Optimizacija procesa dobivanja orahovog ulja

Bošnjak, Andreja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:831757

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Andreja Bošnjak

OPTIMIZACIJA PROCESA DOBIVANJA ORAHOVOG ULJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Optimizacija i projektiranje industrijskih procesa
Tema rada je prihvaćena na II. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. studenog 2014. godine
Mentor: doc. dr. sc. *Stela Jokić*
Komentor: izv. prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Krunoslav Aladić*

OPTIMIZACIJA PROCESA DOBIVANJA ORAHOVOG ULJA

Andreja Bošnjak, 250-DI

Sažetak:
Orah je danas širom svijeta poznat kao funkcionalna hrana. Prilikom proizvodnje ulja važno je postići optimalne uvjete procesa kako bi se postigao što veći prinos. U ovom radu orahovo ulje je dobiveno postupkom prešanja i ekstrakcijom supekritičnim CO_2. Analizirani su sljedeći parametri: temperatura zagrijavanja glave preše (70, 85 i 100 °C), frekvencija elektromotora (20, 30, 40 Hz) te veličina otvora glave pužne preše za izlaz pogače (8, 10, 12 mm) te su prilikom provedbe eksperimenta dobiveni optimalni parametri za provedbu ekstrakcije ulja. U dobivenom ulju određeni su sljedeći parametri kvalitete: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, netopljive nečistoće, udio vlage u ulju, jodni broj, saponifikacijski broj, *p*-anisidinski i totox broj. Zaostalo ulje iz pogače, nakon hladnog prešanja pri optimalnim uvjetima, ekstrahiralno je pomoću superkritičnog CO_2 s ciljem potpunog iskorištenja ulja. Sadržaj tokoferola u ulju dobivenom prešanjem i ulju dobivenom ekstrakcijom supekritičnim CO_2 je određen i uspoređen.

Ključne riječi: orahovo ulje, hladno prešanje, ekstrakcija supekritičnim CO_2, kvaliteta ulja, tokoferoli, optimizacija

Rad sadrži: 52 stranice
11 slika
7 tablica
1 prilog
50 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Mate Bilić*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Stela Jokić*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*	član-komentor
4.	izv. prof. dr. sc. *Darko Velić*	zamjena člana

Datum obrane: 14. srpnja 2015. godine

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of technological design process and construction materials
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Optimization and design of industrial processes
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no.2 held on November 25, 2014.
Mentor: *Stela Jokić*, PhD, assistant prof.
Comentor: *Tihomir Moslavac*, PhD, associated prof.

Technical assistance: *Krunoslav Aladić*, PhD

OPTIMIZATION OF WALNUT OIL PRODUCTION

Andreja Bošnjak, 250-DI

Summary:
Walnut is recognized worldwide as a functional health food. In the walnut oil production it is very important to find an appropriate method to recover the oil from seeds. Walnut oil in this study was obtained by pressing the seeds followed by extraction with supercritical CO_2. The effects of pressing temperature (70, 85, 100 °C), frequency (20, 30, 40 Hz) and nozzle size (8, 10, 12 mm) in pressing experiments on oil recovery and oil temperature were monitored. The optimal calculated pressing condition within the experimental range of the variables studied was determined. In obtained walnut oil the following parameters were analyzed: peroxide value, free fatty acids, insoluble impurities, moisture content, iodine value, saponification value, *p*-anisidine value and Totox value. The residual oil from pressed cake obtained at optimal conditions was extracted with CO_2 with the aim of complete oil recovery. Content of tocopherols in walnut oil obtained by screw pressing and oil extracted by supercritical CO_2 were compared.

Key words: walnut oil, screw pressing, supercritical CO_2 extraction, oil quality, tocopherols, optimization

Thesis contains: 52 pages
11 figures
7 tables
1 supplement
50 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Mate Bilić*, PhD, full prof. — chair person
2. *Stela Jokić*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Tihomir Moslavac*, PhD, associate prof. — member
4. *Darko Velić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: July 14, 2015.

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

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj izuzetnoj mentorici doc. dr. sc. Steli Jokić koja mi je uvijek bila uzor i primjer uspješne osobe. Zahvaljujem joj se na podršci, razumijevanju i toleriranju svih mojih eventualnih pogrešaka, kašnjenja i ostalih obaveza, koje je dočekivala sa osmjehom i razumijevanjem, što mi je iznimno puno značilo, te na svom prenešenom znanju i idejama za daljnje napredovanje.

Takodjer se zahvaljujem i prof. dr. sc. Mati Biliću koji me je još na prvoj godini studija savjetovao i bio podrška zbog čega sam mu iznimno zahvalna. Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sr. Tihomiru Moslavcu na velikoj pomoći oko izrade diplomskog rada i njegovoj tehničkoj suradnici Danieli Paulik.

Nadalje, želim se zahvaliti mojim fenomenalnim roditeljima, sestrama i bratu koji su mi omogućili studiranje i bili mi velika podrška u svim mojim teškim i lijepim trenutcima.

Najviše od svega zahvaljujem mojim prijateljima Tanji, Marinu, Alenu, Iliji, Ivanu i Stjepanu bez kojih ovih pet godina studija ne bi prošlo tako brzo i lako.

Te za kraj mom dečku Stjepanu, koji mi je pružio najveću podršku, ljubav, inspiraciju kada je nisam imala i najbolje društvo kada je trebalo odmoriti od obaveza.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. ORAH 4

2.1.1. Orahovo ulje 5

2.2. PROCES HLADNOG PREŠANJA ULJA 6

2.3. EKSTRAKCIJA SUPERKTIČNIM FLUIDIMA 7

2.4. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA 9

2.4.1. Box-Behnkenov plan pokusa 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. ZADATAK 14

3.2. MATERIJALI 14

3.2.1. Jezgra oraha 14

3.2.2. Reagensi 15

3.2.3. Uređaji 15

3.3. METODE 16

3.3.1. Određivanje udjela vlage u jezgri oraha 16

3.3.2. Određivanje udjela ulja u jezgri oraha i pogači 16

3.3.3. Hladno prešanje 18

3.3.4. Određivanje parametara kvalitete orahovog ulja 18

3.4. OPTIMIRANJE PROCESA HLADNOG PREŠANJA ORAHOVOG ULJA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA 23

3.5. EKSTRAKCIJA ULJA IZ POGAČE POMOĆU SUPEKRITIČNOG CO_2 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. OPTIMIRANJE PROCESA PREŠANJA ORAHOVOG ULJA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA 26

4.2. EKSTRAKCIJA OSTATKA ULJA IZ POGAČE SUPERKRITIČNIM CO_2 33

4.3. SADRŽAJ TOKOFEROLA U ORAHOVOM ULJU 34

5. ZAKLJUČCI 37

6. LITERATURA 39

7. PRILOZI 43

Popis oznaka, kratica i simbola

Y - modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

X_{ij} - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

c_p - broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

k - broj faktora

m - masa (g)

T - temperatura (°C)

T_c - kritična temperatura (°C)

P - tlak (bar)

P_c - kritični tlak (bar)

ANOVA - analiza varijance

CO_2 - ugljik (IV) oksid

$Na_2S_2O_3$ - natrij tiosulfat

NaOH - natrij hidroksid

RSM - metoda odzivnih površina (*eng. Response surface metodology*)

SFE - ekstrakcija superkritičnim fluidima (*eng. Supercritical fluid extraction*)

SMK - slobodne masne kiseline

Pbr - peroksidni broj

NN - netopljive nečistoće

F - frekvencija okretaja pužnice (Hz)

N - veličina otvora preše (mm)

$C_{16:0}$ - palmitinska kiselina

$C_{18:0}$ - stearinska kiselina

$C_{18:1}$ - oleinska kiselina

$C_{18:2}$ - linolna kiselina

$C_{18:3}$ - linolenska kiselina

1. UVOD

Orahova jezgra odličan je izvor nutrijenata, osobito proteina i esencijalnih masnih kiselina. Sadrže visok udio ulja (52 – 70%) s izvrsnom ravnotežom masnih kiselina (Crews i sur., 2005). Njihovi glavni sastojci su trigliceridi od kojih su najzastupljenije mononezasićene (oleinska kiselina) i polinezasićene masne kiseline prisutne u visokim udjelima. Što se tiče antioksidacijskog potencijala, orasi su izvrstan izvor tokoferola i polifenola (Crews i sur., 2005; Martìnez i sur., 2006).

Količina i kvaliteta ekstrahiranog orahovog ulja su ključni za određivanje isplativosti komercijalne proizvodnje. Sve se više povećava interes za korištenjem kontinuirane, mehaničke pužne preše za dobivanje ulja iz uljarica, međutim pužna preša ne može u potpunosti zamijeniti ekstrakciju ulja organskim otapalima. Glavni razlog je relativno malo iskorištenje ulja. Nadalje, prednosti prešanja pužnom prešom su jednostavnost i pouzdan način obrade male količine sjemenki (Martìnez i sur., 2008). Uobičajena ekstrakcija organskim otapalima daje ulje lošije kvalitete zbog čega ga je potrebno dodatno pročišćavati, dok to nije slučaj kod prešanja pužnom prešom. Prilikom upotrebe ove metode zadržavaju se sve bioaktivne komponenete u uljima poput esencijalnih masnih kiselina, fenola, flavonoida i tokoferola (Teh i Birch, 2013).

Ekstrakcija ulja supekritičnim fluidima je alternativna metoda konvencionalnim industrijskim metodama kao što su prešanje i ekstrakcija organskim otapalima jer nudi brojne prednosti, isključujući nedostatke poput ostataka otapala u ulju. Primjenom ove metode ekstrakcije zadržavaju se aromatični spojevi koji su od vrlo velike važnosti kada govorimo o kakvoći ulja (Salgin i Salgin, 2006; Martìnez i sur.,2008; Sovilj, 2010). Superkritični fluidi osiguravaju veliku topljivost spojeva, povećavaju stupanj prijenosa mase i procesom se može upravljati promjenom glavnih procesnih parametara. Ugljik (IV) oksid (CO_2) kao ekološko otapalo najčešće se upotrebljava u ekstrakciji supekritičnim fluidima. Ekstrakt dobiven pomoću CO_2 je bez tragova ostataka toksičnih spojeva koji se inače nalaze u organskim otapalima, čime je ulje dobiveno ovakvom metodom vrlo cijenjen proizvod (Brunner, 2005; Martìnez i sur., 2008; Sahena i sur., 2009; Temelli, 2009).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima ubraja se u novije metoda izolacije i nema široku komercijalnu primjenu u smislu ekstrakcije jestivih ulja. Naime, činjenica je da se radi o vrlo skupoj metodi koja zahtjeva visoka ulaganja u procesnu opremu, a jestiva biljna ulja su relativno jeftin proizvod koji se proizvodi u velikim količinama. Međutim, kako bi se ova metoda ipak primjenjivala u industriji, potrebno je napraviti što više znanstvenih istraživanja o osnovama superkritičnih procesa, pa je prema tome cilj ovoga rada i bio optimirati proces ekstrakcije orahovog ulja pomoću pužne preše i primijeniti supekritični CO_2 za izdvajanje ulja iz uljne pogače u svrhu potpunog iskorištenja ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ORAH

Orasi (lat. *Juglans regia*) su rod biljaka iz porodice *Juglandaceae*. Riječ je o voćnoj vrsti vrlo rasprostranjenoj u svijetu čije je stablo visoko 10-40 m, sa šiljastim listovima dugim 20-30 cm. Postoji dvadesetak vrsta oraha. Dvije najpoznatije vrste su perzijski orah (*Juglans regia*) koji potječe iz Azije i Dalekog istoka, i crni orah (*Juglans nigra*) koji je rodom iz Sjeverne Amerike. Plodovi svih oraha su jestivi, ali orasi koji se mogu kupiti u trgovinama većinom su plodovi perzijskog oraha. Potrebno je 15 godina kako bi drvo naraslo i počelo davati plodove. Prosječno drvo oraha daje plod 45 godina (Korać, 1987).

Velik značaj oraha potječe od njegove višestruke upotrebe. Uzimajući u obzir njegova prehrambena svojstva, orah je namirnica vrlo bogata vitaminima, mineralima, uljima i bjelančevinama. Sama jezgra oraha tri puta je kaloričnija od goveđeg mesa, vrlo je bogata uljem čiji se sadržaj kreće od 50-60%, pa čak i 70%. Također su izvrstan izvor omega-3 i omega-6 masnih kiselina, a dokazano je da konzumacijom ove vrste orašastih plodova dolazi do snižavanja kolesterola. Osim ploda i jezgre upotrebljavaju se i zeleni plodovi, ljuska ploda, list i kora oraha (Savage i sur.,1999).

Mladi plodovi oraha sadrže i do 5000 mg vitamina C na 100 g ploda, dok ga u jezgri zrelog ploda ima 30-50 mg. Sadržaj ostalih vitamina: A, B_1, B_2, PP i E povećava se zrenjem ploda. Prema Koraću (1987), 100 g jezgre oraha sadrži 0,3-0,5 mg vitamina B_1, oko 0,1 mg vitamina B_2, 1-1,2 mg vitamina PP i 0,6-1 mg vitamina E. Količina ulja, bjelančevina, šećera i ostalih ugljikohidrata kao što je već rečeno, povećava se zrenjem ploda gdje je stavljen naglasak na rast udjela ulja. Jezgra oraha sadrži 12-15% bjelančevina, ovisno o sorti, dok je količina šećera vrlo mala (2,5-4%), zbog čega je jezgra oraha pogodna za ljude oboljele od dijabetesa, nadalje, udio minerala je do 3% (Poljoprivredna enciklopedija, 1970; Tehnička enciklopedija, 1976; Korać, 1987; Miljković, 1991). Količina vode u mladim plodovima je visoka, čak i do 80%. Plodovi se obično prodaju pri vlažnosti od 8-12%.

Čuvanje orašastih plodova je relativno jednostavno. Ipak, zbog velike količine ulja u jezgri i linolne kiseline (oko 60% svih masnih kiselina) koja je sklona oksidaciji, jer u molekulama sadrži po dvije nezasićene veze, na višim temperaturama bi došlo do oksidacije (užeglosti) pri čemu bi jezgra izgubila svoj karakterističan miris i okus te kao takva postaje neupotrebljiva. Zato plodove oraha treba čuvati u hladnjači na temperaturi 1-4 °C i pri relativnoj vlažnosti od oko 60%, a tako čuvani plodovi mogu zadržati dobru kvalitetu i do dvije godine (Korać, 1987).

2.1.1. Orahovo ulje

Biljna ulja su tip ekstrakta biljnih sirovina u čijem sastavu najčešće dominiraju trigliceridi. Trigliceridi pripadaju većoj skupini spojeva koje zovemo lipidi (masti). Ona se uglavnom dobivaju iz sjemenki/ploda biljke. Kao i kod životinja, masnoće u biljkama predstavljaju skladišni oblik energije, budući da svojom razgradnjom oslobađaju puno energije. No, masnoće su i izvor masnih kiselina koje su biljnom ili životinjskom organizmu sirovina, odnosno primarni spoj iz kojeg će stvoriti lokalne hormone koji reguliraju brojne funkcije, od imunološke obrane do rasta (Rac, 1964).

Kako je naglašeno, jezgra oraha je vrlo bogata uljem. Proizvodnja orahovog ulja ima „sezonski karakter“ (od sredine listopada do kraja ožujka), zbog velike osjetljivosti jezgre na oksidaciju. Orahovo ulje proizvodi se kao hladno prešano ulje, a zbog specifičnog okusa se koristi kao začinsko ulje. Postupak započinje grubim mljevenjem jezgre, koja se zatim preša u pužnoj preši prilikom čega dolazi do izdvajanja ulja i nastajanja uljne pogače. Ovako dobiveno ulje često se deklarira kao *djevičansko* ulje (Dimić, 2005).

Orahovo ulje svrstavamo u grupu ulja visoke biološke vrijednosti za što je zaslužan sastav masnih kiselina orahovog ulja. Sadrži oko 9% zasićenih, 24% mononezasićenih i 67% polinezasićenih masnih kiselina, gdje su najzastupljenije linolna i linolenska kiselina koje ubrajamo u esencijalne masne kiseline (**Tablica 1**). Kao što je prikazano u **Tablici 1**, orahovo ulje je vrlo dobar izvor omega-3 i omega-6 masnim kiselinama, koje štite od kardiovaskularnih bolesti i snižavaju rizik od nastanka raka (Dimić, 2005).

Tablica 1 Sastav masnih kiselina orahovog ulja (Dimić,2005)

Masna kiselina	(%m/m)
Palmitinska $C_{16:0}$	6-8
Stearinska $C_{18:0}$	1-3
Oleinska $C_{18:1}$	14-21
Linolna $C_{18:2}$	54-65
Linolenska $C_{18:3}$	9-15

Prema Dimić (2005) indukcijski period pri temperaturi od 100 °C iznosio je 5,45 h, pri čemu je sadržaj linolne kiseline u ulju bio 60,2%, a linolenske 15,5%. Osim u jestive svrhe, zbog vrlo visokog jodnog broja, odnosno vrlo dobre sposobnosti „sušenja“, orahovo ulje je pogodno i za

proizvodnju slikarskih boja. Prikaz osnovnih karakteristika orahovog ulja dat je u **Tablici 2** (Dimić, 2005).

Tablica 2 Prikaz fizikalno-kemijskih karakteristika orahovog ulja (Dimić, 2005)

Pokazatelj	
Jodni broj (g/100 g)	135-140
Saponifikacijski broj (mg KOH/g)	189-198
Indeks refrakcije (n^t_D)	T = 20 °C 1,475-1,476

2.2. PROCES HLADNOG PREŠANJA ULJA

Ulja su proizvodi koji se dobivaju iz sjemenki ili plodova biljaka, sastoje se od triglicerida, a mogu sadržavati i neznatne količine drugih lipida kao što su fosfolipidi, voskovi, neosapunjive tvari, mono- i digliceride i slobodne masne kiseline. Ovisno o tehnološkom postupku koji se primjenjuje u proizvodnji, ulja se razvrstavaju u sljedeće kategorije:

rafinirana ulja – proizvodi dobiveni postupkom rafinacije jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja;

hladno prešana ulja – proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C;

nerafinirana ulja – proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, uz upotrebu topline (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, 2012).

Hladno prešanje ulja najčešće se provodi kontinuiranim pužnim prešama. Osim što je hladno prešanje ulja specifično po tome što se prešanje ne provodi na višoj temperaturi od 50 °C, ono se može provoditi i pri nižim tlakovima čime je očuvanje arome veće. Upravo iz tih razloga hladno prešana ulja su puno skuplja (Dimić, 2005). Hladno prešano orahovo ulje se u ovom slučaju proizvodi direktnim prešanjem sirovog-osušenog ploda oraha. Prilikom provođenja ovog tehnološkog procesa treba voditi računa da ni sirovina ni ulje tijekom postupka prešanja ne budu u kontaktu sa temperaturom većom od 50 °C što je u skladu sa Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (Dimić i sur., 2015). Naime, hladno prešano jestivo biljno ulje proizvodi se bez zagrijavanja, prešanjem, uz prethodno čišćenje (odstranjivanje nečistoća), ljuštenjem i usitnjavanjem mehaničkim putem (kod određenih sirovina). Ovakvo sirovo ulje se može

pročišćavati isključivo pranjem vodom, taloženjem, filtracijom i centrifugiranjem (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, 2012).

Tehnološki proces proizvodnje hladno prešanog orahovog ulja prema Vujasinović (2011) obuhvaća sljedeće: neposredno prije prerade plodovi prolaze kroz magnetni čistač kako bi se u potpunosti uklonile metalne nečistoće koje bi mogle oštetiti prešu. Zatim se plodovi čiste na selektoru od svih organskih i anorganskih nečistoća. Nakon toga se očišćeni, suhi plodovi preko prihvatnog koša direktno unose u prešu. Preša istovremeno melje i preša materijal, pri čemu sa strane dolazi do izlaska ulja koje se prikuplja u sabirne posude, a kroz konus izlazi pogača. Odgovarajućom konstrukcijom izlaznog konusa regulira se debljina pogače što utječe i na radni tlak u preši. Što je manji otvor na glavi preše, tlak u preši je veći i obrnuto (Rac, 1964). Nakon završetka procesa prešanja sirovo ulje sadrži netopljive nečistoće koje mu umanjuju kvalitetu. Da bi se uklonile netopljive nečistoće iz ulja primjenjuju se procesi centrifugiranja, taloženja i filtracije.

Za proizvodnju hladno prešanog ulja često se koriste pužne preše koje su po konstrukciji namijenjene prešanju raznih vrsta uljarica, a ne isključivo za plodove oraha. Samo prešanje plodova oraha na ovakvim vrstama preše je vrlo problematično, kako zbog nepovoljnih plastično-elastičnih svojstava osušenog ploda, tako i zbog konstrukcije same preše. Stoga se orah često miješa s ljuskama suncokreta kako bi se olakšao izlazak pogače i spriječilo njezino prekomjerno skrutnjavanje (Dimić i sur., 2015).

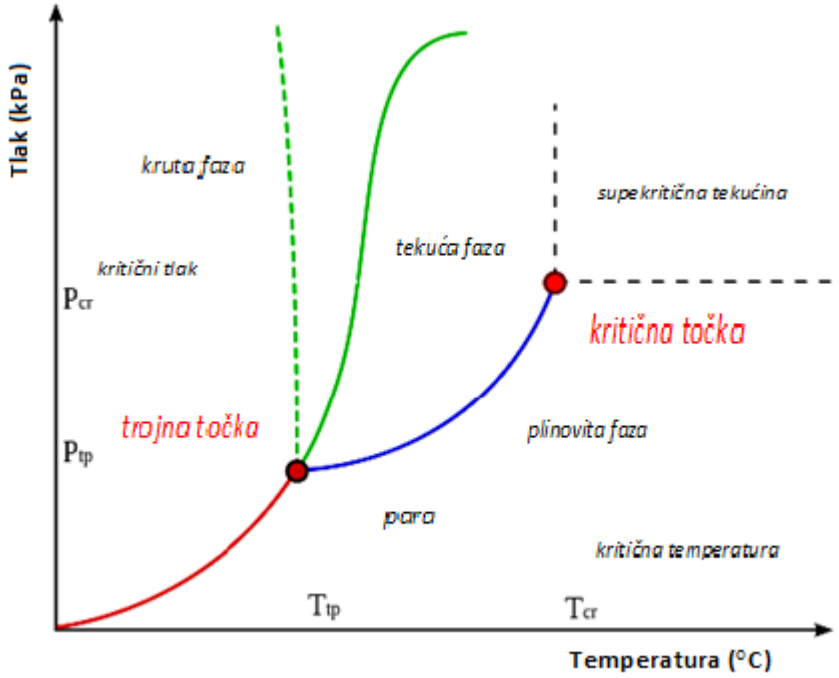
2.3. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Superkritična fluidna ekstrakcija (SFE) ili ekstrakcija superkritičnim fluidima je slična ekstrakciji s organskim otapalima ali s boljom difuzijom, nižom viskoznošću i manjom napetošću površine primjenjenog superkritičnog otapala. Glavne prednosti upotrebe superkritičnih fluida za ekstrakciju su niska cijena, neotrovnost i mnogo jednostavnije i jeftinije uklanjanje otapala nego kod ekstrakcije s organskim otapalima. SFE je jedna od najboljih tehnologija za ekstrakciju osjetljivih materijala. Osim navedenog, ovaj se postupak odlikuje visokom selektivnošću i bez nastanka štetnih nusprodukata za okoliš, što ga ubraja u energetski efikasne procese i pripada tzv. „čistoj tehnologiji“ (Brunner, 2005, Abbas i sur., 2008, Jokić i sur., 2011).

Prema Jokić i sur. (2011) matematičko modeliranje superkritične ekstrakcije služi prvenstveno kod prijenosa rezultata iz laboratorijskog u poluindustrijsko odnosno industrijsko mjerilo tzv. *scale-up*. Princip modeliranja je kvalitativno opisati kinetiku različitih ekstrakcijskih procesa pri čemu niti jedan od postojećih modela nije univerzalan. Konkretno, vezano za ekstrakciju biljnih (jestivih) ulja proces se opisuje kao jednostupanjska ekstrakcija jedne pseudo-komponente

prilikom kojega je prinos izrazito velik. Nadalje, prikaz inovativnih matematičkih modela dati su od strane del Valle i de la Fuente (2006) te Oliveira i sur. (2011).

Princip ekstrakcije supekritičnim fluidima naglasak stavlja na korelaciju gustoće i topljivosti supstance koje se eksperimentalno određuju. Svaki plin iznad svoje kritične točke mijenja gustoću čime mu se mijenja i sposobnost otapanja za određenu komponentu. Nakon što je fluid upotrebljen kao otapalo, superkritični fluid se vraća u stanje nižeg tlaka od kritičnog, pri čemu oslobađa otopljenu supstancu. SF difundira do površine čestice, zatim prodire u unutrašnjost krutog materijala. Prilikom kontakta fluida s otopljenom tvari dolazi do njezine ekstrakcije. Otopljena tvar izlazi kroz vanjski sloj omotača i ulazi u vanjsku stjenku superkritičnog fluida gdje ostaje do promijene tlaka i temperature (Wakao i Kaguei, 1982; Nikolovski, 2009).



Slika 1 Fazni dijagram (tlak-temperatura) (Mrvnar, 2012)

Fazni dijagram prikazan na **Slici 1** prikazuje princip nastanka superkritičnog fluida. U određenom trenutku, kako zagrijavamo fluid i povećavamo mu tlak dolazi do nestanka krivulje isparavanja. Takav fenomen se naziva kritična točka i iznad nje se nalazi područje superkritičnih fluida ili tekućina. Ovo područje se nalazi između tekuće i plinovite faze, pa tako fluid koji prijeđe u supekritično stanje ima svojstva i plina i tekućine. Približavanjem kritičnoj točki dolazi do sve manje razlike u molnom volumenu plinovite i tekuće faze, dakle manja je razlika u gustoći i drugim fizikalnim svojstvima poput stlačivosti, viskoznosti i slično. Dolaskom do kritične točke, granica između plina i tekućine se zamagljuje. Daljnjim napretkom potpuno

se gubi granica i fluid prelazi u superkritično stanje. Navedena promjena se događa upravo zbog činjenice da je plinovito i tekuće stanje vrlo slično po unutarnjoj strukturi, jedina razlika je snaga u intermolekulskim vezama (Mrnar, 2012).

Kao superkritični fluid mogu se koristiti različite tvari, primjerice voda, etanol i slično, no u industriji je najrasprostranjenija uporaba $scCO_2$. U proizvodnji se upotrebljava najčešće za dekofenizaciju kave i zelenog čaja, ekstrakciju eteričnih ulja i hmelja iz piva. Pri tome on prodire duboko u zeleno zrno i otapa 97-99% prisutnog kofeina. Tlak i temperatura $scCO_2$ iznose 7,38 MPa i 31,3 °C, zbog čega je idealan za ekstrakciju termolabilnih aromatičnih i sličnih spojeva (Jokić i sur., 2011).

2.4. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Riječ optimiranje se odnosi na poboljšanje performansi sustava procesa ili produkta u cilju postizanja što boljeg rezultata. Tradicionalno, optimizacija u analitičkoj kemiji se obično provodila promatranjem utjecaja jednog faktora na ukupni eksperiment. Dakle, mijenjan je samo jedan parametar, a drugi su bili konstantni. Kao glavni nedostatak ove metode navodi se činjenica da ne uključuje interaktivne utjecaje na promatranu varijablu, što za posljedicu ne daje prikaz potpunog utjecaja svih čimbenika na varijablu. Drugi nedostatak metode je potreba za povećanjem broja eksperimenata ako se želi dobiti detaljniji opis i stvarna slika istraživanja. Kako bi se izbjegli ovi nedostatci, počinju se upotrebljavati multivarijantne statističke analize, od kojih je jedna i metoda odzivnih površina (RSM – *Response surface metodology*) (Bezerra i sur., 2008).

Riječ je o skupu empirijskih i statističkih tehnika kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nezavisnih varijabli (faktori, procesni parametri) na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja, razvoja i optimiranja procesa. Prije nego se objasni RSM metoda potrebno je definirati nekoliko pojmova:

Eksperimentalna domena je eksperimentalno polje koje treba istražiti. Definirano je minimumom i maksimumom eksperimentalne varijable.

Eksperimentalni dizajn je specifični skup eksperimenata definiranih matricom koja je sastavljena od različitih kombinacija varijable.

Čimbenici ili nezavisne varijable su eksperimentalne varijable koje se mogu mijenjati neovisno jedna o drugoj. Neke od osnovnih nezavisnih varijabli su temperatura, koncentracija, pH, protok i slično.

Razine varijable predstavljaju različite vrijednosti varijabli na kojoj se eksperiment provodi.

Odziv ili zavisne varijable su izmjerene vrijednosti, rezultati pokusa.

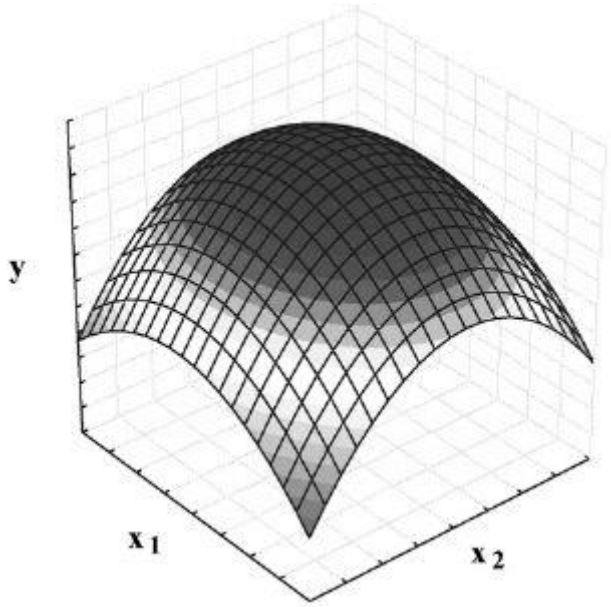
Ostatak je razlika između izračunatih i eksperimentalnih podataka (Bezerra i sur., 2008).

Svrha metode odzivnih površina je dobivanje matematičkog modela. Ukoliko ispitani parametri (faktori) predstavljaju one koji najviše utječu na proces te ako su eksperimentalno dobiveni podaci dovoljno točni i precizni, matematičkim modelom, uz poznavanje vrijednosti parametara (faktora), možemo predvidjeti odziv.

Kako bi se mogle procijeniti vrijednosti koeficijenata u matematičkom modelu potreban je zadovoljavajući broj informacija (stupnjeva slobode). To znači da plan pokusa mora sadržavati bar jedan eksperiment za svaki član matematičkog modela. Plan pokusa za metodu odzivnih površina koji obuhvaća tri parametra (faktora) mora sadržavati barem 11 eksperimenata, međutim najčešće se primjenjuje 15 eksperimenata kako bi se s dodatnim eksperimentima preispitalo u kojoj mjeri dobiveni model opisuje proces, odnosno odstupa od dobivenih podataka. Da bi se sa što manje pokusa dobio što bolji matematički model predloženo je nekoliko vrsta planiranja pokusa koji imaju sličan pristup (Baş, Boyacı, 2007).

Planiranje pokusa može se podijeliti na tri glavne skupine: centralni kompozitni plan, kubični plošno centrirani plan i Box-Behnkenov plan pokusa. Prvi korak nakon što se prikupe podatci iz provedenih eksperimenata je odabir vrste modela koji će najbolje opisati odziv pri čemu to može biti jednostavni linearni, interaktivni ili kvadratni model. Model s više članova imat će uvijek bolje poklapanje, ali biti će složeniji. Poklapanje (odstupanje) određujemo pomoću R^2 koji predstavlja varijancu između eksperimentalnih podataka i onih dobivenih modelom. Ukoliko je R^2 veći od 95% model se smatra statistički značajnim. Iz dobivenog modela može se kvantificirati utjecaj pojedinih parametara i njihova interakcija (Lenth, 2009).

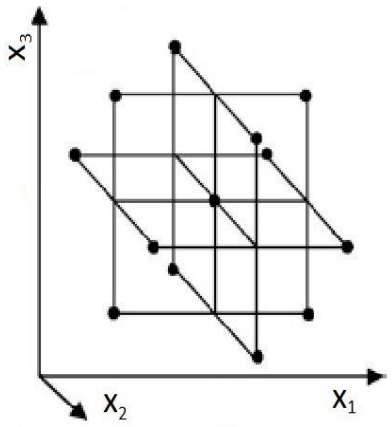
Pojam odzivna površina odnosi se na način prikazivanja ovisnosti odziva o parametrima (faktorima). Kad su u pitanju jednostavne linearne ovisnosti, površina odziva bila bi ravna ploha te bi takav odziv jednostavnije mogao biti prikazan grafom u dvije dimenzije. Metoda odzivnih površina daje trodimenzijski prikaz u kojem svaka os (x-, y- i z-os) predstavlja vrijednost jednog parametra (faktora) ili prikaz u obliku kontura (**Slika 2**).



Slika 2 Primjer trodimenzionalnog prikaza odzivne plohe

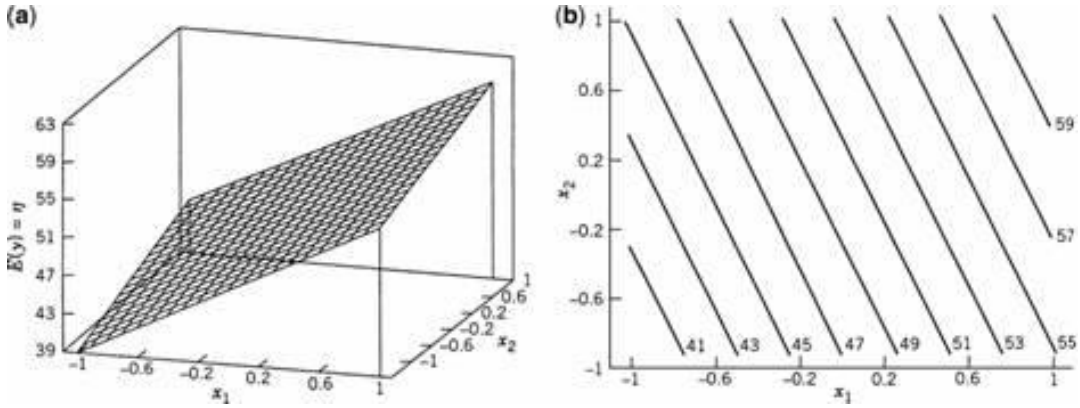
2.4.1. Box-Behnkenov plan pokusa

RSM dizajn nam omogućuje procijeniti interakcije, pa čak i kvadratne efekte, pri čemu nam daje predodžbu oblika promatranog odziva površine. Box-Behnkenov plan pokusa i centralno kompozitni planovi pokusa su učinkoviti modeli za dobivanje polinoma drugog stupnja, jer se koristi relativno mali broj varijabli za procjenu parametara. Svrha korištenja RSM je odrediti optimalni matematički model koji će najbolje opisati željeni eksperiment. Box-Behnkenov plan pokusa se obično koristi za dizajniranje modela za tri parametra (faktora) na tri razine (-1, 0, +1), (**Slika 3**) (Del Vecchio, 1997). Ovaj dizajn je učinkovit i efikasan zbog mogućnosti ispitivanja većeg broja varijabli i to od 3 do 10.

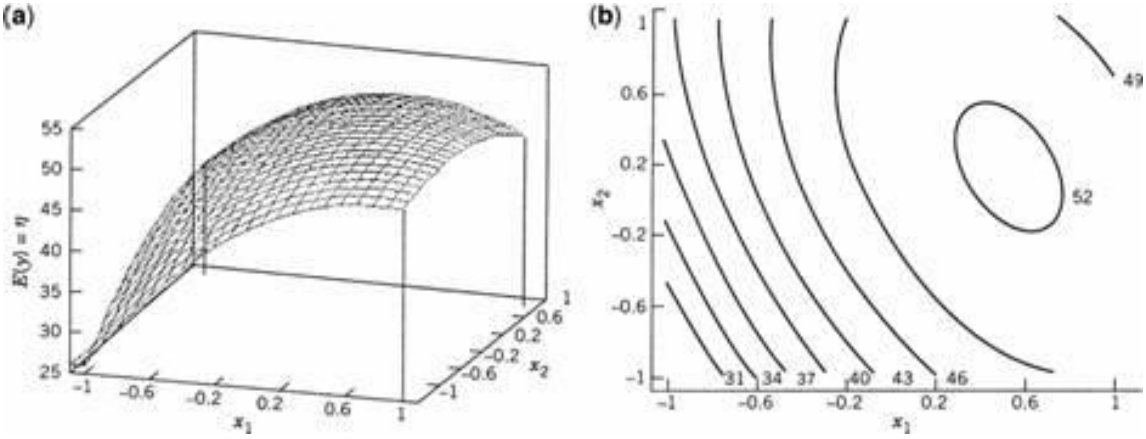


Slika 3 Box-Behnken plan pokusa (Bezzera i sur., 2008)

Kao rezultat metode dobiju se odzivi koji se mogu opisati grafički pomoću odzivne površine. Općenito grafički prikaz je moguće prikazati u dvije dimenzije, kao konturne površine (**Slika 4b i 5b**) ili tri dimenzije pomoću 3D dijagrama (**Slika 4a i 5a**).



Slika 4 (a) Primjer odzivne površine za modele prvog reda (3D); **(b)** Primjer odzivne površine prikazane konturnim dijagramom za modele prvog reda (2D) (Myers i sur., 2009)



Slika 5 (a) Primjer odzivne površine za modele drugog reda (3D); **(b)** Primjer odzivne površine prikazane konturnim dijagramom za modele drugog reda (2D) (Myers i sur., 2009)

Konturnim dijagramom prikazuju se konturne površine koje se crtaju u x_1 i x_2 ravnini pri čemu svaka od njih odgovara određenoj vrijednosti odziva, pa tako promjenom vrijednosti navedenih parametara x_1 i x_2 dobivaju se različiti oblici odzivnih površina. Vezu između odziva (Y) i nezavisnih varijabli (x_1 i x_2) opisuje se linearnom ili nelinearnom funkcijom koja može biti različitih oblika (sedlasta, sa lokalnim minimumom ili lokalnim maksimumom i sl.) (Cox i Reid, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga diplomskog rada realiziran je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale te na Katedri za prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku.

3.1. ZADATAK

Zadatak ovoga rada bio je:

- Ispitati utjecaj procesnih parametara hladnog prešanja na iskorištenje i kvalitetu orahovog ulja;
- Provesti ekstrakciju zaostalog ulja iz pogače pomoću superkritičnog CO_2 na novo konstruiranom uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima;
- Optimirati proces hladnog prešanja primjenom programa *Design Expert®, v.7,* metodom odzivnih površina na osnovu eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Jezgra oraha

U ovom diplomskom radu korišten je oljušteni orah porijeklom iz Slavonije, Bučje, 2013. godine prikazan na **Slici 6**. Dobiveno orahovo ulje proizvedeno je laboratorijskim postupkom hladnog prešanja, promjenom različitih procesnih parametara.



Slika 6 Jezgra oraha

3.2.2. Reagensi

U provedbi istraživanja korišteni su sljedeći reagensi i otapala:

- Petroleter (T_v = 40-60 °C);
- *n*-heksan (T_v = 40-60 °C);
- Kvarcni pijesak;
- 0,1 M vodena otopina natrijeva hidroksida;
- Neutralizirana smjesa etiletera i 96%-tnog etanola (1:1);
- 1%-tna otopina fenoftaleina u 96%-tnom etanolu;
- Smjesa ledene octene kiseline i kloroforma (3:2);
- Hladno zasićena otopina kalijeva jodida (14 g KI otopi se u 10 mL svježe prokuhane i ohlađene vode);
- Otopina natrijeva tiosulfata;
- 1%-tna otopina škroba;
- Destilirana voda;
- CO_2 čistoće 99,97% proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- Za određivanje tokoferola korišteni su sljedeći standardi:

  β-, *γ*- i *δ*-tokoferol proizvođača Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA);

  α-tokoferol proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka).

3.2.3. Uređaji

U provedbi istraživanja korišteni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga (Kern 572);
- Mlin (ANKE & KUNKEL, IKA labortechnik);
- Pužna preša (SPU 20, Senta, Srbija);
- Centrifuga (Sigma 2-16, Njemačka);
- Soxhlet aparatura;
- Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO_2 (Osijek, Hrvatska).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje udjela vlage u jezgri oraha

Za određivanje udjela vlage u jezgri oraha koristila se metoda AOAC 925.40 (2000), službena metoda za određivanje udjela vlage u orašastim plodovima i njihovim proizvodima. Princip metode sastoji se od praćenja količine isparene vlage u sušioniku pri temperaturi 95-100 ˚C do postizanja konstantne mase uzorka. Općenito, udio vlage se izražava u gramima isparene vode po 100 grama ispitivanog uzorka. Prije nego se započne sa metodom sušenja, potrebno je izabrati jednu od mogućih vrsta sušenja:

Sušenje na temperaturi od 103 ˚C (± 2 ˚C) u sušioniku pri atmosferskom tlaku – standardna metoda;

Sušenje na temperaturi 95-100 ˚C u sušioniku pri tlaku > 13,3 kPa;

Sušenje na temperaturi od 70 ˚C u sušioniku pri sniženom tlaku od približno 3 kPa (Economic and Social Council, 1999).

U ovom radu korištena je standardna metoda za određivanje vode u jezgri oraha. Provodilo se sušenje do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od 103±2 °C. U osušenu i izvaganu posudicu izvagano je 5 g neusitnjene jezgre oraha s točnošću 0,001 g. Posudica se s podignutim poklopcem stavila u sušionik, koji je prethodno zagrijan na 103±2 °C. Nakon 2 sata posudica se u sušioniku zatvorila poklopcem i stavila u eksikator hladiti. Kada se ohladila do sobne temperature, izvagala se i ponovno stavila s podignutim poklopcem u sušionik na 1 sat. Nakon toga opet se hladila i vagala. Sušenje se nastavljalo do konstantne mase. Kao rezultat uzela se srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Udio vode izrazio se u postocima prema izrazu (1):

$$udio\ vode = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je:

m_0 - masa prazne posudice (g);

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

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

3.3.2. Određivanje udjela ulja u jezgri oraha i pogači

Udio ulja u sjemenu uljarica jedan je od osnovnih parametara za procjenu njegove kvalitete. Za određivanje udjela ulja koriste se metode propisane nacionalnim ili međunarodnim

normama. Metode propisane normama su ekstrakcija ulja po Soxhletu ili Twisselmannu, a kao organsko otapalo se koristi heksan ili petroleter. Aparatura se sastoji od tikvice, ekstraktora i hladila. Na osušenu i izvaganu tikvicu stavlja se ekstraktor sa tuljkom u kojem je uzorak, doda se otapalo i stavi u hladilo te provodi kontinuirana ekstrakcija do iscrpljenja pripremljene uljarice. Vrijeme ekstrakcije je obično propisano metodom ili brojem prelijevanja ekstraktora. Po završetku ekstrakcije, otapalo se predestilira u istoj aparaturi, a zaostalo ulje u tikvici se važe i suši.

Tikvica po Soxhletu s nekoliko kuglica za vrenje mora se prethodno osušiti na temperaturi 100-102 °C jedan sat, a zatim se hladi u eksikatoru 30 minuta te se nakon toga važe na analitičkoj vagi. Uzorak oraha uzet je nakon izdvajanja nečistoća. U tuljak za ekstrakciju na analitičkoj vagi odvagano je 5 g samljevenog uzorka. Mljevenje je provedeno u mlinu. Uzorak je zatvoren vatom, stavljen u ekstraktor koji je spojen sa hladilom i tikvicom. S gornje strane hladila pomoću lijevka ulilo se oko 150 cm³ petroletera, odnosno toliko koliko je potrebno da se ekstraktor napuni i prelije u tikvicu. Dodano je još malo otapala tako da ukupna količina otapala ne prijeđe ¾ volumena tikvice. Zagrijavanje je provedeno na vodenoj kupelji, a temperatura podešena tako da kapljice otapala padaju takvom brzinom da se jedva mogu brojati ali da ne cure u neprekidnom mlazu. Kada je ekstraktor napunjen otapalom, koje u sebi sadrži ekstrahirano ulje, do gornjeg nivoa cijevi otapalo je preliveno u tikvicu. Ekstrakcija traje oko 4 sata. Radi provjere završetka ekstrakcije tijekom ekstrakcije pomoću staklenog štapića uzete su kap-dvije otapala iz ekstraktora i prenesene na filter papir. Ako na filter papiru ne zaostaje masna mrlja ekstrakcija je završena. Aparatura je skinuta s vodene kupelji, tuljak se izvadi pincetom te ponovo sastavi aparatura, otapalo se predestilira u ekstraktoru i prije nego što se otapalo prelije u tikvicu izliveno je iz ekstraktora. Zaostalo otapalo u tikvici otpari se na vodenoj kupelji, a zatim se tikvica sa uljem suši 1 sat u sušioniku na 105 °C, hladi i važe. Maseni udio ulja izračuna se prema formuli (2):

$$udio\ ulja = \frac{(a-b)}{c} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je:

a - masa tikvice sa uljem (g);

b - masa prazne tikvice (g);

c - masa ispitivanog uzorka (g).

3.3.3. Hladno prešanje

Iz jezgre oraha laboratorijskim postupkom hladnog prešanja proizvedeno je ulje. Korištena je kontinuirana pužna preša tipa SPU 20 (ElektroMotor-Šimon d.o.o., Senta, Srbija).

Pužna preša sastoji se od prihvatnog koša, u kojega se ubacivala jezgra oraha, komore za prešanje čija glava preše sadrži otvor za izlaz pogače. Navedeni otvor ima mogućnost podešavanja na različite promjere (6, 8, 9, 10 i 12 mm). Nadalje, preša se sastoji još od puža preše, te elektromotora koji ga pokreće. Kapacitet preše prema proizvođaču je 20-25 kg/h, što ovisi o vrsti materijala koji se preša, njegovom udjelu vlage i sl.

U ovom radu provodilo se 17 eksperimenata. Masa polazne sirovine iznosila je 0,5 kg. Tijekom provođenja eksperimenata mijenjali su se sljedeći parametri: temperatura zagrijavanja glave preše (70, 85 i 100 °C), frekevencija elektromotora (20, 30 i 40 Hz), te promjer otvora preše kroz koji je izlazila pogača (8, 10 i 12 mm). Sirovo ulje je skupljano u staklenke pri čemu se mjerio volumen i temperatura na izlazu iz preše i u staklenki, dok je pogača ostavljena da se suši tjedan dana na zraku. Dobiveno sirovo ulje sadržavalo je krute čestice, zbog čega je ostavljeno da se taloži, nakon čega je pročišćeno laboratorijskom centrifugom.

3.3.4. Određivanje parametara kvalitete orahovog ulja

Nakon postupka hladnog prešanja i proizvodnje orahovog ulja provelo se ispitivanje utjecaja procesnih parametara na iskorištenje i kvalitetu dobivenog ulja. Ispitivani parametri su bili sljedeći:

- Volumen i temperatura sirovog prešanog ulja;
- Peroksidni broj;
- Udio slobodnih masnih kiselina;
- Udio vlage u ulju;
- Udio netopljivih nečistoća u ulju;
- Određivanje anisidinskog broja;
- Određivanje totox broja;
- Udio ulja u pogači;
- Određivanje pojedinačnih tokoferola.

Određivanje volumena i temperature sirovog prešanog ulja

Volumen i temperatura sirovog prešanog orahovog ulja određivani su neposredno nakon prešanja jezgre pomoću menzure odnosno termometra. Nakon toga je sirovo orahovo ulje centrifugirano na laboratorijskoj centrifugi. Bistro ulje je odvojeno od taloga dekantiranjem te je izmjeren njegov volumen pomoću menzure.

Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj određuje se standardnom metodom prema zahtjevima norme HRN EN ISO 3960 (1998). Za određivanje Pbr-a se koristi jodometrijska metoda kojom se određuje količina joda kojeg iz kalij-jodida oslobode peroksidi prisutni u ulju. Rezultat se izražava u milimolima aktivnog kisika po kg ulja (mmol O_2/kg ulja).

Oko 1 g ulja odvagalo se u Erlenmayer-ovu tikvicu od 300 mL. Uzorak se otopio u 20 mL izooktana i 30 mL octene kiseline. Dodalo se 0,5 mL zasićene otopine kalij-jodida. Smjesa se miješala 1 min ± 1 s, razrijedila se sa 30 mL vode te se dodalo 0,5 mL 1%-tne otopine škroba i odmah titriralo s otopinom natrij-tiosulfata c ($Na_2S_2O_3$) = 0,01 mol/L.

Pbr se izračunavo prema jednadžbi:

$$peroksidni\ broj = \frac{(a-b)\cdot 5}{c} \quad (3)$$

gdje je:

a - mL 0,01 M $Na_2S_2O_3$ utrošeni za glavnu probu;

b - mL 0,01 M $Na_2S_2O_3$ utrošeni za slijepu probu;

c - masa uzorka (g).

Određivanje udjela slobodnih masnih kiselina

Slobodne masne kiseline određivane su prema standardnoj metodi AOCS 940.28 (1999). U suhu Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL odvagalo se 5 g uzorka ulja, zatim se dodalo 25 mL smjese etanola i etera koja se prethodno neutralizirala sa 0,1 M NaOH uz fenolftalein (smjesa eter-etanol prethodno se mora neutralizirati jer eter može reagirati kiselo, pa bi se jedan dio baze utrošio na neutralizaciju kiselina iz etera). Sadržaj se mućkao do potpunog otapanja masti. Zatim se dodalo 5 kapi fenolftaleina i titriralo 0,1 M NaOH do pojave ružičaste boje. Udio slobodnih masnih kiselina u ulju može se izraziti kao kiselinski broj i kao kiselinski stupanj, a prema Pravilniku o kvaliteti masti i ulja izražava se u postotcima oleinske kiseline (g OLAC/ 100 g masti ili ulja – 1 mL 1 M otopine alkalnih hidroksida odgovara 0,2823 g oleinske kiseline)

koji označava udio slobodnih masnih kiselina u ulju. Kiselinski broj (Kb) predstavlja broj mg KOH koji je potreban za neutralizaciju masnih kiselina u 1 g ulja ili masti, dok kiselinski stupanj označava broj mL 1 M otopine alkalnih hidroksida potrebnih za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u 100 g masti. Udio oleinske kiseline izračunao se prema sljedećem izrazu (4):

$$udio\ oleinske\ kiseline = \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0{,}282 \quad (4)$$

gdje je:

a - masa uzorka (g);

b – volumen (mL) 0,1 M NaOH.

Određivanje udjela netopljivih nečistoća u ulju

Netopljive nečistoće u ulju predstavljaju uglavnom mehaničke nečistoće koje mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci (dijelovi biljke uljarica). Također, u uljima i mastima mogu se naći razni ugljikohidrati, tvari s dušikom, smole, Ca-sapuni, oksidirane masne kiseline, laktoni masnih kiselina i slično. Za ove spojeve karakteristično je da se ne otapaju u organskim otapalima kao što se otapaju trigliceridi (ulja i masti).

Udio slobodnih masnih kiselina u uzorcima orahovog ulja određivan je prema standardnoj metodi ISO 663 (1992).Udio netopljivih nečistoća u ulju dobre kvalitete je često niži od 0,03%. U Erlenmayer tikvicu od 250 mL s brušenim grlom i čepom, izvagalo se 20 g uzorka sirovog ulja te se dodalo 100 mL otapala petroletera. Začepilo se i dobro promućkalo te se ostavilo da stoji pri 20 °C u trajanju 20-30 min. Dobivena otopina se filtrirala kroz stakleni filter lijevak sa sinteriranim dnom uz ispiranje taloga istim otapalom. Stakleni filter lijevak se ostavio nekoliko minuta na zraku kako bi otparilo organsko otapalo te se nakon toga stavio u sušionik na 103 °C. Nakon sušenja se hladio u eksikatoru i izvagao. Postupak se ponavljao do postizanja konstantne mase te računao prema izrazu (5):

$$udio\ netopljivih\ nečistoća = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je:

m_0 - masa uzorka (g);

m_1 - masa osušenog filter lijevka (g);

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

Određivanje anisidinskog broja (Abr)

Iz vrijednosti anisidinskog broja procijenjuje se održivost ulja, pri čemu veća vrijednost ukazuje na slabiju održivost ulja. Abr zapravo omogućava vrlo točnu procjenu količine ne hlapljivih karbonilnih spojeva (aldehida) koji nepovoljno utječu na oksidacijsku stabilnost ulja i njegova senzorska svojstva. Biljno ulje dobre kvalitete trebalo bi imati vrijednost Abr < 10. U radu je Abr određen standardnom metodom ISO 6885 (2006). Određivanje Abr temelji se na reakciji *p*-anisidina sa višim nezasićenim aldehidima (2,4-dienal i 2-enal) u kiselom mediju (octenoj kiselini), pri čemu nastaju Schiff-ove baze.

Određivanje totox broja (TB)

Anasidinski broj u kombinaciji s peroksidnim brojem daje dobar uvid u sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije te se iz njihovih podataka izračunava totox broj (TB) ili ukupna oksidacijska vrijednost (OV), prema standardnom metodi ISO 6885 (2006) i izrazu (6) (Hamilton i Russell, 1986):

$$TB = 2Pbr + Abr \quad (6)$$

Prema ovim podacima dobije se oksidacijska tzv. prošlost ulja, dok se prema Pbr dobije trenutno oksidacijsko stanje ulja, što se smatra vrlo korisnim kod analize kvalitete i kakvoće ulja.

Određivanje udjela vlage u ulju

Količina vlage i hlapljivih tvari je važan pokazatelj kvalitete sirovih, hladno prešanih, nerafiniranih i rafiniranih biljnih ulja. Zbog prisustva vlage u ulju, pri određenim uvjetima, može doći do hidrolitičkih promjena što rezultira porastom kiselosti ulja. Također može dovesti do zamućenja ulja što dovodi do smanjenja organoleptičke vrijednosti ulja. Udio vlage (vode) u ulju određivan je metodom AOCS 940.28 (1999).

Izvagano je 5 g uzorka za ispitivanje u prethodno osušenu, ohlađenu u eksikatoru i izvaganu staklenu posudicu sa poklopcem. Posudica sa uzorkom stavljena je u sušionik na sušenje 2 h pri 103 °C, te se ohladila u eksikatoru na sobnu temperaturu i izvagala. Postupak sušenja, hlađenja i vaganja ponavljao se sve dok gubitak mase između dva uzastopna mjerenja nije bio manji od 0,002 g. Udio vlage i isparljivih sastojaka ulja računao se prema već navedenom izrazu (1).

Određivanje udjela ulja u pogači

Početni sadržaj uzoraka orahovog ulja mjeren je automatskim sustavima za ekstrakciju po Soxhlet-u (Gerdhart) s *n*-heksanom. Uzorak jezgre oraha od 5 g ekstrahiran je sa 120 mL otapala, do potpunog iscrpljena prema HRN ISO 6492 (2001). Cijeli postupak je trajao 2 sata i 45 min, pri 180 °C. Mjerenje se obavljalo u dva ponavljanja. Udio ulja iz dobivene pogače je također određivano automatskim sustavom ekstrakcije po Soxhlet-u.

Udio ulja izračunao se prema izrazu (7):

$$udio\ ulja = \frac{(a-b)\cdot 100}{c}(\%) \quad (7)$$

gdje je:

a - masa tikvice sa uljem (g);

b - masa prazne tikvice (g);

c - masa ispitivanog uzorka (g).

Određivanje tokoferola

Priprema uzoraka ulja za određivanje tokoferola kromatografskom analizom provodila se saponifikacijom 0,5 g uzorka ulja sa 50 mL KOH, nakon čega je provedena ekstrakcija nesaponificiranih komponenti ekstrakcijom dietil eterom.

Za određivanje tokoferola koristio se je uređaj za plinsku kromatografiju Agilent 7890 A opremljen Agilent 5975 MSD-om. Za provedbu analize koristila se kolona HP-5MS (Agilent J&W 19091S-433) čije su dimenzije iznosile: 30 m x 0,250 mm x 0,25 µm. Temperatura injektiranog uzorka je bila 250 °C. Temperatura mobilne faze bila je 280 °C, dok je temperatura kolone bila postavljena na 200 °C 3 min, nakon čega se je povećavala svake minute za 8 °C, sve do 280 °C. Plin nosač bio je helij, a MSD parametri su bili: scan (45 to 450 amu), threshold 100 MS, quad 150 °C, MS source 250 °C. Volumen injektiranja iznosio je 1 µL. Komponente su se analizirale i identificirale pri čemu je korištena biblioteka masenih spektara NIST (Nacionalni Institut za standarde i tehnologiju, 2008). Kvantitativna analiza je provedena metodom kalibracijske krivulje sa citiranim standardima. Analiza svakog ekstrakta provedena je u dva ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine (Aladić, 2015).

3.4. OPTIMIRANJE PROCESA PREŠANJA ORAHOVOG ULJA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

Box-Behnken plan pokusa koji uključuje tri varijable i tri razine izabran je u ovom istraživanju (Bas i Boyacı, 2007). Odabrane varijable bile su veličina otvora glave pužne preše za izlaz pogače (8, 10, 12 mm), temperatura zagrijavanja glave preše (70, 85, 100 °C) te frekvencija elektromotora (20, 30, 40 Hz). Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištene u RSM dizajnu su dane u **Tablici 3**.

Tablica 3 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu

		Razina		
Nezavisne varijable	Oznaka	Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Temperatura (˚C)	X_1	70	85	100
Otvor pužne preše (mm)	X_2	8	10	12
Frekvencija (Hz)	X_3	20	30	40

Provedeno je sedamnaest eksperimenata hladnog prešanja orahovog ulja. Jednadžba polinoma drugog reda (8) koristila se za izražavanje ispitivanih odziva (Y) tj. odabranih parametara kvalitete ulja: udio ulja dobiven nakon centrifugiranja (mL), temperaturu ulja (°C) i udio zaostalog ulja u pogači (%). Navedeni parametri korišteni su kao funkcija kodirane nezavisne varijable, gdje su $X_1, X_2, ..., X_k$ *nezavisne varijable koje utječu na odzive Y;* β_0 *konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,* β_i *(i = 1, 2, ..., k),* β_{ii} *(i = 1, 2, ..., k) koeficijenti linearnog i kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma i* β_{ij} *(i = 1, 2, ..., k, j = 1 , 2, .., k) koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma te k koji predstavlja broj ispitivanih varijabli:*

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

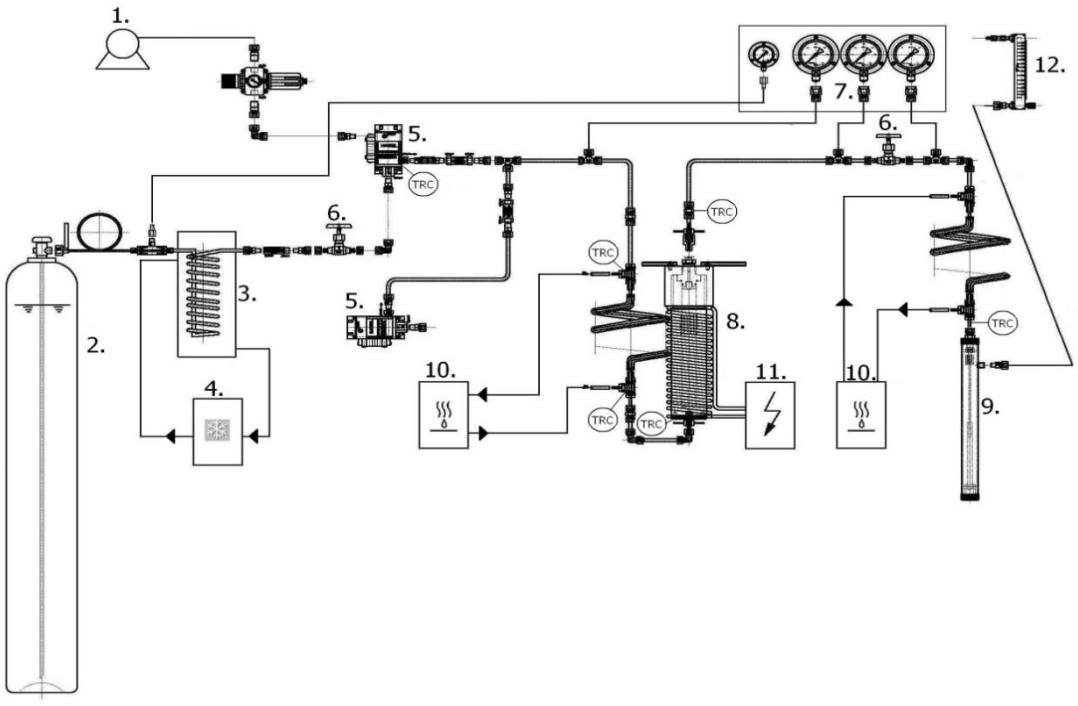
Statistička analiza provedena je pomoću RSM softverskog paketa *Design Expert*®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Rezultati su statistički testirani analizom varijance (ANOVA) na razini značajnosti od $p = 0{,}05$. Prihvatljivost modela procijenjena je koeficijentom determinacije (R^2) i modelom *p*-vrijednosti. Matematički modeli su uspostavljeni tako da opisuju utjecaj jednog parametra i/ili interakciju na više procesnih parametara na svakom ispitivanom odzivu.

Odzivne površine su dobivene mijenjanjem dvaju procesnih parametara, dok su ostali bili konstantni.

3.5. EKSTRAKCIJA ZAOSTALOG ULJA IZ POGAČE POMOĆU SUPERKRITIČNOG CO_2

Ekstrakcija zaostalog ulja iz pogače dobivene pri optimalnim uvjetima prešanja provedena je na novo projektiranom i izrađenom uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima (Moslavac i sur., 2014; Aladić, 2015). Procesna shema uređaja za ekstrakciju supekritičnim CO_2 prikazana je na **Slici 7**.

Princip ekstrakcije sastojao se od sljedećih koraka: uljna pogača od 100 g je stavljena u ekstraktor. Tijekom procesa ekstrakt je sakupljan u prethodno izvaganu staklenu kivetu. Količina ekstrakta prikupljena u određenim vremenskim intervalima određena je pomoću laboratorijske vage sa preciznošću od ±0,0001 g. Ekstrakcija se provodila pri sljedećim procesnim uvjetima: tlak od 30 MPa na temperaturi od 40 °C i pri masenom protoku CO_2 od 1,73 kg/h. U separatoru se odvijao proces separacije ili razdvajanja CO_2 i ekstrakta pri tlaku od 1,5 MPa i temperaturi 25 °C.



Slika 7 Procesna shema uređaja za ekstrakciju superkritičnim CO_2

(1. Kompresor; 2. CO_2 spremnik; 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIRANJE PROCESA PREŠANJA ORAHOVOG ULJA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

U eksperimentalnom dijelu rada prije procesa hladnog prešanja određen je udio ulja i vlage u jezgri oraha. Parametri poput udjela ulja i vlage u plodovima oraha vrlo su važni zbog daljnjeg ispitivanja iskorištenja i kvalitete ulja. Udio vlage određen je prema izrazu (1) prema standardnoj metodi u dva ponavljanja prilikom čega je dobivena srednja vrijednost od 6,43%, dok je udio ulja, odnosno srednja vrijednost dva ponavljanja, dobiven prema izrazu (2), iznosio 63,28±0,23%. Nakon ispitivanja karakteristika jezgre oraha uslijedila je operacija hladnog prešanja oraha na pužnoj preši. Orahovo ulje je dobiveno promjenom različitih procesnih parametara prešanja i prema Box-Behnken planu pokusa prikazanom u **Tablici 4**.

Kao što je vidljivo u **Tablici 4** praćeni su sljedeći parametri: veličina otvora glave preše za izaz pogače (8, 10, 12 mm), temperature zagrijavanja glave preše (70, 85, 100 °C) i frekvencija elektromotora (20, 30, 40 Hz) na volumen dobivenog sirovog ulja (mL), volumen sirovog ulja nakon centrifugiranja (mL), temperaturu sirovog ulja (˚C), peroksidni broj ($mmolO_2/kg$), udio ulja u zaostaloj pogači (%). U svih sedamnaest eksperimenata utvrđen je vrlo mali udio vlage u dobivenome finalnom ulju. Srednja vrijednost dobivenih rezultata za udio vlage iznosila je 0,43±0,09%.

U **Tablici 5** dani su koeficijenti aproksimirani jednadžbom polinoma drugog reda za najvažnije odzive (volumen ulja nakon centrifugiranja, temperatura ulja i zaostalog ulja u pogači). Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisnih i nezavisnih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora. Kako bi se izbjegle poteškoće tijekom prešanja, za bolje potiskivanje pogače, te kako bi se povećala učinkovitost procesa glava preše za izlaz pogače je zagrijavana na temperaturu između 70 i 100 °C. Vrijednost zaostalog ulja u pogači kretala se u rasponu 7,95-17,57%, ovisno o primjenjenim procesnim parametrima. Koeficijenti u **Tablici 5** se odnose na kodirane varijable. Temperatura glave preše (X_2) ima statistički značajan utjecaj (p<0,05) na volumen dobivenog ulja, temperaturu ulja, te na količinu ulja zaostalog u pogači. Veličina otvora preše (X_1) i frekvencija okretaja pužnice (X_3) imaju statistički značajan utjecaj na količinu zaostalog ulja u pogači, dok istovremeno frekvencija okretaja ima utjecaj i na volumen dobivenog ulja.

Tablica 4 Eksperimentalna matrica i srednje vrijednosti promatranih odziva

Br. eksperimenta	Veličina otvora pužne preše (mm)	Temperatura zagrijavanja glave preše (°C)	Frekvencija elektromotora (Hz)	Masa dobivene pogače (g)	Volumen sirovog ulja (mL)	Volumen ulja nakon centrifugiranja (mL)	Temperatura ulja (°C)	Udio ulja u pogači (%)
1	12	85	40	212,70	320	270	53	17,57
2	8	100	30	181,10	360	280	56	8,52
3	10	70	20	161,10	380	260	41	8,73
4	12	70	30	176,80	360	260	50	15,56
5	10	85	30	193,90	350	275	50	14,44
6	8	70	30	188,40	370	295	45	9,78
7	10	85	30	201,70	340	275	53	14,09
8	12	100	30	191,26	330	255	55	12,31
9	10	85	30	203,90	330	265	52	13,01
10	10	85	30	200,10	340	270	51	14,23
11	10	85	30	201,30	340	280	54	12,71
12	12	85	20	204,10	330	290	45	10,43
13	10	70	40	268,20	265	215	43	10,95
14	8	85	40	196,10	350	275	52	12,91
15	10	100	40	181,90	370	275	58	11,58
16	8	85	20	184,60	360	285	53	7,95
17	10	100	20	185,90	360	305	57	9,05

Tablica 5 Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda

Naziv	Koeficijent[a]	Udio sirovog ulja	Temperatura ulja	Udio ulja u pogači
Odsječak			52,00*	13,70*
	β_0	273,00*		
X_1	β_1	-16,25*	-0,37	2,09*
X_2	β_2	10,63	5,88*	-0,44
X_3	β_3	-21,88*	1,25	2,11*
X_1^2	β_{11}	16,62	0,25	-0,0008
X_2^2	β_{22}	-17,12	-0,75	-2,15*
X_3^2	β_{33}	7,87	-1,50	-1,47
X_1X_2	β_{12}	2,50	-1,50	-0,50
X_1X_3	β_{13}	15,00	2,25	0,54
X_2X_3	β_{23}	3,75	-0,25	0,077

[a] $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$

X_1 – veličina otvora; X_2 – temperatura prešanja; X_3 – frekvencija

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

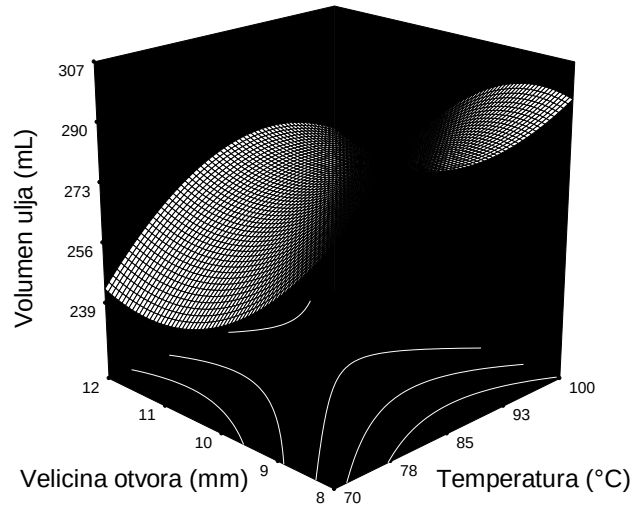
Analiza varijance (ANOVA), na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela, prikazana je u **Tablici 6**. Stupanj i smjer slaganja varijabli procjenjuje se pomoću koeficijenta korelacije. Koeficijent korelacije R^2 je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1 (Pejić, 2010; Knezović, 2014). Joglekar i May (1987) naveli su da za dobar model vrijednost koeficijenta korelacije treba biti najmanje 0,80. U našem istraživanju, vrijednost R^2 za promatrane odzive je bila veća od 0,80 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima. **Tablica 6** pokazuje statistički test modela (F-test i test vjerojatnosti) iskorištenja i kvalitete ulja. Vjerojatnost (*p*-vrijednost) svih regresijskih modela je bila ispod 0,05, što ukazuje na to da je statistički značajna veza između nezavisnih varijabli i odzivnih varijabli. ANOVA je pokazala da su modeli prihvatljivi i mogu se koristiti za optimizaciju procesnih parametara.

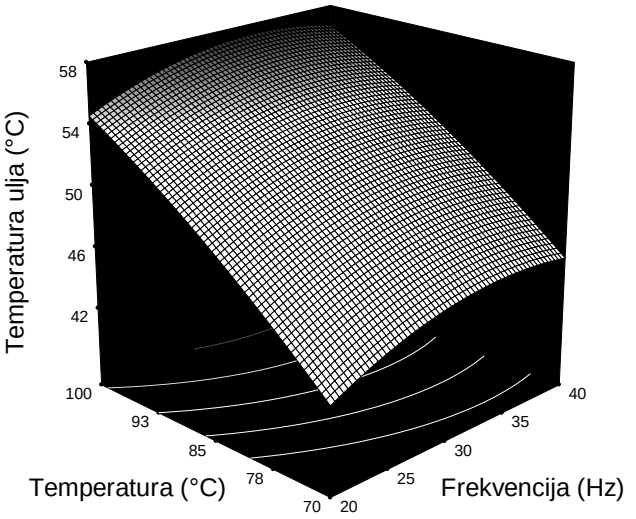
Tablica 6 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva

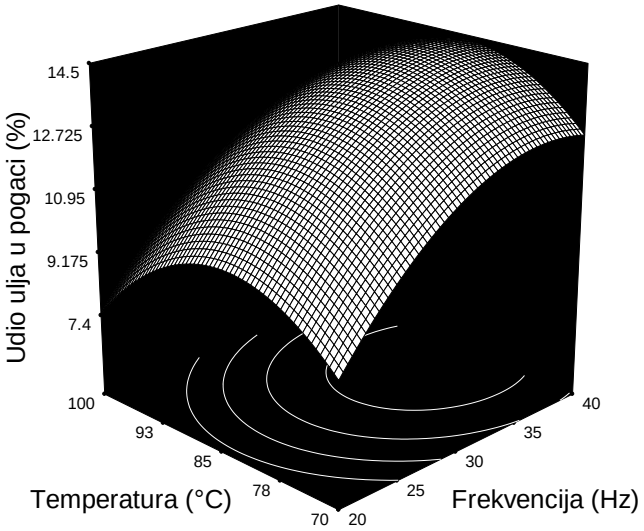
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja (SS)	Stupnjevi slobode (n-1)	Varijanca -MS	F-vrijednost	Prob>F (p<0,05)
Volumen sirovog ulja					
Model	10364,49	9	1151,61	3,71	0,0490
Ostatak	2173,75	7	310,54		
Nedostatak modela	2043,75	3	681,25	20,96	0,0566
Pogreška	130,00	4	32,50		
Ukupno	12538,24	16			
Temperatura ulja					
Model	331,69	9	36,85	4,67	0,0272
Ostatak	55,25	7	7,89		
Nedostatak modela	45,25	3	15,08	6,03	0,0576
Pogreška	10,00	4	2,50		
Ukupno	386,94	16			
Udio ulja u pogači					
Model	104,37	9	11,60	5,94	0,0141
Ostatak	13,65	7	1,95		
Nedostatak modela	11,22	3	3,74	6,14	0,0560
Pogreška	2,44	4	0,61		
Ukupno	118,02	16			

Najbolji način da se prikaže utjecaj procesa hladnog prešanja na iskorištenje i kvalitetu ulja unutar ispitivanog područja jesu odzivne površine odnosno 3D dijagrami (**Slika 8**). Na **Slici 8** prikazano je da količina dobivenog ulja značajno raste s porastom temperature zagrijavanja glave preše sve do 85 °C dok daljnje povišenje temperature ne utječe statistički značajno na volumen dobivenog ulja. Veća veličina otvora glave pužne preše za izlaz pogače rezultira nižom količinom dobivenog ulja. Nadalje, može se vidjeti da temperatura zagrijavanja glave pužne preše ima značajan utjecaj na temperaturu samog ulja. Temperatura zagrijavanja glave preše ima dvostruko značajan učinak na količinu zaostalog ulja u pogači: u intervalu od 70-85 °C količina zaostalog ulja u pogači povećava se s temperaturom, dok se daljnjim povećanjem temperature smanjuje. Količina zaostalog ulja u pogači povećava se povećanjem frekvencije elektromotora od 20 do 40 Hz i sa povećanjem otvora pužne preše.

Primjenom funkcionalne metode (eng. *desirability function method*) (Cojoracu i sur., 2009), optimalni uvjeti prešanja pri kojima je dobivena najveća količina i najbolja kvaliteta ulja su kako slijedi: temperatura zagrijavanja glave preše od 70 °C, frekvencija elektromotora 20 Hz i veličina otvora preše za izlaz pogače od 8 mm. Pri tim uvjetima izračunate su optimalne vrijednosti parametara: volumen sirovog ulja od 288,9 mL, temperatura ulja 42,7 °C i udio zaostalog ulja u pogači od 7,95% što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima (izmjereni volumen ulja 284 mL, temperatura 44 °C i udio zaostalog ulja u pogači 7,81%).







Slika 8 Trodimenzionalni dijagrami ispitivanih odzivnih površina u ovisnosti o procesnim parametrima prešanja

Na uzorku orahovog ulja dobivenom pri optimalnim uvjetima prešanja određeni su parametri kvalitete ulja i prikazani u **Tablici 7**.

Tablica 7 Fizikalno-kemijska svojstva orahovog ulja

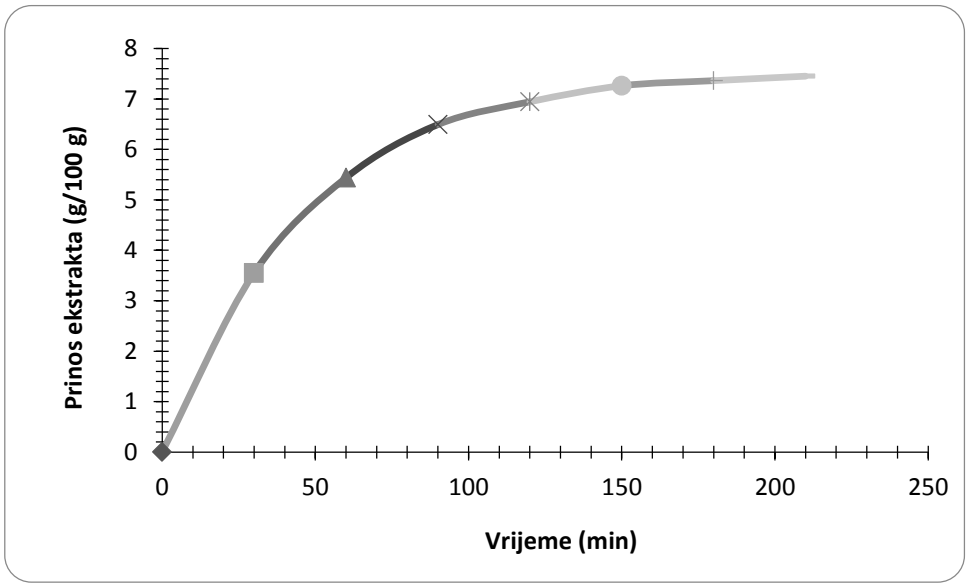
Svojstva	**Udio**
Jodni broj (g I2/100 g ulja)	161,79
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	193,00
Peroksidni broj (mmol O_2/kg ulja)	0,46
Slobodne masne kiseline (%)	0,23
Netopljive nečistoće (%)	0,34
Udio vlage (%)	0,11
***p*-Anisidinski broj**	0,08
Totox broj	1,02

Primarni produkti razgradnje ulja su hidroperoksidi koji se izražavaju peroksidnim brojem (Pbr). Što je manja vrijednost peroksidnog broja to je bolja kvaliteta ulja (Frankel, 2005). Vrijednost Pbr prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima za hladno prešana i nerafinirana ulja ne smije biti veći od 7 mmol O_2/kg ulja. Također je vrlo važno da hladno prešano ulje ima nizak udio vlage i slobodnih masnih kiselina kako bi se održala kvaliteta i vijek trajanja ulja (Teh i Birch, 2013). Prisutnost vode u ulju dovodi do hidrolitičke razgradnje triacilglicerola tijekom procesa

prerade, što dovodi do nastanka slobodnih masnih kiselina i glicerola. Osim toga kvalitetno ulje mora imati vrijednost *p*-anisidinskog broja manju od dva i vrijednost totox broja manju od četiri (Frankel, 2005). Dobiveno orahovo ulje pri optimalnim uvjetima prešanja sadržavalo je nisku vrijednost peroksidnog broja, slobodnih masnih kiselina, netopivih nečistoća, udjela vlage kao i nizak *p*-anisidinski i totox broj, što su pokazatelji vrlo visoke kvalitete dobivenog orahovog ulja.

4.2. EKSTRAKCIJA OSTATKA ULJA IZ POGAČE SUPERKRITIČNIM CO_2

Zaostalo ulje iz uljne pogače dobiveno pri optimalnim uvjetima prešanja (temperaturi zagrijavanja glave preše od 70 °C, frekvenciji od 20 Hz i veličini otvora preše za izaz pogače od 8 mm) ekstrahirano je pomoću superkritičnog CO_2 pri čemu je dobivena krivulja ekstrakcije prikazana na **Slici 6**.



Slika 9 Ekstrakcija zaostalog ulja iz pogače superkritičnim CO_2

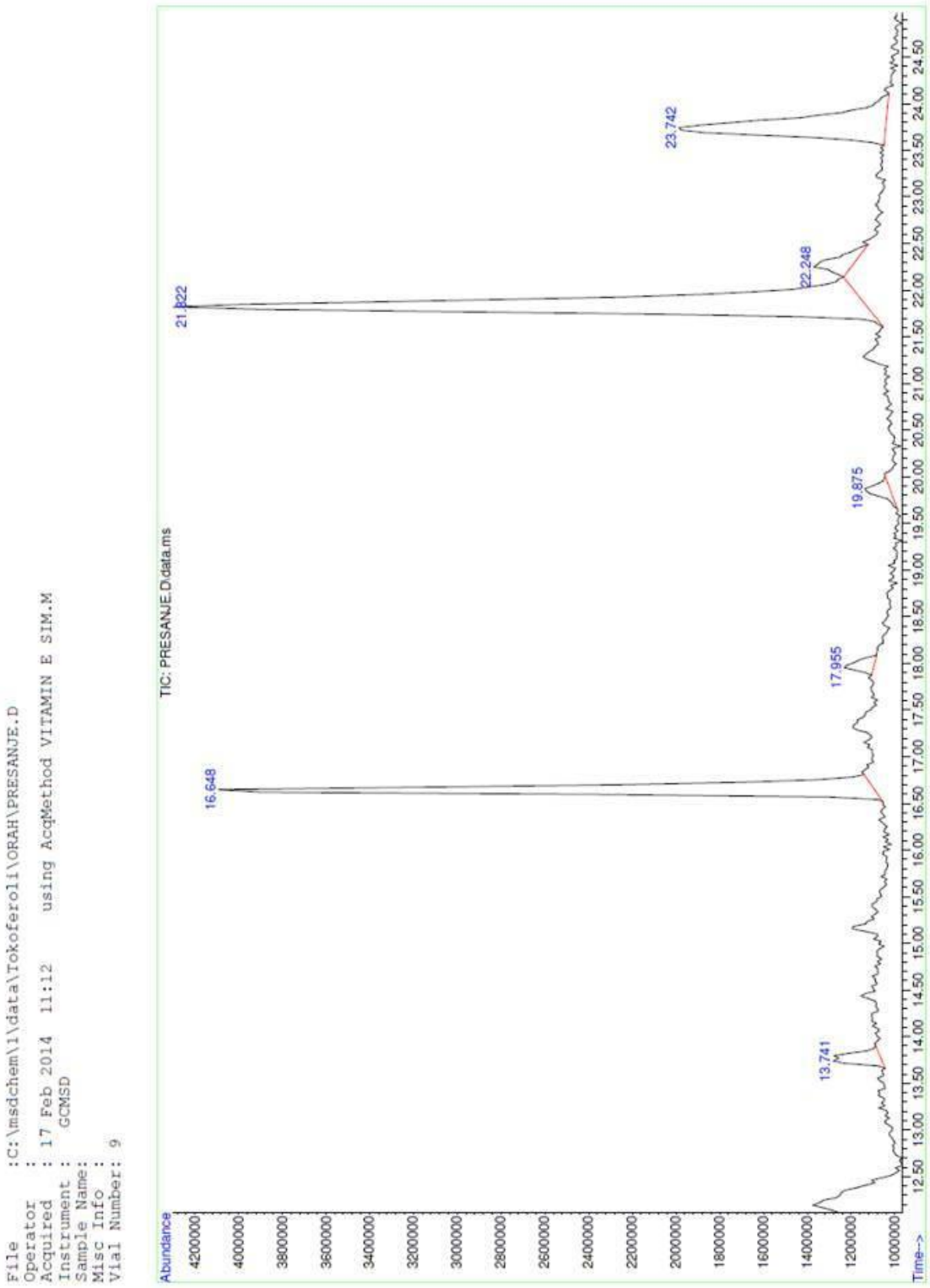
Količina zaostalog ulja u pogači određena prema standardnoj metodi po Soxhlet-u u pogači dobivenoj pri optimalnim uvjetima prešanja iznosila je 7,81%. Prema **Slici 9** možemo vidjeti da je tijekom 210 min trajanja procesa ekstrakcije supekritičnim CO_2 ekstrahirana gotovo sva količina ulja iz pogače. Slični rezultati dobiveni su u prethodnim istraživanjima (Moslavac i sur., 2014) u kojima su autori analizirali ekstrakciju zaostalog ulja iz pogače sjemenki *Camelina sativa*.

Iz prikazane krivulje ekstrakcije vidimo da je ona slična krivuljama ekstrakcije drugih jestivih ulja koje su dobivene ekstrakcijom pomoću superkritičnim fluidima i da je proces ekstrakcije

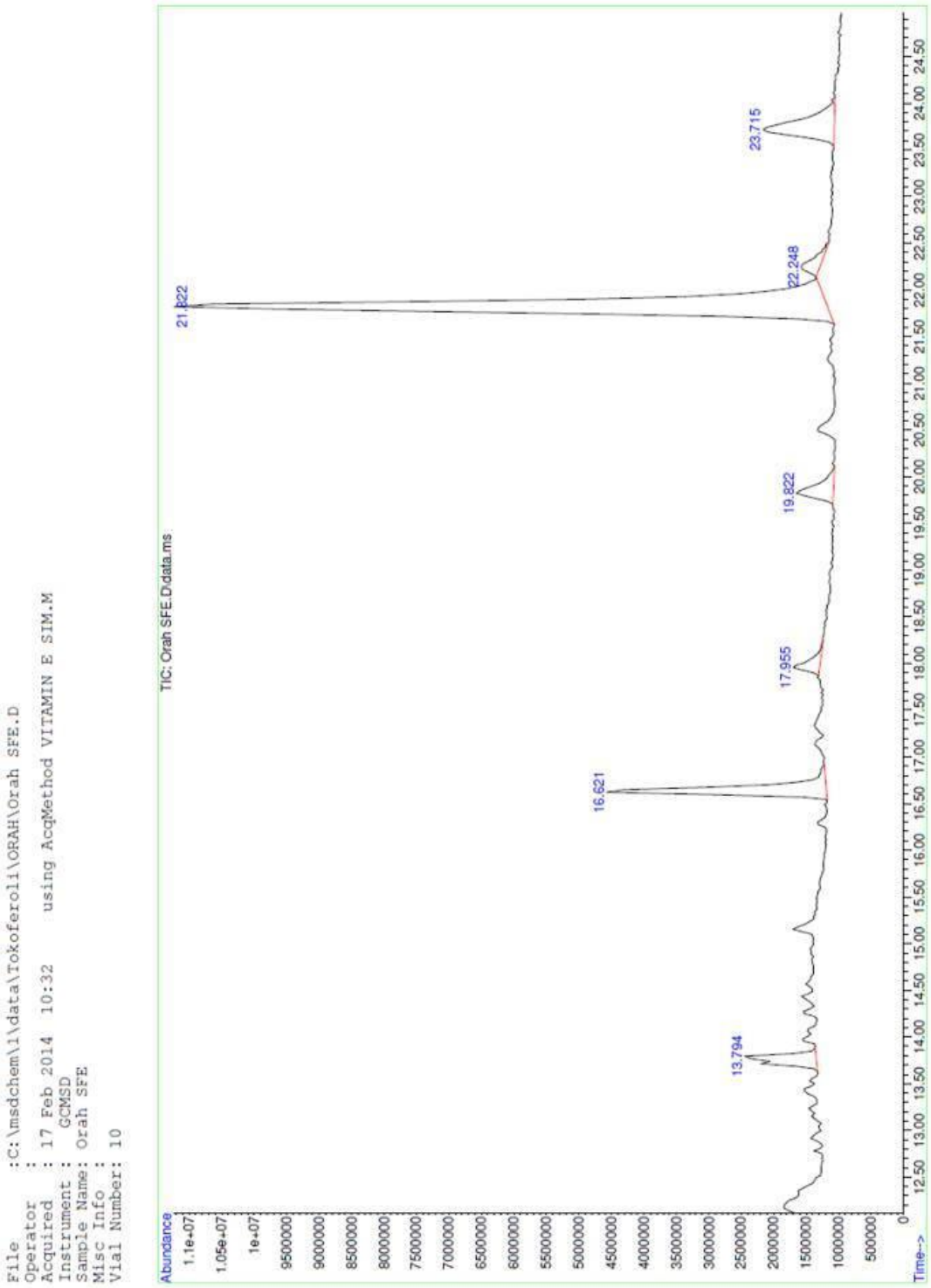
podijeljen u tri perioda: brzi period ekstrakcije, prijelazni period ekstrakcije (pad brzine ekstrakcije) i period difuzije (razdoblje spore ekstrakcije) (Sovova, 1994).

4.3. SADRŽAJ TOKOFEROLA U ORAHOVOM ULJU

Orahovo ulje dobiveno iz pogače ekstrakcijom superkritičnim CO_2 sadržavalo je sličan sastav tokoferola kao i ulje dobiveno prešanjem. Izmjerena količina tokoferola u ulju dobivenom prešanjem iznosila je 463,71 mg/L, dok je ulje dobiveno iz pogače pomoću superkritičnog CO_2 sadržavalo 498,05 mg/L tokoferola. Najzastupljeniji tokoferol je bio *γ*-tokoferol, njegova vrijednost u ulju dobivenom prešanjem iznosila je 322,83 mg/L te u ulju dobivenom ekstrakcijom superkritičnim CO_2 309,32 mg/L. Također orahovo ulje je sadržavalo i α-tokoferol (140,88 mg/L u ulju dobivenom prešanjem, 188,73 mg/L u ulju dobivenim pomoću superkritičnog CO_2), dok druga dva tokoferola *β*- i *δ*- nisu detektirana. Sadržaj *γ*-tokoferola u orahovom ulju dobivenom pomoću obje metode je sličan onome kojega navode Savage i sur. (1999), Laverdine i sur. (1999) i Oliviera i sur. (2002), dok je udio α-tokoferola značajno veći. Primjeri kromatograma za određivanje sadržaja tokoferola za ulje dobiveno prešanjem i ulje dobiveno ekstrakcijom supekritičnim CO_2 prikazani su na **Slici 10** i **Slici 11**.



Slika 10 Primjer kromatograma određivanja sadržaja tokoferola u ulju dobivenom prešanjem



Slika 11 Primjer kromatograma određivanja sadržaja tokoferola u ulju dobivenom SFE

5. ZAKLJUČCI

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

1. Ispitivana jezgra oraha sadržavala je 63,28% ulja i 6,43% vlage;
2. Procesni uvjeti hladnog prešanja (temperatura zagrijavanja glave preše, frekvencija elektromotora i veličina otvora glave pužne preše za izlaz pogače) značajno utječu na iskorištenje i kvalitetu ulja;
3. Dobiveno hladno prešano orahovo ulje ima visoku kvalitetu jer sadrži malu količinu vlage i netopljivih nečistoća, slobodnih masnih kiselina te nisku vrijednost peroksidnog broja;
4. Box-Behnkenova metoda odzivnih površina pokazala se učinkovitom metodom u modeliranju i optimiranju ispitivanih procesnih uvjeta uz relativno mali broj pokusa;
5. Optimalni uvjeti prešanja pri kojim je dobiveno najveće iskorištenje ulja i najbolja kvaliteta ulja određeni metodom odzivnih površina su sljedeći: temperatura zagrijavanja glave preše 70 °C, veličina otvora glave pužne preše 8 mm i frekvencija elektromotora 20 Hz;
6. Orasi su izvrstan izvor tokoferola. Određivanjem sadržaja tokoferola u orahovom ulju utvrđeno je da je najzastupljeniji *γ*-tokoferol, nakon kojeg slijedi *α*-tokoferol, što ukazuje na značajan antioksidacijski potencijal orahovog ulja;
7. Korištenjem suvremene metode ekstrakcije superkritičnim CO_2 moguće je potpuno ekstrahirati zaostalo ulje iz pogače nakon procesa prešanja što je iznimno važno u industrijskoj proizvodnji ulja, jer se time postiže gotovo potpuno iskorištenje polazne sirovine i ostvaruju se minimalni gubitci u proizvodnom procesu;
8. Značenje predloženog istraživanja ogleda se u proizvodnji visokokvalitetnog hladno prešanog ulja, maksimalnom iskorištenju ulja iz nusproizvoda i u dobivanju odmašćene pogače koja se dalje može koristi u druge svrhe. Time je proces proizvodnje hrane zaokružen i ne stvara se velika količina organskog otpada koji danas predstavlja ogroman ekološki i financijski teret u gotovo svim granama prehrambene industrije.

6. LITERATURA

Abbas KA, Mohamed A, Abdulamir AS, Abas HA: A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4:345-353, 2008.

Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa* L.) ulja supekritičnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, 2015.

AOAC: Official Methods of Analysis, seventeenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA, 2000.

AOAC: Official Methods of Analysis, sixteenth ed. AOAC International, Gaithersburg, 1999.

Baş D, Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering,* 78: 836-845, 2007.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliviera EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76: 965-977, 2008.

Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering,* 67: 21–33, 2005.

Cojocaru C, Khayet M, Zakrzewska-Trznadel G, Jaworska A: Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach, *Journal of Hazardous Materials,* 167: 52–63, 2009.

Cox DR, Reid N: The theory of the design of experiments, Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, 2000.

Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W: Study of the main constituents of some authentic walnut oils, *Journal of Agrricultural and Food Chemistry,* 53: 4853–4860, 2005.

del Valle JM, de la Fuente JC: Supercritical CO_2 extraction of oilseeds: Review of kinetic and equilibrium models, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 46: 131-160, 2006.

Del Vecchio RJ: *Understanding Design of Experiments*, Carl Hanser Verlag, Munich, 1997.

Dimić E, Premović TĐ, Takači AA, Vujasinović VB, Radočaj OF, Dimić SB: Uticaj kvaliteta semena na oksidativnu stabilnost hladno presovanog ulja suncokreta, *Hemijska Industrija,* 69: 175–184, 2015.

Dimić E: *Hladno ceđena ulja*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2005.

Frankel EN: *Lipid Oxidation*, 2nd ed. The Oily Press, Bridgwater, Velika Britanija, 2005.

Hamilton RS, Rossell JB: Analysis of oils and fats. *Elsevier Applied Science*, London, 1986.

HRN ISO 6492: *Animal feeding stuffs - Determination of fat content* (ISO 6492:1999), 2001.

ISO 3960: Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value, 1998.

ISO 663: Animal and vegetable fats and oils - Determination of insoluble impurities content., 1992.

ISO 6885: Animal and vegetable fats and oils - Determination of anisidine value, 2006.

Joglekar AM, May AT: Product excellence through design of experiments, *Cereal Foods World,* 32: 857–868, 1987.

Jokić S, Nagy B, Velić D, Bucić-Kojić A, Bilić M: Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkritičnim CO_2 - pregledni rad, *Croatian Journal of Food Science Technology*, 2: 39-54, 2011.

Josifović M, Malinar A, Bićanić V, Bayer V, Rako B: Orah. U *Poljoprivrednoj enciklopediji*, str. 407-410. Jugoslavenski leksikografski zavod, „Mladinska knjiga“, Zagreb, 1970.

Knezović Z: *Biometrika*, Sveučilišni udžbenik, Mostar, 2014.

Korać M: Orah (sorte, kalemljenje, podizanje i nega zasada). Nolit, Beograd, 1987.

Lavedrine F, Zmirou D, Ravel A, Balducci F, Alary J: Blood cholesterol and walnut consumption: A cross-sectional survey in France, *Preventive Medicine-Journal-Elsevies,* 28: 333–339, 1999.

Lenth RV: Response-Surface Methods in R, Using RSM, *Journal of Statistical Software*, 32: 1-17, 2009.

Martínez ML, Mattea MA, Maestri DM: Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil, *Journal of Food Engineering,* 88: 399–404, 2008.

Martínez ML, Mattea MA, Maestri DM: Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes, *Journal of American Oil Chemists' Society,* 83: 791–796, 2006.

Miljković , I : *Suvremeno voćarstvo*. Znanje, Zagreb, 1991.

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*. Narodne novine 46/07, 84/08, 55/11, 2010.

Moslavac T, Jokić S, Šubarić D, Aladić K, Vukoja J, Prce N: Pressing and supercritical CO_2 extraction of *Camelina sativa* oil, *Industrial Crops and Products,* 54: 122-129, 2014.

Mrvnar M: Superkritične tekočine. *Seminarski rad*. Fakultet za matematičko in fiziko, Ljubljana, 2012.

Myers RH, Montgomery DC, Anderson – Cook CM: Response surface methodology: Process and Product Optimisation Using Designed Experiments, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.

Nikolovski, B.: Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (Juniperus communis L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom. *Doktorski rad*. Novi Sad, 2009.

Oliveira ELG, Silvestre AJD, Silva CM: Review of kinetic models for supercritical fluid extraction, *Chemical Engineering Research and Design,* 89: 1104–1117, 2011.

Oliveira R, Rodrigues MF, Bernardo-Gil MG: Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil, *Journal of American Oil Chemists' Society,* 79: 225–230, 2002.

Pansuriya RC, Singhal RS: Superkritična fluidna ekstrakcija lovastatina dobivenog fermentacijom na čvrstoj podlozi od pšeničnih mekinja. *Food Technology and Biotechnology*, 47 (2): 159-165, 2009.

Pejić M: Utjecaj uvjeta sušenja i ekstrakcije na sadržaj fenolnih tvari u ekstraktima ploda divlje ruže (*Rosa canina* L.). *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

Podhorshi V: Eterična ulja. U *Tehnička enciklopedija*, str. 362-363. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1976.

Rac M: Ulja i masti (sirovine, kemija i tehnologija jestivih ulja i masti). *Privredni pregled*. Beograd, 1964.

Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, Omar AKM: Application of supercritical CO_2 in lipid extraction - A review, *Journal of Food Engineering*, 95: 240–253, 2009.

Salgın S, Salgın U: Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil, *European Journal of Lipid Science and Technology,* 108: 577–582, 2006.

Savage GP, Dutta PC, McNeil DL: Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils, *Journal of American Oil Chemists' Society,* 76: 1059–1063, 1999.

Sovilj, M: Critical review of supercritical carbon dioxide extraction of selected oil seeds, *Acta Periodica Technologica,* 41: 1-203, 2010.

Sovová H: Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO_2 – I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science,* 49: 409–414, 1994.

Teh SS, Birch J: Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils, *Journal of Food Composition and Anaysis,* 30: 26–31, 2013.

Temelli F: Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils, *The Journal of Supercritical Fluids,* 47: 583–590, 2009.

Vujasinović VB: Uticaj termičke obrade na nutritivnu vrednost i oksidativnu stabilnost ulja semena uljane tikve golice *Cucurbita pepo* L. *Doktorski rad*. Novi Sad, 2011.

Wakao N, Kaguei S: Heat and Mass transfer in Packed Beds. *Gordon and Breach*, New York, str. 156, 1982.

7. PRILOZI

Optimization of walnut oil production

Stela Jokić[1*], T. Moslavac[1], Andreja Bošnjak[1], K. Aladić[2], Marina Rajić[3], M. Bilić[1]

[1]*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhaca 20, 31000 Osijek, Croatia*
[2]*Croatian Veterinary Institute, Branch - Veterinary InstituteVinkovci, Josipa Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Croatia*
[3]*Vextra d.o.o., Dr. Ante Starčevića 38, Mostar, Bosnia and Herzegovina*

original scientific paper

Summary

Walnut is recognized worldwide as a functional health food. In the walnut oil production it is very important to find an appropriate method to recover the oil from seeds. Walnut oil in this study was obtained by pressing the seeds followed by extraction with supercritical CO_2. The effects of pressing temperature (70, 85, 100 °C), frequency (20, 30, 40 Hz) and nozzle size (8, 10, 12 mm) in pressing experiments on oil recovery and oil temperature were monitored. The optimal calculated pressing condition within the experimental range of the variables studied was determined. In obtained walnut oil the following parameters were analyzed: peroxide value, free fatty acids, insoluble impurities, moisture content, iodine value, saponification value, *p*-anisidine value and Totox value. The residual oil from pressed cake obtained at optimal conditions was extracted with CO_2 with a goal to extract tocopherols residue from walnut after applied screw press process. Content of tocopherols in walnut oil obtained by pressing and oil extracted by supercritical CO_2 were compared.

Keywords: walnut oil, screw pressing, supercritical CO_2 extraction, oil quality, tocopherols, optimization

Introduction

Walnut seeds are a good source of nutrients, particularly proteins and essential fatty acids. They contain high level of oil (52-70 %) with excellent fatty acid balance (Crews et al., 2005). Their major constituents are triglycerides, in which monounsaturated (mainly oleic acid) and polyunsaturated fatty acids are present in high amounts. Regarding the antioxidant potential, nuts are an excellent source of tocopherols and polyphenols (Crews et al., 2005; Martínez et al., 2006).

The amount and quality of extracted walnut oil are crucial for determining feasibility of commercial production. Recently, there has been interest in the use of continuous, mechanical screw presses to recover oil from oilseeds, but screw pressing will not extensively replace solvent extraction in commodity oilseeds. The main reason is lower proportion of collected oil. Benefits of screw pressing is providing a simple and reliable method of processing small batches of seed (Martínez et al., 2008). Conventional solvent extraction produces low-quality oil that requires extensive purification operations while screw pressing does not require the use of organic solvent and is able to retain bioactive compounds such as essential fatty acids, phenolics, flavonoids and tocopherols in the oils (Teh and Birch, 2013).

Oil extraction using supercritical fluids is an alternative method to replace conventional industrial process such as pressing and solvent extraction as it offers a number of advantages, including the absence of solvent residue and better retention of aromatic compounds (Salgın and Salgın, 2006; Martínez et al., 2008; Sovilj, 2010). Supercritical fluids provide high solubility and improved mass transfer rates and process can be manipulated by changing the main process parameters. Carbon dioxide (CO_2) as an environmentally-friendly solvent is mainly used as the extraction agent in supercritical fluid extraction. Extracts obtained using CO_2 as the extraction solvent are solvent-free / without any trace of toxic extraction solvents, and are thereby highly valued (Brunner, 2005; Martínez et al., 2008; Sahena et al., 2009; Temelli, 2009).

Supercritical fluid extraction is still relatively new and is not widely used on the commercial scale for the extraction of edible oils mainly due to very high investment costs for equipment. But when considering industrial application, it is essential to provide research on the fundamentals of the supercritical processes, and according to that the aim of this work was to optimize the extraction process of walnut oil using screw pressing and employing supercritical CO_2 to recover the residual oil from pressed cake.

*Corresponding author: stela.jokic@ptfos.hr

Material and methods

Material

Walnut samples were collected during the 2013 from Slavonian area (Croatia). Moisture content of the walnuts (6.43 % ± 0.09 %) was determined according to AOAC Official Method 925.40 (2000). The walnut oil was obtained by pressing of 0.5 kg of walnuts per each experiment using different process conditions. The pressing were performed in a screw expeller SPU 20 (Senta, Serbia). After pressing, the volume of screw pressed oils and their temperature were measured and after that the oil was centrifuged. The sedimented solids were recovered and solid percentage of the oils was calculated by weight difference.
The purity of CO_2 used for extraction was 99.97 % (w/w) (Messer, Osijek, Croatia). α-, β-, γ- and δ-Tocopherols were purchased from Supelco (Bellefonte, USA) and Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Potassium hydroxide was supplied by Kemika (Zagreb, Croatia).

Organic solvent extraction

The initial oil content in walnut samples was measured by automatic extraction systems Soxterm by Gerdhart with *n*-hexane. 5 g of ground walnut samples was extracted with 120 mL solvent, until totally depleted according to HRN ISO 6492 (2001). The whole process took 2 h and 45 min, at 180 °C. The measurement was done in duplicate. The average of the initial oil content for two replicates was 63.28 ± 0.23 %. Cake residual oil was also determined by automatic extraction systems Soxterm.

Oil quality parameters

Free fatty acids, iodine value and saponification value were determined according to AOAC Official Methods 940.28, 920.185 and 920.160 (1999). Peroxide value (PV) of oil samples was determined according to ISO 3960 (1998) and was expressed as mmol O_2/kg of oil. Insoluble impurities were determined according to ISO 663 (1992). *p*-Anisidine value (AV) was determined according to ISO 6885 (2006). Totox value was calculated as 2PV+AV (Hamilton and Rossell, 1986). All these determinations were carried out in triplicate.

Analysis of tocopherols

Preparation of samples for GC-MS analysis has been provided by saponification 0.5 g of sample in 50 ml of potassium hydroxide, and then by extraction unsaponifiable components using diethyl ether as extraction solvent.
For analysis of tocopherols Agilent 7890 A GC equipped with Agilent 5975 MSD has been used. For this analysis GC-MS was fitted with HP-5MS (Agilent J&W 19091S-433) column (30m x 0.25 mm ID, 0.25 μm). The temperature of injection port was 250 °C, splitless injection. The temperature of transfer line was 280 °C. The initial oven temperature was set at 200 °C for 3 min, and then programmed as 8 °C/min to 280 °C. The carrier gas was He. MS conditions were: scan (45 to 450 amu), threshold 100 MS quad 150 °C, MS source 250 °C. Injected sample volume was 1μl. The identification of components was carried out based on computer matching with NIST 2008 MS library. For qualitative analysis, based on retention times, Supelco (USA) and Dr. Ehrenstorfer (Germany) standard components were used. Quantitative analysis has been provided based on calibration curves. For preparation of calibration curves standard compounds *α*-tocopherol (Dr. Ehrenstorfer Cat No. 1792430), *β*-tocopherol (Supelco Cat No. 46401-U), *γ*-tocopherol (Supelco Cat No. 47785) and *δ*-tocopherol (Supelco Cat No. 47784) were used. Standard compounds were dissolved in *n*-hexane to prepare six different concentration of each standard compound. R^2 for each calibration curve was 0.999. All analyses were performed in triplicate.

Experimental design

Box-Behnken design which includes three variables and three factorial levels was chosen in this study (Bas and Boyacı, 2007). The ranges for the variables, namely nozzle size (8, 10, 12 mm), temperature (70, 85, 100 °C) and frequency (20, 30, 40 Hz) were selected to approximate the optimal conditions for screw pressing of walnut oil. Coded and uncoded levels of the independent variables and the experimental design are given in Table 1. Coded value 0 stands for centre point of the variables and repeated for experimental error. Factorial points are coded as ±1.

Table 1. The uncoded and coded levels of independent variables used in the RSM design

Independent variable	Symbol	Level		
		Low (-1)	Middle (0)	High (+1)
Nozzle (mm)	X_1	8	10	12
Temperature (°C)	X_2	70	85	100
Frequency (Hz)	X_3	20	30	40

Second-order polynomial equation was used to express the investigated responses (*Y*) after pressing, namely the volume of screw press oil after centrifugation (ml), oil temperature (°C) and residual oil in pressed cake (%) as a function of the coded independent variables, where X_1, X_2, …, X_k are the independent variables affecting the responses *Y*'s; β_0, β_j (i= 1, 2,..., k), β_{ii} (i= 1, 2,..., k), and β_{ij} (i= 1, 2,..., k; j=1, 2,.. , k) are regression coefficients for intercept, linear, quadratic, and interaction terms, respectively; k is the number of variables.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Statistical analysis was performed using RSM software Design-Expert®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). The results were statistically tested by the analysis of variance (ANOVA) at the significance level of p=0.05. The adequacy of the model was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and model p-value. Mathematical models were established to describe the influence of single process parameter and/or interaction of multiple parameters on each investigated response. Response surface plots were generated with the same software and drawn by using the function of two factors, and keeping the other constant.

Supercritical CO_2 extraction

The experiment was performed in supercritical fluid extraction system explained in detail elsewhere (Moslavac et al., 2014) with some new modifications that are manifesting on the reduction in the number of valves and installation of heat exchangers for the separator. The new process scheme for supercritical extraction system is given in Fig. 1.

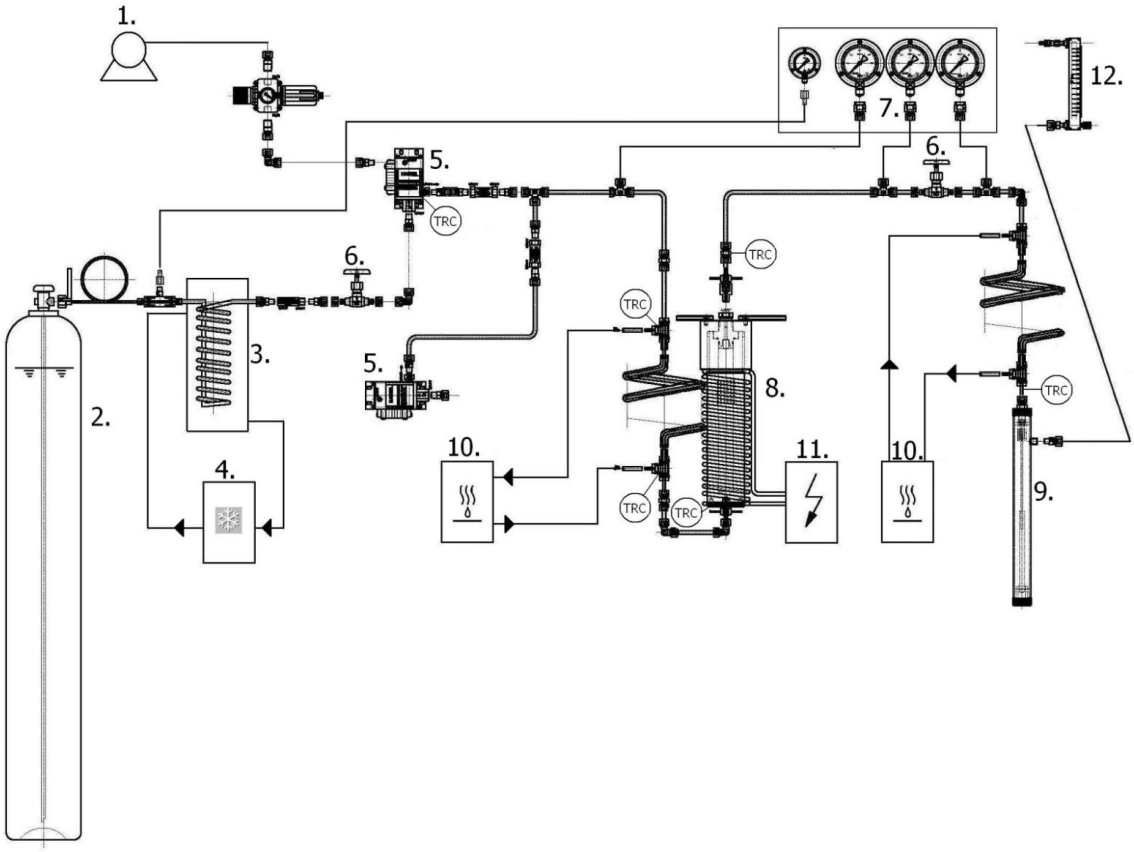


Fig. 1. Experimental set-up of supercritical fluid extraction system
1. Compressor; 2. CO_2 Tank; 3. Stainless steel coil; 4. Cooling bath; 5. Air driven fluid pump Haskel MS-71; 6. Valves (B-HV); 7. Manometers; 8. Extraction vessel; 9. Separator vessel; 10. Water bath; 11. Centralized system glass fiber heater; 12. Flow meter

The pressed cake of 100 g was placed into an extractor vessel. The extracts were collected in previously weighed glass tubes. The amount of extract obtained at regular intervals of time was established by weight using a balance with a precision of ±0.0001 g. Extraction was performed at the following conditions: pressure of 30 MPa, temperature of 40 °C and a CO_2 mass flow rate of 1.73 kg/h. Separator conditions were 1.5 MPa and 25 °C.

Results and discussion

Optimization of screw pressing of walnut seeds

The oil from walnut seeds were obtained by screw pressing using different process parameters. Effects of temperature, nozzle size and frequency on recovery and temperature of walnut oil were studied by RSM and experiments were performed according to the Box-Behnken design (Table 2).

Table 2. Experimental matrix and values of the observed response

Run	Nozzle (mm)	Temperature (°C)	Frequency (Hz)	Pressed cake amount (g)	Screw pressed oil (ml)	Oil volume after centrifugation (ml)	Oil temperature (°C)	Cake residual oil (% of total)
1	12	85	40	212.70	320	270	53	17.57
2	8	100	30	181.10	360	280	56	8.52
3	10	70	20	161.10	380	260	41	8.73
4	12	70	30	176.80	360	260	50	15.56
5	10	85	30	193.90	350	275	50	14.44
6	8	70	30	188.40	370	295	45	9.78
7	10	85	30	201.70	340	275	53	14.09
8	12	100	30	191.26	330	255	55	12.31
9	10	85	30	203.90	330	265	52	13.01
10	10	85	30	200.10	340	270	51	14.23
11	10	85	30	201.30	340	280	54	12.71
12	12	85	20	204.10	330	290	45	10.43
13	10	70	40	268.20	265	215	43	10.95
14	8	85	40	196.10	350	275	52	12.91
15	10	100	40	181.90	370	275	58	11.58
16	8	85	20	184.60	360	285	53	7.95
17	10	100	20	185.90	360	305	57	9.05

In Table 3 is given the estimated coefficients of the second order polynomial equation for the most important responses (volume of screw press oil after centrifugation, oil temperature and residual oil in pressed cake). In order to avoid difficulties in the beginning of pressing experiments with the used screw expeller and to increase efficiency, the head of the screw press was preheated to a temperature between 70 and 100 °C. The pressing conditions had influence also on the amount of residual oil in press cake. The value of residual oil in press cake was in the range from 7.95 to 17.57 % depending on applied pressing parameters. In Table 3 it can be seen which process parameter had statistically significant effect on investigated responses. The nozzle size (X_1) and frequency (X_3) had significant effects ($p<0.05$) on the volume of obtained oil and on the amount of cake residual oil. The temperature of screw press head (X_2) had significant effect on temperature of screw press oil. The regression coefficients (related to coded variables) are obtained by fitting experimental data to the second order models for investigated responses.

The ANOVA results for modeled responses are reported in Table 4. Joglekar and May (1987) suggested that for a good fit of a model, R^2 should be at least 0.80. In our study, the R^2 values for these response variables were higher than 0.80, indicating the adequacy of the applied regression models. Table 4 shows the test statistics for the model (*F*-test and probability) of oil recovery and oil temperature. The probability (*p*-value) of all regression models was below 0.05, which means that there was a statistically significant multiple regression relationship between the independent variables and the response variable. The lack of fit, which measures the fitness of the model, resulted in no significant *F*-value ($p>0.05$) in terms of the response variables studied, indicating that the model was sufficiently accurate for predicting the response variations. The ANOVA showed that the models were acceptable and could be used for optimization the pressing parameters with respect to oil recovery and oil temperature.

Table 3. Estimated coefficient of the second order polynomial equation

Term	Coefficient[a]	Oil volume	Oil temperature	Cake residual oil
Intercept	β_0	273.00*	52.00*	13.70*
X_1	β_1	-16.25*	-0.37	2.09*
X_2	β_2	10.63	5.88*	-0.44
X_3	β_3	-21.88*	1.25	2.11*
X_1^2	β_{11}	16.62	0.25	-0.0008
X_2^2	β_{22}	-17.12	-0.75	-2.15*
X_3^2	β_{33}	7.87	-1.50	-1.47
X_1X_2	β_{12}	2.50	-1.50	-0.50
X_1X_3	β_{13}	15.00	2.25	0.54
X_2X_3	β_{23}	3.75	-0.25	0.077

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

X_1: nozzle size; X_2: temperature; X_3: frequency

*Significant at $p \leq 0.05$

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of the modeled responses

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	*F*-value	*p*-value
Oil volume					
The recovery					
Model	10364.49	9	1151.61	3.71	0.0490
Residual	2173.75	7	310.54		
Lack of fit	2043.75	3	681.25	20.96	0.0566
Pure error	130.00	4	32.50		
Total	12538.24	16			
Oil temperature					
The recovery					
Model	331.69	9	36.85	4.67	0.0272
Residual	55.25	7	7.89		
Lack of fit	45.25	3	15.08	6.03	0.0576
Pure error	10.00	4	2.50		
Total	386.94	16			
Cake residual oil					
The recovery					
Model	104.37	9	11.60	5.94	0.0141
Residual	13.65	7	1.95		
Lack of fit	11.22	3	3.74	6.14	0.0560
Pure error	2.44	4	0.61		
Total	118.02	16			

Fig. 2 show three-dimensional plots for obtained responses as a function of investigated variables in screw pressing experiments. It can be seen that the amount of obtained oil significantly increased with the increase of temperature up to about 85 °C while further increase in temperature did not cause a significant change in oil volume. Larger nozzle diameter results with a lower amount of the obtained oil. Furthermore, it can be seen that the oil temperature is significantly influenced by used temperature for heating the output press head. The amount of residual oil in cake increased with increasing frequency from 20 to 40 Hz and with increasing nozzle diameter. Pressing temperature had double effect on the amount of residual cake oil: from 70 to 85 °C the amount of residual press cake oil increased with temperature while further increase of temperature show decrease in amount of residual oil.

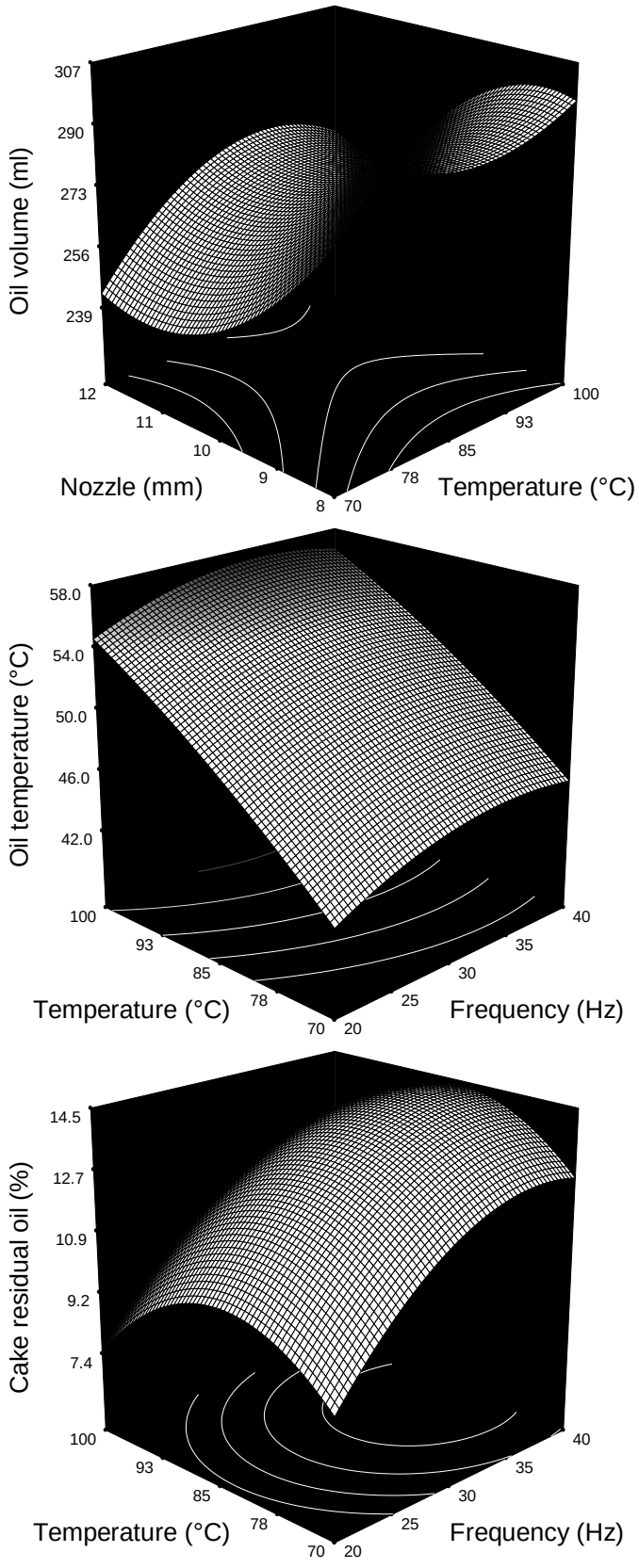


Fig. 2. Three-dimensional plots for obtained responses as a function of investigated variables

By applying desirability function method (Cojocaru et al., 2009) the calculated optimal screw pressing conditions for production of walnut oil were as follows: temperature of 70 °C, frequency of 20 Hz and nozzle of ID 8 mm. At this conditions oil volume was calculated to be 288.9 ml, oil temperature 42.7 °C and cake residual oil 7.95 %, which is in very close agreement with experimental obtained data (measured oil volume 284 ml, oil temperature 44 °C and cake residual oil 7.81 %).

In obtained walnut oil at this optimal screw pressing conditions the quality parameters were determined and listed in Table 5.

Table 5. Physicochemical properties of walnut oil

Properties	Value
Iodine value (g I_2/100 g of oil)	161.79
Saponification value (mg KOH/g of oil)	193.00
Peroxide value (mmol O_2/kg of oil)	0.46
Free fatty acids (%)	0.23
Insoluble impurities (%)	0.34
Moisture content (%)	0.11
p-Anisidine value	0.08
Totox value	1.02

Primary oxidation processes in oil mainly form hydroperoxides, which are measured by the peroxide value. The lower the peroxide value, the better the quality of the oil (Frankel, 2005). It is also very important that cold pressed oils are low in moisture content and free fatty acids to maintain the quality and shelf life of the oils (Teh and Birch, 2013). Good quality oil should have *p*-anisidine value of less than two, and Totox value less than four (Frankel, 2005). In obtained walnut oil at optimal pressing conditions in this study, low values of peroxide number, free fatty acids, insoluble impurities, moisture content and *p*-anisidine value show that obtained walnut oil are of very good quality. Free fatty acids and iodine value was very similar than that reported by Patraş and Dorobanţu (2010).

Extraction of residual oil from pressed cake with supercritical CO_2

The cake resulting from pressing at optimal conditions (temperature of 70 °C, frequency of 20 Hz and nozzle ID 8 mm) was extracted with supercritical CO_2 and the obtained kinetic curve for this experiment is shown in Fig. 3.

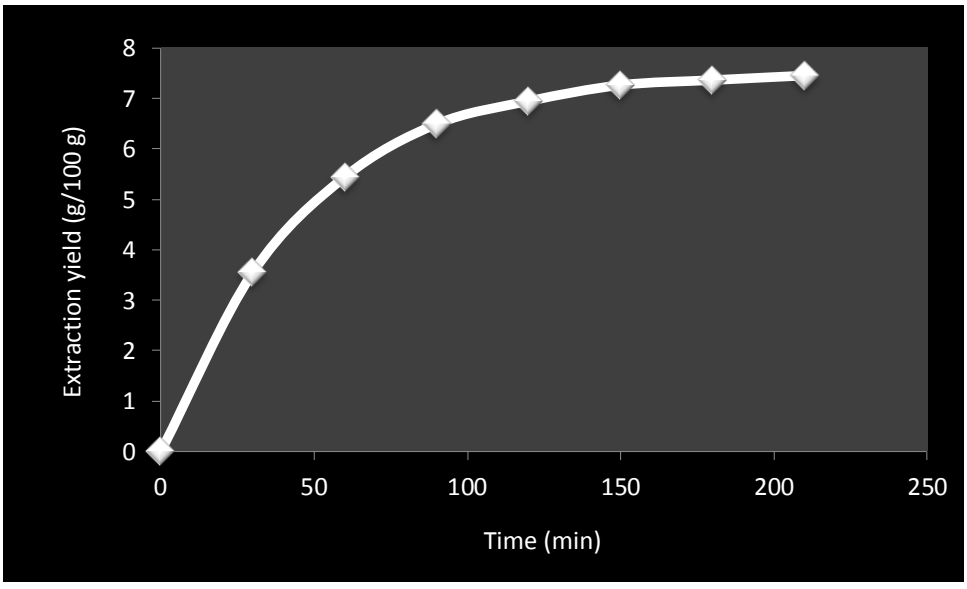


Fig. 3. Extraction of cake residual oil with supercritical CO_2

The amount of residual oil in press cake at optimal conditions was 7.81 % (obtained by Soxhlet extraction). From Fig. 3 it can be seen that after 210 min of extraction almost all residual oil in the pressed cake was extracted by supercritical CO_2. The similar results were obtained in our previous study (Moslavac et al., 2014) where authors investigate the possibility to recover the residual oil from pressed cake obtained after pressing *Camelina sativa* seeds. The shape of obtained extraction curve is the same like in other edible oils obtained by supercritical fluids where the three periods of extraction: rapid extraction period, transition period and slow extraction period are visible.

Tocopherol content of walnut oil

Walnut oil obtained by supercritical CO_2 from pressed cake has tocopherol content similar to those extracted by screw pressing. Measured total tocopherol content was 463.71 mg/l in screw pressed oil and 498.05 mg/l in oil obtained from press cake by supercritical CO_2. The most frequent form of tocopherol was γ-tocopherol (322.83 mg/l in screw pressed oil and 309.32 mg/l in oil extracted by supercritical CO_2) followed by α-tocopherol (140.88 mg/l in screw pressed oil and 188.73 mg/l in oil extracted by supercritical CO_2). Other two tocopherols (*β*- and *δ*-) were not detected. Content of γ-tocopherols in both oil are similar to those found by Savage et al. (1999), Lavedrine et al. (1999) and Oliviera et al. (2002), while amount of α-tocopherols were significantly greater.

Conclusions

This study show that supercritical CO_2 extraction, as a relatively new separation technique, could be used as a very efficient process in recovering the residual walnut oil from pressed cake. When screw press was preheated to the temperature of 70 °C, and applying frequency of 20 Hz and using nozzle of ID 8 mm, the good oil recovery and oil quality were obtained. Regarding the antioxidant potential, walnuts are an excellent source of tocopherols where γ-tocopherol followed by α-tocopherol are dominant.

Acknowledgements

This work has been fully supported by Croatian Science Foundation under the project 1321.

References

AOAC (2000): Official Methods of Analysis, 17th ed, no 925.40. Association of Official Analytical Chemists, Washington.

AOAC (1999): Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Bas, D., Boyacı, I.H. (2007): Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *J. Food Eng.* 78, 836-845.

Brunner, G. (2005): Supercritical fluids: technology and application to food processing, *J. Food Eng.* 67, 21-33.

Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W. (2005): Study of the main constituents of some authentic walnut oils, *J. Agr. Food Chem.* 53, 4853-4860.

Cojocaru, C., Khayet, M., Zakrzewska-Trznadel, G., Jaworska, A. (2009): Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach, *J. Hazard. Mater.* 167, 52-63.

Frankel, E.N. (2005): Lipid Oxidation, 2nd ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Hamilton, R.S., Rossell, J.B. (1986): Analysis of oils and fats. Elsevier Applied Science, London, UK.

HRN ISO 6492 (2001): Animal feeding stuffs - Determination of fat content (ISO 6492:1999)

ISO 663 (1992): Animal and vegetable fats and oils - Determination of insoluble impurities content.

ISO 6885 (2006): Animal and vegetable fats and oils - Determination of anisidine value.

ISO 3960 (1998): Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value.

Joglekar, A.M., May, A.T. (1987): Product excellence through design of experiments, *Cereal Food. World* 32, 857-868.

Lavedrine, F., Zmirou, D., Ravel, A., Balducci, F., Alary, J. (1999): Blood cholesterol and walnut consumption: A cross-sectional survey in France, *Prev. Med.* 28, 333-339.

Martínez, M.L., Mattea, M.A., Maestri, D.M. (2006): Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 791-796.

Martínez, M.L., Mattea, M.A., Maestri, D.M. (2008): Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil, *J. Food Eng.* 88, 399-404.

Moslavac, T., Jokić, S., Šubarić, D., Aladić, K., Vukoja, J., Prce, N. (2014): Pressing and supercritical CO_2 extraction of *Camelina sativa* oil, *Ind. Crop. Prod.* 54, 122-129.

Oliveira, R., Rodrigues, M.F., Bernardo-Gil, M.G. (2002): Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 225-230.

Patraş, A., Dorobanţu, P. (2010): Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia L*) biotypes from Moldavia, Lucrări Ştiinţifice, 53, 57-60.

Salgın, S., Salgın, U. (2006): Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 577-582.

Sovilj, M. (2010): Critical review of supercritical carbon dioxide extraction of selected oil seeds, *APTEFF*. 41, 1-203.

Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2009): Application of supercritical CO_2 in lipid extraction - A review, *J. Food Eng.* 95, 240-253.

Savage, G.P., Dutta, P.C., McNeil, D.L. (1999): Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1059-1063.

Teh, S.S., Birch, J. (2013): Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils, *J. Food Compos. Anal.* 30, 26-31.

Temelli, F. (2009): Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils, *J. Supercrit. Fluid.* 47, 583-590.

Received: March 23, 2014
Accepted: June 16, 2014