

# Utjecaj dodatka antioksidanasa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ulja pistacije

---

Lijić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:109:649656>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

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

**Andrea Lijić**

***UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANASA I SINERGISTA NA  
OKSIDACIJSKU STABILNOST ULJA PISTACIJE***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj 2016.

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnologija ulja i masti  
**Tema rada** je prihvaćena na V. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 26. veljače 2016.  
**Mentor** izv. prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*  
**Pomoć pri izradi:** *Daniela Paulik*, kemijski tehničar

**UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANASA I SINERGISTA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST  
ULJA PISTACIJE**

*Andrea Lijić, 236-DI*

**Sažetak:** Pistacija je nutritivno bogat orašasti plod. Sadrži 40-63 % ulja te je pogodna sirovina za proizvodnju ulja. U ovom istraživanju određivana je oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja pistacije sa i bez dodatka prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista. Primjenom standardnih metoda, određeni su parametri kvalitete ulja: peroksidni broj, udio slobodnih masnih kiselina. Antioksidansi koji su korišteni u ovom radu su ekstrakti zelenog čaja, nara, ružmarina, eterično ulje rtanjskog čaja, propil galat te sinergisti askorbinska i limunska kiselina. Oksidacijska stabilnost ulja ispitana je primjenom Oven testa. Rezultati ispitivanja prikazani su vrijednostima peroksidnog broja tijekom 4 dana trajanja testa. Primjena ekstrakta ružmarina pokazuje bolju zaštitu ulja od oksidacije u odnosu na ekstrakt zelenog čaja i nara. Dodatkom eteričnog ulja rtanjskog čaja postignuta je najveća zaštita ulja pistacije prema oksidacijskom kvarenju. Korištenjem sinergista boljim se pokazala limunska kiselina u odnosu na aksomrbinsku kiselinu u kombinaciji sa prirodnim antioksidansom.

**Ključne riječi:** Ulje pistacije, oksidacijska stabilnost, antioksidanski, sinergisti

**Rad sadrži:** 52 stranica  
14 slika  
9 tablica  
34 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Vedran Slačanac         | Predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i> | član-mentor   |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>      | Član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Jurislav Babić</i>   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 6. travanj 2016.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Food Technologies**  
**Subdepartment of food engineering**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

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

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. V. held on February 26, 2016.

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

### THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS AND SYNERGISTS ADDITION ON OXIDATION STABILITY OF PISTACHIO OIL

*Andrea Lijić*, 236-DI

**Summary:** Pistachio is a nutritive rich nut. It contains 40-63% of oils and therefore it is suitable for oil production. In this research oxidation stability of cold pressed pistachio oil, with or without added natural and synthetic antioxidants and synergist, is examined.

With the application of standard methods, the oil quality parameters: peroxide number and free fat acids content were determined. Antioxidants used in this research were as follows: green tea extract, pomegranate extract, rosemary extract, essential oil of winter savory tea and propyl gallate. Synergists used in this research were ascorbic and citric acid. The oxidation stability of oil was tested using the Oven test. Test results are shown as a peroxide number value over the 4 days duration of the test. Extract of rosemary oil has better protection against oxidation as compared to the green tea extract and pomegranate. The most significant antioxidant effect is shown with addition of essential oil of winter savory tea. As a synergist better effect is shown by citric acid in regard to ascorbic acid in a combination with natural antioxidants.

**Key words:** Pistachio oil, oxidation stability, antioxidants, synergists

**Thesis contains:** 52 pages  
14 figures  
9 tables  
34 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

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

**Defense date:** 6.april 2016

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

*Zahvaljujem svim profesorima na prenesenom znanju tijekom školovanja, a najviše zahvaljujem mentoru izv. prof. dr.sc. Tihomiru Moslavcuna pomoći pri odabiru teme i savjetima kod izvođenja eksperimentalnog dijela, te na uputama tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem tehničarki Danieli Paulik na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima bez kojih studiranje nebi bilo toliko zabavno i zanimljivo.*

*Također se želim zahvaliti dečku Tomislavu što je uvijek bio uz mene, te na potpori, suosjećanju i ljubavi koje mi je pružio tijekom školovanja.*

*Zahvaljujem svojim sestrama Tamari i Martini što su mi uvijek bile potpora tijekom studiranja.*

*I na kraju najveću zaslugu za ovaj uspjeh pripisujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu za mene, zahvaljujem im se na svim odricanjima, savjetima i pruženoj ljubavitijekom školovanja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. JESTIVA BILJNA ULJA .....	4
2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA .....	10
2.2.1. Ulje pistacije .....	11
2.3. KARAKTERISTIKE BILJNIH ULJA .....	14
2.4. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA .....	16
2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi .....	16
2.4.2. Kemijski procesi .....	18
2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA .....	20
2.5.1. Antioksidansi .....	20
2.5.2. Sinergisti .....	25
2.5.3. Prooksidansi .....	26
2.6. ODREĐIVANJE STUPNJA OKSIDACIJE BILJNIH ULJA .....	26
2.7. OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA .....	29
2.7.1. Schaal-Oven test .....	30
2.7.2. Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method) .....	30
2.7.3. Rancimat test .....	30
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	32
3.1. ZADATAK .....	33
3.2. MATERIJALI I METODE .....	33
3.2.1. Materijali .....	33
3.2.2. Metode određivanje parametara kvalitete ulja .....	35
3.2.2.1. Priprema uzorka ulja za analizu .....	36
3.2.2.2. Određivanje oksidacijske stabilnosti .....	37
4. REZULTATI .....	32
5. RASPRAVA .....	44
6. ZAKLJUČCI .....	47
7. LITERATURA .....	49

## **Popis oznaka, kratica i simbola**

Abr – anisidinski broj

AI – antioksidacijski indeks

AK – askorbinska kiselina

ALA – alfa-linolenska kiselina

AOM – Active Oxygen Method

DHA – dokosaheksaenska kiselina

DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

EMK – esencijalne masne kiseline

EPA – eikosapentaenska kiselina

HCl – klorovodična kiselina

HDL – lipoproteini velike gustoće

HOO• - radikal vodikovog peroksida

KI – kalij jodid

KOH – kalijev hidroksid

LDL – lipoproteini male gustoće

LK – limunska kiselina

MO – mikroorganizmi

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – natrijev tiosulfat

NaOH – natrijev hidroksid

NMK – nezasićene masne kiseline

NN – netopljive nečistoće

Pbr – peroksidni broj

PF – zaštitni faktor

PUFA – polinezasićene masne kiseline

$R\bullet, RO\bullet$  - slobodni radikali

RH – masne kiseline

$ROO\bullet$  - radikal peroksida

ROOH – hidroperoksid

RR, ROOR – polimeri

SMK – slobodne masne kiseline

TFA – trans masne kiseline

ZMK –zasićene masne kiseline





## **1. UVOD**

Oksidacijska stabilnost ili održivost ulja je jedno od najvažnijih svojstava biljnih ulja. Predstavlja vrijeme kroz koje se biljna ulja mogu sačuvati od procesa autooksidacije, odnosno oksidacije nezasićenog lanca masne kiseline, što dovodi do užeglosti i kvarenja biljnih ulja, narušavanja njihove kvalitete i organoleptičkih svojstava. Poznavanje oksidacijske stabilnosti važno je kako bi se moglo unaprijed utvrditi vrijeme za koje se ulje može sačuvati od jače izražene autooksidacije te za određivanje roka uporabe.

Proces autooksidacije se ne može zaustaviti, ali se može usporiti dodatkom antioksidanasa koji mogu donirati vodikove atome slobodnim radikalima te ih tako konvertirati u stabilnije, neradikalne produkte. Poznati su brojni sintetski i prirodni antioksidansi, od čega se više preferiraju prirodni antioksidansi (Frega i sur., 1999.).

Proces autooksidacije biljnih ulja može se odvijati sporije ili brže, ovisno o sastavu biljnih ulja (sastav masnih kiselina), uvjeta skladištenja, prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju ili usporavaju ovu reakciju oksidacije (Martin-Polvillo, 2004).

Oksidacijskim kvarenjem ulja nastaje neugodan miris oksidiranih ulja što se pripisuje primarnim i sekundarnim produktima oksidacije koji u malim količinama narušavaju senzorska svojstva ulja (Broadbent i Pike, 2003; Rovellini, 1997).

Održivost ulja najčešće se određuje: Rancimat testom, AOM testom, Oven testom i Testom održivosti pri 98°C.

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama inhibiraju oksidaciju biljnih ulja i na taj način poboljšavaju oksidacijsku stabilnost ulja, a mogu se koristiti prirodni i sintetski antioksidansi.

Pistacija je bogat izvor ulja u kojem dominiraju polinezasićene (linolna i linolenska kiselina) te mononezasićene masne kiseline (oleinska). Pistacija se najviše uzgaja u Iranu, USA, Turskoj, Siriji i Kini.

U ovom diplomskom radu zadatak je bio ispitati utjecaj prirodnih i sintetskih antioksidanasa isinergista na oksidacijsku stabilnost ulja pistacije. Kao prirodne antioksidanse koristili smo ekstrakt ružmarina, ekstrakt nara, ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje rtanjskog čaja, a od sintetskih antioksidanasa propil galat; te sinergiste askorbinsku i limunsku kiselinu. Oksidacijsku stabilnost smo pratili tijekom 4 dana Schaal Oven testom.

## **2. TEORIJSKI DIO**

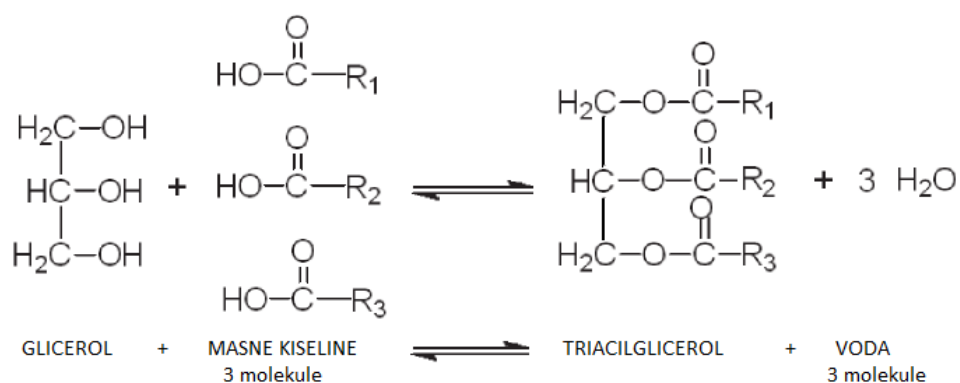
## 2.1. JESTIVA BILNA ULJA

Jestiva ulja i masti pripadaju grupi spojeva lipida. To su organske tvari različite kemijske strukture, netopljive u vodi, a topljive u organskim otapalima (dietil eter, heksan, benzin, kloroform, metanol). Predstavljaju estere trihidroksi alkohola glicerola i masnih kiselina te se najčešće nazivaju trigliceridi ili triacilgliceroli (Marcone, 2006.). Biljna ulja sadrže više nezasićenih masnih kiselina te su na sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju za razliku od masti (Mandić, 2003.).

Podjela lipida s obzirom na strukturu i sastav biljnog ulja:

- jednostavni lipidi
- složeni lipidi
- derivati lipida

**Jednostavni lipidi** obuhvaćaju triacilglicerole masnih kiselina (ulja i masti) te voskove koji predstavljaju estere viših masnih alkohola s višim masnim kiselinama. Ulja i masti (triacilgliceroli) su kondenzacijski proizvodi jedne molekule alkohola glicerola i triju molekula masnih kiselina (Swern, 1972.). Najčešće ih nalazimo u prirodi uz prisutnost manjih količina lipida iz drugih grupa.

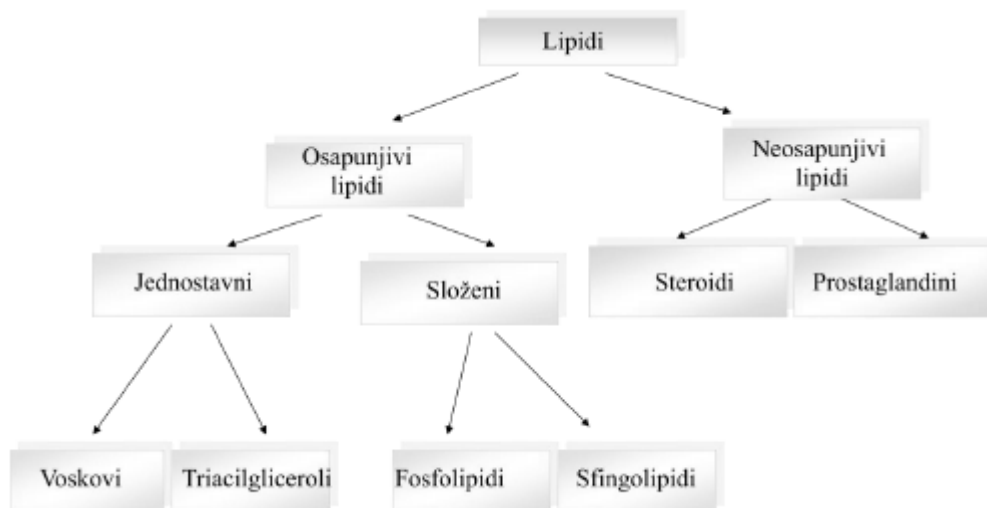


**Slika 1** Reakcija nastajanja triacilglicerola

**Složeni lipidi**, pored glicerola i masnih kiselina, sadrže još i negliceridne sastojke. Oni su pratitelji jednostavnih lipida, ali i lipidni sastojci u nekim dijelovima organizma. Često se

nazivaju i polarni lipidi. U konjugirane lipide spadaju fosfolipidi (sadrže fosfatnu skupinu i molekulu masti), cerebrozidi (sadrže ugljikohidrat i molekulu masti), sulfolipidi (sadrže sulfatnu grupu), lipoproteini i dr. Negliceridne sastojke prirodnih ulja čine fosfatidi, karoteni, liposolubilni vitamini (A, D, E, K), tokoferoli, steroli, pigmenti, voskovi, glikozidi, ugljikovodici, masni alkoholi, aldehidi, ketoni i tragovi metala. Poželjni negliceridni sastojci su vitamini topljivi u mastima i karoteni, dok su voskovi, tragovi metala i fosfatidi nepoželjni negliceridni sastojci u uljima jer smanjuju kvalitetu ulja i moraju se potpuno ukloniti tijekom procesa rafinacije ulja (Odak, 2013.).

**Derivati lipida** su spojevi dobiveni hidrolizom jednostavnih i složenih lipida. U derivate lipida ubrajaju se masne kiseline, alkoholi (steroli), ugljikovodici (karoteni), vitamin D, vitamin E, vitamin K. U ostale vrste lipida spadaju sapuni, pigmenti i boje, oksidacijski polimeri, termalni polimeri i lipoproteini (Odak, 2013.).



**Slika 2.** Klasifikacija lipida (<http://www.sraspopovic.com/Masti.ppt>)

U prirodnim uljima i mastima prevladavaju različite masne kiseline. Masne kiseline su slabe organske kiseline čija se molekula sastoji od dva različita dijela, ugljikovodikove grupe (R-) i karboksilne grupe (-COOH). Mogu imati razgranat i nerazgranat (ravan) lanac, a fizikalna svojstva im ovise o dužini lanca, stupnju nezasićenosti i razgranatosti lanca.

Masne kiseline se razlikuju po:

- broju ugljikovih atoma u molekuli,
- zasićenosti,

- broju dvostrukih veza,
- prostornom rasporedu kiselinskih ostataka oko nezasićene veze.

Obzirom na broj ugljikovih atoma razlikujemo:

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

Obzirom na stupanj nezasićenosti masne kiseline dijele se na:

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

**Zasićene masne kiseline (ZMK)** su masne kiseline koje u molekuli ne sadrže dvostruke veze između C atoma, a opća formula im je:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ . Kod zasićenih masnih kiselina radikal (R-) je jednostavan parafinski lanac u kojem je svaki C atom zasićen. Između C-atoma su prisutne samo jednostruke veze te zbog toga palmitinska i stearinska kiselina imaju oblik ravnog štapića.

Najvažnije svojstvo zasićenih masnih kiselina je da su slabo reaktivne za reakcije na lancu. U prirodnim uljima i mastima dolaze zasićene masne kiseline sa 4 do 22 C-atoma. Masne kiseline koje sadrže 24 i 26 C-atoma dolaze u voskovima, dok zasićene masne kiseline sa neparnim brojem C-atoma dolaze u tragovima u prirodnim mastima.

**Tablica 1** Najčešće zasićene masne kiseline

Broj C atoma:broj dvostrukih veza	Naziv masne kiseline	Formula
12:0	Laurinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Miristinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Palmitinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Stearinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$

**Nezasićene masne kiseline (NMK)** su masne kiseline koje u molekuli sadrže jednu ili više dvostrukih veza (-CH=CH-). Ovisno o broju dvostrukih veza dijele se na mononezasićene (jedna dvostruka veza) i polinezasićene (više dvostrukih veza). U biljnim uljima i životinjskim mastima najčešće se pojavljuju sa 18 C-atoma te s jednom, dvije ili tri dvostruke veze (**Tablica 2**). Najčešće prisutna mononezasićena masna kiselina u ulju je oleinska kiselina koja se nalazi u većem udjelu u maslinovom, repičinom te visokooleinskom suncokretovom ulju. Manje je podložna oksidaciji od polinezasićenih masnih kiselina (Rade i Škevin, 2004.). Reaktivnost nezasićenih masnih kiselina ovisi o broju i položaju dvostrukih veza, stoga je važno poznavanje stupnja nezasićenosti i položaja dvostrukih veza u molekuli masne kiseline.

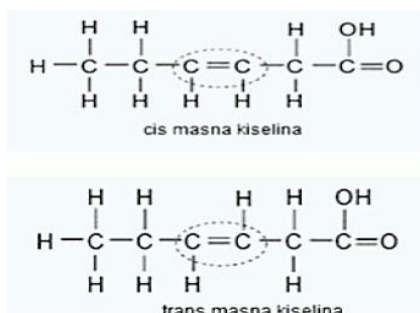
**Tablica 2** Najčešće nezasićene masne kiseline

Broj C atoma:broj dvostrukih veza	Naziv masne kiseline	Formula
16:1	Palmitoleinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Oleinska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:3	Linolenska	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
18:2	Linolna	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

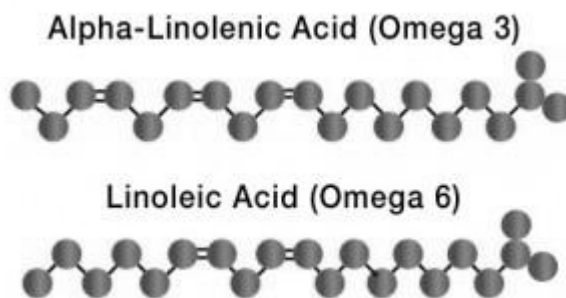


*Cis* konfiguracija znači da su dva atoma vodika na istoj strani dvostruke veze. Krutost dvostruke veze zadržava svoje oblikovanje, a „*cis*“ forma izomera uzrokuje da se lanac presavija i ograničava oblikovnu slobodu masne kiseline. Što je više dvostrukih veza u *cis* obliku, to je manja savitljivost lanca. Ukoliko lanac ima više *cis* veza, postaje izrazito zakrivljen u svim mogućim oblicima. Oleinska kiselina, koja ima jednu dvostruku vezu ima manji pregib u lancu od linolne kiseline s dvije dvostruke veze, dok linolenska kiselina, koja ima tri dvostruke veze je posve savinuta u obliku kuke. Posljedica svega ovoga je da u ograničenom okruženju, kao kada su masne kiseline dio fosfolipida u lipidnoj dvostrukoj ovojnici ili triglicerida u kapljici lipida, „*cis*“ veza ograničava sposobnost masne kiseline da se uskladišti u manjem prostoru te na taj način utječe na točku vrelišta membrane ili masnoće.

*Trans* konfiguracija je konfiguracija koja ima suprotne karakteristike od *cis* konfiguracije. To znači da su dva susjedna atoma vodika vezana na suprotnim stranama dvostruke veze. Rezultat toga je da ne oblikuje lanac koji je ispresavijan, nego je oblik sličan ravnom lancu kao što je kod zasićenih masnih kiselina. U prirodi se nezasićene masne kiseline pojavljuju smao u „*cis*“ formi. „*Trans*“ oblik isključivo nastaje utjecajem čovjeka i njegove namjere da prerađuje masnoće (npr. hidrogenacijom). Razlike u geometriji između „*cis*“ i „*trans*“ oblika nezasićenih masnih kiselina, te između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina igraju vrlo značajnu ulogu u biološkim procesima (u ljudskom tijelu) i u izgradnji bioloških struktura (izgradnja stanične membrane). Dok kod zasićenih masnih kiselina ne postoje dvostruke veze, dotle je položaj dvostruke veze kod nezasićenih masnih kiselina bitan za svojstva istih. Zbog toga govorimo o početku i kraju lanca tih kiselina. Početak je mjesto gdje se nalazi karboksilna skupina (-COOH), dok je kraj mjesto na lancu gdje se nalaze vezana tri atoma vodika na atomu ugljika (CH<sub>3</sub>-). Kraj lanca se naziva omega (ω), te prema mjestu dvostruke veze od tog kraja govorimo o ω-3, ω-6 ili ω-9 masnim kiselinama.



**Slika 3** cis i trans masna kiselina



**Slika 4** Omega 3 i omega 6 masne kiseline

**Esencijalne masne kiseline (EMK)(Tablica 3)** su polinezasićene masne kiseline koje imaju 18,20 i 22 ugljikova atoma i dvije do šest dvostrukih veza u cis konfiguraciji u lancu masne kiseline. Masne kiseline sa više dvostrukih veza ubrajaju se u esencijalne sastojke hrane. Esencijalne su sve one masne kiseline koje su prijeko potrebne za zdravlje i život, a u organizmu se ne mogu sintetizirati već se moraju u dovoljnoj količini unositi prehranom.

Računajući dvostruku skupinu od metilnog kraja, višestruko nezasićene masne kiseline dijelimo na omega-3 i omega-6 skupinu (ili n-3 i n-6 skupinu) (**Slika 4**). Omega-3 skupini pripada linolenska kiselina i njezini derivati: ikosapentaenska (C20:5 ili IPA), eikosapentaenska (EPA) i dokosaheksaenska (C22:6 ili DHA). Omega-6 skupini pripada i arahidonska kiselina koju organizam može sam sintetizirati iz linolne.

Alfa-linolenska kiselina je tip omega-3 masnih kiselina koja se nalazi u biljkama. Slična je eikosapentaenskoj (EPA) i dokosaheksaenskoj (DHA) omega-3 masnoj kiselini koje se nalaze u ribljem ulju i u njih se u tijelu može konvertirati. Za omega-3 masne kiseline dokazano je da smanjuju upale i mogu pomoći u prevenciji kroničnih bolesti.

**Tablica 3** najčešće esencijalne masne kiseline

Broj C atoma: broj dvostrukih veza	Naziv masne kiseline	Formula
18:2	Linolna	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$
18:3	Linolenska	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$
20:4	Arahidonska	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$

## 2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA

U svijetu se za proizvodnju biljnih ulja upotrebljava više od 20 vrsta biljaka, no samo 12 ima veći ekonomski značaj. Osnovna podjela ulja prema porijeklu sirovine može biti na ulja iz mesnatog dijela ploda i na ulja iz sjemena. Također, imamo i podjelu na osnovu većinskog udjela masnih kiselina te na osnovu porijekla sjemena.

### 1. Ulja i masti iz mesnatog dijela ploda:

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

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

- laurinske masti i ulja (palmine koštice, kokos...),
- masti palmitinske i stearinske kiseline (kakao maslac, shea maslac...),
- ulja palmitinske kiseline (pamukovo ulje, palmino ulje...),
- ulja oleinske i linolne kiseline (suncokretovo, sezamovo, šafranika, kukuruzne klice, koštice buče, repica...),
- ulje linolenske kiseline (lan, soja, konoplja, Camelina sativa...).

### 3. Ulja prema porijeklu biljke:

- ulja iz leguminoza (kikiriki, soja...),
- ulja krstašica (repica, slačica-senf) (Bockisch, 1998.).

### 4. Podjela ulja prema tehnološkom postupku proizvodnje (NN 41/12):

- rafinirana ulja

- hladno prešana ulja
- nerafinirana ulja

**Rafinirana ulja** su proizvodi dobiveni postupkom rafinacije jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja, a na tržište se stavljaju pod nazivima:

1. »Ulje« za ulja dobivena postupkom rafinacije jedne vrste sirovih biljnih ulja;
2. »Biljno ulje« za ulja dobivena postupkom rafinacije jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja

Proces rafinacije sirovog ulja obuhvaća postupke deguminacije, neutralizacije, bijeljenja, vinterizacije i dezodorizacije prilikom kojih dolazi do smanjenja udjela prirodnih antioksidanasa (tokoferola), smanjenja karotena, lecitina i sterola te do mogućeg onečišćenja ulja teškim metalima koji ubrzavaju oksidaciju, a samim time dolazi do smanjenja stabilnosti ulja.

**Hladno prešana ulja** su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C. Nakon postupka prešanja može se provesti i postupak čišćenja te bistrenja ulja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem. Potrebno je osigurati da ulje nakon prešanja zadrži svoja prirodna svojstva, da ima što manje nepoželjnih sastojaka te da je ulje dobre kvalitete, ugodnog mirisa i okusa karakterističnog za sirovinu (Moslavac, 2013.).

**Nerafinirana ulja** su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima (prešanje) uz upotrebu topline. Može se provesti i postupak čišćenja, odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.

### **2.2.1. Ulje pistacije**

Pistacija (*Pistachia vera L.*) je jedna od najvažnijih vrsta orašastih plodova u svijetu. Pistacija se najviše uzgaja u zemljama Srednjeg Istoka (Iran, Sirija), u dijelovima Mediterana (Italija, Grčka, Turska), u SAD-u, te u Kini.

Plodovi pistacije su bogat izvor nutrijenata (proteina, prehrambenih vlakana...), minerala (mangana, fosfora, magnezija), vitamina (vitamini B6, tiamin, folata, vitamin A). Konzumacija

jezgre pistacije dobro djeluje na organizam čovjeka tako što između ostaloga pomaže u regulaciji lošeg LDL kolesterola, regulaciji težine, kontroli dijabetesa i dr.. Plodovi pistacije su bogati uljem te sadrže lipide u količini od 40 do 63 % (Arena i sur., 2013).

Triacilgliceroli u ulju pistacije bogati su polinezasićenim masnim kisleinama (linolna i linolenska kiselina), esencijalnim za ljudski organizam, te mononezasićenim masnim kisleinama (oleinska kiselina) (Arena i sur., 2013).

U **Tablicama 4-7** prikazan je kemijski sastav jezgre pistacije.

**Tablica 4** Kemijski sastav pisacije( 100 g) (USDA,2016)

Komponenta	Mjerna jedinica	Vrijednost u 100 g
Voda	g	54,37
Energija	kcal	560
Proteini	g	20,16
Ukupne masnoće	g	45,32
Ugljikohidrati	g	27,17
Prehrambena vlakna	g	10,6

**Tablica 5** Udio minerala ( 100 g) (USDA, 2016)

Mineral	Mjerna jedinica	Vrijednost u 100 g
Kalcij, Ca	mg	105
Željezo, Fe	mg	3,92
Magnezij, Mg	mg	121
Fosfor, P	mg	490
Kalij, K	mg	1025
Natrij, Na	mg	1
Cink, Zn	mg	2,20

**Tablica 6** Udio vitamina ( 100 g) (USDA,2016)

Vitamin	Mjerna jedinica	Vrijednost u 100 g
Vitamin C (askorbinska kiselina)	mg	5,6
Tiamin	mg	0,870
Riboflavin, vitamin B2	mg	0,160
Niacin, vitamin B3	mg	1,300
Vitamin B-12	µg	0,00
Vitamin A	IU	516
Vitamin E (alfa tokoferol)	mg	2,86

**Tablica 7** Udio lipida (100 g) (USDA,2016)

Lipidi	Mjerna jedinica	Vrijednost u 100 g
Zasićene masne kiseline	g	5,907
Mononezasićene masne kiseline	g	23,257
Polinezasićene masne kiseline	g	14,380

Na **slici 5** prikazan je plod pistacije(jezgra i ljuska)



**Slika 5** Pistacija

## **2.3. KARAKTERISTIKE BILJNIH ULJA**

Sve vrste biljnih ulja imaju određene fizikalne i kemijske karakteristike koje proizlaze iz sastava ulja. Cilj tih fizikalnih i kemijskih karakteristika je identifikacija masit ili ulja zbog njegove potencijalne daljnje primjene.

### **a.) Kemijske karakteristike**

Kemijske karakteristike koje se koriste za identifikaciju ulja su:

- saponifikacijski broj;
- jodni broj;
- tiocijanogeni broj;
- hidroksilni broj;
- neosapunjive tvari (Moslavac, 2013).

**Saponifikacijski broj(SV)** predstavlja mg KOH potrebne za osapunjenje 1 g ulja i masti (AOAC 920.160.1999). Ulja i masti koja sadrže niže molekularne masne kiseline imaju veći saponifikacijski broj i obrnuto.

**Jodni broj(IV)** pokazuje količinu joda (g) koji se veže na 100 g masti (AOAC 920.185.1999).

Budući da se jod veže na dvostruke veze masnih kiselina iz vrijednosti jodnog broja dobiva se podatak o stupnju nezasićenosti ulja i masti. Ovisno o tome razlikuju se tri grupe ulja :

- ulja niskog jodnog broja – do 100 g I<sub>2</sub>/100 g;
- ulja srednjeg jodnog broja – 100-400 g I<sub>2</sub>/100 g;
- ulja visokog jodnog broja iznad 140 g I<sub>2</sub>/100 g .

Neosapunjive tvari podrazumijevaju one negliceridne komponente ulja i masti koje se ne saponificiraju alkalnim hidroksidima. Sve vrste ulja i masti sadrže određenu količinu neosapunjivih tvari (0,8% - 1,3%). Također je važna karakteristika za identifikaciju ulja (Moslavac, 2013).

### **b.) Fizikalne karakteristike**

Fizikalne karakteristike masti i ulja ovise prvenstveno od sastava triglicerida. U uljima dolazi veliki broj različitih triglicerida, a fizikalna svojstva određuju oni trigliceridi kojih ima najviše. Sukladno tome, kada u sastavu prevladavaju trigliceridi sa nezasićenim masnim kiselinama, tada su to ulja tekuća pri sobnoj temperaturi, a ako prevladavaju trigliceridi u kojima je najviše zasićenih masnih kiselina, tada su to čvrste masti na sobnoj temperaturi. Određivanje fizikalnih karakteristika bitno je za vođenje i praćenje nekih tehnoloških procesa u industriji ulja, kao što su hidrogenacija, interesterifikacija, frakcioniranje, proizvodnja margarina.

Fizikalne karakteristike ulja i masti su:

- volumna (zapreminska) masa;
- kristalna struktura čvrstih masti;
- topljenje i skrućivanje masti;
- konzistencija masti;
- bistroća

**Volumna masa** (kg/m<sup>3</sup>) je vrijednost karakteristična za pojedina ulja i masti na koju utječe sastav masti i to prvenstveno stupanj nezasićenosti. Vrijednost volumne mase za ulja i masti najčešće se kreće 0,915 kg/m<sup>3</sup>-0,940 kg/m<sup>3</sup>.



**Točka topljenja masti** je temperatura kod koje neka masna kiselina ili mast prelazi iz čvrstog u tekuće stanje. Točka topljenja zasićenih masnih kiselina raste porastom broja atoma ugljika u molekuli, a uvođenjem nezasićene veze snižava se točka topljenja.

**Točka skrućivanja ili očvršćivanja** je temperatura kod koje neka mast prelazi iz tekućeg u čvrsto stanje. Tekuća mast se hladi i prati se pad temperature.

## **2.4. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA**

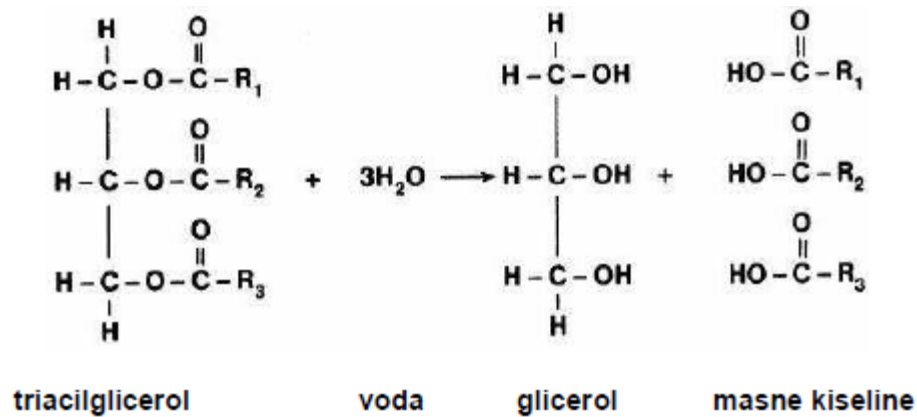
Jestiva biljna ulja vrlo brzo podliježu nepoželjnim promjenama te zbog toga imaju ograničenu trajnost. Procesi koji dovode do kvarenja ulja su kemijski, enzimski i mikrobiološki. Oni uzrokuju kvarenja koja ovise o vrsti, kvaliteti i uvjetima čuvanja ulja. Posljedice navedenih promjena su nastanak spojeva koji narušavaju organoleptička svojstva i smanjuju nutritivnu vrijednost ulja gubitkom biološki aktivnih tvari (esencijalne masne kiseline, provitaminski, vitamini i dr.) i nastankom štetnih tvari (peroksidi i polimeri). Prema uzroku kvarenja ulja, procesi kvarenja se dijele na enzimske i mikrobiološke te kemijske (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Posljedica kvarenja su razgradni produkti (posebno isparljivi karbonilni spojevi i niže molekularne masne kiseline) koji ulju daju neugodan okus i miris. Neki razgradni produkti mogu biti i štetni za zdravlje (peroksidi, polimeri, malondialdehidi) pa se takve masti koriste u tehničke svrhe (Čorbo, 2008.).

### **2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi**

#### **Hidrolitička razgradnja**

Hidrolitička razgradnja u biljnim uljima je proces oslobađanja masnih kiselina iz molekule triglicerida, uz prisutnost vode i enzima lipaze (**Slika 6**)



Slika 6 Hidrolitička razgradnja triacilglicerola

Pri tome nastaju jedna, dvije ili tri molekule masnih kiselina i glicerola, a posljedica je povećanje udjela slobodnih masnih kiselina (Rade, Mokrovčak, Štrucelj, 2001.), te porast kiselosti ulja.

Lipolitički enzimi inaktiviraju se na temperaturama nižim od 20°C i višim od 80°C pa se tako zaustavlja hidrolitička razgradnja. Ova razgradnja nastaje prvenstveno u ulju unutar sjemenke, ali i u izdvojenom ulju, ako je u dodiru s vodom i ako se čuva u neprikladnim uvjetima. Posljedica je povećanje udjela slobodnih masnih kiselina u ulju i nastajanje novih proizvoda razgradnje (mono- i digliceridi, glicerol). U hladno prešanim uljima dozvoljen je udio SMK maksimalno 2% izražen kao % oleinske kiseline (NN 41/12).

### β-ketooksidacija

Ova vrsta kvarenja spada u mikrobiološke procese kvarenja masti i ulja djelovanjem plijesni iz grupa *Aspergillus* i *Penicillium*, te bakterija grupe *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*.

Zasićene masne kiseline su relativno inertne i na njih kisik djeluje samo pri vrlo oštrim uvjetima ili biološkom katalizom. U normalnim uvjetima rijetko dolazi do β-oksidacije masti i ulja, a kada dođe do toga uzrokuju je mikroorganizmi (MO) i enzimi kada masti nisu čiste, ili su dio neke namirnice koja uz masti sadrži vodu i druge tvari koje su hranjivi supstrat mikroorganizmima. MO u prisustvu kisika napadaju ZMK i to metilensku grupu u β-položaju. Postoje dva produkta β-oksidacije:

- primarni- β-keto kiseline i

- sekundarni-metil ketoni (Rade, Mokrovčak, Štrucelj, 2001.).

Posljedica ovog kvarenja su neugodan miris i okus (miris užeglosti), te mogu nastati žuti, crveni i plavozeleni pigmenti koji uzrokuju obojenje masti (Čorbo, 2008.).

Ova vrsta kvarenja sprječava se postupcima sprječavanja rasta i razvoja mikroorganizama koji uključuju pasterizaciju, sterilizaciju, promjenu pH sredine ( $\leq 5$ ), dodatkom antioksidanasa i konzervansa.

### 2.4.2. Kemijski procesi

U kemijske procese kvarenja biljnih ulja pripada:

- autooksidacija,
- termooksidacijske promjene i
- reverzija.

#### a.) Autooksidacija

Autooksidacija je vrsta kvarenja biljnih ulja kod koje se kisik veže na nezasićene (dvostruke) veze masnih kiselina.

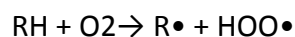
Autooksidacija, prvenstveno polinezasićenih masnih kiselina, odvija se kod izlaganja svjetlu, kisiku i ionima metala. Također, oksidaciju kataliziraju i enzimi poput lipoksigenaze.

Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu znatno su otpornije na oksidaciju nego polinezasićene masne kiseline (Klapec, 2014.).

Tri glavna koraka lipidne oksidacije su :

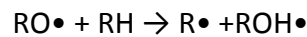
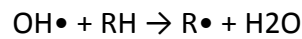
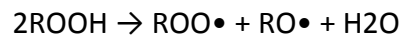
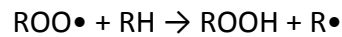
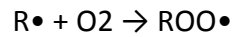
#### 1. Inicijacija

Kisik iz zraka djeluje na nezasićene masne kiseline, na metilnim skupinama dolazi do homolitičkog cijepanja i izdvaja se vodik i nastaje alkil radikal masne kiselina. Nastanak nestabilnog slobodnog radikala masne kiselina može se dogoditi uz energiju elektromagnetskog zračenja ili katalizatore poput iona metala (Klapec, 2014.).



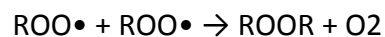
## 2. Propagacija

Slobodni radikal masne kiseline reagira s molekularnim kisikom i nastaje peroksidni radikal masne kiseline i hidroperoksidi. Nastali hidroperoksidi se mogu fragmentirati u slobodne radikale, npr. u prisustvu iona metala (Klapec, 2014.) jer su nestabilni.



## 3. Terminacija

Nastanak neradikalnih produkata (alkohola, aldehida, ketona, ugljikovodika, polimera, itd.) međusobnom reakcijom slobodnih radikala ili djelovanjem antioksidanasa (Klapec, 2014.).



Hidroperoksidi su primarni produkti autooksidacije, a sekundarni produkti nastaju razgradnjom hidroperoksida. To su aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline i drugi spojevi (Odak, 2013.). Najveći dio razgradnih produkata daju ulju neugodan miris i okus po užglosti, što umanjuje kakvoću ulja. Reakcija oksidacije lančano se nastavlja, sve dok slobodni radikali ne reagiraju međusobno, stvarajući neaktivne i stabilne polimere (Ročak, 2005 ; Shahidi, 2005)

### b.) Termooksidacijske promjene ulja i masti

Pri višim temperaturama (iznad 150 °C) oksidacija ulja se naglo ubrzava. Nakon određenog vremena zagrijavanja ulja osim produkata oksidacije (hidroperoksidi i njihovi razgradni produkti) dolazi do nastanka produkata termooksidacije: cikličke masne kiseline, dimeri i

polimeri masnih kiselina i triglicerida, oksipolimeri i ostali hlapljivi i nehlapljivi spojevi. Do sada je identificirano preko 400 spojeva (Odak, 2013.).

Prženjem hrane (170 i 180 °C) u ulju dolazi do fizikalnih i kemijskih promjena. Zagrijavanjem ulja dolazi do porasta viskoznosti, indeksa refrakcije i specifične težine, porasta udjela slobodnih masnih kiselina, broja osapunjenja, porasta peroksidnog broja i smanjenja jodnog broja.

Za utvrđivanje kvalitete ulja tijekom prženja, preporučuje se određivanje jodnog broja. Sniženje jodnog broja (za 5%) je znak da se biljno ulje više ne može koristiti za prženje hrane (Odak, 2013.).

### **c.) Reverzija**

Reverzija je pojava kod koje biljno ulje, nakon kraćeg vremena čuvanja, poprima neugodan miris i okus po sirovini ili ribi.

Da bi se usporila reverzija primjenjuje se djelomična hidrogenacija ulja, kako bi se uklonila linolenska kiselina, ili se dodaju aditivi koji povećavaju održivost ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

## **2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA**

Oksidacijska stabilnost masti i ulja može se definirati kao vrijeme za koje se masti i ulja mogu sačuvati od oksidacijskih promjena. Važniji čimbenici koji utječu na stabilnost ulja su: sastav ulja, kvaliteta ulja, uvjeti čuvanja, vrsta ambalaže i dr. U ulja se često dodaju aditivi u malim količinama radi održavanja stabilnosti ulja. Za ulja i masti najznačajniji aditivi spadaju u skupinu antioksidanasa upravo zbog podložnosti masti i ulja oksidacijskim promjenama.

### **2.5.1. Antioksidansi**

Antioksidansi (**Slika 7**) su skupina različitih reducirajućih spojeva koji igraju važnu ulogu zaštite od štetnog djelovanja slobodnih radikala, sprječavaju proces oksidacijskog kvarenja ulja i produžuju stabilnost ulja. Dva su izvora antioksidanasa: prvi je naš organizam, koji je

sposoban proizvesti antioksidanse uz pomoć vitamina i minerala, a drugi, vanjski izvor antioksidanasa, hrana (Yanishlieva i Marinova, 2001). Budući da je autooksidacija autokatalitički proces važno je dodati antioksidans što je moguće prije u ulje nakon proizvodnje. S obzirom na koju od navedenih faza djeluju antioksidansi se mogu podijeliti na primarne i sekundarne, te prema tome jesu li prirodni ili sintetski. Djelovanje nekog antioksidansa može se izraziti pomoću stabilizacijskog (zaštitnog) faktora (PF) koji pokazuje koliko se puta poveća održivost ulja dodatkom antioksidansa.

$$\text{Zaštitni faktor (PF)} = \text{IP}_x / \text{IP}_k$$

$\text{IP}_x$  – induksijski period uzorka ulja sa dodatkom antioksidansa (h)

$\text{IP}_k$  – induksijski period uzorka ulja bez dodanog antioksidansa (h)

Vrijeme indukcije, odnosno induksijski period je broj sati koji je potreban da ulje dostigne peroksidni broj od 5 mmolO<sub>2</sub>/kg (Yanishlieva i Marinova, 2001).

### **Mehanizam djelovanja**

Antioksidansi sprječavaju tj. usporavaju oksidaciju ulja kroz dvije reakcije. Prva reakcija je inaktivacija slobodnih radikala gdje antioksidans daje vodik koji se veže na slobodni radikal peroksida (ROO·) ili radikal masne kiseline (R·). Druga reakcija je hvatanje slobodnih radikala gdje se slobodni radikal antioksidansa (A·) veže na slobodni radikal (R· i ROO·). Antioksidansi vežu slobodne radikale i tako usporavaju proces autooksidacije ulja. Antioksidansi se moraju dodati ulju niskog peroksidnog broja (< 1). Ukoliko se antioksidans doda u ulje u kojem je oksidacija već počela, neće doći do sprječavanja procesa oksidacije jer su već stvoreni hidroperoksidi koji djeluju kao katalizatori autooksidacije. Koliko će antioksidans dugo djelovati ovisi o vrsti antioksidansa, koncentraciji u kojoj je dodan, vrsti ulja i uvjetima čuvanja (Bandoniene i sur., 2000).

Mehanizam se objašnjava preko ove dvije reakcije:

1) Inaktivacija slobodnih radikala



2) Hvatanje slobodnih radikala



AH = amini ili fenoli (antioksidans)

A = polinezasićeni spojevi kao što je β- karoten

Neki antioksidansi mogu spriječiti dva ili više niza ponavljanja propagacije jer produkti koji se prvi formiraju iz antioksidansa još uvijek imaju antioksidacijsku aktivnost (Gunstone, 2004).

### **Vrste antioksidanasa**

Prema podrijetlu antioksidansi se mogu podijeliti na: **primarne i sekundarne**, te prema tome jesu li **prirodni ili sintetski**.

Prirodni antioksidansi, osim sa zdravstvenog stajališta, imaju prednost u tome što su topljivi u uljima i vodi, što olakšava njihovu primjenu u prehrambenim proizvodima (Mandić, 2007). U primarne antioksidanse se ubrajaju: fenoli, galati, hidrokvinoni, BHA (butil hidroksianisol), BHT (butil hidroksitoluen), tokoferoli, flavonoidi, askorbati, ekstrakti biljaka i začina, antioksidansi nastali procesiranjem (Eskin i Przybylski, 2001). Sekundarni antioksidansi uklanjaju metalne ione (pretežno željezo i bakar). Metalni ioni potpomažu fazu indukcije u procesu autooksidacije. U sekundarne antioksidanse ubrajaju se limunska kiselina, etilendiamin tetra-octena kisleina (EDTA), fosforna kiselina i određene amino kiseline. Oni se često koriste zajedno s primarnim antioksidansima (Gunstone, 2004).

#### **a) Sintetski antioksidansi**

Sintetski antioksidansi su jeftiniji od prirodnih, lako su dostupni i primjenjivi, ali je generalno prihvaćeno da prirodni antioksidansi imaju snažnije, efikasnije i zdravstveno sigurnije djelovanje nego sintetski. Koriste se za stabilizaciju masti, ulja i hrane koja sadrži lipide. U Hrvatskoj je upotreba aditiva, antioksidanasa regulirana Pravilnikom o prehrambenim aditivima NN 81/2008. Umjetni antioksidansi fenolnog tipa su u para supstituciji (*p*-), koja se preferira zbog njihove manje toksičnosti, dok su prirodni fenolni sastojci uglavnom u orto supstituciji (*o*-). Sintetski fenolni antioksidansi su uvijek supstituirani s alkil skupinama kako bi poboljšali njihovu topljivost u mastima i uljima te reducirali njihovu toksičnost (Shahidi, 2005).

**Butil hidroksianisol (BHA – E320)** – Inhibira oksidacijske promjene na mastima i uljima, uzrokovane djelovanjem kisika na masne kiseline. Često se upotrebljava u kombinaciji s galatima (E310, E311, E312), TBHQ (E319) i BHT (E321), jer se njihovi učinci međusobno

pojačavaju. Proizvodi se kemijskom sintezom iz *p*-metoksifenola i izobutilena, dobre je topljivosti u mastima te stabilan u prženim i pečenim proizvodima. Pokazuje bolju učinkovitost u životinjskim mastima nego u biljnim uljima. Djeluje sinergistički sa butiliranim hidroksitoluenom i propil galatom.

**Butil hidroksitoluen (E-321)** – Inhibira oksidacijske promjene na mastima i uljima, uzrokovane djelovanjem kisika na lance masnih kiselina. Često se koristi u kombinaciji s galatima (E310, E311, E312), TBHQ (E319) i BHA (E320), jer se njihovi učinci međusobno pojačavaju. Proizvodi se kemijskom sintezom iz *p*-krezola i izobutilena uz sumpornu kiselinu kao katalizator. Usporava oksidaciju životinjskih masti, nije topljiv u propilen glikolu koji se najčešće koristi kao otapalo za antioksidanse. Djeluje sinergistički sa BHA, ali ne i sa propil galatom, a može se koristiti do maksimalne koncentracije 200 ppm.

**Propil galat (PG-E310)** – je propilni ester galne kiseline koja je prirodni biljni fenolni spoj. Esteri galne kiseline najčešće se primjenjuju za stabilizaciju biljnih i životinjskih masti jer sprječavaju njihovu oksidaciju. Često se kombiniraju s TBHQ (E319), BHA (E320) i BHT (E321), jer se njihovi učinci međusobno pojačavaju. Manje je topljiv od BHA i BHT. Obično ne podnosi kuhanje, jer se razgrađuje na 148 °C, ipak, učinkovit je kada se koristi sa BHA i može se koristiti do maksimalno 100 ppm.

**Tercijarni butilhidrokinon (TBHQ-E319)** – Proizvodi se kemijskom sintezom, često se kombinira s BHA (E320). Učinkovito stabilizira nezasićena biljna ulja i mnoge masti životinjskog podrijetla. Najčešće se koristi kod transporta i skladištenja ulja, a tijekom dezodorizacije se kompletno uklanja. Vrlo je učinkovit u biljnim uljima, dobre je topljivosti i stabilan je na visokim temperaturama.

#### **b) Prirodni antioksidansi**

Od prirodnih antioksidanasa najpoznatiji su **tokoferoli**. Sprječavaju autooksidaciju ulja – vezanje kisika iz zraka na nezasićene veze u lancu masne kiseline. Količina tokoferola kod iste vrste ulja može imati znatna odstupanja, što najčešće ovisi o kakvoći sjemenke, načinu prerade i čuvanja ulja. Tokoferoli lako oksidiraju i prelaze u tokokinone pa je značajno da se



odgovarajućim tehnološkim postupcima onemogućuje oksidacijski procesi. *Vitamin E* je kemijski spoj kojeg nazivamo  $\alpha$ -tokoferol. U prirodi postoji 8 tokoferola (alfa, beta, gama, delta, epsilon, eta i zeta), a od svih navedenih najbolje vitaminsko djelovanje ima  $\alpha$ -tokoferol (najveća nutritivna i biološka vrijednost). Tokoferoli i tokotrienoli su najpoznatiji i najčešće korišteni prirodni antioksidansi koji su široko rasprostranjeni samo u biljnim proizvodima. Nalaze se u većim količinama u pšeničnim klicama, sojinom zrnu, biljnim uljima, oraščićima, šparogama, lisnatom povrću, špinatu, cjelovitim žitaricama i žumanjku jajeta. Tokoferoli i tokotrienoli se dijele na izomerne oblike  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ , ovisno o njihovoj strukturi. Tokotrienoli u odnosu na tokoferole imaju jače antioksidacijsko djelovanje. Antioksidacijska aktivnost tokoferola ovisi o temperaturi i to redoslijedom  $\delta$ - >  $\gamma$ - >  $\beta$ - >  $\alpha$ - tokoferol (Shahidi i Zhong, 2005).

***Vitamin C*** odnosno askorbinska kiselina djeluje kao sinergist sa tokoferolom te funkcionira i kao antioksidans kada se oksidacija odvija u lipidnoj domeni. Vitamin C je topljiv u vodi, ali se može koristiti kao askorbil palmitat u lipid topljivom obliku (Gunstone, 2004).

***Lecitin*** je prirodni fosfolipid (fosfatidilkolin), ima veliku površinsku aktivnost, a komercijalno se proizvodi iz soje te suncokreta i žumanjka jajeta). Vrlo je higroskopan i osjetljiv na hidrolitička i oksidacijska kvarenja. Lecitin u kombinaciji s drugim antioksidansima djeluje kao sinergist. Najbolja je kombinacija lecitina sa askorbil palmitatom i tokoferolom (Rade i sur., 2001).

***Ekstrakt zelenog čaja*** – U zelenom čaju su prisutni polifenoli koji su građeni uglavnom od katehina koji ima antioksidacijska svojstva. Najvažniji katehini zelenog čaja su (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), (-)-epigalokatehin (EGC), (-)-epikatehin-3-galat (ECG), (-)-epikatehin (EC), (+)-galokatehin i (+)-katehin.

***Ekstrakt ružmarina*** sadrži visoki udio spojeva koji imaju djelovanje antioksidanasa i niski udio esencijalnog ulja i klorofila. Ružmarin je iz tog razloga najbolji izvor antioksidanasa, posebno onaj proizveden iz organskog uzgoja. Organski proizveden ružmarin sadrži određene spojeve koji pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost kao što je karnosolna kiselina, karnosol i ružmarinska kiselina (Gunstone, 2004). Ekstrakt ružmarina pokazuje bolju

antioksidacijsku aktivnost u odnosu na  $\alpha$ -tokoferol, askorbil palmitat i limunsku kiselinu, a s njima u kombinaciji (limunska kiselina), naročito sa askorbil palmitatom pokazuje povećanje antioksidacijskog utjecaja.



**Slika 7** Antioksidansi

### 2.5.2. Sinergisti

Sinergisti su kemijske tvari koje same nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali produžuju trajnost i djelotvornost primarnih antioksidanasa. Sinergizam je moguć kod tvari koje imaju različit mehanizam djelovanja i takav sustav ima znatno jače antioksidacijsko djelovanje nego što bi antioksidansi imali pojedinačno. Sinergisti se još nazivaju i sekundarnim antioksidansima, jer nemaju mogućnost izravnog prevođenja slobodnih radikala u stabilne molekule nego djeluju posredno i tako usporavaju oksidaciju. Sinergisti se najčešće dodaju na kraju procesa dezodorizacije. Ova skupina kemijskih tvari obuhvaća sulfite, askorbinsku kiselinu, eritorbinsku kiselinu, polifosfate, vinsku kiselinu, limunsku kiselinu, lecitin, nitrati, aminokiseline, cink, selen, flavonoide te karotenoide (Eskin i Pryzbylski, 2001).

#### Mehanizam djelovanja sinergista

Sinergisti vežu tragove metala, inaktiviraju ih i sprječavaju njihovo prooksidacijsko djelovanje. Vodikov atom daju antioksidansu i na taj način regeneriraju i produžavaju vrijeme njegovog trajanja. Sprječavaju djelovanje antioksidansa na razgradnju peroksida tako što se sinergist veže sa radikalom antioksidansa i na taj način zaustavlja njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006).

### 2.5.3. Prooksidansi

Prooksidansi su tvari koje potiču oksidaciju biljnih ulja. Uključuju prethodno formirane hidroperokside i tragove metala (posebno bakar i željezo) od kojih svi potiču lančanu reakciju autooksidacije (Frankel, 1998.).

U najčešće prooksidanse ubrajamo svjetlost, kisik, visoku temperaturu i neke pigmente. Kod povišene temperature se ubrzava proces autooksidacije ulja i razgradnja hidroperoksida. Nastanak produkata autooksidacije je spor kod niskih temperatura skladištenja ulja i masti.

Svjetlost nižih valnih duljina (UV) ima štetniji učinak od svjetlosti viših valnih duljina (vidljivo svjetlo). Zbog utjecaja svjetlosti važna je ambalaža u koju se ulje pakira. Prozirna plastika ubrzava autooksidaciju ulja. Da bi se to spriječilo može se u takvu plastiku dodati UV apsorber, koji onda poboljšava oksidacijsku stabilnost tako pakiranog ulja.

Oksidacijska stabilnost ulja također je ovisna o koncentraciji otopljenog kisika u ulju. Da bi se spriječilo otapanje kisika u ulju, treba paziti da je zračni prostor iznad ulja što manji.

Jestiva biljna ulja u sebi sadrže u tragovima slobodne masne kiseline koje su podložnije autooksidaciji od esterificiranih masnih kiselina, pa one djeluju kao prooksidansi u jestivim uljima. Ioni tranzicijskih metala (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni) se također nalaze u uljima, a imaju snažno prooksidacijsko djelovanje.

Klorofil i njegovi razgradni produkti uz prisutnost svjetla djeluju prooksidativno, dok u mraku djeluju kao antioksidansi (Klapec, 2014.).

Ulje je potrebno pravilno pakirati i skladištiti da bi se izbjegao utjecaj prooksidanasa i spriječilo kvarenje biljnog ulja.

## 2.6. ODREĐIVANJE STUPNJA OKSIDACIJE BILJNIH ULJA

Za određivanje oksidacije masti i ulja potrebno je primjeniti više metoda koje zajedno daju vrijednost primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja. Razlikujemo 3 vrste metoda:

**a) Organoleptičke (senzorske) metode**

**b) Kemijske metode**

**c) Fizikalne metode**

**a) Senzorske metode**

Senzorsko ocjenjivanje stupnja oksidacije ulja i masti temelji se na određivanju pojave neprijatnog, užeglog mirisa i okusa ulja koji su uzrokovani nastankom sekundarnih produkata oksidacije pri čemu daju neugodan, užegnut miris i okus čak i u vrlo malim koncentracijama (oko 10-6 ppm). Organoleptičko (senzorsko) ocjenjivanje biljnih ulja vrlo je važan pokazatelj oksidacijskog stanja ulja u svim laboratorijima gdje se provode analize ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

**b) Kemijske metode*****Peroksidni broj (Pbr)***

Peroksidni broj označava razinu primarne oksidacije masnih kiselina i on pokazuje količinu hidroperoksida kao primarnih produkata autooksidacije masti i ulja, izražene u mmolO<sub>2</sub>/kg. Vrijednost peroksidnog broja je usko povezana s načinom čuvanja ulja. Oksidacija masti i ulja je jedna od osnovnih reakcija koja utječe na njihovu zdravstvenu ispravnost, jer produkti reakcije oksidacije utječu na zdravlje potrošača. Kao glavni početni produkti autooksidacije, peroksidi se mogu odrediti na osnovi sposobnosti da iz KJ u ledenoj octenoj kiselini oslobađaju jod. Peroksidni broj masti ili ulja mjerilo je sadržaja reaktivnog kisika u masti, a izražava se u milimolima peroksida ili milimolima kisika na 1 kg masti ili ulja.

Peroksidi, tj. hidroperoksidi su primarni produkti oksidacije ulja. Peroksidnim brojem dobiva se uvid u sadržaj hidroperoksida (Gunstone, 2004.). Za određivanje peroksidnog broja, osim jodometrijske metode, može se koristiti i kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidaciji željeza (II) u željezo (III) i mjerenjem intenziteta nastalog obojenja. Za biljna, rafinirana ulja smatra se da su dobre kvalitete ako peroksidni broj ne prelazi 5 mmolO<sub>2</sub>/kg, dok je za hladno prešena i nerafinirana jestiva ulja dozvoljen peroksidni broj do 7 mmolO<sub>2</sub>/kg (NN 41/12). Na kraju procesa dezodorizacije peroksidni broj rafiniranih ulja treba biti 0 mmolO<sub>2</sub>/kg kako bi se ulje moglo što duže čuvati i skladištiti (Gunstone, 2004.).

***Anisidinski broj (Abr)***

Anisidinski broj biljnih ulja određuje se standardnom metodom (ISO 6885). Određivanje anisidinskog broja temelji se na reakciji p- anidina sa višim nezasićenim aldehidima (2,4-

dienil i 2-enal) u kiselom mediju (octenoj kiselini), pri čemu nastaju Schiff-ove baze. Anisidinski broj pokazuje količinu sekundarnih produkata oksidacije (Dimić i Turkulov, 2000; Rade i sur., 2001). Određivanje anisidinskog broja često se koristi za ispitivanje kvalitete sirovih i jestivih ulja te omogućuje potpuniju procjenu ulja (Shahidi, 2005). Ulje dobre kvalitete trebalo bi imati anisidinski broj manji od 10 (Dimić i Turkulov, 2000).

### ***Tiobarbiturni broj (TB)***

Test tiobarbiturne kiseline mjeri količinu malonaldehida, sekundarnog produkta oksidacije ulja, nastalog tijekom oksidacije lipida. Tiobarbiturna kiselina reagira sa nastalim malonaldehidom koji se formirao tijekom oksidacijskog cijepanja višestruko nezasićenih masnih kiselina. Prilikom te reakcije stvara se crvena boja, čiji se intenzitet očitava na 532 nm ili žuta boja čiji se intenzitet očitava na 450 nm. Na taj se način određuje tiobarbiturni broj (Pike, 1998; Rade i sur., 2001).

### ***Totox broj***

Peroksidni broj (Pbr) u kombinaciji sa anisidinskim brojem (Abr) koristi se za određivanje ukupne oksidacijske vrijednosti (OV) biljnih ulja ili Totox broj (ISO 6885:2006). Rezultat Totox broja izračunava se prema sljedećem izrazu:

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

Totox broj ili oksidacijska vrijednost ulja smatra se vrlo korisnim pokazateljem kvalitete i oksidacijske stabilnosti ulja, jer se preko anisidinskog broja dobije podatak o oksidacijskoj prošlosti ulja, a preko peroksidnog broja dobije se podatak o trenutnom oksidacijskom stanju ulja.

## **c) Fizikalne metode**

### **Apsorpcija u UV dijelu spektra**

Produkti oksidacije polinezasićenih masnih kiselina pokazuju karakterističan spektar u ultraljubičastom području. Hidroperoksidi linolne kiseline i konjugirani dieni, kao primarni produkti oksidacije pokazuju apsorpcijski maksimum na 232 nm. Sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni) kao i konjugirani trieni, pokazuju apsorpcijski max na 270 nm.

Odnos ove dvije vrijednosti apsorbancije, izražen kao R-vrijednost je dobar izvor podataka za procjenjivanje oksidacijske kvalitete ulja.

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

- apsorbancija na 232 nm A270 nm

- apsorbancija na 270 nm

Ulje je lošije kvalitete što je R - vrijednost niža, jer sadrži više konjugiranih triena i sekundarnih produkata oksidacije. Procjenjivanje stupnja oksidacije na osnovu R-vrijednosti moguće je samo kod sirovih ulja jer kod rafiniranih ulja tijekom procesa dekoloracije djelovanjem aktivne zemlje nastaju konjugirani trieni koji nisu rezultat oksidacijskih promjena (Dimić i Turkulov, 2000.).

### **Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija se sve više koristi za određivanje oksidacijskih promjena na nezasićenim masnim kiselinama. Ona se može uspješno koristiti za praćenje oksidacije čistih ulja i masti, dok u kompleksnim lipidnim sustavima (hrana) identifikacija je otežana. Plinska kromatografija se koristi za određivanje hlapljivih spojeva (najčešće aldehida) koji nastaju oksidacijskom razgradnjom ulja i masti (Rade i sur., 2001.).

### **Indeks refrakcije**

Oksidacijske promjene ulja se mogu pratiti i promjenom indeksa refrakcije jer konjugirani dieni hidroperoksida i polimeri povećavaju indeks refrakcije (Rade i sur., 2001.).

## **2.7. OKSIDACIJSKA STABILNOST BILJNIH ULJA**

Oksidacijska stabilnost ili održivost biljnih ulja predstavlja vrijeme kroz koje se mogu sačuvati od procesa autooksidacije. Poznavanje održivosti veoma je važno, kako bi se unaprijed odredilo vrijeme tijekom kojeg se proizvodi mogu čuvati bez vidljivih promjena kvalitete. Poznavanje održivosti važno je i u definiranju roka trajanja ulja. Određivanje održivosti treba provesti oprezno i odgovorno zato što u uljima mogu biti prisutne komponente koje smanjuju održivost (slobodne masne kiseline, ioni metala i dr.) i komponente koje produžuju

održivost (tokoferoli, karotenoidi, fenolne skupine i dr.). Održivost najviše ovisi o vrsti ulja, odnosno o sastavu masnih kiselina zato što se polinezasićene masne kiseline oksidiraju puno brže nego mononezasićene i zasićene masne kiseline.

Metode koje se primjenjuju za određivanje održivosti zasnivaju se na ubrzanoj oksidaciji ulja pod utjecajem jednog ili više čimbenika koji ubrzavaju proces. U praksi su najveću primjenu našle metode kod kojih se proces oksidacije ubrzava djelovanjem topline ili provjetravanjem. Ne postoji jedinstvena metoda pomoću koje bi se mogli dobiti ukupni podatci o oksidacijskim promjenama ulja. Zbog toga se koristi više metoda koje daju ukupne podatke, odnosno sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije. Za određivanje održivosti ulja najveću primjenu imaju sljedeće metode : Schaal-Oven test (Oven test), Swift test ili AOM test (Active Oxygen Method) i Rancimat test.

### **2.7.1. Schaal-Oven test**

Ovo je jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda za određivanje održivosti ulja i masti. Uzorci se drže u sušioniku ili termostatu pri temperaturi od 60°C ili 63 °C i prati se porast peroksidnog broja.

Rezultat se izražava kao:

- vrijeme u danima za koje peroksidni broj dostigne određenu vrijednost,
- vrijednost peroksidnog broja nakon određenog vremena,
- vrijeme u danima za koje se utvrdi pojava užeglosti putem senzorskih ispitivanja.

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

Metoda uključuje ravnomjerno upuhivanje zraka kroz uzorak ulja koji se održava na temperaturi 97,8°C dok mu vrijednost peroksidnog broja ne dosegne razinu na kojoj počinje biti vidljivo kvarenje. Ta razina je različita za svaku vrstu ulja. Održivost kvalitetnog ulja poslije 8 sati AOM metode mora imati peroksidni broj manji od 5 mmolO<sub>2</sub>/kg.

### **2.7.3. Rancimat test**

Rancimat test se temelji na ubrzanom kvarenju masti i ulja kod konstantne temperature (100°C, 110°C, 120°C) i konstantnog protoka zraka. Prva faza oksidacije se određuje prema

povećanju udjela mravlje i drugih nižemolekularnih hlapljivih kiselina, koji su produkti oksidacije. One se uvode u destiliranu vodu kojoj se mijenjaju svojstva elektroprovodljivosti, što uređaj detektira i registrira, prateći tijek oksidacije. Vrijeme induksijskog perioda (IP) određeno na ovaj način označava se kao indeks održivosti ulja i masti pri određenoj temperaturi. Indukcijski period pokazuje koliko je biljno ulje otporno prema oksidaciji, što je period duži (u satima), oksidacijska stabilnost odnosno održivost ulja je bolja (Čorbo, 2008.).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati oksidacijsku stabilnost (održivost) hladno prešanog ulja pistacije, te ispitati utjecaj dodatka pojedinog antioksidansa i sinergista na promjene u stabilnosti ulja pistacije. Održivost hladno prešanog ulja pistacije određena je primjenom Oven testa i praćenjem promjene vrijednosti peroksidnog broja uzorka čistog hladno prešanog ulja pistacije i uzoraka s dodanim antioksidansima (prirodnim i sintetskim) i sinergistima tijekom 4 dana trajanja testa pri 63°C.

Određivanje početnih kemijskih karakteristika (osnovni parametri kvalitete SMK, Pbr) ispitivanog ulja pistacije provedeno je primjenom standardnih metoda.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Materijali

##### Ulje pistacije

Ulje pistacije (**Slika 8**), hladno prešano ulje, dobiveno od blago prženih jezgri pistacije, proizvedeno u Francuskoj i SAD-u, a punjeno u Njemačkoj (Deluxe, 250 mL), uvoznik Lidl Hrvatska d.o.o.



**Slika 8** Ulje pistacije

## **Antioksidansi**

### **Ekstrakt zelenog čaja**

Ekstrakt zelenog čaja (*Camelia sinensis L.*), prirodni ekstrakt, dobiven iz listova zelenog čaja, proizvođač firma Naturex, Francuska, vodeća svjetska organizacija u proizvodnji prirodnih sastojaka za prehrambenu industriju.

### **Ekstrakt ružmarina tip Oxy'Less CS**

Ekstrakt ružmarina tip Oxy'Less CS (*Rosmarinus officinalis L.*), prirodni ekstrakt, dobiven iz listova ružmarina. Proizvođač firma Naturex, Francuska, vodeća svjetska organizacija u proizvodnji prirodnih sastojaka za prehrambenu industriju.

### **Ekstrakt nara**

Ekstrakt nara (*Punica granatum L.*), prirodni ekstrakt, maltodekstrin, dobiven iz voća nara. Proizvođač firma Naturex, Francuska, vodeća svjetska organizacija u proizvodnji prirodnih sastojaka za prehrambenu industriju.

### **Propil galat**

Propil galat (E310), sintetski antioksidans. Propil galat je propilni ester galne kiseline koja je prirodni biljni fenolni spoj. Često se kombiniraju s TBHQ (E319), BHA (E320) i BHT (E321) jer se njihovi antioksidacijski učinci međusobno pojačavaju.

### **Eterično ulje rtanjskog čaja**

Eterično ulje rtanjskog čaja (*Satureja montana L.*), biljka iz porodice *Lamiaceae*, dobiva se iz listova biljke vrijesak ili planinski čubar. Koristi se u vidu čaja i praha, koji se koristi kao začim za jela.

## **Sinergisti**

### **Askorbinska kiselina**

Askorbinska kiselina (Acidum ascorbicum- Vitamin C), vitamin topljiv u vodi, proizvođač Kemig d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

## Limunska kiselina

Limunska kiselina monohidrat ( $C_6H_8O_7$ ), bijela je kristalna tvar topljiva kisela okusa, lako topljiva u vodi. Proizvođač T.T.T d.o.o., Sveta nedjelja, Hrvatska.

### 3.2.2. Metode određivanje parametara kvalitete ulja

$m$  = masa uzorka ispitivanog ulja (g)

#### Peroksidni broj (Pbr)

Peroksidni broj (Pbr) je pokazatelj stupnja oksidacijskog kvarenja biljnih ulja. Određivanje peroksidnog broja je jedna od najviše primjenjivanih metoda za ispitivanje primarnih produkata oksidacije biljnih ulja. Peroksidni broj (Pbr) ispitivanih biljnih ulja određen je standardnom metodom (ISO: 3960:1998). Rezultat je izražen kao mmol aktivnog kisika koji potječe iz nastalih peroksida prisutnih u 1 kg ulja ( $mmolO_2/kg$ ). Vrijednost peroksidnog broja (Pbr) izračunava se prema sljedećoj jednadžbi:

$$Pbr (mmolO_2/kg) = (V_1 - V_0) * 5 / m$$

$V_1$  = volumen otopine natrij-tiosulfata ( $c(Na_2S_2O_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ ) utrošen za titraciju uzorka ulja (mL)

$V_0$  = volumen otopine natrij-tiosulfata ( $c(Na_2S_2O_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ ) utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

$m$  = masa uzorka ulja (g)

#### Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Masti i ulja, osim masnih kiselina koje su vezane u trigliceridima, sadrže i određenu količinu slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline nastaju kao produkti hidrolitičke razgradnje triglicerida i njihov udio ovisi od načina dobivanja ulja, o upotrebljenim sirovinama i uvjetima čuvanja, te se može izraziti kao:

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

Navedene vrijednosti mogu se dobiti istim postupkom određivanja i mogu se preračunati jedna u drugu. Najčešće se udio SMK izražava kao %SMK (oleinska kiselina).

Slobodne masne kiseline u uzorcima biljnih ulja su određivane primjenom standardne metode prema normi HRN EN ISO 660:1996 pod nazivom - Određivanje kiselinskog broja i kiselost.

Metoda se zasniva na principu titracije ulja, otopljenog u otapalu, sa otopinom natrij hidroksida,  $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$ . Izvagan uzorak ulja prelije se s neutralnom smjesom etera i etanola te promućka. Zatim se doda nekoliko kapi otopine fenolftaleina i titrira sa 0,1M otopinom NaOH do promjene boje.

Udio slobodnih masnih kiselina je izražen kao %SMK izražene kao oleinska kiselina, a računa se prema formuli:

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

gdje je:

V – utrošak otopine natrijevog hidroksida za titraciju uzorka (mL);

c – koncentracija otopine natrijevog hidroksida utrošenog za titraciju (0,1 mol/L);

M – molekularna masa oleinske kiseline [282 g/mol];

m – masa uzorka ulja (g).

### 3.2.2.1 Priprema uzorka ulja za analizu

Prije početka ispitivanja oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja pistacije odrede se osnovni parametri kvalitete kao što je udio slobodnih masnih kiselina i vrijednost peroksidnog broja. Uzorci se pripremaju na način da se izvaže po 30 g ulja u svaku staklenu čašu i dodaju pojedinačno antioksidansi u točno određenim koncentracijama, te promješa staklenim štapićem. Uzorci se zatim zagriju na temperaturu 70°C do 80°C (**slika 9**) i na toj temperaturi se miješaju 30 minuta kako bi se antioksidans otopio, a zatim se uzorci ohlade na sobnu temperaturu. Uzorci u čašama prekriju se satnim stakalcem i stavljaju u sušionik (Binder) (**slika 10**) čime započinje ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja sa i bez dodanih antioksidanasa.



**Slika 9** Zagrijavanje uzoraka ulja pistacije  
( dodatak antioksidanasa)

### **3.2.2.2. Određivanje oksidacijske stabilnosti**

#### **Oven test**

Oven test proveden je na čistom uzorku hladno prešanog ulja pistacije, te na uzorcima ulja pistacije kojima su dodani pojedini antioksidansi (prirodni i sintetski) te sinergisti. Pripremljeni uzorci ulja zagrijavani su u sušioniku (Binder) pri temperaturi 63°C uz praćenje peroksidnog broja tijekom 4 dana. Uzokovanje ulja provodi se svakih 24 sata kako bi se odredio peroksidni broj. Prije uzorkovanja uzorci se moraju dobro homogenizirati staklenim štapićem. Nakon homogeniziranja se u pripremljene čašice odlije 3 do 5 g ulja, a uzorci s uljem se vrata u Binder (**Slika 10**). Kada se temperatura izuzetog ulja spusti na sobnu temperaturu određuje se peroksidni broj.

Rezultati Oven testa prikazani su kao vrijednost peroksidnog broja (mmol O<sub>2</sub>/kg) nakon određenog vremena stajanja u termostatu pri temperaturi 63°C odnosno tijekom 4 dana trajanja testa.



**Slika 10** Termostat (binder)





## **4. REZULTATI**



**Tablica 8** Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja pistacije

	Ulje pistacije
Pbr (mmolO <sub>2</sub> /kg)	1,50
SMK (% oleinske kiseline)	0,33

SMK-slobodne masne kiseline, izražene kao % oleinske kiseline

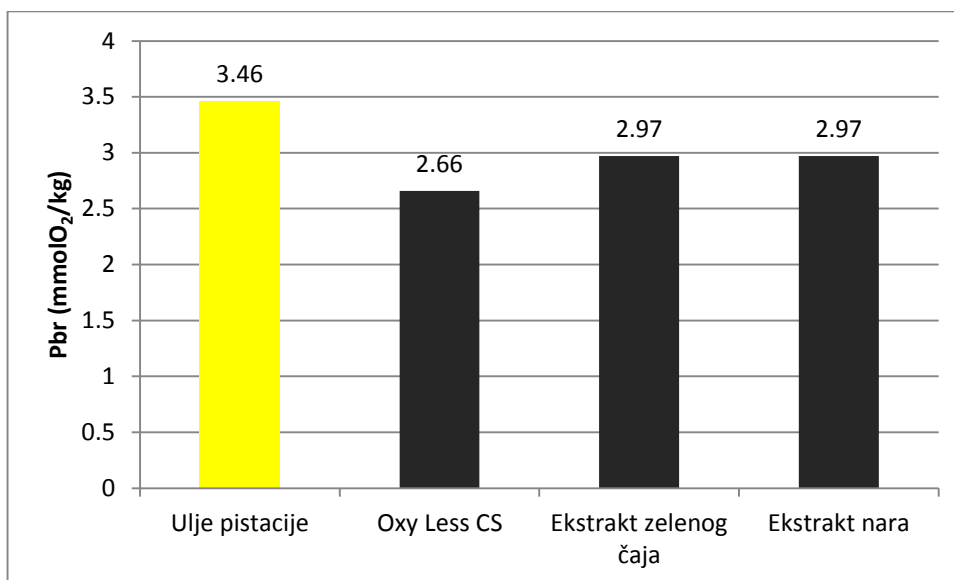
Pbr- peroksidni broj, mmolO<sub>2</sub>/kg

**Tablica 9** Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja pistacije, sa i bez dodanih antioksidanasa i sinergista, praćena Schaal Oven testom tijekom 4 dana

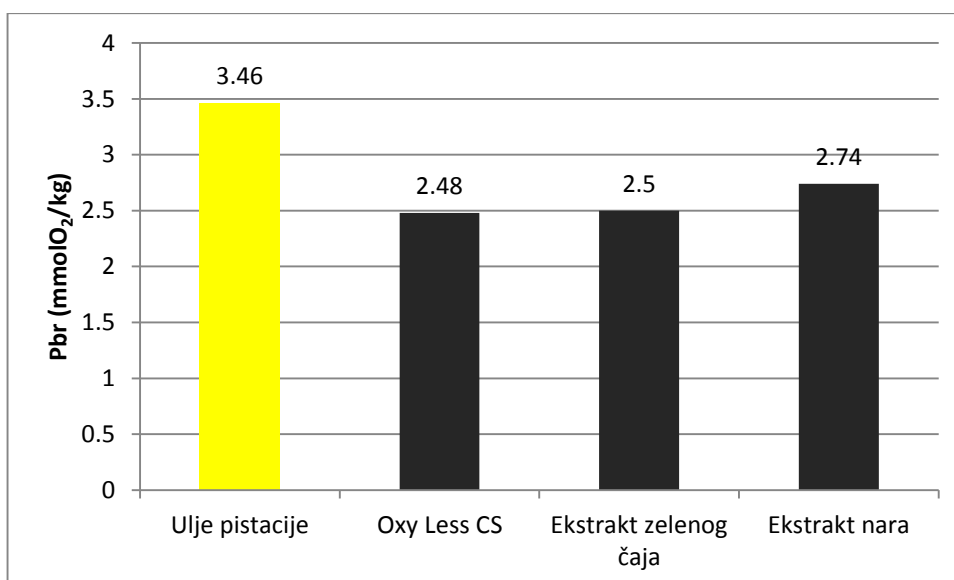
UZORAK	UDIO ANTIOKSIDANASA (%)	UDIO SINERGISTA (%)	Pbr(mmolO <sub>2</sub> /kg)				
			0.DAN	1.DAN	2.DAN	3.DAN	4.DAN
Ulje pistacije	-	-	1,50	2,01	2,71	3,06	3,46
Ekstrakt ružmarina OxyLess®.CS	0,1	-		2,00	2,23	2,55	2,66
	0,2	-		1,80	1,99	2,26	2,48
OxyLess®.CS+Ask	0,1	0,01		1,75	1,98	2,27	2,50
OxyLess®.CS+Lk	0,1	0,01		1,77	1,99	2,23	2,48
Ekstrakt zelenog čaja	0,1	-		1,98	2,01	2,75	2,97
	0,2	-		1,74	1,75	2,28	2,50
Ekstrakt zelenog čaja+ASK	0,1	0,01		1,76	1,78	2,45	2,75
Ekstrakt zelenog Čaja+ Lk	0,1	0,01		1,97	2,02	2,53	2,69
Ekstrakt nara	0,1	-		1,97	2,48	2,75	2,97
	0,2	-		1,87	2,00	2,52	2,74
Ekstrakt nara +Ask	0,1	0,01		1,95	2,01	2,50	2,78
Ekstrakt nar + Lk	0,1	0,01		1,97	2,04	2,47	2,74
Propil galat	0,01	-		1,75	2,00	2,46	2,50
Eterično ulje rtanjskog čaja	0,05	-		1,74	2,01	2,27	2,42

ASK- askorbinska kiselina (sinergist)

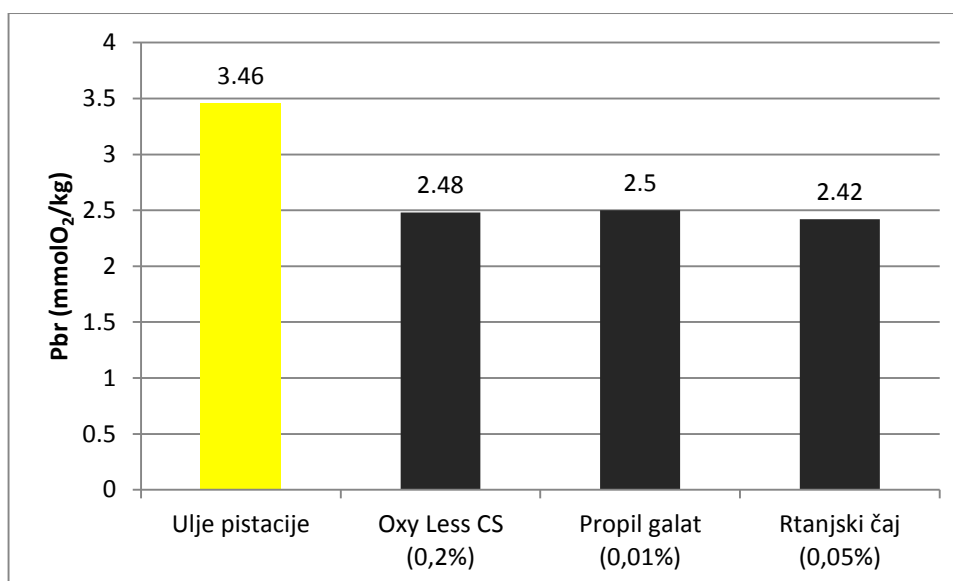
LK- limunska kiselina (sinergist)



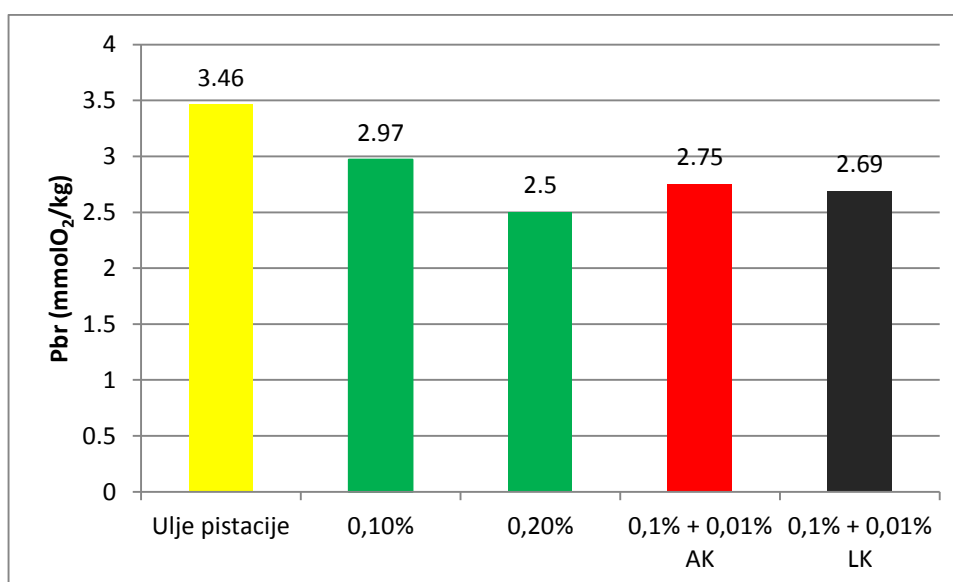
**Slika 11** Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,1%) na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja pistacije nakon 4 dana Oven testa



**Slika 12** Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,2%) na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja pistacije nakon 4 dana Oven testa



**Slika 13** Utjecaj dodatka prirodnog i sintetskog antioksidansa na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja pistacije nakon 4 dana Oven testa



**Slika 14** Utjecaj dodatka ekstrakta zelenog čaja i sinergista na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja pistacije nakon 4 dana Oven testa

(AK – askorbinska kiselina; LK – limunska kiselina)

## **5. RASPRAVA**

**U Tablici 8** prikazani su osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja pistacije slobodne masne kiseline (SMK) i peroksidni broj (Pbr). Iz rezultata je vidljivo da ulje pistacije ima vrijednost Pbr 1,50 (mmolO<sub>2</sub>/kg) i SMK 0,33%, što znači da je ulje dobre kvalitete čije su vrijednosti svih parametara u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN41/12).

Rezultati ispitivanja utjecaja dodataka prirodnih i sintetskih antioksidanasa i sinergista (askorbinska i limunska kiselina) na promjenu oksidacijske stabilnosti (održivosti) hladno prešanog ulja pistacije prikazani su u **Tablici 9**. Oksidacijska stabilnost ovog ulja ispitivana je testom ubrzane oksidacije Schaal oven testom pri temperaturi od 63 °C tijekom 4 dana. Početna vrijednost peroksidnog broja (Pbr) ulja pistacije iznosila je 1,50 (mmolO<sub>2</sub>/kg). Tijekom 4 dana testa došlo je do postepenog porasta vrijednosti Pbr, nakon 4 dana dobivena je vrijednost 3,46 (mmolO<sub>2</sub>/kg). Ovako niska vrijednost Pbr nakon 4 dana testa ukazuje na dobru otpornost ovog ulja prema oksidacijskom kvarenju što se pripisuje sastavu masnih kiselina i prisutnosti sastojaka ulja koji imaju izraženo antioksidacijsko djelovanje.

Dodatkom pojedinog ispitivanog prirodnog antioksidansa (ekstrakta ružmarina tip Oxy Less CS, ekstrakt zelenog čaja i ekstrakta nara) udjela 0,1% u ulje pistacije postignuta je zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja. Primjenom ekstrakta ružmarina (0,1%) nakon 4 dana testa dobivena je niža vrijednost Pbr (2,66 mmolO<sub>2</sub>/kg). Jednaka efikasnost zaštite ovog ulja od oksidacijskog kvarenja ostvarena je dodatkom ekstrakta zelenog čaja (0,1%) i ekstrakta nara (0,1%), nakon 4 dana testa Pbr ima vrijednost 2,97 (mmolO<sub>2</sub>/kg) što je vidljivo u **Tablici 9** i na **Slici 11**. Porastom koncentracije ovih ispitivanih prirodnih antioksidanasa sa 0,1% na 0,2% računato na masu ulja, zapažena je veća efikasnost zaštite ulja pistacije prema oksidaciji. Nakon 4 dana testa postignute su niže vrijednosti Pbr ulja.

Također primjenom ekstrakta ružmarina (Oxy Less CS) ostvarena je bolja zaštita ulja (2,48 mmolO<sub>2</sub>/kg) u odnosu na dodatak ekstrakta zelenog čaja (2,50 mmolO<sub>2</sub>/kg) i ekstrakta nara (2,74 mmolO<sub>2</sub>/kg) (**Slika 12.**). Ova koncentracija dodanog prirodnog ekstrakta ne dovodi do promjene senzorskih svojstava ulja pistacije.

Jednaka razina zaštite ulja od oksidacijskog kvarenja postignuta je dodatkom sintetskog antioksidansa propil galata (0,01%) i ekstrakta zelenog čaja (0,2%) (**Tablica 9; Slika 13.**).



Međutim, danas se preferira primjena prirodnog antioksidansa za stabilizaciju hladno prešanih i nerafiniranih ulja u odnosu na sintetski. Kemijski antioksidans je jeftiniji ali ima loš utjecaj na zdravlje potrošača.

Korištenjem eteričnog ulja rtanjskog čaja, udjela 0,05%, postignuta je najveća efikasnost zaštite ulja tj. otpornost ulja pistacije prema oksidacijskom kvarenju, nakon 4 dana testa dobivena je niska vrijednost Pbr 2,42 (mmolO<sub>2</sub>/kg).

Primjenom sinergista (askorbinska kiselina i limunska kiselina), udjela 0,01%, nastojalo se poboljšati antioksidacijsko djelovanje prirodnog antioksidansa ekstrakta ružmarina, ekstrakta zelenog čaja i ekstrakta nara kod udjela 0,1%.

Dodatkom limunske kiseline u kombinaciji sa ekstraktom zelenog čaja (0,1%) postignuta je bolja zaštita ulja pistacije od oksidacije, Pbr je nakon 4 dana testa 2,69 (mmolO<sub>2</sub>/kg) u odnosu na primjenu askorbinske kiseline gdje je Pbr 2,75 (mmolO<sub>2</sub>/kg) **(Slika 14.)**.

Ista pojava veće efikasnosti zaštite ulja pistacije dodatkom limunske kiseline u kombinaciji sa ekstraktom ružmarina (Pbr je 2,38 mmolO<sub>2</sub>/kg) zapaža se u odnosu na primjenu askorbinske kiseline gdje je Pbr 2,50 (mmolO<sub>2</sub>/kg). Ovdje je vidljivo da se dodatkom sinergista limunske kiseline malog udjela (0,01% ) postiže ista razina zaštite ulja pistacije od oksidacijskog kvarenja kao i primjena ekstrakta ružmarina udjela 0,2%. Ova spoznaja znači da se može uštedjeti na dodatku ovog antioksidansa uz dodatak limunske kiseline, a da se postigne ista razina zaštite ulja pistacije.

Dobra sinergističko djelovanje ove dvije kiseline (0,01%) pokazalo se i u kombinaciji sa ekstraktom nara (0,1%). Također se postiže nešto veća efikasnost zaštite ulja pistacije primjenom limunske kiseline u odnosu na askorbinsku kiselinu.

## **6. ZAKLJUČCI**

Iz dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja dodatka antioksidanasa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ulja pistacije mogu se donjeti sljedeći zaključci:

1. Ispitivano hladno prešano ulja pistacije je dobre kvalitete, vrijednosti peroksidnog broja (Pbr) i slobodne masne kiseline (SMK) su u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima.
2. Ulje pistacije pokazuje dobru stabilnost, otpornost prema oksidacijskom kvarenju.
3. Dodatkom prirodnih antioksidanasa ( ekstrakta ružmarina tip Oxy Less CS, ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta nara), udjela 0,1% postiže se zaštita ulja pistacije od oksidacijskog kvarenja.
4. Veća efikasnost zaštite ulja ostvarena je dodatkom ekstrakta ružmarina u odnosu na primjenu ekstrakta zelenog čaja i ekstrakta nara koji pokazuju jednaku razinu zaštite ulja.
5. Porastom udjela dodanog prirodnog antioksidansa na 0,2% ostvarena je veća stabilnost, održivost ulja pistacije. Nakon 4 dana testa dobivene su niže vrijednosti Pbr u odnosu na primjenu udjela 0,1%.
6. Korištenjem sintetskog antioksidansa propil galata (0,01%) postignuta je ista razina zaštite ulja pistacije od oksidacije kao i dodatak ekstrakta zelenog čaja (0,2%).
7. Dodatkom eteričnog ulja rtanjskog čaja (0,05%) postignuta je najveća zaštita ulja pistacije prema oksidacijskom kvarenju.
8. Primjenom sinergista (limunska i askorbinska kiselina udjela 0,01%) poboljšala se antioksidacijska efikasnost prirodnih antioksidanasa (ekstrakta ružmarina, ekstrakta zelenog čaja i nara, udjela 0,1%) kod stabilizacije ulja pistacije te je povećana održivost ulja.
9. Sinergist limunska kiselina djeluje efikasnije na stabilizaciju ulja pistacije u odnosu na askorbinsku kiselinu.

## **7. LITERATURA**

Arena, E, Ballistreri G, Fallico B.: Effect of postharvest storage temperatures on the quality parameters of pistachio nuts. Czech J. Food Sci., 31: 467-473, 2013.

Bandoniene, D, Pukalskas, A., Venskutonis, P., P.R. and Gruzdiene: Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. Food Res. Int., 33, 2000.

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

Broadbent, C.J., Pike, O.A. Oil stability indeks correlated with sensory determination of oxidative stability in canola oil. Journal of the American Oil Chemists Society 80: 59-63, 2003.

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

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

Eskin, N.A.M., Przybylski, R. Antioxidants and shelf life of foods. In Eskin N.A.M., Robinson D.S.: Food Shelf Life Stability. CRS press, NY, Washington, 2001.

Frankel EN: Lipid Oxidation. The Oily Press, Dundee, 1998.

Frega N., Mozzon M., Lercker G.: Effect of Free Fatty Acids on Oxidative stability of Vegetable oil. J Am Oil Chem Soc 76 (3): 325-329, 1999.

Gunstone, F.D.: The Chemistry of Oils and Fats. Blackwell Publishing, UK, 2004.

Grompone MA: Sunflower oil. U Bailey's Industrial Oil and Fat Products (6th edition). Fereidon Shahidi, Canada, 2005.

<http://www.sraspopovic.com/Masti.ppt>

Klapec T.: Opasnosti vezane uz hranu, kemijske i fizikalne opasnosti. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.

Koprivnjak O.: Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola. Poreč 2006.

Mandić ML.: Znanost o prehrani. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno - tehnološki fakultet Osijek, 2003.

- Mandić ML.: Znanost o prehrani. Osijek, 2007.
- Marcone M: Analytical Techniques in Food Biochemistry. In Food Biochemistry and Food Processing. Blackwell Publishing, USA, 2006.
- Martin-Polvillo, M. Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C.: Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. Journal of the American Oil Chemists Society 81: 577-583, 2004.
- Moslavac T: Materijali s predavanja na kolegiju "Tehnologija ulja i masti", Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.
- Moslavac T: Tehnologija ulja i masti. Interna skripta. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- NN 41/12. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Pravilnik o jestivim uljima i mastima.
- Odak I: Utjecaj antioksidansa na oksidacijsku stabilnost ulja konoplje, diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, listopad, 2013.
- Oštrić-Matijašević B, Turkulov J: Tehnologija ulja i masti. Tehnološki fakultet, Novi sad, 1980.
- Pike, O.A: Fat characterization. In Food Analysis. Ed. By S:S: Nielsen. Gaithersbury, Maryland: Aspen Publishers, Inc. Pp 221-225, 1998.
- Pravilnik o prehrambenim aditivima, Narodne Novine 81/2008.
- Rade D., Mokrovčak Ž., Štrucelj D.: Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida. Durieux, Zagreb, 2001.
- Rade D., Škevin D.: Maslinovo ulje i zdravlje – važnost maslinovog ulja u prehrani. Popularni stručni članci iz područja PBN-a, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2004.
- Ročak T. :Osnovne kemijske analize kakvoće istarskih maslinovih ulja, diplomski rad. Agronomski fakultet, Zagreb, siječanj 2005.

Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E.,: Ossidazioni dei lipidi. Nota 1. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 74, 181-189, 1997.

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

Shahidi F.: Bailey's Industrial Oil and Fats Products. Sixth edition. Volume1, Edible Oil and Fat Products Chemistry, Properties, and Health Effects .Newfoundland, Canada, 2005.

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

United States Department of Agriculture: USDA National Nutrient Database for Standard Reference:

<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3717?fg=&man=&facet=&count=&max=35&sort=&qlookup=pistachio&offset=&format=Full&new=&measureby> (10.2.2016)

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. Stabilization of edible oils with nature antioxidants. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 103, 2001.