

# Utjecaj dodatka antioksidanasa na održivost makovog ulja

---

**Karimović, Marina**

**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:109:403884>

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

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

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Marina Karimović**

**UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANASA NA ODRŽIVOST MAKOVOG  
ULJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za prehrambene tehnologije  
Katedra za prehrambeno inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnologija ulja i masti  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. lipnja 2015.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac

### UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANASA NA ODRŽIVOST MAKOVOG ULJA

*Marina Karimović, 218 - DI*

#### Sažetak:

*Papaver somniferum L.* (mak) je bogat nezasićenim masnim kiselinama od kojih se najviše ističu oleinska i linolna masna kiselina. Konzumacijom maka smanjuje se mogućnost različitih oboljenja na organizam čovjeka kao što su reguliranje krvnog tlaka i grušanje krvi, liječenje upalnih procesa, usporavanje pojave raka. U ovom radu ispitivana je oksidacijska stabilnost hladno prešanog makovog ulja, sa i bez dodanih antioksidanasa i sinergista. Primjenom Oven testa utvrđen je utjecaj dodataka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost makovog ulja. Antioksidansi korišteni u ovom istraživanju su ekstrakt ružmarina (OxyLess®.CS) (0,1 i 0,2%), ekstrakt zelenog čaja (0,1 i 0,2%), ekstrakt nara (0,1 i 0,2%), eterično ulje rtanjskog čaja (0,05%) i propil galat (0,01%). Od sinergista su korišteni askorbinska i limunska kiselina u koncentraciji od 0,01%. Uz oksidacijsku stabilnost ispitani su i osnovni parametri kvalitete hladno prešanog makovog ulja. Najbolje antioksidacijsko djelovanje kod stabilizacije makovog ulja pokazala je primjena ekstrakta zelenog čaja (0,1% i 0,2%). Dodani sinergisti (limunska i askorbinska kiselina) produžuju antioksidacijsko djelovanje ekstrakta ružmarina (OxyLess®.CS) i ekstrakta nara na stabilizaciju makovog ulja.

**Ključne riječi:** makovo ulje, oksidacijska stabilnost, antioksidansi, sinergisti

**Rad sadrži:** 51 Stranica  
12 Slika  
9 tablica  
44 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Andrija Pozderović | Predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac   | član – mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Vedran Slačanac    | član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. Jurislav Babić     | zamjena člana |

**Datum obrane:** 03.srpnja 2015

**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 Food Technologies**  
**Subdepartment of Food Engineering**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technology of Oils and Fats

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no.IX. held on 23. June 2015.

**Mentor:** *Tihomir Moslavac, PhD, associate prof.*

### THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON THE STABILITY POPPY OIL

*Marina Karimović, 218 – DI*

#### Summary:

*Papaver somniferum L.* (poppy seeds) is rich in nonsaturated fatty acids such as olein and linoleic fatty acids. Consumption of poppy seeds reduces risk of chronic diseases (cancer, inflammatory process, regulation of blood pressure and coagulation of blood). In this thesis, oxidation stability of cold-pressed poppy seed oil was tested with and without added antioxidants using the Oven test, thus identifying the influence of individual natural antioxidant on the oxidation stability of the extracted poppy seed oil. The antioxidants used in this study are rosemary extract (Oxy Less® .CS) (0,1 and 0,2%), green tea extract(0,1 i 0,2%) and pomegranate extracts(0,1 i 0,2%), savory tea volatile oil at concentration of 0,05 % and synthetic propyl gallate (0,01%). Synergists used in this study were ascorbic acid and citric acid at concentration of 0, 01%. Along with tested oxidation stability, the basic parameters of quality of cold – pressed poppy seed oil were also tested. The study determined that the extract of green tea (0, 1% i 0, 2%) had the best effect on stabilisation of poppy seed oil. Added synergists (lemon and ascorbic acid) extend antioxidant activity of rosemary extract (Oxy Less® .CS) and pomegranate extract on poppy seed oil stabilisation.

**Key words:** Poppy seed oil, oxidation stability, antioxidants, synergists

**Thesis contains:** 51 Pages  
12 figures  
9 tables  
44 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Andrija Pozderović</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, associate prof.   | Supervisor   |
| 3. <i>Vedran Slačanac</i> , PhD, associate prof.    | Member       |
| 4. <i>Jurislav Babić</i> , PhD, associate prof.     | stand-in     |

**Defense date:** July 03, 2015

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

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. JESTIVA BILJNA ULJA.....	4
2.1.1. Makovo ulje.....	9
2.2. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA.....	11
2.2.1. Enzimski i mikrobiološki procesi.....	12
2.2.2. Kemijski procesi.....	13
2.3. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA.....	17
2.3.1. Antioksidansi.....	17
2.3.2. Sinergisti.....	21
2.4. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA.....	22
2.5. OKSIDACIJSKA STABILNOST ILI ODRŽIVOST ULJA.....	26
2.5.1. Oven test (Schaal Oven metoda).....	26
2.5.2. Rancimat test.....	26
2.5.3. Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method).....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	29
3.1. ZADATAK.....	30
3.2. MATERIJALI I METODE.....	30
3.2.1. Materijali.....	30
3.2.1.1. Sjemenke maka.....	30
3.2.1.2. Antioksidansi.....	31
3.2.2. Metode.....	32
3.2.2.1. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja.....	33
4. REZULTATI.....	38
5. RASPRAVA.....	42
6. ZAKLJUČCI.....	45
7. LITERATURA.....	47

## Popis oznaka, kratica i simbola

Abr – anisidinski broj

AF – antioksidacijski faktor

AK – askorbinska kiselina

BG – butil galat

BHA – butilhidroksianisol

BHT – butilhidroksitoluen

DG – dodecil galat

DHA – dokosaheksaenska kiselina

DPA – dokosapentaenska kiselina

DPP – dobra proizvođačka praksa

EGCG – epigalokatehin galat

EMK – esencijalne masne kiseline

EPA – eikosapentaenska kiselina

HOO' - radikal vodikovog peroksida

IP – indukcijski period

IR – indeks refrakcije

KI – kalij jodid

LK – limunska kiselina

NN – netopljive nečistoće

OG – oktil galat

OV – oksidacijska vrijednost ulja

Pbr – peroksidni broj

PF – zaštitni faktor

PG – propil galat

R', RO' - slobodni radikali

RH – masna kiselina

ROO' - radikal peroksida

ROOH – hidroperoksid

RR, ROR, ROOR – polimeri

SMK – slobodne masne kiseline

TBHQ – tercijarni butilhidrokinon

TBK – tiobarbiturna kiselina

ZMK – zasićene masne kiseline

## **1. UVOD**



Masti i ulja su u vodi netopljive tvari biljnog i životinjskog podrijetla, trigliceridi – esteri masnih kiselina i alkohola glicerola koji sadrže manje količine negliceridnih komponenti (1-2%) koje se ne saponificiraju s alkalijama. Lipidi su koncentrirani izvor energije, osiguravaju organizam sa 9 kcal/g. Također, osiguravaju medij za vitamine topljive u mastima, doprinose osjećaju sitosti, te igraju važnu ulogu u bogastvu teksture, okusa i kvalitete hrane.

Makovo ulje se dobiva hladnim prešanjem sirovog osušenog sjemena maka i primjena je uglavnom za salate. Prešanjem sjemenki maka dobije se sirovo ulje i nusproizvod prešanja – pogača. Zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, sjemenke maka i proizvodi koji u svom sastavu sadrže mak su dosta skloni oksidacijskim reakcijama koje uzrokuju različite promjene u sastavu i svojstvima.

Oksidacijska stabilnost ili održivost ulja predstavlja vrijeme kroz koje se ulja mogu čuvati od procesa autooksidacije i narušavanja njegovih senzorskih svojstava i kvalitete. Oksidacijska stabilnost ulja se određuje metodama koje rade na principu ubrzavanja procesa oksidacije ulja, djelovanjem jednog ili više čimbenika koji ubrzavaju proces. U praksi se koriste Rancimat test, AOM test i Oven test.

Antioksidansi su tvari koje prisutne u malim koncentracijama sprječavaju, tj. usporavaju proces oksidacijskog kvarenja i produžuju održivost ulja, a mogu biti prirodni i sintetski.

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati oksidacijsku stabilnost svježe proizvedenog hladno prešanog makovog ulja, sa i bez dodatka antioksidanasa i sinergista te na taj način utvrditi utjecaj pojedinog prirodnog antioksidansa na održivost ovog ulja.

U ovom istraživanju korišteni su prirodni i sintetski antioksidansi: ekstrakt ružmarina (OxyLess®.CS), ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt nara, eterično ulje rtanjskog čaja i propil galat (PG). Sinergisti korišteni u ovom istraživanju su askorbinska i limunska kiselina. Oksidacijska stabilnost makovog ulja ispitana je primjenom Oven testa.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. JESTIVA BILJNA ULJA

Masti i ulja su organski spojevi biljnog ili životinjskog podrijetla, netopljivi u vodi, ali topljivi u organskim otapalima. Prema kemijskom sastavu, masti i ulja se sastoje od triglicerida masnih kiselina, tj. masti i ulja su esteri alkohola glicerola i masnih kiselina. Ulja sadrže više nezasićenih masnih kiselina, te su na sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju za razliku od masti koje sadrže više zasićenih masnih kiselina i pri sobnoj temperaturi su u čvrstom stanju.

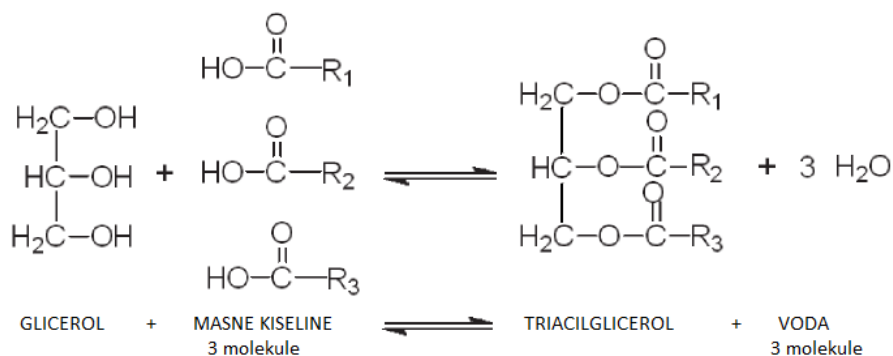
S obzirom na strukturu i sastav biljnih ulja, lipidi se dijele na:

- ❖ jednostavne lipide,
- ❖ složene lipide,
- ❖ derivate lipida.

### Jednostavni lipidi

U jednostavne lipide ubrajamo triacilglicerole (trigliceride) masnih kiselina koje nalazimo u prirodi prisutne s malim količinama lipida drugih skupina, te voskovima koji predstavljaju estere viših masnih kiselina i viših masnih alkohola. Na **Slici 1** je prikazana reakcija nastajanja triacilglicerola iz masnih kiselina i alkohola glicerola.

Ulja i masti (triacilgliceroli) su kondenzacijski proizvodi jedne molekule alkohola glicerola i triju molekula masnih kiselina. Masne kiseline su reaktivni dio molekule triacilglicerola pa imaju veliki utjecaj na njegova kemijska i fizikalna svojstva (Swern, 1972.).



Slika 1. Nastajanje triglicerida (triacilglicerola)

## Složeni lipidi

Složeni lipidi uključuju derivate fosforne kiseline, tj. fosfolipide, lipide koji sadrže ostatke ugljikohidrata, tj. glikolipide, aminolipide, sulfolipide. Udio negliceridnih sastojaka u prirodnim biljnim uljima iznosi 1 – 2 %, u nekima i do 3,5 %, a čine ih fosfatidi (fosfolipidi), karoteni, voskovi, steroli, vitamini A, D i E, tokoferoli, pigmenti klorofil i gosipol, glikozidi, aldehidi, ketoni, masni alkoholi i tragovi metala. Određeni negliceridni sastojci u prirodnim uljima su izrazito poželjni (npr. Liposolubilni, vitamini, karoteni) i poboljšavaju kvalitetu ulja prilikom rafinacije, dok voskovi, fosfatidi i tragovi metala mogu uvelike pogoršati kvalitetu ulja prilikom rafinacije, pa ih je potrebno ukloniti iz sirovog ulja tijekom procesa rafinacije.

## Derivati lipida

U derivate lipida ubrajaju se masne kiseline, vitamin D, vitamin E, alkoholi (steroli), ugljikovodici (karoteni).

Masne kiseline se razlikuju po:

- ❖ broju ugljikovih atoma u molekuli,
- ❖ zasićenosti,
- ❖ broju dvostrukih veza,
- ❖ prostornom rasporedu kiselinskih ostataka oko nezasićene veze.

S obzirom na broj ugljikovih atoma razlikujemo:

- ❖ masne kiseline kratkog lanca (broj ugljikovih atoma do 8),
- ❖ masne kiseline srednjeg lanca (broj ugljikovih atoma od 8 do 12),
- ❖ masne kiseline dugačkog lanca (broj ugljikovih atoma iznad 12).

Što je lanac masnih kiselina kraći, to je masnoća više u tekućem obliku, odnosno snižava se njezino talište.

S obzirom na stupanj nezasićenosti masne kiseline dijele se na:

- ❖ zasićene masne kiseline,
- ❖ nezasićene masne kiseline (Swern, 1972.).

### Zasićene masne kiseline

Kada su ugljikovi atomi u masnim kiselinama povezani jednostrukim vezama (C-C), takve masne kiseline nazivamo zasićenim masnim kiselinama (ZMK). Zasićenim masnim kiselinama vodikovi atomi potpuno ispunjavaju sva slobodna mjesta na ugljikovim atomima i najvažnije svojstvo je da su slabo reaktivne za reakcije na lancu, te dominiraju u mastima koje su na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju (masti životinjskog porijekla).

**Tablica 1** Najvažnije zasićene masne kiseline

Broj C atoma	Naziv masne kiseline	Formula
4	Maslačna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6	Kapronska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8	Kaprilna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10	Kaprińska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
12	Laurinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14	Miristinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16	Palmitinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18	Stearinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20	Arahidska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22	Behenijska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24	Lignocerinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$

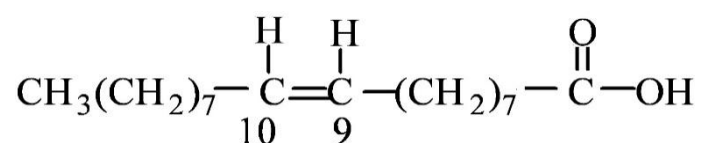
Povećanjem broja C atoma u molekuli raste i točka topljenja masnih kiselina. Najraširenije zasićene masne kiseline su: laurinska, miristinska, palmitinska i stearinska masna kiselina (**Tablica 1**).

### Nezasićene masne kiseline

Ako je jedna ili više veza između ugljikovih atoma povezana dvostrukim vezama (C = C), masna kiselina pripada nezasićenim masnim kiselinama. Ovisno o broju dvostrukih veza, nezasićene masne kiseline dijelimo u dvije skupine. Masne kiseline s jednom dvostrukom

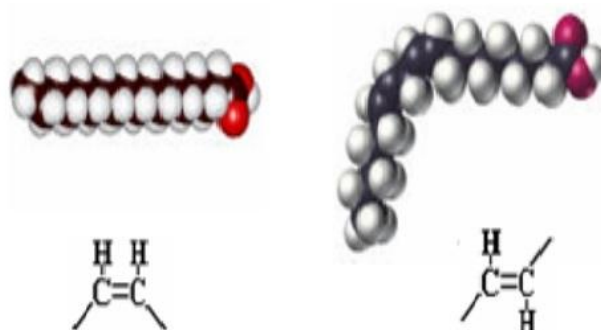
vezom su mononezasićene masne kiseline, s dvije ili više dvostrukih veza zovu se polinezasićene masne kiseline. Nezasićene masne kiseline dominiraju u uljima, te su na sobnoj temperaturi u tekućem stanju (maslinovo ulje, sojino, suncokretovo, ulje uljane repice i dr.), jer se točka topljenja smanjuje s dvostrukim vezama.

Oleinska kiselina sa 18 - C atoma i jednom dvostrukom (=) vezom je najčešće prisutna mononezasićena masna kiselina (**Slika 2**). Značajno je zastupljena u maslinovom, repičinom i visokooleinskom suncokretovom ulju. Jednostruko nezasićena oleinska kiselina je manje podložna oksidaciji od polinezasićenih masnih kiselina (Rade i Škevin, 2004.). Najpoznatija polinezasićena masna kiselina je linolna masna kiselina koja ulazi u sastav brojnih biljnih ulja poput suncokretovog, kukuruznog, sezamovog ulja i dr. ulja.



**Slika 2** Mononezasićena oleinska masna kiselina (Jašić, 2009.)

Nezasićene masne kiseline mogu biti u dva geometrijska izomerna oblika, cis i trans obliku (**Slika 3**). Prirodne nezasićene masne kiseline su cis konfiguracije, a trans nezasićene masne kiseline nastaju tijekom procesiranja, zagrijavanja ili hidrogenacije biljnih ulja (O'Brien, 2004.). Tehnološkim procesom proizvodnje hidrogeniziranih masti i margarina, gdje se procesom hidrogenacije molekulama nezasićenih masnih kiselina na mjestima dvostukih veza adiraju vodikovi atomi, mijenja se prirodan cis oblik masnih kiselina u trans oblik, koji je štetan za ljudski organizam.



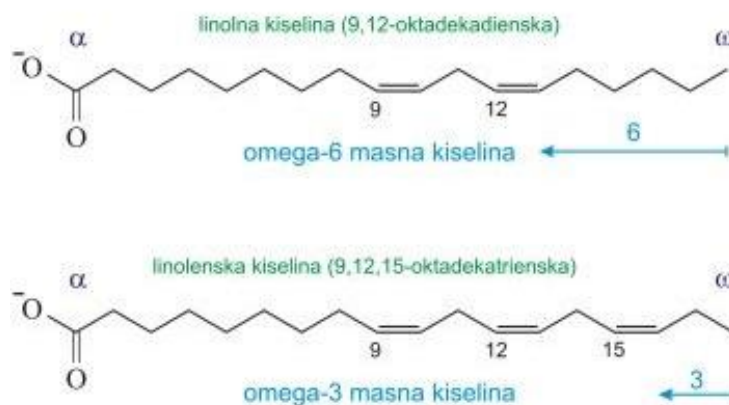
**Slika 3** Cis i trans oblik nezasićene dvostruke veze (Jašić, 2009.)

Kemijski sastav oba oblika je jednak, ali fizikalna svojstva im se razlikuju zbog razlike u konfiguraciji, broj cis i trans izomera ovisi o broju dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama (npr. masne kiseline s dvije dvostruke veze imaju četiri geometrijska oblika; cis – cis, cis – trans, trans – cis, trans - trans). Određivanja udjela trans masnih kiselina je vrlo važno zbog određivanja kvalitete masti i kontrole procesa hidrogenacije.

Polinezasićene masne kiseline dijele se na omega–3 i omega–6 (n–3 i n-6). Omega–3 skupini pripada  $\alpha$  – linolenska kiselina i njezini derivati: eikosapentaenska kiselina (EPA), dokosapentaenska kiselina (DPA) i dokosaheksaenska kiselina (DHA). Najviše ih ima u ulju riba sjevernih mora, pastrvama i ulju biljaka, a kod uljarica se nalaze najviše u lanenom ulju, konopljinom ulju i repičinom ulju. Omega – 6 skupini pripadaju linolna kiselina i arahidonska kiselina koju organizam može sintetizirati iz linolne kiseline (Mandić, 2003.).

### Esencijalne masne kiseline

Linolna i linolenska masna kiselina se ubrajaju u esencijalne masne kiseline (EMK), jer ih naš organizam ne može sam sintetizirati, pa ih je potrebno unositi hranom u organizam (**Slika 4**). Vrlo su važne za pravilan rast i razvoj organizma, rad stanica i funkciju organizma, te pripadaju grupi polinezasićenih masnih kiselina sa 18 i 20 ugljikovih atoma i sadrže 2 – 6 dvostrukih veza u cis konfiguraciji masne kiseline.



**Slika 4** Strukturna formula esencijalnih omega-3 i omega-6 masnih kiselina

### 2.1.1. Makovo ulje

Mak (*Papaver somniferum L.*) potječe vjerojatno iz Azije gdje se i danas uveliko uzgaja. Mak je jedna od najstarije uzgajanih biljaka. Poznat je i uzgaja se više od 4000 godina. Stari Rimljani su već tada vrlo dobro poznavali ljekovita i nutritivna svojstva maka. Mak se danas uzgaja iz dva osnovna razloga:

- ❖ radi dobivanja određenih alkaloida koji predstavljaju osnovu pojedinih lijekova
- ❖ radi neposredne primjene u jestive svrhe ili dobivanja jestivog ulja.

Mak je jednogodišnja biljka visine oko 1m. Sjeme se nalazi u čahuri na vrhu stabljike. Zavisno od sorte, sjeme može biti svjetlo obojeno – bijeli mak, ili crno – plavi mak. Mak se sije u proljeće ili u jesen, pri čemu je prinos sjemena proljetnog maka 500 – 700 kg/ha, a prinos jesenskog je za 30 – 40% veći.

Iz suhих čahura maka se, u strogo kontroliranim industrijskim uvjetima, izdvajaju razni alkaloidi od kojih su najznačajniji: morfin (0,4 – 1,5%), narkotin (0,3 – 1,0%), papaverin (0,3 – 1,0%), kodein, tebain (0,3 – 0,5%) i narcelin. Čisto sjeme maka je u suštini bez alkaloida. Ukoliko se u sjemenu maka dokaže prisustvo alkaloida, ono može da potječe jedino iz „prašine“ sa unutrašnje strane čahure, odnosno, to znači da sjeme nije dovoljno čisto.

Zrno maka sadrži 40 – 55% kvalitetnog ulja i 20 – 25% proteina. Pored ugodnih senzorskih svojstava, nutritivnoj vrijednosti maka znatno doprinosi i povoljan sastav mikroelemenata, prije svega, visok sadržaj željeza i magnezija. Sadržaj ulja u sjemenu maka znatno varira u ovisnosti od sorte i mjesta uzgoja. Na primjer u sjemenu maka uzgajanog u Pakistanu sadržaj ulja je iznosio 47 – 53%, u Indiji 41,4 – 49,1%, dok u Švedskoj uzgajano sjeme bijelog maka je imalo sadržaj ulja u prosjeku 40%, a plavi mak oko 33% ( Földesi, 1997.).

Sjeme maka se koristi, prije svega, u pekarskoj i konditorskoj industriji. U značajnim količinama se troši na područjima sa nasljeđenom tradicijom upotrebe maka, kao što je srednja Europa i Indija.

#### Sastav i fizikalno – kemijske karakteristike ulja sjemena maka

Mak je bogat vitaminima, izvrstan je izvor tiamina (0,85 mg što čini 56% RDA), piridoksina (0,4 mg što čini 22% RDA), a dobar je izvor i folne kiseline (35 µg što čini 17%



RDA), riboflavina (0,2 mg što čini 12% RDA) i vitamina E (1,1mg što čini 11% RDA). Od minerala mak je izvrstan izvor mangana (6,8 mg što čini 270% RDA), bakra (1,6 mg što čini 180% RDA), kalcija (1448 mg što čini 145% RDA), fosfora (849 mg što čini 106% RDA), magnezija (331 mg što čini 95% RDA), željeza (9,4 mg što čini 94% RDA) i cinka (10,2 mg što čini 68% RDA). Sjemenke maka u 100 g sadrže 10 g dijetalnih vlakana, 30,8 g nezasićenih masnih kiselina, od toga 30,5 g linolne kiseline, a također sadrže 89 mg fitosterola.

Iz bogatog nutritivnog sadržaja maka ističu se nezasićene masne kiseline, prije svega linolna kiselina i oleinska kiselina. Linolna kiselina je esencijalna omega 6 masna kiselina koju naš organizam ne može sintetizirati. Nalazi se u staničnim membranama biljaka gdje sudjeluje u njihovoj izgradnji, potiče apsorpciju i transport u masti topljivih vitamina A, D, E i K. Znanstvena istraživanja upućuju na to da može sudjelovati u procesu usporavanja razvoja multiple skleroze. Također može pomoći u zaštiti krvožilnog sustava, reguliranju krvnog tlaka i grušanja krvi. Često se primjenjuje za liječenje kožnih oboljenja i upalnih procesa. Oleinska kiselina je mononezasićena masna kiselina koja pripada grupi omega 9 masnih kiselina. Ona nije esencijalna i ljudski organizam je može djelomično sintetizirati. Istraživanja znanstvenika sa Sveučilišta Northwestern otkrivaju da oleinska kiselina može sudjelovati u usporavanju pojave raka djelovanjem na genetskoj razini. Također štiti krvožilni sustav od oštećenja. Mak se može koristiti i za opuštanje mišića, protiv bolova, za iskašljavanje i liječenje grčeva u abdomenu. Minerali i vitamini maka ublažuju razdražljivost, stres, potiču koncentraciju i raspoloženje.

Postupkom hladnog prešanja iz sjemena maka se dobiva kvalitetno jestivo ulje, dok se ulje koje se izdvaja pri višim temperaturama može koristiti u tehničke svrhe. Randman ulja pri prešanju sjemena maka je oko 35 do 50%. Hladno prešano makovo ulje je svjetložute boje, ugodnog mirisa i dobrog okusa. Prešanjem pri višim temperaturama se povećava iskorištenje na ulju, međutim, ulje je tamnije boje i senzorska svojstva su pogoršana.

Ukoliko je sjeme maka namijenjeno proizvodnji hladno prešano ulja, posebno se mora voditi računa da ne dođe do mehaničkog oštećenja sjemena tijekom skladištenja. Wagner i suradnici (2003.) su ustanovili da se oksidacijska stabilnost ulja u slučaju 10% oštećenog sjemena smanjila za oko 50%, a u slučaju 50% oštećenog sjemena čak za 82% u periodu od 175 dana pri 40°C.

**Tablica 2** Sadržaj i sastav neosapunjivih tvari ulja sjemena maka (Karleskind, 1996.)

Pokazatelj	Vrijednost
Sadržaj neosapunjivih tvari (g/kg)	5 – 15
Sadržaj ukupnih sterola (mg/kg)	2750
Sastav sterola: (% od ukupnih sterola)	
Campesterol	22
$\beta$ – sitosterol	68
Sadržaj ukupnih tokoferola (mg/kg)	140 – 150
Sastav tokoferola: (izražen u %)	
$\alpha$ – tokoferol	17
$\gamma$ – tokoferol	83
Ugljikovodici (mg/100g)	160
Triterpen alkoholi (mg/100g)	35

Pogača koja zaostaje nakon izdvajanja ulja iz sjemena maka sadrži 25 - 35% proteina i može se koristiti za ishranu životinja. Međutim mora se obratiti pažnja na kvalitetu jer se veoma brzo užegne. Skladištenje pogače u suhoj i hladnoj prostoriji moguće je samo za vrijeme od par tjedana. Kao komponenta stočne hrane pogača maka može biti zastupljena u količini ispod 10% (zbog toksičnosti i stvaranja ovisnosti) (Karleskind, 1996.).

## 2.2. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA

Biljna ulja su, kao i svi prehrambeni proizvodi, podložna raznim nepoželjnim procesima koji dovode do nepoželjnih promjena i kvarenja proizvoda. Ti nepovoljni procesi koji najčešće dovode do kvarenja ulja mogu biti mikrobiološke, kemijske ili enzimske prirode. Neke od nepoželjnih promjena do kojih dolazi prilikom kvarenja su: promjena boje i mirisa,

gubitak dijela biološki aktivnih tvari, smanjenje prehrambene vrijednosti ulja, gubitak vitamina i provitamina, esencijalnih masnih kiselina i sl. Obzirom na uzrok kvarenja biljnih ulja, procesi kvarenja se dijele na:

- ❖ enzimске i mikrobiološke procese kvarenja;
- ❖ kemijske procese kvarenja (Čorbo, 2008).

### **2.2.1. Enzimski i mikrobiološki procesi**

Enzimski procesi kvarenja su tipični za ulja i masti u samim sirovinama, a mikrobiološki procesi su značajni za proizvode koji sadrže visoki udio ulja i masti. Da bi uopće došlo do ovih vrsta procesa u biljnim uljima, neophodna je prisutnost, odnosno utjecaj enzima ili mikroorganizama, te odgovarajući uvjeti za njihovo djelovanje, a to su temperatura, voda i pH vrijednost.

Enzimski i mikrobiološki procesi se mogu podijeliti na:

- ❖ Hidrolitičku razgradnju
- ❖  $\beta$  – ketooksidaciju

#### **Hidrolitička razgradnja**

Hidrolitička razgradnja biljnih ulja je proces oslobađanja masnih kiselina iz molekule triglicerida uz prisustvo vode i lipolitičkih enzima (lipaza). Hidroliza se odvija u ulju unutar ploda ili sjemenke ako su nagnečene, oštećene ili prezrele. Pokazatelj hidrolitičkog kvarenja je količina nastalih slobodnih masnih kiselina (SMK), koje nastaju uslijed cijepanja esterske veze alkohola glicerola i masne kiseline. SMK nemaju okusa ni mirisa, same po sebi nisu štetne za ljude ali štetno djeluju na ulje zato što:

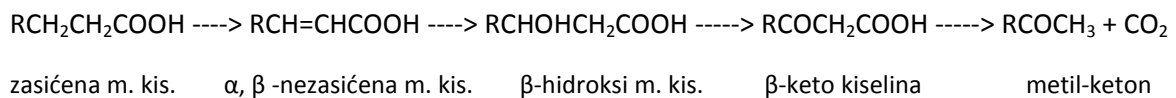
- ❖ smanjuju oksidacijsku stabilnost ulja,
- ❖ imaju prooksidacijsko djelovanje, svojom karboksilnom skupinom ubrzavaju razgradnju hidroperoksida i stvaranje sekundarnih produkata oksidacije ulja,
- ❖ potiču prelazak iona metala s metalnih dijelova opreme i tankova u ulje.

Hladno prešana i nerafinirana ulja ne smiju sadržavati više od 2 % slobodnih masnih kiselina, izraženih kao oleinska kiselina (NN 41/12).

Proces hidrolitičke razgradnje ulja se može zaustaviti inaktivacijom lipolitičkih enzima, a to se postiže primjenom visokih temperatura (viših od 80°C), te primjenom niskih temperatura (nižih od -20°C). Pošto oslobađanje viših masnih kiselina izaziva pojavu pjene, one se uklanjaju tijekom rafinacije ulja (Velagić – Habul, 2010).

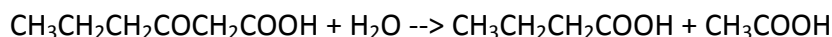
### β – ketooksidacija

Ova reakcija je karakteristična za biljna ulja i masti koje sadrže masne kiseline kraćeg i srednjeg lanca. Uzročnici β – ketooksidacije su plijesni iz skupine *Aspergillus* i *Penicillium* te bakterija *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*. Navedeni mikroorganizmi u prisustvu kisika iz zraka napadaju zasićene masne kiseline i to metilensku grupu u β – položaju. Pri tome nastaju primarni produkti reakcije, a to su β – keto kiseline, i metil ketoni kao sekundarni produkti reakcije (**Slika 5**).



**Slika 5** Reakcija β – ketooksidacije

Ako je prisutna voda, umjesto metil ketona, iz β – keto kiseline, mogu nastati dvije masne kiseline, i to maslačna kiselina i octena kiselina, što prikazuje sljedeća reakcija:



Proces β – ketooksidacije se može spriječiti osiguravanjem određenih uvjeta koji onemogućavaju razvoj mikroorganizama, kao što su pasterizacija, sterilizacija, dodatak nekih aditiva i sl.

### 2.2.2. Kemijski procesi

Kemijski procesi kvarenja biljnih ulja su:

- ❖ Autooksidacija,
- ❖ Termooksidacija,

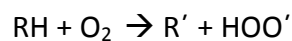
❖ Reverzija.

### **Autooksidacija**

Autooksidacija ulja je oksidacijsko kvarenje nezasićenih masnih kiselina autokatalitičkim procesom koji se zasniva na mehanizmu djelovanja radikala u lančanoj reakciji. To je veoma složen proces koji uključuje veliki broj međusobno povezanih reakcija. Brzina, tijek, vrsta i količina produkata procesa autooksidacije ovise o sastavu masnih kiselina, stupnju nezasićenosti, položaju masne kiseline na glicerolu ( $\alpha$  je osjetljiviji od  $\beta$  položaja), prisustvu i aktivnošću antioksidanasa, parcijalnom tlaku kisika, prirodni površine u kontaktu s kisikom, o temperaturi, kvaliteti i intenzitetu svjetla, itd. (Velagić – Habul, 2010).

Reakcija autooksidacije može biti podijeljena na tri dijela: inicijacija, propagacija i terminacija (deMan, 1999).

**Faza inicijacije** je početak procesa autooksidacije ulja, a zasniva se na pojavi početnog slobodnog lipidnog radikala ( $R'$ ) uz pretpostavku da kisik iz zraka pri izravnom djelovanju na masnu kiselinu daje radikale prema reakciji:



(masna kiselina)    (slobodni radikali)

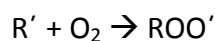
U početnoj fazi još uvijek nema nastalih hidroperoksida ili ima u izuzetno malim količinama, pa je ova faza autooksidacije usporena.

Utvrđeno je da hranu uvijek karakterizira određeni interval vremena, označen kao indukcijski period, koji prethodi autooksidaciji ili predstavlja njen prvi korak. Indukcijski period ovisi o količini i kvaliteti lipida i uglavnom je karakterističan za određene tipove proizvoda, s tim da je generalno dug za hranu s malim sadržajem nezasićenih lipida (Velagić – Habul, 2010).

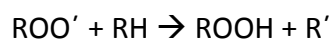
**Tablica 3** Period indukcije i relativna brzina oksidacije za pojedine masne kiseline (Velagić – Habul, 2010)

Masna kiselina	Broj alil grupa	Broj indukcije (sati)	Brzina peroksidacije u odnosu na stearinsku kiselinu
18:0	0		1
18:1(9)	1	82	100
18:2 (9,12)	2	19	1.200
18:3 (9,12,15)	3	1,34	2.500

**Faza propagacije** je druga faza procesa autooksidacije ulja.



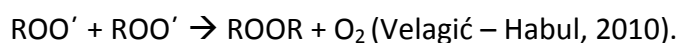
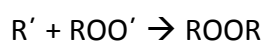
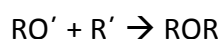
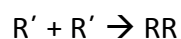
Slobodni radikal      Peroksid



Hidroperoksid (Lawson, 1995)

Raspad hidroperoksida vodi formiranju širokog mnoštva aldehida, ketona i ugljikovodika. Ovi spojevi su odgovorni za užegli miris i okus (Lawson, 1995).

**Faza terminacije** je završetak procesa autooksidacije. Do terminacije lančane reakcije oksidacije dolazi ako su slobodni radikali deaktivirani tj. međusobno povezani (Lawson, 1995). Ova faza terminacije podrazumijeva sljedeće međusobne reakcije koje završavaju stvaranjem stabilnih produkata (ne radikala) i prekidom lančanih promjena:



RH – masne kiseline,	ROOH – hidroperoksid,
R', RO' - slobodni radikali,	HOO' - radikal vodikovog peroksida
ROO' - radikal peroksida,	RR, ROR, ROOR – polimeri.

Tijekom autooksidacije nezasićenih masnih kiselina nastaju dvije skupine produkata:

- ❖ Primarni produkti – monohidroperoksidi;
- ❖ Sekundarni produkti – stabilni produkti lančane reakcije, koji mogu biti alkani, alkeni, aldehidi i ketoni, a nastaju razgradnjom hidroperoksida

### **Termooksidacija**

Energija potrebna da se zahvati H atom iz metilenske grupe masne kiseline i tako potiče stvaranje hidroperoksida, može se dobiti zagrijavanjem, kako se to dešava tijekom prženja i obrade hrane. Međutim, proces je složeniji i zahtjeva određene preduvjete. Na primjer, tijekom prženja uz povećanu temperaturu ulja razvijaju se pare vode i ulja, što značajno smanjuje parcijalni tlak kisika na površini, a to je preduvjet za duži period indukcije autooksidacije lipida. Istovremeno, visoke temperature ubrzavaju i olakšavaju najveći broj koraka u lančanim reakcijama (Velagić – Habul, 2010). Pri termooksidaciji se stvaraju oksidacijski produkti (hidroperoksidi i njihovi razgradni produkti), te produkti termooksidacije (cikličke masne kiseline, dimeri i polimeri masnih kiselina i triacilglicerola, oksipolimeri te drugi hlapljivi i nehlapljivi spojevi). Vrsta ulja, temperatura te vrijeme zagrijavanja uvjetuju način odvijanja termooksidacije. Uvid u stupanj termooksidacijskih promjena daju složene kromatografske metode i određivanje jodnog broja. Sniženje jodnog broja za 5% je znak da se ulje ne može više koristiti za prženje.

### **Reverzija**

Reverzija je kemijska promjena karakteristična za ulje soje i repice gdje se nakon kraćeg vremena skladištenja javlja neugodan okus i miris. Nekoliko je teorija o uzroku reverzije kao što su: oksidacija linolenske kiseline, oksidacija izolinolenske kiseline, fosfatidne reakcije, neosapunjive tvari i oksidacijski polimeri.

## 2.3. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA

Stabilizacija biljnih ulja prema oksidacijskom kvarenju se može poboljšati dodavanjem antioksidanasa (prirodnih i sintetskih), a to su tvari koje inhibiraju, tj. usporavaju antioksidacijsko kvarenje ulja, te dodatak sinergista uz antioksidanse. Stabilizacija biljnih ulja se provodi kako bi se produžilo vrijeme trajnosti i čuvanja ulja te kako bi se usporilo ili spriječilo kvarenje biljnih ulja koje uzrokuje neugodan miris, okus i narušava senzorska svojstva ulja.

### 2.3.1. Antioksidansi

Oksidacija je jedan od glavih uzroka kvarenja hrane. Odgovorna je za degradaciju mirisa, okusa, teksture, konzistencije, izgleda, kao i gubitka nutritivne vrijednosti većine hrane u današnje vrijeme (Goldberg i Williams, 1991).

Antioksidansi su kemijski spojevi koji se dodaju u vrlo malim koncentracijama te u većoj ili manjoj mjeri usporavaju oksidacijsko kvarenje biljnih ulja i masti.

Antioksidansi koji se koriste u prehrambene svrhe moraju zadovoljiti neke određene zahtjeve, a to su:

- ❖ Antioksidans mora biti topljiv u uljima i mastima;
- ❖ Ne smije uzrokovati strani okus, miris ili boju ulja zagrijavanjem niti dužim skladištenjem;
- ❖ Mora biti aktivan kod dodataka u vrlo malim koncentracijama;
- ❖ Antioksidacijsko djelovanje u ulju mora biti prenešeno i na proizvod koji sadrži to ulje ili mast;
- ❖ Ne smije biti preskup;
- ❖ Treba se moći jednostavno identificirati i odrediti u proizvodima.

Razni prirodni i sintetski antioksidansi se dodaju za stabilizaciju biljnih ulja. Generalno gledano, prirodni antioksidansi imaju jače, efikasnije i zdravstveno sigurnije djelovanje nego sintetski, ali su prirodni antioksidansi skuplji od sintetskih.



### **Prirodni antioksidansi**

Posljednjih godina se intenzivno istražuju različiti biljni materijali koji sadrže fenolne spojeve i pokazuju djelotvorna antioksidacijska svojstva u jestivim biljnim uljima i mastima.

Od prirodnih antioksidanasa najpoznatiji su tokoferoli ( $\alpha$  – tokoferol,  $\beta$  – tokoferol,  $\gamma$  – tokoferol,  $\delta$  – tokoferol).  $\alpha$  -,  $\beta$  -,  $\gamma$  -,  $\delta$  – tokoferoli se razlikuju u broju i položaju ostataka metilnih grupa u kromanolskom prstenu (Gunstone, 2003). Antioksidacijska aktivnost tokoferola se povećava od  $\alpha$  prema  $\delta$  (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).  $\alpha$  – tokoferol reagira sa peroksi radikalima brže nego ostali tokoferoli i sintetički antioksidansi TBHQ i BHT. Veća efikasnost  $\gamma$  – tokoferola u usporedbi sa  $\alpha$  – tokoferolom se zasniva na većoj stabilnosti  $\gamma$  – tokoferola i na različitim reakcijskim produktima formiranim tijekom antioksidacijske reakcije (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).

Askorbinska kiselina je aktivna kao antioksidans u vodenom mediju, ali samo pri višim koncentracijama ( $\sim 10^{-3}$  mol/l). Uočena je i prooksidacijska aktivnost pri nižim koncentracijama ( $10^{-5}$  mol/l), posebice u prisutnosti iona teških metala.

Karotenoidi također imaju antioksidacijsko djelovanje.  $\beta$  – karoteni su najaktivniji pri koncentracijama od  $5 \times 10^{-5}$  mol/l, a također je i parcijalni tlak kisika izuzetno važan, treba biti ispod 150 mm Hg.

Neki flavononi i flavonoli su fenolne komponente koje su široko prisutne u biljnim tkivima gdje se ponašaju kao prirodni antioksidansi (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).

U prirodne antioksidanse još ubrajamo vitamine A, C i E, astaksantin (karotenoid), karotenoide – provitamine A, minerale selen i cink, bioflanoide, aminokiselinu cistein, biljke i biljne ekstrakte (ekstrakt sjemenki grožđa, češnjak, zeleni čaj i dr.), alfa lipoičnu kiselinu i dr.

Vitamin C (askorbinska kiselina) reagira s kisikom zaostalim u zatvorenom pakiranju i na taj način spriječava reakcije oksidacije. Topljiv je u vodi i prisutan u svježem voću i povrću. Astaksantin se dobiva iz algi i on je karotenoid koji se u organizmu ne pretvara u vitamin A. Astaksantin se potvrdio kao vrlo snažni antioksidans za zaštitu kože i očiju od štetnog djelovanja sunca. Likopen je najjači antioksidans iz skupine karotenoida i najviše ga ima u rajčici. Likopen inaktivira slobodne radikale, štiti lipide, proteine i DNA od oksidacije, te je inaktivator kisika.

Ekstrakt ružmarina pokazuje najbolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na  $\alpha$  – tokoferol, askorbil palmitat i limunsku kiselinu. U kombinaciji sa askorbil palmitatom i limunskom kiselinom pokazuje povećanje antioksidacijskog efekta. U kombinaciji sa  $\alpha$  – tokoferolom otkriven je negativan sinergistički učinak (Hraš i sur., 2000.).

Antioksidansi novijeg datuma su biljni ekstrakti začinskih biljaka kao npr. ružmarina, kadulje, timijana, zelenog čaja, nara, maslinovog lista te drugi biljni ekstrakti. Ekstrakcijom antioksidanasa iz bilja, dobije se potpuno čisti „ekstrakt prirode“. Kod primjene prirodnih antioksidanasa za stabilizaciju biljnih ulja koristi se dobra proizvođačka praksa (DPP).

### **Sintetski antioksidansi**

Kako bi se mogli koristiti kao antioksidansi, sintetske kemijske tvari moraju zadovoljiti sljedeće uvjete:

- ❖ ne smiju biti toksični;
- ❖ moraju biti vrlo aktivni pri niskim koncentracijama (0,01 – 0,02%);
- ❖ moraju se koncentrirati na površini masne ili uljne faze (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).

Od sintetskih antioksidanasa (kemijskih ili umjetnih), najvažniji su: butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT); tercijarni butilhidrokinon (TBHQ), te alkil esteri galne kiseline (PG – propil galat; BG – butil galat, OG – oktil galat i DG – dodecil galat). Još treba spomenuti i askorbil palmitat i askorbil stearat, mješavinu tokoferola itd.

Istraživanja su pokazala da je u svrhu stabilizacije biljnih ulja bolje dodati smjesu antioksidanasa nego jedan antioksidans. Razlog tome je sinergističko djelovanje jednog antioksidansa na drugi, pa dodani zajedno imaju bolje antioksidacijsko djelovanje. Da bi se utvrdilo koji je antioksidans sinergist drugome potrebno je provesti ispitivanje.

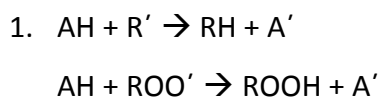
**Tablica 4** Vrijednosti antioksidacijskog faktora (AF) nekih antioksidanasa (0,02%) u pročišćenoj svinjskoj masti (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).

Antioksidans	AF	Antioksidans	AF
d- α – tokoferol	5	Oktil galat	6
dl – γ – tokoferol	12	Askorbil palmitat	4
BHA	9.5	BHA i	
BHT	6	BHT <sup>a</sup>	12

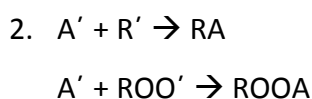
<sup>a</sup> – svaka komponenta je dodana u količini od 0,01%.

### Mehanizam djelovanja antioksidansa

Antioksidans djeluje na spriječavanje oksidacijskog kvarenja ulja i masti preko dvije reakcije:



Kod prve reakcije antioksidans daje svoj H atom koji se veže na slobodni radikal masne kiseline ili na slobodni radikal peroksida.



Kod druge reakcije nastali slobodni radikali antioksidanasa se veže na slobodni radikal masne kiseline ili na slobodni radikal peroksida.

Antioksidans produžuje održivost ulja i masti na način da obje reakcije prekidaju lančanu reakciju oksidacijskog kvarenja. Antioksidans ne veže kisik na sebe iz zraka nego djeluje na slobodne radikale. Jako je važno da se antioksidans dodaje „svježoj masti i ulju“ koji imaju nizak peroksidni broj (Pbr), koji mora biti manji od jedan. Dugotrajnost djelovanja antioksidansa ovisi od vrste dodanog antioksidansa, njegove koncentracije, vrste ulja i masti

te uvjeta čuvanja ulja i masti. Antioksidansi, u prosjeku, povećavaju održivost odnosno oksidacijsku stabilnost ulja i masti 3 – 6 puta u usporedbi s uljima i mastima kojima nisu dodani antioksidansi. Važan utjecaj na djelovanje antioksidansa ima sastav ulja i masti, odnosno udio nezasićenih masnih kiselina te nekih negliceridnih sastojaka. U animalnim mastima koje sadrže manje polinezasićenih masnih kiselina, a ne sadrže prirodne antioksidanse, dodani antioksidans ima bolje djelovanje nego u biljnim uljima.

Efikasnost antioksidansa može se procijeniti usporednom analizom, koristeći se „antioksidacijskim faktorom“ (AF):

$$AF = I_A / I_0$$

Gdje je  $I_A$  = indukcijski period za mast ili ulje uz dodatak antioksidansa, a  $I_0$  = oksidacijski indukcijski period za mast ili ulje bez dodatnog antioksidansa (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004).

### 2.3.2. Sinergisti

Kemijske tvari koje poboljšavaju aktivnost antioksidanasa nazivaju se sinergisti (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004). Najvažniji primjeri sinergista su: lecitin, aminokiseline, limunska, askorbinska i octena kiselina, monoizopropil citrat, askorbil palmitat itd. Sinergisti sami po sebi nemaju antioksidacijsko djelovanje ali dodani uz neki antioksidans produžuju njegovo djelovanje, najčešće 1 – 3 puta.

Sinergisti imaju tri načina djelovanje:

1. Vežu tragove metala (Cu, Fe, Ni,...), inaktiviraju ih te isključuju njihovo prooksidacijsko djelovanje na proces autooksidacije ulja i masti
2. Daju svoj H atom antioksidansu, tako da regeneriraju i reduciraju, pa produžuju vrijeme njegovog djelovanja
3. Sinergist se veže sa slobodnim radikalom antioksidansa i sprječava njegov utjecaj na razgradnju peroksida.

U praksi se uz antioksidans redovno dodaje i sinergist u količini od 0.005 – 0.02%. dodatak sinergista je propisan zakonskom regulativom. Ispitivanjima treba ustanoviti koji sinergist

odgovara kojem antioksidansu, u takvoj se kombinaciji trebaju dodavati uljima i mastima, i to najčešće kod završetka procesa dezodorizacije (ako se radi o rafiniranim uljima).

## 2.4. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA

Danas se u praksi koristi veliki broj metoda za određivanje stupnja oksidacije ulja i masti iz razloga što poznavanje stupnja oksidacije omogućava određivanje kvalitete ulja i masti te se na taj način utvrđuje može li se određena mast ili ulje koristiti u ljudskoj prehrani i da li se može kraće ili duže skladištiti.

Tri su grupe metoda kojima se određuje stupanj oksidacijskih promjena na masti ili ulju, a to su:

- ❖ Organoleptičke (senzorske) metode
- ❖ Kemijske metode
- ❖ Fizikalne metode

### a) Organoleptičke (senzorske) metode

Iako su ove metode subjektivne i dugotrajne, one i dalje ostaju jako važne za ispitivanje stupnja oksidacije ulja i masti. Senzorske metode se baziraju na određivanju pojave neprijatnog užeglog mirisa. Taj miris nastaje zbog razgradnih sekundarnih produkata oksidacije ulja, a to su hlapljivi kabilni spojevi, odnosno aldehidi i ketoni. Senzorsko ocjenjivanje ulja danas provode panel ispitivači te se ono provodi u posebnim prilagođenim uvjetima.

### b) Kemijske metode

Što se tiče kemijskih metoda za određivanje stupnja oksidacije ulja, one se mogu podijeliti na:

- ❖ metode kod kojih se određuju primarni produkti oksidacije ulja (hidroperoksidi i peroksidi),

- ❖ metode kod kojih se određuju sekundarni produkti oksidacije ulja (hlapljivi karbonilni spojevi), a oni nastaju razgradnjom primarnih produkata.

**Tablica 5** Kemijske metode procjenjivanja stupnja oksidacije ulja (Dimić i Turkulov, 2000)

ANALITIČKA METODA	ISPITIVANI PARAMETAR
Peroksidni broj (Pbr)	Peroksidi
TBK test (broj)	Malonaldehid
Karbonilni broj	Spojevi sa karbonilnom grupom
Anisidinski broj (Abr)	Nehlapljivi karbonilni spojevi
Kreis broj	Epoksaldehidi i acetali
Oksidacijska vrijednost (OV) ili Totox broj	$OV = 2Pbr + Abr$ , ukupni sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije

**Peroksidni broj** - metoda za određivanje koncentracije peroksida temelji se na redukciji hidroperoksidne grupe s HI ili  $Fe^{2+}$  (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004). Biljno ulje koje sadrži određenu količinu hidroperoksida ili peroksida brže podliježe oksidacijskom kvarenju ulja, jer ovi spojevi djeluju kao katalizatori na oksidaciju. U praksi se za određivanje hidroperoksida i peroksida najčešće koristi metoda određivanje prema Wheeleru, a to su jodometrijske metode temeljene na određivanju količine joda koje oslobađaju hidroperoksidi iz otopine kalij jodida u uvjetima testa koji se radi. Peroksidni broj se izražava u jedinici  $mmol O_2/kg$  i ovaj broj je u uskoj vezi s načinom čuvanja ulja. Ako želimo da ulje čuvamo duži vremenski period Pbr takvog ulja treba biti što niži (0 – 1  $mmol O_2/kg$ ).

**Anisidinski broj** - Abr predstavlja količinu sekundarnih produkata oksidacijskog kvarenja ulja i masti. Određuje količinu aldehida, primarno 2 – alkena koji su izvedeni iz peroksida (Lawson, 1995). Određivanje Abr se temelji na reakciji paraanisidina sa višim nezasićenim aldehydima (2,4 – dienal i 2 – enal). Budući da se količina neisparljivih aldehida kao produkata razgradnje vrlo malo mjenja tijekom procesa rafinacije, moguće je ovom

metodom utvrditi tzv. oksidacijsku prošlost ulja. Ako je vrijednost anisidinskog broja viša, to znači slabiju održivost ulja.

**TBK test** - test tiobarbiturne kiseline je preferirana metoda za detekciju lipidne peroksidacije u biološkim sustavima (Belitz, Grosch, Schieberle, 2004). Stupanj oksidacijskih promjena se određuje na temelju količine sekundarnih produkata oksidacije ulja. Kod ove kolorimetrijske metode TBK reagira sa malonaldehidom, a to je jedan od razgradnih produkata polinezasićenih masnih kiselina. Pri tome dolazi do stvaranja crvene boje, a intezitet te boje se očitava na 532 nm.

**Totox broj** - to je oksidacijska vrijednost ulja (OV), prema formuli:

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

Gdje je :

Pbr = peroksidni broj

Abr = anisidinski broj

Oksidacijska vrijednost ulja pokazuje i količinu primarnih produkata (Pbr) i količinu sekundarnih produkata (Abr), pa prema tome daje vrlo dobar uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena ulja.

**Kreis broj** - ova se metoda temelji na obojenoj reakciji flavoglucina sa razgradnim produktima oksidacije ulja, ponajprije sa epihidrinaldehidom, pri čemu nastaje crvena boja čiji intezitet se određuje na 540 nm.

### c) Fizikalne metode

**Plinska kromatografija** – određuje se 3 – cis heksanal, kao i drugi aldehidi koji su nositelji neugodnog mirisa užegle masti. Plinskom kromatografijom moguće je određivanje ovih aldehida ako je njihova količina veća od 1 ppm (ppm = mg/kg).

**UV spektrofotometrija** – oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do stvaranja konjugiranih dvostrukih veza koje imaju maksimum apsorpcije u UV području od 230 do 375 nm. Nastali hidroperoksidi sa konjugiranim dienima pokazuju apsorpcijski maksimum u UV

području na 232 nm. Aldehidi, ketoni i konjugirani trieni imaju apsorbanciju na 270 nm, pa se na temelju očitane vrijednosti na 232 i 270 nm može odrediti stupanj oksidacije ulja. Ova vrijednost se naziva R vrijednost:

$$R \text{ vrijednost} = A_{232} / A_{270}$$

Gdje je:

$A_{232}$  – apsorbancija na 232 nm

$A_{270}$  – apsorbancija na 270 nm.

Ulje je lošije kvalitete ako je R vrijednost niska jer sadrži više konjugiranih triena i sekundarnih produkata oksidacije. Ovakav način procjenjivanja stupnja oksidacije pomoću R vrijednosti moguć je samo kod sirovih ulja jer se kod rafiniranih ulja tijekom procesa dekolorizacije, djelovanjem aktivne zemlje stvaraju konjugirani trieni koji nisu rezultat oksidacijskih promjena (Dimić i Turkulov, 2000).

**Indeks refrakcije** – konjugirani dieni hidroperoksida kao i nastali polimeri povećavaju indeks refrakcije, pa se oksidacijske promjene ulja i masti mogu pratiti određivanjem IR – a.

**Tekućinska kromatografija (HPLC)** – određuje se malonaldehid i drugi sekundarni produkti oksidacije.

**Tablica 6** Fizikalne metode za procjenjivanje stupnja oksidacije ulja (Dimić i Turkulov, 2000)

ANALITIČKA METODA	ISPITIVANI PARAMETAR
UV - spektrofotometar	Konjugirani dieni/trieni
IR spektrofotometar	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
NMR (nuklearna magnetska rezonanca)	Hidroperoksidi i alkoholi
Fluorescencija	Karbonilni spojevi i ketoni
Plinska kromatografija	Hlapljivi spojevi
HPLC	Malonaldehidi i sekundarni proizvodi
Indeks refrakcije	Primarni i sekundarni produkti oksidacije



Polarografija	Hidroperoksidi
Kulometrija	Hidroperoksidi
Kromatografija u koloni	Polimeri, polarni spojevi

## 2.5. OKSIDACIJSKA STABILNOST ILI ODRŽIVOST ULJA

Oksidacijska stabilnost ili održivost biljnih ulja predstavlja vrijeme kroz koje se oni mogu sačuvati od procesa autooksidacije. Poznavanje stabilnosti ili održivosti biljnih ulja važno je kako bi se moglo unaprijed odrediti vrijeme za koje se mogu sačuvati od jače izražene oksidacije, bez bitnih promjena kvalitete te za definiranje roka upotrebe ulja (Dimić i Turkulov, 2000). Metode koje se koriste za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja se temelje na ubrzanoj oksidaciji ulja i masti utjecajem nekog čimbenika koji ubrzava ovu vrstu kvarenja ulja. Danas su to najčešće metode koje se provode pod utjecajem temperature. Za održivost ulja i masti koristi se vrijeme u satima (h) i danima, potrebno je da ispitivani uzorak ulja dosegne određenu, unaprijed utvrđenu vrijednost Pbr ili se organoleptički utvrdi pojava užeglog mirisa.

### 2.5.1. Oven test (Schaal Oven metoda)

Ovo je jedan od najstarijih i najjednostavnijih testova za određivanje oksidacijske održivosti ulja i masti. Kod Oven testa, uzorci ulja se drže u sušioniku na temperaturi 60<sup>0</sup>C ili 63<sup>0</sup>C te se prati porast vrijednosti Pbr kao i senzorske, organoleptičke promjene. Za održivost ulja i masti uzima se vrijeme u danima za koje peroksidni broj ulja dosegne određenu vrijednost ili se organoleptičkim ispitivanjem utvrdi pojava užeglosti. Pri tome je važno naglasiti da 1 dan Schaal Oven testa odgovara održivosti ulja 6 – 12 dana pri sobnoj temperaturi (Dimić i Turkulov, 2000).

### 2.5.2. Rancimat test

Kod primjene rancimat testa provodi se ubrzana oksidacija ulja pri točno definiranim uvjetima. Za ispitivanje se koristi Rancimat uređaj pri povišenoj temperaturi (100<sup>0</sup>C, 110<sup>0</sup>C, 120<sup>0</sup>C) uz stalni dovod zraka. Pri povišenoj temperaturi, oksidacijom ulja, nastaju

kratkolančane hlapljive organske kiseline koje se uvode u deioniziranu vodu pa se ovi hlapljivi produkti određuju konduktometrijski sa automatskim registriranjem vodljivosti u funkciji vremena. Tijek oksidacije ulja se može indirektno pratiti mjerenjem porasta vodljivosti. Kod ove metode se dobije indukcijski period (IP) koji se mjeri u satima, a on se označava kao indeks održivosti ulja pri određenoj temperaturi i protoku zraka. Što je indukcijski period duži, to je bolja održivost, odnosno oksidacijska stabilnost ulja.

**Tablica 7** Indukcijski period različitih vrsta ulja pri određenim temperaturama

<b>VRSTA ULJA</b>	<b>TEMPERATURA ISPITIVANJA (°C)</b>	<b>INDUKCIJSKI PERIOD – IP (h)</b>
<b>Suncokretovo ulje</b>	<b>100</b>	<b>7.1 – 12.2</b>
<b>Suncokretovo ulje</b>	<b>120</b>	<b>3.5 – 6.3</b>
<b>Ulje kukuruznih klica</b>	<b>100</b>	<b>18.9</b>
<b>Arašidovo (kikiriki) ulje</b>	<b>100</b>	<b>13.2 – 29.2</b>
<b>Maslinovo ulje</b>	<b>100</b>	<b>19.6 – 29.4</b>
<b>Palminovo ulje</b>	<b>100</b>	<b>42.5</b>
<b>Repičino ulje</b>	<b>100</b>	<b>14.0</b>
<b>Sojino ulje</b>	<b>100</b>	<b>10.5</b>

### **2.5.3. Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method)**

Kod ovog testa se uzorci ulja kroz koje prolazi struja zraka zagrijavaju u Swift aparatu na temperaturu 97,8<sup>0</sup>C. U određenim vremenskim intervalima se uzimaju uzorci ulja i određuje se Pbr. Uzorci ulja se drže u uređaju toliko dugo dok Pbr ne dosegne određenu vrijednost. Iz održivosti ulja određene AOM testom može se izračunati približna održivost ulja pri sobnoj temperaturi jer su rezultati ispitivanja pokazali da 1h AOM testa odgovara

približno 20 dana čuvanja ulja pri sobnoj temperaturi. Ulja i masti dobre kvalitete i održivosti poslije 8h AOM testa moraju imati Pbr manji od 5 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati oksidacijsku stabilnost (održivost) proizvedenog hladno prešanog makovog ulja, sa i bez dodanog antioksidansa. U tu svrhu potrebno je ispitati utjecaj pojedinog antioksidansa na održivost proizvedenog ulja primjenom Oven testa (63 °C) i praćenjem promjene vrijednosti peroksidnog broja uzorka čistog hladno prešanog ulja maka (kontrolni uzorak) i uzorka s dodanim prirodnim i sintetskim antioksidansima tijekom četiri dana trajanja testiranja. Također ispitan je utjecaj dodatka sinergista (limunska i askorbinska kiselina) na promjenu oksidacijske stabilnosti makovog ulja.

Prije određivanja oksidacijske stabilnosti određeni su parametri kvalitete hladno prešanog makovog ulja primjenom standardnih metoda, određeni su: peroksidni broj, udio slobodnih masnih kiselina, udio netopljive nečistoće, udio vlage u ulju.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Materijali

##### 3.2.1.1. Sjemenke maka

Sjemenke maka su nabavljene iz firme CUM FRUCTU d.o.o., Zagreb. Laboratorijskim postupkom prešanja, iz ovih sjemenki maka je dobiveno ispitivano hladno prešano ulje.



**Slika 5** Sjemenke maka

### 3.2.1.2. Antioksidansi

Kod ispitivanja oksidacijske stabilnosti (održivosti) svježe proizvedenog hladno prešanog makovog ulja korišteni su sljedeći antioksidansi:

- ekstrakt ružmarina Oxy'Less CS (Naturex, Francuska);
- ekstrakt zelenog čaja (Naturex, Francuska);
- ekstrakt nara (Naturex, Francuska);
- eterično ulje rtanjskog čaja
- propil galat (PG)

Od sinergista su korištene askorbinska i limunska kiselina.



Slika 6 Korišteni antioksidansi

#### Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)

Oxy Less CS je prirodni ekstrakt dobiven iz listova ružmarina (*Romarinus officinalis* L.). Proizveden u praškastom obliku u Francuskoj (tvrtka NATUREX), bež boje i topljiv u vodi. Udio karnosolne kiseline je 18 do 22%, zaštitni faktor (PF) je veći od 12%, suha tvar ekstrakta je od 92 do 98%. U ispitivanju smo ga upotrijebili u udjelima 0,1% i 0,2%, te u udjelu od 0,1% uz 0,01% limunske i 0,01% askorbinske kiseline računato na masu ulja.

#### Ekstrakt zelenog čaja

Ekstrakt zelenog čaja je prirodni ekstrakt dobiven iz listova zelenog čaja (*Camellia sintensis* L.) i proizveden je u praškastom obliku, proizvođač je tvrtka NATUREX. To je prah,

žute do smeđe boje, trpkog mirisa, sa maksimalnim udjelom vode do 8%. Udio epigalokatehin galata (EGCG) veći je od 45%, udio ukupnih polifenola veći je od 98%, udio kofeina manji je od 2%, a udio katehina veći je od 80%. U ispitivanju smo ga upotrijebili u udjelima 0,1% i 0,2%, te u udjelu od 0,1% uz 0,01% limunske i 0,01% askorbinske kiseline računato na masu ulja.

#### **Ekstrakt nara**

Ekstrakt nara je prirodni ekstrakt, dobiven iz voća nara (*Punica granatum L.*). Prema sastavu pripada maltodekstrinima. Proizveden je u Francuskoj (NATUREX) u praškastom obliku i topljiv je u vodi. Sadrži više od 10% elagične kiseline, a udio suhog ekstrakta je veći od 95%. U ispitivanju smo ga upotrijebili u udjelima 0,1% i 0,2%, te u udjelu od 0,1% uz 0,01% limunske i 0,01% askorbinske kiseline računato na masu ulja.

#### **Eterično ulje rtanjskog čaja**

Eterično ulje rtanjskog čaja je dobiveno parnom destilacijom cvjetnih vrhova rtanjskog čaja (*Satureja Montana*). Eterično ulje koje smo koristili u ovom ispitivanju je proizvedeno od strane Instituta za ratarstvo i povrtarstvo (Novi Sad, Srbija). DPPH metodom je određena antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja rtanjskog čaja i iznosi  $IC_{50} = 0,0629$  (mg/ml). U ispitivanju smo ga upotrijebili u udjelu od 0,05% računato na masu ulja.

#### **Propil galat**

Propil galat je sintetski antioksidans E310, prah, sivo – bijele boje, bez mirisa. Točka tališta je 146 do 150°C. Preporučena količina doziranja je od 20 do 200 ppm. U ispitivanju smo ga upotrijebili u udjelu od 0,01% računato na masu ulja.

### **3.2.2. Metode**

Parametri kvalitete ulja koji su se određivali ovim radom nakon procesa hladnog prešanja su:

- ✓ Peroksidni broj (Pbr)
- ✓ Slobodne masne kiseline (SMK)
- ✓ Udio netopljivih čestica
- ✓ Udio vlage

### Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj je jedan od pokazatelja oksidacijskog stanja biljnih ulja, a njime se određuju primarni produkti oksidacije. U ovom istraživanju peroksidni broj je određen standardnom metodom: Određivanje peroksidnog broja – Jodometrijsko određivanje točke završetka ISO 3960 (2007). Uzorak ulja je otopljen u smjesi ledene octene kiseline i kloroforma, zatim promiješan, pa mu je dodan kalij jodid (KI). Uzorak je mućkan rukom točno jednu minutu pa je razrijeđen prethodno prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom, poslije čega mu je dodan škrob kao indikator. Djelovanjem peroksida oslobađa se jod iz otopine kalij jodida koji je zatim određen titracijom sa natrij – tiosulfatom. Na isti način se provede i slijepi pokus, ali bez ulja. Rezultat se izražava kao broj milimola aktivnog kisika koji potječe od nastalog peroksida prisutnog u 1kg ulja (mmol O<sub>2</sub>/kg).

Formula za izračunavanje peroksidnog broja:

$$\text{Pbr (mmol O}_2\text{/kg)} = (V_1 - V_0) \times 5/m$$

Gdje je:

V<sub>1</sub> – volumen otopine natrij – tiosulfata, koncentracije c(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)=0,01mol/L utrošen za titraciju uzorka ulja (mL)

V<sub>0</sub> – volumen otopine natrij – tiosulfata, koncentracije c(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)=0,01mol/L utrošen za titraciju slijepa probe (mL)

m – masa uzorka ulja (g)



**Slika 7** Određivanje peroksidnog broja



### Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Udio slobodnih masnih kiselina u ulju može se izraziti kao kiselinski broj, kiselinski stupanj ili kao postotak SMK izražen kao oleinska kiselina. U ovom istraživanju su slobodne masne kiseline u uzorcima biljnih ulja određene primjenom standardne metode (HRN EN ISO 660:1996). Princip metode je titracija ulja otopljenog u otapalu sa otopinom natrij – hidroksida u koncentraciji 0,1mol/L. 5 grama ulja je odvagano u Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL, pa je dodano 50 mL neutralne smjese etera i etanola te je sve zajedno promućkano. Nakon toga je dodano nekoliko kapi fenolftaleina i titrirano s 0,1% - tnom otopinom natrij – hidroksida do promjene boje. Udio slobodnih masnih kiselina je izražen kao postotak (%) oleinske kiseline, a izračunat je prema izrazu:

$$\text{SMK (\% oleinske kiseline)} = V \times c \times M / 10 \times m$$

Gdje je:

V – utrošak otopine natrijeva – hidroksida (NaOH) za titraciju uzorka ulja (mL)

c – koncentracija otopine natrij – hidroksida za titraciju uzorka ulja,  $c(\text{NaOH}) = 0,1\text{mol/L}$

M – molekularna masa oleinske kiseline,  $M = 282 \text{ g/mol}$

m – masa uzorka ulja za ispitivanje (g)



**Slika 8** Određivanje slobodnih masnih kiselina

### Određivanje udjela netopljivih nečistoća

Netopljive nečistoće (NN) u biljnom ulju su uglavnom mehaničke nečistoće koje mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci (dijelovi biljke uljarica). U ovom istraživanju je za

određivanje netopljivih nečistoća korištena standardna metoda ISO 663 (1992). Princip rada je taj da je najprije stakleni lijevak sa sinteriranim dnom za filtriranje osušen u sušioniku pri 103<sup>0</sup>C tijekom 30 minuta, zatim ohlađen u eksikatoru i izvagan. U Erlenmayerovu tikvicu od 250 mL sa brušenim grlom i čepom izvagano je 20 g uzorka sirovog ulja te dodano 100 mL otapala (petrol – eterom). Tikvica je začepljena i dobro promućkana te ostavljena da stoji pri temperaturi 20<sup>0</sup>C u trajanju od 20 - 30 minuta. Zatim je sastavljena aparatura za vakuum filtraciju te je sadržaj Erlenmayereve tikvice filtriran te ispiran više puta s manjom količinom otapala. Potom je stakleni lijevak sušen u sušioniku pri 103<sup>0</sup>C tijekom jednog sata, ohlađen u eksikatoru te izvagan. Udio netopljivih nečistoća izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ netopljive nečistoće} = (m_2 - m_1 / m_0) \times 100$$

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 udjela vlage**

Količina vlage odnosno vode je važan pokazatelj kvalitete sirovih i rafiniranih biljnih ulja. Zbog prisustva vlage u ulju, pri određenim uvjetima može doći do hidrolitičkih promjena što rezultira porastom kiselosti ulja, odnosno povećava se udio slobodnih masnih kiselina čime se pogoršava kvaliteta ulja. Također, povećana količina vlage u ulju može dovesti do zamucenja ulja što dovodi do smanjenja estetske vrijednosti ulja. U ovom istraživanju je korištena standardna metoda ISO 662 (1992). Najprije je izvagano 5 g uzorka ulja u prethodno osušenu, u eksikatoru ohlađenu i izvaganu staklenu posudicu s poklopcem. Posudica s uzorkom je stavljena u sušionik na sušenje pri 103<sup>0</sup>C tijekom dva sata. Potom je ohlađena u eksikatoru na sobnu temperaturu i izvagana. Postupak sušenja, hlađenja i vaganja je ponovljen dok gubitak mase između dva uzastopna mjerenja nije bio manji od 0,002 g. Udio vlage u ulju izračunat je:

$$\% \text{ vlage} = ((m_1 - m_2)/(m_1 - m_0)) \times 100$$

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)

### 3.2.2.1. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja

#### Priprema uzoraka za ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja

Prije početka ispitivanja oksidacijske stabilnosti određeni su osnovni parametri kvalitete ulja. U staklene čašice se izvaže po 50 g uzorka i dodaju se pojedinačno antioksidansi u točno određenim koncentracijama, te se promješaju staklenim štapićem. Uzorci se zagrijavaju na temperaturu 70 °C do 80 °C i održavaju se na toj temperaturi uz miješanje 30 minuta, kako bi nastala homogena smjesa s antioksidansima, a zatim se uzorci ohlade na sobnu temperaturu. Uzorci u čašama prekriju se satnim stakalcem i stavljaju u sušionik (Binder) čime započinje ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja sa i bez dodanih antioksidanasa.

#### UZORCI:

1. Čisto hladno prešano makovo ulje
2. Ulje + 0,01% propil galata
3. Ulje + 0,05% eterično ulje rtanjskog čaja
4. Ulje + 0,1% ekstrakta zelenog čaja
5. Ulje + 0,2% ekstrakta zelenog čaja
6. Ulje + 0,1% ekstrakta zelenog čaja + 0,01% limunske kiseline
7. Ulje + 0,1% ekstrakta zelenog čaja + 0,01% askorbinske kiseline
8. Ulje + 0,1% ekstrakta ružmarina
9. Ulje + 0,2% ekstrakta ružmarina
10. Ulje + 0,1% ekstrakta ružmarina + 0,01% limunske kiseline
11. Ulje + 0,1% ekstrakta ružmarina + 0,01% askorbinske kiseline
12. Ulje + 0,1% ekstrakta nara

13. Ulje + 0,2% ekstrakta nara
14. Ulje + 0,1% ekstrakta nara + 0,01% limunske kiseline
15. Ulje + 0,1% ekstrakta nara + 0,01% askorbinske kiseline

### Oven test

Pripremljeni uzorci makovog ulja se zagrijavaju u termostatu (Binder) pri temperaturi 63 °C uz praćenje peroksidnog broja kroz četiri dana. Uzokovanje ulja provodi se svakih 24 sata kako bi se odredio peroksidni broj. Prethodno homogenizirani uzorci se uzorkuju u pripremljene čašice, odlije se 3 do 5 g ulja, a uzorci s uljem se vrata u termostat. Kada se temperatura uzorkovanih ulja spusti na sobnu temperaturu određuje se peroksidni broj.

Rezultati Oven testa prikazani su kao vrijednost peroksidnog broja (mmol O<sub>2</sub>/kg) nakon određenog vremena stajanja u termostatu pri temperaturi 63 °C odnosno nakon četiri dana trajanja testa.



**Slika 9** Priprema uzoraka ulja za Oven test

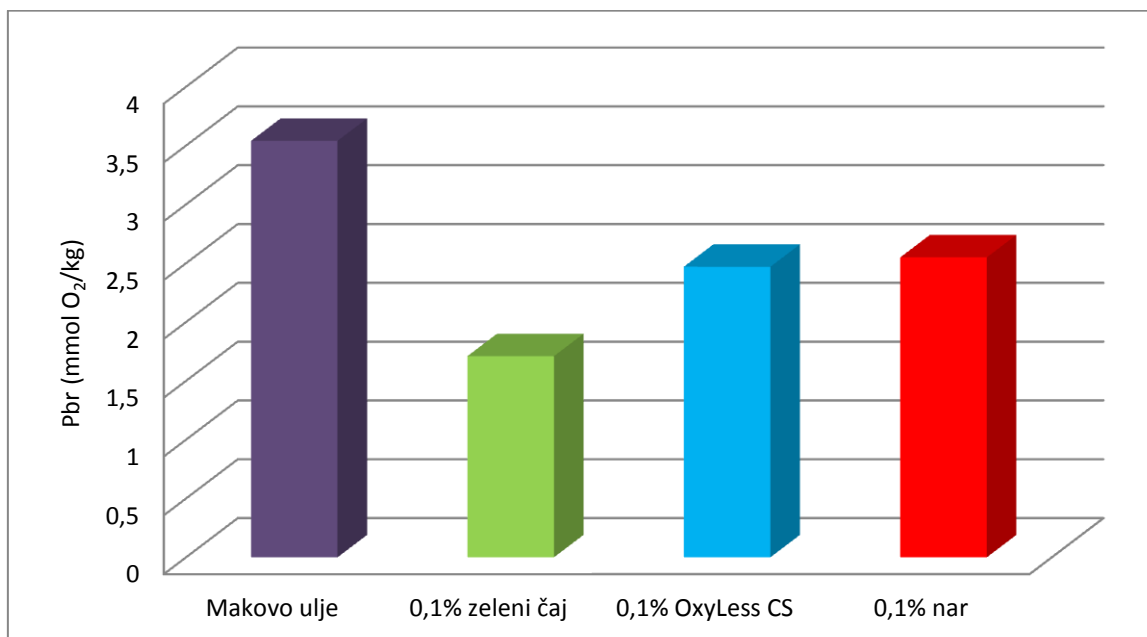
## **4. REZULTATI**

**Tablica 8** Osnovni parametri kvalitete proizvedenog hladno prešanog makovog ulja

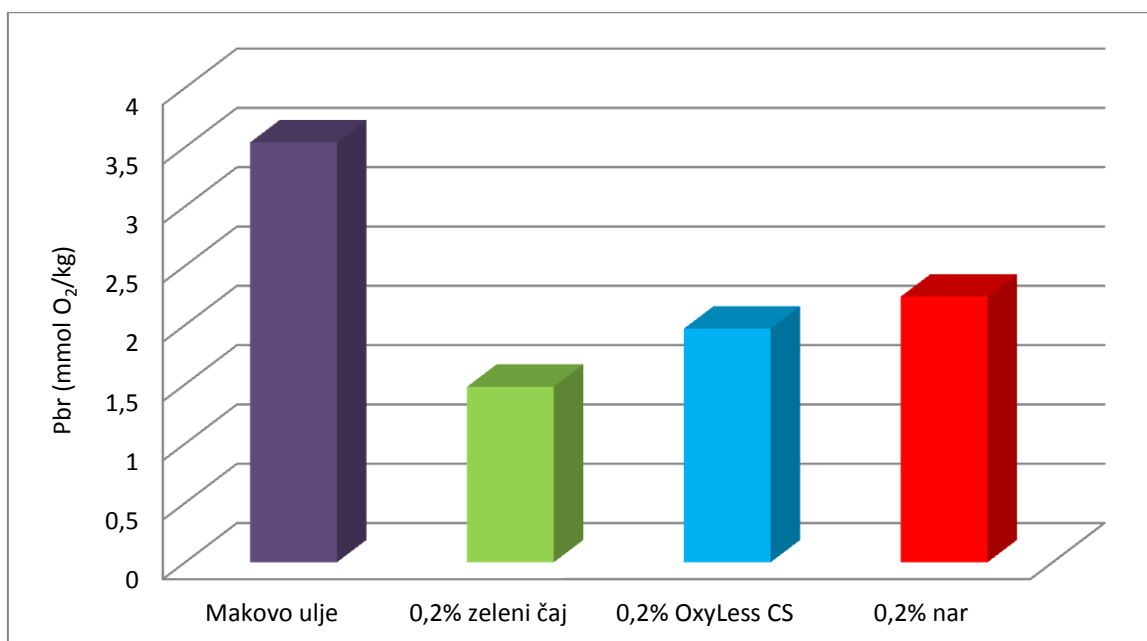
PARAMETARI KVALITETE	
Peroksidni broj (Pbr), mmol O <sub>2</sub> /kg	0,98
Slobodne masne kiseline (SMK), %	3,26
Voda, %	0,056
Netopljive nečistoće, %	0,19

**Tablica 9** Oksidacijska stabilnost hladno prešanog makovog ulja, sa i bez dodanog antioksidansa i sinergista (LK – limunska kiselina, AK – askorbinska kiselina), određena Schaal Oven testom, tijekom 4 dana praćenjem Pbr svakih 24 sata.

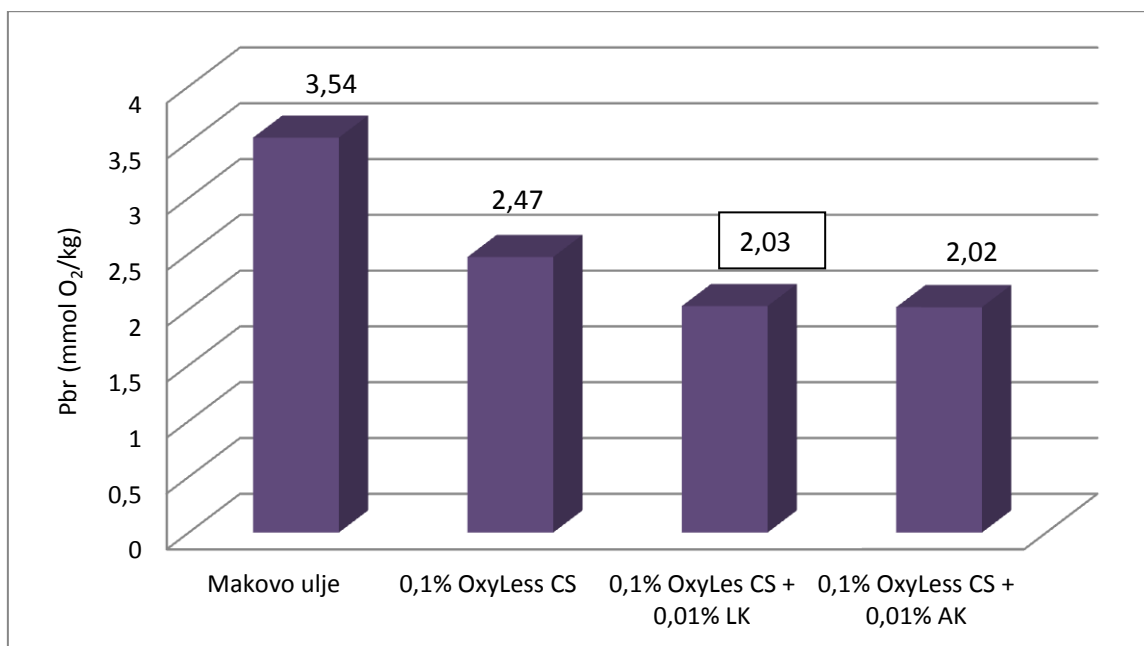
Uzorak	Udio antioksidansa (%)	Pbr (mmol O <sub>2</sub> /kg)				
		0. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan
Makovo ulje (kontrolni uzorak)	-	0,98	1,47	1,74	2,22	<b>3,54</b>
Ekstrakt ružmarina (Oxy Less CS)	0,1	0,98	0,96	1,00	1,99	2,47
	0,2		0,72	0,75	1,46	<b>1,97</b>
	0,1 + 0,01 LK		0,74	0,75	1,75	2,03
	0,1 + 0,01 AK		0,72	0,76	1,50	2,02
Ekstrakt zelenog čaja	0,1	0,98	0,99	1,01	1,45	1,71
	0,2		0,75	0,76	0,99	<b>1,48</b>
	0,1 + 0,01 LK		0,75	0,80	1,25	1,74
	0,1 + 0,01 AK		0,75	0,77	1,00	1,77
Ekstrakt nara	0,1	0,98	1,21	1,26	1,71	2,55
	0,2		1,01	1,03	1,26	2,24
	0,1 + 0,01 LK		0,77	0,99	1,05	<b>2,23</b>
	0,1 + 0,01 AK		0,75	1,00	1,46	<b>2,23</b>
Propil galat	0,01	0,98	1,00	1,26	1,72	2,47
Eterično ulje rtanjskog čaja	0,05	0,98	0,99	1,23	1,50	2,50



**Slika 10** Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,1%) na oksidacijsku stabilnost makovog ulja nakon 4 dana ubrzane oksidacije ulja određene Schaal Oven testom



**Slika 11** Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,2%) na oksidacijsku stabilnost makovog ulja nakon 4 dana ubrzane oksidacije ulja određene Schaal Oven testom



Slika 12. Utjecaj dodatka antioksidansa ekstrakta ružmarina (0,1%) i synergista (LK - limunska i AK - askorbinska kiselina, 0,01%) na oksidacijsku stabilnost makovog ulja nakon 4 dana ubrzane oksidacije ulja određene Schaal Oven testom



## **5. RASPRAVA**

U **Tablici 8** prikazani su rezultati ispitivanja osnovnih parametara kvalitete (peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vode i udio netopljivih nečistoća) proizvedenog hladno prešanog makovog ulja. Dobivene vrijednosti ukazuju na to da je ulje dobre kvalitete te su parametri u skladu sa Pravilnikom o jestivim uljima i mastima ( NN 41/12). Izuzetak je nešto veća vrijednost SMK u odnosu na Pravilnik što je rezultat korištenja sirovine sjemenke maka u kojoj je započela hidrolitička razgradnja triglicerida djelovanjem lipolitičkih enzima (lipaza) koje cijepaju estersku vezu i oslobađaju molekule masnih kiselina, a to dovodi do porasta kiselosti ulja.

Oksidacijska stabilnost svježe proizvedenog hladno prešanog makovog ulja, sa i bez dodanog prirodnog i sintetskog antioksidansa (ekstrakt ružmarina tip Oxy Less CS, ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt nara, eterično ulje rtanskog čaja i propil galata) te sinergista (limunska i askorbinska kiselina) određena Schall Oven testom (63 °C) tijekom 4 dana prikazana je u **Tablici 9**.

Rezultati testa ubrzane oksidacije makovog ulja (kontrolni uzorak) pokazuju da se tijekom testa postepeno povećava vrijednost peroksidnog broja (Pbr) sa 0,98 mmol O<sub>2</sub>/kg na 3,54 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja. Ovako dobivena niska vrijednost Pbr, nakon 4 dana testa, pokazuje da makovo ulje ima dobru održivost ili stabilnost prema oksidacijskom kvarenju što se pripisuje sastavu masnih kiselina i udjelu prirodnih antioksidanasa u samom ulju.

Dodatkom pojedinog ispitivanog prirodnog antioksidansa, udjela 0,1%, u makovo ulje postignuta je zaštita ovog ulja od oksidacijskog kvarenja, dobivene vrijednosti Pbr nakon 4 dana testa su niže od vrijednosti Pbr kontrolnog uzorka. Veću efikasnost zaštite makovog ulja od oksidacijskog kvarenja postiže ekstrakt zelenog čaja (0,1%) pri čemu je dobiven niži Pbr 1,71 mmol O<sub>2</sub>/kg nakon 4 dana testa.

Ekstrakt ružmarina Oxy Less CS (0,1%) ostvaruje veću efikasnost zaštite makovog ulja (Pbr je 2,47 mmol O<sub>2</sub>/kg) od oksidacijskog kvarenja u odnosu na primjenu ekstrakta nara (0,1%) gdje je vrijednost Pbr nakon 4 dana testa bila 2,55 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja. Ovaj odnos efikasnosti zaštite makovog ulja od oksidacije vidljiv je i na **Slici 10**.

Porastom koncentracije dodanih prirodnih antioksidanasa sa 0,1% na 0,2% zapaža se i porast efikasnosti zaštite makovog ulja od oksidacijskog kvarenja, peroksidni broj se snižava nakon 4 dana testa. I kod ovog ispitivanja održivosti ulja pokazalo se da ekstrakt zelenog čaja (0,2%)

ima veću antioksidacijsku zaštitu makovog ulja, Pbr je 1,48 mmolO<sub>2</sub>/kg u odnosu na primjenu ekstrakta ružmarina i ekstrakta nara. Također, dodatak ekstrakta ružmarina Oxy Less CS (0,2%) bolje štiti makovo ulje od oksidacijskog kvarenja (Pbr je 1,97 mmolO<sub>2</sub>/kg) u odnosu na ekstrakt nara, gdje je Pbr 2,24 mmol O<sub>2</sub>/kg nakon 4 dana testa (**Tablica 9, Slika 11**).

Primjena eteričnog ulja rtanjskog čaja (0,05%) već u ovakvom malom udjelu osigurava dovoljnu zaštitu makovog ulja od oksidacijskog kvarenja. Pbr nakon 4 dana testa ima vrijednost 2,50 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja. Dakle, dodatak ovog antioksidansa osigurava približnu razinu zaštite ulja kao i primjena ekstrakta nara udjela 0,1%.

Sintetski antioksidans propil galat (0,01%) dodan u makovo ulje osigurava nivo zaštite od oksidacije kao i dodatak ekstrakta ružmarina Oxy Less CS udjela 0,1%. Dakle, kod stabilizacije hladno prešanog makovog ulja prednost bi dali prirodnom antioksidansu ekstraktu ružmarina zbog zdravstvenog aspekta u odnosu na sintetski, kemijski antioksidans propil galat.

U **Tablici 9** i na **Slici 12** prikazani su rezultati ispitivanja utjecaja dodatka prirodnog antioksidansa ekstrakta ružmarina Oxy Less CS (0,1%) i dodatka sinergista (limunska kiselina i askorbinska kiselina udjela 0,01%) na oksidacijsku stabilnost makovog ulja nakon 4 dana testa ubrzane oksidacije ulja. Dobiveni rezultati pokazuju da pojedinačni dodatak ova dva sinergista dodatno povećava stabilnost makovog ulja, Pbr se snižava na vrijednost 2,03 mmol O<sub>2</sub>/kg ( limunska kiselina) i 2,02 mmol O<sub>2</sub>/kg (askorbinska kiselina) nakon 4 dana testa. Vidljiva je podjednaka efikasnost zaštite ulja kod oba sinergista.

Primjenom ova dva sinergista uz dodatak prirodnog antioksidansa ekstrakta zelenog čaja (0,1%) ne dolazi do porasta stabilnosti makovog ulja, Pbr je nešto veći u odnosu na ulje bez dodatka sinergista.

Sinergisti limunska i askorbinska kiselina dodani uz prirodni antioksidans ekstrakt nara (0,1%) dovode do porasta stabilnosti makovog ulja, dodatno se snižava vrijednost Pbr nakon 4 dana testa. Primjena ovih sinergista u ovom ulju pokazuje razinu zaštite ulja kao i dodatak ekstrakta nara (0,2%).

Iz navedenog se može zaključiti da dodatak ovih sinergista uz prirodne antioksidanse ekstrakt ružmarina i nara utječe na porast stabilnosti hladno prešanog makovog ulja.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi ispitivanja utjecaja dodatka antioksidanasa i sinergista na održivost ili oksidacijsku stabilnost hladno prešanog makovog ulja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Ispitivano, svježe proizvedeno hladno prešano makovo ulje je dobre kvalitete, osnovni parametri kvalitete su u skladu sa Pravilnikom, osim udjela SMK koji je nešto veći no što je propisano.
2. Hladno prešano makovo ulje pokazuje dobru oksidacijsku stabilnost (održivost), nakon 4 dana provedbe Oven testa dobivena je niska vrijednost peroksidnog broja 3,54 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja.
3. Dodatkom ispitivanih antioksidanasa u makovo ulje došlo je do porasta stabilnosti ulja, povećana je otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju.
4. Primjena ekstrakta zelenog čaja (0,1 i 0,2%) značajno je i najbolje povećala stabilnost makovog ulja.
5. Ekstrakt ružmarina Oxy Less CS (0,1% i 0,2%) ostvaruje veću efikasnost zaštite makovog ulja od oksidacijskog kvarenja u odnosu na primjenu ekstrakta nara.
6. Porastom koncentracije dodanog prirodnog antioksidansa sa 0,1% na 0,2% zapažen je i porast efikasnosti zaštite makovog ulja od oksidacijskog kvarenja.
7. Dodatak eteričnog ulja rtanjskog čaja (0,05%) u makovo ulju osigurava približnu razinu zaštite ovog ulja kao i primjena ekstrakta nara udjela 0,1%.
8. Propil galat dodan u makovo ulje (0,01%) osigurava jednak nivo zaštite ulja od oksidacije kao i dodatak ekstrakta ružmarina Oxy Less CS udjela 0,1% .
9. Pojedinačni dodatak sinergista 0,01% (limunska i askorbinska kiselina) uz prirodni antioksidans (ekstrakt ružmarina i ekstrakt nara) dodatno povećava stabilnost makovog ulja.
10. Sinergisti dodani uz antioksidans ekstrakt zelenog čaja ne utječu na porast stabilnosti makovog ulja, Pbr je veći u odnosu na ulje bez dodatka sinergista.

## **7. LITERATURA**

Aksoy L., *Opium poppy (Papaver somniferum L.) oil for preparation of biodisel: Optimization of conditions*. Applied energy, 88: 4713 – 4718, 2011.

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.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P, Food Chemistry, Translation from the Fifth German Edition by M.M. Burghagen. Springer, Germany, 2004.

Bockisch M: *Fats and Oils Handbook*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1998.

Bozan B., Temelli F., Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils, Bioresource Technology, 99: 6354 – 6359, 2008.

Čorbo S: *Tehnologija ulja i masti*. Bemust, Sarajevo, 2008.

deMan J.M., *Principles of Food Chemistry*, Third Edition, University of Guelph, Guelph, Ontario, 1999.

Dimić E, Turkulov J: *Kontrola kvalitete u tehnologiji jestivih ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.

Eskin NAM, Przybylski R: *Antioxidants and shelf life of foods*. In Eskin NAM, Robinson DS: *Food Shelf Life Stability*. CRS press, NY, Washington, 2001.

Espin JC, Soler – Rivas, Wicher HJ: *Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl radical*. Journal of Agricultural food Chemistry, 2000.

Földesi D., *A mák (Papaver somniferum L.)*, Olaj Szappan Kozmetika, 46 (3): 93 – 97, 1997.

Goldberg I, Williams RA, Biotechnology and Food Ingredients, USA, 1991

Gordon MH: *The development of oxidative rancidity in foods*. U Antioxidants in food. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (ur.). Woodhead Publishing Ltd, 2001.

Gunstone F.D., *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*, University of St. Andrews and Honorary Researc Professor Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland, 2003.

Gunstone FD: *The Chemistry of Oils and Fats*. Blackwell Publishing, UK, 2004.

- Hraš AR, Hadolin M, Knez Z, Bauman D: *Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$  – tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil*. Food Chem. 71, 2000.
- Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine netopljivih nečistoća*. HRN EN ISO 663:1992.
- Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje kiselinskog broja i kiselosti*. HRN EN ISO 660:1996.
- Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje peroksidnog broja, Jodometrijsko određivanje točke završetka*. HRN EN ISO 3960:2007
- Jašić M: *Kemija hrane - Lipidi*. Tehnološki fakultet, Tuzla, 2009. [8.06.2015.]  
<http://www.tehnologijahrane.com/hemijahrane/lipidi>
- Johansson A., *The content and composition of sterols and sterol esters in sunflower and poppy seed oils*, Lipids, 14: 285 – 291, 1979.
- Karleskind A., *Oils and fats Manual, Volumen 1*, Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK, 1996.
- Laubli MW, Bruttal PA: *Determination of the Oxidative Stability of Fats and Oils: Comparison between the Active Oxygen Method (AOCS cd 12 – 57) and the Rancimat Method*. J. Am. Oil Chem. 63, 1986.
- Lawson HW, *Food oils and fats – Technology, Utilization, and Nutrition*, Chapman & Hall, USA, 1995.
- Mandić ML: *Znanost o prehrani*. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2003.
- Martin-Polvillo M, Marquez – Ruiz G, Dobarganes MC: *Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long – term storage at room temperature*. Journal of the American Oil Chemists Society 81, 2004.
- Merill LI, Pike OA, Ogden LV, Dunn ML: *Oxidative Stability of Conventional and High – Oleic Vegetable Oils With Added Antioxidants*. J. Am. Oil Chem. Soc. 85, 2008.



Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*, Narodne novine 41/12, 2012.

O'Brien RD: *Fats and Oils: Formulating and Processing for Application*. CRC Press, Washington, 2004.

Oštrić – Matijašević B, Turkulov J: *Tehnologija ulja i masti*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1980.

Rade D, Škevin D: *Maslinovo ulje i zdravlje – važnost maslinovog ulja u prehrani*. Popularni stručni članci iz područja PBN – a, Prehrambeno – biotehnološki fakultet Zagreb, 2004.

Sabliov CM, Fronczek C, Astete CE, Khachatryan L, Leonardi C: *Effects of Temperature and UV Light on Degradation of  $\alpha$  – Tocopherol in Free and Dissolved Form*. J. Am. Oil Chem. Soc. 86, 2009.

Shahidi F, Zhong Y: *Antioksidants: Regulatory status*. Bailey's Industrial Oil and Fats Products. Newfoundland, Canada, 2005.

Shahidi F: *Natural antioxidants: an overview*. In *Natural antioxidants. Chemistry, Health Effects and Applications*. Ed. Shahidi F, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997.

Stanojević Lj, Stanković M, Nikolić V, Nikolić Lj, Ristić D, Čanadanovic-Brunet J, Tumbas V: *Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of Hieracium pilosella L. Extracts*, Sensors 9, 2009.

Stanojević LjP, Zdravković AS, Stanković MZ, Cakić MD, Nikolić VD, Ilić DP: *Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (Urtica dioica L.)*. Savremene tehnologije 2, 2013.

Subhashinee SK, Wijeratne, Mamdouh M, Abou-Zaid, Fereidoon S: *Antioxidant Polyphenols in Almond and Its Coproducts*. J. Agric. Food Chem. 54, 2006.

Swern D: *Industrijski proizvodi ulja i masti po Baileyu*. Nakladni zavod Znanje. Zagreb 1972.

Velagić – Habul E, *Hemija hrane*, Poljoprivredno – prehrambeni fakultet u Sarajevu, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo, 2010.

Wagner K.H., B. Isnardy, I. Elmadfa, *Effects of seed damage on the oxidative stability of poppy seed oil*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105: 219 – 224, 2003.

Wijerante SKS, Amarowicz R, Shahidi F: *Antioxidant Activity of almonds and Their By – products in Food Model Systems*. J. Am. Oil Chem. Soc. 83, 2006.

Yanishlieva NV, Marinova EM: *Stabilisation of edible oils with natural antioxidants*. European Journal of Lipid Science and Technology 103, 2001.

Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: *Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas*. U Antioxidants in food. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (ur.), Woodhead Publishing Ltd, 2001.