

Stabilizacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica i Coratina

Duvnjak, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:023253>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Duvnjak

**STABILIZACIJA EKSTRA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA SORTE
*ISTARSKA BJELICA I CORATINA***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, studeni 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija ulja i masti
Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 2. svibnja 2023.
Mentor: prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*
Pomoć pri izradi: *Daniela Paulik*, tehnički suradnik

Stabilizacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica* i *Coratina*
Ivana Duvnjak, 0113139538

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilizaciju ekstra djevičanskih maslinovih ulja hrvatskih sorti *Coratina* i *Istarska bjelica*, bez i uz dodatak antioksidansa i sinergista. Oksidacijsko kvarenje je jedan od glavnih problema tijekom proizvodnje i skladištenja maslinovog ulja. Oksidacijska stabilnost biljnih ulja predstavlja vrijeme kroz koje se ulje može sačuvati od procesa oksidacije. Antioksidansi su reducirajuće tvari koje inhibiraju oksidaciju supstrata te tako produžuju održivost ulja. Utjecaj dodatka antioksidansa na oksidacijsku stabilnost maslinovih ulja ispitivan je Oven testom pri 63 °C kroz određeni vremenski period. Ispitivani su parametri kvalitete maslinovih ulja: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vlage, udio netopljivih nečistoća, saponifikacijski broj i jodni broj. Korišteni su antioksidansi ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less®CS), ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola i propil galat te sinergisti limunska i kafeinska kiselina. Provedenim testom utvrđeno je kako maslinova ulja hrvatskih sorti pokazuju dobru otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Dodatkom ispitivanih antioksidansa ostvarena je dodatna zaštita maslinovih ulja od oksidacije. Najbolja stabilnost ulja je postignuta dodatkom ekstrakta ružmarina i kafeinske kiseline. Mješavina tokoferola i eterično ulje lavande nisu zaštitili oba ulja od oksidacijskog kvarenja.

Ključne riječi: Ekstra djevičansko maslinovo ulje, *Coratina*, *Istarska bjelica*, oksidacijska stabilnost, antioksidansi

Rad sadrži: 59 stranica
23 slika
10 tablica
23 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. izv. prof. dr. sc. Antun Jozinović	Predsjednik
2. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac	član-mentor
3. doc. dr. sc. Krunoslav Aladić	član-komentor
4. izv. prof. dr. sc. Ante Lončarić	zamjena člana

Datum obrane: 26. listopada 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18 Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Course title: Technology of Oils and Fats

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. 2022./2023. held on 2.may 2023.

Mentor: *Tihomir Moslavac*, PhD prof.

Technical assistance: *Daniela Paulik*, technical associate

The Stabilization of Extra Virgin Olive Oil of the *Istarska Bjelica* and *Coratina* Varieties

Ivana Duvnjak, 0113139538

Summary:

The aim of this study was to examine the stabilization of Croatian extra virgin olive oils of the *Coratina* and *Istarska bjelica* varieties, with and without the addition of antioxidants and synergists. Oxidative spoilage is one of the main issues during the production and storage of olive oil. Oxidative stability of plant oils represents the time during which the oil can be preserved from oxidation processes. Antioxidants are reducing agents that inhibit substrate oxidation, thus extending the oil's shelf life. The influence of antioxidant addition on the oxidative stability of olive oils was examined using the Rancimat test at 63 °C over a specific period of time. The quality parameters of the olive oils were analyzed, including peroxide value, free fatty acids, moisture content, insoluble impurities, saponification value, and iodine value. The antioxidants used were rosemary extract (Oxy'Less®CS), green tea extract, lavender essential oil, a mixture of tocopherols and propyl gallate, as well as the synergists citric and caffeic acid. The test revealed that Croatian olive oils exhibited good resistance to oxidative spoilage. The addition of the tested antioxidants provided additional protection against oxidation. The best oil stability was achieved with the addition of rosemary extract and caffeic acid. However, the mixture and lavender essential oil did not protect both oils from oxidative spoilage.

Key words: Extra virgin olive oil, *Coratina*, *Istarska bjelica*, oxidative stability, antioxidants

Thesis contains: 59 pages
23 figures
10 tables
23 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Antun Jozinović, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Tihomir Moslavac, PhD, full prof. | Supervisor |
| 3. Krunoslav Aladić, PhD, assistant prof. | co-mentor |
| 4. Ante Lončarić, PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: October 26, 2023.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

Iskreno se zahvaljujem

mentoru prof. dr. sc. Tihomiru Moslavac na ukazanom povjerenju, susretljivosti, vodstvu i podršci, kako tijekom cijelog studiranja, tako i tijekom izrade diplomskog rada. Najveće hvala na svim savjetima, ukazanim prilikama i inovativnim idejama!

Također, izrada ovog rada ne bi bila moguća bez tehničkog suradnika Danijele Paulik, zbog svih dodijeljenih savjeta, riječi podrške i smirenja, ugodne i nasmijane atmosfere tijekom rada u laboratoriju.

Veliko hvala dragim prijateljima i kolegama koji su razdoblje studiranja olakšali svojim razumijevanjem i podrškom.

Najveće hvala ostavljam svojoj obitelji, na svemu!

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. Ulja biljnog podrijetla.....	5
2.1.1. Sastav i primjena biljnih ulja.....	5
2.2. Maslinovo ulje.....	7
2.2.1. Građa i sastav ploda maslina.....	8
2.2.2. Vrste maslinovog ulja.....	8
2.2.3. Proces proizvodnje maslinovog ulja.....	10
2.2.4. Kemijski sastav maslinovog ulja.....	13
2.2.5. Pakiranje i skladištenje maslinovog ulja.....	13
2.2.6. Maslinovo ulje u Hrvatskoj.....	14
2.3. VRSTE KVARENJA JESTIVIH BILJNIH ULJA.....	16
2.3.1. Kemijski procesi.....	16
2.3.2. Enzimski i mikrobiološki procesi.....	18
2.4. STUPANJ OKSIDACIJE I OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA.....	19
2.4.1. Metode određivanja stupnja oksidacije ulja.....	19
2.4.2. Analitičke metode za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja.....	23
2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA.....	24
2.5.1. Vrste stabilizatora biljnih ulja.....	24
2.5.2. Mehanizmi djelovanja stabilizatora.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	27
3.1. ZADATAK RADA.....	28
3.2. MATERIJALI.....	29
3.3. METODE.....	34
3.3.1. Priprema uzoraka.....	34
3.3.2. Određivanje parametara kvalitete ulja.....	36
3.3.3. Određivanje karakteristika za identifikaciju ulja.....	39
3.3.4. Određivanje sastava masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno- ionizacijskim detektorom (GC - FID).....	42
4. REZULTATI.....	43
5. RASPRAVA.....	49
6. ZAKLJUČAK.....	53
7. LITERATURA.....	56

Popis oznaka, kratica i simbola

Abr	Anisidinski broj
BHA	Butil hidroksianisol
BHT	Butil hidroksitoluen
IP	Indukcijski period
MUFAs	Mononezasićene masne kiseline
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Natrijev tiosulfat
NaOH	Natrijev hidroksid
NMK	Nezasićene masne kiseline
OV	Oksidacijska vrijednost ili Totox broj
Pbr	Peroksidni broj
PF	Zaštitni faktor
PUFAs	Polinezasićene masne kiseline
SMK	Slobodne masne kiseline
TBHQ	Tercijarni butilhidrokinon
ZMK	Zasićene masne kiseline

1. UVOD

Maslinarstvo je u pogledu gospodarstva vrlo značajna grana u našoj poljoprivrednoj proizvodnji, a samim time je maslinovo ulje jedan od najstarijih prehrambenih proizvoda namijenjenih za ljudsku upotrebu. Ulje dobiveno iz ploda masline (*Olea europaea*) ima dugu povijest i vrlo je značajno zbog svojih ljekovitih, kozmetičkih i prehrambenih svojstava. U Hrvatskoj plodovi zimzelenog drveta *Olea Europaea L.* su najviše zastupljeni u mediteranskom području, tj. u Dalmaciji i Primorju.

Kako bi se dobilo maslinovo ulje, koristimo nekoliko ključnih tehnoloških koraka. Najbitniji koraci za proizvodnju maslinovog ulja uključuju: pranje plodova i uklanjanje nečistoća, mljevenje, miješanje, izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta i odvajanje ulja od biljne vode. Djevičansko maslinovo ulje je jedno od rijetkih ulja koje se dobije jednostavnim cijedenjem voćnog ploda masline. Karakterizira ga intenzivan okus i miris, visoka biološka vrijednost i blagotvoran utjecaj na zdravlje ljudi (Koprivnjak, 2006). Sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama proizvoda što predstavlja najkvalitetniji tip maslinovog ulja. Pored oleinske masne kiseline, prisutne su linolna i linolenska masna kiselina (Zadro, 2007).

Primjenjivost biljnih ulja i njihova kvaliteta ovisi o oksidativnoj stabilnosti. Oksidacijom dolazi do nepoželjnih senzorskih, kemijskih i nutritivnih promjena. Spojevi fenolne strukture koji usporavaju oksidacijsko kvarenje su antioksidansi koji mogu biti prirodni i sintetski. Reagiraju sa slobodnim radikalima koji nastaju oksidacijom nezasićenih masnih kiselina i na takav način zaustavljaju oksidacijsko kvarenje (Zadro, 2007).

Postoje različite metode za procjenu oksidacijske stabilnosti ili dugotrajnosti biljnih ulja koje se baziraju na ubrzanoj oksidaciji ulja. Metode koje se koriste su: OSI indeks, Schaal oven test, Rancimat test i AOM test.

Glavni cilj ovog istraživanja je bio analizirati oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, te istražiti utjecaj dodatka prirodnih antioksidansa na njihovu promjenu. Analizirane su bile hrvatske sorte maslina *Istarska bjelica* i *Coratina*. Oksidacijska stabilnost je ispitivana putem Oven testa, koji je proveden na temperaturi od 63 °C. U istraživanju su korišteni različiti antioksidansi uključujući ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt ružmarina, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola i propil galat, te sinergisti poput kafeinske i limunske kiseline. Antioksidansi su dodani u određenim koncentracijama kako bi se procijenio njihov utjecaj na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Kroz ovo istraživanje, zadatak je bio dobiti uvid u djelotvornosti različitih prirodnih antioksidansa u produženju oksidacijske stabilnosti, te će rezultati pružiti informacije o njihovoj potencijalnoj primjeni u industrijama, s naglaskom na produljenje trajnosti ulja i očuvanje kvalitete.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ulja biljnog podrijetla

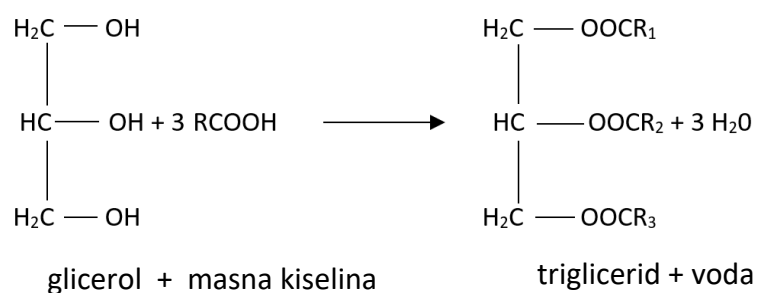
Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/19), ulja biljnog podrijetla su proizvodi koji se dobivaju iz sjemenki ili plodova biljaka, sastoje se od triglicerida, masnih kiselina, a mogu sadržavati i neznatne količine drugih lipida kao što su fosfolipidi, neosapunjive tvari, voskovi, monogliceridi, digliceridi, slobodne masne kiseline i druge sastojke. Ovisno o tehnološkom postupku koji se primjenjuje u proizvodnji, ulja biljnog podrijetla se razvrstavaju u sljedeće kategorije: rafinirana ulja, hladno prešana ulja i djevičanska ulja.

Hladna prešana ulja su dobivena mehaničkom ekstrakcijom ulja iz uljarica pri sobnim temperaturama i bez dodatka otapala, ne uključuju kemijsku ni toplinsku ekstrakciju, te samim time su najkvalitetnija kategorija jestivih ulja (Çakaloğlu i sur., 2018). Djevičansko maslinovo ulje se za razliku od većine ulja dobivenih iz sjemenki, dobiva nizom mehaničkih, tehnoloških operacija dovođenjem topline čiji je cilj izvući ulje iz stanica pulpe (maslina) (Šarolić i sur., 2014). Rafinirana ulja su dobivena postupkom rafinacije gdje se uklanjaju nepoželjni, negliceridni sastojci, kao što su fosfolipidi, oksidirane tvari, tragovi metala, sumporni spojevi i dr., ali se također mogu ukloniti i poželjni sastojci poput antioksidansa i vitamina (Gunstone, 2011). Postupak rafinacije sastoji se od: deguminacije, neutralizacije, dekoloracije i dezodorizacije (Zadro, 2007).

2.1.1. Sastav i primjena biljnih ulja

Atomi ugljika, vodika i kisika su glavni građevni blokovi ulja. Biljna ulja su uglavnom pri sobnoj temperaturi fluidni hidrofobni sustavi, a dobiju se obradom sjemenki različitih biljaka kao što su uljana repica, kikiriki, pamuk, suncokret i drugi. Ulje se sastoji od lipida, tj. triglicerida s različitim masnim kiselinama. Na **Slici 1.** je prikaz stvaranja triglicerida, koji nastaju reakcijom alkohola glicerola i tri masne kiseline, uz istovremeno nastajanje molekule vode. Trigliceridi nastaju kada se sve tri hidroksilne skupine glicerola zamijene s masnom kiselinom, uz sveukupno nastajanje tri molekule vode (Gupta, 2017). Masne kiseline koje su

najčešće prisutne su: miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i druge. Viša točka topljena je povezana s brojem ugljikovih atoma u njihovom lancu, kao i s manjim brojem dvostrukih veza između ugljika. Ostali hidrofobni spojevi koji mogu biti prisutni u biljkama su steroli, karoteni, tokoferoli i fosfolipidi (Holt, 2016).



Slika 1 Nastajanje triglicerida i vode reakcijom glicerola i masne kiseline
(Gupta, 2017)

Posljednjih godina je značajno porasla proizvodnja biljnih ulja (suncokretovo, laneno, repičino, maslinovo, sojino i dr.), koja se smatraju velikim gospodarskim resursom koji se uglavnom koristi u prehrambenoj industriji ili kao sirovina za proizvodnju biodizela, te u farmaceutskoj industriji i dr. (Holt, 2016). Koriste se u hrani, gorivu, mazivima, kao prehrambeni aditivi i dodaci, u kozmetici i biomedicini. Privlače puno pažnje u komercijalnom razvoju zbog svoje lake dostupnosti, niske cijene, biorazgradivosti i blagog utjecaja na okoliš. Međutim, njihova niska oksidacijska stabilnost može ograničiti njihovu upotrebu (Carvalho da Silva i sur., 2022).

2.2. Maslinovo ulje

Maslina pripada razredu *Magnoliatae*, podrazredu *Asteridae*, redu *Oleales*, porodici *Oleaceae*, rodu *Olea*. Grmlje sa zimzelenim ili listopadnim lišćem i biljke stablašice su predstavnici porodice *Oleaceae*. Korijen masline je razgranat, te ovisno o prirodi tla nalazi se na dubini od 15-80 cm. Korijen ima funkciju učvršćenja stabla, upijanja mineralnih sastojaka i vode iz tla i obnavljanja biljke. Plod je koštuničava bobica, debljine 1-1,5 cm, dužine 1-3 cm. Na početku je zelenkaste boje, a kada sazrije boja varira između tamnomodre ili crne boje (**Slika 2**), s time da poneke sorte i u zriobi zadržavaju zelenu boju. Plodovi se obogaćuju uljem krajem kolovoza i u mjesecu rujnu (Večernik, 2003).



Slika 2 Plod masline (Kantoci, 2006)

Maslinovo ulje se konzumira od davnina i njegova proizvodnja podrazumijeva važnu ulogu u nekim zemljama, posebno u mediteranskim područjima. Maslinovo ulje kao prehrambena namirnica je jedna od ključnih komponenti Mediteranske prehrane koja je zbog svojih priznatih svojstava i kulturološkog značaja, 2010. godine upisana na UNESCO-VU listu nematerijalne kulturne baštine čovječanstva. Maslinovo ulje ima mnoge ljekovite i nutritivne učinke. Osim što jača imunološki sustav i služi kao pomoć u zaštiti od virusa, također je učinkovito u borbi protiv raka, oksidativnog stresa, bolesti srca, visokog krvnog tlaka, pretilosti, dijabetesa i osteoporoze (De Leonardis, 2014).

2.2.1. Građa i sastav ploda maslina

Plod masline se sastoji od:

- kožice ploda masline,
- pulpe ploda masline,
- sjemenke masline.

Osnovni dijelovi su kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) i koštica (endokarp), unutar koje se nalazi sjemenka (endosperm). Temeljni preduvjet za dobivanje kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja se neoštećena i kvalitetna sirovina, te također optimalno zreo i svjež plod masline. Masa ploda masline određena je uvjetima uzgoja i genetičkim karakteristikama sorti pa je samim time prosječna vrijednosti 0,5 do 20 g. Plod sadržava 40-70 % vode, 6-25 % ulja te 24-35 % ostalih sastojaka gdje pripadaju organske kiseline, šećeri, biljna vlakna, bjelančevine, mineralne tvari, fenolne tvari, tvari boje i dr. (Koprivnjak, 2006).

2.2.2. Vrste maslinovog ulja

Maslinovo ulje se s obzirom na kvalitetu može podijeliti na:

1. Djevičansko maslinovo ulje,
2. Rafinirano maslinovo ulje,
3. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja,
4. Sirovo ulje komine maslina,
5. Rafinirano ulje komine maslina,
6. Ulje komine maslina (Pravilnik o uljima od ploda i komine masline, NN 7/2009).

Maslinovo ulje u usporedbi s vinom starenjem ne dobiva na kvaliteti (Kantoci, 2006).

Općenito se maslinova ulja klasificiraju prema Pravilniku o uljima od ploda i komine masline što je prikazano u **Tablici 1**. Pravilnikom su određeni opći zahtjevi kakvoće ulja koja su namijenjena za tržište, odnose se na kategorije ulja, definicije proizvoda i nazive. Kriteriji za razvrstavanje su senzorska i fizikalno-kemijska svojstva što je prikazano u **Tablici 1**.

Tablica 1 Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva pojedinih kategorija ulja od ploda i komine masline (Pravilnik o uljima od ploda i komine masline, NN 7/2009)

kategorija	Slobodne masne kiseline %	Peroksidni broj mmol O ₂ /kg	Voskovi mg/kg	2-gliceril monopalmitat %
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,8	≤10	≤ 250	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 ≤1,0 ako je udio palmitinske kiseline % >14
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 2,0	≤ 10	≤ 250	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,0 ako je udio palmitinske kiseline % >14
3. Maslinovo ulje lampante	> 2,0	-	≤ 300(3)	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,1 ako je udio palmitinske kiseline % >14
4. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,3	≤2,5	> 350	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,1 ako je udio palmitinske kiseline % >14
5. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	≤ 1,0	≤7,5	≤ 350	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,0 ako je udio palmitinske kiseline % >14
6. Sirovo ulje komine masline	≤ 0,3	≤2,5	> 350 (4)	≤ 1,4
7. Rafinirano ulje komine masline	≤ 0,3	≤2,5	> 350	≤ 1,4
8. Ulje komine masline	≤ 1,0	≤7,5	> 350	≤ 1,2

Osim spomenutih kategorija, ulja se razvrstavaju i prema izraženosti senzorskih svojstava:

1. Lagana ulja,
2. Srednja ulja,
3. Intenzivna ulja (Zadro, 2007).

Ovisno o trajanju čuvanja dijele se na:

1. Nova ulja- do četiri mjeseca starosti (voćan miris i okus po plodu),
2. Svježa ulja- do osam mjeseci (blaži voćni okus i miris),
3. Mlada ulja- do dvanaest mjeseci starosti (Zadro, 2007).

2.2.3. Proces proizvodnje maslinovog ulja

Postupci prerade masline u ulje uključuju:

1. Pranje plodova i uklanjanje nečistoća,
2. Mljevenje,
3. Miješenje,
4. Izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta,
5. Odvajanje ulja od biljne (vegetativne) vode.

Berba maslina se obavlja pri kraju listopada, tijekom studenog i prosinca, a može se produžiti i do siječnja iduće godine. Maslina nejednako dozrijeva, pa u trenutku berbe postoje djelomično i potpuni zreli plodovi. Maslina se može brati ručno, upotrebom strojeva ili kombinirano. Ovisno o vremenu čuvanja do prerade, plodovi se mogu čuvati u morskoj vodi, slatkoj vodi ili u otopini vode s dodanom soli. Međutim, najbolja kvaliteta ulja se postiže kada se prerada obavlja odmah nakon berbe dok su plodovi u svježem stanju. Zreli plodovi maslina koji su namijeni za proizvodnju sadrže 18-25 % ulja i 40-55 % vode (Večernik, 2003).

Plodovi maslina nakon berbe i dovodom u pogon sadrže različite nečistoće kao što su kamenje, zemlje, lišće, te je takve nečistoće potrebno ukloniti jer mogu negativno utjecati na kvalitetu ulja. Pored toga što negativno utječu na kvalitetu ulja, mogu umanjiti efikasnost ekstrakcije ulja i oštetiti dijelove strojeva. Uklanjanje lišća je bitnije ako se za mljevenje koriste metalni mlinovi, jer se povećava mogućnost prelaska tvari iz lišća u ulje budući da se listovi usitne u sitne djeliće. Kod upotrebe kamenih mlinova to nije slučaj. Međutim, zaostatak lišća do 3 % u odnosu na masu ploda može biti i poželjan kada se radi o zrelim maslinama

(Koprivnjak, 2006). Od grančica i lišća oslobođene i oprane masline se drobe i usitnjavaju pomoću kamenih ili metalnih mlinova. Dolazi do razaranja stanične strukture mesa ploda gdje započinje oslobađanje kapljica ulja iz vakuole. Oslobađanjem ulje dolazi u kontakt s kisikom, tvarima iz sjemenke i kože. U takvoj situaciji dolazi do niza kemijskih, fizikalnih i biokemijskih procesa koji utječu na svojstva i sastav ulja koje se izdvaja. Mljevenjem se treba dobiti što više ulja, a da se ono što manje rasprši u sitne kapljice i ne dovede u stanje emulzije. Budući da izostanak emulzije i krupnije kapljice olakšavaju izdvajanje ulja iz tijesta, te također niža temperatura tijesta je prikladnija zbog nastanka poželjnih mirisnih tvari. Kameni mlinovi su najstariji uređaji koji se koriste u proizvodnji maslinovog ulja. Građeni su od kružne podloge i teških valjaka. Prilikom okretanja i pritiskom o podlogu mlinovi drobe maslinu i mijese maslinovo tijesto. Međutim, zbog manjeg zauzimanja prostora i većeg kapaciteta, metalni mlinovi su počeli biti sve učestaliji u proizvodnji, iako kameni mlinovi imaju prednost jer stvaraju manje emulzije. Mlinovi čekićari se sastoje od rupičastog obruča unutar koje se vrti nosač s čekićima. Unutar obruča plod se drobi zbog udarca i protiskivanja kroz rupice. U upotrebi su i mlinovi s rotirajućim diskovima sa zupcima kod kojih se plod usitnjava silom udarca i silom rezanja (Zadro, 2007).

Samljevene masline se mijese u tijesto kako bi se razbila emulzija ulja u vodi i ujedinile kapljice ulja do veličine koja je prikladna za izdvajanje. Proces se odvija u koritima od nehrđajućeg čelika unutar kojeg se okreću metalni mješači (**Slika 3**). Korita imaju dvostruku stijenku unutar koje struji topla voda. Umjereni dovod topline, zagrijavanje tijesta i dulje miješenje rezultira boljem izdvajanju ulja. Tijekom miješenja aktiviraju se enzimi koji potiču oksidaciju (peroksidaze i polifenoloksidaze), te dolazi do degradacije poželjnih tvari okusa i oksidacije nezasićenih masnih kiselina. Uklanjanjem kisika kao sudionika u reakcijama oksidacije moguće je inhibirati njihovo djelovanje. Pri kraju miješenja potrebno je dobiti tijesto u kojem su se kapljice ulja spojile u kontinuiranu uljnu fazu, jer se time olakšava izdvajanje uljnog mošta ili ulja (Zadro, 2007).



Slika 3 Miješenje maslinovog tijesta (Web 1)

Postupci izdvajanja uljnog mošta iz tijesta se provode primjenom sile pritiska kod prešanja. Kod procjeđivanja se izdvajaju zbog razlike u površinskoj napetosti ulja, vode i krutih čestica, te kod centrifugiranja zbog razlike u gustoći ovih triju komponenti. Uljni mošt (mješavina ulja i vode) se iz maslinovog tijesta izdvaja postupkom prešanja. Premaz tijesta debljine 3 cm se stavlja na filtrirajuće slojnice kružnog oblika koje su izgrađene od sintetičnih ili biljnih vlakana, a između svakih nekoliko slojnica se ubacuje metalni disk. Ubacivanjem metalnog diska se omogućava ravnomjerna raspodjela tlaka i osigurava stabilnost. Sabijanje stupca između glave hidraulične preše i klipa se obavlja postupno kako bi ulje imalo dovoljno prostora i vremena za izlazak iz filtrirajućih slojnica. Nakon završenog prešanja, slojnice se strojno ili ručno odvoje od komine, operu i vrata u proces. Iskorištenje ulja kod procesa prešanja je 85-90% što ovisi o vremenu prešanja, tlaku preše i o pripremi maslinovog tijesta. Opisani postupak prešanja se odnosi na upotrebu hidrauličnih preša jer su najčešće u praksi (Koprivnjak, 2006).

Zadnja tehnološka operacija je izdvajanje zaostale biljne vode i čvrstih čestica iz uljnog mošta. Koriste se vertikalne centrifuge koje su sastavljene od metalnih konusnih diskova koji su složeni u obliku stošca kroz čije središte ulazi uljni mošt. Tekućina manje gustoće, tj. ulje, kreće se između konusnih diskova prema osi vrtnje, dok se krute čestice i biljna voda kreću prema bubnju centrifuge. Mlada djevičanska ulja često znaju nakon ovog postupka ostati mutna zbog sitnih kapljica biljne vode i čestica biljnog tkiva jer ostaju raspršeni u ulju. Kroz par

mjeseci tvari se istalože na dno spremnika, te se onda izbistreno ulje odvoji od taloga. Postupkom filtracije netom proizvedenog ulja se može spriječiti mutnoća ulja (Zadro, 2007).

2.2.4. Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje se sastoji od dvije osnovne frakcije: osapunjive i neosapunjive frakcije. Glavni sastojci koji pripadaju osapunjivim frakcijama su trigliceridi, fosfolipidi i masne kiseline. Ugljikovodici, steroli, fenolne tvari i tokoferoli pripadaju neosapunjivim frakcijama. Najveći udio maslinovog ulja zauzima oleinska masna kiselina koja je ujedno jednostruko nezasićena masna kiselina, te linolna i linolenska kiselina kao višestruko nezasićene masne kiseline. Od vitamina koji su topljivi u mastima, u maslinovom ulju se nalaze vitamin E i K. Vitamin E je alfa tokoferol, koji ima najbolje biološko djelovanje (Zadro, 2007).

Maslinovo ulje sadrži prirodne antioksidanse poput karotenoida, tokoferola, sterola i fenolnih spojeva koji čine 27 % nesaponificiranog dijela. Nesaponificirajući sastojci u maslinovom ulju čine otprilike 1-2 % ukupnog sastava, pri čemu veći dio predstavljaju fitosteroli, koji su poznati po svojim biološkim učincima poput citostatske aktivnosti, prevencije raka i kontrole razine kolesterola u krvi. Glavni fenoli identificirani u maslinovom ulju su galna, kafeinska, vanilna, p-kumarinska, ferulična, sirnična, p-hidroksibenzojeva kiselina, homovanilna, protokatehinska kiselina, hidroksitirozol i tirozol. Fenolni spojevi utječu na stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja tijekom skladištenja, te također imaju sposobnost usporavanja ili inhibicije rasta nekoliko bakterija i mikrogljivica (De Leonardis, 2014).

2.2.5. Pakiranje i skladištenje maslinovog ulja

Do punjena u boce jestivo ulje se mora zaštititi od svjetlosti, kisika iz zraka i topline. Temperature prostora u kojem se nalazi ulje moraju biti niske da ne ubrzavaju kemijske reakcije, ali treba paziti da ne dođe do skrućivanja ulja. Najprikladnije temperature su između 14 °C i 18 °C. Ulje se prvo skladišti u spremnike od nehrđajućeg čelika jer pružaju dobru zaštitu od nepovoljnih čimbenika. Spremnik od nehrđajućeg čelika štiti od vlage, topline, svjetlosti i kisika (**Slika 4**). Spremnik treba biti lako periv i biti napravljen od materijala koji je inertan u

odnosu na maslinovo ulje. Ulje je potrebno čuvati s minimalnom količinom natprostora u spremniku, ili natprostor napuniti plinom dušikom. Zaštitu od nepovoljnih čimbenika potrebno je osigurati i prilikom punjenja u boce te stavljanja na tržište. Spremnike od plastičnog materijala treba izbjegavati jer ne pružaju dovoljnu zaštitu ulju. Najprikladnije su boce od tamnog stakla koje štite ulje od utjecaja svjetlosti, te čuvanje u hladnijim prostorijama. Otvorenu bocu ulja je najbolje što prije potrošiti zbog negativnog utjecaja kisika iz zraka (Zadro, 2007).



Slika 4 Spremnici od nehrđajućeg čelika (Web 2)

2.2.6. Maslinovo ulje u Hrvatskoj

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, u Hrvatskoj se broj stabala masline kreće od 3 do 3,5 milijuna. Prosječna potrošnja ulja u Hrvatskoj po stanovniku iznosi 0,7 do 1,5 litara. Hrvatska ima dobro i plodno tlo za uzgoj maslina. Uzgaja se na otocima i obalnom pojasu, te u pojedinim dijelovima unutrašnjosti. Istra je područje gdje maslina dobro uspijeva, daje ulje visoke kvalitete i donosi bogat urod zbog svoje dobre sredozemne klime. Najstarija maslina na tom području je Brijunska maslina. Najjužnija podregija za uzgoj masline je područje Dubrovačko-neretvanske županije. Dubrovačko područje je najtopliji dio Hrvatske, te stabla masline samim time neće stradati od hladnoće. Maslina se najviše uzgaja na tlu kao što su crvenica i smeđe primorsko tlo. Područje Kvarnera i Primorja nije pogodno za uzgoj masline zbog snažne bure s planina i kontinentalne klime. Uzgoj je moguć jedino na

vapnenačkim podlogama, crvenicama i smeđem tlu koja su dovoljno duboka. Na kvarnerskom području najpoznatija sorta je Oblica. Na području Sjeverne Dalmacije postoji oko 800 000 stabala masline na više od 6000 ha. Pored vinove loze maslina je najvažnija voćarska kultura na tom području. Na otocima Hvaru, Braču, Šolti i Drveniku uzgoj masline je raširen, dok na ostatku Srednje Dalmacije ne toliko zbog niže temperature i padalina.

Istarska bjelica je podrijetlom iz područja Boljunca kod Trsta. Najviše je rasprostranjena po Istri i Kvarneru. Plod je srednje veličine i jajolikog oblika (**Slika 5**). Tijekom zriobe boja im se mijenja od svjetložute do ljubičaste boje. Dozrijeva kasnije nego druge sorte, sredinom ili krajem studenoga. Zreli plod ima visok udio ulja, oko 24 % ulja. Ulje je visoke kvalitete, izražene pikantnosti i gorčine. Karakterizira je otpornost na niske temperature, ali je osjetljiva na maslinovu muhu.



Slika 6 *Istarska bjelica* (Web 3)

Coratina je sorta masline koja se može pronaći na istočnoj obali Jadrana. Plod je asimetričan, jajolik i srednje veličine čija je masa 4-6 grama (**Slika 6**). Dozrijeva kasno i dugo se zadržava na stablu. Zreli plodovi crne boje se nalaze samo na vrhu krošnje. Toplija i zaštićenija područja su bolja za uzgoj. Udio ulja iznosi od 21 % do 26 %. Osjetljiva je na paunovo oko i rak masline. *Coratina* daje ulje izrazite voćne arome, pikantnog okusa i visoke kvalitete, te također daje ulje koje je bogato polifenolima (Zadro,2007).



Slika 5 Coratina (Web 4)

2.3. VRSTE KVARENJA JESTIVIH BILJNIH ULJA

Biljna ulja su proizvodi koji imaju ograničeno vrijeme trajanja te su zbog toga podložna nepoželjnim promjene kao što su mikrobiološki ili enzimski i kemijski procesi koji će rezultirati kvarenjem ulja. Najučestaliji oblik kvarenja je oksidacijsko kvarenje, gdje dolazi do oksidacije masnih kiselina u ugljikovodikovom dijelu lancu. Oksidacijska stabilnost biljnih ulja predstavlja period tijekom kojeg ulje može zadržati svoju kakvoću i tako izbjeći proces autooksidacije. Zbog toga je poznavanje oksidacijske stabilnosti važno kako bi se odredio rok trajanja ulja. Brzina autooksidacije ovisi o uvjetima skladištenja, sastavu ulja, skladištenju ulja, prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju oksidaciju (prooksidansi) i sastojaka koji usporavaju oksidacije (antioksidansi). Vrlo male količine produkata autooksidacije mogu utjecati na promjenu senzorskih svojstava, uzrokujući neugodan okus i miris (Moslavac i sur., 2009).

2.3.1. Kemijski procesi

Autooksidacija, termooksidacijske promjene i reverzija spadaju u kemijske procese koji uzrokuju kvarenje biljnih ulja.

Proces koji rezultira nepoželjnim promjenama ulja je autooksidacija. Oksidacijska stabilnost ulja predstavlja sposobnost ulja da se ne podvrgne procesu autooksidacije tijekom određenog vremenskog perioda. To je lančana reakcija koja se odvija u tri faze: inicijacija,

propagacija i terminacija. Kvarenje se događa kada dolazi do oksidacije ugljikovodikovih lanaca masnih kiselina u ulju. Tijekom autooksidacije nastaju različiti produkti raspadanja ulja, uključujući primarne, sekundarne i tercijarne produkte. Ti produkti negativno utječu na miris, okus i stabilnost ulja. Autooksidacija se odvija prilikom izlaganja svjetlu, ionima metala i kisiku. Prisutnost tragova metala je nepoželjna jer ioni metali iniciraju reakciju autooksidacije i smanjuju stabilnosti ulja tijekom skladištenja. Najčešći ioni metala koji se nalaze u sirovom ulju su kalcij, magnezij, željezo i bakar. Reakcija autooksidacije započinje djelovanjem kisika iz zraka na dvostruke veze nezasićene masne kiseline. Dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Slobodni radikali imaju jedan nesparen elektron i reaktivni su. Autooksidacija ne može biti u potpunosti zaustavljena, ali se može kontrolirati primjenom odgovarajuće temperature ulja, korištenjem antioksidansa koji reagiraju sa slobodnim radikalima, zaštiti od utjecaja kisika, a koncentracija iona metala bi trebala biti svedena na minimum. Također, sjemenke i plodovi mogu biti oštećeni tijekom rukovanja i dostave, što uzrokuje hidrolizu i autooksidaciju ulja u sjemenkama. Ovaj tip oksidacijskog procesa se događa tijekom prerade, skladištenja, distribucije ulja i prehrambenih proizvoda koji sadrže ulja (Gupta, 2017).

Termooksidacija ulja je proces koji se provodi na temperaturama iznad 150°C. Pod utjecajem vodene pare, zraka i visoke temperature dolazi do nastajanja nepoželjnih produkata termooksidacije. Ovakav proces je karakterističan kod prženja hrane gdje se javljaju hidrolitičke, oksidativne i toplinske reakcije koje dovode do stvaranja oksidiranih i polimeriziranih produkata koji su nepoželjni (Brenes i sur., 2002). Kemijski mehanizam termooksidacije je u osnovi isti kao mehanizam autooksidacije, ali brzina termooksidacije je brža. Visok udio zasićenih masnih kiselina u nekim industrijskim uljima za prženje predstavlja problem u slučaju kada je potrebno održavati proizvod u tekućem stanju. Biljna ulja poput suncokretovog, sojinog, kukuruznog itd. često se smatraju nestabilnima za kontinuirano prženje zbog udjela nezasićenih masnih kiselina. Također, prisutnost prirodnih tvari poput tokoferola poboljšava njihovu stabilnost pri višim temperaturama. Duboko prženje smanjuje udio nezasićenih masnih kiselina i povećava polarne tvari. Neke od metoda koji se koriste za procjenu degradacije ulja tijekom prženja su: procjena peroksidnog broja, jednog broja, masnih kiselina, polarne komponente itd. (Marinova i sur., 2012).

Ulja s visokim sadržajem linolenske kiseline su sklonija procesu reverzije. Stoga se pretpostavlja da trigliceridi koji sadrže linolensku kiselinu i druge nezasićene masne kiseline igraju važnu ulogu kao prekursori okusa reverzije u jestivim uljima. Ulje procesom reverzije poprima neugodan okus i miris koji je sličan ribi i mirisu sijena. Hidrogenacijom tj. uklanjanjem linolenske kiseline se može inhibirati kvarenje reverzijom (Daubert, 1953).

2.3.2. Enzimski i mikrobiološki procesi

Enzimsko i mikrobiološko kvarenje jestivih biljnih ulja zahtjeva prisutnost mikroorganizama i enzima uz odgovarajuće uvjete kao što su količina vode, optimalna temperatura i pH.

Podjela mikrobioloških i enzimskih kvarenja biljnih ulja obuhvaća:

1. Hidrolitičku razgradnju,
2. β - ketooksidacija.

Hidrolitička razgradnja se provodi u pod utjecajem vode zbog prisustva lipolitičkih enzima. Lipolitički enzimi mogu biti oslobođeni iz mikroorganizama ili iz samog ploda. Prilikom kvarenja dolazi do oslobađanja jedne, dvije ili tri molekule masne kiseline i to kod hidrolize triglicerida. Najoptimalnija temperatura koja aktivira lipazu je 45°C, dok ju temperatura iznad 80 °C i ispod -20 °C inaktivira. Samim time hidrolitičko kvarenje može započeti još u samom plodu masline, ukoliko se plod ošteti tijekom berbe. Nastavlja se u fazama pripreme za preradu i u fazi same prerade. Također, kvarenje se može odvijati i u gotovom proizvodu, posebice ukoliko nije potpuno odvojeno od vegetabilne vode, te se nastavlja i tijekom skladištenja ulja. Hidrolitičko kvarenje uzrokuje povećanje kiselosti ulja, tj. povećanje slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline (SMK) su izražene kao % oleinske kiseline. Karboksilna skupina koja se nalazi u SMK ubrzava razgradnju peroksida, što potiče kvarenje ulja. Maksimalna koncentracija slobodnih masnih kiselina je određena za svaku kategoriju posebno, a to je uređeno Pravilnikom o uljima od ploda i komine masline (NN 7/2009).

β - ketooksidacijsko kvarenje je tipično za ulja i masti koje sadrže pretežito masne kiseline srednje i kraćeg lanca. Beta-ketooksidacija nastaje djelovanjem mikroorganizama uključujući gljivice roda *Aspergillus* i *Penicillium*, kao i bakterije *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*. Kod beta-ketooksidacije, mikroorganizmi napadaju zasićene masne kiseline u prisutnosti kisika iz zraka, posebno metilensku skupinu u beta-položaju prema karboksilnoj skupini. Kao rezultat tog djelovanja mikroorganizama, nastaju beta-keto kiseline kao primarni produkti, dok se metil keton formira kao sekundarni produkt reakcije kvarenja (Moslavac, 2021).

2.4. STUPANJ OKSIDACIJE I OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA

Kao što je poznato, oksidacija masti i ulja je glavni uzrok narušavanja kvalitete, stoga je oksidacijska stabilnost temeljni aspekt koji se treba uzeti u obzir (Gonzales-Gamallo i sur., 2021).

2.4.1. Metode određivanja stupnja oksidacije ulja

Senzorskim, kemijskim i fizikalnim metodama se može odrediti stupanj oksidacije ulja.

Senzorske metode uključuju okusne, taktilne, njušne i kinestetične doživljaje. Njušni doživljaj se opisuje izrazima kao što su oštro, oporo, kamilica, artičoka, trava, cvjetni, lišće smokve, orah, jabuka, zrelo voće, vanilija, staro, prazno, bobičasto voće, eukaliptus i dr. Pridjevni trpkost i pikantnost se odnose na kinestetične i taktilne doživljaje, dok se slatko i gorko odnose na doživljaje okusa. Fenolne tvari, poput jednostavnih fenola, fenolnih alkohola i kiselina su odgovorne za pikantnost i trpkost ulja visoke kakvoće. Aglikoni su zaslužni za pikantnost i gorčinu. Tvar koja je najzaslužnija za doživljaj gorčine je oleuropein aglikona, a za pikantnost oleokantal. Ulja koja su pikantnija i gorča se dobiju od djelomično zrelih i zelenijih plodova. Okusnim svojstvima doprinose i hlapljive tvari, ali u manjoj mjeri. Najveća količina tvari koja ulju daju svježinu biljnih mirisa nastaju tijekom mljevenja svježih i zdravih plodova. Uzroci pojave nepoželjnih mirisa odnose se na pogreške u fazama skladištenja, prerade i čuvanja ulja što je opisano u **Tablici 2** (Zadro, 2007).

Tablica 2 Standardizirani rječnik nepoželjnih mirisnih i okusnih svojstava (Zadro,2007)

Svojstvo	Opis svojstva
Upaljen plod	Okus i miris ulja koji je dobiven od maslina koje su prije prerade skladištene u sabijenom stanju te zbog povišene temperature i vlage dolazi do fermentacije u anaerobnim uvjetima
Plijesan – vlaga	Okus i miris ulja koji je dobiven od maslina koje su prije prerade čuvane u vlažnim mjestima te je došlo do razvoja kvasaca i plijesni
Uljni talog	Okus i miris ulja koji podsjeća na razgradnju organske tvari; nastaje kontaktom ulja s muljem na dnu spremnika, gdje je došlo do fermentacije u anaerobnim uvjetima
Vinski – octikavo	Okus i miris uzrokovan fermentacijom koja dovodi do stvaranja etanola, etil acetata i octene kiseline
Metalno	Okus i miris svojstven uljima koja su bila u dodiru s nezaštićenim metalnim površinama
Užeglo	Okus i miris ulja koja su izložena oksidacijom
Pregrijano	Okus i miris dobiven zbog predugog zagrijavanja samljevane mase tijekom prerade
Sijeno – drvo	Okus i miris karakterističan za ulja koje je dobiveno preradom presušenih plodova
Grubo – tjestasto	Osjećaj pastoznosti, ljepljivosti i gustoće
Mazivo	Okus i miris podsjeća na naftu, mast za podmazivanje ili mineralno ulje
Biljna voda	Okus i miris koji se dobije zbog dugog dodira biljne vode s uljem
Salamura	Okus i miris od maslina koje su držane u salamuri prije prerade
Športe	Okus i miris dobiven prešanjem plodova na novim slojnicama od biljnih vlakana
Zemlja	Okus i miris dobiven od plodova sa zemlje ili plodova koji su uprljani zemljom koja nije uklonjena prije prerade
Crvljivo	Okus i miris ulja dobiven od maslina koje su bile napadnute ličinkom maslinove muhe
Krastavac	Okus i miris ulja jer je dugo vremena hermetički zatvoreno u limenci

Fizikalne metode se baziraju na UV spektrofotometriji. UV spektrofotometrija se temelji na ovisnosti absorbance o valnoj duljini zračenja koje je prošlo kroz analizirani uzorak. Proizvodi oksidacije polinezasićenih masnih kiselina pokazuju karakterističan spektar u ultraljubičastom području. Primarni oksidacijski produkti imaju maksimum apsorpcije na 232 nm, dok sekundarni produkti imaju maksimum apsorpcije na 270 nm (Dimić i sur., 2000).

Njihov omjer se izražava kao vrijednost R:

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

$A_{232 \text{ nm}}$ – apsorpcija na 232 nm

$A_{270 \text{ nm}}$ – apsorpcija na 270 nm

Ulje je lošije kvalitete što je niža R vrijednost. Ovom metodom se određuje oksidacijski stupanj kod sirovih ulja, a ostale fizikalne metode koje se mogu primjenjivati za određivanje oksidacijskih promjena su:

1. IR- spektrometrija,
2. Nuklearna magnetska rezonanca,
3. Fluoroscencija,
4. Plinska kromatografija,
5. HPLC,
6. Indeks refrakcije,
7. Kulometrija,
8. Kromatografija u koloni,
9. Plinska kromatografija.

Kemijske metode koje se koriste za određivanje stupnja oksidacijskih promjena masti i ulja, mogu se podijeliti na sljedeće kategorije:

- Metode za određivanje primarnih produkata oksidacije, poput hidroperoksida,
- Metode za određivanje sekundarnih produkata oksidacije koji nastaju razgradnjom hidroperoksida.

Određivanje peroksidnog broja, anisidinskog broja, Totox broja su jedne od kemijskih metoda za određivanje stupnja oksidacije ulja. Određivanje peroksidnog broja je jedna od najprimjenjivijih metoda. Mjerenje peroksidnog broja je metoda za analizu primarnih produkata oksidacije biljnih ulja, kao što su peroksidi i hidroperoksidi. Rezultat se izražava kao mmol aktivnog kisika koji nastaje iz dobivenih peroksida prisutnih u 1 kg ulja (mmol O₂/kg). Jednadžba za izračunavanje peroksidnog broja je: (Moslavac i sur., 2010).

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

V₁ = volumen otopine natrij-tiosulfata (mL);

c (Na₂S₂O₃) = 0,01 mol/L utrošen za titraciju uzorka ulja;

V₀ = volumen otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe (mL);

m = masa uzorka ulja (g).

Metoda određivanja anisidinskog broja (Abr) omogućuje izravno mjerenje količine nehlapljivih karbonilnih spojeva, koji predstavljaju sekundarne produkte oksidacije ulja (aldehidi). Nastali su razgradnjom nestabilnih primarnih produkata oksidacije (hidroperoksidi). Prisutnost ne hlapljivih karbonilnih spojeva negativno utječu na senzorska svojstva, trajnost ulja i oksidacijsku stabilnost. Vrijednost Abr se koristi za procjenu trajnosti jestivog ulja, pri čemu što viša vrijednost ukazuje na slabiju trajnost ulja. Smatra se da visokokvalitetno biljno ulje mora imati Abr manji od 10 (nema zakonskih ograničenja). Metoda Abr se temelji na reakciji p-anisidina s višim nezasićenim aldehydima u kiselom okruženju, što rezultira nastankom Schiffove baze.

Kombinacija peroksidnog broja i anisidinskog broja koristi se za određivanje ukupne oksidacijske vrijednosti (OV) biljnih ulja, koja je također poznata kao Totox broj (TB). TB se izračunava pomoću jednadžbe:

$$\text{Totox broj} = 2 \text{ Pbr} + \text{Abr}$$

TB je važan pokazatelj oksidacijske stabilnosti i kvalitete ulja, a pruža informacije o oksidacijskoj prošlosti ulja, dok Pbr ukazuje na trenutno oksidacijsko stanje ulja (Moslavac i sur., 2010).

2.4.2. Analitičke metode za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja

Oven test/Schaal Oven test, Active Oxygen Method/Swift test i Rancimat test su najčešće analitičke primjenjive metode za određivanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja. S obzirom na da ne postoji jedna jedinstvena metoda za određivanje cjelokupnih podataka o oksidacijskom stanju, koristi se više različitih metoda kako bi se dobila ukupna slika o sadržaju primarnih i sekundarnih produkata oksidacije (Dimić i sur., 2000).

Oven test je jedna od starijih metoda koja se koristi za procjenu trajnosti i oksidacijske stabilnosti ulja. Ovom metodom uzorci ulja se zagrijavaju na konstantnoj temperaturi od 63 °C u termostatu, dok se vrijednost peroksidnog broja ili senzorske promjene ulja uzrokovane oksidacijskim kvarenjem prate u određenim vremenskim intervalima. Može se pratiti u satima, danima i tjednima. Rezultat ispitivanih biljnih ulja se prikazuje kao Pbr nakon određenog vremena testiranja, najčešće četiri dana. Ovaj test je izrazito koristan i za međusobno uspoređivanje različitih biljnih ulja po njihovoj oksidacijskoj stabilnosti i trajnosti. Rezultati dobiveni ovim testom pri temperaturi od 63 °C pružaju najpribližniji podatak za procjenu stvarne trajnosti dobivenih ulja. Vrijednost jednog dana održivosti ulja dobivena Oven testom odgovara stvarnoj trajnosti ulja od šest do dvanaest dana pri sobnoj temperaturi koja iznosi oko 20 °C (Moslavac i sur., 2010).

U Rancimat testu, biljna ulja se izlažu ubrzanom kvarenju pri povišenim temperaturama (100, 110, 120 °C) uz stalni dovod struje zraka određene brzine kroz uzorak ulja. Indukcijski period oksidacije ulja se određuje na temelju kratkolančanih hlapljivih organskih kiselina koje se otpuštaju i otapaju u demineraliziranoj vodi. Mjerenjem porasta električne vodljivosti vode, prati se tijek oksidacijskog kvarenja. Dobivena vrijednosti indukcijskog perioda koja je izražena u satima, ukazuje na otpornosti ispitivanog ulja na oksidaciju. Veća vrijednost indukcijskog perioda označava veću trajnost ulja i oksidacijsku stabilnost (Moslavac i sur., 2010).

AOM ili Swift test mjeri vrijeme u satima koje je potrebno da peroksidni broj dostigne određenu vrijednost. Metoda pruža dobre informacije o stabilnosti ulja za salatne preljeve koji ne zahtijevaju visoku temperaturu obrade ulja. Kod metode se koristi toplina i aeracija kako bi se ubrzala oksidacija ulja, uz istovremeno praćenje peroksidnog broja. Većina proizvođača ulja je prestala koristiti ovu metodu jer je otkriveno da druge metode daju korisnije rezultate za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja (Gupta, 2017).

2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA

Postoje razni faktori koji utječu na stabilnost ulja, uključujući sastav ulja, kvaliteta ulja, uvjeti prerade ulja i skladištenje, vrsta ambalaže itd. Ključnu ulogu u stabilizaciji ulja imaju tvari koje sprječavaju, ometaju ili usporavaju oksidacijske reakcije i to na način da deaktiviraju slobodne radikale u sustavu.

2.5.1. Vrste stabilizatora biljnih ulja

Antioksidansi, spojevi najčešće fenolne strukture čija je uloga usporavanje procesa oksidacijskog kvarenja ulja i produžuju trajnost ulja. Antioksidansi mogu biti sintetski i prirodni. To su spojevi koji reagiraju sa slobodnim radikalima, koji su nastali procesom oksidacije nezasićenih masnih kiselina otpuštajući vodik. Dolazi do nastanka stabilnih spojeva i tako se zaustavlja lančana reakcija stvaranja slobodnih radikala. Orto-difenolni spojevi su prirodni antioksidansi u maslinovom ulju. Udio tih spojeva u maslinovom ulju ovisi o uzgoju, sorti masline, kakvoći ploda, stupnju zrelosti ploda, načinu prerade i čuvanju maslinovog ulja.

Također, synergisti utječu na aktivnost antioksidansa. Synergisti su spojevi koji sami ne moraju imati antioksidacijsko djelovanje, a njihova uloga je produljiti djelovanje antioksidansa. Vrlo je poznato sinergijsko djelovanje tokoferola i fosfolipida. Pojedine tvari koje se mogu pronaći u maslinovom ulju kao što su α -tokoferol, β -karoten i polifenoli, sprječavaju toksično djelovanje akumulacije i toksično djelovanje nastalih slobodnih radikala (Zadro, 2007).

Najpoznatiji prirodni antioksidansi su tokoferoli, pored njih se često koriste i drugi antioksidansi koji su dobiveni iz ekstrakata začinskih bilja poput žalfije, zelenog čaja i ružmarina. Ovi antioksidansi su posebno efikasni u stabilizaciji biljnih ulja i životinjskih masti, te zadržavaju svoje antioksidativno djelovanje čak i pri visokim temperaturama (98 °C-194 °C). Bitno je da njihovo dodavanje ne utječe na senzorska svojstva proizvoda poput boje, mirisa i okusa (Moslavac, 2021).

Sintetski antioksidansi koji se najčešće koriste u stabilizaciji ulja i masti su:

- Butil hidroksianisol (BHA),
- Butil hidroksitoluen (BHT),
- Tercijarni butilhidrokinon (TBHQ),
- Propilgalat (PG),
- Butilgalat (BG),
- Oktilgalat (OG),
- Dodecilgalat (DG).

Oni se dodaju u koncentraciji od 0,005 do 0,02 %. Istraživanja su pokazala da je efikasnije dodati smjesu antioksidansa umjesto samo jednog, jer postoji sinergijsko djelovanje između njih. To znači da jedan antioksidans može pojačati djelovanje drugog, što rezultira boljim antioksidacijskim svojstvima. Nije svaki antioksidans synergist drugom, ispitivanjem treba utvrditi koje antioksidanse treba koristiti u smjesi i za koje ulje (Moslavac, 2021).

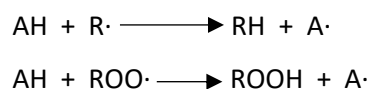
Synergisti su kemijski spojevi koji sami po sebi nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali kada se dodaju zajedno s nekim antioksidansom, produžuju njegovo djelovanje za jedan do tri puta. Najčešće korišteni synergisti su organske kiseline poput octene, limunske i askorbinske kiseline, lecitin, monoizopropil, askorbil palmitat. Važno je napomenuti da svaki synergist nije pogodan za svaki antioksidans (Koprivnjak, 2006).

2.5.2. Mehanizmi djelovanja stabilizatora

Antioksidansi usporavaju oksidacijsko kvarenje pomoću dvije reakcije:

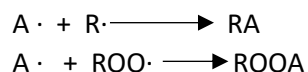
1. Reakcija

Antioksidans (AH) daje vodik (H) koji se veže na slobodni radikal masne kiseline (R·) ili slobodni radikal peroksida (ROO·)



2. Reakcija

Slobodni radikal antioksidansa (A·) se veže na slobodni radikal masne kiseline (R·) ili slobodni radikal peroksida (ROO·)



Obje reakciju zaustavljaju lančanu reakciju oksidacije i tako antioksidans produžuje održivost ulja za 3-6 puta. Jedan od ključnih uvjeta je da antioksidans mora lako oslobađati vodik i zbog toga je velik broj antioksidansa fenolnog tipa jer imaju aktivni H atom (Moslavac, 2021).

Kod sinergista postoje tri ključne reakcije za stabilizaciju:

1. Vežu tragove metala poput bakra (Cu) i željeza (Fe), inaktiviraju ih i sprječavaju njihovo prooksidacijsko djelovanje,
2. Pružaju vodikom atom antioksidansu, regeneriraju ga i produžuju trajanje njegove aktivnosti,
3. Sprječavaju djelovanje antioksidansa na razgradnju peroksida. Sinergist se veže s radikalom antioksidansa i na taj način zaustavlja njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog istraživanja je bio ispitati oksidacijsku stabilnost dva ekstra djevičanska maslinova ulja hrvatskih sorti *Istarska bjelica* i *Coratina*, proizvođača Kalcina Family Tradition. Osim ispitivanja oksidacijske stabilnosti (održivosti) ulja praćen je i utjecaj dodataka poput prirodnih antioksidansa i sinergista. Antioksidansi i sinergisti koji su se koristili u ovom istraživanju su: ekstrakt zelenog čaja udjela 0,2 %, ekstrakt zelenog čaja udjela 0,2 % uz dodatak sinergista limunske kiseline udjela 0,01 %, ekstrakt zelenog čaja udjela 0,2 % uz dodatak sinergista kafeinske kiseline udjela 0,01 %, eterično ulje lavande udjela 0,2 %, ekstrakt ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,2%, ekstrakt ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,2 % uz dodatak sinergista limunske kiseline udjela 0,01 %, ekstrakt ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,2 % uz dodatak sinergista kafeinske kiseline udjela 0,01 %, mješavine tokoferola udjela 0,1 % te sintetski antioksidans propil galat udjela 0,01 %.

Prije ispitivanja oksidacijske stabilnosti su određeni parametri kvalitete i identifikacije ulja (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, udio netopljivih nečistoća, udio vlage, jodni i saponifikacijski broj) primjernom standardnih metoda.

Oven testom pri temperaturi od 63 °C u termostatu se proveo test ubrzane oksidacije ulja, tj. oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, te djelovanje dodanog antioksidansa i sinergista na stabilnost ulja.

Primjenom plinske kromatografije s plameno ionizacijskim detektorom (GC-FID) određen je sastav masnih kiselina ispitivanih ulja.

3.2. MATERIJALI

a) Jestiva biljna ulja

Za ispitivanje oksidacijske stabilnosti koristila su se ekstra djevičanska maslinova ulja hrvatskih sorti *Istarska bjelica* i *Coratina* (Slika 7).



Slika 7 *Istarska bjelica* i *Coratina* (Izvor: autor)

b) Antioksidansi

Korišteni su prirodni i sintetski antioksidansi. Korišteni prirodni antioksidansi su: ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less® CS), ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola i sintetski antioksidans propil galat.

Ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less® CS)

Oxy'Less® CS je prirodni ekstrakt listova ružmarina, botaničkog imena *Romanurus officinalis L.* Prašak bež boje koji je proizveden u firmi Naturex, Francuska. Specifikacija ovog ekstrakta uključuje sadržaj karnosolne kiseline u rasponu od 18 % do 22 %. Također, zaštitni faktor (PF) ovog ekstrakta je veći od 12 %, a suha tvar je od 92 % do 98 % (Slika 8).



Slika 8 Ekstrakt ružmarina (Izvor: autor)

Ekstrakt zelenog čaja

Ekstrakt zelenog čaja je suhi ekstrakt u obliku praha. Dobiven iz listova zelenog čaja roda *Camellia sinensi L.*, te je topljiv u vodi. Proizveden u Hrvatskoj, tvrtka Dankam Solution. Ekstrakt sadrži kofein, L-teanin i 95 % polifenola (**Slika 9**).



Slika 9 Ekstrakt zelenog čaja (Izvor: autor)

Eterično ulje lavande

Eterično ulje lavande je bezbojno do blijedo žućkaste ili zelenkasto- žućkaste boje. Sastoji se od linalola i linalil-acetata (**Slika 10**).



Slika 10 Eterično ulje lavande (Izvor: autor)

Mješavina tokoferola

Mješavina tokoferola je žuto do smeđe-crveno, viskozno ulje bez karakterističnog mirisa. Minimalni udio tokoferola je 95 %. Sastav je: α tokoferol 0-15 %, β tokoferol 5 %, γ tokoferol 55-75 %, δ tokoferol 20-30 %. Proizvođač je DSM Nutritional Products Ltd, Švicarska (**Slika 11**).



Slika 11 Mješavina tokoferola (Izvor: autor)

Propil galat

Propil galat je propilni ester galne kiseline koji se koristi kao sintetski antioksidans. Dolazi u obliku praha koji je sivo bijele boje. Proizvođač je firma Danisco, Danska (**Slika 12**).



Slika 12 Propil galat (Izvor: autor)

c) Sinergisti

Sinergisti koji su se koristili u istraživanju su kafeinska i limunska kiselina.

Kafeinska kiselina

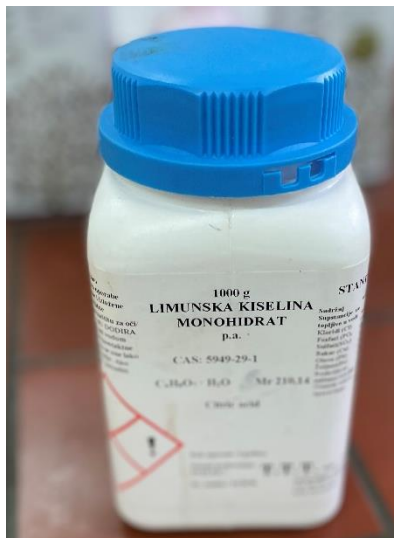
Kafeinska kiselina ($C_{15}H_{10}O_4$) predstavlja organsku hidroksicijamičnu kiselinu. To je žućkasti prah i njezina rasprostranjenost je široka jer predstavlja međuproizvod u sintezi lignina. Proizvođač je firma Sigma (**Slika 13**).



Slika 13 Kafeinska kiselina (Izvor: autor)

Limunska kiselina

Limunska kiselina monohidrat ($C_6H_8O_7$) je u obliku bijele kristalne tvari koja je topliva u vodi. Proizvođač je T.T.T d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska (**Slika 14**).



Slika 14 Limunska kiselina (Izvor: autor)

Svaki antioksidans i synergist dodaje se u određenom udjelu što je prikazano u **Tablicama 3 i**

4.

Tablica 3 Udio dodanog antioksidansa u ispitivana ulja

Antioksidans	Udio dodanog antioksidansa (%)
Ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less® CS)	0,2
Ekstrakt zelenog čaja	0,2
Eterično ulje lavande	0,2
Mješavina tokoferola	0,1
Propil galat	0,01

Tablica 4 Udio dodanog synergista u ispitivana ulja

Synergisti	Udio dodanog synergista (%)
Limunska kiselina	0,01
Kafeinska kiselina	0,01

3.3. METODE

3.3.1. Priprema uzoraka

U staklene čašice se izvaže određena masa antioksidansa, doda se 40 g ulja te se uzorci zagrijavaju na temperaturi 65 °C (**Slika 15**), uz stalno miješanje sa staklenim štapićem. Mora se paziti da temperature ne pređe 70 °C. Nakon toga uzorci se ostave na sobnoj temperaturi da se ohlade i zatim se stavljaju u ventilacijski sušionik na konstantnoj temperaturi od 63 °C (**Slika 16**).



Slika 15 Zagrijavanje uzorka uz miješanje (Izvor: autor)



Slika 16 Pripremljeni uzorci u sušioniku (Izvor: autor)

Svakih 24 sata je potrebno uzorak izvaditi iz sušionika (**Slika 17**), homogenizirati, uzorkovati i ponovno ga vratiti u sušionik koji je podešen na temperaturu od 63 °C.



Slika 17 Sušionik (Izvor: autor)

3.3.2. Određivanje parametara kvalitete ulja

Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj predstavlja indikator svježine tj. užeglosti masti i ulja. Pod utjecajem prooksidansa dolazi do vezanja kisika na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina, te tako nastaju peroksidi odnosno hidroperoksidi. Metoda određivanja se temelji na sposobnosti peroksida da oslobode jod iz otopile kalij jodida koji se onda određuje titracijom s otopinom natrij tiosulfata. Peroksidni broj su mL 0,002 M otopine natrij tiosulfata koji je potreban za redukciju one količine joda koju oslobodi 1 g masti ili ulja iz kalij jodida.

Postupak se provodi tako da se oko 1 g masti ili ulja odvaže u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL. Uzorak se otopi u smjesi ledene octene kiseline i kloroforma, dobro se promiješa i doda KI. Uzorak se mučka jednu minutu, te se razrijedi s već prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom. Dodaje se otopina škroba (indikator) i odmah titrira sa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (**Slika 18**).

Peroksidni broj se izračunava pomoću jednadžbe:

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

V_1 - volumen otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,01 mol/L) utrošen za titraciju uzorka (mL);

V_0 - volumen otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,01 mol/L) utrošen za titraciju slijepe probe (mL);

m - masa uzorka ulja (g).



Slika 18 Promjena boje nakon titracije za određivanje peroksidnog broja (Izvor: autor)

Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Masti i ulja osim što imaju masne kiseline vezane u trigliceridima sadrže i određenu količinu slobodnih masnih kiselina. Udio SMK ovisi o sirovini koja se koristi, načinu prerade i uvjetima skladištenja. Može se izraziti kao:

- Kiselinski broj
- Kiselinski stupanj
- % oleinske kiseline

Postupak započinje tako što se odvaže 5 g masti ili ulja, prelije s neutralnom smjesom etera i etanola te dobro promućka. Dodaje se par kapi otopine fenolftaleina (indikator) i titrira s otopinom NaOH sve dok se boja ne promijeni (**Slika 19**). Udio SMK je izražen kao % SMK odnosno kao % oleinske kiseline, te se izračunava pomoću jednadžbe:

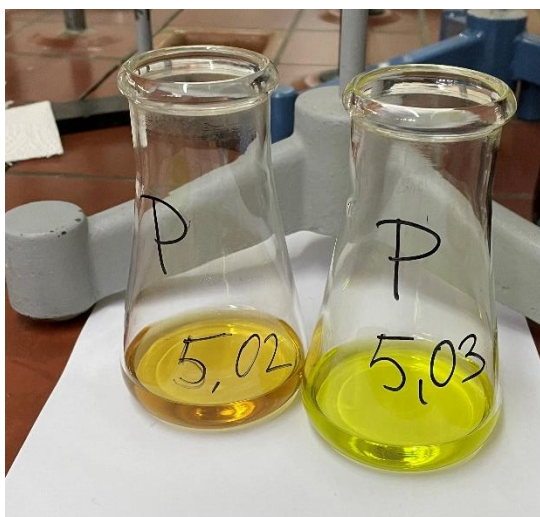
$$\text{SMK (\% oleinske kiseline)} = V \times c \times M / 10 \times m$$

V - volumen otopine NaOH utrošenog za titraciju uzorka (mL);

c - koncentracija otopine NaOH utrošenog za titraciju (0,1 mol/L);

M - molekularna masa oleinske kiseline (282 g/mol);

m - masa uzorka ulja (g).



Slika 19 Promjena boje prilikom titracije kod određivanja SMK (Izvor: autor)

Određivanje netopljivih nečistoća

Netopljive nečistoće u ulju predstavljaju većinom mehaničke nečistoće. Nečistoće mogu biti organski sastojci ili mineralne tvari. U uljima i mastima se mogu pronaći različiti ugljikohidrati, smole, Ca-sapuni, laktoni masnih kiselina, oksidirane masne kiseline, hidroksi masne kiseline i njihovi derivati i tvari s dušikom. Njihova zajednička karakteristika je da se ne otapaju u organskim otapalima. U ulju dobre kvalitete udio netopljivih nečistoća bi trebao biti ispod 0,05%.

Uzorak se tretira organskim otapalom kao što su petrol-eter i n-heksan. Otopina koja se dobije se filtrira kroz stakleni filter lijevak sa sinteriranim dnom uz ispiranje taloga istim otapalom. Netopljivi talog koji je zaostao na filteru se suši sve dok se ne dobije konstanta masa i važe. Udio netopljivih nečistoća se računa pomoću jednadžbe:

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

m_0 – masa uzorka (g);

m_1 – masa osušenog filter - lijevka (g);

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

Određivanje vlage u ulju

Količina hlapljivih tvari i količina vlage (vode) su važan pokazatelj kakvoće jestivih i sirovih biljnih ulja. Kod sirovih ulja vlaga predstavlja „nečistoću“ te se njena količina određuje zbog ekonomskih interesa. Vlaga u ulju pri određenim uvjetima može uzrokovati hidrolitičke promjene. Hidrolitičke promjene rezultiraju porastom kiselosti odnosno povećava se udio SMK, što uzrokuje smanjenje kvalitete ulja. Također, velika količina vlage u ulju može uzrokovati zamućenje ulja što smanjuje estetsku vrijednost ulja.

Postupak za određivanje vlage i hlapljivih tvari temelji se na isparavanju hlapljivih tvari i vode zagrijavanjem ulja u sušioniku. Dolazi do smanjenja mase pri zagrijavanju na 103 °C (2 sata)

dok masa ne bude konstantna. Gubitak mase između mjerenja mora biti manji od 0,002 g. Izračunava se pomoću jednadžbe:

$$\% \text{ vlage i hlapljivih nečistoća} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 – masa prazne posudice (g);

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

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

3.3.3. Određivanje karakteristika za identifikaciju ulja

Određivanje saponifikacijskog broja

Saponifikacijski broj predstavlja količinu kalijevog hidroksida (KOH) izraženu u miligramima potrebnu za potpunu saponifikaciju slobodnih i esterificiranih masnih kiselina u 1 gramu masti. Vrijednost saponifikacijskog broja je konstanta koja je karakteristična za različita ulja te ovisi o molekulskim masama masnih kiselina prisutnih u sastavu masti. Povećava se kada je molekulska masa niža, a smanjuje kada je molekulska masa veća. Također, saponifikacijski broj može biti i pod utjecajem neosapunjivih tvari tj. stranih primjesa. Saponifikacija se provodi pomoću alkoholne otopine KOH, čiji nam je molaritet poznat, a višak nevezanih hidroksida se tretira otopinom klorovodične kiseline poznatog molariteta (**Slika 20**). Saponifikacijski broj se izračunava pomoću jednadžbe:

$$\text{Saponifikacijski broj (mg KOH/g)} = (V_0 - V_1) \times 28,1 \text{ m}$$

V_0 – volumen 0,5 M otopine HCl utrošeni za titraciju slijepe probe (mL);

V_1 - volumen 0,5 M otopine HCl utrošeni za titraciju uzorka (mL);

m – masa uzorka (g).

1 mL 0,5 M otopine HCl ekvivalentan je 28,1 mg KOH.



Slika 20 Promjena boje nakon titracije kod određivanja saponifikacijskog broja (Izvor: autor)

Određivanje jodnog broja

Jodni broj je pokazatelj prisutnosti nezasićenih veza masnih kiselina u molekuli triglicerida tj. ukazuje na stupanj nezasićenosti masti i ulja. Izražava se kao količina joda u gramima koja se veže na 100 grama masti ili ulja.

Metoda za određivanje jodnog broja temelji se na reakciji vezanja joda na dvostruke veze masnih kiselina. Veći jodni broj ukazuje na veću koncentraciju NMK. Postupak obuhvaća tretiranje uzorka ulja sa smjesom halogena, a nakon dodavanja halogena, višak se titrira s otopinom natrij tiosulfat. Uzorak se otapa u kloroformu te se u tu otopinu doda otopina jodnog monobromida. Smjesa se promućka, zatvori i ostavi u tamnom prostoru pola sata. Nakon toga, otopini se dodaje KI i prokuhana i ohlađena destilirana voda. Zatim se provodi titracija pomoću natrij tiosulfata uz dodatak škroba kao indikatora. Titracija je gotova kada uzorak promijeni boju (**Slika 21**). Jodni broj se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\text{Jodni broj (gI}_2\text{/100g)} = ((V_0 - V_1) \times 0,01269 \times 100)/c$$

V_0 - volumen utrošene 0,1 M otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ za titraciju slijepe probe (mL);

V_1 – volumen utrošene 0,1 M otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ za titraciju uzorka (mL);

c – masa ispitivanog uzorka (g).



Slika 21 Promjena boje nakon titracije kod određivanja jodnog broja (Izvor: autor)

3.3.4. Određivanje sastava masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC - FID)

Određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima ulja provedeno je metodom plinske kromatografije sa plameno-ionizacijskim detektorom. Prije analize provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere masnih kiselina sa metanolnom otopinom KOH prema postupku opisanom u Prilogu B Uredbe Komisije br. 796/2002 (EZ, 2002). Uzorci ulja (1-2 kapi) pomiješani su sa 4 mL n-heptana, promiješani na vortex miješalici 30 sekundi, zatim je dodano 0,2 mL 2 mol/L metanolne otopine kalijevog hidroksida i ponovo promiješano 30 sekundi. Nakon odvajanja slojeva, gornji heptanski sloj koji sadrži metilne estere masnih kiselina profiltriran je kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm u vijalicu. Tako pripremljeni metilni esteri masnih kiselina analizirani su na plinskom kromatografu (Shimadzu GC-2010 Plus) opremljenom kapilarnom kolonom SH-FAMEWAX™ (Shimadzu, Kyoto, Japan) sljedećih karakteristika: 30 m duljina kolone; 0,32 mm unutarnji promjer i 0,25 µm debljina filma nepokretne faze. Plin nosioc bio je dušik uz protok od 1,26 mL/min. Temperatura injektora iznosila je 240 °C, a volumen injektiranog uzorka 2 µL uz omjer cijepanja 1:100. Početna temperatura kolone iznosila je 120 °C, nakon 5 minuta programirano je povećavana do 220 °C brzinom 5 °C/min koja je zadržana narednih 20 minuta. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora postavljena je na 250 °C. Identifikacija odijeljenih masnih kiselina u uzorcima analiziranih ulja provedena je temeljem usporedbe vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja masnih kiselina u certificiranom referentnom materijalu (Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24) analiziranog pri istim uvjetima. Analiza uzoraka ulja provedena je u tri ponavljanja. Udio masnih kiselina izražen je kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline (EZ, Komisija Europske zajednice: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002).

4. REZULTATI

Tablica 5 Parametri identifikacije i kvalitete ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica* u usporedbi s maksimalnim dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009)

Parametar kvalitete	Rezultat	Maksimalne vrijednosti (Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina)
Peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)	1,67	10
Slobodne masne kiseline (izražene kao oleinska) (%)	0,27	0,8
Udio vlage (%)	0,038	0,4
Udio netopljivih nečistoća (%)	0,62	0,05
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	219,29	184-196
Jodni broj (gI ₂ /100g)	96,45	75-94

Tablica 6 Parametri identifikacije i kvalitete ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Coratina* u usporedbi s maksimalnim dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009)

Parametar kvalitete	rezultat	Maksimalne vrijednosti (Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina)
Peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)	1,92	10
Slobodne masne kiseline (izražene kao oleinska) (%)	0,20	0,8
Udio vlage (%)	0,034	0,4
Udio netopljivih nečistoća (%)	0,37	0,05
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	221,19	184-196
Jodni broj (gI ₂ /100g)	96,58	75-94

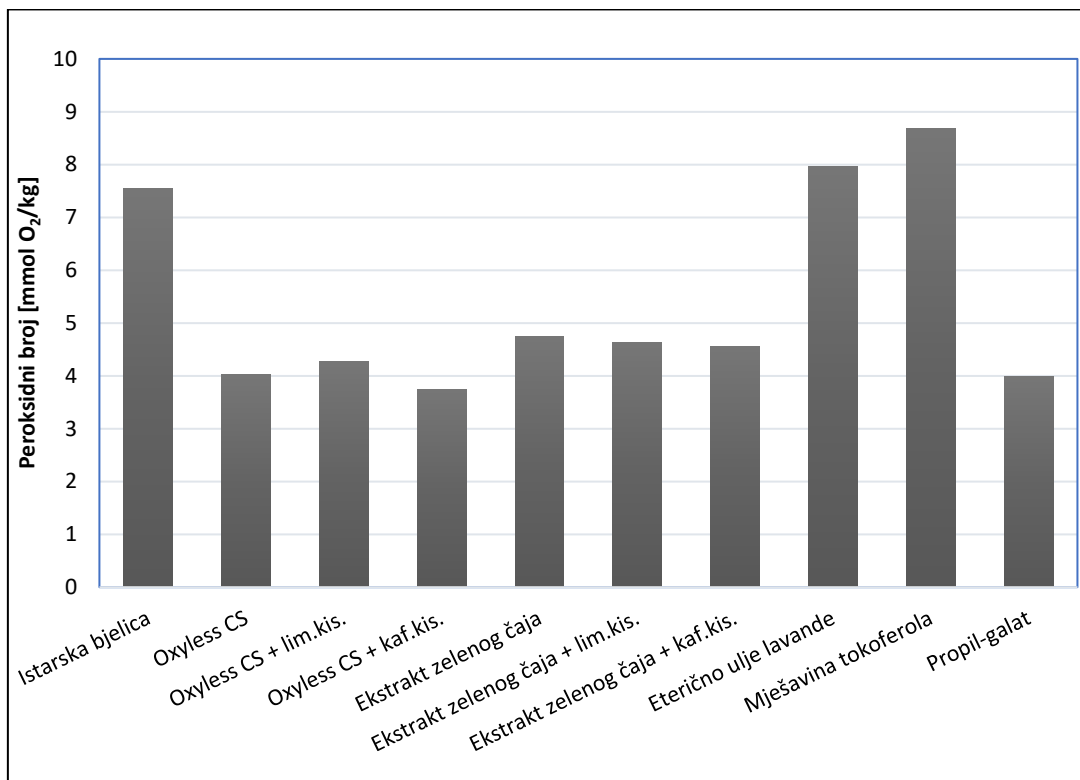
Tablica 7 Utjecaj dodatka prirodnih antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica*

Uzorci	Koncentracija antioksidansa (%)	Peroksidni broj								
		0. dan	1. dan	2. dan	4. dan	7. dan	10. dan	11. dan	14. dan	18. dan
Istarska bjelica	-		1,91	2,35	2,43	3,87	4,55	4,98	5,53	7,54
Ekstrakt ružmarina Oxyless CS	0,2		1,90	1,94	2,18	2,45	2,50	2,73	3,52	4,02
OxyLess CS + limunska kiselina	0,2+0,01		1,91	2,03	2,06	2,24	2,65	2,74	3,72	4,27
OxyLess CS + kafeinska kiselina	0,2+0,01		1,71	1,84	1,95	2,01	2,54	2,66	3,30	3,75
Ekstrakt zelenog čaja	0,2		1,67	1,83	2,52	2,59	3,23	3,64	4,35	4,74
Ekstrakt zelenog čaja + limunska kiselina	0,2+0,01	1,67	1,64	2,07	2,23	2,44	2,83	3,20	4,57	4,63
Ekstrakt zelenog čaja + kafeinska kiselina	0,2+0,01		1,85	2,06	2,28	3,29	2,74	3,06	4,13	4,55
Eterično ulje lavande	0,2		1,90	2,16	2,29	2,91	4,13	4,48	5,00	7,96
Mješavina tokoferola	0,1		1,84	2,30	2,50	3,73	4,90	5,86	5,96	8,68
Propil galat	0,01		1,45	1,83	1,91	2,39	3,18	3,29	3,69	3,98

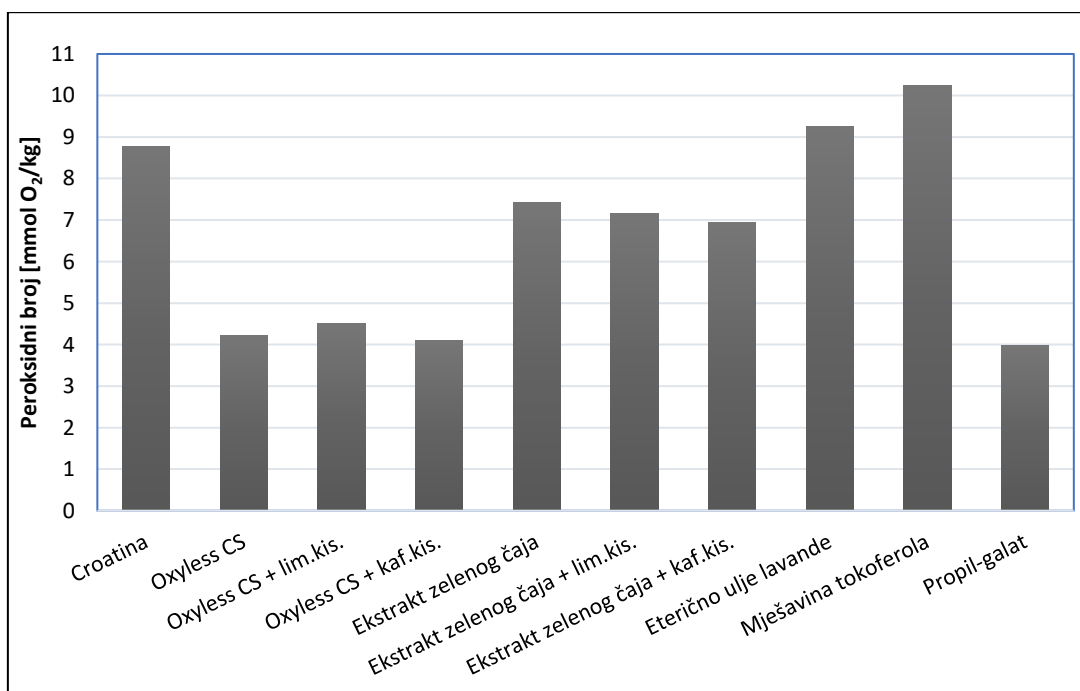
Tablica 8 Utjecaj dodatka prirodnih antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte *Coratina*

Uzorci	Konc. antiok. (%)	Peroksidni broj									
		0. dan	1. dan	2. dan	4. dan	7. dan	10. dan	11. dan	14. dan	18. dan	
Coratina	-		2,14	2,93	3,26	4,09	5,45	6,42	7,50	8,76	
Ekstrakt ružmarina Oxyless CS	0,2		1,97	2,25	2,39	2,78	2,95	3,46	3,98	4,23	
OxyLess CS + limunska kiselina	0,2+0,01		1,90	1,98	2,15	2,51	2,96	3,40	3,67	4,51	
OxyLess CS + kafeinska kiselina	0,2+0,01		1,94	2,11	2,28	2,52	4,79	3,21	3,42	4,09	
Ekstrakt zelenog čaja	0,2		1,86	2,44	2,85	3,69	4,35	5,34	5,97	7,43	
Ekstrakt zelenog čaja+ limunska kiselina	0,2+0,01	1,92	1,90	2,30	2,75	3,39	4,34	4,98	5,29	7,15	
Ekstrakt zelenog čaja + kafeinska kiselina	0,2+0,01		1,93	2,26	2,53	3,46	2,74	4,55	4,98	6,94	
Eterično ulje lavande	0,2		2,19	2,35	2,74	3,69	4,98	5,67	6,68	9,26	
Mješavina tokoferola	0,1		2,15	2,45	3,06	4,00	5,27	6,19	7,45	10,24	
Propil-galat	0,01		1,91	1,94	2,25	2,78	2,96	3,66	4,15	4,68	

Slika 22 Utjecaj dodatka antioksidansa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica*, nakon 18 dana provođenja Oven testa pri 63 °C



Slika 23 Utjecaj dodatka antioksidansa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte *Coratina*, nakon 18 dana provođenja Oven testa pri 63 °C



Tablica 9 Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica*

Masna kiselina	% masne kiseline	SD
C16: 0	12,28	0,03
C16: 1	0,86	0,00
C17: 0	0,05	0,01
C17: 1	0,08	0,00
C18: 0	2,84	0,00
C18: 1n9c+t	76,49	0,04
C18: 2n6c	5,19	0,00
C18: 3n3	0,51	0,00
C20: 0	0,43	0,00
C20: 1	0,25	0,00
C22: 0	0,11	0,00
C24: 0	0,92	0,01

Tablica 10 Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Coratina*

Masna kiselina	% masne kiseline	SD
C16: 0	10,51	0,10
C16: 1	0,44	0,01
C17: 0	0,05	0,01
C17: 1	0,07	0,00
C18: 0	2,01	0,01
C18: 1n9c+t	80,27	0,11
C18: 2n6c	4,74	0,01
C18: 3n3	0,70	0,00
C20: 0	0,35	0,01
C20: 1	0,33	0,01
C22: 0	0,09	0,00
C24: 0	0,46	0,00

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizom ekstra djevičanskih maslinovih ulja hrvatskih sorti *Istarske bjelice* i *Coratine* dobiveni su podaci o njihovoj održivosti ili oksidacijskoj stabilnosti, te podaci o osnovnim parametrima identifikacije i kvalitete ekstra djevičanskih maslinovih ulja. Među osnovnim parametrima kvalitete i identifikacije ulja pripadaju: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio netopljivih nečistoća, udio vlage, jodni i saponifikacijski broj. Dobiveni rezultati ovih parametara su prikazani u **Tablicama 5.** i **6.** uz maksimalne dopuštene vrijednosti koje su određene *Pravilnikom o uljima od ploda i komine masline* (NN 7/2009). Jodni broj, udio netopljivih nečistoća i saponifikacijski broj nisu u skladu s Pravilnikom. Jodni broj za *Istarsku bjelicu* iznosi 96,45 gI₂/100 g, a za *Coratinu* 96,58 gI₂/100 g, a maksimalna dopuštena vrijednost je u rasponu od 75-94 gI₂/100 g. Netopljive nečistoće kod sorte *Istarske bjelice* iznosi 0,62 %, a kod sorte *Coratine* iznosi 0,37 % što znači da nije u skladu s Pravilnikom, jer je maksimalna dopuštena vrijednosti netopljivih nečistoća 0,05 %. Također, saponifikacijski broj kod obje sorte se pokazao većim nego što je maksimalna dopuštena vrijednost. Saponifikacijski broj kod *Istarske bjelice* iznosi 219,29 mg KOH/g ulja, a kod *Coratine* 221,19 mg KOH/g ulja. Maksimalna vrijednost saponifikacijog broja bi trebala biti u rasponu 184-196 mg KOH/g ulja, a ispitivane sorte ulja prelaze tu vrijednost. Ostali parametri kvalitete i identifikacije ulja su u skladu s Pravilnikom. Vrijednost peroksidnog broja i slobodnih masnih kiselina su znatno niže od maksimalne vrijednosti što znači da nije došlo do hidrolitičke razgradnje triglicerida tj. oksidacijskog kvarenja.

Određivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskih maslinovih ulja se provodilo pomoću Oven testa pri 63 °C što je prikazano u **Tablicama 7.** i **8.** Test oksidacijske stabilnosti se provodio 18 dana i održivost se prikazala u vrijednostima peroksidnog broja. Polazna vrijednost peroksidnog broja *Istarske bjelice* je iznosila 1,67 mmolO₂/kg, a nakon 18 dana vrijednost peroksidnog broja je bila 7,54 mmol O₂/kg. Polazna vrijednost peroksidnog broja *Coratine* je iznosila 1,92 mmolO₂/kg, a nakon 18 dana je bila 8,76 mmol O₂/kg. Obje vrijednosti peroksidnog broja hrvatskih sorti su bile ispod maksimalne dozvoljene vrijednosti koja iznosi 10 mmol O₂/kg . *Istarska bjelica* je pokazala bolju oksidacijsku stabilnost u usporedbi s *Coratinom* nakon 18 dana provedbe testa. Nakon testa ulje sorte *Istarske bjelice* imalo je nižu vrijednost Pbr.

Na oksidacijsku stabilnost se utjecalo i dodavanjem različitih antioksidansa i sinergista u ispitivana ulja. U **Tablicama 3.** i **4.** je popis korištenih antioksidansa i sinergista zajedno s dodanim udjelima. Njihov utjecaj na ispitivana ulja se također pratio kroz 18 dana gdje je vidljiv postepeni porast peroksidnog broja. Teorija da antioksidansi usporavaju oksidacijsko kvarenje tj. imaju zaštitnu ulogu je dokazana budući da je u većini slučajeva peroksidni broj bio niži u odnosu na kontrolni uzorak. Pojedini antioksidansi su povećavali oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskih maslinovih ulja ispitivanih hrvatskih sorti.

Najveća efikasnost zaštite ulja je postignuta kombinacijom dodatka ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less® CS kao antioksidansa i kafeinske kiseline kao sinergista što je vidljivo i na **Slikama 22.** i **23.** Nakon 18 dana testa kod sorte *Istarske bjelice* peroksidni broj uzorka gdje je dodavana kombinacija ekstrakta ružmarina Oxy'Less® CS + kafeinska kiselina je iznosio 3,75 mmol O₂/kg, a kod *Coratine* je peroksidni broj iznosio 4,09 mmol O₂/kg, dok je vrijednost peroksidnog broja u kontrolnom uzorku bila za *Istarsku bjelicu* 7,54 mmol O₂/kg, a za *Coratinu* 8,76 mmol O₂/kg.

Antioksidansi eterično ulje lavande i mješavina tokoferola nisu pokazali antioksidacijsko djelovanje u zaštiti ispitivanih ulja. Vrijednost peroksidnog broja u uzorcima gdje su dodavani navedeni antioksidansi su premašili vrijednost peroksidnog broja u odnosu na kontrolni uzorak nakon 18 dana provedbe testa. Točnije, dodatkom mješavine tokoferola u koncentraciji 0,1 % nije postignuta zaštita od oksidacijskog kvarenja, budući da je vrijednost peroksidnog broja kod sorte *Coratina* nakon 18 dana testa iznosila 10,24 mmol O₂/kg, a kod sorte *Istarska bjelica* vrijednost peroksidnog broja je 8,68 mmol O₂/kg ulja, što je veće od vrijednosti kontrolnog uzorka.

Dodatkom prirodnog antioksidansa ekstrakta zelenog čaja ostvarena je malo slabija zaštita ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Istarska bjelica* (malo je veći Pbr) u odnosu na primjenu ekstrakta ružmarina. Sintetski antioksidans propil galat postigao je podjednaku zaštitu ovog ulja od oksidacijskog kvarenja kao i ekstrakt ružmarina. Kod ove sorte maslinovog ulja sinergisti su dodatno zaštitili ulje od oksidacije uz dodatak ekstrakta ružmarina i zelenog čaja. Kod ulja sorte *Coratina* primjena ekstrakta zelenog čaja je skoro duplo slabije zaštitila ovo ulje od oksidacije (Pbr je 7,43 mmol O₂/kg) u odnosu na ekstrakt ružmarina (nakon testa Pbr je 4,23 mmol O₂/kg). Propil galat je malo slabije zaštitio ovo ulje od oksidacije u odnosu na primjenu ekstrakta ružmarina.

Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskih maslinovih ulja sorti *Istarska bjelica* i *Coratina* određen je separacijskom tehnikom plinske kromatografije te su rezultati prikazani u **Tablicama 9. i 10.** Iz dobivenih vrijednosti sastava masnih kiselina je vidljivo da obje sorte ekstra djevičanskih maslinovih ulja imaju najveći udio oleinske kiseline (C18:1n9c+t).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja dodatka antioksidansa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja hrvatskih sorti ulja *Istarske bjelice* i *Coratine* mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- S obzirom na usporedbu rezultata osnovnih parametara identifikacije i kvalitete ulja s Pravilnikom o uljima od ploda i komine masline (NN 7/2009), utvrđeno je da su ekstra djevičanska maslinova ulja hrvatskih sorti *Istarska bjelica* i *Coratina* dobre kvalitete.
- Dobra otpornost ispitivanih ulja *Istarske bjelice* i *Coratine* prema oksidacijskom kvarenju je prikazano Oven testom koji je proveden na temperaturi 63 °C u vremenskom periodu od 18 dana.
- Bolju oksidacijsku stabilnost je pokazalo ulje sorte *Istarska bjelica* zbog manjeg peroksidnog broja u odnosu na sortu *Coratinu* na kraju testa.
- Najbolja zaštita od oksidacijskog kvarenja postignuta je dodatkom kombinacije antioksidansa ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS i sinergista kafeinska kiselina kod oba ulja.
- Dodatkom sinergista limunska kiselina i kafeinska kiselina uz ekstrakt ružmarina i ekstrakt zelenog čaja postignuta je dodatna zaštita oba ulja od oksidacijskog kvarenja.
- Dobru oksidacijsku stabilnost kod ulja sorte *Istarske bjelice* i *Coratina* je pokazao i antioksidans propil galat.
- Primjenom mješavine tokoferola i eteričnog ulja lavande kao prirodnog antioksidansa nije se postigla željena zaštita od oksidacijskog kvarenja, nakon testa dobivena je veća vrijednost peroksidnog broja u odnosu na kontrolni uzorak.

- Ekstrakt zelenog čaja pokazuje efikasnu zaštitu oba ulja od oksidacijskog kvarenja, ali malo manju od ekstrakta ružmarina.
- Sastav masnih kiselina oba ulja odgovara literaturnim podacima za ovu vrstu ulja.

7. LITERATURA

Boskou D: Olive Oil. American Oil Chemists' Society. 2006.

Brenes M., García A., Dobarganes M. C., Velasco J., Romero, C: Influence of Thermal Treatments Simulating Cooking Processes on the Polyphenol Content in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5962–5967, 2002.

Carvalho da Silva L., Menezes Castelo R., Cheng Huai N., Biswas A., Furtado Ferro R., Alves Robert C: Methods of Microencapsulation of Vegetable oil: Principles, Stability and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 60 (3) 308-320, 2022.

Çakaloğlu B, Özyurt V.H., Ötleş S: Impact of Cold Pressed Oil Production on Nutritional Composition. *Ukrainian Food Journal*. Volume 7, Issue 4, 2018.

Daubert B.F., O'Connell P.W: Reversion Problem sin Edible Fats. *Advances in Food Research*. Volume 4, 185-207, 1953.

De Leonardis A: Virgin Olive Oil, Production, Composition, Uses and Benefits for Man. Nova Science Publishers, 2014.

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

Farr W., Proctor A: Green Vegetable oil Processing. AOCS Press, Urbana, 2014.

Gonzales-Gamallo S., Salvador D.M., Fregapane G: Design and Characteristic of Novel Sensory and Nutritionally Oriented Olive, Seed, and Nut Virgin Oil's Blendings. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2021.

Gunstone D.F: Vegetable oils in Food technology: composition, properties and uses. Wiley-Blackwell, 2011.

Gupta K.M: Practical Guide to Vegetable Oil Processing. Academic Press, 2017.

Holt B: Vegetables oil: properties, uses, and benefits. Nova Science Publishers, Inc., New York 2016.

Kantoci D: Maslina – pregledni rad. Glasnik zaštite bilja 6:4-14, 2006.

Koprivnjak O: Djevičansko maslinovo ulje. MIH, Poreč, 2006.

Marinova E. M., Seizova K. A., Totseva I. R., Panayotova S.S., Marekov I. N., Momchilova S. M: Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature. Bulgarian Chemical Communications, Volume 44, Number 1 (pp. 57 – 63),2012.

Martín-Sánchez A.M, Navarro C, Pérez-Álvarez J.A, Kuri V: Alternatives for efficient and sustainable production of surimi. 359-374 , 2009.

Moslavac T: Kemija i tehnologija ulja i masti, nastavni materijali. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2021.

Moslavac T., Benčić Đ., Pašić Melita: Utjecaj dodatka različitih biljnih ulja na oksidacijsku stabilnosti smjese suncokretovog ulja. Glasnik zaštite bilja 6, 2009.

Moslavac T., Pozderović A., Pichler A., Perl Pirički A., Volmut K., Benčić Đ: Komparativna studija oksidacije stabilnosti različitih biljaka s rancimat metodom i oven testom. Glasnik zaštite bilja 4, 2010.

Pravilnik o uljima od ploda i komine masline, NN 7/2009.

Šarolić M., Gugić M., Marijanović Z., Šuste M: Food in health and disease. Scientific-professional journal of nutrition and dietetics. 3 (1), 38-43, 2014.ž

Večernik N: Čovjek i maslina. Split, 2003.

Zadro B., Perica S: Maslina i maslinovo ulje. Naklada Zadro, Zagreb, 2007.

Web 1.: <https://maslina.slobodnadalmacija.hr/maslina/maslinarstvo/dodavanjem-talka-i-soli-moze-se-dobiti-vise-ulja-lijecnik-to-je-opasno-za-zdravlje-1163316#&gid=1&pid=2>

[pristupljeno 18. svibnja 2023.]

Web 2.: <https://www.maslinar.com/kalendar-radova-za-prosinac/> [pristupljeno 21. svibnja 2023]

Web 3.: <https://opg-rakovac.hr/blog/uzgoj-maslina/istarska-bjelica/> [pristupljeno 22. svibnja 2023]

Web 4.: <https://www.viadellago.com/2022/02/10/olio-di-coratina-caratteristiche-e-proprieta/> [pristupljeno 22. svibnja 2023]