

Utjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Arbequina, Picual i Royal iz Španjolske

Hodak, Gabriela

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:109:706172>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**

REPOZITORIJ

PTFS

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

Gabriela Hodak

**UTJECAJ ANTIOKSIDANSA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST
EKSTRA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA SORTE *ARBEQINA*,
PICUAL I *ROYAL* IZ ŠPANJOLSKE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 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**Utjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Arbequina*, *Picual* i *Royal* iz Španjolske***Gabriela Hodak, 0113141565***Sažetak:**

Cilj ovog rada bio je ispitati oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskih maslinovih ulja španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal sa i bez dodatka antioksidanasa i sinergista. Oksidacijska stabilnost biljnih ulja podrazumijeva vremenski period tijekom kojeg se ulja mogu sačuvati bez da podlegnu procesu autooksidacije. Antioksidansi su reducirajuće tvari koje usporavaju oksidaciju supstrata te tako produžuju održivost ulja. Utjecaj dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost maslinovih ulja ispitivan je Oven testom pri 63 °C kroz vremenske periode od 336 sati (Arbequina), 408 sati (Picual) i 240 sati (Royal). 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 španjolskih sorti pokazuju dobru otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Dodatkom ispitivanih antioksidanasa ostvarena je dodatna zaštita maslinovih ulja od oksidacije. Najbolja održivost ovih ulja postignuta je dodatkom kombinacije ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (udio antioksidansa 0,2 %) i kafeinske kiseline (udio sinergista 0,01 %), dok je najlošija zaštita postignuta dodatkom eteričnog ulja lavande. Dodatkom mješavine tokoferola nije se postigla zaštita ovih ulja od oksidacijskog kvaranja.

Ključne riječi: Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Arbequina, Picual, Royal, oksidacijska stabilnost**Rad sadrži:** 55 stranica
13 slika
12 tablica
28 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: 23. 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

University 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 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. VII in academic year 2022/2023 held on May 2, 2023.

Mentor: *Tihomir Moslavac*, PhD prof.

Technical assistance: *Daniela Paulik*, technical associate

The Effect of Antioxidants on the Oxidative Stability of Extra Virgin Olive Oil Varieties *Arbequina, Picual* and *Royal* from Spain

Gabriela Hodak, 0113141565

Summary:

The aim of this paper was to examine the oxidation stability of extra virgin olive oils of Spanish varieties Arbequina, Picual and Royal with and without the addition of antioxidants and synergists. Oxidation stability of vegetable oils implies a period of time during which the oils can be preserved without succumbing to the auto-oxidation process. Antioxidants are reducing substances that delay the oxidation of the substrate and thus extend the oil's shelf life. The influence of addition of antioxidants on the oxidation stability of olive oils was tested with the Oven test at 63 °C over time periods of 336 hours (Arbequina), 408 hours (Picual) and 240 hours (Royal). The quality parameters of olive oils were tested: peroxide value, free fatty acids, moisture content, insoluble impurities content, saponification value and iodine value. The antioxidants used are rosemary extract (Oxy'Less ®CS type), green tea extract, lavender essential oil, a mixture of tocopherols and propyl gallate, and synergists citric and caffeic acid. The conducted test determined that olive oils of Spanish varieties show good resistance to oxidative spoilage. With the addition of tested antioxidants, additional protection of olive oils from oxidation was achieved. The best sustainability of these oils was achieved by adding rosemary extract of the Oxy'Less ®CS type (antioxidant content 0.2 %) with caffeic acid (synergist content 0.01%), while the worst protection was achieved by adding a lavender essential oil. The addition of a mixture of tocopherols did not provide protection against oxidative rancidity of these oils.

Key words: Extra virgin olive oil, Arbequina, Picual, Royal, oxidative stability

Thesis contains: 55 pages
13 figures
12 tables
28 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 23, 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

svojem mentoru prof. dr. sc. Tihomiru Moslavcu na ukazanom povjerenju, susretljivosti, vodstvu i podršci, kako tijekom cijelog studiranja, tako i tijekom izrade diplomskog rada.

Također, izrada ovog rada ne bi bila moguća bez drage tehničarke Daniele Paulik zbog svih dodijeljenih savjeta, riječi podrške, ugodne i nasmijane atmosfere tijekom rada u laboratoriju.

Najveće hvala želim iskazati svojim dragim roditeljima na podršci i razumijevanju kroz sve ove godine studiranja.

Sadržaj

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ULJA BILNOG PODRIJETLA	4
2.1.1. Sastav biljnih ulja	6
2.2. MASLINA.....	8
2.2.1. Građa i sastav ploda masline	9
2.2.2. Sorte maslina u ovisnosti o geografskim obilježjima	10
2.3. MASLINOVO ULJE	12
2.3.1. Proces proizvodnje maslinovog ulja	14
2.3.2. Pakiranje i skladištenje maslinovog ulja	17
2.4. VRSTE KVARENJA JESTIVIH BILJNIH ULJA	18
2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi	20
2.4.2. Kemijski procesi	20
2.5. STUPANJ OKSIDACIJE I OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA.....	21
2.5.1. Metode određivanja stupnja oksidacije ulja.....	21
2.5.2. Analitičke metode za određivanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja	24
2.5.3. Stabilizatori biljnih ulja: antioksidansi i sinergisti	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. ZADATAK RADA.....	28
3.2. MATERIJALI I METODE	28
3.2.1. Materijali	28
3.2.2. Metode	31
4. REZULTATI.....	40
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČCI	53
7. LITERATURA	56

Popis oznaka, kratica i simbola

Abr	Anisidinski broj
BHA	Butil hidroksianisol
BHT	Butil hidroksitoluen
IP	Indukcijski period
KI	Kalij jodid
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

Jestiva biljna ulja predstavljaju nezaobilazan nutritivni resurs za ljudsko zdravlje, a dobivaju se iz sjemenki, koštica, pulpe, plodova pojedinih biljaka. Još od rane ljudske povijesti, sezamovo i maslinovo ulje su najčešće korištena jestivih biljna ulja. Maslina pripada skupini najpoznatijih drvenastih jestiva uljarica u svijetu zahvaljujući svom visokom sadržaju ulja (Zhou i sur., 2020).

Maslina (*Olea europaea L.*) je subtropska zimzelena biljka čiji je plod koštuničavo voće ovalnog oblika dužine oko 1 cm i promjera 1-1,5 cm. osim visokog sadržaja vode i ulja, maslina sadrži i šećere, organske kiseline, bjelančevine, biljna vlakna, tvari boje, fenolne i mineralne tvari, itd. Ona uspijeva samo u umjereno toplim krajevima što predstavlja jedan od glavnih razloga zašto je Španjolska vodeća svjetska zemlja po proizvodnji maslinovog ulja. Neke od najpoznatijih španjolskih sorti maslina, koje ujedno predstavljaju i fokus ovoga rada, su Arbequina, Picual i Royal. Prerada maslina u ulje podrazumijeva pranje plodova i uklanjanje nečistoća, mljevenje, miješanje, izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta i odvajanje ulja od biljne vode. Ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiva se mehaničkim postupcima (najčešće prešanjem) izravno i isključivo iz ploda masline (Koprivnjak, 2006., Barranco i Rallo, 2000).

Rok trajanja biljnih ulja u prehrambenoj upotrebi i njihova primjenjivost u industriji uvelike ovise o njihovoj oksidacijskoj stabilnosti. Načini poboljšanja oksidacijske stabilnosti ulja koje su trenutno dostupne uključuju genetske modifikacije, promjene sastava putem kemijskih sredstava, kao i inhibicija oksidacije pomoću tvari poznatih kao antioksidansi. Ako su primijenjeni na jestiva biljna ulja, antioksidansi su spojevi koji prekidaju proces oksidacije prvenstveno reagirajući s radikalom tako masti da se formira stabilan radikal koji ne reagira brzo s kisikom. Sinergisti su kemijski spojevi koji antioksidansima produžuju djelovanje, ali sami nemaju antioksidacijsku aktivnost (Aluyor i Ori-Jesu, 2008).

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, te utjecaj dodataka prirodnih antioksidanasa u određenim koncentracijama na produženje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskih maslinovih ulja španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal. Ispitivanje je provedeno Oven testom pri 63 °C. 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. Prije ispitivanja oksidacijske stabilnosti ulja određeni su parametri kvalitete uzorka ulja primjenom standardnih metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ulja bilnog podrijetla

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/19), ulja se razvrstavaju u tri kategorije (ovisno o primijenjenom tehnološkom postupku u proizvodnji): 1. Rafinirana, 2. Hladno prešana i 3. Djevičanska ulja. Rafinirana ulja predstavljaju proizvode dobivene postupkom rafinacije jedne ili više vrsta sirovih ulja bilnog podrijetla, dok su hladno prešana ulja proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, bez primjene topline. S druge strane, djevičanska ulja također se dobivaju mehaničkim postupcima, ali uz primjenu topline.

Jestivo biljno ulje dobiva se iz sjemenki, koštice, pulpe, plodova pojedinih biljaka pa se tako biljna ulja dijele u tri skupine: 1. Ulja i masti iz mesnatog dijela ploda (npr. palmino ulje, maslinovo ulje, itd.); 2. Ulja i masti iz sjemena ploda prema dominirajućim masnim kiselinama (laurinske – uljana palma, masti palmitinske i stearinske kiseline – kakao maslac, ulja palmitinske kiseline – pamukovo ulje, ulja oleinske i linolne kiseline – suncokretovo, sezamovo ulje te ulja linolenske kiseline – sojino ulje) i 3. Ulja prema podrijetlu biljke (ulja iz leguminoza – kikiriki te ulja krstašica – repica) (Čorbo, 2008). Uzimajući u obzir činjenicu da predstavljaju jedan od tri glavna resursa za dobivanje energije kod ljudi, uglavnom se koriste u kuhanju, ali u malim količinama i za kozmetiku, suplemente u obliku kapsula i druge svrhe. Kada se koriste u kuhanju, ulja mijenjaju senzorska svojstva hrane kao što su boja, miris i okus, a također pojačavaju osjećaj sitosti. Prema informacijama Ministarstva poljoprivrede SAD-a, tržište jestivih biljnih ulja bilo je blizu 203 milijuna tona u 2019. godini. S povećanjem potrošnje jestivih biljnih ulja i povećanim onečišćenjem okoliša posljednjih godina, njihova kvaliteta i sigurnost je dobila više pozornosti, a to predstavlja velik izazov za industriju ulja (Zhou i sur., 2020). Tijekom rane ljudske povijesti, izvor jestivih biljnih ulja bili su sezam (*Sesamum indicum* L.) i maslina (*Olea europaea* L.). Razvojem poljoprivrede, tehnologije obrade i inspekcije, razvijeno je sve više postrojenja za proizvodnju ulja iz različitih biljaka. Tako mnoge zeljaste biljke proizvode visok postotak jestivog biljnog ulja. Iako sezam ima veći sadržaj ulja među uljaricama, sezamovo ulje nije često korišteno zbog niske globalne vrijednosti proizvodnje sezama i neučinkovite tehnologije prerade. U današnje vrijeme se globalno u najvećim količinama proizvodi ulje soje (*Glycine max* L.) i uljane repice (*Brassica napus* L.). Osim zeljastih, drvenaste biljke se također uvelike koriste za proizvodnju jestivih ulja. Sadržaj ulja, sastav i biološka aktivnost različitih vrsta biljaka ili dijelova biljaka uvelike variraju i prikazani

su u **Tablici 1**. Uljana kamelija, uljana palma, maslina i kokos (*Cocos nucifera*) predstavljaju četiri najpoznatije drvenaste jestive uljarice u svijetu jer imaju najviši sadržaj ulja. Ako se uzme u obzir prednost nekorištenja obradivog zemljišta, razvoj i korištenje ulja drvenastih biljaka imat će važnu ulogu u globalnoj sigurnosti žitarica i jestivog ulja (Yi i sur., 2017; Zhou i sur., 2020).

Tablica 1 Zeljaste i drvenaste uljarice (Zhou i sur., 2020)

Uobičajeni naziv	Vrsta	Rod	Porodica	Glavno područje proizvodnje	Sadržaj ulja
Soja	<i>Glycine max</i> (Linn.) Merr.	<i>Glycine</i>	<i>leguminosae</i> sp.	Kina, SAD, Brazil	18-24 %
Suncokret	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Helianthus</i>	<i>Compositae</i>	Po cijelom svijetu	46-50 %
Kikiriki	<i>Arachis hypogaea</i> L.	<i>Arachis</i>	<i>leguminosae</i> sp.	Azija, Afrika, Amerika	46-57 %
Kukuruz	<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea</i>	<i>Graminae</i>	Područja tropske i umjerene klime po cijelom svijetu	4,5-4,8 %
Sezam	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Sesamum</i>	<i>Pedaliaceae</i>	Područja tropske i umjerene klime	43-61 %
Uljana palma	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	<i>Elaeis</i>	<i>Arecaceae</i>	Područja tropske klime u Africi i Kini, Tajvan, Hainan i Yunnan	50-55 %
Kokos	<i>Cocos nucifera</i> L.	<i>Cocos</i>	<i>Arecaceae</i>	Azija, Afrika i latinoameričke države	65-74 %
Maslina	<i>Olea europea</i> L.	<i>Olea</i>	<i>Oleaceae</i>	Mediterranska obala	15-22 %
Orah	<i>Juglans regia</i> L.	<i>Juglans</i> L.	<i>Juglandaceae</i>	Jugoistočna Europa, planine Himalaja, Kina	50-70 %
Lješnjak	<i>Corylus heterophylla</i> Fisch.	<i>Corylus</i>	<i>Betutaceae</i>	Područja umjerene klime u Aziji, Europi i Sjevernoj Americi	50-75 %
Kakao	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Theobroma</i>	<i>Sterculiaceae</i>	Uski prolaz u području 10° geografske širine od ekvatora	45-60 %

2.1.1. Sastav biljnih ulja

Masti i ulja su u kemijskom smislu u vodi netopljivi esteri alkohola glicerola i masnih kiselina, odnosno triacilglicerola, a također sadže diacilglicerole, monoacilglicerole, slobodne masne kiseline (SMK) te negliceridne komponente u količinama od 1-3 %. Pojam ulje obuhvaća one triacilglicerole koji su na sobnoj temperaturi u tekućem stanju, a pojam mast obuhvaća triacilglicerole koji su na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju (Gunstone, 2013).

Jestiva biljna ulja sadrže složene kemijske komponente i općenito su bogata masnim kiselinama, mikroelementima i aktivnim spojevima, te tvarima okusa koje im u kombinaciji daju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva. Također su bogati vitaminima topljivim u mastima (A, D, E, K) od kojih vitamin E ima antioksidativna svojstva (Kim i sur., 2010; Puch i sur., 2010).

S obzirom na sastav i strukturu biljnih ulja, lipidi se dijele na jednostavne, složene i derivate lipida. Jednostavni lipidi se sastoje od masnih kiselina i alkohola glicerola te se oni mogu hidrolizirati na navedene komponente, iz čega nastaju jednostavnije molekule. U jednostavne lipide se ubrajaju acilgliceroli, esteri acilglicerola, steroli, esteri sterola i voskovi. Triacilgliceroli su jednostavni lipidi koji nastaju kondenzacijom jedne molekule glicerola i triju molekula masnih kiselina. U skupinu složenih lipida pripadaju fosfolipidi, glikolipidi, aminolipidi i sulfolipidi. Njihovom hidrolizom nastaje tri ili više komponenata. Derivate lipida čine masne kiseline, alkoholi (steroli), ugljikovodici (karoteni), vitamini A i E te masne kiseline (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

Masne kiseline predstavljaju glavni sastojak ulja, a po definiciji su organska tvar koja se sastoji od dugog lanca alifatskih ugljikovodika koji sadrži karboksilnu skupinu na jednom kraju. Masne kiseline dijele se na zasićene masne kiseline (ZMK) i nezasićene masne kiseline (NMK) (Esteki i sur., 2018). Ljudsko tijelo može sintetizirati potrebne ZMK i NMK sa samo jednom dvostrukom vezom, dok se masnim kiselinama koje sadrže dvije ili više dvostrukih veza mora opskrbiti putem prehrane. Iz tog razloga se MK koje sadrže dvije ili više dvostrukih veza nazivaju esencijalnim masnim kiselinama među kojima su najvažnije linolenska kiselina i linolna kiselina. NMK imaju važne uloge u ljudskom tijelu, kao što su održavanje relativne fluidnosti staničnih membrana kako bi se osigurala normalna fiziološka funkcija stanica, esterifikacija kolesterola i smanjenje sadržaja kolesterola i triglicerida u krvi (Assmann i sur., 2018). Oni su također prethodnici sinteze prostagladina, smanjuju viskoznost krvi, povećavaju

mikrocirkulaciju krvi i aktivnost moždanih stanica te poboljšavaju pamćenje. Najzastupljenije MK imaju 16 ili 18 atoma ugljika, a to su oleinska kiselina, linolna kiselina, linolenska kiselina i ZMK. Ipak, treba uzeti u obzir da različita ulja imaju različit sastav masnih kiselina.

Negliceridni sastojci prirodnih ulja su fosfatidi, karoteni, voskovi, steroli, liposolubilni vitamini (A, D, E, K), tokoferoli, pigmenti (klorofil i gosipol), aldehidi, ketoni, glikozidi, masni alkoholi i tragovi metala. Pojedini negliceridni sastojci imaju povoljan utjecaj na kakvoću ulja (tokoferoli, liposolubilni vitamini i karoteni), steroli djeluju neutralno, a fosfatidi, voskovi i tragovi metala imaju negativan utjecaj na kvalitetu ulja te se iz tog razloga uklanjaju iz sirovog ulja u procesu rafinacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

Pojedini izvori navode određene negliceridne sastojke prisutne u jestivim biljnim uljima kao elemente u tragovima. U jestivim su otkrivene mnoge vrste elemenata u tragovima, a njihov sadržaj varira ovisno o vrsti biljke iz koje je dobiveno ulje. Ljudski organizam sadrži male količine elemenata u tragovima koji su neophodni za opstanak i zdravlje, a pošto ljudsko tijelo ne može automatski sintetizirati elemente u tragovima, oni se moraju dobiti iz prehrane, primjerice iz biljnih ulja (Llorent-Martinez i sur., 2011). Sadržaj elemenata u tragovima i aktivnih spojeva u jestivim biljnim uljima je vrlo nizak, ali njihove biološke aktivnosti imaju jedinstven učinak na ljudsko zdravlje. U te elemente se ubrajaju kalcij, natrij, cink, mangan, fosfor, magnezij, selen, jod, kalij, željezo, bakar, α -tokoferol i β -tokoferol. Osim toga, velik broj biljnih ulja sadrži nezasićene ugljikovodike poput skvalena. Biljna ulja sadrže i fitosterole, karotenoide, polifenole i flavonoide (Zhou i sur., 2020).

Prilikom odabira jestivog biljnog ulja za konzumaciju, glavni faktor (uz hranjive tvari) su tvari okusa. Aroma je jedan od najvažnijih pokazatelja senzorske kvalitete biljnog ulja. Njihov jedinstven okus ne tvori jedan ili više spojeva, već nastaje sinergijom različitih komponenti. Fenoli, uključujući tokoferole, polifenole, fitosterole i pigmente su važne komponente prirodnih biljnih ulja. Iako je njihov sadržaj relativno nizak, usko su povezani s kvalitetom jestivog ulja, što izravno utječe na njegovu funkcionalnost i oksidacijsku stabilnost. Usporedbom je utvrđeno da tvari okusa uglavnom uključuju alkohole, aldehide, ketone, alkane, alkene i furane. Međutim, njihova prisutnost, ali i sadržaj najviše ovise o biljci iz koje je dobiveno biljno ulje. U nekim uljima su prisutni i esteri (najviše u maslinovom), olefin, kisele tvari, itd. (Zhang i sur., 2012; Liu i sur., 2017).

2.2. Maslina

Maslina (*Olea europea L.*) je subtropska zimzelena biljka koja može narasti do preko 10 metara visine (**Slika 1.**). Samonikle masline su niže (4 do 5 metara visine) i grmolike, za razliku od kultiviranih. Drvo masline odlikuje se tvrdoćom i krhkošću te je cijenjeno u tokarstvu. Korijen masline razvija se dublje ili pliće, ovisno o sastavu tla, udaljenosti stabala u maslinjaku, itd. Stablo uzgojeno iz sjemena prodire žilom provodnicom vrlo duboko u zemlju te se širi koliko je široka krošnja. Takvo stablo najbolje se razvija jer je otpornije na jake vjetrove i sušu. Listovi su vrlo slični lišću vrbe: mali, duguljasti i kožasti, a na grani su pravilno raspodijeljeni. Lice lista je svijetlozelene boje, a naličje je puzasto i bijelo. U pazuišcima listova smješteni su pupovi koji mogu biti šiljastog (drveni pupovi) ili okruglog (cvjetni pupovi) oblika. Samo na jednogodišnjim vrstama rastu cvjetovi iz kojih se kasnije razvijaju plodovi. Cvjetovi su grozdasti, žućkasto bijeli i imaju ugodan miris. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod koji je prvo zelene boje, a pred zriobu mijenja boju u tamnoljubičastu ili gotovo crnu. Dok je plod zelen, meso je gorko, a dozrijevanjem se gubi gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu. Masline se uglavnom uzgajaju u priobalnim područjima uz more jer uspijevaju samo u umjereno toplim krajevima gdje se temperatura ne spušta ispod 0 °C (Kantoci, 2006).



Slika 1 Drvo masline (Kantoci, 2006)

2.2.1. Građa i sastav ploda masline

Plod masline nalikuje plodovima ostalog koštičavog voća, odnosno ovalnog je oblika, dužine oko 1 cm i promjera od 1-1,5 cm te je prikazan na **Slici 2**. Masa ploda ovisi o genetičkim karakteristikama određene sorte i uvjetima uzgoja te se kreće između 0,5 i 20 g. Kemijski sastav uvjetovan je istim karakteristikama kao i masa ploda s time da na njega također utječu i klimatski uvjeti krajolika i dijela godine, što znači da može varirati u izvjesnoj mjeri. U prosjeku, plod masline sadržava 40-70 % vode, 6-25 % ulja te 24-35 % ostalih sastojaka (šećeri, organske kiseline, bjelančevine, biljna vlakna, tvari boje, mineralne tvari, fenolne tvari, itd.). Osnovni anatomske dijelovi masline su kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) i koštica (endokarp) unutar koje se nalazi sjemenka (endosperm) (Koprivnjak, 2006).



Slika 2 Plod masline (Kantoci, 2006)

Kožica masline građena je od sloja epidermalnih stanica iznad kojeg se nalazi kutikula prekrivena masno-voštanom prevlakom. Sastav kutikule je oko 40 % triacilglicerola, 30 % triterpenskih kiselina, 20 % alifatskih i triterpenskih alkohola i oko 10 % voskova i drugih tvari. Prilikom prerade maslina, kutikula zajedno sa masno-voštanom prevlakom dolazi u kontakt s uljem u kojem se dio navedenih tvari otapa i postaje njegov sastavni dio. Kožica je anatomske dio ploda koji u najvećoj mjeri sadrži pigmente - lipofilne klorofile, karotenoide (karotene i ksantofile) te hidrofilne antocijane. U fazi dozrijevanja se koncentracija klorofila, ksantofila i karotena progresivno smanjuje što uzrokuje promjenu boje kožice od zelene i zeleno-žute

nijanse do ljubičastih ili crvenih mrlja koje ukazuju na početak sinteze antocijana. Drugim riječima, plod masline može biti zelene, žute, crvene i crne boje te je indikator stadija procesa zrenja ploda (Koprivnjak, 2006).

Pulpa ploda je građena od stanica čija se primarna stanična stijenka sastoji od polimera celuloze, pektoceluloze i hemiceluloze. Za čvrstoću samog ploda odgovorna je tanka središnja lamela smještena u međustaničnom prostoru na način da pomoću vlastite gradivne jedinice pektina povezuje susjedne stanice i tkivo. Ipak, navedene pektinske tvari mogu zadavati problem otežanog izdvajanja ulja tijekom prerade maslina jer prilikom iste se stanična struktura mezokarpa razara pa tako pektini dolaze u kontakt s vodom i iskazuju svoja koloidna svojstva. Za stanice pulpe karakteristično je nakupljanje ulja u vakuolama. Vakule predstavljaju uljne mjehuriće s membranama koje ga odvajaju od ostalog vodenog sadržaja citoplazme. Mali dio ulja je raspršen u vodenom dijelu citoplazme u obliku sitnih kapljica. Kad plod dosegne određenu zrelost, takve vakuole ispunjavaju preko 80 % volumena stanica. Vodeni dio citoplazme sadrži šećere, organske kiseline, enzime, fenole i druge u vodi topljive tvari. Od šećera su najzastupljenije glukoza i fruktoza te u manjim količinama saharoza i manitol. Što se tiče organskih kiselina, u plodu masline najzastupljenije su limunska, jabučna i oksalna kiselina. One se pretežito javljaju u obliku soli te pulpi maslina osiguravaju pH u rasponu 4,5-5. Fenolne tvari su stanicama ploda masline poznate pod nazivom biofenoli te podrazumijevaju fenolne kiseline i alkohole te sekoiridoide. Javljaju se u obliku nakupina, odnosno vakuola koje su smještene neposredno uz staničnu stijenku. Biofenoli imaju biološku ulogu zaštite od mikroorganizama na mjestima oštećenja ploda te odbijanje biljojeda i nametnika. Osim toga, fenolne tvari su izuzetno važne za senzorska (okus i miris) i nutritivna svojstva te trajnost djevičanskih maslinovih ulja, a u ulju ih se otopi otprilike od 0,5 do 1 % od ukupne količine (Koprivnjak, 2006).

Iako sjemenka masline sadrži između 35 i 40 % ulja, to ulje je zastupljeno samo između 5 i 7 % od ukupne količine ulja u svježem plodu jer sjemenka ima mali maseni udio. Za sjemenku i ulje dobiveno iz sjemenke karakterističan je veći udio tokoferola, prisutnost specifičnih fenolnih tvari kao što je nuzhenid te znatno veći dio linolne kiseline i ukupnih sterola. Osim toga, ulje sjemenke ima i znatno veći udio enzima lipoksigenaze i peroksidaze u odnosu na kožicu u pulpi ploda, što doprinosi njihovoj ukupnoj aktivnosti tijekom prerade maslina.

2.2.2. Sorte maslina u ovisnosti o geografskim obilježjima

Jestiva maslina je koegzistirala s ljudima između 5 i 6 tisuća godina, dakle još od razdoblja ranog brončanog doba (3150-1200. godina pr. Kr.). Točno podrijetlo masline nije poznato, ali se nagađa da potječe iz Sirije ili eventualno subsaharske Afrike. Uzgojena maslina se tijekom više od šest tisuća godina razvijala paralelno s mediteranskim civilizacijama, a danas se komercijalno proizvodi diljem više od 23 milijuna hektara u mediteranskom zaljevu. Novi nasadi također postoje u Kaliforniji, Čileu, Argentini, Južnoj Africi i Australiji. Razni „neznanstveni“ procesi selekcije doveli su do mnoštva različitih sorti pa tako mnoga sela u Europi, na Bliskom istoku i u sjevernoj Africi imaju različite sorte. Također je prilično uobičajeno vidjeti iste sorte s različitim imenima i ponekad različite sorte s istim imenom (Vossen, 2007).

Stablo masline zahtijeva malo hlađenja, a podnosi vruće i suhe uvjete. Ne voli vlagu tijekom cvjetanja te ima malo bolju produktivnost ako je izloženo maloj količini stresnih uvjeta. Kao rezultat toga, masline su tradicionalno bile potisnute u zemlje gdje je vrlo mala količina ostale vegetacije i biljaka preživljavala. Tisućama godina masline su se prvenstveno uzgajale za ulje za svjetiljke uz ignoriranje njihovog kulinarskog okusa. Ipak, svjetska proizvodnja stolnih maslina sada iznosi oko 1,5 milijuna tona godišnje. Crna stolna maslina "California Style" gotovo je potpuno nepoznata izvan Sjedinjenih Američkih Država, a predstavlja maslinu vrlo blagog okusa koja se uglavnom koristi za pizze. Prema tome su vrste ulja također različite te je većina plodova masline (16 milijuna tona godišnje) prerađena u ulje (Vossen, 2007).

U svijetu se proizvodi oko 19 klasičnih stilova maslinovog ulja, prvenstveno temeljenih na određenim sortama uzgajanih u različitim regijama. U nekim slučajevima ulja se proizvode miješanjem regionalnih sorti, dok je neispravno maslinovo ulje česta pojava diljem svijeta. Najveći svjetski proizvođač maslinovog ulja je Španjolska, zatim Italija, a na trećem mjestu je Grčka. Zajedno ove tri mediteranske države čine oko 77 % ukupne svjetske proizvodnje. Šest najutjecajnijih svjetskih sorti maslina iz kojih se proizvodi ulje su španjolski Picual, talijanska Coratina, grčki Koroneiki, španjolska Arbequina, talijanski Frantoio te talijanski Leccino (Vossen, 2007).

Postoje stotine uvezenih i domaćih maslinovih ulja dostupnih primjerice američkim potrošačima. Svako ulje ima drugačiji okus, kvalitetu i sadržaj antioksidanasa. Također se razlikuju u načinu na koji su masline uzgojene, kako su obrađene, njihovom sortnom sastavu, i cijeni (Vossen, 2007),

2.2.2.1. Masline španjolskih sorti

Španjolska ima oko jednu četvrtinu svjetske površine obrasle maslinama, s 5,98 milijuna hektara maslina u uzgoju i 36 % proizvodnje ulja, što ju čini glavnim proizvođačem. Što se tiče obrade maslina, glavni postupak za stolne masline poznat je kao Sevillano stil te koristi zelene masline. Koristi se još nekoliko postupaka obrade, primjerice kalifornijski stil gdje se skupljaju masline koje su zelene i pocrnjele od oksidacije. U istraživanju sorti maslina uzgojenih u Španjolskoj su identificirane 262 različite sorte. Biljni materijal masline koji se uzgaja u Španjolskoj karakterizira obilje vrlo starih sorti ograničenih na određena područja gdje su izvorno rasle. Nadalje, većina tih sorti je samoukorijenjena. Sorte maslina u Španjolskoj se razvrstavaju u četiri kategorije - glavni, sekundarni, raspršeni i lokalni na njihov stupanj važnosti i difuziju. Glavne sorte su one koje zauzimaju veliki dio površine ili prevladavaju u jednom ili više maslinika te ih trenutno postoji 24 (Barranco i Rallo, 2000).

Među tim sortama, Picual pokazuje mnoge povoljne agronomske karakteristike, kao što su rana rodnost i visoki prinos, a prilagođen je i različitim uvjetima okoline. Kao posljedica toga, Picual je glavna sorta na novim plantažama. Ova ulja potječu iz velike proizvodne zona koja se nalazi u južnoj Španjolskoj te uključuje regije Jaén, Córdoba, Granada, Málaga, Huelva i Sevilla. Masline se uglavnom uzgajaju na padinama u uvjetima suhog uzgoja s tradicionalnim nasadima koji su vrlo široko razmaknuti. Rani sezonski plodovi ubrani u studenom i prosincu su odlične kvalitete i vrlo su voćni. Ulja iz Picuala imaju visok sadržaj polifenola, jako su gorka, vrlo opora i dobro se čuvaju. Više od polovice plodova bere se tijekom kasne sezone što predstavlja svojevrsnu operaciju spašavanja koja proizvodi veliki volumen ulja niske kvalitete, za rafiniranje. Površine u nasadima gdje raste sorta Arbequina se također povećavaju, zahvaljujući njezinoj niskoj bujnosti, rane rodnosti, visoke produktivnosti i visokog sadržaja ulja. Katalonska Arbequina dolazi iz regija na sjeveroistočnoj obali Španjolske (Tarragona i Lleida). Ulja su pretežno napravljena od Arbequine sorte, koja daje vrlo aromatično ulje s čistim, svježim, biljnim okusom masline, često s podtonovima jabuke, slatkog badema i artičoke te ima vrlo laganu oštrinu i gorčinu. Nažalost, ulja Arbequina od kasnije ubranih

maslina imaju tendenciju da izgube mnogo svog aromatskog karaktera u roku od nekoliko mjeseci pa do kraja prodajne godine postanu bezukusni. Sorta Royal potječe iz regije Jaen u Andaluziji, točnije iz sela Cazorle te predstavlja sortu iz koje se dobiva popularno lokalno ulje (Barranco i Rallo, 2000; Vossen, 2007).

2.3. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje se dobiva isključivo iz plodova stabla masline (*Olea europea sativa*), isključujući ulja dobivena korištenjem otapala ili procesom reesterifikacije i miješanjem sa uljima drugih vrsta. Na tržište se stavlja kao djevičansko maslinovo ulje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, obično djevičansko maslinovo ulje, djevičansko maslinovo ulje nepogodno za konzumaciju, rafinirano maslinovo ulje i maslinovo ulje (Alarcón de la Lastra i sur., 2001).

Sastav maslinovog ulja primarno čine triacilgliceroli (~99 %), a sekundarno SMK, mono i diacilgliceroli te niz negliceridnih sastojaka kao što su: ugljikovodici, steroli, alifatski alkoholi, tokoferoli i pigmenti. Također je prisutno mnoštvo fenolnih i hlapljivih spojeva (Boskou i sur., 2006).

Masne kiseline zastupljene u maslinovom ulju su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3). Miristinska (C14:0), heptadekanske i eikosanske kiseline prisutne su u tragovima. Sastav masnih kiselina ovisi o zoni proizvodnje, geografskoj širini, klimi, sorti i stupnju zrelosti ploda. Primjerice, grčka, talijanska i španjolska maslinova ulja imaju nizak udio linolne i palmitinske kiseline te visok postotak oleinske kiseline. Na temelju analize uzoraka iz raznih zemalja, maslinova ulja klasificiraju se u dvije vrste: 1. S niskim udjelom linolno-palmitinske i visokim udjelom oleinske kiseline, 2. S visokim udjelom linolno-palmitinske i niskim sadržajem oleinske kiseline. Nadalje, prisutnost djelomičnih glicerida u maslinovom ulju posljedica je nepotpune biosinteze triacilglicerola ili hidrolitičkih reakcija. U djevičanskom maslinovom ulju koncentracija diacilglicerola (DG) je u rasponu od 1 do 2,8 %, a monoacilgliceroli su prisutni u mnogo manjim količinama (manje od 0,25 %) (Boskou i sur., 2006). Dva ugljikovodika prisutna u znatnim količinama u maslinovom ulju su skvalen i β -karoten. Skvalen (2,6,10,15,19,23-heksametil-2,6,10,14,18,22-tetrakozahexaen) je posljednji metabolit koji prethodi formiranju sterolnog prstena. Osim ugljikovodika, u maslinovom ulju se pojavljuju i tokoferoli, i to najvećim dijelom (90 %) α -tokoferol u slobodnom obliku (Boskou i sur., 2006).

Boja djevičanskog maslinovog ulja je rezultat zelene i žute nijanse zbog prisutnosti klorofila i karotenoida. Klorofili se pojavljuju u obliku feofitina, a prevladava feofitin α . Glavni karotenoidi prisutni u maslinovom ulju su lutein i β -karoten. Nadalje, alifatski i aromatski alkoholi prisutni u maslinovom ulju nalaze se u slobodnom i esterificiranom obliku te su najvažniji masni alkoholi i diterpenski alkoholi. Steroli su važni lipidi povezani s kvalitetom ulja i široko se koriste za provjeravanje njegove autentičnosti. U maslinovom ulju se pojavljuju četiri klase sterola: uobičajeni steroli (4-desmetilsteroli), 4α -metilsteroli, triterpenski alkoholi (4,4-dimetilsteroli) i triterpenski dialkoholi. Također, u hlapljivoj frakciji djevičanskih maslinovih ulja je identificirano otprilike dvjesto osamdeset spojeva. To su ugljikovodici (više od 80 spojeva), alkoholi (45 spojeva), aldehidi (44 spoja), ketoni (26 spojeva), kiseline (13 spojeva), esteri (55 spojeva), eteri (5 spojeva), i dr. U maslinovom ulju se u tragovima pojavljuju i fosfolipidi te proteini (Boskou i sur., 2006).

Maslinovo ulje je glavna masna komponenta mediteranske prehrane i karakterizira ga to što se sastoji od jednostruko nezasićenih masnih kiselina kao i povišenim sadržajem antioksidansa. Ovo ulje pokazuje brojne biološke funkcije koje imaju blagotvorne učinke na zdravlje. Prehrana bogata mononezasićenim masnim kiselinama (MUFAs) osigurava odgovarajuću fluidnost bioloških membrana, smanjujući opasnost od peroksidacije lipida. Štoviše, antioksidansi prisutni u maslinovom ulju su sposobni uhvatiti slobodne radikale i pružiti odgovarajuću zaštitu od peroksidacije. Što se tiče kardiovaskularnog sustava, maslinovo ulje smanjuje plazmatske razine LDL-kolesterola i povećava razine HDL-kolesterola i tako smanjuje rizik od srčanih tegoba. U tom kontekstu je sugerirano da će se povećanjem konzumacije MUFAs umanjiti razvoj ateroskleroze. Također je dokazano da maslinovo ulje doprinosi boljoj kontroli hipertrigliceridemije koja prati dijabetes, a može smanjiti rizik i od raka dojke i debelog crijeva. S druge strane, nekoliko istraživanja je sugeriralo da maslinovo ulje može biti korisno kod upalnih i autoimunih bolesti, poput reumatoidnog artritisa. Što se tiče probavnog sustava, maslinovo ulje pospješuje pražnjenje žučnog mjehura, a time i smanjuje rizik od kolelitijaze, smanjuje egzokrinu sekreciju gušterače i sekrecijsku funkciju želuca kao odgovor na hranu. Konačno, dokazano je da je prehrana bogata maslinovim uljem povezana s visokim postotkom zacjeljivanja čira na želucu i pruža veću otpornost na želučanu ulcerogenezu uzorkovanu nesteroidnim protuupalnim lijekovima (Alarcón de la Lastra i sur., 2001).

2.3.1. Proces proizvodnje maslinovog ulja

U svrhu očuvanja kvalitete ploda masline nakon berbe, one se odmah pakiraju u odgovarajuću ambalažu i otpremaju u uljaru na preradu. Međutim, najčešće nije moguće ubrane plodove preraditi odmah te ih je potrebno skladištiti. Važno je da se masline skladište na pravilan način jer je preduvjet za dobivanje kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja kvalitetna sirovina (zdrav, neoštećen, svjež i optimalno dozrio plod masline). Uz to, poznato je da na kakvoću ulja utječu uzgojni čimbenici poput sorte, količine ploda po stablu, zrelosti plodova, klimatskih uvjeta, dostupnosti vode. Ipak, u slučaju proizvodnje ulja visoke kakvoće, pravilo je da se plodovi maslina nakon berbe prerade istog dana ili idući dan. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uključuje niz tehnoloških operacija: 1. Čišćenje i pranje plodova; 2. Mljevenje; 3. Miješanje maslinovog tijesta; 4. Izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta te 5. Odvajanje ulja od vegetabilne vode (Koprivnjak, 2006).

Prvi korak u preradi maslina u ulje je pranje plodova i uklanjanje nečistoća, poput primjerice lišća. To se većinom obavlja uz pomoć uređaja koji propuštaju masline preko vibrirajućeg sita i puhala čija je funkcija uklanjanje lišća i drugih ostataka. Masline se peru samo ako su ubrane iz tla ili ako su prethodno prskane iz razloga što dodatna vlaga može smanjiti učinkovitost ekstrakcije jer nastaju emulzije voda/ulje. Ulja dobivena iz opranih maslina su obično manje poželjna, manje su gorka i opora, ali također imaju i manje voćni okus. Ipak, nečistoće općenito negativno utječu na kakvoću ulja te se pranje uglavnom provodi s ciljem uklanjanja grubih nečistoća i pesticida (Vossen, 2007; Koprivnjak, 2006).

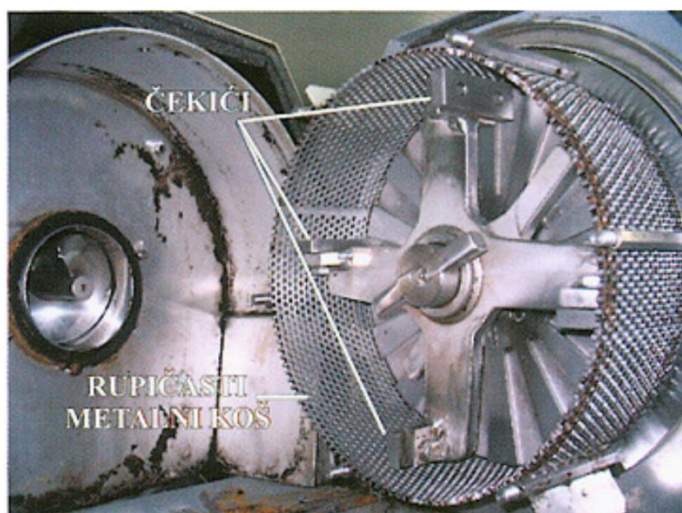
Nakon toga, masline se gnječe kako bi im se razbile stanice i oslobodilo ulje za ekstrakciju. Za mljevenje maslina se koriste dvije osnovne vrste strojeva: kameni mlin i mlin čekićar. Većina maslina se drobi s košticom, a veličina udubljenja na kamenju označava finoću tijesta. Kameni mlinovi (Slika 3.) predstavljaju najstariju metodu te se sastoje od kamenog postolja i uspravnog mlinskog kamenja koji su zatvoreni u metalnom spremniku, često sa strugalima i lopaticama za raspoređivanje plodova ispod mlinskog kamenja te da cirkuliraju i da se izbacuju tijesto. Sporo kretanje mlinskog kamenja ne zagrijava tijesto i rezultira slabijim emulgiranjem pa se tako ulje lakše ekstrahira. Nedostaci ove metode su glomazni strojevi i njihov spor rad, visoka cijena i nemogućnost kontinuiranog rada. Uz to, teže se održava čistoća samog stroja, a i okolnog prostora. Većina kamenih mlinova je u posljednjih 20 godina zamijenjena, većinom

zbog njihove neučinkovitosti. Međutim, neki proizvođači preferiraju ovu metodu za obradu sorti maslina pretjerano jakog okusa.



Slika 3 Kameni mlin (Miljević, 2010)

Mlinovi čekićari (**Slika 4.**) se sastoje od metalne osovine koja se okreće velikom brzinom, bacajući masline na rupičasti metalni koš. Prednost mlinova čekićara je njihova brzina i kontinuirani rad, što se prevodi u visok učinak, kompaktnu veličinu i niska cijena. Ipak, brzo mljevenje ploda dovodi do jačeg emulgiranja ulja i vode unutar tijesta te do viših temperatura. Ulje proizvedeno pomoću mlina čekićara jačeg je okusa jer je pulpa razorenija u većoj mjeri. Veličina rupa na košu mlina čekićara se obično prilagođava napredovanju godišnjeg doba, odnosno plodu koji postaje zreliji i mekši (Vossen, 2007).



Slika 4 Mlin čekićar (Miljević, 2010)

Sljedeći korak uključuje pripremu tijesta za separaciju ulja te se izvodi kako bi emulgiranje koje se dogodilo tijekom mljevenja reverziviralo, pogotovo ako je pasta proizvedena u mlinu čekićaru. Proces miješanja optimizira količinu ulja ekstrahiranog stvaranjem većih kapljica ulja i redukcije uljno-vodne emulzije. Stroj za miješanje tijesta je optimalno dizajniran tako da osigura temeljito miješanje, prilikom čega se nijedan dio tijesta ne izostavlja. Tijesto se miješa polako (30 do 60 min). Temperatura tijesta tijekom miješanja je vrlo važna te ono treba biti toplo (26,6–30 °C), što znači da je tijesto još uvijek hladno na dodir kako bi se poboljšala viskoznost i sposobnost ekstrakcije ulja. Temperature više 30 °C mogu uzrokovati gubitak voćne arome, povećanje gorčine i trpkosti, i dr. Najnoviji trend u obradi maslinovog tijesta je isključenje kisika, što se može učiniti bilo preplavlivanjem površine spremnika za miješanje sa dušikom, bilo vakuumskom ekskluzijom kisika u posebnim spremnicima. Vjeruje se da izloženost ograničenom sadržaju kisika smanjuje aktivnost enzima koji mogu razgraditi polifenole, koji su glavne tvari okusa maslinovog ulja (Vossen, 2007).

Sljedeći korak je ekstrakcija ulja iz maslinovog tijesta i uljnog mošta. Ulje može biti ekstrahirano prešanjem, centrifugalnim dekanterima, selektivnom filtracijom ili kombinacijom različitih metoda. Tradicionalno prešanje uključuje primjenu pritiska na naslagane filtrirajuće slojnice pri čemu je svaka slojnica prekrivena s 2-3 cm tijesta. Slojnice se izmjenjuju s metalnim diskovima. Središnji šuplji šiljak omogućuje uljnom moštu da izađe u oba pravca. Korištenje tradicionalnih preša je zastarjelo zbog nedostataka poput diskontinuiranosti, otežanog čišćenja, itd. U procesu selektivne filtracije se ne primjenjuje pritisak na tijesto. Djeluje na principu da se od tijesta koje sadrži ulje, čvrste čestice i vodu, samo ulje zalijepi za metal. Stroj ima oštrice od nehrđajućeg čelika koje su umočene u tijesto. Zalijepljeno ulje tada kaplje s oštrica u zasebnu posudu, zaostavljajući čvrste čestice i vodu. Na ovaj način se proizvodi lagano "free-run" ulje jedinstvene kvalitete. Međutim, oprema je komplicirana i zahtijeva često čišćenje. Nadalje, centrifugalni dekanteri mogu biti trofazni i dvofazni. Moderni dekanteri su velike, horizontalne centrifuge koje odvajaju ulje iz čvrste tvari i vode u kratkom vremenskom razdoblju. Prilikom okretanja dekantera, centrifugalna sila baca teže čvrste materijale prema van te se stvara svjetliji sloj vode na sredini sa najsvjetlijim slojem ulja iznutra. U trofaznom sustavu dodaje se voda kako bi tijesto teklo kroz dekanter, što ispire dio okusa i antioksidansa (polifenola). Dekanteri s dvofaznim sustavom su također velike centrifuge koje se vrte oko horizontalne osi, ali odvajaju ulje od krutih tvari i uljnog mošta koji izlaze zajedno. Voda se ne

mora dodavati, tako da je sadržaj polifenola u konačnici veći. Vertikalne centrifuge se vrte dvostruko većom brzinom od one u dekanteru s okomitom osi i osiguravaju četiri puta veću silu razdvajanja čvrste tvari, vode i uljne faze (Vossen, 2007).

Posljednji korak uključuje razdajanje smjese ulja i vegetabilne vode, tj. dvije tekućine različite specifične težine koje se nalaze u uljnom moštu. Njihovo razdvajanje se može obaviti dekantiranjem ili pomoću centrifugalnog separatora. Dekantiranje je sporo te je ulje dugo u dodiru s vegetabilnom vodom, a to može dovesti do kvarenja ulja. Za dobivanje ulja visoke kakvoće, odvajanje se obvezno obavlja pomoću centrifugalnih separatora. To je brz postupak koji zahtijeva ograničenu radnu snagu i dopušta učinkovito uklanjanje nečistoća (Miljević, 2010).

2.3.2. Pakiranje i skladištenje maslinovog ulja

Nakon navedenih postupaka obrade, ukupni volumen dobivenog maslinovog ulja treba uskladištiti zajedno, u razdoblju od jednog do tri mjeseca kako bi se u potpunosti smirile preostale čestice. Time se eliminira talog u bocama i kontakt ulja s ostacima procesne vode koji može dovesti do lošijeg okusa. Neka ulja treba filtrirati prije punjenja u boce kako bi se uklonili svi ostaci uljnog mošta ili suspendiranih tvari. "Nova" ulja, koja se pune u boce i odmah prodaju nakon obrade se moraju brzo potrošiti (unutar otprilike 6 tjedana) kako bi se izbjegla promjena okusa u ambalaži. Ulja vrhunske kvalitete treba skladištiti u nehrđajućem čeliku i održavati na konstantnoj temperaturi između 7,2 i 18,3 °C (Vossen, 2007).

Spremnik i ambalaža štite ulje od mirisa i onečišćenja iz okolnog prostora. Materijal spremnika ili ambalaže u kojoj se maslinovo ulje čuva ili stavlja na tržište u velikoj mjeri utječe na očuvanje kakvoće ulja. Svjetlost, kisik, toplina i vlaga su glavni čimbenici kvarenja ulja pa ih spremnik treba zaustaviti. Materijal spremnika mora biti inertan u odnosu na ulje, ne smije otpuštati pojedine sastojke u ulje te se mora lako čistiti. Najčešći materijali koji se koriste za spremanje i pakiranje maslinovog ulja su nehrđajući čelik, lim, staklo i plastika. Prednosti metalne ambalaže su vrlo mala osjetljivost na mehanička oštećenja, u potpunosti štiti maslinovo ulje od svjetlosti i prikladna je za litografsko označavanje. Nadalje, staklo je visoko inertan materijal koji se lako čisti i pruža potpunu zaštitu od kisika i vodene pare. Bezbojno staklo gotovo u potpunosti propušta svjetlosno i ultraljubičasto zračenje, pa se zbog zaštite od svjetlosti preporučuje uporaba tamnog stakla (Miljević, 2010).

2.4. Vrste kvarenja jestivih biljnih ulja

Biljna ulja su proizvodi ograničene trajnosti te će kod njih vrlo brzo doći do određenih neželjenih promjena ako su prisutni uvjeti koji će katalizirati nepoželjne procese i samim time dovesti do kvarenja. Kvarenje ulja uglavnom ovisi o nekoliko čimbenika: 1. Vrsti i kvaliteti sirovine za proizvodnju, 2. Kvaliteti proizvedenog ulja te 3. Sporednim čimbenicima koji se javljaju kod daljnjeg čuvanja ili skladištenja. Glavni od navedenih čimbenika su kvaliteta ulja te uvjeti čuvanja (Čorbo, 2008).

Kvarenjem ulja gubi se njegova prehrambena i nutritivna vrijednost tijekom degradacije biološki aktivnih tvari poput esencijalnih masnih kiselina, provitamina, vitamina i dr. Prilikom tih procesa nastaju spojevi koji ulju daju nepoželjna organoleptička svojstva poput neugodnog okusa i mirisa, dok neki nastali spojevi imaju nepoželjan učinak na ljudsko zdravlje. Razgradni produkti (peroksidi, polimeri, malondialdehidi, itd.) čine ulja neupotrebljivima za jelo budući da mogu biti štetni za zdravlje. Zbog nepravilnog uzgoja, obrade i skladištenja, u jestivim biljnim uljima se pojavljuju opasne tvari. Te tvari se mogu podijeliti u dvije vrste: 1. Biološke opasnosti; i 2. Štetne kemijske tvari (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980; Koprivnjak, 2006, Zhou i sur., 2020).

Drugim riječima, procesi kvarenja se prema uzroku mogu podijeliti na enzimske i mikrobiološke te na kemijske procese. Prilikom rukavanja s uljem, dakle kod proizvodnje ulja, mogućeg procesiranja, čuvanja i upotrebe, vrlo je važno voditi računa o sprječavanju ovakvih procesa. Dakle, okolina predstavlja veliki izazov za sigurnost i kvalitetu jestivih biljnih ulja tijekom cijelog industrijskog lanca, uključujući uzgoj biljaka, žetvu, preradu ulja i skladištenje. U slučaju djevičanskog maslinovog ulja, za njegovu su kakvoću prvenstveno značajne promjene koje nastaju tijekom dozrijevanja, berbe i prerade plodova te čuvanja ulja. Te promjene nastaju na triacilglicerolima, NMK, fenolima i hlapljivim tvarima iz kojih proizlaze poželjna ili nepoželjna okusna i mirisna svojstva. S obzirom na to da su ona vrlo važan aspekt kakvoće i prihvatljivosti proizvoda, treba obratiti pozornost na prevenciju i zaštitu od kvarenja ulja. To se postiže od samog početka, dakle od trenutka ubiranja i skladištenja sjemena pa tako i tijekom proizvodnje i upotrebe ulja pomoću praćenja odgovarajućih parametara (Koprivnjak, 2006; Zhou i sur., 2020).

2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi

Ove procese kvarenja karakterizira prisustvo enzima ili mikroorganizama. Osim toga, za razvoj su im neophodni odgovarajuća sredina i uvjeti poput količine vode, pH, optimalne temperature. Enzimski procesi su karakteristični za sirovine, najčešće iz razloga što sjeme diše. Također, oslobađa toplinu koja povećava temperaturu što dovodi do povećavanja aktivnosti autohtonih enzima, tj. egzogenih lipaza. Mikroorganizmi, kao i paraziti i insekti, uništavaju epidermu sirovine (plodova) te za sobom zaostavljaju opasne izlučevine (obično na ili u sjemenki). Zbog toga je važno pravilno skladištiti sjemenke i plodove uljarica pod odgovarajućim uvjetima kako ne bi došlo do kvarenja. Proces koji uzrokuju mikroorganizmi značajni su za proizvode koji sadrže masti i ulja te se u njih ubrajaju hidrolitička razgradnja i β -ketooksidacija (Rade i sur., 2001; Zhou i sur., 2020).

Hidrolitička razgradnja je reakcija hidrolize triglicerida pri kojoj dolazi do cijepanja esterske veze masnih kiselina i alkohola glicerola u prisutnosti vode i enzima lipaze. Do nje dolazi prilikom svakog razaranja stanične strukture koja dovodi enzime u dodir s triacilglicerolima. Temperatura veća od 80 °C i niža od -20 °C inaktivira lipolitičke enzime i dovodi do zaustavljanja procesa hidrolitičke razgradnje ulja. Do ove razgradnje najčešće dolazi u ulju unutar ploda masline, ali i u izdvojenom ulju koje je u dodiru s vodom i ako se čuva u neprikladnim uvjetima. Kao posljedica toga nastaju SMK čijim se oslobađanjem povećava kiselost ulja i nastaju monogliceridi, digliceridi i glicerol. Stupanj nastalih hidrolitičkih promjena se prati određivanjem udjela slobodnih masnih kiselina (SMK). Rafinirana jestiva ulja smiju sadržavati do 0,3 % SMK izraženih kao postotak oleinske kiseline (Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 11/2019; Rade i sur., 2001).

β -ketooksidacija biljnih ulja je proces kvarenja karakterističan za ona ulja i masti u čijem sastavu prevladavaju masne kiseline kraćeg i srednjeg lanca. Nastaje pod djelovanjem mikroorganizama, odnosno plijesni iz *Aspergillus* i *Penicillium* te bakterija *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*. Posljedica β -ketooksidacije je nastanak β -keto kiselina kao primarnih produkata i metil ketona kao sekundarnih produkata reakcije. Već pri niskim koncentracijama metil ketoni narušavaju organoleptička svojstva u pogledu užglosti ulja i masti. Ovu vrstu kvarenja ulja i masti moguće je spriječiti termičkom obradom (pasterizacijom i sterilizacijom), snižavanjem pH vrijednosti ispod 5 i primjenom određenih konzervansa (Rade i sur., 2001).

2.4.2. Kemijski procesi

U kemijske procese koji uzrokuju kvarenje jestivih biljnih ulja se ubrajaju autooksidacija, termooksidacijske promjene i reverzija.

Autooksidacija ulja je kemijski proces do kojeg dolazi kada je ulje izloženo kisiku iz zraka, svjetlosti, toplini i tvarima s prooksidacijskim djelovanjem. Slobodni radikali koji nastaju procesom oksidacije ulja katalitički pospješuju daljnji tijek oksidacije zbog čega se ova vrsta kvarenja naziva autooksidacija. Autooksidacija je lančana reakcija te se odvija u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija se temelji na nastanku slobodnog lipidnog radikala reakcijom masne kiseline te kisika iz zraka. Nastali slobodni radikali masnih kiselina reagiraju s kisikom i tvore peroksi-radikale u fazi propagacije. Peroksi-radikali oslobađaju nove radikale masnih kiselina, kao i hidroperokside koji se raspadaju na dva nova radikala koji opet oslobađaju nove radikale, inicirajući novi niz lančanih reakcija. Primarni i sekundarni produkti koji nastaju daju ulju užegnut okus i miris. U terminaciji slobodni radikali masnih kiselina međusobno se spajaju dajući polimere i zbog toga raste viskoznost, ulje tamni i teže se probavlja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980; Rade i sur., 2001).

Do termooksidacijskih promjena (termičke i oksidacijske degradacije) dolazi zagrijavanjem ulja na temperature više od 150 °C, uz prisutnost vodene pare i zraka. Ovakvi procesi karakteristični su pri procesiranju hrane prženjem pri kojem se može apsorbirati do 40 % ulja, a fizikalna svojstva ulja koja se mijenjaju pri navedenim uvjetima su indeks refrakcije, viskoznost i boja. Uz fizikalna, mijenjaju se i kemijska svojstva ulja – raste udio SMK, broja osapunjenja, peroksidnog broja te smanjenje jodnog broja. Kemijske reakcije koje se odvijaju tijekom prženja su hidroliza, oksidacija i polimerizacija te kao produkti nastaju dimeri i polimeri masnih kiselina i triglicerida, oksipolimeri, cikličke masne kiseline te drugi hlapljivi i nehlapljivi spojevi. Pojavom ovih spojeva mijenjaju se funkcionalna, senzorska i nutritivna svojstva ulja. Termooksidacija se odvija stupnjevito, a njezin stupanj ovisi o vrsti ulja, temperaturi i vremenu zagrijavanja.

Reverzija je proces karakterističan za ulja koja sadrže linolensku kiselinu koja već nakon kratkog perioda skladištenja poprimaju neugodan okus i miris nalik na miris sirovine ili ribe. Ovaj oblik kvarenja može se usporiti djelomičnom hidrogenacijom (uklanjanjem linolenske kiseline) ili dodavanjem određenih aditiva kako bi se povećala održivost ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

2.5. Stupanj oksidacije i oksidacijska stabilnost biljnih ulja

Procjenjivanje stupnja oksidacije ulja uglavnom se provodi pomoću više metoda zbog toga što ne postoji jedinstvena metoda koja daje točan podatak o stupnju oksidacije koja se pojavila u biljnim uljima. Stoga istovremenom primjenom više metoda koje daju ukupan sadržaj oksidacijskih promjena možemo dobiti kompletan uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena. Oksidacijske promjene očituju se prilikom pojave primarnih (peroksidi i hidroperoksidi) i sekundarnih (aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline, epoksidi i dr.) produkata oksidacije. (Dimić i Turkulov, 2000).

Oksidacijska stabilnost, odnosno održivost biljnih ulja podrazumijeva vremenski period tijekom kojeg se ulja mogu sačuvati bez da podlegnu procesu autooksidacije. Oksidacijsku stabilnost je potrebno utvrditi prije skladištenja kako bi se vrijeme čuvanja proizvoda u kojemu neće doći do promjene njegove kvalitete, odnosno kako bi se rok trajanja ulja znao unaprijed. Oksidacijska stabilnost prvenstveno ovisi o vrsti ulja, tj. o njegovom sastavu masnih kiselina, budući da su polinezasićene masne kiseline (PUFAs) reaktivnije od MUFAs i ZMK te oksidiraju puno brže (Yanishleva i Marinova, 2001; Dimić i Turkulov, 2000).

2.5.1. Metode određivanja stupnja oksidacije ulja

Metode određivanja stupnja oksidacije ulja podijeljene su tri skupine: 1. Senzorske (organoleptičke) metode; 2. Kemijske metode i 3. Fizikalne metode.

Senzorske metode

Senzorske metode se temelje na subjektivnom ispitivanju jestivih biljnih ulja, odnosno na osjetilnim sensorima ispitivača koji onda donosi odluku o okusu i mirisu ulja. Ove metode na jednostavan način određuju neugodan, odnosno užegli miris i okus ulja koji se pojavljuju zbog oksidacije. Ove metode su dobar pokazatelj oksidacijske stabilnosti biljnih ulja, ali danas se radi na razvoju bržih i jednostavnijih metoda određivanja stupnja oksidacije ulja. Drugim riječima, iako su senzorske analize vrlo važan pokazatelj pri određivanju kakvoće biljnih ulja, također su i nedovoljne za donošenje konačne ocjene (Dimić i Turkulov, 2000).

Fizikalne metode

Fizikalne metode pomoću kojih se procjenjuje stupanj oksidacije ulja su UV spektrofotometrija, IR spektrofotometrija, nuklearna magnetska rezonanca (NMR),

fluorescencija, plinska kromatografija, indeks refrakcije, dielektrična konstanta, polarografija i kulonometrija. UV spektrofotometrija se primjenjuje za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Temelji se na principu ovisnosti apsorbance o valnoj dužini zračenja koje je prošlo kroz ispitivani uzorak, odnosno na principu ovisnosti energije zračenja o kemijskom sastavu tvari. U ultraljubičastom području produkti oksidacije PUFAs (konjugirani dieni i trieni) pokazuju karakterističan spektar pomoću kojeg se mogu identificirati. Za određivanje u UV i IR dijelu spektra koriste se spektrofotometri, uređaji koji električnim putem mjere apsorbanciju. Na 232 nm svoj maksimum apsorpcije pokazuju primarni produkti oksidacije, a na 270 nm sekundarni produkti oksidacije. Njihov odnos izražava se kao R vrijednost koja je dobar pokazatelj kvalitete ulja:

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

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

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

Vrijednost R je niža ukoliko je ispitivano ulje lošije kvalitete te je ovo najčešće korištena metoda kod određivanja stupnja oksidacije ulja. R vrijednost se može odrediti samo kod sirovih ulja.

IR spektrofotometrija ispituje primarne i sekundarne produkte oksidacije. Ova metoda se nikada ne koristi sama za analizu nepoznatih uzoraka, nego se dopunjuje sa drugim metodama poput NMR i UV spektrofotometrije.

Metoda koja se primjenjuje za određivanje oksidacijskih promjena kod čistih ulja i masti je plinska kromatografija. Ona se pretežito koristi za određivanje hlapljivih spojeva (npr. aldehidi).

Određivanje indeksa refrakcije je metoda koja se također koristi za određivanje oksidacijskih promjena, pri čemu konjugirani dieni hidroperoksida i polimeri povećavaju indeks refrakcije.

Polarimetrija je kvantitativna i kvalitativna voltmetrijska metoda koja se zasniva na pojavi polarizacije i depolarizacije radne elektrode pri elektrolizi analiziranog elektrolita. Prilikom analize se prati pojava redukcije ili oksidacije ispitivanog uzorka na površini radne elektrode (Dimić i Turkulov, 2000).

Kemijske metode

Za određivanje stupnja oksidacije ulja najčešće se primjenjuju kemijske metode: peroksidni broj (Pbr), test tiobarbiturne kiseline (TBK), karbonilni broj, anisidinski broj (Abr), Kreis test, oksidacijska vrijednost (OV)/Totox broj i kemijska luminiscencija te su njihovi ispitivani parametri prikazani u **Tablici 2**. Od navedenih, najčešće primjenjivana metoda je određivanje peroksidnog broja kojom se određuju peroksidi, odnosno primarni produkti oksidacije ulja.

Osim toga, često primjenjivana metoda je Leova i Wheeler-ova jodometrijska metoda kojom se određuje količina joda koju oslobode peroksidi koji se nalaze u ulju iz kalij-jodida. Nadalje, kolorimetrijska metoda se temelji na principu mijenjanja obojenja oksidacije željeza (II) soli u željezo (III). Količina sekundarnih produkata određuje se pomoću Abr koji se određuje metodom temeljenoj na reakciji viših nezasićenih aldehida sa p-anisidinom u kiselom mediju. Konačno, pomoću Totox broja određuje se količina ukupnih produkata oksidacije na način da se vrijednosti peroksidnog i anisidinskog broja zbroje (Dimić i Turkulov, 2000; Gunstone, 2004).

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

Pbr – peroksidni broj,

Abr – anisidinski broj,

OV – oksidacijska vrijednost

Tablica 2 Kemijske metode za određivanje stupnja oksidacije ulja (Dimić i Turkulov, 2000)

Kemijska metoda	Ispitivani parametar
Peroksidni broj	Hidroperoksidi, peroksidi
TBK test (broj)	Malonaldehidi
Karbonilni broj	Svi spojevi s karbonilnom skupinom
Anisidinski broj (Abr)	Svi isparljivi karbonilni spojevi (2 - enali, 2,4 - dieni)
Kreis-ov test	Epoksaldehidi i acetali
Kemijska luminiscencija	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Oksidacijska vrijednost (OV)/Totox broj	$OV = 2Pbr + Abr$, ukupni sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije

2.5.2. Analitičke metode za određivanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja

Postupak određivanja oksidacijske stabilnosti provodi se metodama koje se temelje na namjerno izazvanoj ubrzanoj oksidaciji ulja utjecajem temperature i zraka. U praksi se najčešće primjenjuju sljedeće metode: Oven test/Schaal Oven test, Swift test/AOM test i Rancimat test. S obzirom na to da u praksi ne postoji jedinstvena metoda za dobivanje ukupnih podataka o oksidacijskim promjenama, koristi se više različitih metoda za dobivanje ukupne slike o sadržaju primarnih i sekundarnih produkata oksidacije (Dimić i Turkulov, 2000).

Oven test ili Schaal Oven test

Prilikom provođenja Oven testa uzorci ulja zagriju se i drže na konstantnoj temperaturi od 60 ili 63 °C u sušioniku ili termostatu, pri čemu se prati porast peroksidnog broja u određenim vremenskim razmacima (svakih 24 sata) i senzorske promjene ulja. Rezultati ove metode se prikazuju kao vrijednost peroksidnog broja nakon određenog vremena držanja uzorka (u danima) pri određenoj temperaturi (za jestiva ulja to je obično četiri dana). Jedan dan Oven testa odgovara održivosti ulja na sobnoj temperaturi od 6 do 12 dana. (Dimić i Turkulov, 2000)

AOM (Active Oxygen Method) test ili Swift test

Biljna ulja se zagrijavaju na 98 °C dok kroz njih prolazi struja zraka u Swift aparatu, nakon čega se uzimaju uzorci u određenim vremenskim razmacima i određuje im se peroksidni broj. Održivost ulja se uglavnom određuje do peroksidnog broja 5 mmol O₂/kg jer je to granica pri kojoj je ulje još ispravno. Kvalitetna ulja (ulja dobre održivosti) poslije 8 sati Swift testa moraju imati peroksidni broj manji od 5 mmol O₂/kg (Rade i sur., 2001).

Rancimat test

Oksidacijska stabilnost ulja se određuje pomoću Rancimat uređaja u kojem dolazi do ubrzane oksidacije biljnih ulja uz povišenu temperaturu (100, 110 i 120 °C) i konstantan protok zraka kroz uzorak. Pri tome se na osnovu količine izdvojenih hlapljivih kiselina određuje induksijski period (IP) u satima. Zatim se hlapljivi spojevi (kratkolančane lakohlapljive organske kiseline) koje nastaju oksidacijom ulja uvode u deioniziranu vodu i mjeri se porast vodljivosti. IP se određuje na osnovu količine izdvojenih kratkolančanih hlapljivih organskih kiselina. On pokazuje otpornost ulja prema oksidaciji, tj. dulje vrijeme indukcije znači da ulje ima bolju oksidacijsku stabilnost ili održivost (Rade i sur., 2001).

2.5.3. Stabilizatori biljnih ulja: antioksidansi i sinergisti

Antioksidansi se koriste u svrhu sprečavanja oksidacije i poboljšanja stabilnosti biljnih ulja. To su tvari koje usporavaju propagaciju tako da deaktiviraju slobodne radikale te su od velikog značaja za održivost ulja, tj. za zaustavljanje i usporavanje oksidacijskih promjena koje se javljaju u ulju. Kada su prisutni u uljima i mastima, antioksidansi posjeduju tzv. zaštitnu ulogu. Pojam antioksidans odnosi se na bilo koju reducirajuću kemijsku tvar, odnosno na tvar koja sprječava ili usporava oksidaciju supstrata podložnih oksidaciji te na taj način produžuje održivost ulja. Postoji nekoliko kategorija prema kojima se provodi podjela antioksidanasa: 1. Prema podrijetlu; i 2. Prema načinu djelovanja. Prema podrijetlu se dijele na prirodne i sintetske, dok se prema načinu djelovanja dijele na primarne i sekundarne (Yanishleva i Marinova, 2001).

Primarni antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima na direktan način te se u njih ubrajaju: fenoli, galati, hidrokvinoni, butil hidroksianisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), tokoferoli, flavonoidi, askorbati i ekstrakti biljaka i začina. Sekundarni antioksidansi su tvari koje posredno usporavaju oksidaciju umjesto direktnog reagiranja sa slobodnim radikalima. Sekundarnim antioksidansima pripadaju etilendiamin tetra-octena kiselina (EDTA), limunska kiselina, fosforna kiselina i određene aminokiseline. Primarni i sekundarni antioksidansi se najčešće koriste zajedno jer sekundarni antioksidansi samostalno ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost (Yanishleva i Marinova, 2001).

Djelovanje antioksidansa na poboljšanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja određeno je stabilizacijskim ili zaštitnim faktorom (PF) koji označava koliko se puta poveća stabilnost ili održivost nekog ulja dodatkom antioksidansa. Izračunava se kao količnik indukcijskog perioda uzorka ulja s dodatkom antioksidansa i indukcijskog perioda uzorka ulja bez dodatka antioksidansa koji su izraženi u satima (Yanishleva i Marinova, 2001).

Prirodne antioksidanse čine aminokiseline i dipeptidi, hidrolizati proteina, proteini topljivi u vodi, fosfolipidi, anorganske soli, tokoferoli i njihovi derivati, bioflavonoidi, vitamini A, B i C, minerali selen i cink, karotenoidi, askorbinska kiselina, neki biljni ekstrakti i dr. Tokoferoli su fenolni lipofilni spojevi tokoli koji se međusobno razlikuju po rasporedu metilnih grupa i prema tome dijele na četiri tokotrienola i četiri tokoferola. Tokoferoli predstavljaju najvažniju grupu prirodnih antioksidanasa, a najpoznatiji je α -tokoferol (vitamin E) koji također posjeduje snažno vitaminsko i antioksidacijsko djelovanje (Wijerante i sur., 2006).

Vitamin C (askorbinska kiselina) reagira sa kisikom koji je zaostao kao višak u pakiranim proizvodima. Astaksantin je karotenoid dobiven iz mikroalgi sa iznimno jakim antioksidacijskim djelovanjem. Također ima protuupalno djelovanje, a vrlo je učinkovit i u zaštiti od štetnog djelovanja sunčevog zračenja, prvenstveno kože i očiju (Wijerante i sur., 2006).

Sintetski antioksidansi nisu prirodan sastojak hrane nego se sintetiziraju kemijskim putem te pripadaju skupini prehrambenih aditiva. Sintetski antioksidansi koji se primjenjuju za stabilizaciju rafiniranih i sirovih ulja su BHA, BHT, grupa alkil estera galne kiseline (propil galat – PG, oktil galat – OG, dodecil galat), tercijarni butilhidrokinon (TBHQ) (MZSS, 2008).

Sinergisti su kemijski spojevi koji antioksidansima produžuju djelovanje, ali sami nemaju antioksidacijsku aktivnost. U većini slučajeva se dodaju na kraju procesa dezodorizacije. Najviše se koriste različite organske kiseline (limunska, octena, askorbinska kiselina), askorbil palmitat, mono izopropil citrat i lecitin. Potrebno ih je pažljivo odabrati jer svaki synergist ne odgovara svakom antioksidansu. Dobar synergist uz tokoferole je askorbinska kiselina, askorbil palmitat i limunska kiselina (Koprivnjak, 2006).

Sinergisti djeluju na tri načina: 1. Vežu tragove metala (npr. Cu i Fe) i inaktiviraju ih i na taj način sprečavaju njihovo prooksidacijsko djelovanje; 2. Daju vodikov atom antioksidansu i tako ga regeneriraju i produžuju mu vrijeme trajanja; i 3. Sprečavaju djelovanje radikala antioksidansa na razgradnju peroksida, odnosno synergist se veže na radikal antioksidansa i zaustavlja njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006).

Sinergisti se mogu nazivati i sekundarnim antioksidansima iz razloga što ne prevode izravno slobodne radikale u stabilne molekule. Umjesto toga, oni posredno pridonose usporavanju oksidacijskog procesa kvarenja biljnog ulja (Koprivnjak, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitivanje oksidacijske stabilnosti tri ekstra djevičanska maslinova ulja španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal. Osim toga, ispitivao se i utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa i sinergista (ekstrakta zelenog čaja udjela 0,2 %, ekstrakta zelenog čaja udjela 0,2 % uz dodatak sinergista limunske kiseline udjela 0,01 %, ekstrakta zelenog čaja udjela 0,2 % uz dodatak sinergista kafeinske kiseline udjela 0,01 %, eterično ulje lavande udjela 0,2 %, ekstrakta ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,2%, ekstrakta ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,2 % uz dodatak sinergista limunske kiseline udjela 0,01 %, ekstrakta 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 %).

Istraživanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskih maslinovih ulja, kao i djelovanje dodanih antioksidanasa i sinergista na njihovu stabilnost, provelo se testom ubrzane oksidacije ulja Oven testom pri temperaturi od 63 °C u termostatu.

Prije istraživanja oksidacijske stabilnosti ispitivanih ekstra djevičanskih maslinovih ulja, određeni su parametri kvalitete i identifikacije (SMK, Pbr, udio vlage, udio netopljivih nečistoća, saponifikacijski broj i jodni broj) primjenom standardnih metoda.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Materijali

a) Jestiva biljna ulja

Prilikom ispitivanja oksidacijske stabilnosti korištena su ekstra djevičanska maslinova ulja španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal.

b) Antioksidansi

Ispitivanje utjecaja antioksidansa na održivost ili oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja provedeno je dodatkom prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista. Korišteni antioksidansi su: ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less®CS), ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola i propil galat (**Slika 5.**), dok su korišteni sinergisti limunska kiselina te kafeinska kiselina (**Slika 6.**).

Ekstrakt ružmarina (tip OxyLess® CS)

Oxy Less CS je prirodni ekstrakt dobiven iz listova ružmarina (*Romarinus officinalis L.*). To je prašak bež boje proizveden u Francuskoj (tvrtka NATUREX). Udio karnosolne kiseline je 18 do 22 %, PF je veći od 12 %, suha tvar ekstrakta je od 92 do 98 %. U ispitivanju je upotrebljen u udjelu 0,2 %.

Ekstrakt zelenog čaja

Ekstrakt zelenog čaja je prirodni ekstrakt topljiv u vodi dobiven iz listova zelenog čaja (*Camellia sinensis L.*) u obliku praška, a proizveden u Francuskoj (tvrtka NATUREX). Udio epigalokatehin galata (EGCG) je nešto veći od 45 %, udio ukupnih polifenola je veći od 98 %, udio kofeina je manji od 2 %, a udio katehina veći od 80 %. U ispitivanju je upotrebljen u udjelu 0,2 %.

Eterično ulje lavande

Eterično ulje lavande je bezbojno do blijedo žućkaste ili žućkasto-zelenkaste boje. U njegovom kemijskom sastavu dominiraju linalil-acetat sa oko 50 % i linalol sa oko 40 %, ali je za njegovu aktivnost važno prisustvo i drugih, manje zastupljenih sastavnica. Primjerice, sadrži i male količine kamfora. U ispitivanju je eterično ulje lavande upotrijebljeno u udjelu 0,2 %.

Mješavina tokoferola

Mješavina tokoferola je žuto do smeđe-crveno, bistro i viskozno ulje bez karakterističnog mirisa sa minimalnim udjelom tokoferola od 95 %. Sadrži 0-15 % α -tokoferola, manje od 5 % β -tokoferola, 55-75 % γ -tokoferola i 20-30 % δ -tokoferola. Topljiv je u lipofilnim otapalima (npr. ulje) te je netopljiv u vodi. U ispitivanju je mješavina tokoferola upotrijebljena u udjelu 0,1 %.

Propil galat

Propil galat (E310) predstavlja sintetski antioksidans. To je propilni ester galne kiseline koja predstavlja prirodni biljni fenolni spoj. Često se kombiniraju s TBHQ (E319), BHA (E320) i BHT (E321) jer se njihovi antioksidacijski učinci međusobno pojačavaju. U ispitivanju je upotrijebljen u udjelu 0,01 %.



Slika 5 Prikaz upotrijebljenih antioksidanasa s lijeva na desno: ekstrakt ružmarina, ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola, propil galat (Izvor: autor)

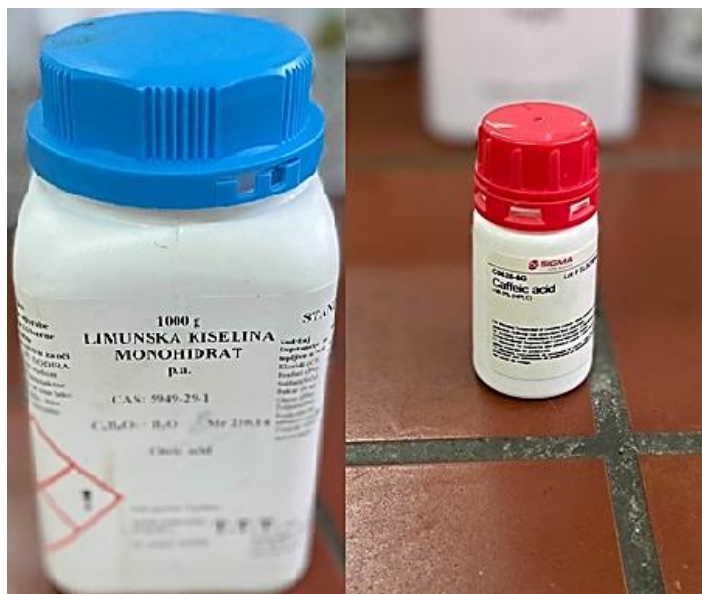
c) Sinergisti

Limunska kiselina

Limunska kiselina monohidrat ($C_6H_8O_7$), bijela je kristalna tvar kiselog okusa koja je lako topljiva u vodi. Proizvođač je T.T.T d.o.o., Sveta nedjelja, Hrvatska. U ispitivanju je upotrijebljena u udjelu 0,01 %.

Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina je organska hidroksicijamična kiselina, odnosno fenolna kiselina. Predstavlja žućkasti prah koji se nalazi u svim biljkama jer je ključni međuproizvod u biosintezi lignina. U ispitivanju je upotrijebljena u udjelu 0,01 %.



Slika 6 Prikaz upotrijebljenih synergista s lijeva na desno: limunska kiselina, kafeinska kiselina (Izvor: autor)

3.2.2. Metode

3.2.2.1. Određivanje parametara kvalitete ulja

Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj je indikator svježine, tj. užeglosti ulja te njegovo određivanje predstavlja jednu od najčešće korištenih metoda za ispitivanje primarnih produkata oksidacije. U ovom istraživanju peroksidni broj je određen standardnom jodometrijskom metodom koja se temelji na sposobnosti peroksida da oslobode jod iz otopine kalij jodida (KI), koji se zatim određuje titracijom sa otopinom natrijevog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Dobiveni rezultat je izražen kao mmol aktivnog kisika koji potječe iz nastalih peroksida prisutnih u 1 kg ulja (mmolO_2/kg).

Postupak se provodi tako da se uzorak ulja otopi u smjesi ledene octene kiseline i kloroforma, promiješa se te se smjesi doda KI. Uzorak se mućkanjem miješa jednu minutu, a zatim se razrijedi prethodno prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom. Slijedi dodatak škroba kao indikatora pa se oslobođeni jod iz otopine KI određuje titracijom s $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (**Slika 7.**). Istim postupkom je provedena i slijepa proba, ali bez uzorka ulja.

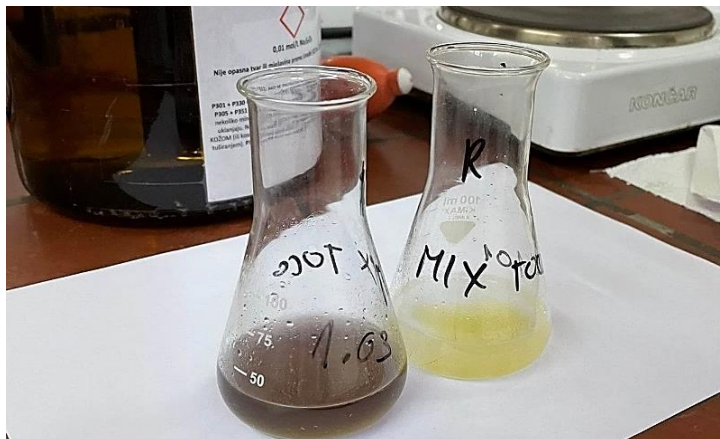
Peroksidni broj iskazuje mL 0,002 M otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ koji je potreban za redukciju one količine joda koju oslobodi 1 g masti ili ulja iz KI. Izračunava se prema sljedećoj jednadžbi:

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

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 slijepa probe (mL);

m - masa uzorka ulja (g).



Slika 7 Promjena boje prilikom titracije za određivanje peroksidnog broja (Izvor: autor)

Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Masti i ulja sadrže određenu količinu SMK koje nastaju kao produkti hidrolitičke razgradnje triacilglicerola. Njihov udio ovisi o kakvoći sirovine, procesu prerade i uvjetima skladištenja te se izražava kao:

- kiselinski broj,
- kiselinski stupanj i
- % SMK (izražen kao oleinska kiselina).

Navedene vrijednosti mogu se dobiti istim postupkom određivanja te se mogu preračunati jedna u drugu. SMK su u uzorcima maslinovog ulja određivane primjenom standardne metode prema normi HRN EN ISO 660:1996 pod nazivom Određivanje kiselinskog broja i kiselosti (HRN, 1996). Metoda se provodi titracijom ulja s otopinom natrijevog hidroksida $c(\text{NaOH}) = 0,1$ mol/L uz indikator fenolftalein (**Slika 8.**). Prethodno izvagani uzorak prelije se s neutralnom smjesom etera i etanola te izmiješa mućkanjem. Udio SMK izražen je kao % SMK odnosno kao % oleinske kiseline:

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

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 8 Promjena boje prilikom titracije za određivanje SMK (Izvor: autor)

Određivanje vlage u ulju

Količina vlage u ulju se smatra jednim od pokazatelja kvalitete u biljnim uljima iz razloga što njezina prisutnost u ulju može dovesti do nepoželjnih hidrolitičkih i senzorskih promjena. Princip određivanja vlage u ulju temelji se na isparavanju udjela vode i hlapljivih tvari zagrijavanjem u sušioniku pri točno definiranim uvjetima. U prethodno osušenu i izvaganu posudicu izvaže se uzorak, nakon čega se staklena posudica s podignutim poklopcem i uzorkom stavlja u sušionik pri 103 °C na 2 sata. Posudica se tada zatvori s poklopcem i stavlja u eksikator na hlađenje do sobne temperature, nakon čega se uzorak izvaže te ponovno s podignutim poklopcem stavlja u sušionik 1 sat, hladi i važe. Pri zagrijavanju na 103 °C dolazi do gubitka mase (izražen u %), a postupak se provodi do konstantne mase. Udio vlage u ulju računa se prema jednadžbi:

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

m_0 – masa prazne posudice (g);

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

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

Određivanje netopljivih nečistoća

Netopljive nečistoće predstavljaju mehaničke nečistoće u ulju, a mogu biti mineralne tvari ili organski sastojci za koje je karakteristično da se ne otapaju u organskim otapalima. Karakteristične su za sirova biljna ulja te je njihova maksimalna dopuštena vrijednost 0,05 %.

Udio netopljivih nečistoća u uzorcima određuje se primjenom standardne metode (ISO 663:1992) temeljene na tretiranju uzorka određenim organskim otapalom (n-heksan ili petroleter). Dobivena otopina filtrira se kroz stakleni filter lijevak sa sinteriranim dnom uz ispiranje taloga istim otapalom. Netopljivi talog koji zaostaje na filteru suši se do konstantne mase i važe. Udio netopljivih nečistoća u ulju računa se prema jednadžbi:

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

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. Određivanje karakteristika za identifikaciju ulja

Određivanje saponifikacijskog broja

Saponifikacijski broj je broj mg kalijevog hidroksida koji je potreban za potpunu saponifikaciju slobodnih i esterski vezanih masnih kiselina u 1 g masti. Vrijednost saponifikacijskog broja je konstanta karakteristična za pojedina ulja, a ovisi i o molekulskim masama masnih kiselina koje ulaze u sastav masti (veća je ako je molekulska masa manja i obrnuto). Na saponifikacijski broj utječu i neosapunjive tvari (strane primjese). Saponifikacija ulja ili masti provodi se pomoću alkoholne otopine KOH, poznatog molariteta, a višak nevezanih hidroksida se tretira otopinom klorovodične kiseline poznatog molariteta. Saponifikacijski broj se izražava prema jednadžbi:

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

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.

Određivanje jodnog broja

Jodni broj ukazuje na nezasićenost masti ili ulja, tj. na prisutnost nezasićenih veza masnih kiselina u molekuli triglicerida. To je količina joda u gramima koja se veže na 100 g ulja ili masti.

Metoda određivanja jodnog broja temelji se na vezanju joda na dvostruke veze masne kiseline. Veća vrijednost jodnog broja znači više NMK. Na ulje se djeluje smjesom halogena, a nakon adicije se višak halogena određuje titracijom sa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Uzorak se otopi u kloroformu te se otopini doda otopina jodnog monobromida, promućka, začepi i ostavi u tamnom prostoru pola sata. Zatim se otopini doda KI i prokuhana i ohlađena destilirana voda i vrši se titracija s otopinom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do pojave žute boje pa se uzorku dodaje otopina škroba i titrira do nastanka plave boje. Jodni broj se izračunava prema formuli:

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

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).

3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja

Priprema uzoraka za analizu

Uzorci koji sadrže praškaste ili krute antioksidanse pripremaju se tako da se izvaže određena masa antioksidansa, doda 40 g ulja te se uzorci zagriju na temperaturu od otprilike 65 °C (maksimalno 70 °C) uz stalno miješanje 30 minuta. To su uzorci koji sadrže OxyLess CS, OxyLess CS + limunska kiselina, OxyLess CS + kafeinska kiselina, ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt zelenog čaja + limunska kiselina, ekstrakt zelenog čaja + kafeinska kiselina te propil galat. Nakon toga uzorci se ohlade na sobnoj temperaturi i stavljaju u ventilacijski sušionik (Binder) (**Slike 9. i 10.**) na konstantnu temperaturu od 63 °C čime započinje ispitivanje oksidacijske stabilnosti sa i bez dodatka antioksidanasa i sinergista. Popis uzoraka prikazan je u **Tablici 3.**

Tablica 3 Popis uzoraka za provođenje Oven testa

Uzorak	Maslinovo ulje Arbequina	Maslinovo ulje Picual	Maslinovo ulje Royal
1.	Ulje bez dodatka antioksidansa	Ulje bez dodatka antioksidansa	Ulje bez dodatka antioksidansa
2.	Ulje + 0,2 % OxyLess CS	Ulje + 0,2 % OxyLess CS	Ulje + 0,2 % OxyLess CS
3.	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % limunska kiselina	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % limunska kiselina	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % limunska kiselina
4.	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % kafeinska kiselina	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % kafeinska kiselina	Ulje + 0,2 % OxyLess CS + 0,01 % kafeinska kiselina
5.	Ulje + 0,2 % zeleni čaj	Ulje + 0,2 % zeleni čaj	Ulje + 0,2 % zeleni čaj
6.	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % limunska kiselina	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % limunska kiselina	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % limunska kiselina
7.	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % kafeinska kiselina	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % kafeinska kiselina	Ulje + 0,2 % zeleni čaj + 0,01 % kafeinska kiselina
8	Ulje + 0,2 % eterično ulje lavande	Ulje + 0,2 % eterično ulje lavande	Ulje + 0,2 % eterično ulje lavande
9.	Ulje + 0,1 % mješavina tokoferola	Ulje + 0,1 % mješavina tokoferola	Ulje + 0,1 % mješavina tokoferola
10.	Ulje + 0,01 % propil galat	Ulje + 0,01 % propil galat	Ulje + 0,01 % propil galat



Slika 9 Pripremljeni uzorci u sušioniku za određivanje oksidacijske stabilnosti (Izvor: autor)

Oven test pri 63 °C

Oksidacijska stabilnost maslinovih ulja Arbequina, Picual i Royal određena je pomoću Oven testa na konstantnoj temperaturi od 63 °C. Test je izvođen tijekom 14 dana za maslinovo ulje Arbequina, tijekom 17 dana za maslinovo ulje Picual te tijekom 10 dana za maslinovo ulje Royal, uvijek u isto vrijeme dana. Tijekom izvođenja Oven testa uzorcima ulja je određena vrijednost peroksidnog broja. Uzroci su držani ukupno 14 dana ili 336 sati (Arbequina), 17 dana ili 408 sati (Picual) te 10 dana ili 240 sati (Royal), u sušioniku. Rezultati Oven testa na 63 °C prikazani su kao vrijednost peroksidnog broja [mmol O₂/kg] u vremenskom intervalu od 336, 408, odnosno 240 sati.



Slika 10 Sušionik zagrijan na 63 °C (Izvor: autor)

3.2.2.4. 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 koje 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-FAMEWAXTM (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 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 Europskih zajednica: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002).

4. REZULTATI

Tablica 4 Osnovni parametri kvalitete i identifikacije ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Arbequina u usporedbi s maksimalnim dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009)

Parametar kvalitete	Rezultat	Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina (maksimalne vrijednosti)
Peroksidni broj Pbr (mmol O ₂ /kg)	1,26	10
Slobodne masne kiseline (izraženih kao oleinska) (%)	0,17	0,8
Udio vlage (%)	0,11	0,4
Udio netopljivih nečistoća (%)	0,19	0,05
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	194,38	184 – 196
Jodni broj (gl ₂ /100g)	77,90	75 - 94

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

Parametar kvalitete	Rezultat	Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina (maksimalne vrijednosti)
Peroksidni broj Pbr (mmol O ₂ /kg)	1,74	10
Slobodne masne kiseline (izraženih kao oleinska) (%)	0,20	0,8
Udio vlage (%)	0,15	0,4
Udio netopljivih nečistoća (%)	0,24	0,05
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	194,46	184 – 196
Jodni broj (gl ₂ /100g)	79,98	75 - 94

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

Parametar kvalitete	Rezultat	Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina (maksimalne vrijednosti)
Peroksidni broj Pbr (mmol O ₂ /kg)	2,59	10
Slobodne masne kiseline (izraženih kao oleinska) (%)	0,17	0,8
Udio vlage (%)	0,12	0,4
Udio netopljivih nečistoća (%)	0,077	0,05
Saponifikacijski broj (mg KOH/g ulja)	191,19	184 – 196
Jodni broj (gl ₂ /100g)	80,27	75 - 94

Tablica 7 Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Arbequina

Masna kiselina	% masne kiseline	SD
C16:0	16,26	0,01
C16:1	1,23	0,00
C17:0	0,14	0,00
C17:1	0,27	0,00
C18:0	1,82	0,01
C18:1n9c+t	67,33	0,04
C18:2n6c	11,52	0,01
C18:3n3	0,61	0,01
C20:0	0,33	0,01
C20:1	0,24	0,01
C22:0	0,09	0,01
C24:0	0,19	0,01

Tablica 8 Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Picual

Masna kiselina	% masne kiseline	SD
C16:0	12,50	0,03
C16:1	0,93	0,00
C17:0	0,04	0,00
C17:1	0,07	0,00
C18:0	2,49	0,01
C18:1n9c+t	78,56	0,01
C18:2n6c	3,40	0,01
C18:3n3	0,73	0,00
C20:0	0,32	0,01
C20:1	0,21	0,00
C22:0	0,10	0,00
C24:0	0,67	0,00

Tablica 9 Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Royal

Masna kiselina	% masne kiseline	SD
C16:0	11,86	0,18
C16:1	0,82	0,02
C17:0	0,04	0,01
C17:1	0,06	0,00
C18:0	2,61	0,01
C18:1n9c+t	77,02	0,13
C18:2n6c	5,65	0,10
C18:3n3	0,87	0,01
C20:0	0,30	0,01
C20:1	0,24	0,00
C22:0	0,08	0,01
C24:0	0,48	0,03

Tablica 10 Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Arbequina sa i bez dodatka antioksidansa i sinergista, određena Oven testom na 63 °C

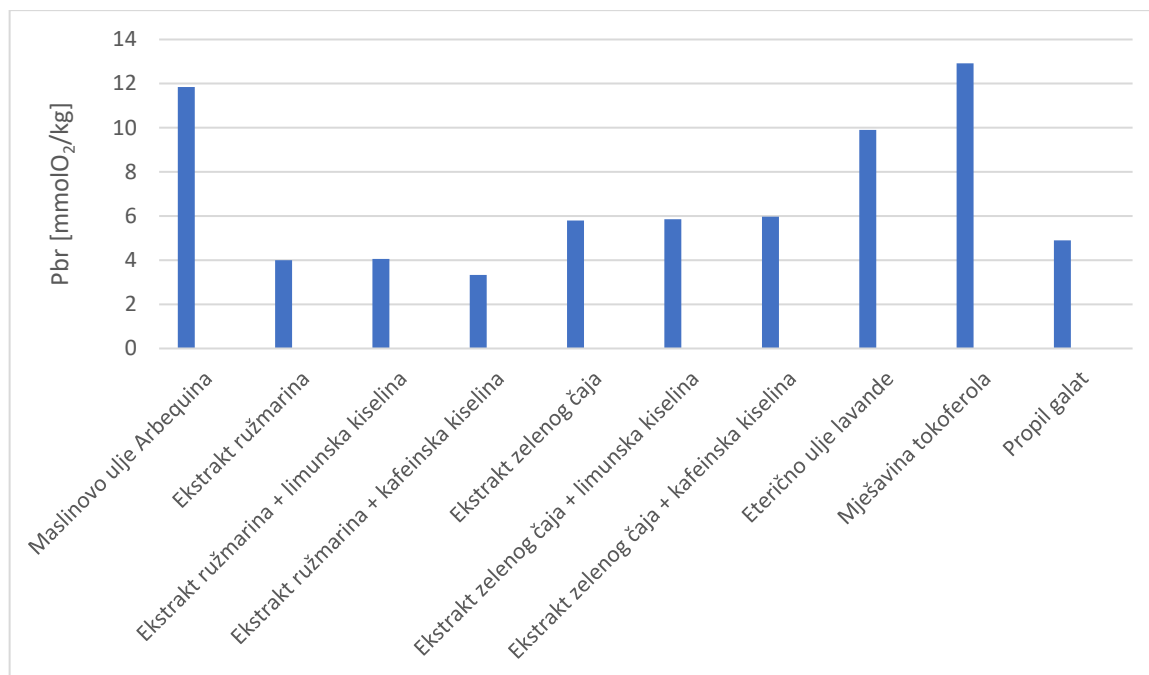
Uzorci	Koncentracija antioksidansa (%)	Peroksidni broj Pbr (mmolO ₂ /kg)										
		0. dan	1. dan	2. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan	10. dan	11. dan	14. dan
Maslinovo ulje sorte Arbequina	-		2,03	2,97	3,74	5,05	5,39	5,83	6,58	7,25	8,12	11,85
OxyLess CS	0,2		1,27	1,76	2,00	2,24	2,52	2,78	2,96	3,16	3,45	4,00
OxyLess CS + lim. kis.	0,2 + 0,01		1,49	1,73	2,26	2,48	2,78	2,86	3,00	3,03	3,20	4,06
OxyLess CS + kaf. kis.	0,2 + 0,01		1,48	1,72	1,99	2,00	2,26	2,50	2,75	2,93	3,00	3,33
Ekstrakt zelenog čaja	0,2		1,50	2,02	2,53	2,58	2,75	2,81	3,75	3,87	4,44	5,80
Ekstrakt zelenog čaja + lim. kis.	0,2 + 0,01	1,26	1,50	2,00	2,33	2,79	2,96	3,06	3,39	3,78	4,50	5,86
Ekstrakt zelenog čaja + kaf. kis.	0,2 + 0,01		1,29	1,75	2,25	2,40	2,79	2,93	3,23	3,69	4,59	5,97
Eterično ulje lavanda	0,2		1,50	2,21	3,47	4,00	5,00	5,51	7,05	8,03	8,38	9,90
Mješavina tokoferola	0,1		1,74	2,67	4,57	4,90	5,80	6,57	7,96	8,95	10,53	12,92
Propil galat	0,01		1,48	1,75	2,49	2,77	2,99	3,24	3,92	4,13	4,84	4,90

Tablica 11 Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Picual sa i bez dodatka antioksidansa i sinergista, određena Oven testom na 63 °C

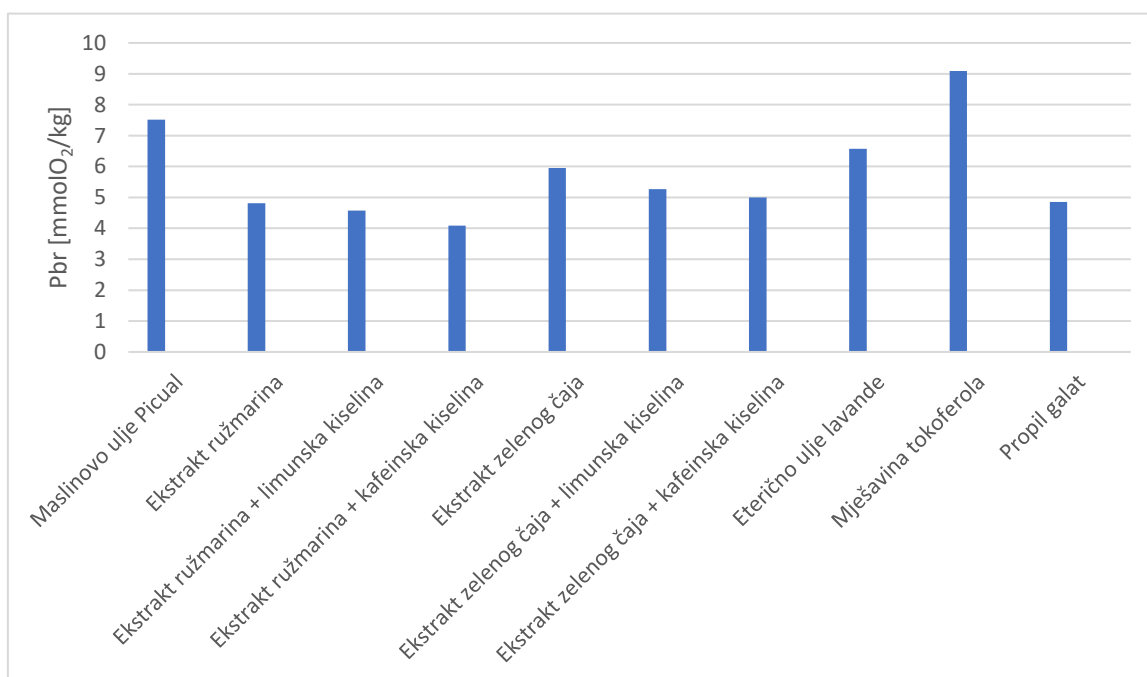
Uzorci	Koncentracija antioksidansa (%)	Peroksidni broj Pbr (mmolO ₂ /kg)											
		0. dan	1. dan	2. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan	10. dan	11. dan	14. dan	17. dan
Maslinovo sorte ulje Picual	-		1,97	2,52	3,00	3,40	4,23	4,50	4,78	5,03	5,64	6,84	7,52
OxyLess CS	0,2		1,78	1,98	2,04	2,24	2,51	2,56	2,82	3,72	4,05	4,46	4,81
OxyLess CS + lim. kis.	0,2 + 0,01		1,77	2,01	2,26	2,49	3,00	3,16	3,42	3,94	4,25	4,48	4,57
OxyLess CS + kaf. kis.	0,2 + 0,01		1,74	1,74	1,99	2,25	2,52	2,57	2,56	3,20	3,61	3,79	4,09
Ekstrakt zelenog čaja	0,2	1,74	1,75	1,97	2,52	2,70	3,21	3,22	3,96	4,42	5,18	5,74	5,95
Ekstrakt zelenog čaja + lim. kis.	0,2 + 0,01		1,96	2,00	1,97	2,26	2,52	3,00	2,46	4,07	4,46	5,05	5,27
Ekstrakt zelenog čaja + kaf. kis.	0,2 + 0,01		1,97	1,97	2,48	2,60	2,99	2,73	3,24	3,71	4,35	4,55	5,00
Eterično ulje lavande	0,2		1,74	1,80	2,99	3,22	3,52	4,00	4,23	4,59	4,81	5,91	6,57
Mješavina tokoferola	0,1		1,96	2,21	2,96	3,47	4,50	4,62	5,37	3,75	6,04	7,25	9,09
Propil galat	0,01		1,77	2,01	2,44	2,53	3,25	3,47	3,66	3,96	4,00	4,39	4,85

Tablica 12 Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Royal sa i bez dodatka antioksidansa i sinergista, određena Oven testom na 63 °C

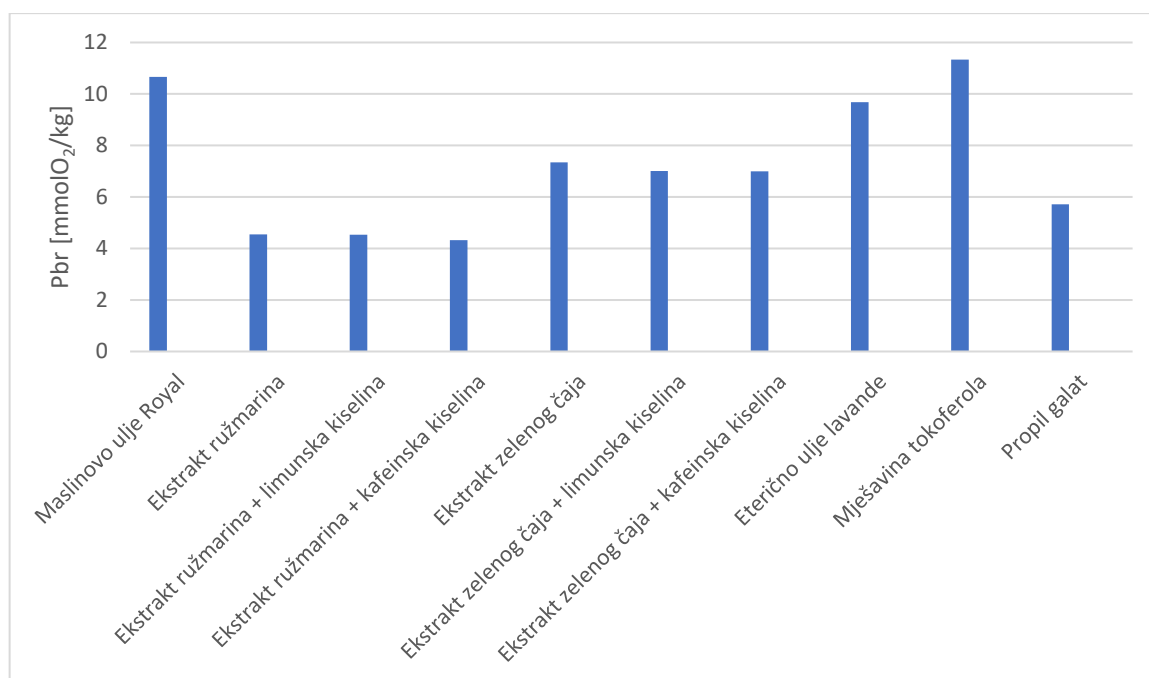
Uzorci	Konzentracija antioksidansa (%)	Peroksidni broj Pbr (mmolO ₂ /kg)								
		0. dan	1. dan	2. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan	10. dan
Maslinovo ulje Royal	-	2,59	3,80	4,46	7,75	8,12	8,29	8,80	9,86	10,66
OxyLess CS	0,2		3,30	3,75	4,06	4,23	4,55	4,46	4,50	4,55
OxyLess CS + lim. kis.	0,2 + 0,01		3,52	3,52	4,48	4,62	4,52	4,44	4,50	4,53
OxyLess CS + kaf. kis.	0,2 + 0,01		3,45	3,49	4,25	4,37	4,61	4,17	4,01	4,32
Ekstrakt zelenog čaja	0,2		3,52	3,98	4,98	5,18	5,97	6,13	7,15	7,34
Ekstrakt zelenog čaja + lim. kis.	0,2 + 0,01		3,81	4,02	4,57	4,80	5,31	5,64	6,80	7,01
Ekstrakt zelenog čaja + kaf. kis.	0,2 + 0,01		3,49	4,02	4,25	4,46	4,95	5,15	6,75	6,99
Eterično ulje lavande	0,2		4,19	4,68	6,68	6,97	7,75	8,04	9,43	9,68
Mješavina tokoferola	0,1		3,68	4,46	6,59	7,18	7,84	8,54	10,51	11,34
Propil galat	0,01		3,73	3,68	4,00	4,51	4,62	5,13	5,45	5,72



Slika 11 Grafički prikaz utjecaja različitih antioksidanasa i synergista na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte Arbequina nakon 14 dana provođenja Oven testa (63 °C)



Slika 12 Grafički prikaz utjecaja različitih antioksidanasa i synergista na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte Picual nakon 17 dana provođenja Oven testa (63 °C)



Slika 13 Grafički prikaz utjecaja različitih antioksidanasa i synergista na oksidacijsku stabilnost ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja sorte Royal nakon 10 dana provođenja Oven testa (63 °C)

5. RASPRAVA

U ovom radu provedeno je istraživanje sa ekstra djevičanskim maslinovim uljima španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal. Prije početka ispitivanja održivosti ili oksidacijske stabilnosti ovih ulja analitički su određeni osnovni parametri kvalitete i identifikacije ekstra djevičanskih maslinovih ulja: peroksidni broj (Pbr), slobodne masne kiseline (SMK), udio vlage, udio netopljivih nečistoća, saponifikacijski broj te jodni broj. Izračunate vrijednosti ovih parametara prikazane su u **Tablicama 4., 5. i 6.** uz njihove maksimalne dopuštene vrijednosti prema *Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina* (NN 7/2009). Osim udjela netopljivih nečistoća, dobivene vrijednosti, odnosno rezultati ispitivanja su u skladu s Pravilnikom. Udio netopljivih nečistoća iznosio je 0,19 % za Arbequinu, 0,24 % za Picual te 0,077 % za Royal, a maksimalna dopuštena vrijednost prema Pravilniku je 0,05 %. Udio krutih čestica (netopljivih nečistoća) može se smanjiti raznim tehnološkim operacijama poput filtracije, centrifugiranja i produženog taloženja te se stoga može zaključiti da su sva tri ulja dobre kvalitete. Jodni broj je iznosio 77,90 (g I₂/100 g ulja) za Arbequinu, 79,98 (g I₂/100 g ulja) za Picual te 80,27 (g I₂/100 g ulja) za Royal, što znači da su u skladu s dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku koja se kreće u rasponu od 75 do 94 (g I₂/100 g). Vrijednost jodnog broja je konstantna vrijednost za pojedina ulja. Ulje sorte Picual ima najveći udio oleinske kiseline (78,56 %), ali i najmanji udi linolne kiseline (3,40 %) u odnosu na ulja sorte Arbequina i Royal. Najveći udio zasićene palmitinske kiseline (16,26 %) ima ulje sorte Arbequina.

Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskih maslinovih ulja sorti Arbequina, Picual i Royal određen je separacijskom tehnikom plinske kromatografije te su rezultati prikazani u **Tablicama 7., 8. i 9.** Iz dobivenih vrijednosti je vidljivo da sve tri sorte ekstra djevičanskih maslinovih ulja imaju najveći udio oleinske kiseline (C18:1n9c+t)

U **Tablicama 10., 11. i 12.**, vidljivi su rezultati ispitivanja utjecaja dodatka prirodnih i sintetskih antioksidanasa i sinergista na promjenu održivosti (oksidacijske stabilnosti) ekstra djevičanskih maslinovih ulja španjolskih sorti. Oksidacijska stabilnost je određena Oven testom pri 63 °C tijekom 336 sati, odnosno 14 dana (Arbequina), 408 sati, odnosno 17 dana (Picual) te 240 sati, odnosno 10 dana (Royal). Vrijednost Pbr mjerena je svaka 24 sata (izuzevši vikende). Tri sorte ulja imale su različitu oksidacijsku stabilnost, odnosno održivost što se očituje u vrijednostima peroksidnog broja. Oksidacijski najstabilnijim se pokazalo maslinovo ulje Picual jer je vrijednost peroksidnog broja iznosila nakon 17. dana (240. sat) provođenja Oven testa 7,52 (mmolO₂/kg). Ta vrijednost peroksidnog broja bila je znatno manja od maksimalno dopuštene

koja iznosi 10 (mmolO₂/kg). Najslabije održivim uljem od ove tri sorte se pokazalo maslinovo ulje sorte Royal čiji je peroksidni broj kontrolnog nakon provođenja Oven testa (10. dan) premašio maksimalno dopuštenu vrijednost 10 (mmolO₂/kg). Što se tiče maslinovog ulja sorte Arbequina, pokazalo je dobru oksidacijsku stabilnost jer je peroksidni broj kontrolnog uzorka premašio maksimalno dopuštenu vrijednost tek 14. dana 11,85 (mmolO₂/kg). Maslinova ulja španjolskih sorti prema ovim vrijednostima pokazuju iznimno dobru otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Dodatkom pojedinih antioksidansa (i synergista) može se zaključiti da je Pbr u većini slučajeva niži u odnosu na kontrolni uzorak što ukazuje na to da dodani antioksidansi imaju određenu zaštitnu ulogu (usporavaju oksidacijsko kvarenje), odnosno povećavaju oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskih maslinovih ulja ispitivanih sorti.

Dodatkom kombinacije antioksidansa ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) i synergista kafeinska kiselina (0,01 %) postignuta je najveća efikasnost zaštite sve tri sorte ekstra djevičanskog maslinovih ulja od oksidacijskog kvarenja. Nakon 10 dana (240 sati) testa dobivena je znatno niža vrijednost Pbr 2,93 (mmol O₂/kg) za Arbequinu; 3,20 (mmolO₂/kg) za Picual te 4,32 (mmolO₂/kg) za Royal u odnosu na Pbr kontrolnih uzoraka ulja. Korištenjem ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) kao samostalnog antioksidansa te ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) u kombinaciji sa synergistom limunska kiselina (0,01 %), ostvarena je podjednaka, također iznimno jaka zaštita ulja od oksidacije. Malo lošija, ali i dalje prilično visoka otpornost španjolskih sorti ulja prema oksidacijskom kvarenju postignuta je dodatkom ekstrakta zelenog čaja kao samostalnog antioksidansa (0,2 %), ekstrakta zelenog čaja (0,2 %) u kombinaciji sa synergistom limunska kiselina (0,01 %), ekstrakta zelenog čaja (0,2 %) u kombinaciji sa synergistom kafeinska kiselina (0,01 %) te sintetskog propil galata (0,01 %) kao samostalnog antioksidansa. Najmanje antioksidacijsko djelovanje u ovim sortama maslinovih ulja pokazuje eterično ulje lavande (0,2 %). Kod ulja ispitivanih sorti maslina, dodatkom mješavine tokoferola (0,1 %) nakon cjelokupno provedenog vremena Oven testa dobivena je viša vrijednost Pbr u odnosu na Pbr kontrolnih uzoraka ulja. To znači da mješavina tokoferola kod koncentracije 0,1 % ne štiti ulje od oksidacijskog kvarenja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih određivanjem osnovnih parametara kvalitete i identifikacije ulja te ispitivanjem utjecaja dodataka pojedinih antioksidanasa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskih maslinovih ulja španjolskih sorti Arbequina, Picual i Royal u ovom diplomskom radu mogu se izvući sljedeći zaključci:

- Prema usporedbi rezultata osnovnih parametara kvalitete i identifikacije ulja s Pravilnikom o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009), utvrđeno je da su ekstra djevičanska maslinova ulja sorti Arbequina, Picual i Royal dobre kvalitete.
- Sastav masnih kiselina pokazuje da ulje sorte Picual ima veći udio oleinske kiseline, a manje linolne kiseline. Ulje sorte Arbequina ima veći udio zasićene palmitinske kiseline.
- Nakon provođenja Oven testa pri 63 °C u vremenskim razdobljima od 14 dana ili 336 sati (Arbequina), 17 dana ili 408 sati (Picual) te 10 dana ili 240 sati (Royal) utvrđeno je da ekstra djevičanska maslinova ulja Arbequina, Picual i Royal imaju dobru otpornost prema oksidacijskom kvarenju.
- Među tri ispitivane sorte ulja, najveću stabilnost prema oksidacijskom kvarenju pokazalo je maslinovo ulje sorte Picual, a najmanju stabilnost prema oksidacijskom kvarenju je pokazalo maslinovo ulje sorte Royal.
- Najveća efikasnost zaštite sve tri sorte maslinovih ulja od oksidacijskog kvarenja postignuta je dodatkom kombinacije antioksidansa ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) i sinergista kafeinska kiselina (0,01 %).
- Podjednaka, također iznimno jaka zaštita sve tri sorte maslinovih ulja od oksidacije je postignuta korištenjem ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) kao samostalnog antioksidansa te ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less®CS (0,2 %) u kombinaciji sa sinergistom limunska kiselina (0,01 %).
- Malo lošija, ali i dalje prilično visoka otpornost sve tri sorte ulja prema oksidacijskom kvarenju postignuta je dodatkom ekstrakta zelenog čaja kao samostalnog antioksidansa (0,2 %), ekstrakta zelenog čaja (0,2 %) u kombinaciji sa sinergistom limunska kiselina (0,01 %), ekstrakta zelenog čaja (0,2 %) u kombinaciji sa sinergistom kafeinska kiselina (0,01 %) te sintetskog antioksidansa propil galata (0,01 %) kao samostalnog antioksidansa.

- Najlošije antioksidacijsko djelovanje u ekstra djevičanskim maslinovim uljima Arbequina, Picual i Royal pokazuje eterično ulje lavande (0,2 %).
- Primjenom prirodnog antioksidansa mješavine tokoferola (0,1 %) nije se postigla zaštita ovih ekstra djevičanskih maslinovih ulja od oksidacijskog kvarenja.

7. LITERATURA

- Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM: Mediterranean Diet and Health: Biological Importance of Olive Oil. *Current Pharmaceutical Design* 7:933-950, 2001.
- Aluyor EO, Ori-Jesu M: The use of antioxidants in vegetable oils – A review. *African Journal of Biotechnology* 7:4836-4842, 2008.
- Assmann KE, Adjibade M, Hercberg S, Galan P, Kesse-Guyot E: Unsaturated Fatty Acid Intakes During Midlife Are Positively Associated with Later Cognitive Function in Older Adults with Modulating Effects of Antioxidant Supplementation. *Journal of Nutrition* 148:1938–1945, 2018.
- Barranco D, Rallo L: Olive Cultivars in Spain. *HortTechnology* 10:107-110, 2000.
- Boskou D, Blekas G, Tsimidou M: Olive Oil Composition. U *Olive Oil*. AOCS Press, Thessaloniki, 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
- Esteki M, Ahmadi P, Vander Heyden Y, Simal-Gandara J: Fatty Acids-Based Quality Index to Differentiate Worldwide Commercial Pistachio Cultivars. *Molecules* 24:58, 2018.
- Gunstone FD: Composition and properties of edible oils. U *Edible oil processing, second edition*. WileyBlackwell, Chennai, 2013.
- Gunstone FD: *The Chemistry of Oils and Fats*. Blackwell Publishing, UK, 2004.
- Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti*. HRN EN ISO 660:1996.
- Kantoci, D: Maslina – pregledni rad. *Glasnik zaštite bilja* 6:4-14, 2006.
- Kim J, Kim DN, Lee SH, Yoo SH, Lee S: Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chemistry* 118:398–402, 2010.
- Koprivnjak O: *Djevičansko maslinovo ulje*. MIH, Poreč, 2006.
- Liu Y, Yang Y, Hui HU, Liu H, Shi A, Liu L: Advance in flavor compounds analysis and flavor-enhancing technology of peanut oil. *China Oils Fats* 42:30–34, 2017.
- Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Fernandez-de Cordova ML, Dominguez-Vidal A, Ruiz-Medina A: Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry* 127:1257–1262, 2011.
- Miljević, D: *Proizvodnja maslinovog ulja. Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*, Narodne novine 11/19, 2019.

Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, Narodne novine 7/2009, 2009.

NN 81/08. Ministarstvo zdravstva o socijalne skrbi uz sukladnost ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Pravilnik o prehrambenim aditivima.

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

Puch F, Samsonvilleger S, Guyonnet D, Blachon JL, Rawlings AV, Lassel T: Consumption of functional fermented milk containing borage oil, green tea and vitamin E enhances skin barrier function. *Experimental Dermatology* 17:668–674, 2010.

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

Vossen, P: Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *HortScience* 42:1093-1100, 2007.

Wijerante SKS, Amarowicz R, Shahidi F: Antioxidant Activity of almonds and Their By-products in Food Model Systems. *Journal of the American Oil Chemists Society* 83, 2006.

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

Yi JY, Kim HJ, Chung MS: Manufacture of low-benzo(a)pyrene sesame seed (*Sesamum indicum* L. oil using a self-designed apparatus. *PLoS One* 12:3-20, 2017.

Zhang G, Weisheng XU, Liu J, Liu Y, Wang X: Application of flavor finger-printing technology in identification of vegetable oil. *China Oils Fats* 37:65–68, 2012.

Zhou Y, Zhao W, Lai Y, Zhang B, Zhang D: Edible Plant Oil: Global Status, Health Issues, and Perspectives. *Frontiers in Plant Science* 11:1315, 2020.

