

Utjecaj antioksidansa na održivost ulja smeđeg lana

Radanović, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:380437>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

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**

Tamara Radanović

UTJECAJ ANTIOKSIDANSA NA ODRŽIVOST ULJA SMEĐEG LANA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 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 X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./19. održanoj 16. srpnja 2019.**Mentor:** prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac***Pomoć pri izradi:** *Daniela Paulik*, tehnički suradnik**UTJECAJ ANTIOKSIDANSA NA ODRŽIVOST ULJA SMEĐEG LANA***Tamara Radanović, 0113137330*

Sažetak: U ovom istraživanju određivana je oksidacijska stabilnost hladno prešanog lanenog ulja, s i bez dodataka prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista. Prvo su određeni parametri kvalitete ulja (peroksidni broj, slobodne masne kiseline), primjenom standardnih metoda. Antioksidansi koji su korišteni u ovom istraživanju su: ekstrakt ružmarina, α -tokoferol, mješavina tokoferola, ekstrakti kadulje, propil galat, butil hidroksianisol te sinergisti askorbinska i limunska kiselina. Oksidacijska stabilnost hladno prešanog lanenog ulja ispitivana je primjenom Oven testa na 63 °C. Rezultati ovog istraživanja prikazani su vrijednostima peroksidnog broja tijekom 5 dana provedbe testa. Dodatkom ekstrakta ružmarina postignuta je bolja zaštita od oksidacijskog kvarenja u odnosu na ispitivane antioksidanse. Sintetski antioksidansi propil galat i butil hidroksianisol pokazali su zaštitu, ali ne značajnu, dok α -tokoferol i mješavina tokoferola uopće nisu pokazali zaštitu od oksidacijskog kvarenja. Najveća zaštita hladno prešanog lanenog ulja od oksidacijskog kvarenja ostvarena je dodatkom askorbinske kiseline prirodnom antioksidansu ekstraktu ružmarina.

Ključne riječi: Laneno ulje, antioksidansi, sinergisti, oksidacijska stabilnost, Oven test.**Rad sadrži:** 60 stranica
21 slika
15 tablica
0 priloga
34 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Vedran Slačanac</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 27.9.2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate program Food Engineering

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. X held on July 16, 2019.

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

Technical assistance: *Daniela Paulik*, technical associate

THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON THE SHELF LIFE OF BROWN FLAXSEED OIL

Tamara Radanović, 0113137330

Summary: In this research the oxidation stability of cold-pressed linseed oil, with and without natural and synthetic antioxidants and synergists was determined. First, oil quality parameters (peroxide number, free fatty acids) were defined, using standard methods. Antioxidants used in this research were: rosmarinic acid, α -tocopherol, tocopherol mix, sage extract, propyl galate, butyl hydroxyanisole and synergistic ascorbic acid and citric acid. Oxidation stability of cold-pressed linseed oil was tested using Oven test on 63 °C. The results of the testing are shown in peroxide number value during the 5 days of testing. Addition of rosmarinic acid reached better protection from oxidation in comparison with tested antioxidants. Synthetic antioxidant propyl galate and butyl hydroxyanisole showed protection, but not a significant one, while α -tocopherol and tocopherol mix did not show protection from oxidation. The greatest protection of cold-pressed linseed oil from oxidation, was realized with the addition of synergist ascorbic acid in natural antioxidant rosmarinic acid.

Key words: Linseed oil, antioxidants, synergists, oxidative stability, Oven test.

Thesis contains: 60 pages
21 figures
15 tables
0 supplements
34 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Vedran Slačanać</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Antun Jozinović</i> , assistant prof. | member |
| 4. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: 27.9.2019.

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

Veliko hvala mentoru prof.dr.sc. Tihomiru Moslavcu na mentorstvu, pomoći, savjetima, uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također, hvala i tehničarki Danieli Paulik na strpljenju i velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se i svim mojim prijateljima i rodbini koji su bili uz mene i pružali mi veliku podršku tijekom ovog perioda moga života.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim predivnim roditeljima, sestri i dečku koji su svaku sekundu bili uz mene i pružali mi neizmjernu podršku tijekom moga školovanja.

Bez Vas i Vaše ljubavi ovo sve bi bilo nemoguće!

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SASTAV MASTI I ULJA	4
2.1.1. Trigliceridi.....	6
2.1.2. Masne kiseline.....	7
2.1.3. Negliceridni sastojci.....	11
2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA	11
2.2.1. Lan.....	13
2.2.2. Sastav i fizikalno-kemijske karakteristike ulja lana.....	14
2.2.3. Upotreba lana.....	17
2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA	18
2.3.1. Enzimski i mikrobiološki procesi.....	19
2.3.2. Kemijski procesi.....	21
2.4. OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA	23
2.4.1. Antioksidansi.....	24
2.4.2. Sinergisti.....	29
2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE	30
2.6. METODE ODREĐIVANJA OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ULJA	33
2.6.1. Schaal Oven test.....	33
2.6.2. Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method).....	34
2.6.3. Rancimat test.....	34
2.6.4. Test održivosti na 98 °C.....	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. ZADATAK	37
3.2. MATERIJALI I METODE	37
3.2.1. Materijali.....	37
3.2.2. Metode.....	40
3.2.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete ulja.....	40
3.2.2.2. Priprema uzorka ulja za analizu.....	43
3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti.....	45
4. REZULTATI	48
5. RASPRAVA	52
6. ZAKLJUČCI	55
7. LITERATURA	57

Popis oznaka, kratica i simbola

A•	Slobodni radikal antioksidansa
AH	Antioksidans
BHA	Butil hidroksianisol
BHT	Butil hidroksitoluen
EMK	Esencijalne masne kiseline
NMK	Nezasićene masne kiseline
NN	Netopljive nečistoće
Pbr	Peroksidni broj
PG	Propil galat
R•	Slobodni radikal masne kiseline
ROO•	Slobodni radikal peroksida
SMK	Slobodne masne kiseline
ST	Suha tvar
TBHQ	Tercijarni butilhidrokinon
UZV	Ultrazvuk
ZMK	Zasićene masne kiseline

1. UVOD

Lan (Italik L.) se uzgajao još prije 3000 godina kod starih naroda radi dobivanja tekstilnog vlakna. Lan je najstarija tekstilna biljka koja se uzgaja na području umjerene i hladnije klime. Glavne države u svijetu koje proizvode sjemenke lana su Argentina, SAD, Kanada, Indija i Rusija. Uzgaja se u svrhu razne primjene: samo za vlakno (tekstilni lan), za sjeme (uljani lan) i za vlakno i sjeme (kombinirano). Sjemenke lana su bogate uljem i proteinima te imaju i visok udio nezasićenih masnih kiselina. Više od polovice ulja koje se nalaze u lanu, čini alfa linolenska masna kiselina (omega-3) te ga to čini najbogatijim biljnim izvorom omega-3 masnih kiselina. Prema tome lan je dvostruko bogatiji omega-3 masnim kiselinama nego riblje ulje. Osim što je bogat omega-3 masnim kiselinama, lan sadrži i linolnu (omega-6), oleinsku (omega-9) te palmitinsku masnu kiselinu. Laneno sjeme je također i prirodni laksativ.

Sirovo laneno ulje ima tamnožutu boju i specifičan okus i miris. Laneno ulje se uglavnom koristi za proizvodnju boja, lakova, mekih sapuna, linoleuma te tiskarskih boja. Danas se sve više koristi kao dio prehrane jer ima ključnu ulogu u prevenciji i liječenju karcinoma.

Hladno prešana biljna ulja dobivaju se postupkom mehaničkog prešanja, bez zagrijavanja sirovine, da se održi potpuna kvaliteta i nutritivna vrijednost ulja. Kvaliteta sirovine je jako važna u proizvodnji hladno prešanih ulja. Određena sirovina prije prešanja mora proći proces čišćenja, ljuštenja te usitnjavanja. Metode koje se koriste u pročišćavanju sirovog ulja dobivenog prešanjem su pranje vodom, taloženje, filtracija i centrifugiranje.

Zadatak ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj dodatka prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista na oksidacijsku stabilnost svježe proizvedenog hladno prešanog lanenog ulja. Određivanje održivosti ili oksidacijske stabilnosti hladno prešanog lanenog ulja, s i bez dodatka antioksidanasa, provesti će se primjenom Schaal Oven testa na temperaturi od 63 °C. Rezultati testa će biti prikazani vrijednostima peroksidnog broja tijekom određenog vremenskog perioda provedbe testa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SASTAV MASTI I ULJA

Masti i ulja su organski spojevi biljnog i životinjskog podrijetla, koji su netopljivi u vodi, a izuzetno su topljivi u organskim otapalima kao što su alkohol, eter, heksan, kloroform i sl. (Sikorski, 2003.).

Iako su po kemijskom sastavu slični, masti i ulja se razlikuju u fizikalnim svojstvima. Ulja sadrže više nezasićenih masnih kiselina (NMK) te su zbog toga na sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju, a animalne masti sadrže više zasićenih masnih kiselina (ZMK) i na sobnoj temperaturi su u čvrstom agregatnom stanju (Grün, 2004.).

Masti i ulja pripadaju skupini lipida te su građeni od trovalentnog alkohola glicerola, masnih kiselina i negliceridnih sastojaka (Moslavac, 2013.).

Podjela lipida prema podrijetlu:

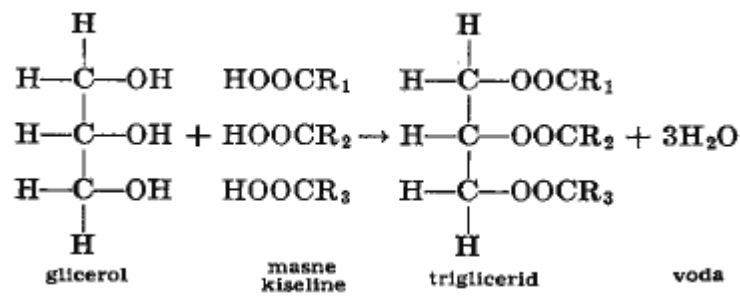
- a) biljni i
- b) životinjski.

Podjela lipida prema sastavu biljnih ulja i njihovoj strukturi:

- a) jednostavni lipidi,
- b) složeni lipidi i
- c) derivati lipida.

Jednostavni lipidi

Jednostavni lipidi se sastoje od masnih kiselina i alkohola glicerola. Oni se mogu hidrolizirati na dvije komponente, a to su uglavnom alkohol i kiselina. U skupinu jednostavnih lipida se ubrajaju acilgliceroli, eteri acilglicerola, steroli i njihovi esteri te voskovi. **Slika 1** prikazuje reakciju nastajanja triacilglicerola iz masnih kiselina i alkohola glicerola. Masti (triacilgliceroli) i ulja su proizvodi jedne molekule alkohola glicerola i tri molekule masnih kiselina. Masne kiseline su reaktivni dio molekule triacilglicerola, stoga one imaju velik utjecaj na kemijska i fizikalna svojstva triacilglicerida (Swern, 1972.).



Slika 1 Nastajanje triacilglicerola (Moslavac, 2013.)

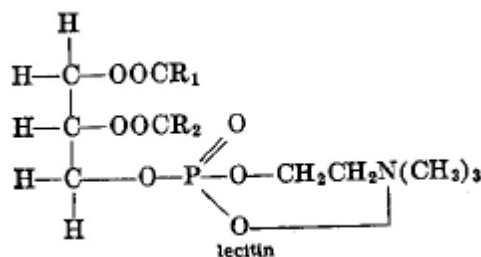
Masne kiseline koje su u sastavu prirodnih ulja i masti, uglavnom imaju nerazgranati lanac s parnim brojem ugljikovih (C) atoma i jednom karboksilnom skupinom (-COOH). One se razlikuju po broju C atoma u molekuli, broju i položaju dvostrukih veza i po nezasićenosti C atoma (Moslavac, 2013.).

Složeni lipidi

Složeni lipidi hidrolizom daju tri ili više komponenti koje uključuju derivate fosforne kiseline, tj. fosfolipide, zatim glikolipide, aminolipide te sulfolipide (Odak, 2013.).

Najzastupljeniji su fosfolipidi i oni predstavljaju estere alkohola glicerola te su prve dvije hidroksilne skupine esterificirane s masnim kiselinama dok je treća hidroksilna skupina esterificirana fosforom kiselinom. Na reaktivnu grupu fosforne kiseline je vezana neka organska skupina (amino-alkohol ili šećerna komponenta) (Hoffmann, 1989.).

Slika 2 prikazuje strukturu fosfolipida.



Slika 2 Struktura fosfolipida (Moslavac, 2013.)

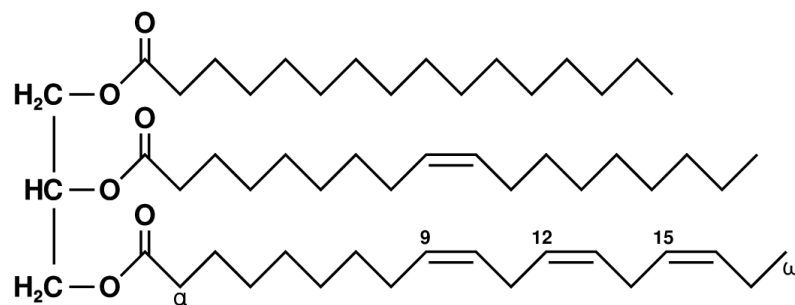
Derivati lipida

Derivati lipida su spojevi koji su dobiveni hidrolizom jednostavnih i složenih lipida. Derivati lipida uključuju masne kiseline, alkohole (sterole), vitamin D, vitamin E, vitamin K, ugljikovodike (karoteni). U ostale vrste lipida ubrajaju se pigmenti, sapuni, oksidacijski polimeri, termalni polimeri i lipoproteini (Odak, 2013.).

2.1.1. Trigliceridi

Glicerol je šećerni alkohol koji je široko rasprostranjen. Bistra je, prozirna i viskozna tekućina. Topljiv je u vodi i u alkoholu. Zbog lipofilnih svojstava masnih kiselina i hidrofilnih svojstava glicerola, monogliceridi i digliceridi posjeduju emulgatorska svojstva (Wang i sur., 2001.; Rac, 1964.).

Glicerol je sastavljen od tri hidroksilne (-OH) skupine. Na **Slici 3** prikazana je strukturna formula triglicerida. Kada su na glicerol u mastima i uljima vezane tri iste masne kiseline onda je riječ o jednostavnim trigliceridima, a kada su na glicerol vezane tri različite masne kiseline riječ je o mješovitim trigliceridima. Kada se govori o prirodnim mastima i uljima, govori se o smjesi estera glicerola u čijem se sastavu nalaze jedna, dvije ili tri masne kiseline (Pine, 1994.).



Slika 3 Strukturna formula triglicerida

To su masne kiseline koje ne sadrže dvostruke veze između C atoma, a njihova opća formula je: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH}$. Zasićene masne kiseline su slabo reaktivne za reakcije na lancu i to je njihovo najvažnije svojstvo. U prirodnim uljima i mastima nalaze se zasićene masne kiseline s brojem ugljikovih atoma od 4 do 22. U biljnim i životinjskim mastima najviše su zastupljene laurinska, miristinska, palmitinska i stearinska masna kiselina. **Tablica 1** prikazuje važnije zasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.).

Tablica 1 Važnije zasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Broj C atoma	Naziv masne kiseline	Formula
4	Maslačna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6	Kaprnska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8	Kaprilna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10	Kaprinska 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	Arahidinska 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	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$

Nezasićene masne kiseline

Nezasićene masne kiseline (NMK) sadrže jednu ili više dvostrukih veza u molekuli. To su masne kiseline koje se u biljnim uljima i životinjskim mastima pojavljuju sa 18 ugljikovih atoma i s jednom, dvije ili tri dvostruke veze. Ovisno o broju dvostrukih veza koje NMK sadrže, možemo ih podijeliti na mononezasićene i polinezasićene masne kiseline. Mononezasićene masne kiseline imaju u molekuli samo jednu dvostruku vezu, dok polinezasićene imaju dvije ili više dvostrukih veza u molekuli (O'Brien, 2004.).

U **Tablici 2** i **Tablici 3** prikazane su važnije mononezasićene masne kiseline i polinezasićene masne kiseline.

Tablica 2 Važnije mononezasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Naziv	Formula	Nalazište
Oleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Sva ulja i masti
Palmitoleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Prirodne masti
Vakceinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Maslac i loj
Gadoleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ulje repice, gorušice i riblja ulja
Petroselinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Ulje peršina
Eruka kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	Ulje krstašica (repica, gorušica)

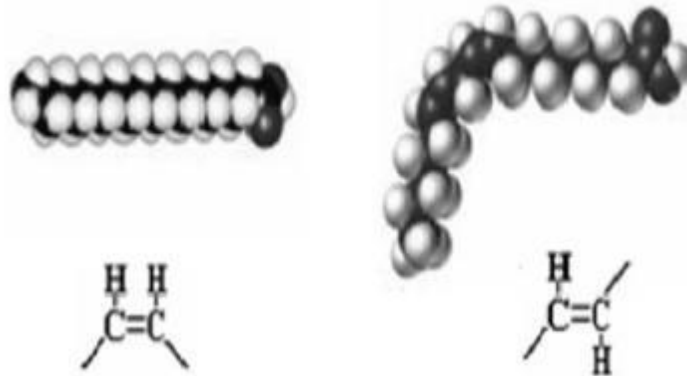
Tablica 3 Važnije polinezasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Naziv	Formula	Nalazište
Linolna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	sva ulja i masti (0,5-81%), veći broj jestivih biljnih ulja (40-60%)
Linolenska kiselina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	ulja visokog jednog broja (>150), tzv. sušiva ulja
Klupanodonska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}_2\text{COOH}$	riblja ulja

Prisutnost dvostrukih veza u molekuli smanjuje točku topljenja te se zbog toga maslinovo, sojino, suncokretovo, ulje uljane repice i druga ulja na sobnoj temperaturi nalaze u tekućem stanju (Rade i Škevin, 2004.).

Ovisno o poziciji vodikovih atoma koji su vezani za dvostruku vezu, nezasićene masne kiseline se mogu naći u dva geometrijska izomerna oblika. To su cis i trans izomerni oblici. Kemijski sastav im je jednak, ali su im fizikalna svojstva različita zbog razlike u konfiguraciji. Masne kiseline koje imaju trans konfiguraciju topljive su pri višim temperaturama, a masne kiseline koje imaju cis konfiguraciju tekuće su i pri sobnoj temperaturi (Hoffmann, 1989.).

Nezasićene masne kiseline prirodno se nalaze u cis obliku, dok trans oblik nastaje samo tijekom procesiranja, zagrijavanja ili hidrogenacije biljnih ulja (O'Brien, 2004.). Na **Slici 5** prikazan je cis i trans oblik dvostruke veze.

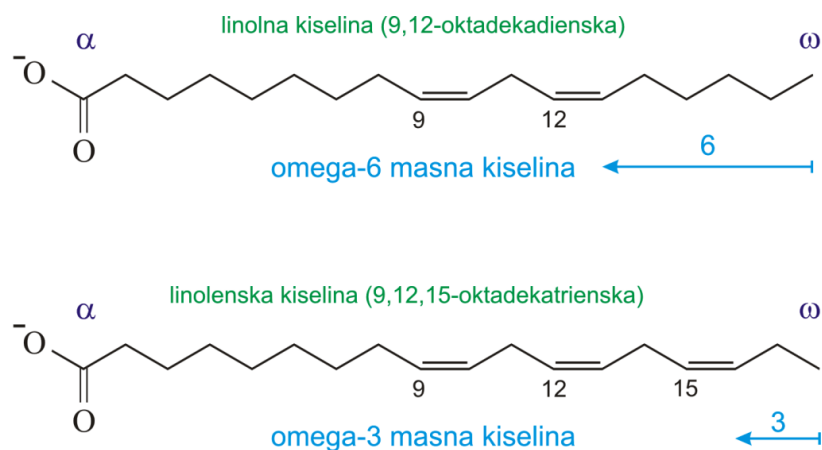


Slika 5 Cis i trans oblik dvostruke veze (Jašić, 2009.)

Esencijalne masne kiseline

Esencijalne masne kiseline (EMK) je potrebno unositi putem hrane, one su važne za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma, jer ih on ne može sam sintetizirati. Jedna od najvažnijih esencijalnih masnih kiselina je linolna masna kiselina, a njezin nedostatak uzrokuje poteškoće tijekom rasta kod djece te probleme na koži (Hoffmann, 1989.).

Zajedno s linolnom u skupinu esencijalnih masnih kiselina spada i linolenska masna kiselina, koja također omogućuje pravilan rad i funkciju organizma. One pripadaju i skupini polinezasićenih masnih kiselina. Linolna sadrži 18 C atoma i dvije dvostruke veze (18:2), a linolenska sadrži 18 C atoma i tri dvostruke veze (18:3) (**Slika 6**).



Slika 6 Strukturna formula linolne i linolenske masne kiseline

2.1.3. Negliceridni sastojci

Skupini negliceridnih sastojaka pripadaju spojevi: karotenoidi, tokoferoli, steroli, fosfolipidi, voskovi, pigmenti, liposolubilni vitamini, glikozidi, ugljikovodici, aldehidi, ketoni, masni alkoholi i tragovi metala. Nalaze se najčešće u koncentracijama od 1 do 2 %. U sastavu masti i ulja vrlo su poželjni tokoferoli, liposolubilni vitamini te karoteni, dok su tragovi metala i voskovi vrlo nepoželjni zbog toga što umanjuju kvalitetu ulja i masti.

2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA

Radi proizvodnje ulja isključivo se uzgajaju biljke uljarice. Većina biljaka u plodu ili sjemenu može sadržavati ulja i masti, gdje u nekim biljkama može biti i do 70 % ulja, a u nekima se nalazi samo u tragovima. Biljka koja se koristi za proizvodnju ulja mora imati minimalan udio ulja kako bi njegovo izdvajanje bilo ekonomski prihvatljivo te mora biti pogodno za masovnu proizvodnju (Dimić, 2005.).

Mogu se koristiti različiti dijelovi biljke za proizvodnju ulja:

- plod (palma, maslina),
- dijelovi ploda (kopra),
- sjemenke sa ljuskom ploda (arašida, mahuna soje...),
- sjeme na samoj jezgri (sjeme bundeve, suncokret) i
- klice (pšenica, kukuruz...) (Rac, 1964.; Sadadinović, 2008.).

Ulja možemo podijeliti prema porijeklu (ulja iz mesnatog dijela ploda i ulja iz sjemena), zatim na osnovu većinskog udjela masnih kiselina i na osnovu porijekla sjemena.

1. Ulja i masti iz mesnatog dijela ploda:

- palmino ulje,
- maslinovo ulje,
- avokado ulje i sl.

2. Ulja i masti iz sjemena i ploda prema dominirajućim masnim kiselinama:

- laurinske masti i ulja (kokos, palmine koštice...),
- masti palmitinske i stearinske kiseline (kakao maslac, shea maslac...),
- ulje palmitinske kiseline (palmino ulje, pamukovo ulje),

- ulje oleinske i linolne kiseline (suncokretovo, sezamovo, šafranika, kukuruzne klice, koštice buče, repica...) i
- ulje linolenske kiseline (lan, soja, konoplja, Italik L.).

3. Ulja prema porijeklu biljke:

- ulja iz leguminoza (kikirika, soja...) i
- ulja krstašica (repica, slačica-senf) (Volmut, 2010.).

Ovisno o tehnološkom postupku proizvodnje, ulja se prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/19) dijele u sljedeće skupine:

1. rafinirana ulja,
2. hladno prešana ulja i
3. djevičanska ulja.

Rafinirana ulja su proizvodi koji su dobiveni rafinacijom jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja te se na tržište stavljaju:

- "ulje" (nadopunjeno nazivom biljne vrste za ulja koja su dobivena rafinacijom jedne vrste sirovih biljnih ulja) i
- "biljno ulje" (za ulje koje je dobiveno rafinacijom jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja).

Prozvodi koji se dobivaju prešanjem odgovarajućih sirovina na temperaturi od 50 °C nazivaju se hladno prešana ulja. Kod proizvodnje hladno prešanih ulja može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja, a on se postiže pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.

Djevičanska ulja su proizvodi koji se mogu dobiti odgovarajućim mehaničkim postupcima (prešanjem) uz primjenu topline, iz odgovarajućih sirovina. Kod djevičanskih ulja također se može provesti postupak čišćenja, odnosno bistrenja i to pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.

Djevičanska ulja i hladno prešana ulja, moraju zadovoljavati sljedeće zahtjeve:

1. da su karakteristične boje,
2. da su miris i okus karakteristični za vrstu sjemena ili ploda, bez stranog i/ili užeglog mirisa i okusa,
3. da ne sadrže više od 2 % slobodnih masnih kiselina (izraženih kao oleinska kiselina),

4. da peroksidni broj nije veći od 7 mmol O₂/kg,
5. da sadrže najviše 0,4 % vode i tvari hlapljivih na temperaturi 105 °C,
6. da sadrže najviše 0,05 % nehlapljivih nečistoća i
7. da hladno prešana ulja ne sadrže više od 0,15 mg/kg stigmastadiena (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, NN 11/19).

2.2.1. Lan

Lan (Italik L.) se uzgajao još i prije 3000 godina te je jedna od najstarijih i glavnih tekstilnih biljaka koja se uzgaja na području umjerene i hladne klime. Njega su uzgajali još i stari Egipćani, Grci i Rimljani. Radi sjemena, lan se najviše uzgaja na području Argentine, Francuske, Ukrajine, Etiopije, Rusije, Bangladeša, Kine, SAD-a i Kanade. Oko 70 % učešća na svjetskom tržištu u proizvodnji lanenih tekstilnih vlakana predstavlja Rusija (Dimić, 2005.)

Lan se uzgaja u tri svrhe:

- samo za vlakno (tekstilni lan),
- samo za sjeme (uljani lan) i
- za vlakno i sjeme (kombinirano) (Stanković i Petrović, 1998.).

Lan je plod jednogodišnjih biljaka iz porodice lanova (Linaceae), s više od 200 različitih vrsta. Gotovo su sve vrste divlje, neke se uzgajaju kao ukrasne biljke, a za proizvodnju vlakana i sjemena uzgajaju se jedino obični ili pravi lan (Italik). Ima tanku uspravnu stabljiku, cjelovite uske listove i zrakasto simetrične, peteročlane, modre ili bijele cvjetove. Plod je peterogradan, na vrhu zašiljen, trouglasti tobolac u kojem se nalazi do 10 sjemenki. Lan za vlakno ima stabljiku visine 60-120 cm, razgranatu samo u vršnom dijelu, a lan za ulje ima kratku, razgranatu stabljiku visine 40-60 cm s većim brojem tobolaca (35-50) (web 1 www.enciklopedija.hr). **Slika 7** prikazuje građu lana.



Slika 7 Građa lana

Biljci lanu najviše odgovaraju proladna područja te vlažne i umjerene klime. Lan ne treba vraćati na istu površinu prije 5 godine, jer ne podnosi uzgoj u monokulturi (Šimetić, 2008.).

Sjemenka lana građena je od jezgre (60 %), endosperma (21 %) i ljuske (19 %). Za uljani lan masa 1000 zrna iznosi od 6 do 14 g, a za tekstilni lan masa 1000 zrna iznosi od 4 do 7 g. Prosječan sadržaj ulja sjemena lana je oko 40 %, a njegov prinos je oko 1500 kg/ha. Prema ovim podacima prinos ulja iznosi oko 550 do 650 kg/ha (Karlović i Andrić, 1996.).

2.2.2. Sastav i fizikalno-kemijske karakteristike ulja lana

Jedan od najvažnijih izvora sušivih ulja je upravo sjeme lana. Vrlo je bogato uljem, što dosta ovisi o vrsti lana. Bogato je i proteinima, što se može vidjeti u **Tablici 4**.

Tablica 4 Sastav sjemenki lana (Dimić, 2005.)

Komponenta	Karlović i Andrić, 1996.	Karleskind, 1996.	Wiley, 1996.*
Ulje (% na ST)			
-tekstilni lan	32 - 35	< 40	-
-uljani lan	38 - 45	35 - 45	34
Sirovi proteini (%)			23
Proteini (% na ST sačme)	32 - 40	36 - 40	
Nedušične tvari (%)			24
Sirova celuloza (% na ST sačme)	9 - 11	-	7**
Pepeo (%)			5

*podaci pri sadržaju vlage u sjemenu od 9%; **sirova vlakna

Sirovo laneno ulje je tamno žute boje te ima jak i specifičan okus i miris, ima visoki sadržaj nezasićenih masnih kiselina. Zbog visokog jodnog broja i velike količine linolenske kiseline, najčešće se koristi za proizvodnju boja, lakova, mekih sapuna i tiskarskih boja. U **Tablici 5** i **Tablici 6** se mogu vidjeti podaci o jodnom broju i velikoj količini linolenske kiseline u lanenom ulju. Iz sjemenki lana se dobivaju i mnogi plastični polimeri koji se koriste u proizvodnji suvremenih sintetičkih podnih podloga. Laneno ulje se koristi i u izradi nekih farmaceutskih preparata te kao laksativ (Dimić, 2005.).

Tablica 5 Fizikalno-kemijske karakteristike lanenog ulja (Dimić, 2005.)

Pokazatelj	Karleskind, 1996.	Swern, 1972.	Dimić i sur., 2003.*
Rel. zaprem masa (20°C/voda 20°C)	0,928 – 0,933		
Indeks refrakcije (n _{20D}) (n _{40D})	1,479 – 1,484 -	- -	- 1,467
Viskozitet (cP) pri 20°	42 – 47	-	-
Jodni broj (g/100g)	170 – 204	165 – 204	184
Saponifikacijski broj (mg KOH/g)	189 – 196	-	189

*karakteristike ulja dobivene hladnim prešanjem sorte Olin

Tablica 6 Sastav masnih kiselina lanenog ulja (% m/m) (Dimić, 2005.)

Masna kiselina	Ulje sa područja: Karleskind, 1996.			Swern, 1972.	Dimić i sur., 2003.*
	Europa	Kanada	Indija		
C _{16:0} palmitinska	4 – 6	5 – 6	9 – 10	4 – 7	9,14
C _{18:0} stearinska	2 – 3	3 – 4	7 – 8	2 – 5	2,43
C _{18:1} oleinska	10 – 22	19 – 20	10 – 21	12 – 34	20,87
C _{18:2} linolna	12 – 18	19 – 20	13 – 15	17 – 241	15,63
C _{18:3} linolenska	56 - 71	54 – 61	50 - 61	35 – 60	51,92

*sastav masnih kiselina ulja dobivenog hladnim prešanjem sorte Olin

Ulje lana ima dosta slabu održivost i jako je osjetljivo na oksidaciju, a uzrok tome je specifični sastav masnih kiselina. **Tablica 7** prikazuje slabu održivost i oksidacijsko stanje hladno prešanog lanenog ulja.

Tablica 7 Oksidacijsko stanje i održivost hladno prešanog lanenog ulja* (Dimić i sur., 2003.)

Pokazatelj	Uzorak 1 **	Uzorak 2	Uzorak 3
Peroksidni broj (mmol/kg)	2,23	0,29	1,29
Anisidinski broj ($100 A^{1\%}_{350nm}$)	0,00	0,00	0,00
Specifične apsorbcije $A^{1\%}_{350nm}$	2,24	3,10	1,47
	0,34	0,56	0,37
Indukcijski period ^{a)} pri 100°C (h)	2,25	4	-
Oven test, Peroksidni broj (mmol/kg)			
- nakon 2 dana	7,77	6,58	0,67 ^{b)}
- nakon 4 dana	24,34	20,35	1,59

*uzorci su uzeti s tržišta iz redovne prodaje u makrobiotičkoj prodavnici

**u ovom uzorku je sadržaj bakra iznosio 0,49 mg/kg

^{a)}Rancimat test

^{b)}najvjerojatnije dodan antioksidans

Sljedeća **Tablica 8** prikazuje sadržaj i sastav neosapunjivih tvari lanenog ulja. γ tokoferol je najzastupljeniji tokoferol lanenog ulja te je prisutan u količini od 90 do 97 % od ukupnih tokoferola (Valasco, 2000.).

Tablica 8 Sadržaj neosapunjivih tvari ulja lana (Dimić, 2005.)

Neosapunjive tvari	Karleskind, 1996.	Baza podataka, tehnološki fakultet, Novi Sad
Sadržaj neosapunjivih tvari (g/kg)	5 – 13	7 – 8
Sadržaj ukupnih sterola (mg/kg)	2000 – 4100	-
Sastav sterola: %od ukupnih sterola		
Campesterol	28 – 29	-
Stigmasterol	9 – 10	-
β sitosterol	44 – 53	-
Δ 5-Avenasterol	10 – 13	-
Sadržaj ukupnih tokoferola (mg/kg)	1100 – 1300	585 – 638
Ugljikovodici (mg/100g)	80 – 100	-
Skvalen (mg/100g)	20 – 30	-
Triterpen alkoholi (mg/100g)	150	-

*karakteristike ulja dobivenog hladnim prešanjem lana sorte Olin

2.2.3. Upotreba lana

Od stabljike predivog lana se dobije kvalitetno vlakno, a iz njega konac koji je tanak i od kojeg se tkaju fina platna. Fina platna se najčešće koriste za odjevne predmete i za razne rukotvorine. Kada se vlakno odvaja od stabljike dobije se pozder iz kojeg se prešanjem dobiju briketi, koji se mogu koristiti za ogrjev. Iz pozdera se prešanjem mogu dobiti i ploče koje se upotrebljavaju u građevinarstvu, a pozder u rinfuzi upotrebljava se kao stelja u peradarnicama. Stabljika lana se može upotrijebiti u proizvodnji finih cigaretnih papira i papira za novčanice. Od tobolaca, kada se vršidbom izdvoji sjeme, dobiva se pljeva koja se koristi u hranidbi krava i konja (Šimetić, 2008.).

Iz sjemena predivog i uljanog lana dobije se ulje koje je hladno prešano te se može koristiti na različite načine. Koristi se u proizvodnji boja i lakova, brzo se suše i prave tvrdi sloj. Lakosušivo je zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina te se u industriji koristi za razne potrebe: u proizvodnji uljanog platna, tiskarske tinte, linoleuma, kitova, imitacije kože,

sapuna, za pješčane kalupe koji služe za lijevanje metala te kao namaz za zaštitu cementnih i asfaltnih površina na pločnicima i autocestama (zbog otpornosti na sol) (Šimetić, 2008.).

U procesu dobivanja ulja, kao nusproizvod dobije se uljana pogača ili uljani kolač, a ona služi za dobivanje lanenog brašna. Laneno brašno se koristi kao koncentrirana stočna hrana u krmnim smjesama (Šimetić, 2008.).

S medicinskog stajališta, laneno ulje je dobro za bolesti na koži (ekcemi, psorijaza, akne ili opekline). Laneno ulje, sjeme, lanena pogača i lanena sluz su dobri protiv kašlja, za grčeve u želucu, žučne kamence, čireve, hemoroide i sl. Kao sredstvo za grgljanje kod upala u ustima, ždrijelu, desnama te kod upala želučane sluznice se koristi čaj od lanenog sjemena. Lan je također dobar za zdravlje srca i krvožilnog sustava, smanjuje razinu lošeg kolesterola te samnjuje rizik od nastanka raka jajnika i dojke. Lignini iz lana umanjuju aktivnost estrogena, pomažu zdravlju debelog crijeva te smanjuju mogućnost pojave zatvora (Šimetić, 2008.).

2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA

Jestiva biljna ulja su izrazito ograničenog vremenskog trajanja, zbog toga što podliježu različitim mikrobiološkim i enzimskim procesima te različitim kemijskim reakcijama koje dovode do kvarenja ulja. Koje kvarenje će nastupiti i koji razgradni produkti će nastati ovisi od vrste ulja, načina i uvjeta čuvanja ulja. Razgradni produkti ulju daju neugodan okus i miris, a produkti kao što su peroksidi i polimeri mogu biti štetni za ljudsko zdravlje. Kvarenjem biljnih ulja također dolazi i do promjene prehrambene vrijednosti, jer dolazi do gubitka biološki aktivnih tvari kao što su vitamini i esencijalne masne kiseline (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Kako bi se kvarenje spriječilo vrlo je važno znati, već tijekom same proizvodnje ali i skladištenja, uzroke kvarenja, mehanizam procesa i način sprječavanja (Čorbo, 2008.).

Vrste kvarenja do kojih može doći u biljnim uljima su:

1. Enzimski i mikrobiološki procesi:
 - Hidrolitička razgradnja i
 - β -ketooksidacija.

2. Kemijski procesi:

- Autooksidacija,
- Termooksidacijske promjene i
- Reverzija.

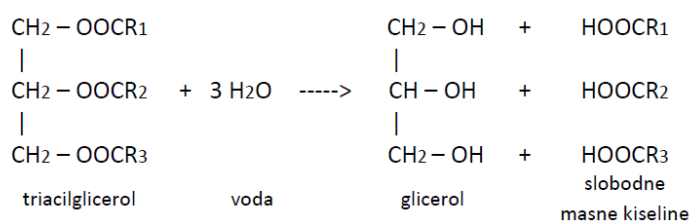
2.3.1. Enzimski i mikrobiološki procesi

Procesi kvarenja koji su karakteristični za ulja i masti u sirovini uzrokuju enzimi, a procese koji su karakteristični za neke vrste ulja, masti i proizvode sa većim udjelom masti uzrokuju mikroorganizmi. Kako bi enzimi i mikroorganizmi mogli uzrokovati kvarenje masti i ulja, potrebna im je povoljna sredina za rast i razvoj, odnosno određeni pH sredine, voda i dr.

Zbog toga je vrlo bitno pravilno skladištiti sjemenke i plodove, jer se disanjem sjemena povećava toplina, a ona pogoduje aktivnosti autohtonih enzima. Hidrolitička razgradnja i β -ketoosidacija pripadaju enzimskoj i mikrobiološkoj vrsti kvarenja biljnih ulja i masti (Moslavac, 2013.).

Hidrolitička razgradnja

U molekuli triglicerida (triacilglicerola) u prisustvu vode i enzima lipaze dolazi do cijepanja esterske veze između masne kiseline i alkohola glicerola. Ovom reakcijom izdvajaju se slobodne masne kiseline koje uzrokuju kiselost ulja. Osim slobodnih masnih kiselina nastaju i monogliceridi, digliceridi te alkohol glicerol. Zbog povišenog udjela vode u proizvodima kao što su maslac, margarin, mesni i mliječni proizvodi, najčešće dolazi do hidrolitičke razgradnje. Hidrolitičku razgradnju pospješuje viša temperatura, dok temperature iznad 80 °C i ispod -20 °C inaktiviraju enzim lipazu te dolazi do zaustavljanja hidrolitičke razgradnje (Rade i sur., 2001.). **Slika 8** prikazuje hidrolitičku razgradnju molekule triacilglicerola.



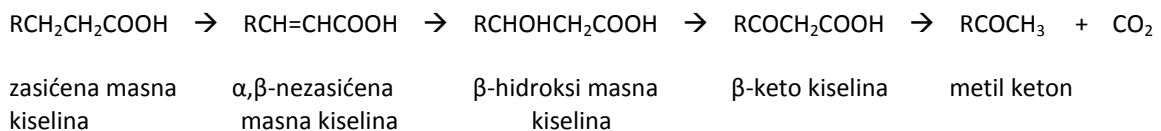
Slika 8 Hidrolitička razgradnja triacilglicerola

Pravilnikom o jestivim uljima i mastima određen je dozvoljeni udio slobodnih masnih kiselina (SMK) te se njihovim određivanjem prati stupanj hidrolitičkih promjena u biljnom ulju. U hladno prešanim uljima i djevičanskim uljima udio SMK maksimalno smije iznositi 2 % (izraženih kao oleinska kiselina), dok u rafiniranim uljima udio SMK maksimalno smije iznositi 0,3 % (izraženih kao oleinska kiselina) (Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 11/19).

β -ketoooksidacija

Plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* te bakterije *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*, glavni su uzročnici β -ketoooksidacije. Prema tome β -ketoooksidacija pripada mikrobiološkim procesima kvarenja biljnih ulja i masti.

Mikroorganizmi djeluju na zasićene masne kiseline (ZMK) odnosno na metilnu skupinu u β položaju prema karboksilnoj skupini, u prisutnosti kisika. Na **Slici 9** može se vidjeti reakcija β -ketoooksidacije. Kao primarni produkti β -ketoooksidacije nastaju β -keto kiseline, a kao sekundarni produkti nastaju metil ketoni koji daju neugodan miris (užeglost) uljima i mastima (Rade i sur., 2001.).



Slika 9 Reakcija β -ketoooksidacije

Neke vrste mikroorganizama koje uzrokuju ovu vrstu kvarenja ulja i masti, djeluju na stvaranje pigmenata (žuti, crveni, plavo-zeleni) te mijenjaju boju masti (Čorbo, 2008.).

β -ketoooksidacija može se spriječiti tako da se onemogući razvoj mikroorganizama, a to se postiže odgovarajućim načinima kao što su:

- pasterizacija,
- sterilizacija,
- mijenjanje pH i temperature i
- dodatak aditiva i konzervansa.

2.3.2. Kemijski procesi

Kemijski procesi kvarenja biljnih ulja su:

- Autooksidacija,
- Termooksidacijske promjene i
- Reverzija.

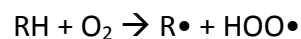
Autooksidacija ulja

Ovo je najčešća vrsta kvarenja biljnih ulja. Do autooksidacije dolazi djelovanjem kisika iz zraka na nezasićene masne kiseline. Povišena temperatura i veći broj proooksidanasa kao što su svjetlost, tragovi metala i dr., ubrzavaju autooksidaciju, dok ju antioksidansi usporavaju. Ovaj proces se odvija i na temperaturi nižoj od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ te ga je teško spriječiti. Neka istraživanja su pokazala da svjetlost kraće valne duljine ($<380\text{ nm}$) također ubrzava ovu reakciju, ali i pospješuje razgradnju hidroperoksida. Tragovi iona metala, najčešće Cu (bakar) i Fe (željezo), se često mogu pronaći u ulju te djeluju kada su hidroperoksidi prisutni. Inaktivatori metala kao što su limunska, askorbinska, fosforna kiselina, lecitin i dr., sprječavaju utjecaj iona metala tako što ih vežu u komplekse.

Autooksidacija je lančana reakcija kojom dolazi do stvaranja slobodnih radikala i sastoji se od 3 faze:

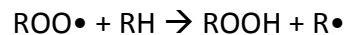
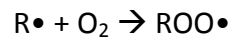
1. inicijacija,
2. propagacija i
3. terminacija.

1. Faza - inicijacija (početak reakcije)

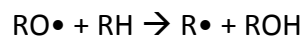
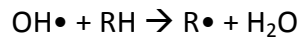


U fazi inicijacije, kisik iz zraka napada dvostruku vezu nezasićene masne kiseline (RH), dolazi do hemolitičkog cijepanja te nastaju slobodni radikal ($\text{R}\bullet$) i izdvaja se vodik.

2. Faza – propagacija (tijek reakcije)



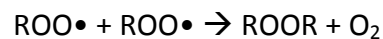
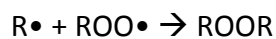
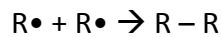
U ovoj fazi nastaju hidroperoksidi (ROOH) i slobodni radikali peroksida (ROO•) vezanjem kisika na slobodne radikale masnih kiselina (R•).



Hidroperoksidi (primarni produkti) su labilni spojevi i oni se dalje razgrađuju na slobodne radikale, na produkte oksidacije (sekundarne produkte) kao što su karbonilni spojevi, aldehidi, ketoni, masne kiseline i alkoholi koji daju neugodan miris.

Reaktivni slobodni radikali (RO•, ROO•) napadaju nove lance masnih kiselina te stvaraju hidroperokside i slobodne radikale.

3. Faza – terminacija (završetak reakcije)



U trećoj, završnoj fazi, slobodni radikali međusobno reagiraju i nastaju finalni produkti oksidacije, a to su inaktivni i stabilni polimeri (R-R, ROOR) i time završava reakcija autooksidacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001.).

Termooksidacijske promjene ulja i masti

Na temperaturama višim od 100 °C oksidacija se ubrzava te osim produkata oksidacije nastaju i produkti termooksidacije. Produkti termooksidacije najčešće su: cikličke masne kiseline, dimeri, polimeri masnih kiselina i triglicerida, oksipolimeri i ostali hlapljivi i nehlapljivi spojevi (Odak, 2013.).

Do fizikalnih i kemijskih promjena dolazi tijekom prženja hrane na visokim temperaturama. Dolazi do porasta viskoznosti, indeksa refrakcije i specifične težine, zatim do porasta udjela SMK, broja osapunjenja, porasta peroksidnog broja i smanjenja jodnog broja.

Jodni broj služi za utvrđivanje kvalitete ulja tijekom prženja hrane. Kada se jodni broj snizi za 5 %, to znači da se to biljno ulje više ne smije koristiti za prženje hrane (Odak, 2013.).

Reverzija

Pojava neugodnog mirisa na sirovinu ili na ribu, koji se pojačava zagrijavanjem ulja, naziva se reverzija. Najčešća je kod sojinog i repičinog ulja. Uzrok reverzije i način sprječavanja još uvijek nisu skroz poznati, ali se pretpostavlja da su uzrok razgradni produkti nekih negliceridnih sastojaka ili razgradni produkti linolenske kiseline.

Načini na koje se može ublažiti reverzija ulja i produžiti njegova održivost su:

1. pravilno odabrani uvjeti rafinacije uz dodatak limunske kiseline na početku ili poslije procesa dezodorizacije i
2. djelomično selektivna hidrogenacija ulja s ciljem uklanjanja linolenske kiseline (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

2.4. OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA

Oksidacijske reakcije i razgradnja produkata oksidacije, glavne su degradacijske reakcije koje dovode do smanjenja senzorskih svojstava i nutritivne vrijednosti biljnih ulja. S toga je uljima potrebno produžiti otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Najvažnije je usporiti oksidacijske reakcije, a to se postiže primjenom niskih temperatura, uklanjanjem kisika, pakiranjem ulja u obojenu staklenu ambalažu te drugim metodama kao što su dodatak antioksidanasa i sinergista (Ergović Ravančić, 2017.).

2.4.1. Antioksidansi

Reducirajuće tvari koje u niskim koncentracijama usporavaju ili sprječavaju oksidacijsko kvarenje te produžuju oksidacijsku stabilnost biljnih ulja nazivaju se antioksidansi (Yanishlieve i Marinova, 2001.).

Njihovo djelovanje ovisi o nizu čimbenika:

- sastavu masnih kiselina u ulju,
- udjelu antioksidanasa već prisutnih u ulju,
- svojstvima antioksidanasa,
- uvjetima čuvanja ulja,
- vremenu kada se dodaju u ulje,
- koncentraciji antioksidanasa itd.

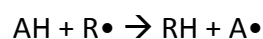
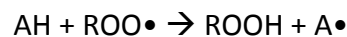
Antioksidansi ne mogu poboljšati kvalitetu ulja ako je ono već oksidiralo (Schuler, 1990.).

Uvjeti koje antioksidansi moraju zadovoljiti su:

- dobro se otapati u uljima i mastima,
- aktivno djelovanje prilikom dodavanja mora biti u vrlo malim koncentracijama (0,001 do 0,02 %),
- ne smiju uzrokovati strani miris i okus,
- moraju djelovati na proizvod u kojem se mast nalazi, a ne samo na mast,
- određivanje i identifikacija antioksidanasa mora biti jednostavna i
- ne smiju biti previše skupi (Čorbo, 2008.).

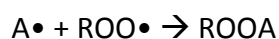
Mehanizam djelovanja antioksidanasa temelji se na dvije reakcije:

1. Prva reakcija



U ovoj reakciji antioksidans (AH) daje vodik (H) te se taj vodik veže na slobodni radikal peroksida (ROO•) ili radikal masne kiseline (R•).

2. Druga reakcija



Tijekom ove reakcije slobodni radikal antioksidansa ($A\bullet$) se veže na slobodni radikal peroksida ($ROO\bullet$) ili slobodni radikal masne kiseline ($R\bullet$).

Ove dvije reakcije prekidaju lančanu reakciju oksidacije i time produžuju održivost masti i ulja. Zbog već stvorenih hidroperoksida u oksidacijskim reakcijama, antioksidansi neće spriječiti reakciju, ali je važno da peroksidni broj ulja bude manji od 1. Prema mehanizmu djelovanja, antioksidansi se mogu podijeliti na primarne i sekundarne, jer mogu djelovati u različitim fazama oksidacijskog kvarenja. Primarni i sekundarni antioksidansi mogu biti prirodni i umjetni (sintetski).

Primarni antioksidansi doniraju vodikov atom slobodnom radikalumu ili ulaze u reakciju zajedno sa slobodnim radikalima. Prilikom te reakcije nastaje stabilan, inaktivan produkt koji se u proces oksidacije više ne može uključiti.

Skupini primarnih antioksidanasa pripadaju fenoli, galati, butil hidroksianisol, butil hidroksitoluen, terc butil hidrokinon, tokoferoli, askorbati, flavonoidi, ekstrakti biljaka i začina te su neki od njih prikazani u **Tablici 9**.

Tablica 9 Primarni antioksidansi (Shahidi, 2005.)

Prirodni	Sintetski
Karotenoidi	Butil hidroksianisol (BHA)
Flavonoidi	Butil hidroksitoluen (BHT)
Fenolne kiseline	Tercijarni butilhidrokinon (TBHQ)
Tokoferoli i tokotrienoli	Propil galat

Za razliku od primarnih, sekundarni antioksidansi djeluju tako što hvataju ione metala koji su prisutni u ulju. Skupini sekundarnih antioksidanasa pripadaju:

- limunska kiselina,
- fosforna kiselina,
- EDTA (etilendiamin tetra-acetat),
- određene aminokiseline i dr.

Antioksidacijskim indeksom (AI) izražava se antioksidacijsko djelovanje. On pokazuje koliko je puta povećana održivost masti ili ulja uz dodatak antioksidansa.

$$\text{Antioksidacijski indeks (AI)} = \frac{s_2}{s_1}$$

s₂ – održivost masti s dodanim antioksidansom,

s₁ – održivost masti bez dodanog antioksidansa.

Prirodni antioksidansi

Tokoferoli, fenolne kiseline, flavonoidi, karotenoidi, ekstrakti biljaka (zeleni čaj, kadulja, ružmarin, origano...) pripadaju skupini prirodnih antioksidanasa. Oni se nalaze i u raznim dijelovima biljaka, a to su korijen, sjemenke i lišće (Berra i sur., 2006.).

Dobra proizvođačka praksa (DPP) je dozvoljena koncentracija prirodnih antioksidanasa u jestivim uljima te iznosi od 0,05 do 0,2 %. Ovi antioksidansi dodani u biljno ulje ne smiju promijeniti organoleptička svojstva ulja (okus, boja, miris).

1. Tokoferoli

Jedni od najzastupljenijih prirodnih antioksidanasa koji se nalaze u biljnim uljima su tokoli. Postoje dvije grupe tokola, a to su: tokoferoli i tokotrienoli. Oni su po kemijskom sastavu metil derivati cikličkog alkohola tokola. U uljima i mastima se nalaze u obliku neosapunjivih tvari.

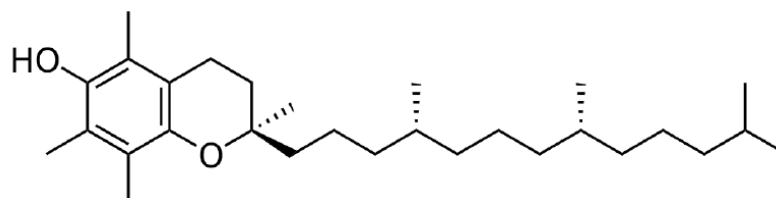
Osam tokola koji postoje u prirodi, nalaze se u α , β , γ i δ oblicima. Njihovo biološko i antioksidacijsko djelovanje ovisi o rasporedu metilnih grupa na kromanolnom prstenu (Schuler, 1990.).

α -tokoferol ima najbolje vitaminsko djelovanje, a γ -tokoferol i δ -tokoferol imaju najbolje antioksidacijsko djelovanje, što se može vidjeti u prikazanoj **Tablici 10**.

Tablica 10 Prikaz vitaminskog i antioksidacijskog djelovanja pojedinih tokoferola

Vrsta tokoferola	Vitaminsko djelovanje	Antioksidacijsko djelovanje
α -tokoferol	100	100
β -tokoferol	33	110
γ -tokoferol	1	160
δ -tokoferol	1	170

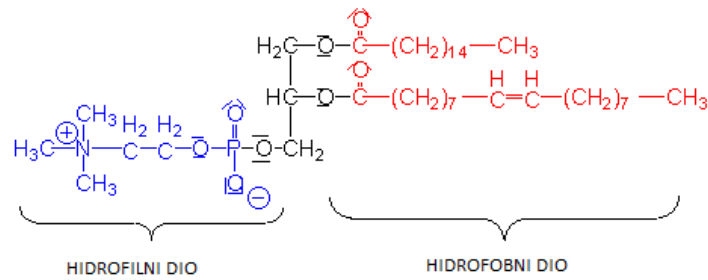
α -tokoferol je poznat i kao vitamin E, a on se u prisustvu UV svjetlosti i na povišenoj temperaturi degradira. Struktura α -tokoferola se može vidjeti na **Slici 10** (Shahidi, 2000.).

**Slika 10** Strukturna formula α -tokoferola

Sadržaj tokoferola u biljnim uljima može varirati, a on ovisi o vrsti i uvjetima uzgoja sirovine i o uvjetima procesiranja te skladištenja samog ulja (Schuler, 1990.).

2. Lecitin

Lecitin pripada skupini fosfolipida koji nastaju esterifikacijom alkohola glicerola sa masnim kiselinama i fosfornom kiselinom. Kada se na fosfornu kiselinu esterski veže organska baza kolin, nastaje fosfolipid koji se naziva fosfatidil-kolin odnosno lecitin. Uz to što se koristi kao prirodni antioksidans, zbog svojih amfifilnih svojstava koristi se i kao emulgator (Moslavac, 2013.). Na **Slici 11** prikazana je strukturna formula lecitina.



Slika 11 Strukturna formula lecitina

3. Začinsko bilje

Ekstrakt ružmarina ima vrlo jako antioksidacijsko djelovanje i zbog toga je jedan od često korištenih antioksidanasa u industriji. On sadrži karnosolnu kiselinu, karnosol i ružmarinsku kiselinu koji imaju sposobnost doniranja vodika slobodnim radikalima te na taj način prekidaju proces oksidacije (Škevin, 2003.).

Ekstrakt kadulje također ima antioksidacijsko djelovanje, a za to su zaslužne fenolne kiseline, fenolni diterpeni i flavonoidi.

U ekstraktu timijana, aktivne komponente koje su odgovorne za antioksidacijsko djelovanje su engenol, timol i karvakrol. Oni imaju jače djelovanje od sintetskih antioksidanasa BHA i BHT.

Sintetski antioksidansi

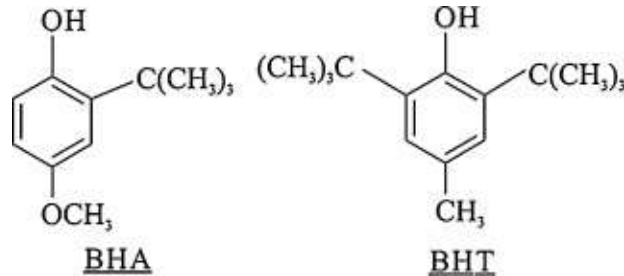
Kontrolirani su Pravilnikom o prehranbenim aditivima (NN 62/2010) te se propisane koncentracije njihovog dodavanja kreću od 0,005 do 0,02 %. Njihovo dodavanje je strogo propisano jer su stvoreni kemijskim putem i ne nalaze se prirodno u hrani.

Sintetskim antioksidansima pripadaju:

- butil hidroksianisol (BHA),
- butil hidroksitoluen (BHT),
- alkil esteri galne kiseline: propil galat (PG), butil galat (BG), oktil galat (OG), dodecil galat i

- tercijarni butilhidrokinon (TBHQ).

Sintetski antioksidansi su jeftiniji te su termički stabilniji od prirodnih, dok prirodni antioksidansi imaju snažnije, efikasnije te zdravstveno sigurnije djelovanje.



Slika 12 kemijska struktura BHA i BHT

2.4.2. Sinergisti

Kemijski spojevi koji se koriste s nekim od antioksidanasa produžujući njegovo djelovanje nazivaju se sinergisti. Neki sinergisti s antioksidansima mogu dovesti do ubrzanja procesa oksidacije te se po tome vidi da ne djeluju svi sinergisti sa svakim antioksidansom.

Sinergisti koji se češće koriste u industriji ulja su:

- limunska kiselina,
- askorbinska kiselina,
- octena kiselina,
- monoizopropilcitrati,
- askorbilpalmitat i
- lecitin.

Djelovanje sinergista se odvija na nekoliko načina:

- sprječavaju prooksidacijsko djelovanje iona metala, tako što ih vežu i inaktiviraju,
- vežu se s radikalom antioksidansa te zaustavljaju njegov utjecaj na razgradnju peroksida i
- daju vodikov atom radikalumu antioksidansa, regeneriraju ga i produžuju njegovu trajnost (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE

Prilikom određivanja stupnja oksidacije ulja, uvijek se koristi nekoliko različitih metoda.

Metode određivanja stupnja oksidacije su:

- senzorske metode,
- fizikalne metode i
- kemijske metode.

Senzorske metode

Senzorske metode se koriste za određivanje neugodnog mirisa i okusa. Neugodan okus i miris, odnosno užeglost nastaju oksidacijom ulja. Ova metoda je dobar pokazatelj, ali nedostatak ove metode je subjektivnost i nedovoljne su za donošenje konačne ocjene.

Fizikalne metode

U **Tablici 11** prikazane su fizikalne metode koje se koriste za određivanje stupnja oksidacije biljnih ulja i animalnih masti.

Tablica 11 Fizikalne metode za određivanje stupnja oksidacije (Dimić i Turkulov, 2000.)

Fizikalne metode	Ispitivani parametri
UV-spektrofotometrija	Konjugirani dieni/trieni
IR-spektrofotometrija	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
NMR (nuklearna magnetska rezonanca)	Hidroperoksidi i alkoholi
Fluoroscencija	Karbonilni spojevi i ketoni
Plinska kromatografija	Hlapljivi spojevi
HPLC	Malonaldehidi i sekundarni produkti
Indeks refrakcije	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Polarografija	Hidroperoksidi
Kulometrija	Hidroperoksidi
Kromatografija u koloni	Polimeri, polarni spojevi

a) UV spektrofotometrija

Primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi, linolne kiseline i konjugirani dieni) na 232 nm pokazuju apsorpcijski maksimum u UV području, dok sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni, konjugirani trieni) na 270 nm pokazuju apsorpcijski maksimum.

Odnos ovih apsorbanacija izražava se kao:

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

Kada je R-vrijednost niža, znači da je ulje lošije kvalitete jer sadrži više konjugiranih triena i sekundarnih produkata oksidacije (Dimić i Turkulov, 2000.).

b) Plinska kromatografija

Ovom metodom određuju se aldehidi koji su glavni nosioci mirisa i okusa po užglosti. Plinska kromatografija je uspješna samo u čistim uljima i mastima, a u kompleksnim lipidnim sustavima (hrana), nije moguća (Rade i sur., 2001.).

Kemijske metode

U kemijske metode određivanja stupnja oksidacije ubrajamo: metode u kojima se određuju primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi) i metode u kojima se određuju sekundarni produkti oksidacije nastali razgradnjom hidroperoksida (aldehidi i ketoni). Kemijske metode koje se koriste za određivanje stupnja oksidacije navedene su u **Tablici 12**.

Tablica 12 Kemijske metode za određivanje stupnja oksidacije (Dimić i Turkulov, 2000.)

Kemijske metode	Ispitivani parametar
Peroksidni broj (Pbr)	Peroksidi
TBK test (broj)	Malonaldehidi
Karbonilni broj	Svi spojevi su karbonilnom grupom
Anisidinski broj (Abr)	Nehlapljivi karbonilni spojevi
Kreis test	Epoksaldehidi i acetali
Oksidacijska vrijednost (OV) ili Totox broj	Ukupni sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije

a) Peroksidni broj (Pbr)

Količina hidroperoksida i peroksida kao primarnih produkata oksidacije ulja određuje se ovom metodom. Najčešće se primjenjuje Lea i Wheeler metode. To su jodometrijske metode i zasnivaju se na određivanju količine joda kojeg iz kalij-jodida oslobađaju peroksidi.

Može se koristiti i kolorimetrijska metoda, a ona se zasniva na oksidaciji željezo (II) soli u željezo (III) soli, tj. fero oblik soli u feri oblik soli. Dolazi do mijenjanja intenziteta nastalog obojenja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001.).

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/19) vrijednost Pbr je određena: za hladno prešana i djevičanska ulja iznosi maksimalno 7 mmol O₂/kg, a za rafinirana biljna ulja iznosi maksimalno 5 mmol O₂/kg.

a) Tiobarbiturni broj (Tbr)

Koristi se kolorimetrijska metoda. Ova metoda se bazira na određivanju sekundarnih produkata oksidacije ulja. Kao rezultat reakcije tiobarbiturne kiseline sa malonaldehidom nastaje ružičasta boja te se njen intenzitet mjeri na 532 nm (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001.).

b) Anisidinski broj (Abr)

Ova metoda se temelji na reakciji p-anisidina sa višim nezasićenim aldehydima (2,4-dienal i 2-enal) u kiselom mediju. Određivanje Abr najčešće se koristi za ispitivanje kvalitete sirovih i jestivih ulja.

Dobar uvid u primarne i sekundarne produkte oksidacije ulja daje oksidacijska vrijednost (OV) ili Totox broj. OV ili Totox broj izračunava se iz vrijednosti Pbr i Abr (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001.).

$$OV = 2Pbr + Abr$$

2.6. METODE ODREĐIVANJA OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ULJA

U jestivim uljima glavni je problem proces oksidacije koji uzrokuje promjenu nutritivnih, senzorskih i kemijskih svojstava. Održivost ili oksidacijska stabilnost biljnih ulja predstavlja vremenski period tijekom kojeg je sigurno čuvati ulje od procesa autooksidacije. Kako bi se odredilo vrijeme čuvanja ulja od oksidacije i kako bi se mogao odrediti rok trajanja ulja, najvažnije je poznavati oksidacijsku stabilnost ulja.

Hoće li se proces autooksidacije odvijati brže ili sporije ovisi o:

- sastavu ulja,
- uvjetima čuvanja i
- prisutnosti i udjelu tvari koje ubrzavaju oksidaciju (Polvillo, 2004.).

Za određivanje održivosti, odnosno oksidacijske stabilnosti ulja i masti, primjenjuju se metode koje se temelje na ubrzanoj oksidaciji masti pod utjecajem nekog čimbenika koji uzrokuje kvarenje. Najčešće se koriste metode kod kojih se proces oksidacije ubrzava utjecajem temperature. Za nekoliko sati ili dana može se odrediti oksidacijska stabilnost ulja i masti ako se primjenjuju takve metode.

2.6.1. Schaal Oven test

Jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda je Schaal Oven ili Oven test. U termostatu ili sušioniku na 60 °C ili 63 °C se drže uzorci tijekom određenog vremenskog perioda i svaka 24 sata se određuje vrijednost peroksidnog broja te organoleptičke promjene uzorka.

Za održivost, odnosno oksidacijsku stabilnost uzimaju se:

- vrijednost Pbr nakon određenog vremenskog perioda trajanja testa (4 ili više dana),
- vrijeme u danima za koje Pbr ulja i masti dosegne određenu vrijednost i
- vrijeme u danima za koje se organoleptičkim ispitivanjima utvrdi užeglost (Dimić i Turkulov, 2000.).

Ispitivanja su utvrdila da jedan dan Oven testa odgovara od 6 do 12 dana čuvanja ulja pri sobnoj temperaturi (Dimić i Turkulov, 2000.).

2.6.2. Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method)

Uzorci ulja ili masti se zagrijevaju na temperaturu 97,8 °C u Swift aparaturi, gdje kroz uzorke prolazi struja zraka koja ih zagrijava. Uzorci ulja ili masti se uzimaju u određenim vremenskim intervalima i određuje se vrijednost peroksidnog broja u uzorcima. Sve dok se ne postigne unaprijed utvrđena vrijednost Pbr uzorci se drže u uređaju. Kvalitetnim uljem dobre stabilnosti smatra se ulje kojemu nakon 8 sati Swift testa Pbr iznosi manje od 5 mmol O₂/kg. Ispitivanja su pokazala da jedan sat AOM metode odgovara oko 20 dana čuvanja ulja na sobnoj temperaturi (Rade i sur., 2001.).

2.6.3. Rancimat test

Najbolja i najpreciznija metoda je Rancimat test. Ovaj test se temelji na ubrzanom kvarenju ulja na povišenim temperaturama (100 °C, 110 °C i 120 °C) i propuhivanju zraka kroz uzorak. Tijekom ove metode vrši se određivanje nižemolekularnih hlapljivih kiselina (mravlja, octena, propionska i kapronska), tako da se iz reakcijske posude Rancimat uređaja uvode u deioniziranu vodu. Prilikom toga mjeri se porast provodljivosti vode i na taj način indirektno se može pratiti oksidacijsko kvarenje ulja i masti. Konduktometrijski s automatskim registriranjem provodljivosti vode u funkciji vremena određuje se nastala količina hlapljivih kiselina.

Dužina indukcijskog perioda (IP) u satima određuje se pomoću ovog uređaja pri određenim uvjetima provedbe testa, a indukcijski period prikazuje otpornost ulja i masti na oksidacijsko kvarenje (Rade i sur., 2001.).

2.6.4. Test održivosti na 98 °C

Uzorci se na temperaturi od 98 °C drže u sušioniku te se svakih sat vremena vade i određuje se Pbr. Ovaj test se može koristiti ako nemamo originalnu Swift aparaturu te je utvrđena dobra korelacija između ovog testa i rezultata koji su dobiveni AOM i Oven testom. Nedostatak testa održivosti na 98 °C je taj što su uvjeti procesa autooksidacije neodgovarajući, jer proces oksidacije ulja nije isti na povišenoj temperaturi i na sobnoj temperaturi. Rezultati ovog testa pokazuju mogućnost korištenja za približno određivanje održivosti ulja na sobnoj temperaturi (Moslavac, 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj dodatka antioksidanasa i sinergista na održivost ili oksidacijsku stabilnost hladno prešanog lanenog ulja. Također će se ispitati utjecaj koncentracije dodanog antioksidansa u funkciji stabilizacije lanenog ulja.

Od prirodnih antioksidanasa koristili su se:

- ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less CS),
- ekstrakt ružmarina + limunska kiselina,
- ekstrakt ružmarina + askorbinska kiselina,
- α -tokoferol,
- mješavina tokoferola,
- ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH 96h,
- ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH 96h + limunska kiselina,
- ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH UZV i
- ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH UZV + limunska kiselina.

Od sintetskih antioksidanasa koristili su se:

- propil galat (PG) i
- butil hidroksianisol (BHA).

Ispitivanje oksidacijske stabilnosti hladno prešanog lanenog ulja sa i bez dodatka antioksidanasa, provelo se primjenom Schaal Oven testa (Oven test) na temperaturi 63 °C. Rezultati testa prikazani su vrijednostima peroksidnog broja tijekom pet dana provedbe ovog testa.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Hladno prešano laneno ulje

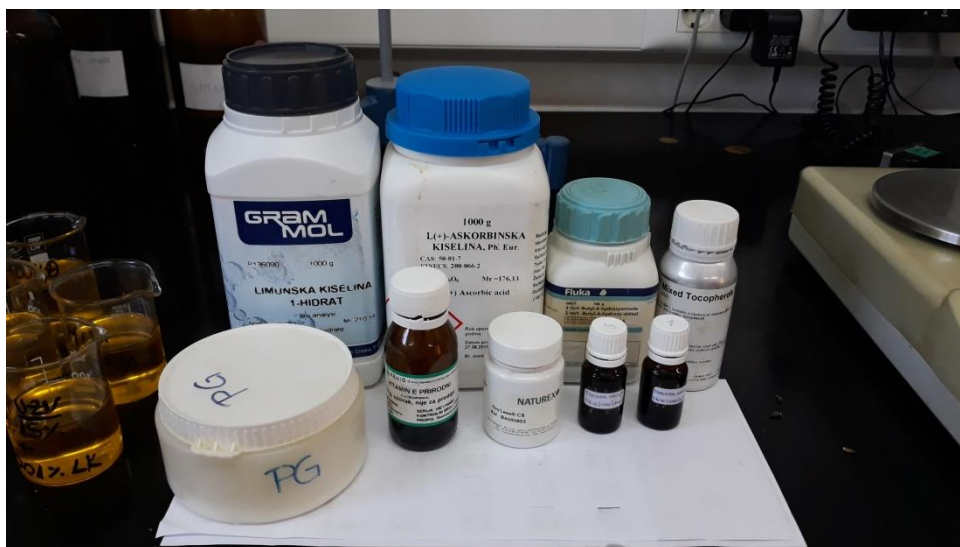
Hladno prešano laneno ulje dobiveno je prešanjem sjemenki lana, prirodnim taloženjem te filtracijom sirovog ulja. Prešanje je provedeno na kontinuiranoj pužnoj preši. **Slika 13** prikazuje dobiveno hladno prešano laneno ulje.



Slika 13 Uzorci dobivenog hladno prešanog lanenog ulja

Antioksidansi

Prilikom ispitivanja utjecaja dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog lanenog ulja, koristili su se prirodni i sintetski antioksidansi. Od prirodnih antioksidanasa koristili su se ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less CS), α -tokoferol, mješavina tokoferola, ekstrakt kadulje, a od sintetskih antioksidanasa primjenili su se propil galat (PG) i butil hidroksianisol (BHA). Korišteni antioksidansi prikazani su na **Slici 14**, a njihovi udjeli dodani u laneno ulje u **Tablici 13**.



Slika 14 Prirodni i sintetski antioksidansi

Tablica 13 Udio dodanih antioksidanasa u lanenom ulju

Antioksidans	Udio dodanog antioksidansa (%)
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)	0,05 i 0,15
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) + limunska kiselina	0,15 + 0,01
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) + askorbinska kiselina	0,15 + 0,01
α -tokoferol	0,05 i 0,15
Mješavina tokoferola	0,05 i 0,15
Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH 96h)	0,05 i 0,15
Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH 96h) + limunska kiselina	0,15 + 0,01
Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH UZV)	0,05 i 0,15
Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH UZV) + limunska kiselina	0,15 + 0,01
Propil galat (PG)	0,01
Butil hidroksianisol (BHA)	0,01

UZV – ekstrakt tretiran sa ultrazvukom

Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS)

Oxy'Less CS proizveden je u tvornici NATUREX, u Francuskoj. Dobiven je od listova ružmarina (Italik L.) te je u praškastom obliku. Udio karnosolne kiseline je 18 do 22 %, zaštitni faktor (PF) je veći od 12 %. Suha tvar ekstrakta je od 92 do 98 %.

Ekstrakt kadulje

Osušeni listovi biljke kadulje usitnjeni su u laboratorijskom mlinu. Količina od 10 g materijala je pripremljena s 65 %-tnim etanolom. Tinktura je pripremljena na klasičan način i čuvana 96 h u tamnom prostoru na sobnoj temperaturi. Nakon 96 h provedena je filtracija te koncentriranje do 10 mL na rotacijskom vakuum uparivaču. Nastali ekstrakt čuvan je na sobnoj temperaturi u tamnom prostoru.

α -tokoferol

To je prirodni antioksidans i stabilizator ulja. Naziva se još i vitamin E.

Mješavina tokoferola

Mješavina tokoferola sadrži: α -tokoferol (0-15 %), β -tokoferol (<5 %), γ -tokoferol (55-75%) i δ -tokoferol (20-30%).

Propil galat (PG)

Propil galat je sintetski antioksidans.

Butil hidroksianisol (BHA)

Butil hidroksianisol je sintetski antioksidans.

Sinergisti

Prirodnom antioksidansu ekstraktu ružmarina (Oxy'Less) dodani su i sinergisti limunska kiselina i askorbinska kiselina. Limunska kiselina je također dodana i ekstraktu kadulje.

3.2.2. Metode

3.2.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete ulja

Peroksidni broj (Pbr) po Wheeleru

Peroksidni broj predstavlja indikator svježine odnosno užeglosti neke masti ili ulja. Čuvanjem masti i ulja pod utjecajem prooksidanasa (kisik iz zraka, toplina, svjetlost, tragovi metala i dr.) dolazi do vezanja kisika na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina, te nastaju peroksidi odnosno hidroperoksidi. Oni nastaju u prvoj fazi kvarenja tzv. indukcionom periodu, kada još uvijek nisu vidljive organoleptičke promjene na mastima i uljima. U drugoj fazi kvarenja – period aktivne oksidacije – peroksidi se razgrađuju i nastaju oks- i ketomasne kiseline, aldehidi i ketoni koji su nosioci neugodnog (užeglog) mirisa.

Ova metoda određivanja se zasniva na sposobnosti peroksida da oslobode jod iz otopine kalij jodida, koji se zatim određuje titracijom s otopinom natrij tiosulfata.

Peroksidni broj su mL 0,002 M otopine natrij tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) potrebnog za redukciju one količine joda koju oslobodi 1 g masti ili ulja iz kalij jodida.

Izračun:

$$\text{PEROKSIDNI BROJ} = \frac{(a-b)*5}{c}$$

a – mL 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošeni za titraciju uzorka ulja,

b – mL 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošenih za titraciju slijepe probe,

c – masa uzorka (g).

Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Masti i ulja osim masnih kiselina vezanih u triacilglicerole sadrže i određenu količinu slobodnih masnih kiselina. Udio slobodnih masnih kiselina u ulju ili masti ovisi o upotrebljenoj sirovini, načinu dobivanja i uvjetima skladištenja.

Može se izraziti kao:

- kiselinski broj,
- kiselinski stupanj ili
- postotak oleinske kiseline.

Sve navedene vrijednosti mogu se dobiti istim postupkom određivanja, pa se mogu preračunati jedna u drugu.

KISELINSKI STUPANJ – mL 1M KOH (ili NaOH) potrebnog za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u 100 g masti ili ulja.

Udio SMK u biljnom ulju izračunava se iz formule:

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

V – volumen utrošene otopine NaOH za titraciju uzorka (mL),
c – koncentracija otopine NaOH utrošenog za titraciju (0,1 mol/L),
M – molarna masa oleinske kiseline (282 g/L),
m – masa uzorka (g).

Određivanje vlage u ulju

Količina vlage (vode) i hlapljivih tvari je važan pokazatelj kvalitete sirovih i jestivih biljnih ulja. Prisustvo vlage se smatra nečistoćom te je njenu količinu važno poznavati zbog ekonomskog interesa. Zbog prisustva vlage u ulju, pri određenim uvjetima, može doći do hidrolitičkih promjena što dovodi do porasta kiselosti ulja odnosno povećava se udio slobodnih masnih kiselina i pogoršava se kvaliteta ulja. Veća količina vlage može dovesti i do zamućenja ulja i time se smanjuje estetska vrijednost ulja.

Metoda za određivanje vlage temelji se na isparavanju vode i hlapljivih tvari iz ulja zagrijavanjem u sušioniku pri točno određenim uvjetima. Dolazi do gubitka mase (izražen u %) pri zagrijavanju na 103 ± 2 °C, do konstantne mase. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem.

Izračun:

$$\% \text{ vlage i isparljivih tvari} = (m_1 - m_2 / m_1 - m_0) * 100$$

m_0 – masa staklene posudice (g),

m_1 – masa staklene posudice i uzorka prije sušenja (g),

m_2 – masa staklene posudice i uzorka nakon sušenja (g).

Određivanje netopljivih nečistoća (NN)

Netopljive nečistoće u ulju su uglavnom mehaničke nečistoće koje mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci (dijelovi uljarice).

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/19) dozvoljeni udio netopljivih nečistoća u rafiniranim uljima iznosi maksimalno 0,05 %, a u hladno prešanim i djevičanskim uljima iznosi maksimalno 0,05 %.

Uzorak koji se ispituje tretira se odgovarajućim organskim otapalom kao što je n – heksan ili petrol – eter. Dobivena otopina ide na filtriranje kroz stakleni filter lijevak sa sinteriranim

dnom uz ispiranje taloga istim otapalom. Zaostali talog koji je netopljiv, na filteru se suši do konstantne mase i mjeri.

Izračun:

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

m_0 – masa uzorka (g),

m_1 – masa osušenog filter – lijevka (g),

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

3.2.2.2. Priprema uzorka ulja za analizu

Prije početka pripreme uzoraka hladno prešanog lanenog ulja za ispitivanje oksidacijske stabilnosti, odrede se osnovni parametri kvalitete kao što su peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vlage u ulju te udio netopljivih nečistoća.

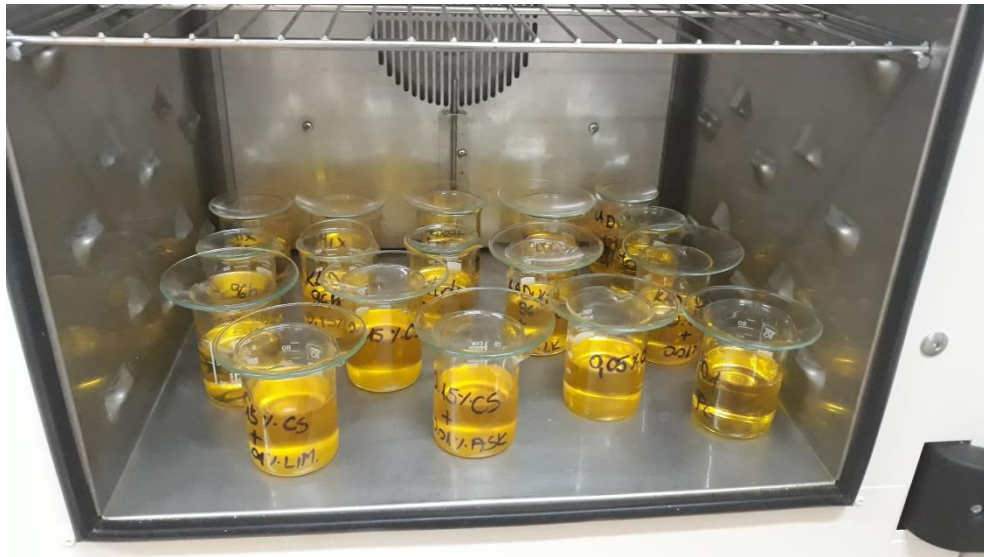
Uzorci se pripremaju tako što se u čaše odvažuju određene količine antioksidansa te se doda 50 g ulja u svaki uzorak. Uzorci se zagrijevaju na temperaturu od 70 °C do 80 °C (ne smije prijeći 80 °C) i uz miješanje se održava ta temperatura 30 minuta. Nakon toga uzorci se hlade na sobnu temperaturu, čaše sa uzorcima se prekriju satnim stakalcem te se stavjaju u sušionik. **Slika 15** prikazuje pripremljene uzorke u sušioniku.

Uzorci sa ispitivanim antioksidansima i sinergistima za provedbu ovog testa pripremljeni su na ovaj način.

Pripremljeni uzorci:

1. ulje bez dodatka antioksidansa,
2. ulje + ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,05 %,
3. ulje + ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15 %,
4. ulje + ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15 % + limunska kiselina 0,01 %,
5. ulje + ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15 % + askorbinska kiselina 0,01 %,
6. ulje + α -tokoferol 0,05 %,
7. ulje + α -tokoferol 0,15 %,
8. ulje + mješavina tokoferola 0,05 %,
9. ulje + mješavina tokoferola 0,15 %,

10. ulje + ekstrakt kadulje (1:10, 65 % EtOH 96h) 0,05 %,
11. ulje + ekstrakt kadulje (1:10, 65 % EtOH 96h) 0,15 %,
12. ulje + ekstrakt kadulje (1:10, 65 % EtOH 96h) 0,15 % + limunska kiselina 0,01 %,
13. ulje + ekstrakt kadulje (1:10, 65 % EtOH UZV) 0,05 %,
14. ulje + ekstrakt kadulje (1:10, 65 % EtOH UZV) 0,15 %,
15. ulje + ekstrakt kadulje (1:10 65 % EtOH UZV) 0,15 % + limunska kiselina 0,01 %,
16. ulje + propil galat 0,01 % i
17. ulje + butil hidroksianisol 0,01 %.



Slika 15 pripremljeni uzorci u sušioniku

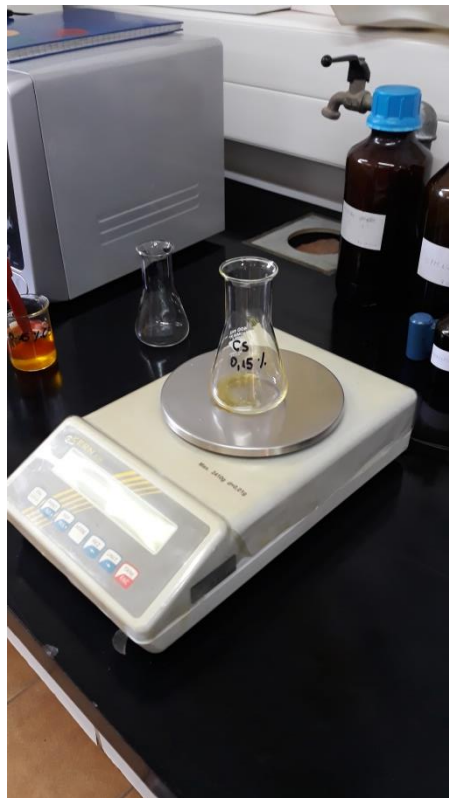
3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti

Schaal Oven test ili Oven test

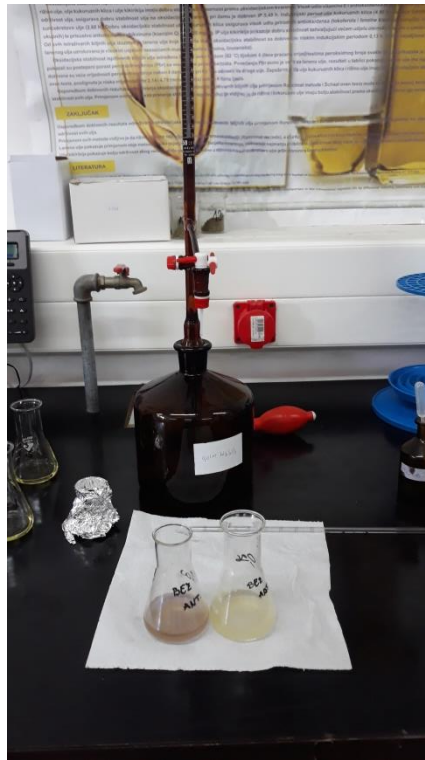
Ovaj test je proveden na uzorku hladno prešanog ulja lana u kojem nije dodan antioksidans (kontrolni uzorak) te na uzorcima u kojima su dodani prirodni i sintetski antioksidansi te sinergisti. Uzorci koji su prethodno pripremljeni, zagrijavani su u sušioniku na temperaturi koja je konstantno iznosila 63 °C (Slika 16). Svakih 24 sata tijekom 5 dana provedeno je praćenje peroksidnog broja ulja. Nakon 24 sata zagrijavanja uzorci se vade iz sušionika, hlade se na sobnu temperaturu, homogeniziraju te se iz svakog uzorka izdvoji 1 g za svaku paralelu određivanja Pbr (2 paralele) (Slika 17). Uzorci se vrata u sušionik, a u izdvojenim uzorcima se određuje peroksidni broj (Slika 18). Rezultati Oven testa prikazuju vrijednost peroksidnog broja izraženu u mmol O₂/kg ulja.



Slika 16 Sušionik za provedbu Oven testa na 63 °C



Slika 17 Odvaga 1 g uzorka



Slika 18 Određivanje peroksidnog broja

4. REZULTATI

Tablica 14 Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog lanenog ulja

Uzorak	Pbr (mmol O ₂ /kg)	SMK (% oleinske kisljine)	Vlaga (%)	NN (%)
Hladno prešano laneno ulje	0	0,39	0,067	0,16

Pbr – peroksidni broj (mmol O₂/kg),

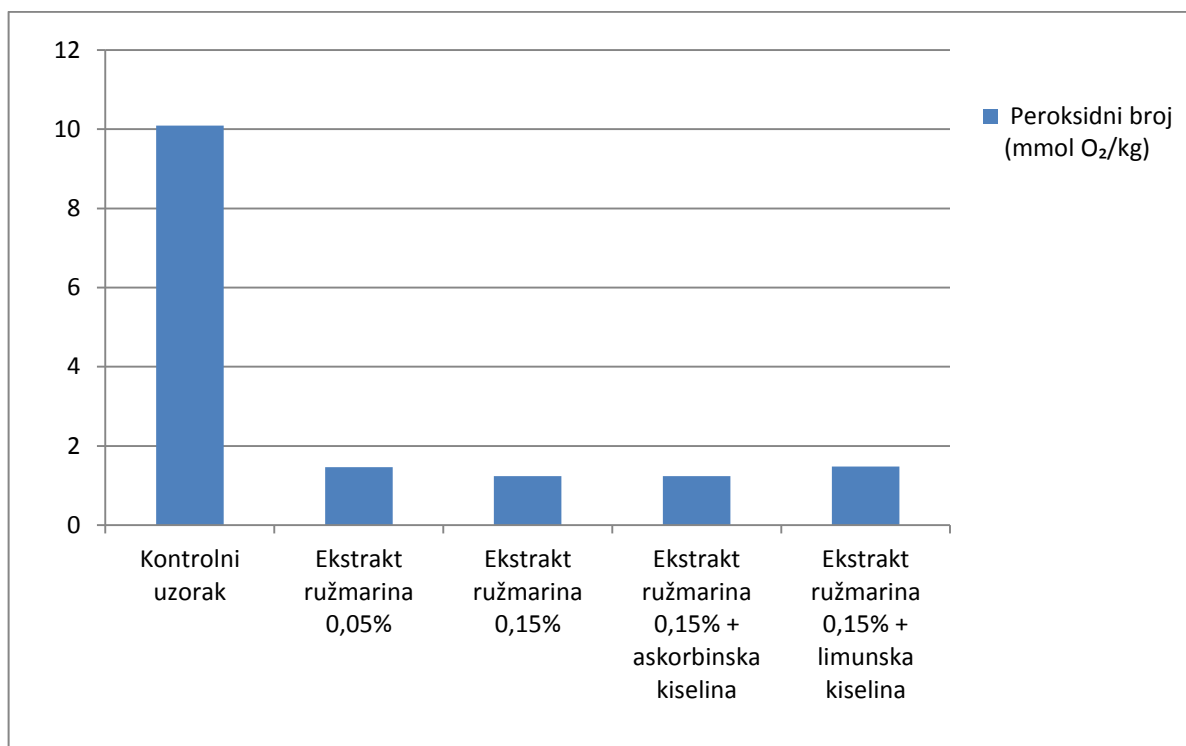
SMK – slobodne masne kisljine (%),

NN – netopljive nečistoće (%).

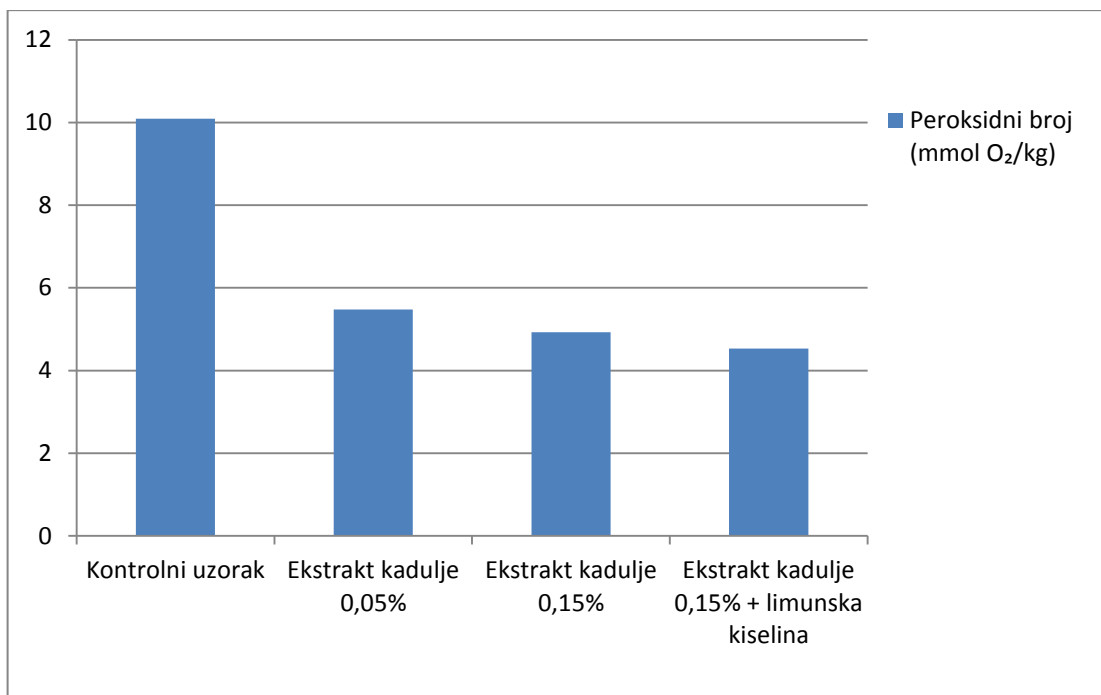
Tablica 15 Oksidacijska stabilnost hladno prešanog lanenog ulja sa i bez dodanog antioksidansa, određena Oven testom na 63 °C tijekom 5 dana

UZORCI	PEROKSIDNI BROJ (mmol O ₂ /kg)				
	1.DAN	2.DAN	3.DAN	4.DAN	5.DAN
Hladno prešano laneno ulje (kontrolni uzorak)	0,51	1,92	3,91	7,28	10,09
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,05%	0	0	0,49	0,99	1,46
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15%	0	0	0,73	1,21	1,24
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15% + askorbinska kisljina 0,01%	0	0	0,47	0,98	1,24
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) 0,15% + limunska kisljina 0,01%	0	0	0,50	0,98	1,48
α-tokoferol 0,05%	0,99	3,58	5,93	9,66	13,80
α-tokoferol 0,15%	2,55	5,50	7,81	12,5	18,09
Mješavina tokoferola 0,05%	0,73	2,47	4,64	8,83	11,82
Mješavina tokoferola 0,15%	1,63	3,47	6,44	7,32	13,24

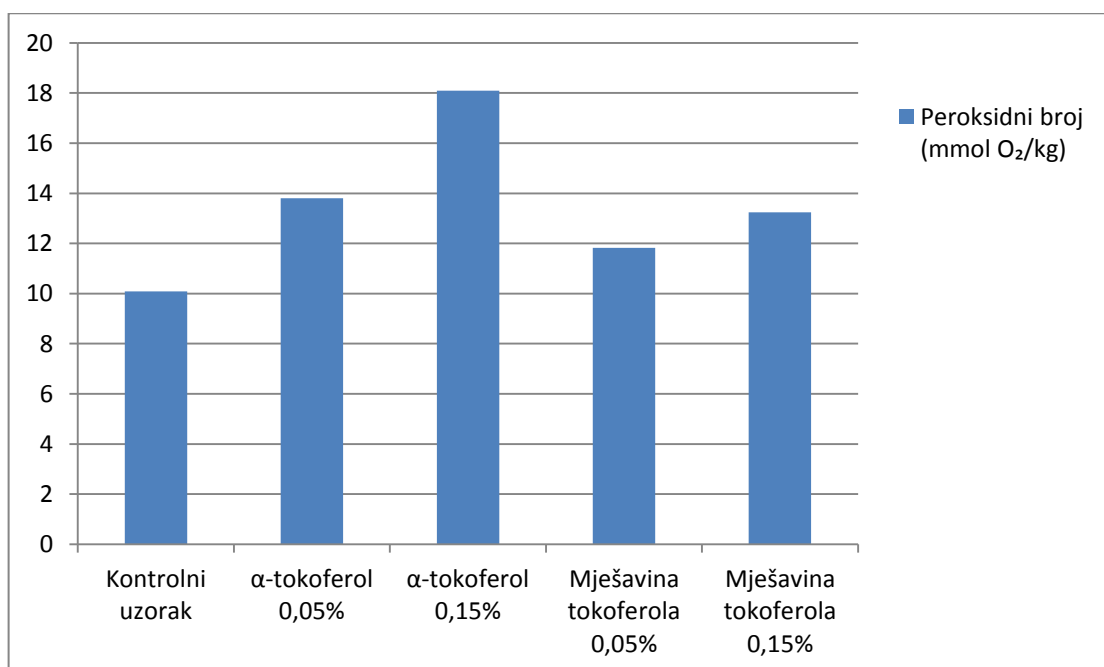
Ekstrakt kadulje (96h) 0,05%	0	0,47	1,48	1,22	5,48
Ekstrakt kadulje (96h) 0,15%	0	0,25	0,94	1,91	4,93
Ekstrakt kadulje (96h) 0,15% + limunska kiselina 0,01%	0	0	1,23	1,93	4,53
Ekstrakt kadulje (UZV) 0,05%	0,45	0,98	3,37	9,08	10,72
Ekstrakt kadulje (UZV) 0,15%	0,25	1,50	3,72	6,28	9,48
Ekstrakt kadulje (UZV) 0,15% + limunska kiselina 0,01%	0,50	1,17	2,97	5,86	9,12
PG 0,01%	0,94	2,48	3,85	6,28	8,75
BHA 0,01%	0,50	2,77	4,81	6,73	10,05



Slika 19 Utjecaj dodatka ekstrakta ružmarina (tip Oxy'Less CS) i sinergista na održivost hladno prešanog lanenog ulja nakon 5 dana testa



Slika 20 Utjecaj dodatka ekstrakta kadulje (65% EtOH, 96h) i synergista na održivost hladno prešanog lanenog ulja nakon 5 dana testa



Slika 21 Utjecaj dodatka α-tokoferola i mješavine tokoferola na održivost hladno prešanog lanenog ulja nakon 5 dana testa

5. RASPRAVA

Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog lanenog ulja, ispitani primjenom standardnih metoda, prikazani su u **Tablici 14**. Ispitivano hladno prešano laneno ulje ima peroksidni broj 0 mmol O₂/kg, udio slobodnih masnih kiselina 0,39 %, udio vlage 0,067 % te udio netopljivih nečistoća 0,16 %. Ispitivani parametri kvalitete pokazuju da je proizvedeno laneno ulje dobre kvalitete i da je u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/19), osim NN koja je nešto veća od maksimalno dozvoljene.

U **Tablici 15** prikazana je oksidacijska stabilnost proizvedenog hladno prešanog lanenog ulja, bez i s dodatkom prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista, primjenom Schaal Oven testa ili Oven testa na 63 °C tijekom 5 dana.

Hladno prešano laneno ulje bez dodanog antioksidansa (kontrolni uzorak), pokazuje određenu stabilnost odnosno otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Tijekom provedbe Oven testa dolazi do postupnog porasta peroksidnog broja ulja te nakon 5 dana iznosi 10,09 mmol O₂/kg.

Ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less CS) se dodavao u koncentracijama 0,05 % i 0,15 %. Ekstrakt ružmarina (udjela 0,15 %) se još i kombinirao sa sinergistima askorbinskom kiselinom (u koncentraciji 0,01 %) i limunskom kiselinom (u koncentraciji 0,01 %). Najveću zaštitu pokazao je ekstrakt ružmarina (0,15 %) u kombinaciji s askorbinskom kiselinom te nakon 5 dana testa vrijednost Pbr iznosi 1,24 mmol O₂/kg. Odličnu zaštitu pokazao je i sam ekstrakt ružmarina u koncentraciji 0,15 %, gdje Pbr nakon 5 dana iznosi također 1,24 mmol O₂/kg. Vrijednost Pbr za ekstrakt ružmarina u koncentraciji 0,05 % nakon 5 dana iznosi 1,46 mmol O₂/kg, a za ekstrakt ružmarina (0,15 %) u kombinaciji s limunskom kiselinom (0,01 %) iznosi 1,48 mmol O₂/kg. Dakle askorbinska kiselina pokazuje bolje sinergističko djelovanje uz ekstrakt ružmarina (**Slika 19**).

Dodatkom prirodnog antioksidansa α-tokoferola u koncentracijama 0,05 % i 0,15 % nije postignuta zaštita lanenog ulja od oksidacijskog kvarenja, jer je vrijednost Pbr nakon 5 dana viša od vrijednosti Pbr za ulje bez dodanog antioksidansa nakon 5 dana. Vrijednost Pbr za α-tokoferol (0,05 %) iznosi 13,80 mmol O₂/kg, a za α-tokoferol (0,15 %) 18,09 mmol O₂/kg.

Zaštita lanenog ulja od oksidacijskog kvarenja nije se postignula ni primjenom mješavine tokoferola, dodvanih u koncentracijama 0,05 % i 0,15 %. Za mješavinu tokoferola u koncentraciji 0,05 % nakon 5 dana vrijednost Pbr je 11,82 mmol O₂/kg, a za mješavinu tokoferola u koncentraciji 0,15 % je 13,24 mmol O₂/kg (**Slika 21**).

Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH 96h) koristio se u koncentracijama 0,05 % i 0,15 %. Također se ekstrakt kadulje (0,15 %) kombinirao sa sinergistom limunskom kiselinom (0,01 %). Ovaj prirodni antioksidans je isto pokazao dobru zaštitu od oksidacijskog kvarenja, jer vrijednosti Pbr iznose: za ekstrakt kadulje (0,05 %) 5,48 mmol O₂/kg, ekstrakt kadulje (0,15 %) 4,93 mmol O₂/kg i za kombinaciju ekstrakta kadulje (0,15 %) s limunskom kiselinom (0,01 %) 4,53 mmol O₂/kg. Zapaža se da limunska kiselina dodatno povećava stabilnost lanenog ulja uz dodatak ekstrakta kadulje (**Slika 20**).

Koristio se i ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH UZV), isto u koncentracijama 0,05 % i 0,15 % te ekstrakt kadulje (0,15 %) u kombinaciji s limunskom kiselinom (0,01 %), ali se rezultati nisu pokazali jako dobri. Ekstrakt kadulje (0,05 %) nije pokazao dobru zaštitu ulja od oksidacije i vrijednost Pbr nakon 5 dana je 10,72 mmol O₂/kg. Malo bolji od njega su se pokazali ekstrakt kadulje (0,15 %) gdje Pbr iznosi 9,48 mmol O₂/kg i ekstrakt kadulje (0,15 %) s limunskom kiselinom (0,01 %) gdje je Pbr 9,12 mmol O₂/kg. Ovaj ekstrakt kadulje proizveden djelovanjem etanola i ultrazvuka (UZV) vrlo malo je zaštitio ulje od oksidacijskog kvarenja.

Sintetski antioksidans propil galat (PG) koji se dodavao u koncentraciji 0,01 % pokazao je bolje djelovanje od prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje (1:10, 65% EtOH UZV). Nakon 5 dana vrijednost Pbr iznosi 8,75 mmol O₂/kg.

Upotrebom sintetskog antioksidansa butil hidroksianisola (BHA) u koncentraciji 0,01 %, nije se postigla dobra zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja, jer je njegov Pbr nakon 5 dana približno jednak kontrolnom uzorku, a iznosi 10,05 mmol O₂/kg.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog provedenog istraživanja, gdje se ispitivala oksidacijska stabilnost hladno prešanog lanenog ulja bez i s dodatkom prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista, mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Hladno prešano laneno ulje je dobre kvalitete, jer su osnovni parametri kvalitete Pbr i SMK u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/19).
2. Dodatkom ekstrakta ružmarina (tip Oxy'Less CS) postignuta je najbolja zaštita od oksidacijskog kvarenja Oven testom na 63 °C, pogotovo ekstraktom ružmarina (0,15 %) u kombinaciji sa sinergistom askorbinskom kiselinom (0,01 %).
3. Korištenjem veće koncentracije ekstrakta ružmarina (0,15 %) ostvarena je bolja zaštita ulja od oksidacije u odnosu na koncentraciju 0,05 %.
4. Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH 96h) također pokazuje značajno dobru zaštitu lanenog ulja, ali je lošiji od ekstrakta ružmarina.
5. Ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH UZV) se nakon 5 dana testa pokazao lošiji od ekstrakta kadulje (1:10, 65% EtOH 96h).
6. Prirodni antioksidans α -tokoferol, kod obje koncentracije, nije pokazao zaštitu ulja od oksidacijskog kvarenja, njegove vrijednosti Pbr su bile znatno veće u odnosu na kontrolni uzorak ulja.
7. Mješavina tokoferola, kod obje koncentracije, također nije pokazala zaštitu od oksidacijskog kvarenja jer su vrijednosti Pbr nakon 5 dana testa bile veće od kontrolnog uzorka.
8. Sintetski antioksidans propil galat dovodi do veće stabilnosti hladno prešanog lanenog ulja u odnosu na prirodni antioksidans ekstrakt kadulje (1:10 65% EtOH UZV) i BHA.
9. Butil hidroksianisol se nije pokazao efikasan, jer je njegov Pbr nakon 5 dana testa približno jednak Pbr hladno prešanog ulja bez dodatka antioksidansa (kontrolnog uzorka).

7. LITERATURA

Berra, D, Lahiri, D, Nag, A: Studies on a natural antioxidant for stabilisation of edible oil and comparison with synthetic antioxidants, *Journal of Food Engineering*, 74: 542-545, 2006.

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

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

Dimić, E., Dimić, V, Romanić, R: Essential fatty acids and nutritive value of edible nonrefined linseed oil, 9th Symposium: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, Proceedings, pp. 480-483, Jena Thuringen, 2003.

Dimić, E: Hladno ceđena ulja, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 88-91, 2005.

Ergović Ravančić, M, Tehnologija ulja i masti – priručnik za vježbe, Veleučilište u Požegi, Požega, 2017.

Grün I: Fats: Edible Fat and Oil Processing. U *Food Processing: Principles and Applications*, str. 353-360. Blackwell Publishing, 2004.

Hoffmann G: The Chemistry of Edible Fats. U *The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and their High Fat Products*, str. 1-28. Academic Press, 1989.

Jašić M: Kemija hrane–Lipidi. Tehnološki fakultet, Tuzla, 2009.

Karleskid, A: Oils and fats Manual, Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK, 1996.

Karlović, Đ, N.Andrić, Kontrola kvaliteta semena uljarica, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Savezni zavod za standardizaciju- Beograd, 1996.

Moslavac T: Tehnologija ulja i masti, Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

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

Odak I: Utjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ulja konoplje, diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, listopad, 2013.

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

Pine SH.: Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1994.

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 Chemist Society* 81, 2004.

Rac M: *Ulja i masti*, Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd, 1964.

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.

Rade, D, Mokrovčak, Ž, Štrucelj, D: *Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida*, Zagreb, 2001.

Sadadinović J: *Organska tehnologija*, Ars grafika, Tuzla, 2008.

Schuler P: *Natural Antioxidants Exploited Commercially*. U *Food Antioxidants*. str.:99-170. Springer, 1990.

Scrimgeour C: *Chemistry of Fatty Acids*. U *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, str 1-43. John Wiley & Sons Inc., 2005.

Shahidi F: *Antioxidants in food and food antioxidants*. *Molecular Nutrition & Food Research* 44:158-163, 2000.

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

Sikorski ZE: *Chemical and functional properties of food componensts*. CRC Press, USA, 2003.

Stanković, V, Petrović, R: *Biološka i produktivna svojstva perspektivnih linija konzumnog i uljanog lana*, 39. *Savetovanje industrije ulja: Proizvodnja i prerada uljarica*, Zbornik radova, pp. 279-282, Budva, 1998.

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

Šimetić, S: *Lan u proizvodnji i upotrebi*, Zavod za sjeme i rasadničarstvo, Osijek, 217-220, 2008.

Škevin, D: *Utjecaj prirodnih antioksidanasa na održivost i svojstva djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica i buharica*, doktorski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet Zagreb, 2003.

Valasco, L, Goffman, FD: *Tocopherol and fatty acid patterns in the genus Linum Plant*, *Syst. Evol.* 221: 77-88, 2000.

Volmut K: *Utjecaj propil galata i ekstrakta ružmarina na oksidacijsku stabilnost smjese biljnih ulja*. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek, svibanj, 2010.

Wang ZX, Zhuge J, Fang H, Prior BA: Glycerol production by microbial fermentation; A review, *Biotechnology Advances*, 19, 201-223, 2001.

Wiley J & Sons: Baileys industrial oil & fat products, Edited by Y. H. Hui, Volume 2, *Edible oils and fat products: Oils and oil seeds*, Fifth Edition, Inc., New York, 1996.

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