

# Utjecaj prešanja i ekstrakta kadulje na iskorištenje i oksidacijsku stabilnost ulja gorušice

---

Lukac, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:109:752605>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**

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**

**Mateja Lukac**

**UTJECAJ PREŠANJA I EKSTRAKTA KADULJE NA ISKORIŠTENJE I  
OKSIDACIJSKU STABILNOST ULJA GORUŠICE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac 2018.

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnologija ulja i masti  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 29. lipnja 2018.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac*  
**Komentor:** izv. prof. dr. sc. *Maja Molnar*  
**Pomoć pri izradi:** *Daniela Paulik*, tehnički suradnik

#### UTJECAJ PREŠANJA I EKSTRAKTA KADULJE NA ISKORIŠTENJE I OKSIDACIJSKU STABILNOST ULJA GORUŠICE

*Mateja Lukac, 425-DI*

##### Sažetak:

Cilj ovog rada odnosio se na ispitivanje utjecaja procesnih parametara prešanja (frekvencija elektromotora, temperatura grijača glave preše i veličina nastavka za izlaz pogače) sjemenki gorušice na iskorištenje hladno prešanog ulja. Na proizvedenom ulju ispitan je utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje u koncentracijama 0,1%, 0,2% i 0,3% na promjenu oksidacijske stabilnosti ulja. Oksidacijska stabilnost ulja, s i bez dodatka prirodnog antioksidansa, određena je primjenom Schaal Oven testa pri temperaturi 63°C kroz 4 dana, a rezultati su prikazani vrijednostima peroksidnog broja. Na temelju dobivenih rezultata istraživanja, možemo zaključiti da procesni parametri prešanja utječu na iskorištenje ulja. Najbolje antioksidacijsko djelovanje pokazao je uzorak s ekstraktom kadulje pripremljen s 96% etanolom, tijekom 96 sati u koncentraciji 0,1%. Uzorak ulja s dodatkom 0,3% ekstrakta kadulje pripremljen s 65% i 95% etanolom te s vodom tijekom 24h i 96h nije pokazao zaštitu od oksidacijskog kvarenja.

**Ključne riječi:** Bijela gorušica, ulje gorušice, oksidacijska stabilnost, ekstrakt kadulje

**Rad sadrži:** 54 stranice  
18 slika  
10 tablica  
0 priloga  
44 literaturne reference

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

1. prof. dr. sc. <i>Vedran Slačanac</i>	Predsjednik
2. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i>	član-mentor
3. izv. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i>	član-komentor
4. izv. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 20. prosinca 2018.

**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 of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on May 29, 2018.

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

**Co-mentor:** *Maja Molnar*, PhD, associate prof.

**Technical assistance:** *Daniela Paulik*, technical associate

### THE INFLUENCE OF PRESSING AND SAGE EXTRACTS ON THE YIELD AND OXIDATIVE STABILITY OF MUSTARD SEED OIL

*Mateja Lukac, 425-DI*

**Summary:** The purpose of this study was to do a research on the influence of process parameters (frequency of electric motor, temperature of the head presses, and attachment for oil cake exit) of pressing mustard seed oil. Furthermore, we investigated the impact of adding natural antioxidant extracts was examined in concentration of 0,1%, 0,2% and 0,3% to oil production. Oxidation stability of oils, with or without the addition of antioxidants, was determined using a Scaal Oven test at 63°C for four days. The result is shown in the peroxide number values. To conclude, the process parameters of the pressing do affect the oil utilization. The best antioxidant activity showed the sample of sage extract with 96% ethanol, during 96 hours in concentration of 0,1%. The oil sample with addition of 0,3% sage extract with 65%, 96% ethanol and with water during 24 and 96 hours did not show any protection of oxidative degradation.

**Key words:** Mustard plant, mustard seed oil, oxidative stability, sage extract

**Thesis contains:** 54 pages  
18 figures  
10 tables  
0 supplements  
44 References

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>Vedran Slačanac</i> , PhD, full prof.  | chair person  |
| 2. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, full prof. | Supervisor    |
| 3. <i>Maja Molnar</i> , PhD, associate prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Stela Jokić</i> , PhD, associate prof. | stand-in      |

**Defense date:** December 20, 2018.

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

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Tihomiru Moslavcu na svim savjetima, izdvojenom vremenu i trudu za ovaj diplomski rad.

Veliko hvala tehničarki Danieli Paulik koja je stručno i strpljivo pomagala tijekom provođenja eksperimentalnog dijela rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su bili moja podrška tokom školovanja i koji su vjerovali u mene.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. SASTAV ULJA I MASTI</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BILJNIH ULJA</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. Uvjeti kvalitete sirovine .....	8
2.2.2. Kontrola kvalitete sirovine .....	8
2.2.3. Bijela gorušica ( <i>Sinapis alba</i> L.).....	8
<b>2.3. POSTUPAK PROIZVODNJE HLADNO PREŠANIH BILJNIH ULJA</b> .....	<b>11</b>
2.3.1. Čišćenje sjemenki.....	12
2.3.2. Prešanje .....	13
2.3.3. Odvajanje netopljivih nečistoća.....	13
<b>2.4. KVARENJE BILJNIH ULJA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5. OKSIDACIJSKA STABILNOST</b> .....	<b>17</b>
2.5.1. Metode za određivanje oksidacijske stabilnosti .....	17
2.5.2. Antioksidansi.....	18
2.5.3. Sinergisti .....	19
<b>2.6. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE BILJNIH ULJA</b> .....	<b>20</b>
2.6.1. Senzorske metode .....	20
2.6.2. Kemijske metode .....	20
2.6.3. Fizikalne metode.....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.2.1. Materijali .....	23
3.2.2. Metode rada .....	25
3.2.2.1. Određivanje parametara kvalitete sjemenke gorušice .....	27
3.2.2.2. Određivanje parametara kvalitete ulja .....	29
3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Schaal Oven testom .....	34
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE ULJA</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2. UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANSA NA STABILIZACIJU ULJA</b> .....	<b>41</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>44</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>48</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>50</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

Abr – anisidinski broj

EMK – esencijalne masne kiseline

IP – indukcijski period

MK – masne kiseline

M – molarna masa

NN – netopljive nečistoće

Pbr – peroksidni broj

R• - slobodni radikal masne kiseline

RH – nezasićene masne kiseline

ROO• – slobodni radikal peroksida

ROOH - hidroperoksid

SMK – slobodne masne kiseline

TB – totox broj

## **1. UVOD**



Rodovi Brassicaceae obuhvaćaju velik broj biljaka sa širokim spektrom upotrebe u prehrani, gospodarstvu, industriji i medicini. Za dobivanje ulja se najčešće koriste uljana repica (*Brassica napus*), hren (*A Armoracia rusticana*), crna gorušica (*Brassica nigra*) i bijela gorušica (*Sinapis alba*).

Bijela gorušica je jednogodišnja zeljasta biljka porijeklom iz Sredozemlja. Prirodno raste na napuštenim mjestima i žitnim poljima, a uzgaja se kao kulturna biljka radi proizvodnje sjemena. Sjemenke su ljutkaste i koriste se kao začim ili rjeđe kao ljekoviti čaj, a samljevene u brašno služe za izradu senfa.

Ulje gorušice nema intenzivan miris, a zanimljivo je zbog sastava masnih kiselina od kojih dominira mononezasićena masna kiselina (eruka masna kiselina) i polinezasićena masna kiselina (linolenska masna kiselina).

Hladno prešana jestiva biljna ulja dobivamo postupkom prešanja, bez zagrijavanja sirovine jer na taj način održavamo nutritivnu vrijednost i kvalitetu ulja. Prije samog procesa prešanja sirovina prolazi kroz postupke čišćenja, ljuštenja i mljevenja. Dobiveno sirovo prešano ulje pročišćava se isključivo pranjem vodom, taloženjem, filtriranjem i centrifugiranjem te tako dobivamo hladno prešano ulje. Biljna ulja dobivena postupkom prešanja sklona su nepoželjnim promjenama od kojih je najučestalije oksidacijsko kvarenje, stoga je važno poznavati oksidacijsku stabilnost ulja koja predstavlja vrijeme kroz koje je moguće sačuvati ulje od procesa autooksidacije. Proces autooksidacije moguće je usporiti dodatkom prirodnih i sintetskih antioksidanasa.

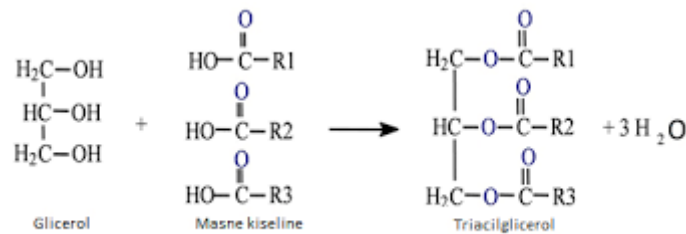
Zadatak istraživanja diplomskog rada bio je ispitati utjecaj procesnih parametara prešanja i dodatka ekstrakta kadulje na iskorištenje i oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja gorušice. Ispitivani procesni parametri bili su veličina nastavka za izlaz pogače, frekvencija elektromotora i temperatura zagrijavanja glave preše. Na proizvedenom hladno prešanom ulju gorušice ispitan je utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje koji je proizveden ekstrakcijom vode i etanola u različitim omjerima. Oksidacijska stabilnost ulja sa i bez dodatka antioksidansa određena je primjenom Schaal Oven testa pri temperaturi od 63°C. Rezultati su prikazani na temelju vrijednosti peroksidnog broja.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. SASTAV ULJA I MASTI

Ulja i masti su u vodi netopljive tvari biljnog i životinjskog podrijetla, a sadrže estere alkohola glicerola i masnih kiselina. Ulja sadrže više nezasićenih masnih kiselina i na sobnoj temperaturi su u tekućem agregatnom stanju za razliku od masti koje sadrže više zasićenih masnih kiselina te se pri sobnoj temperaturi nalaze u čvrstom stanju. Pripadaju grupi spojeva lipida koji se s obzirom na strukturu i sastav biljnih ulja dijele na jednostavne, složene i derivate lipida (Rac, 1964.).

U jednostavne lipide ubrajamo triacilglicerole masnih kiselina (**Slika 1**) i voskove koji predstavljaju skupinu estera viših masnih kiselina i viših masnih alkohola.



**Slika 1** Nastajanje triglicerida (triacilglicerola)

Složeni lipidi uključuju fosfolipide, glikolipide, aminolipide, sulfolipide i negliceridne sastojke prirodnih ulja. U negliceridne sastojke ubrajamo fosfolipide, karotene, voskove, sterole, vitamine A, D, K i E, tokoferole, pigmente klorofil i gosipol, glikozide, aldehide, ketone, masne alkohole i tragove metala, a njihov udio u prirodnim biljnim uljima iznosi najčešće 1-2%.

Derivati lipida uključuju vitamine D i E, ugljikovodike (karotene), alkohole (sterole) i masne kiseline koje znatno utječu na svojstva ulja jer su reaktivni dio molekule triacilglicerola (Swern, 1972.).

Masne kiseline su nerazgranate molekule koje sadržavaju 14-22 ugljikova atoma (Pine, 1994.). Ovisno o broju ugljikovih atoma u molekuli, zasićenosti ili nezasićenosti ugljikovog atoma, položaju i broju dvostrukih veza, masne kiseline se mogu podijeliti u nekoliko skupina (Sadadinović, 2008.).

Podjela masnih kiselina s obzirom na broj ugljikovih atoma:

- masne kiseline kratkog lanca (do 8 ugljikovih atoma);
- masne kiseline srednjeg lanca (od 8 do 12 ugljikovih atoma);
- masne kiseline dugog lanca (preko 12 ugljikovih atoma).

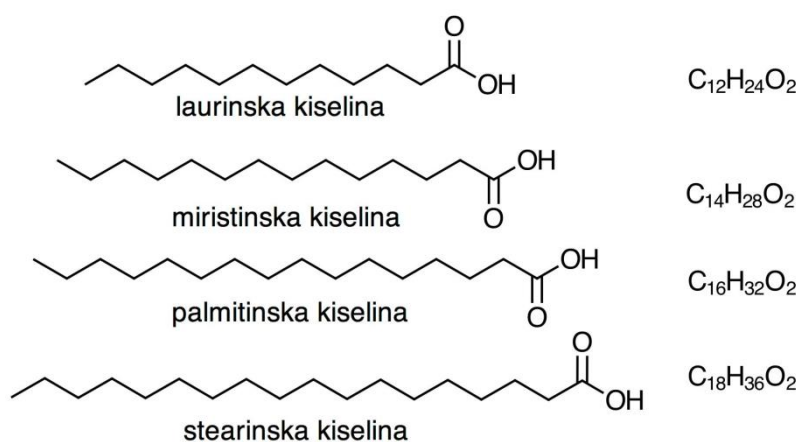
Podjela masnih kiselina na osnovu stupnja nezasićenosti:

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

### Zasićene masne kiseline

Veze prisutne u sastavu zasićenih masnih kiselina su jednostruke. Nalazimo ih u većem udjelu u mastima. Zasićene masne kiseline koje u svom sastavu sadrže od 4 do 22 ugljikova atoma nalaze se u prirodnim uljima i mastima, dok one sa većim brojem ugljikovih atoma su prisutne u voskovima (Sadadinović, 2008.). Najzastupljenije zasićene masne kiseline u mastima i uljima su laurinska, stearinska, palmitinska i miristinska (**Slika 2**).

Opća formula zasićenih masnih kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$



**Slika 2** Najraširenije zasićene masne kiseline

### Nezasićene masne kiseline

Nezasićene masne kiseline su masne kiseline koje u molekuli imaju jednu ili više dvostrukih veza. Ovisno o broju dvostrukih veza, nezasićene masne kiseline se dijele na:

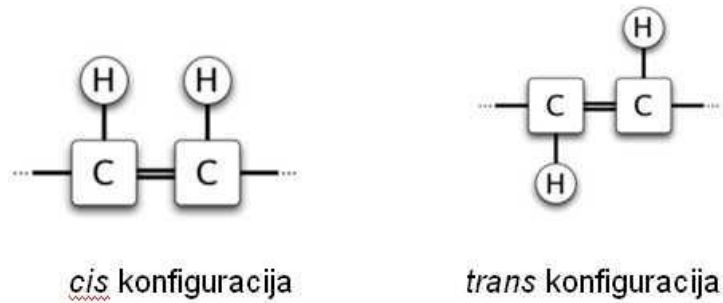
- mononezasićene masne kiseline (s jednom dvostrukom vezom);
- polinezasićene masne kiseline (s više dvostrukih veza).

Najznačajnija mononezasićena masna kiselina je oleinska, dok su od polinezasićenih značajne linolna, linolenska, arahidonska i eleostearinska (**Tablica 1**).

**Tablica 1** Najvažnije polinezasićene masne kiseline (Moslavac, 2013)

NAZIVI	BROJ C ATOMA	BROJ DVOSTRUKIH VEZA	FORMULA	MOLEKULARNA TEŽINA	TALIŠTE °C	NALAZIŠTE
Linolna	18	2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	280,44	-5	U većini biljnih i životinjskih masti
Linolenska	18	3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	278,42	-10	Ulje lana, soje, oraha i konoplje
Eleostearinska	18	3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	278,42	48	Tungovo ulje
Arahidonska	20	4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	304,46	-49,5	Masti mozga, jetre i drugih organa
Klupanodonska	22	5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}_2\text{COOH}$	330,48	-78	Ulja riba

Dva su geometrijska izomerna oblika u kojem se mogu nalaziti nezasićene masne kiseline, cis ili trans oblik (**Slika 3**) koji zavisi o prostornom rasporedu dijelova molekule s obje strane nezasićene dvostruke veze.



**Slika 3** Cis i trans oblik

Trans oblici nezasićenih dvostrukih veza su termodinamički stabilniji u odnosu na cis oblik što objašnjava mogućnost stvaranja trans izomera tijekom termičkog tretiranja ulja pri rafinaciji u fazi dezodorizacije. Eksperimentalne studije posljednjih su godina pokazale da trans masne kiseline utječu na nivo lipoproteina u krvi čime dolazi do ubrzanog razvoja ateroskleroze (Caggiula i Mustad, 1997.).

### Esencijalne masne kiseline

Masne kiseline koje je potrebno unijeti hranom jer ih organizam ne može sam sintetizirati nazivaju se esencijalne masne kiseline (EMK). Esencijalne masne kiseline pripadaju polinezasićenim masnim kiselinama s 18, 20 i 22 ugljikova atoma i sadrže dvije do šest dvostrukih veza. S obzirom na položaj dvostruke veze od metilnog kraja lanca razlikujemo omega-3 ( $\omega$ -3) i omega-6 ( $\omega$ -6) skupinu. Omega-3 skupini pripada linolenska kiselina i njezini derivati eikosapentaenska kiselina (EPA), dokosapentaenska kiselina (DPA) i dokosaheksaenska kiselina (DHA). Navedene masne kiseline se nalaze u ribljem ulju te u uljaricama poput uljane repice (Volmut, 2010.).

## 2.2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BILJNIH ULJA

Biljke u svom sjemenu i košticama sadrže određenu količinu ulja ovisno o vrsti uljarice. Sirovina od koje će se proizvoditi ulje mora biti pogodna za masovnu proizvodnju te mora imati minimalan udio ulja koji će biti ekonomski prihvatljiv prilikom njegovog izdvajanja. Za dobivanje ulja se koristi više od 20 vrsta biljaka od čega 12 uljarica ima veći ekonomski značaj (Dimić, 2005.).

Ulja se mogu podijeliti prema porijeklu sirovine i prema porijeklu sjemena:

- a) ulja i masti iz mesnatog dijela ploda (npr. maslinovo ulje);
- b) ulja i masti iz sjemena prema dominirajućim masnim kiselinama (npr. laurinska, oleinska masna kiselina);
- c) ulja i masti prema porijeklu biljke (npr. ulja krstašica) (Bockisch, 1998.).

### **2.2.1. Uvjeti kvalitete sirovine**

Kvaliteta nerafiniranih i hladno prešanih jestivih ulja ovisi o karakteristikama same sirovine ali i o tehnološkom procesu proizvodnje. Polazna sirovina mora udovoljavati strogim uvjetima kvalitete koju je potrebno očuvati tijekom skladištenja same prerade i pripreme uz sprječavanje kontaminacije sirovine. Proizvodnja započinje odabirom sorte, a kako bi se dobio konačan proizvod moraju se proći faze proizvodnje koje uključuju žetvu, transport, čišćenje, sušenje i skladištenje (Dimić, 2005.).

### **2.2.2. Kontrola kvalitete sirovine**

Kontrola kvalitete sirovine obuhvaća:

- a) mikrobiološku kontrolu;
- b) kontrolu senzorskih svojstava;
- c) kontrolu tehnološke kvalitete;
- d) kontrolu zdravstveno-higijenske ispravnosti;
- e) kontrolu kemijske kvalitete sirovine.

Prilikom prijema sirovine ispituje se njezina kvaliteta u svrhu proizvodnje hladno prešanih ulja. Tehnološka kvaliteta sirovine mora odgovarati uvjetima prešanja, a provodi se kako bi se omogućilo stvaranje jednolične mase sirovine koja je sastavljena od jedne ili više šarži iste ili slične kvalitete (Dimić, 2005.).

### **2.2.3. Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.)**

Gorušica pripada porodici *Cruciferae* ili krstašica. Rod *Brassica* sastoji se od 150 vrsta jednogodišnjeg ili dvogodišnjeg bilja. Bijela gorušica je jednogodišnja biljka koja je visoka 120 cm i ima snažan korjenov sustav koji doprinosi otpornosti na sušu. To je zimska biljka koja se na visokim temperaturama brzo osjemenjuje. Cvate od svibnja do lipnja žutim cvjetovima od

četiri latice, koji se javljaju u malim skupovima (**Slika 4**). Sjemenke su kuglaste i žućkaste (**Slika 5**), veličine od 1,5-3 mm, sjemena ljuska je tanka, endosperm oskudan i nevidljiv golim okom, embrij velik, žućkast sa zakrivljenim hipokotilama, korijen djelomično okružen dvjema sklopljenim supkama, a ispuštaju miris tek kada se samelju i pomiješaju s tekućinom (Thomas i sur., 2012.). Sadržaj ulja u sjemenkama gorušice iznosi 28-42% (Antova i sur., 2016.). Primjerena je za zelenu gnojidbu koja predstavlja planirano unošenje nadzemne mase pojedinih kultura u tlo. Kulture na taj način obogaćuju tlo i njegovu biološku aktivnost te povećavaju kapacitet tla za vodu. Smatra se da je dobra predkultura za šećernu repu jer povoljno utječe na smanjenje parazita u tlu. Otporna je na niske temperature i stoga je pogodna za proizvodnju u područjima visoke nadmorske visine (Thomas i sur., 2012.).



**Slika 4** Cvijet bijele gorušice



**Slika 5** Sjeme bijele gorušice



### **Kemijski sastav**

Bijela gorušica sadrži sinalbin koji hidrolizom uz pomoć enzima mirozinaze daje p-hidroksibenzil-izotiocijanat, p-hidroksibenzilamin i druge spojeve (proteine, ulja, sluz, itd.) (Thomas i sur., 2012.).

### **Sastav masnih kiselina**

Ulje gorušice sadrži visoke koncentracije eruka kiseline (22-60%) (Shrestha i sur., 2013.). Ostale masne kiseline koje se mogu naći u ulju gorušice proizvedenom bez kondicioniranja su linolna (24,8%), oleinska (24,7%), linolenska (11,1%), eikosenska (12,8%), palmitinska (3,98%) i stearinska kiselina (1,3%) od ukupnih masnih kiselina (Vaidya i Choe, 2010.).

### **Fitosteroli, skvalen i tokoferoli u sjemenu gorušice**

Fitosteroli, skvalen i tokoferoli su komponente neosapunjivog dijela lipidne tvari hrane koji imaju antioksidacijsku i antikancerogenu aktivnost. Nekoliko studija je pokazalo da biljni steroli inhibiraju crijevnu apsorpciju kolesterola čime se snižava ukupni kolesterol u plazmi i razina lipoproteina niske gustoće (LDL). Skvalen je 30 ugljikohidratni izopren koji je ključan međuprodukt biosinteze kolesterola kojim obiluje jetra morskog psa i maslinovo ulje. Tokoferoli su antioksidansi koji rade kao čistači lipidnih peroksidnih radikala (Ryan i sur., 2007.). Sjeme gorušice sadrži tokoferole i karotenoide kao što su lutein i  $\beta$ -karoten. Iako se smatraju antioksidansima,  $\beta$ -karoten, lutein i likopen mogu ubrzati oksidaciju u specifičnim uvjetima. Prženje sjemena prije ekstrakcije daje dobar okus i poboljšava stabilnost nekih ulja (Vaidaya i sur., 2010.). Ulje gorušice uglavnom sadrži  $\alpha$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokoferol dok je od fitosterola najzastupljeniji  $\beta$ -sitosterol i kampesterol (Jham i sur., 2009.). U istraživanjima na temelju 5 primjera *Sinapis Alba L.* sjemenja utvrđena je količina  $\beta$ -sitosterola u slobodnim sterolima (51,9-55,9%) i sterolnim esterima (52,8-59,7%) te količina kampesterola u udjelu od 19,1-30,5% (Antova i sur., 2016.).

**Tablica 2** Identifikacijski zahtjevi ulja gorušice (Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 41/12).

INDEKS REFRAKCIJE	1,461-1,469
JODNI BROJ (g J <sub>2</sub> /100g)	92-125
SAPONIFIKACIJSKI BROJ (mgKOH/g)	168-184

### 2.3. POSTUPAK PROIZVODNJE HLADNO PREŠANIH BILJNIH ULJA

Prema pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 41/12) jestiva biljna ulja se prema tehnološkom postupku dijele na rafinirana, hladno prešana i nerafinirana ulja.

Jestiva biljna ulja mogu se proizvesti na dva načina:

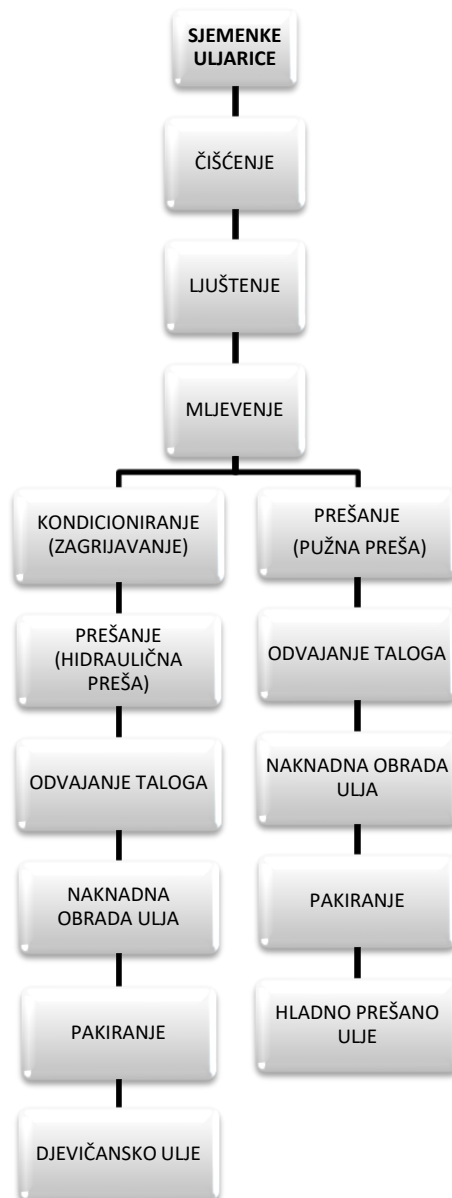
- 1) Kemijski postupak;
- 2) Fizikalni postupak (Jokić i sur., 2016.).

Kemijski postupak uključuje primjenu organskog otapala. Tijekom ovog postupka proizvodnje nastaje sirovo ulje koje prolazi proces rafinacije ili pročišćavanja (Teh i Birch, 2013.).

Fizikalni način proizvodnje biljnog ulja provodi se primjenom hidrauličkih ili kontinuiranih pužnih preša. Potiskivanjem sjemena kroz prešu dolazi do djelovanja mehaničke sile i nastajanja sirovog ulja i pogače (Teh i Birch, 2013.). Sirovo ulje je potrebno podvrgnuti procesima sedimentacije i filtracije kako bi se moglo dobiti hladno prešano ulje.

Prije nego ode na proces prešanja, sirovina prolazi određene faze pripreme koje uključuju čišćenje, ljuštenje i usitnjavanje s ciljem jednostavnijeg izdvajanja ulja. Kako bi se dobilo finalno ulje dobre kvalitete, sirovo ulje se može pročititi pranjem vodom, filtriranjem, centrifugiranjem i sedimentacijom.

Iako je proces proizvodnje hladno prešanih ulja relativno jednostavan, postoji određeni broj čimbenika koji mogu utjecati na kvalitetu gotovog proizvoda. Tehnološki proces proizvodnje jestivih hladno prešanih i nerafiniranih ulja iz sjemenki uljarica i drugih sirovina prikazan je na **Slici 6** (Dimić, 2002.).



**Slika 6** Blok shema proizvodnje jestivog hladno prešanog i djevičanskog ulja (Dimić i sur., 2002.)

U proizvodnji hladno prešanog ulja gorušice upotrebljava se očišćena i osušena sjemenka koja ide u proces prešanja bez prethodnog ljuštenja i mljevenja.

### 2.3.1. Čišćenje sjemenki

Sjemenka uljarice prije prerade mora biti očišćena od organskih i anorganskih primjesa. U organske nečistoće se ubrajaju dijelovi biljke, lišće, kukci i dr., dok se u anorganske nečistoće ubraja prašina, kamenje, komadići metala i dr. Čišćenje se provodi na temelju razlike u aerodinamičnim svojstvima, razlike u dimenzijama, magnetskim svojstvima i specifičnoj

težini. Primjese se odvajaju postupcima prosijavanja, rešetanja, provjetravanja i aspiracije, a metalne primjese pomoću magnetnih separatora. Proces čišćenja sjemenki mora biti što efikasniji kako bi se mogle ukloniti sve nečistoće i kako bi se dobilo kvalitetno ulje (Sadadinović 2008.; Dimić 2005.).

### **2.3.2. Prešanje**

Prešanje je jedna od najstarijih metoda izdvajanja ulja iz sirovine primjenom visokog tlaka i mehaničke ekstrakcije materijala. Nakon prešanja, osim ulja nastaje i uljna pogača koja se može koristiti za proizvodnju stočne hrane, u ljudskoj prehrani ili kao industrijska sirovina. Postupkom prešanja dobivamo ulje koje zadržava svoja prirodna svojstva i koje ima manje nepoželjnih sastojaka (Čorbo, 2008.).

Tehnološki proces prešanja provodi se na hidrauličnim i kontinuiranim pužnim prešama. Prvo su to bile ručne preše, preše na vijak, preše na klin i dr., koje su imale male radne tlakove i zbog toga nedovoljno iskorištenje sirovina. Pojavom hidrauličnih preša omogućeno je dobivanje većih radnih tlakova pomoću malih sila, a uvođenjem pužnih preša omogućen je kontinuiran proces izdvajanja sirovog ulja prešanjem. Primjena hidrauličnih preša danas je sve rijeđa jer zahtjevaju veliku radnu snagu i zbog toga su konstruirane kontinuirane pužne preše (Rac, 1964.).

U industriji ulja pužne preše imaju najveću primjenu. Glavni element ovih preša je pužnica koja je smještena na glavnoj osovini. Ona gura sjemenke iz većeg u manji prostor čime dolazi do porasta tlaka, cijedenja ulja i smanjenja volumena. Ostali elementi kontinuiranih pužnih preša su kućište preše, uređaj za punjenje i doziranje materijala te uređaj za reguliranje debljine isprešane pogače (Rac, 1964.). Pužne preše mogu biti konstruirane za predprešanje pri čemu se iz sirovine uklanja dio ulja, a stupanj djelovanja je 50-60% u odnosu na sadržaj ulja. Kod završnog prešanja stupanj djelovanja može doseći i do 90% (Dimić i Turkulov, 2000.).

### **2.3.3. Odvajanje netopljivih nečistoća**

Nakon postupka hladnog prešanja, dobiveno sirovo ulje sadrži određeni udio netopljivih nečistoća koje mogu negativno utjecati na organoleptička svojstva te kvalitetu ulja, stoga ih je potrebno ukloniti.

Odvajanje nečistoće moguće je izvesti na nekoliko načina: sedimentacijom ili taloženjem, filtracijom, filtracijskim centrifugama te centrifugalnim separatorima. Proces filtriranja sastoji se u propuštanju sirovog prešanog ulja kroz filter na kojem se krute čestice zadržavaju. Kao filterski materijal mogu se upotrebljavati filtracijske tkanine, sita izrađena od metala, filter papir. Vibracijska sita i filtracijske centrifuge upotrebljavaju se za grubo filtriranje, dok se centrifugalni separatori i kontinuirani filtri koriste za finije filter preše (Rac, 1964., Dimić, 2005.). Sadržaj netopljivih nečistoća, u hladno prešanim uljima, se prema zakonskim propisima dozvoljava u količini od najviše 0,1% (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, NN 41/12).

#### **2.4. KVARENJE BILJNIH ULJA**

Na stupanj kvarenja ulja i masti može utjecati vrsta sirovine, kemijski sastav, uvjeti prerade i skladištenja. Osim što dolazi do promjena u organoleptičkim svojstvima ulja i masti, mijenja se i njihova prehrambena vrijednost gdje dolazi do gubitka vitamina, EMK i drugih važnih tvari. Kao posljedica kvarenja stvaraju se razgradni produkti koji uljima i mastima daju neugodan miris i okus (Čorbo, 2008.).

Postoje dvije osnovne grupe kvarenja ulja i masti:

1. Enzimski i mikrobiološki procesi kvarenja koji uključuju hidrolitičku razgradnju i  $\beta$ -ketoosidaciju;
2. Kemijski procesi kvarenja koji uključuju autoosidaciju, termooksidacijske promjene i reverziju.

##### **Enzimski i mikrobiološki procesi**

Glavni uvjeti za stvaranje enzimskih i mikrobioloških procesa kvarenja su količina vode, pH i optimalna temperatura. Enzimsko kvarenje provode lipolitički enzimi koji uz prisutnost vode uzrokuju hidrolizu triacilglicerola, pri čemu se oslobađa jedna ili više molekula masnih kiselina i glicerol te dolazi do povećanja udjela slobodnih masnih kiselina (SMK). Optimalna temperatura za aktivnost enzima lipaze je 45°C. Prilikom hidrolitičkog kvarenja nastaju ketoni koji uljima i mastima daju neugodan miris i okus (Čorbo, 2008.).

Povećanjem udjela slobodnih masnih kiselina raste i kiselost ulja te nastaju novi proizvodi razgradnje, mono-i digliceridi i glicerol, a stupanj nastalih promjena se prati određivanjem

udjela SMK. Ulja i masti u čijem sastavu su zastupljene zasićene masne kiseline, djelovanjem mikroorganizama u prisustvu kisika iz zraka podliježu  $\beta$ -ketooksidacijskom kvarenju.

Mikrobiološki uzročnici kvarenja su bakterije *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis* te plijesni *Aspergillus* i *Penicillium*. Kao primarni produkt  $\beta$ -ketooksidacije nastaje  $\beta$ -keto kiselina dok kao sekundarni produkt nastaje metil keton. Ovi produkti dovode do stvaranja neugodnih mirisa i okusa. Proces  $\beta$ -ketooksidacije se može spriječiti postupcima pasterizacije i sterilizacije te snižavanjem pH vrijednosti (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

### **Kemijski procesi kvarenja**

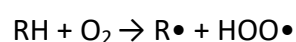
Kemijski procesi kvarenja biljnog ulja su:

- a) Autooksidacija
- b) Termooksidacijske promjene
- c) Reverzija

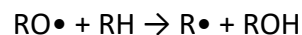
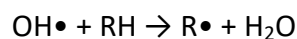
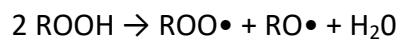
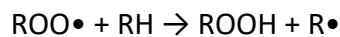
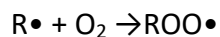
#### **Autooksidacija**

Autooksidacija se može opisati kao reakcija bilo kojeg materijala s molekularnim kisikom (Šego, 2011.). Produkti autooksidacije u malim količinama daju uljima neugodan miris i okus te narušavaju senzorska svojstva ulja (Broadbent i Pike, 2003.). Hoće li proces autooksidacije ulja nastupiti brže ili sporije ovisi o sastavu ulja, uvjetima čuvanja, prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju ili usporavaju reakciju oksidacije (Martin-Polvillo, 2004.). Na povećanje brzine autooksidacije utječu povišena temperatura, svjetlo i tragovi metala. Autooksidacija se odvija u tri faze, a to su faza inicijacije, propagacije i terminacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

U početnoj fazi autooksidacije koncentracija produkta je mala i ne djeluje na prehrambenu vrijednost i organoleptička svojstva. Za vrijeme faze inicijacije nastaju slobodni radikali jer kisik iz zraka djeluje na nezasićene masne kiseline u molekuli triglicerida. Slobodni radikali nastavljaju reagirati sa masnim kiselinama i stvaraju nove radikale te dolazi do ubrzanja procesa i nastajanja lančanih reakcija (Ergović-Ravančić, 2017.).

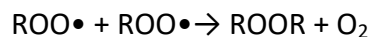


U fazi propagacije nastali slobodni radikali masnih kiselina su reaktivni i nestabilni zbog nesparenog elektrona pa lančano djeluju na susjedne molekule kako bi im oduzeli njihov elektron (Reuben, 1998.). Nastali slobodni radikali masnih kiselina ( $R\bullet$ ) reagiraju sa kisikom stvarajući peroksi-radikale ( $ROO\bullet$ ), koji oduzimaju vodik iz molekula masnih kiselina i oslobađaju nove radikale masnih kiselina ( $R\bullet$ ) te nastaju hidroperoksidi ( $ROOH$ ). Hidroperoksidi su primarni produkti oksidacije koji su vrlo nestabilni te se dalje razgrađuju na slobodne radikale. Reaktivni slobodni radikali ( $RO\bullet$ ,  $ROO\bullet$ ) djeluju na nove lance masnih kiselina i stvaraju hidroperoksidi i slobodne radikale (započinje lančana reakcija).



Razgradnjom hidroperoksida nastaju sekundarni produkti oksidacije: aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline i dr., i već u vrlo malim količinama ulju daju neugodan (užegli) miris i okus (Shahidi, 1997.).

U fazi terminacije dolazi do međusobne reakcije slobodnih radikala uz nastanak stabilnih polimera koji su nereaktivni i time završava proces autooksidacije (Koprivnjak, 2006.).



#### Termooksidacija

Termooksidacijske promjene ulja dešavaju se tijekom zagrijavanja i prženja ulja na temperaturama višim od 150°C u prisustvu vodene pare i zraka (Vidyasagar i sur., 1974.). Stupanj termooksidacije ovisi o temperaturi, vremenu zagrijavanja i vrsti ulja. Istraživanja su pokazala da visok stupanj oksidacije i zagrijavanje ulja štetno djeluje na ljudsko zdravlje (Huang i sur., 1990.).

Tijekom prženja hrane dolazi do promjene fizikalnih (specifična težina, boja i viskozitet ulja) i kemijskih (porast udjela slobodnih masnih kiselina, peroksidnog broja, broja osapunjenja, a smanjenja jodnog broja) svojstava ulja.

Reverzija

Reverzija je pojava neugodnih mirisa, a uzrokuju je razgradni produkti negliceridnih sastojaka ili linolenske kiseline. Djelomičnom hidrogenacijom ulja ili dodatkom aditiva možemo usporiti kvarenje ove pojave (Rac, 1964.).

## **2.5. OKSIDACIJSKA STABILNOST**

Oksidacijska stabilnost ili održivost biljnih ulja predstavlja vrijeme kroz koje se mogu sačuvati od procesa autooksidacije. Poznavanje održivosti ulja važno je kako bi se moglo unaprijed odrediti vrijeme za koje se ulje može sačuvati od jače izražene oksidacije, bez bitnih promjena kvalitete, te za definiranje roka upotrebe ulja (Martin-Polvillo, 2004.).

Kako bi se odredio period tijekom kojeg se ulje može čuvati, potrebno je odrediti oksidacijsku stabilnost. Testovi koji se primjenjuju temelje se na ubrzanoj oksidaciji ulja, a uključuju AOM test, Schaal oven test, Rancimat test, test održivosti na 98°C te dvije metode koje se nešto rjeđe koriste, a to su metoda apsorpcije kisika i test na bazi fluorescentnog svjetla (Dimić i Turkulov, 2000.).

### **2.5.1. Metode za određivanje oksidacijske stabilnosti**

#### **Schaal oven test**

Primjenom ovog testa uzorci ulja se postavljaju u sušionik na konstantnu temperature 63°C. U određenim vremenskim razmacima prati se porast peroksidnog broja i senzorske promjene ulja. Kada peroksidni broj postigne određenu vrijednost ili ako dođe do pojave užglosti, broj dana koji je bio potreban za to uzima se za održivost ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).



**AOM (Active Oxygen Method) ili Swift test**

Swift test se odvija u Swift uređaju gdje su uzorci ulja zagrijani na 98°C i kroz njih prolazi struja zraka. U određenim vremenskim intervalima se mjeri vrijednost peroksidnog broja (Pbr) koja postepeno raste u svim uzorcima (Patterson, 1983.).

**Rancimat test**

Rancimat test provodi se u Rancimat uređaju u kojem dolazi do ubrzane oksidacije biljnih ulja pri povišenoj konstantnoj temperaturi od 100, 110 i 120°C uz konstantan dovod zraka. Pri navedenim temperaturama dolazi do izlaska hlapljivih organskih kiselina koje se uvode u deioniziranu vodu, a zatim se mjeri porast vodljivosti i indirektno određuje održivost ulja. Vrijeme indukcije se izražava kao indeks održivosti ulja pri određenoj temperaturi i protoku zraka. Rezultat testa se prikazuje indukcijskim periodom (IP) u satima koji ukazuje na otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju. Što je indukcijski period veći to ulje ima veću stabilnost ili održivost (Laubli i Bruttal, 1986.).

**2.5.2. Antioksidansi**

Održivost biljnih ulja može se poboljšati dodatkom antioksidansa, a to su tvari koje inhibiraju autooksidaciju ulja (Yanishlieva i Marinova, 2001.). Dodaju se u malim količinama, a stupanj djelovanja ovisi o temperaturi, prisutnosti drugih antioksidansa i njihovoj koncentraciji (Pokorny i sur., 2001.).

Mehanizam djelovanja antioksidansa temelji se na dvije reakcije. U prvoj reakciji antioksidans daje vodik koji se veže na slobodni radikal masne kiseline ili peroksida, dok se u drugoj reakciji slobodni radikal antioksidansa veže za drugi slobodni radikal masne kiseline ili peroksida. Obje reakcije onemogućuju provođenje procesa oksidacije te time omogućuju produženje oksidacijske stabilnosti ulja (Inatani i sur., 2014.).

Poznati su razni prirodni i sintetski antioksidansi koji se primjenjuju za oksidacijsku stabilnost biljnih ulja (Merrill, 2008.). Sintetski antioksidans je jeftiniji od prirodnog, ali je generalno prihvaćeno da prirodni antioksidansi imaju snažnije, efikasnije i zdravstveno sigurnije djelovanje nego sintetski (Bera i sur., 2006.). Najznačajniji prirodni antioksidansi su karotenoidi, tokoferoli, fenolne kiseline i dr.. U zadnjih pet godina, istražuju se različiti biljni materijali koji sadrže fenolne spojeve i pokazuju uspješna antioksidacijska svojstva u biljnim

uljima. Tako se koriste razni ekstrakti začinskih biljaka kao što je ekstrakt ružmarina, kadulje, zelenog čaja i dr. (Ahn, 2008.). Jedna od najznačajnijih izvora prirodnih antioksidanasa je biljka kadulja (*Salvia officinalis* L.) koja sadrži fenolne spojeve i fenolne kiseline. Fenolne kiseline čine 55-60% od ukupnih fenolnih spojeva u uzorku kadulje (Jasicka-Misiak i sur., 2018.). Glavni antioksidacijski učinak u kadulji imaju derivati kafeinske kiseline (ružmarinska kiselina) te flavoni (luteolin-3-glikozid). Osim antioksidacijskog svojstva, značajan je i antimikrobni, antialergijski i antibiotski učinak (Dent i sur., 2017.; Aruoma i sur., 1992.).

Najčešće korišteni sintetski antioksidansi su butil hidroksianisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT) te alkil esteri galne kiseline (propil galat, butil galat, oktil galat i dodecil galat). Maksimalno dopušteni udio u uljima za BHA je do 0,02%, a za ostale sintetske antioksidanse do 0,01%. Sintetski antioksidansi su manje učinkovitiji u procesu smanjenja oksidacijskog kvarenja nego oni prirodnog tipa, stoga se predlaže upotreba jestivih biljaka kao izvor prirodnog antioksidansa (Inatani i sur., 2014.; Özcan i Arslan, 2011.).

### **2.5.3. Sinergisti**

Sinergisti su kemijski spojevi koji nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali dodani uz neki antioksidans produžuju njegovo djelovanje. Sinergisti se još nazivaju sekundarni antioksidansi jer ne prevode izravno slobodne radikale u stabilne molekule, već posredno usporavaju oksidacijski proces kvarenja biljnih ulja. Najčešće se koriste organske kiseline poput askorbinske, octene i limunske kiseline, lecitin, monoizopropil citrat i askorbil palmitat.

Načini djelovanja sinergista:

- a) vežu i inaktiviraju tragove metala te sprječavaju njihovo prooksidacijsko djelovanje;
- b) daju vodikov atom antioksidansu, regeneriraju ga i produžuju mu vijek trajanja;
- c) veže se na radikal antioksidansa i zaustavlja njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006.).

## 2.6. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE BILJNIH ULJA

Metode određivanja stupnja oksidacije ulja dijele se u tri skupine:

1. Senzorske metode
2. Kemijske metode
3. Fizikalne metode

### 2.6.1. Senzorske metode

Ove metode su dobar pokazatelj oksidacijske stabilnosti biljnih ulja, a određuju pojavu neugodnog mirisa i okusa ulja. Zbog subjektivnog i nedovoljno točnog određivanja teži se za primjenom bržih, točnijih i jednostavnijih metoda.

### 2.6.2. Kemijske metode

Kemijskim metodama se određuju primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi) i sekundarni produkti oksidacije (aldehidi i ketoni) koji su nastali razgradnjom hidroperoksida.

Peroksidni broj (Pbr)

Peroksidni broj označava razinu primarne oksidacije masnih kiselina i pokazuje količinu primarnih produkata oksidacije izraženih u miliekvivalentima  $O_2$  ili  $mmol O_2/kg$  (Dimić, 2005.). Vrijednost peroksidnog broja može biti vrlo promjenjiva, a ovisi o vremenu uzimanja uzoraka, tako da dva uzorka uzeta iz iste šarže, ali u različito vrijeme, neće imati istu vrijednost peroksidnog broja. Prilikom uzorkovanja potrebno je uzorak uzeti sa površine, sredine i dna posude da bi uzorak bio što reprezentativniji (Ergović-Ravančić, 2017.).

U praksi se najčešće primjenjuju jodometrijske metode Lea i Wheeler-a, a baziraju se na titracijskom određivanju količine joda, kojeg peroksidi oslobađaju iz kalij-jodida. Također, za određivanje Pbr, koristi se i kolorimetrijska metoda koja se zasniva na oksidaciji Fe (II) soli u Fe (III) soli te mjerenju inteziteta nastale boje (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001.).

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 41/12), maksimalno dopuštena vrijednost Pbr za hladno prešana i nerafinirana ulja je  $7 mmol O_2/kg$ , dok je za biljna rafinirana ulja  $5 mmol O_2/kg$ .

Anisidinski broj (Abr)

Određivanje Abr-a temelji se na reakciji p-anisidina sa višim nezasićenim aldehydima u kiselom mediju. Ova metoda se koristi za ispitivanje kvalitete sirovih i jestivih ulja jer omogućuje potpuniju procjenu kvalitete, daje uvid u tzv. "oksidacijsku prošlost" ulja (Rade i sur., 2001.).

Oksidacijska vrijednost ulja (OV) ili Totox broj (TB)

Totox broj se izračunava iz vrijednosti anisidinskog i peroksidnog broja, a daje uvid u količinu primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja.

$$TB = 2 Pbr + Abr$$

Pbr - peroksidni broj

Abr – anisidinski broj

### 2.6.3. Fizikalne metode

Neke od fizikalnih metoda su prikazane u **Tablici 3** (Dimić i Turkulov, 2000.).

ANALITIČKA METODA	ISPITIVANI PARAMETAR
UV – spektrofotometrija	Konjugirani dieni i trieni
IR – spektrofotometrija	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
NMR (nuklearna magnetska rezonancija)	Hidroperoksidi i alkoholi
Fluorescencija	Karbonilni spojevi i ketoni
GC – plinska kromatografija	Isparljivi spojevi
Indeks refrakcije	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Dielektrična konstanta	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Polarografija	Hidroperoksidi
Kulunometrija	Hidroperoksidi

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak diplomskog rada je ispitati utjecaj procesnih parametara prešanja sjemenke gorušice kao što su veličina nastavka za izlaz pogače, temperatura grijača glave preše i frekvencija elektromotora na iskorištenje ulja, te odrediti oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja sa i bez dodatka prirodnog antioksidansa.

Kao prirodni antioksidans korišten je ekstrakt kadulje koji je proizveden postupkom ekstrakcije pomoću etanola i vode te dodan u ulje u udjelu od 0,1%, 0,2% i 0,3%.

Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja bijele gorušice određivala se Schaal Oven testom pri temperaturi od 63°C.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Materijali

Sjemenke bijele gorušice (*Sinapis alba L.*) koje su korištene za proizvodnju hladno prešanog ulja u ovom istraživanju porijeklom su sa obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva (OPG) Vučemilović. Očišćene sjemenke bijele gorušice prikazane su na **Slici 7**.



**Slika 7** Sjemenke bijele gorušice (*Sinapis alba L.*)

U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje na promjenu oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja bijele gorušice. Osušeni listovi biljke kadulje (*Salvia officinalis L.*) prikazani na **Slici 8** usitnjeni su na laboratorijskom mlinu. Prema

Europskoj farmakopeji 10 g usitnjenog uzorka se natopi u 100 mL odabranog otapala, odnosno priprema je izvedena u omjeru 1:10. Za pripremu uzorka korištena je voda, 65%-tni i 96%-tni alkohol etanol. Tinktura je pripremljena klasičnim postupkom maceracije i primjenom ultrazvuka u ultrazvučnoj kupelji **Slika 9**. Ekstrakti koji su pripremljeni klasičnim načinom (maceracija) čuvani su pri sobnoj temperaturi u tamnom prostoru tijekom 24 i 96 sata uz miješanje svaki dan. Primjenom ultrazvuka frekvencije 37 Hz i temperature 30°C tijekom 60 minuta dobiven je ekstrakt kadulje. Nakon toga, ekstrakti kadulje su profiltrirani radi uklanjanja mogućih grubih nečistoća te je provedeno koncentriranje na rotacionom vakuum uparivaču pri 35°C do konačnih 10 mL ekstrakta. Na kraju, ekstrakti su skladišteni u tamnom prostoru pri sobnoj temperaturi do daljnje upotrebe.



**Slika 8** Osušeni listovi kadulje



**Slika 9** Ultrazvučna kupelj

### 3.2.2. Metode rada

#### Proizvodnja ulja pomoću kontinuirane pužne preše

Eksperimentalni rad započinje postupkom hladnog prešanja sjemenki gorušice na laboratorijskoj kontinuiranoj pužnoj preši prikazanoj na **Slici 10** tvrtke „ElektroMotor Šimon“, iz Srbije. Kapacitet preše je 20-25 kg/h sirovine sa snagom elektromotora 1,5 kW.



**Slika 10** Proizvodnja sirovog ulja i izlaz pogače na kontinuiranoj pužnoj preši

Prije samog postupka prešanja analitički je određen udio ulja u sjemenkama (16,52%) i udio vlage (7,23%). Masa polazne sirovine pojedinog uzorka pri prešanju bila je 1 kg, a sjemenke su konstantno dodavane kako bi se spriječio prazan hod preše i začepljenje glave preše. Tijekom prešanja sjemenki gorušice provedeno je 8 uzastopnih pokusa pri različitim procesnim parametrima koji obuhvaćaju veličinu otvora glave preše za izlaz pogače (8, 10 i 12 mm), temperaturu zagrijavanja izlaznog dijela glave preše (90, 100 i 110°C) i različite brzine pužnice pomoću frekvencije elektromotora (20, 25 i 30 Hz). Nakon prešanja dobiveno je sirovo ulje gorušice i pogača kao nusprodukt prešanja. Dobiveno sirovo ulje sakupljeno je u menzuru pomoću koje je očitana volumen ulja i izmjerena temperatura (**Slika 11**), a nakon toga je preneseno u staklenke gdje se taložilo prirodnim putem u trajanju od 13 dana u tamnom prostoru na sobnoj temperaturi. Nakon taloženja, ulje je podvrgnuto vakuum filtraciji preko Büchner-ovog lijevka (**Slika 12**) s ciljem što efikasnijeg uklanjanja netopljivih nečistoća iz ulja. Nakon završene vakuum filtracije očitana je volumen ulja (hladno prešano ulje gorušice) koji predstavlja finalni proizvod.





**Slika 11** Mjerenje volumena i temperature sirovog ulja



**Slika 12** Vakuum filtracija sirovog ulja preko Büchner-ovog lijevka

### 3.2.2.1. Određivanje parametara kvalitete sjemenke gorušice

#### Određivanje udjela ulja u sjemenu gorušice

Udio ulja u sjemenkama gorušice i u pogači određen je standardnom metodom ekstrakcije organskim otapalom po Soxhlet-u (**Slika 13**). Aparatura za ekstrakciju sastoji se od tikvice, ekstraktora i hladila. Kao organsko otapalo korišten je petroleter. U tuljak za ekstrakciju odvagano je 5 g usitnjenog uzorka. Tuljak zatvoren s vatom stavljen je u ekstraktor koji je spojen s hladilom i tikvicom. U ekstraktor je dodano 150 mL petroletera i provedeno je zagrijavanje na vodenoj kupelji. Po završetku ekstrakcije otapalo je predestilirano, a zaostalo ulje u tikvici se suši, hladi te važe.

Udio ulja se izračunava prema izrazu:

$$\text{Udio ulja} = (a - b) \times 100 / c \quad (\%)$$

a – masa tikvice s uljem (g);

b – masa prazne tikvice (g);

c – masa uzorka koji se ispituje (g).



**Slika 13** Ekstrakcija ulja po Soxhlet-u

Na temelju udjela ulja u sirovini i dobivenoj pogači može se izračunati prinos prešanog ulja, odnosno stupanj djelovanja prešanja (Dimić i Turkulov, 2000.).

Količina sirovog ulja dobivenog prešanjem računa se prema formuli (Dimić, 2005.):

$$U = U_o - U_p * (a / b) \quad (\%)$$

U- količina prešanog ulja (%);

U<sub>0</sub> - udio ulja u sirovini (%);

U<sub>p</sub> – udio ulja u pogači (%);

a- suha tvar u sirovini (%);

b- suha tvar u pogači (%).

Formula za izračunavanje stupnja djelovanja prešanja (P) je:

$$P = (U / U_0) * 100 \quad (\%)$$

U-količina prešanog ulja (%);

U<sub>0</sub>-udio ulja u sirovini (%).

#### Određivanje vlage u sjemenu gorušice i pogačama nakon prešanja

Udio vode u sjemenu gorušice i pogačama nakon prešanja određuje se standardnom metodom (ISO 665:1991). U osušenu i izvaganu posudicu odvagano je 5 g prethodno usitnjenog uzorka i stavljeno u sušionik na 103°C kroz 2 sata. Nakon sušenja posudica je prebačena u eksikator na hlađenje do sobne temperature. Nakon hlađenja posudica je izvagana, a cijeli postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa.

Udio vlage izračunava se prema izrazu:

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

m<sub>0</sub> – masa prazne posudice (g);

m<sub>1</sub> – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g);

m<sub>2</sub> – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

### 3.2.2.2. Određivanje parametara kvalitete ulja

Primjenom standardnih metoda određeni su parametri kvalitete ulja kao što su peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vlage i netopljivih nečistoća, jodni broj, saponifikacijski broj, anisidinski broj i totox broj.

#### Određivanje peroksidnog broja (Pbr) po Wheeleru

Metoda se temelji na sposobnosti peroksida da oslobode jod iz otopine kalij-jodida koji se određuje titracijom s otopinom natrij tiosulfata. U tikvicu se odvaži oko 1 g uzorka ulja i doda 10 mL smjese ledene octene kiseline i kloroforma, promiješa te doda 0,2 mL otopine kalij-jodida. Uzorak se točno jednu minutu ručno mućka i razrijedi sa 20 mL prethodno prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom. Na kraju se dodaje 0,5 mL otopine škroba kao indikatora i sve skupa se odmah titrira sa 0,01 M otopinom  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , do promjene boje.

Peroksidni broj računa se prema formuli:

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

$V_1$  – volumen 0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utrošenog za titraciju uzorka ulja (mL);

$V_0$  – volumen 0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utrošenog za titraciju slijepe probe (mL);

$m$  – masa uzorka (g).

#### Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Slobodne masne kiseline određuju se primjenom standardne metode (HRN EN ISO 660:1996) titracijom ulja s 0,1 M otopinom NaOH. Odvaži se 5 g uzorka ulja i dodaje 50 mL neutralne smjese etera i etanola, promućka te doda nekoliko kapi indikatora fenolftaleina i provede titracija s 0,1 M otopinom NaOH do promjene boje (**Slika 14**). Rezultat se prikazuje u % izražen kao oleinska kiselina.

Formula za izračunavanje SMK:

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

gdje je:

$V$  – volumen utrošene otopine NaOH za titraciju uzorka (mL);

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

M – molekularna masa oleinske kiseline (282 g/L);

m – masa uzorka ulja (g).



**Slika 14** Titracija ulja s NaOH

#### Određivanje vlage u ulju

Metoda se temelji na isparavanju vode i hlapljivih tvari iz ulja zagrijavanjem u sušioniku pri točno određenim uvjetima. U prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu staklenu posudicu s poklopcem izvaže se 5-10 g uzorka ulja te se stavi u sušionik na sušenje pri 103°C tijekom 2 sata. Tijekom sušenja u sušioniku poklopac je podignut. Nakon toga posudica se zatvori, ohladi u eksikatoru na sobnu temperaturu i izvaže. Navedeni postupak (sušenje, hlađenje i vaganje) ponavlja se do konstantne mase.

Udio vlage izračunava se prema izrazu:

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

$m_0$  – masa staklene posudice (g);

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

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

### Određivanje netopljivih nečistoća

U ulju se najčešće nalaze mehaničke netopljive nečistoće, a predstavljaju ih mineralne tvari ili organske npr. dijelovi biljke uljarica. Njihov udio u uljima dobre kakvoće je često niži od 0,03%. U Erlenmeyerovu tikvicu sa brušenim grlom izvaže se 20 g uzorka ulja i pomiješa sa 100 mL n-heksana, zatim se dobivena otopina profiltrira kroz stakleni lijevak sa perforiranim dnom. Zaostali netopljivi talog se suši do konstantne mase i važe.

Udio netopljivih nečistoća izračunava se prema formuli:

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

$m_0$  – masa uzorka (g);

$m_1$  – masa osušenog filter-lijevka (g);

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

### Određivanje anisidinskog i totox broja

Zaodređivanje anisidinskog broja korištena je standardna metoda ISO 6885 (2016.) Anisidinski broj definiran je kao povećanje vrijednosti apsorbancije otopine uzorka ulja (1 g) u 100 mL mješavine otapala i reagensa (*p*-anisidina), mjenog na valnoj duljini 350 nm u kivetu od 10 mm. Uzorak ulja je otopljen u izooktanu (2,2,4 trimetilpentane), uz dodatak *p*-anisidina i octene kiseline. Nakon stajanja 10 minuta na tamnom mjestu i pri sobnoj temperaturi. Pomoću spektrofotometra mjereno je povećanje apsorbancije na 350 nm. Anisidinski broj izračunat je prema izrazu:

$$AV = 100 \times Q \times V/m \times [1,2 \times (A_1 - A_2 - A_0)]$$

gdje je:

Q - konstanta 0,01 (g/mL);

V – konstanta 25 mL;

m - masa uzorka u gramima;

A<sub>0</sub> - apsorbancija nereaktivne test otopine;

A1 - apsorbancija reaktivne test otopine;

A2 - apsorbancija slijepe probe;

1,2 - faktor korekcije za razrjeđenje test otopine dodatkom 1 mL ledene octene kiseline.

konstanta 0,01 (g/mL);

Totox broj određuje se računski iz vrijednosti peroksidnog i anisidinskog broja prema izrazu:

$$TV = (2 \times PV) + AV$$

gdje je:

PV – peroksidni broj;

AV – anisidinski broj.

#### Određivanje jodnog broja po Hanušu

Jodni broj ukazuje na nezasićenost ulja ili masti tako što se veže na dvostruke veze masne kiseline, a predstavlja količinu joda u gramima koji se veže na 100 g ulja (g/100 g).

U Erlenmeyerovu tikvicu je odvagano oko 0,2 g ulja, dodano 10 mL kloroforma i 25 mL otopine jodnog monobromida te je promućkana otopina, a zatim zatvorena sa staklenim čepom i ostavljena stajati u tamnoj prostoriji 30 minuta. Nakon odležavanja otopini se dodalo 15 mL KI i oko 150 mL prethodno prokuhane i ohlađene destilirane vode te proveda titracija s 0,1 M otopinom natrij tiosulfata do pojave svijetlo žute boje. Poslije toga se dodalo 1-2 mL otopine škroba i nastavilo titrirati do pojave plave boje otopine što predstavlja završetak titracije. Istim postupkom se provede i slijepa proba ali bez uzorka ulja.

Izračun:

$$\text{Jodni broj} = (a - b) \times 0,01269/c \times 100 \text{ (g/100 g)}$$

a – utrošak mL 0,1 M otopine natrij tiosulfata za titraciju slijepe probe;

b – utrošak mL 0,1 M otopine natrij tiosulfata za titraciju uzorka;

c – masa ispitivanog uzorka.

### Određivanje saponifikacijskog broja

Saponifikacijski broj označava broj mg KOH koji je potreban za potpunu saponifikaciju slobodnih i esterski vezanih masnih kiselina u 1 g masti.

Saponifikacija ulja se vrši pomoću alkoholne otopine KOH u dvije faze. U alkalno-alkoholnoj sredini masne kiseline prelaze u odgovarajuće etilestere. Ti novonastali esteri se lako saponificiraju dajući sapune.

U Erlenmajer od Pyrex stakla izmjereno je oko 2 g ulja i dodano 25 mL 0,5 M otopine KOH. U tikvicu je dodano nekoliko staklenih kuglica te je provedeno zagrijavanje pola sata uz mućkanje dok smjesa nije postala sasvim bistra (**Slika 15**). Poslije završene saponifikacije u vruću otopinu je dodano nekoliko kapi 1% fenolftaleina i provedena je titracija s 0,5 M otopinom HCl do nestanka crvene boje. Istim postupkom je napravljena i slijepa proba samo bez uzorka.

Izračunavanje:

$$\text{Saponifikacijski broj} = (\mathbf{A - B}) \times \mathbf{28,1/Ok}$$

A – mL 0,5 M otopine HCl utrošenih za slijepu probu;

B - mL 0,5 M otopine HCl utrošenih za uzorak ulja;

Ok – odmjerena količina uzorka (g).

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



**Slika 15** Zagrijavanje uzorka



### 3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Schaal Oven testom

#### Priprema uzorka s antioksidansima za ispitivanje oksidacijske stabilnosti

U staklene čašice izvagana je određena količina antioksidansa i dodano 50 g hladno prešanog ulja gorušice te je smjesa homogenizirana staklenim štapićem. Uzorci koji su se koristili u ovom istraživanju i koncentracije dodanih antioksidanasa prikazane su u **Tablici 4**. Uzorci su zagrijavani, uz stalno miješanje, pri temperaturi od 70 do 80°C (**Slika 16**). Nakon što je postignuta željena temperatura, potrebno ju je održavati 30 minuta i paziti da ne prijeđe 80°C. Nakon postupka zagrijavanja uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi te stavljeni u ventilacijski sušionik s konstantnom temperaturom od 63°C. Ovim započinje proces ispitivanja oksidacijske stabilnosti ulja gorušice primjenom Schaal Oven testa.



**Slika 16** Zagrijavanje i miješanje uzorka s dodanim antioksidansima

**Tablica 4** Prikaz dodanih antioksidansa i njihove koncentracije

UZORCI	KONCENTRACIJA ANTIOKSIDANSA		
	(%)		
Hladno prešano ulje bijele gorušice (kontrolni uzorak)			
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH, 24h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 96% EtOH, 24h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, H <sub>2</sub> O, 24h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH, 96h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 96% EtOH, 96h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, H <sub>2</sub> O, 96h	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 65% EtOH, ultrazvuk	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, 96% EtOH, ultrazvuk	0,1	0,2	0,3
HPL ulje + ekstrakt kadulje 1:10, H <sub>2</sub> O, ultrazvuk	0,1	0,2	0,3

HPL – hladno prešano ulje

## Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta kadulje

### DPPH metoda

Antioksidacijska aktivnost ekstrakta lista kadulje određena je spektrofotometrijski DPPH metodom koja mjeri sposobnost nekog antioksidansa da neutralizira stabilni DPPH radikal (DPPH·). Princip metode je redukcija sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrihidrazil radikala (DPPH·) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisutnosti antioksidansa (AH) koji donira jedan vodikov atom i "hvata" slobodni DPPH· radikal te nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A·). Količina inhibiranog DPPH· radikala dokazuje veću ili manju antioksidacijsku aktivnost ispitivanog uzorka.

U 1,2 mL ekstrakta lista kadulje ( $c=1$  mg/mL) dodano je 0,5 mL otopine DPPH· u metanolu (0,3 mmol DPPH·/L). Dobivena reakcijska otopina ostavljena je na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu 30 minuta, a nakon toga vremena je u 1,2 mL reakcijske otopine dodano 0,5 mL metanola te je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija ( $A_{\text{ekst.}}$ ) pri valnoj duljini od 517 nm u odnosu na slijepu probu (1,2 mL uzorka s 0,5 mL metanola, bez dodatka otopine DPPH·). Važno je istaknuti da je otopina DPPH· korištena za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) uvijek svježije pripremana neposredno prije provođenja analize te korištena unutar 24 sata, a između mjerenja čuvana je u hladnjaku na  $+4^{\circ}\text{C}$  prekrivena aluminijskom folijom. Apsorbancija DPPH· otopine ( $A_{\text{DPPH}}$ ) očitavala se pod istim uvjetima kao i uzorci u odnosu na slijepu probu.

Inhibicija DPPH· uslijed antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih ekstrakata izračunata je u postotku (%) prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekst.}} / A_{\text{DPPH}}) \times 100$$

$A_{\text{DPPH}}$  = apsorbancija otopine DPPH· (nm);

$A_{\text{ekst.}}$  = apsorbancija ispitivanog ekstrakta (nm).

### Schaal Oven test

Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja gorušice sa i bez dodatka antioksidansa, ispitana je Schaal Oven testom. Princip ovog testa je zagrijavanje uzoraka ulja u sušioniku pri konstantnoj temperaturi od  $63^{\circ}\text{C}$  (**Slika 17**) te praćenju porasta vrijednosti peroksidnog broja

i senzorske promjene koje nastaju oksidacijom ulja u trajanju od 4 dana. Prije ispitivanja peroksidnog broja potrebno je dobro homogenizirati uzorke staklenim štapićem. Nakon toga, u čaše je izvagano 1 g uzorka (2 paralele) te određen peroksidni broj, a uzorci ulja su ponovno vraćeni u sušionik (**Slika 18**).

Rezultati Schaal Oven testa na ulju bijele gorušice prikazani su kao vrijednosti peroksidnog broja (mmol O<sub>2</sub>/kg).



**Slika 17** Sušionik zagrijan na 63°C



**Slika 18** Uzorci ulja s antioksidansima termostatirani na 63°C u sušioniku

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA PREŠANJA NA ISKORIŠTENJE ULJA

**Tablica 5** Utjecaj veličine nastavka za izlaz pogače na iskorištenje ulja tijekom prešanja bijele gorušice

N – veličina otvora glave preše, definira promjer pogače (mm); F – frekventni regulator elektomotora, regulira

Uzorak	Masa polazne sirovine (kg)	Volumen sirovog ulja (mL)	Volumen finalnog ulja (13 dana taloženje i vakuum filtracija) (mL)	Temp. sirovog ulja (°C)	Masa dobivene pogače (g)	Udio ulja u pogači (%)	Udio vode u pogači (%)	Stupanj djelovanja preše (%)
N = 12mm F = 25 Hz T = 80 °C	1	150	110	36	628,08	13,97	7,80	15,53
N = 10mm F = 25 Hz T = 80°C	1	150	118	37	653,85	13,69	8,44	17,35
N=8mm F = 25 Hz T = 80 °C	1	170	130	37	605,77	12,00	8,28	27,67

brzinu pužnice preše (Hz); T – temperatura grijača glave preše kod izlaza pogače (°C)

**Tablica 6** Utjecaj frekvencije elektromotora (brzine pužnice) na iskorištenje ulja tijekom prešanja bijele gorušice

Uzorak	Masa polazne sirovine (kg)	Volumen sirovog ulja (mL)	Volumen finalnog ulja (13 dana taloženje i vakuum filtracija) (mL)	Temp. sirovog ulja (°C)	Masa dobivene pogače (g)	Udio ulja u pogači (%)	Udio vode u pogači (%)	Stupanj djelovanja preše (%)
N = 8mm F = 20 Hz T = 80 °C	1	170	132	37	605,52	11,80	8,23	28,88
N = 8mm F = 25 Hz T = 80 °C	1	170	130	37	605,77	12,00	8,28	27,67
N= 8 mm F = 30 Hz T = 80 °C	1	165	119	38	601,45	13,73	7,84	17,00

**Tablica 7** Utjecaj temperature zagrijavanja glave preše na iskorištenje ulja tijekom prešanja bijele gorušice

Uzorak	Masa polazne sirovine (kg)	Volumen sirovog ulja (mL)	Volumen finalnog ulja (13 dana taloženje i vakuum filtracija) (mL)	Temp. sirovog ulja (°C)	Masa dobivene pogače (g)	Udio ulja u pogači (%)	Udio vode u pogači (%)	Stupanj djelovanja preše (%)
N = 8 mm F = 30 Hz T = 80°C	1	165	119	38	601,45	13,73	7,84	17,00
N = 8mm F = 30 Hz T = 90 °C	1	170	120	43	618,55	13,58	8,05	17,96
N = 8mm F = 30 Hz T = 100°C	1	170	115	45	613	12,70	7,81	23,27
N = 8 mm F = 30 Hz T = 110°C	1	160	115	48	618	12,70	7,71	23,24

**Tablica 8** Osnovni parametri kvalitete proizvedenog hladno prešanog ulja bijele gorušice

Parametar kvalitete	Vrijednost
Peroksidni broj (Pbr), mmol O <sub>2</sub> /kg	0,0
Slobodne masne kiseline (SMK), %	0,17
Jodni broj, g J <sub>2</sub> /100 g	94,35
Saponifikacijski broj, mg KOH/g ulja	175,63
Anisidinski broj (Abr)	0,29
Totox broj (TV)	0,29
Voda, %	0,09
Netopljive nečistoće (NN), %	0,20

## 4.2. UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANSA NA STABILIZACIJU ULJA

**Tablica 9** Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja bijele gorušice sa i bez dodatka antioksidansa, određena Schaal Oven testom na 63°C tijekom 4 dana

	Uzorak	0. DAN	1. DAN			2. DAN		
			0,1%	0,2%	0,3%	0,1%	0,2%	0,3%
		Pbr (mmol O <sub>2</sub> /kg)						
	Hladno prešano ulje bijele gorušice	--	0,51			0,76		
1.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, 24 h	0	0	0	0	0,50	0,50	0,75
2.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, 24 h		0	0	0	0,26	0,51	0,77
3.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, 24 h		0	0,25	0	0,50	0,49	0,51
4.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, 96 h		0	0	0	0,51	0,49	0,75
5.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, 96 h		0	0	0	0,25	0,25	0,75
6.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, 96 h		0	0	0	0,50	0,48	0,51
7.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, ultrazvuk		0	0	0	0,49	0,51	0,76
8.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, ultrazvuk		0	0	0	0,25	0,50	0,50
9.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, ultrazvuk		0	0	0,25	0,51	0,49	0,50



Nastavak **Tablice 9**

	Uzorak	3. DAN			4. DAN		
		0,1%	0,2%	0,3%	0,1%	0,2%	0,3%
		Pbr (mmol O <sub>2</sub> /kg)					
	Hladno prešano ulje bijele gorušice	2,53			5,03		
1.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, 24 h	1,49	1,75	3,52	4,57	4,53	7,04
2.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, 24 h	0,99	1,51	2,56	4,31	4,00	6,57
3.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, 24 h	1,97	2,00	1,50	4,80	5,00	5,50
4.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, 96 h	1,94	1,76	3,98	4,85	4,30	7,96
5.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, 96 h	1,00	1,01	4,04	3,45	3,50	6,93
6.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, 96 h	1,99	1,97	3,05	4,48	5,00	6,47
7.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 65 % EtOH, ultrazvuk	2,00	1,71	2,93	4,83	4,90	5,00
8.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, 96 % EtOH, ultrazvuk	1,50	0,99	2,46	3,48	3,90	5,00
9.	Ulje + ekstrakt kadulje, 1:10, H <sub>2</sub> O, ultrazvuk	2,25	1,95	2,54	5,08	4,88	4,53

**Tablica 10** Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakta kadulje (DPPH metoda)

Redni broj	Opis tinkture	DPPH (%) c=125 µg/mL	Ukupni polifenoli (mg GAE/L) c=1 mg/mL
1.	1:10 H <sub>2</sub> O, 24 h	7,045±0,383	18,282±0,444
2.	1:10 65 % EtOH, 24 h	47,510±0,888	43,410±3,109
3.	1:10 96 % EtOH, 24 h	23,497±0,546	18,538±0,769
4.	1:10 H <sub>2</sub> O, 96 h	15,345±0,192	8,795±0,444
5.	1:10 65 % EtOH, 96 h	73,737±0,711	68,795±1,175
6.	1:10 96 % EtOH, 96 h	55,404±0,293	47,256±1,601
7.	1:10 H <sub>2</sub> O, ultrazvuk, 1 h	57,728±0,443	62,897±1,936
8.	1:10 65 % EtOH, ultrazvuk, 1 h	73,220±0,523	58,026±1,601
9.	1:10 96 % EtOH, ultrazvuk, 1 h	30,874±0,064	26,744±4,237

## **5. RASPRAVA**

Prije samog procesa prešanja određen je udio ulja u sjemenkama bijele gorušice koji je iznosio 16,52% te udio vode 7,23%. Količina sirovine za prešanje kod izvođenja pojedinog pokusa iznosila je 1 kg nesamljevene sjemenke bijele gorušice.

Rezultati ispitivanja utjecaja procesnih parametara prešanja na iskorištenje hladno prešanog ulja gorušice prikazani su u **Tablicama 5-7**.

Tijekom hladnog prešanja sjemenki gorušice, prvo je ispitan utjecaj veličine nastavka za izlaz pogače, a korišteni su nastavci promjera otvora  $N= 12$  mm, 10 mm i 8 mm. U **Tablici 5** prikazan je utjecaj nastavka na glavi preše za izlaz pogače na iskorištenje ulja tijekom prešanja. Vrijednost frekvencije elektromotora i temperatura grijače glave preše su bili konstantni tijekom procesa prešanja ( $T=80^{\circ}\text{C}$ ,  $F=25$  Hz).

Primjenom nastavka promjera 12 mm dobivena je najmanja količina proizvedenog sirovog ulja, a iznosila je 150 mL s temperaturom koja je imala vrijednost  $36^{\circ}\text{C}$ . Nakon taloženja prirodnim putem u trajanju od 13 dana i vakuum filtracije volumen dobivenog hladno prešanog ulja je iznosio 110 mL. Stupanj djelovanja preše bio je najmanji, a iznosio je 15,53%, dok je udio zaostalog ulja u pogači bio najveći 13,97%.

Korištenjem nastavka veličine 10 mm dobivena je ista količina sirovog ulja (150 mL), a temperatura ulja je iznosila  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon sedimentacije i filtracije ulja dobiveno je hladno prešano ulje gorušice u volumenu od 118 mL. Udio ulja u pogači iznosio je 13,69%, a stupanj djelovanja preše 17,35%.

Primjenom veličine nastavka od 8 mm dobivena je najveća količina sirovog ulja, volumen je 170 mL i temperatura ulja  $37^{\circ}\text{C}$  te najveća količina finalnog ulja koja je iznosila 130 mL. Stupanj djelovanja preše bio je najveći, a iznosio je 27,67%. Analitički je utvrđen udio zaostalog ulja u pogači od 12%. Korištenjem nastavka manjeg promjera u preši dolazi do stvaranja većeg procesnog tlaka što rezultira većim izdvajanjem sirovog ulja uz zaostajanje manje količine ulja u pogači.

U **Tablici 6** prikazan je utjecaj frekvencije elektromotora (brzine pužnice) na iskorištenje ulja bijele gorušice. Frekvencije elektromotora koje su korištene tijekom prešanja su 20 Hz, 25 Hz i 30 Hz, uz konstantnu temperaturu grijača glave preše ( $80^{\circ}\text{C}$ ) i nastavka za izlaz pogače (8 mm). Prešanjem gorušice pri 20 Hz dobiveno je 170 mL sirovog ulja više nego kod frekvencije

od 30 Hz gdje je dobiveno 165 mL sirovog ulja. Volumen finalnog ulja korištenjem frekvencije od 20 Hz bio je 132 mL, a kod 25 Hz iznosio je 130 mL, dok je zaostatak ulja u pogačama iznosio podjednako u obje frekvencije. Najmanji volumen proizvedenog sirovog i finalnog ulja s najvećim zaostatkom ulja u pogači postignut je kod primjene frekvencije od 30 Hz, kao i najmanji stupanj djelovanja preše.

**Tablica 7** prikazuje utjecaj temperature zagrijavanja glave preše (80°C, 90°C, 100°C i 110°C) na iskorištenje ulja gorušice. Nastavak na glavi preše koji je korišten pri ovim ispitivanjima je 8 mm, a brzina pužnice je podešena na 30 Hz. Pri temperaturi glave preše od 80°C i 90°C dobiveno je 165 i 170 mL sirovog ulja, kod 100°C također je dobiveno 170 mL sirovog ulja, a pri temperaturi od 110°C je 160 mL. Nakon sedimentacije i filtracije sirovog ulja veća količina hladno prešanog ulja gorušice dobivena je kod temperature glave preše 80°C i 90°C, a iznosila je 119 i 120 mL. Kod temperature 100°C količina hladno prešanog ulja iznosila je 115 mL, a kod temperature od 110°C dobiveno je 115 mL hladno prešanog ulja. Temperature sirovog ulja na izlazu iz preše su u granicama Pravilnika o jestivim uljima i mastima (NN 41/12) jer ne prelaze granicu od 50°C. Najmanja temperatura sirovog ulja 38°C izmjerena je kod temperature grijača glave preše 80°C.

U **Tablici 8** prikazani su rezultati osnovnih parametara kvalitete hladno prešanog ulja gorušice. Navedeni rezultati ukazuju na to da je proizvedeno hladno prešano ulje bijele gorušice dobre kvalitete te su parametri kvalitete u skladu s Pravilnikom. Uz osnovne parametre kvalitete ispitane su i karakteristike za identifikaciju ulja gorušice (saponifikacijski broj i jodni broj). Izračunata vrijednost za jodni broj je 94,35 g J<sub>2</sub>/100g ulja, dok je vrijednost saponifikacijskog broja 175,63 mg KOH/g ulja. Izračunate vrijednosti anisidinskog broja koji ukazuju na "oksidacijsku prošlost" ulja i Totox broja (predstavlja ukupnu oksidacijsku vrijednost ulja) pokazuju da je hladno prešano ulje bijele gorušice izrazito dobre kvalitete.

Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja bijele gorušice, sa i bez dodatka antioksidansa određena Schaal Oven testom na 63°C tijekom 4 dana prikazana je u **Tablici 9**. Rezultati testa prikazani su preko vrijednosti peroksidnog broja (Pbr). Početna vrijednost Pbr hladno prešanog ulja bijele gorušice prije testa iznosila je 0 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja. Hladno prešano ulje bijele gorušice bez dodatka antioksidansa (kontrolni uzorak) imalo je vrijednost peroksidnog broja (5,03 mmol O<sub>2</sub>/kg) nakon 4 dana testa. Rezultati testa pokazuju da se vrijednost Pbr

tijekom 4 dana postepeno povećavala ovisno o dodanom antioksidansu i njegovoj koncentraciji.

Pripremom ekstrakta kadulje sa etanolom (65% i 96%) uz tretiranje ultrazvukom dobiven je prirodni antioksidans čijom se primjenom za stabilizaciju ulja gorušice postigla veća efikasnost zaštite ulja od oksidacijskog kvarenja kod dodane koncentracije 0,1% u odnosu na 0,2% i 0,3%. Ekstrakt kadulje s vodom uz tretiranje ultrazvukom pokazao je veću efikasnost zaštite ulja kod koncentracije od 0,3% u odnosu na 0,1% i 0,2%. Kod primjene ekstrakta kadulje pripremljenih sa etanolom (65% i 96%) tijekom 24 sata, bez tretiranja ultrazvukom, ostvarena je veća zaštita ulja kod koncentracije 0,2% u odnosu na 0,1 i 0,3. Kod pripreme ekstrakta sa vodom tijekom 24 sata bolja zaštita ulja od oksidacije ostvarena je dodatkom 0,1%. Primjenom ekstrakta kadulje u vodi tijekom 96 sati, bez tretiranja ultrazvukom i bez dodatka vode u ulje gorušice, bolja efikasnost zaštite ulja od oksidacije postignuta je uglavnom kod koncentracije 0,2% u odnosu na 0,1% i 0,3%.

Uzorak ulja s dodatkom 0,3% ekstrakta kadulje koji je pripremljen s 65% i 95% etanolom te sa vodom tijekom 24h i 96h nije pokazao zaštitu od oksidacijskog kvarenja jer dobiveni podaci prelaze vrijednost Pbr kontrolnog uzorka.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista kadulje određena spektrofotometrijski DPPH metodom i sadržaj ukupnih polifenola istih prikazana je u **Tablici 10**. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak ekstrakta kadulje pripremljen maceracijom s etanolom (65%-tni) tijekom 96 sati. Navedeni uzorak je tijekom provođenja DPPH metode inhibirao najveću količinu DPPH• radikala upravo iz razloga što ima najveći udio ukupnih polifenola ( $68,795 \pm 1,175$  mg GAE/L).

Nakon završetka provedbe Oven testa ispitana su senzorska svojstva tretiranih uzoraka. Ulje gorušice je nakon dodavanja prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje u različitim koncentracijama zadržalo svoju karakterističnu boju i miris te time pokazalo svoju izvrsnu kvalitetu, odnosno stabilnost.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja procesnih parametara hladnog prešanja i dodatka ekstrakta kadulje na iskorištenje ulja gorušice i na oksidacijsku stabilnost, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Veličina nastavka za izlaz pogače na glavi preše ima utjecaj na iskorištenje ulja gorušice. Korištenjem nastavka manjeg promjera (8 mm) dobiven je veći volumen sirovog i finalnog ulja, dok je udio zaostalog ulja u pogači bio najmanji.
2. Frekvencija elektromotora za regulaciju brzine pužnice ima utjecaj na iskorištenje ulja. Što je veća frekvencija udio sirovog i finalnog ulja je manji, a zaostatak ulja u pogači veći.
3. Temperatura grijača glave preše utječe na iskorištenje ulja gorušice. Što je temperature grijača glave preše niža dobije se veći volumen finalnog ulja.
4. Osnovni parametri kvalitete proizvedenog hladno prešanog ulja gorušice u sladu su s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima.
5. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak ekstrakta kadulje pripremljen maceracijom s etanolom (65%-tni) tijekom 96 sati jer sadrži najveću količinu ukupnih polifenola.
6. Dodatkom prirodnog antioksidansa ekstrakta kadulje udjela 0,1% i 0,2% u hladno prešano ulje gorušice došlo je do porasta oksidacijske stabilnosti ulja.
7. Najbolje antioksidacijsko djelovanje pokazao je uzorak ekstrakta kadulje pripremljen s 96% etanolom tijekom 96 sati sa i bez tretiranja ultrazvukom kod koncentracije od 0,1%.
8. Uzorci ulja s dodatkom 0,3% ekstrakta kadulje pripremljeni s 65% i 95% etanolom te sa vodom tijekom 24h i 96h nisu pokazali zaštitu od oksidacijskog kvarenja.



## **7. LITERATURA**

Ahn JH, Kim YP, Seo EM, Choi YK, Kim HS: Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering* 84: 327-334, 2008.

Antova GA, Angelova-Romova MI, Petkova ZhY, Teneva OT, MarcheVA MP: Lipid composition of mustard seed oils (*Sinapis alba L.*). 55-60, 2016.

Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Loligers J: Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 2: 257-268, 1992.

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

Bockisch M: *Fats and oils handbook*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1998.

Broadbent CJ, Pike OA: Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 80: 59-63, 2003.

Caggiula AW, Mustad VA: Effect of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total lipoprotein cholesterol concentrations. *Epidemiologic studies, Am. J. Clin. Nutr.*, 65 (suppl), 1597S-1610S, 1997.

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

Dent M, Bursać Kovačević D, Bosiljkov T, Dragović-Uzelac V: Polyphenolic Composition of Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis L.*). *Croatica Chemica Acta* 90 (3):451-459, 2017.

Dimić E, Radoičić J, Lazić V, Vukša V: *Jestiva nerafinirana ulja suncokreta – Problemi i perspektive*, Tematski Zbornik, Novi Sad, 2002.

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

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

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

Huang CJ, Lee HJ, Hau LB: *Chung-Kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih*, 175, 1990.

Inatani R, Nakatani N, Fuwa H, Antioxidative: Effect of the Constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:3, 521-528, 2014.

Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Petecka M, Buslovych O, Shlyapnikov VA, Wieczorek PP: *Antioxidant phenolic compounds in Salvia officinalis L. and Salvia sclarea L.* *Ecological Chemistry and Engineering S*, 25 (1), 133-142, 2018.

Jham GN, Moser BR, Shah SN, Holser RA, Dhingra OD, Vaughn SF, Berhow MA, Winkler-Moser JK, Isbell TA, Holloway RK, Walter EL, Natalino R, Anderson JC, and Stelly DM: Wild Brazilian Mustard (*Brassica juncea* L.) Seed Oil Methyl Esters as Biodiesel Fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 917-926, 2009.

Jokić S, Moslavac T, Aladić K, Bilić M, Ačkar Đ, Šubarić D: Hazelnut oil production using pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Hemijska Industrija* 70 (4):359-366, 2016.

Koprivnjak O: *Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola*. MIH d.o.o., Poreč, 2006.

Laubli MW, Bruttal PA: *Determination of the Oxidative Stability of Fats and Oils: Comparison between the Active Oxygen Method (AOCS cd 12-57) and the Rancimat Method*, *Journal of the American Oil Chemist Society* 63, 792-793, 1986.

Martin-Polvillo M, Marquez-Ruiz G, Dobarganes, MC: Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. *Journal of the American Oil Chemists Society* 81: 577-583, 2004.

Merrill LI, Pike OA, Ogden LV: Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 85: 771-776, 2008.

Moslavac T: *Tehnologija ulja i masti*, nastavni materijali, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2013.

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

Özcan Musa M, Arslan D: Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, 129, 171-174, 2011.

Patterson HBW: Hydrogenation of fats and oils. Science publishers LTD, RippleRoad, Barking, Essex, England, 1983.

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

Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M: Antioxidants in food. Woodhead Publishing, USA, 2001.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 41/12

Rac M: *Ulja i masti*, Privredni pregled, Beograd, 1964.

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

Reuben C: Antioksidansi-cjeloviti vodič, Izvori, Zagreb, 1998.

Ryan E, Galvin K, O'Connor TP, Maguire AR, O' Brein NM: Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Food Hum. Nutr.* 62, 85-91, 2007.

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

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

Shrestha K, Gemechu FG, De Meulenaer B: A novel insight on the high oxidative stability of roasted mustard seed oil in relation to phospholipid, Maillard type reaction products, tocopherol and canolol contents. *Food Res. Int.* 54, 587-594, 2013.

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

Šego J: Oksidacija lipida. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultete, Osijek, 2011.

Teh SS, Birch J: Physicochemical and quality characteristics of cold-pressen hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30 (26-31), 2013.

Thomas J, Kuruvilla KM and Hrideek TK: Mustard. U: *Handbook of Herbs and Spices*, (Peter, K. V., ured.), Woodhead Publishing, Philadelphia, str. 388-398, 2012.

Vaidya B, Choe E: Effects of Seed Roasting on Tocopherols, Carotenoids, and Oxidation in Mustard Seed Oil During Heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 83-90, 2010.

Vidyasagar K, Arya SS, Premevali KS, Parihar DB, Nath H, J. Food Sci. Technol., 11, 73, 1974.

Volmut K: Oksidacijska stabilnost biljnih ulja s dodatkom propil galata i ekstrakta ružmarina. Specijalistički rad. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

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