heritability of phenological phases in interspecies progenies of F1 generation in grapevine. *Genetika*, 38 (1): 49–58.

96. Oliveira, M., E. Duarte (2016). Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10 (1): 168–176.
97. Orčić, D., M. Francišković, K. Bekvalac, E. Svirčev, I. Beara, M. Lesjak, M., N. Mimica-Dukić (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143: 48–53.
98. Oštrić-Matijašević, B., J. Turkulov (1980). Tehnologija ulja i masti I deo. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 77-81.
99. Ovcharova, T. N., M. D. Zlatanov, A. S. Ivanov (2014). Sterol and fatty acid composition of grape seed oils. *Bulgarian Chemical Communications*, 46 (Special Issue A): 106–110.
100. Ovcharova, T., M. Zlatanov, A. Ivanov (2014). Changes in grape seed oil during fermentation. *European International Journal of Science and Technology*, 3 (9): 178–187.
101. Ovcharova, T., M. Zlatanov, R. Dimitrova (2016). Comparative Study of Seed Composition of White and Red Grape. *European Journal of Food Science and Technology*, 4 (3): 37–51.
102. Paqout, C., J. Mercier, D. Lefort, A. Mathieu, R. Perron (1967). Les Methodes Analytiques des Lipides Simples (in Serbian: Metode analize lipida). Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd, 175-179.
103. Pardo, J. E., E. Fernández, M. Rubio, A. Alvarruiz, G. L. Alonso (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (2): 188–193.
104. Parry, J., L. Su, M. Luther, K. Zhou, M. Peter Yurawecz, P. Whittaker, L. Yu (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3): 566–573.
105. Pickard, M. D. (2005). By-Product Utilization. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Sixth Ed: 391–416.
106. Pićurić-Jovanović, K., M. Milovanović (2005). Autoksidacija lipida i prirodni

- antioksidanti flore Srbije. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.
107. Piironen, V., J. Toivo, R. Puupponen-Pimiä, A. M. Lampi (2003). Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (4): 330–337.
 108. Piller D. (2011). New dietary guidelines and labeling initiatives accelerate shift toward more healthful oils. *INFORM*, 22 (9): 593-595.
 109. Poiana, M. A. (2012). Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (7): 9240–9259.
 110. Pravilnik (2006). Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode (Službeni list SCG , br. 23/2006 i Službeni glasnik RS, br. 43/2013 - dr. pravilnik).
 111. Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Službeni glasnik RS, br. 19/2017 i 16/2018).
 112. Pravilnik o prehrambenih i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane (Službeni glasnik RS, br. 51/2018 i 103/2018).
 113. Prisacaru, A. E. (2016). Effect of antioxidants on polyunsaturated fatty acids – Review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 15 (2): 121-129.
 114. Psomiadou E, M. Tsimidou (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 640-647.
 115. Rabrenović, B. B., E. B. Dimić, M. M. Novaković, V. V. Tešević, Z. N. Basić (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 55 (2): 521–527.
 116. Radočaj, O., E. Dimić (2013). Physico-chemical and nutritive characteristics of selected cold-pressed oils found in the European market. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 90 (4): 219–228.
 117. Radočaj, O., V. Vujasinović, E. Dimić, Z. Basić (2014). Blackberry (*Rubus*

- fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (8): 1015–1024.
118. Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud (2006). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England
119. Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. *Current Opinon in Food Science*, 1: 56-63.
120. Rombaut, N., R. Savoie, B. Thomasset, J. Castello, E. Van Hecke, J. L. Lanoisellé (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products*, 63: 26–33.
121. Ržehin, B. P., A. G. Sergeev (Red.) (1965). *Rukovodstvo po metodam issledovanija, tehnohimičeskemu kontrolju i učetu proizvodstva v masložirovoj promišlenosti. Tom II, čast pervaj, VNIIŽ, Leningrad.*
122. Schieber, A., D. Müller, G. Röhring, R. Carle (2002). Effects of grape cultivar and processing on the quality of cold-pressed grape seed oils. *Mitteilungen Klosterneu- burg*, 52: 29-33.
123. Schubert, E. F. (2006). *Light Emitting Diodes*. Cambridge University Press, Sec. edition: 292-305.
124. Seppanen C. M., Q. H. Song, A. Saari Csallany (2010). The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87: 469-481.
125. Shinagawa, F. B., F. C. de Santana, L. Rabelo, O. Torres, J. Mancini-Filho (2015). Grape seed oil: a potential functional food? *Food Science and Technology*, 35 (3): 399–406.
126. Shinagawa, F. B., F. C. de Santana, E. Araujo, E. Purgatto, J. Mancini-Filho (2017). Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *Food Science and Technology*, 38 (1): 164-171.
127. Shukla, V. K. S. (2003). A designer oil for better health. *Health & Nutrition*, 14(6): 340–341.

128. Siger, A., M. Nogala-Kalucka, E. Lampart-Szczapa (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15 (2): 137–149.
129. Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56 (8): 365–379.
130. Službeni list Evropske Unije, D. 32008L0098. (2008). Direktiva 2008/98/EZ Evropskog parlamenta i Veća o otpadu i stavljanju izvan snage određenih direktiva.
131. SRPS EN ISO 659 (2011). Seme uljarica - Određivanje sadržaja ulja (referentna metoda) . Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
132. SRPS EN ISO 660 (2015). Masti i ulja biljnog i životinjskog porekla - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
133. SRPS EN ISO 665 (2008). Seme uljarica - Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
134. SRPS ISO 729 (1992). Seme uljarica - Određivanje kiselosti ulja (identičan sa ISO 729:1988). Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
135. SRPS EN ISO 3960 (2017). Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko (vizuelno) određivanje završne tačke. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
136. SRPS EN ISO 6885 (2017). Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje anisidinskog broja. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
137. SRPS EN ISO 12966-1 (2015). Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Gasna hromatografija metilestara masnih kiselina - Deo 1: Uputstva za savremenu gasnu hromatografiju metilestara masnih kiselina. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
138. SRPS EN ISO 12966-2 (2017). Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Gasna hromatografija metilestara masnih kiselina - Deo 2: Priprema metilestara masnih kiselina. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
139. Strandvik, B. (2011). The omega-6/omega-3 ratio is of importance! Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 85 (6): 405–406.
140. Taseri, L., M. Gülcü, I. Palabiyik, G. U. Seckin, T. Aktas, U. Gecgel (2018).

- Effects of open air and solar drying on the nutritional quality of seed oil, seeds and skins from Muscat Hamburg grapes. *Grasas y Aceites*, 69 (4): 1–8.
141. Teixeira, A., N. Baenas, R. Dominguez-Perles, A. Barros, E. Rosa, D. A. Moreno, C. Garcia-Viguera (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (9): 15638–15678.
142. Töpfer, R., L. Hausmann, R. Eibach (2011). *Molecular Breeding. Genetics, Genomics and Breeding of Grapes. Genetics*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, USA, 160–185.
143. Vardanega, R., J. M. Prado, M. A. Meireles (2015). Adding value to agri-food residues by means of supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 96: 217-227.
144. Verleyen, T. (2002). Stability of minor components during vegetable oil refining. Doctoral Thesis. Ghent University, Ghent, Belgium.
145. Voća, N. (2008). Vinska komina kao izvor toplinske energije. *Glasnik Zaštite Bilja*, 6: 91–99.
146. Vujasinović, V. (2011). Uticaj termičke obrade na nutritivnu vrednost i oksidativnu stabilnost ulja semena uljane tikve goliće *Cucurbita pepo* L. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
147. Vujasinović, V., M. Bjelica, T. Lužaić, S. Dimić (2016a). Hladno presovano ulje koštica grožđa - realnost i budućnost. *Uljarstvo*, 47 (1): 85–97.
148. Vujasinović, V., M. Bjelica, V. Večei-Funda, N. Vuksanović (2016b). Valorizacija komine grožđa - hladno ceđeno ulje iz koštica. 12. regionalna konferencija "Životna sredina ka Evropi". Klimatske promene i održivo korišćenje prirodnih resursa. Beograd. Zbornik radova EnE16-ENV.net: 181–184.
149. Woźniak, Ł., S. Skąpska, K. Marszałek (2015). Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules*, 20 (11): 20614–20641.
150. Yang, J., T. E. Martinson, R. H. Liu (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116 (1): 332–339.

151. Yang, R., L. Zhang, P. Li, L. Yu, J. Mao, X. Wang, Q. Zhang (2018). A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. *Trends in Food Science and Technology*, 74: 26–32.
152. Yousefi, M., L. Nateghi, M. Gholamian, L. Nateghi (2013). Physicochemical properties of two type of shahrodi grape seed oil (Lal and Khalili). *European Journal of Experimental Biology*, 3 (5): 115–118.
153. Žunić, D., N. Korać, S. Todić, Đ. Paprić, N. Marković, B. Sivčev, I. Kuljančić, Z. Bešlić, S. Matijašević, D. Vujović (2012). Stanje i uslovi razvoja vinogradarstva Srbije. 14. kongres vocara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem. Vrnjačka Banja, Srbija. Zbornik radova i apstrakata: 23–28.