Utjecaj antioksidanasa i sinergista na održivost hladno prešanog ulja šafranike

Marjanović, Mirjana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:155263

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Mirjana Marjanović

UTJECAJ ANTIOKSIDANASA I SINERGISTA NA ODRŽIVOST HLADNO PREŠANOG ULJA ŠAFRANIKE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2015.

Zahvaljujem svojim roditeljima, braći i sestri koji su mi omogućili studiranje i bili nezamjenjiva podrška tijekom cjelokupnog školovanja. Hvala im na svakoj brizi, pomoći i razumijevanju. Bez njih ne bih uspjela!

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc Tihomiru Moslavcu koji mi je pomogao u odabiru teme i savjetovanju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem tehničarki Danieli Paulik na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada te na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
DIPLOMSKI RAD
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 VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 26. svibnja 2015.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac

UTJECAJ ANTIOKSIDANASA I SINERGISTA NA ODRŽIVOST HLADNO PREŠANOG ULJA ŠAFRANIKE

Mirjana Marjanović 229-DI

Sažetak:
Šafranika (*Chartamus tinctorus* L.) je biljka koja ima sve veću primjenu u proizvodnji jestivih ulja. Međutim, kao i svaka druga vrsta ulja, ulje šafranike je podložno oksidacijskim promjenama koje utječu na njegovu nutritivnu vrijednost, te kemijska i senzorska svojstva.
U ovom radu je ispitivana održivost hladno prešanog ulja šafranike uz dodatak prirodnih antioksidanasa te sinergista. Od antioksidanasa korišteni su: ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS), ekstrakt maslinovog lista, ekstrakt nara, u koncentracijama 0,1 i 0,3%, te eterična ulja majčine dušice, bosiljka i rtanjskog čaja u koncentraciji 0,05%. Istražen je i utjecaj sinergista, limunske kiseline, u koncentraciji 0,01% u kombinaciji s ekstraktom ružmarina (0,1%), te limunske kiseline i ekstrakta zelenog čaja (0,1%). Test održivosti ulja šafranike je proveden testom ubrzane oksidacije ulja, Schaal oven testom, na temperaturi 63 ^{o}C.
Održivost ulja šafranike je prikazana kroz peroksidni broj tijekom četiri dana provedbe Oven testa. Najveću učinkovitost na održivost ulja pokazao je ekstrakt ružmarina (Oxy'Less CS) u koncentraciji 0,3%, u odnosu na druge antioksidanse. Primjena sinergista limunske kiseline s ekstraktom ružmarina (Oxy'Less CS 0,1%) pokazala je približno iste vrijednosti peroksidnog broja kao i sam ekstrakt ružmarina (0,3%). Limunska kiselina i ekstrakt zelenog čaja (0,1%) su rezultirali nešto višim vrijednostima peroksidnog broja u odnosu na sam ekstrakt zelenog čaja (0,3%). Eterično ulje majčine dušice pokazuje veću zaštitu ulja šafranike od oksidacije.

Ključne riječi: ulje šafranike, održivost ulja, prirodni antioksidansi, sinergisti

Rad sadrži: 55 stranice
11 slika
9 tablica
51 literaturna referenca

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. Andrija Pozderović	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac	član - mentor
3.	Izv. prof. dr. sc. Vedran Slačanac	član
4.	izv. prof. dr. sc. Jurislav Babić	zamjena člana

Datum obrane: 10. rujan 2015.

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.VIII. held on May 26, 2015.
Mentor:	Tihomir Moslavac, PhD, associate prof.

THE IMPACT OF ANTIOXIDANS AND SYNERGIST ON VIABILITY COLD-PRESSED SAFFLOWER OIL

Mirjana Marjanović 229-DI

Summary:
Safflower (*Chartamus tinctorius* L.) is a plant that has been increasingly used in the production of edible oils. However, like any other type of oil, safflower oil is susceptible to oxidative changes affecting it's nutritional value, as well as chemical and organoleptic properties.
In this study we investigated the viability oc cold-pressed safflower oil with the addition of natural antioxidants and synergists. The antioxidants used in this study are: green tea extract, rosemary extract (Oxy'Less CS), olive leaf extract, pomegranate extract, at concentrations of 0,1% and 0,3%, thyme and basil volatile oil as well as savory tea volatile oil at concentration of 0,05%. Also, investigated the influence of the synergist, citric acid in a concentration of 0,01% in combination with rosemary extract (0,01%), and citric acid and green tea extract (0,1%). Testing sustainability safflower oil is implemented accelerated oxidation test oil, Schaal oven test at 63 ^{o}C.
Sustainability safflower oil is show through the peroxide value, during the four days of the implementation of the oven test. The higest efficiency of oil is shown on the rosemary extract (Oxy'Less CS) at the concentration of 0,3% comapred to other antioxidans. Application synergist of citric acid with rosemary extract (Oxy'Less CS 0,1%) showed approximately the same peroxide value like rosemary extract (0,3%). Citric acid and green tea extract (0,1%) resulted in some higher peroxide value as compared to the green tea extract.
The essential oil of thyme shows greater protection sufflower oil from oxidation.

Key words: safflower oil, oil viability, natural antioxidants, synergists

Thesis contains:
55 pages
11 figures
9 tables
51 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	Andrija Pozderović, PhD, associate prof.	chair person
2.	Tihomir Moslavac, PhD, associate prof.	supervisor
3.	Vedran Slačanac PhD, associate prof.	mentor
4.	Jurislav Babić, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: 10. September 2015.

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

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. JESTIVA BILJNA ULJA 4

2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA 9

2.2.1. Ulje šafranike 10

2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA 12

2.4. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA 17

2.4.1. Antioksidansi 17

2.4.1.1. Sintetski antioksidansi 19

2.4.1.2. Prirodni antioksidansi 21

2.4.2. Sinergisti 22

2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA 24

2.6. ODRŽIVOST ILI OKSIDACIJSKA STABILNOST 27

3. EKSPERIMENTALNI DIO 31

3.1. ZADATAK 32

3.2. MATERIJALI I METODE 32

3.2.1. Materijali 32

3.2.1.1. Hladno prešano ulje šafranike 32

3.2.1.2. Antioksidansi 32

3.2.1.3. Sinergisti 34

3.2.2. Metode rada 35

3.2.2.1. Određivanje parametara kvalitete ulja 35

3.2.2.2. Priprema uzorka za ispitivanje oksidacijske stabilnosti 36

3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Schaal oven testom 37

4. REZULTATI 39

5. RASPRAVA 43

6. ZAKLJUČCI 46

7. LITERATURA 51

Popis oznaka, kratica i simbola

Abr	Anisidinski broj
BG	Butil galat
BHA	Butil hidroksianisol
BHT	Butil hidroksitoluen
DG	Dodecil galat
DHA	Dokosaheksaenska kiselina
DPA	Dokosapentaenska kiselina
EDTA	Etilendiamin tetra-acetat
EGCG	Epigalokatehin galat
EPA	Eikosapentaenska kiselina
OG	Oktil galat
Pbr	Peroksidni broj
PF	Zaštitni faktor
PG	Propil galat
SFA	Zasićene masne kiseline
SMK	Slobodne masne kiseline
TBHQ	Tercijarni butilhidrokinon

1. UVOD

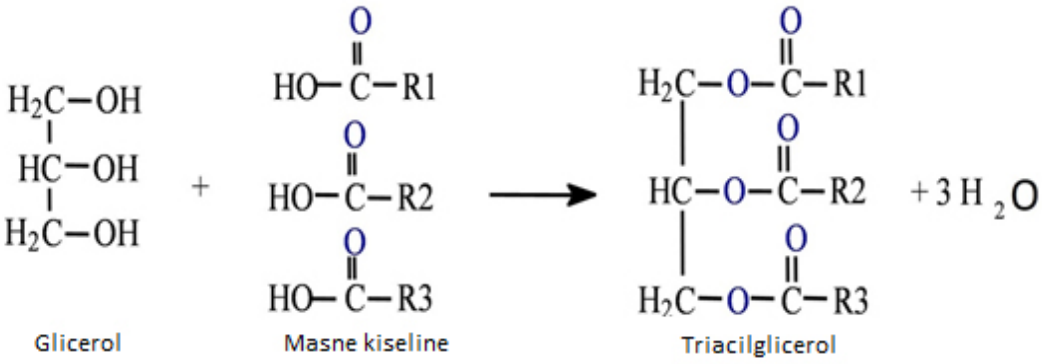
Jestiva biljna ulja imaju ograničeno vrijeme trajnosti jer podliježu enzimskim i mikrobiološkim promjenama koje su nepoželjne, te rezultiraju kvarenjem ulja. Najčešće je oksidacijsko kvarenje ulja, a to je zapravo proces oksidacije ugljikovodikovog lanca masne kiseline. Oksidacijsko kvarenje biljnih ulja tijekom primjene ili skladištenja dovodi do niza nepoželjnih reakcija poput polimerizacije, hidrolize, izomerizacije, ciklizacije i dr. (Dimić, 2005.). Ovisno o sastavu biljnih ulja, proces kvarenja ulja, a samim time i njegova trajnost je različita. Prooksidansi kao što su metalni ioni ili drugi radikalni inicijatori su tvari koje ubrzavaju proces autooksidacije ulja, te inhibiraju aktivnost antioksidanasa. Antioksidansi se često dodaju u jestiva ulja jer djeluju u smijeru usporavanja reakcija oksidacije, ali se mogu i prirodno nalaziti u njima (Gunstone i Norris, 1983.). Poznati su brojni sintetski i prirodni antioksidansi koji se koriste za stabilizaciju biljnih ulja, ali se danas više preferiraju prirodni antioksidansi (Frega i sur., 1999.). Produkti autooksidacije ulja u malim količinama narušavaju kvalitetu ulja, te utječu negativno na okus i miris (Broadbent i Pike, 2003.). Stabilnost ulja predstavlja otpornost prema autooksidaciji kod propisanih uvjeta tretiranja. Mjeri se u vremenskim jedinicama potrebnim za određivanje stupnja oksidacije koji se podudara s organoleptičkom detekcijom okusa ili da se postigne završetak perioda indukcije, ako se mjeri apsorpcija kisika ili analiitički određuju peroksidi. Budući da je ovo vrijeme predugo, primjenjuju se testovi ubrzane oksidacije (Swern, 1972.). U praksi se primjenjuju metode kao što su Schaal ili Oven test, AOM ili Swift test i Rancimat test (Shahidi, 2005.;Przybylski, 1993.; Suja, 2004.; Abramović, 2006.; Farhoosh, 2008.; Farhoosh, 2009.).

Ispitivanje oksidacijske stabilnosti hladno prešanog ulja šafranike koje pripada u skupinu ulja oleinskog i linolnog tipa kao i utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa i sinergista na održivost ulja provedeno je Schaal oven testom koji se temelji na ubrzanoj oksidaciji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JESTIVA BILJNA ULJA

Masti i ulja su u vodi netopljive tvari biljnog ili životinjskog podrijetla koje sadrže estere glicerola i masih kiselina, tzv. trigliceride ili triacilglicerole. Animalne masti su trigliceridi koji su pri sobnoj temperaturi u čvrstom agregatnom stanju, dok su biljna ulja tekuća. Trigliceridi su kondenzacijski produkti molekule glicerola i triju mlekula masnih kiselina. Masne kiseline su reaktivni dio molekule triglicerida te imaju veliki utjecaj na njegova kemijska i fizikalna svojstva (Swern, 1972.).



Slika 1 Struktura triacilglicerola (triglicerida)

Prirodni lipidi se s obzirom na sastav i strukturu dijele na:

- jednostavne lipide,
- složene lipide,
- derivate lipida.

Jednostavni lipidi

Jednostavni lipidi su trigliceridi masnih kiselina, koji se najčešće mogu naći u prirodi uz prisutnost manjih količina lipida iz drugih grupa, te voskova. Voskovi su esteri viših masnih kiselina i viših masnih alkohola (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Složeni lipidi

Složeni lipidi obuhvaćaju fosfolipide, glikolipide, aminolipide, sulfolipide. Negliceridne sastojke prirodnih ulja čine voskovi, karoteni, fosfatidi, steroli, liposolubilni vitamini (A, D, E), tokoferoli, pigmenti (klorofil, gosipol), aldehidi, ketoni, tragovi metala, masni alkoholi i glikozidi. U prirodnim uljima udio negliceridnih sastojaka je najčešće od 1 do 2%. Izuzetno, kod sojinog i pamukovog ulja taj udio je i do 3,5% (Oštrić-Matijašević i Turkuov, 1980.).

Derivati lipida

Derivati lipida obuhvaćaju masne kiseline, ugljikovodike (karotene), sterole (alkohole), vitamin D, vitamin E (Swern, 1972.).

Steroli su ciklički organski spojevi s jednom alkoholnom skupinom, pa imaju karakter alkohola. U svom sastavu nemaju masne kiseline i nisu masnoća u pravom smislu, ali se sterolna jezgra sintetizira iz razgradnih produkata masnih kiselina (Mandić, 2007).

U prirodnim uljima i mastima dolazi jako veliki broj masnih kiselina, prevladavaju masne kiseline nerazgranatog lanca, s parnim brojem ugljikovih atoma i s jednom karboksilnom skupinom. Masne kiseline se međusobno razlikuju prema broju ugljikovih atoma u molekuli, zasićenosti ili nezasićenosti ugljikovog atoma te po broju i položaju dvostrukih veza. U molekuli svake masne kiseline (RCOOH) ima dva dijela: ugljikovodična skupina R i karboksilna skupina COOH. Karboksilna skupina je karakteristična po hidroksilnoj OH i karbonilnoj skupini C=O (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Glavna podjela masnih kiselina je prema stupnju zasićenosti na:

- nezasićene masne kiseline
- zasićene masne kiseline

S obzirom na broj ugljikovih atoma u ugljikovodičnom lancu masne kiseline se dijele na:

- masne kiseline kratkog lanca (do 8 ugljikovih atoma)
- masne kiseline srednjeg lanca (od 8 do 12 ugljikovih atoma)
- masne kiseline dugačkog lanca (više od 12 ugljikovih atoma) (Swern, 1972).

Zasićne masne kiseline

Zasićene masne kiseline (SFA) su masne kiseline gdje su svi ugljikovi atomi u lancu zasićeni atomima vodika i nema dvostrukih veza između atoma ugljika. Ove kiseline su slabo reaktivne za reakcije u lancu. U prirodnim uljima i mastima najčešće dolaze masne kiseline od C_4 do C_{22}. Masne kiseline s 24 i 26 C atoma dolaze u voskovima.

Povećanjem broja ugljikovih atoma u lancu masne kiseline raste i njihova točka topljenja. U biljnim i animalnim mastima najviše su zastupljene: laurinska, miristinska, palmitinska i stearinska kiselina. Zasićene masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma se pojavljuju u tragovima u prirodnim mastima kao i masne kiseline s brojem ugljikovih atoma većim od C_{24} (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Tablica 1 Najčešće zasićene masne kiseline (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.)

Broj C atoma	Naziv	Sistematsko ime	Formula
4	Maslačna	n-butanska	$CH_3(CH_2)_2COOH$
6	Kapronska	n-heksanska	$CH_3(CH_2)_4COOH$
8	Kaprilna	n-oktanska	$CH_3(CH_2)_6COOH$
10	Kaprinska	n-dekanska	$CH_3(CH_2)_8COOH$
12	Laurinska	n-dodekanska	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
14	Miristinska	n-tetradekanska	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
16	Palmitinska	n-heksadekanska	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
18	Stearinska	n-oktadekanska	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
20	Arahinska	n-eikosanska	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
22	Behenska	n-dokosanska	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
24	Lignocerinska	n-tetrakosanska	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
26	Cerotinska	n-heksakosanska	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$

Nezasićene masne kiseline

Nezasićene masne kiseline imaju jednu ili više dvostrukih veza u molekuli. Ovisno o broju dvostrukih veza, dijele se na mononezasićene (imaju jednu dvostruku vezu) i polinezasićene (imaju dvije ili više dvostrukih veza). Oleinska kiselina je najčešće prisutna mononezasićena kiselina u biljnim uljima, te je manje podložna oksidaciji u odnosu na polinezasićene masne kiseline (Rade i Škevin, 2004.).

Nezasićene masne kiseline mogu biti u cis i trans geometrijskom izomernom obliku. Prirodne nezasićene masne kiseline su u cis konfiguraciji, a trans konfiguracija nastaje tijekom procesiranja, zagrijavanja, te hidrogenacije biljnih ulja (O 'Brien, 2004.).



Slika 2 Cis i trans konfiguracija masnih kiselina (www.tehnologijahrane.com)

Trans nezasićene masne kiseline su termodinamički znatno stabilnije u donosu na cis oblike. Kod jestivih nerafiniranih i hladno prešanih biljnih ulja trans izomera ne smije biti čak ni u tragovima, jer proces rafinacije nije primjenjivan kao ni povišene temperature (Caggiula i Mustad, 1997.).

Kemijski sastav oba izomerna oblika je isti, no razlikuju se u fizikalnim svojstvima. Broj cis i trans izomera ovisi o broju dvostrukih veza, pa tako masne kiseline sa dvije dvostruke veze mogu imati 4 različita geometrijska oblika: cis – cis, cis – trans, trans – cis, trans – trans. Određivanje trans masnih kiselina važno je zbog upoznavanja kvalitete masti i kontrole procesa hidrogenacije. Mnoge eksperimentalne studije pokazale su da trans masne kiseline negativno utječu na zdravlje te uzrokuju arterosklerozu i koronarne bolesti (Caggiula i Mustad, 1997.).

Određivanje trans masnih kiselina je važno zbog ispitivanja kvalitete masti, ali i radi kontrole procesa hidrogenacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Polinezasićene masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline u ugljikovodičnom lancu imaju dvije ili više dvostrukih veza. Dijele se na omega-3 i omega-6 skupinu (ω-3 i ω-6). U omega-3 skupinu pripada α-linolenska kiselina i njezini derivati: eikosapentaenska kiselina (EPA), dokosapentaenska kiselina (DPA) i dokosaheksaenska kiselina (DHA).

Najvažnije polinezasićene masne kiseline su:

- linolna (dvije dvostruke veze),
- linolenska (tri dvostruke veze),
- arahidonska (četiri dvostruke veze) (Mandić, 2007.).

Esencijalne masne kiseline

U skupinu esencijalnih masnih kiselina se ubrajaju gore navedene kiseline: linolna (18 : 2, ω-6), linolenska (18 : 3, ω-3) i arahidonska (20 : 4, ω-6).

Linolna kiselina pripada omega-6 skupini masnih kisleina, kao i arahidonska kiselina koju organizam može sintetizirati iz linolne kiseline (Mandić, 2007.).

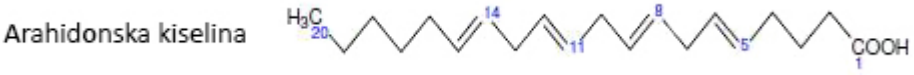
Linolna kiselina je glavna komponenta mnogih biljnih ulja kao npr. ulja šafranike u kojoj se nalazi u udjelu oko 75%, zatim u ulju suncokreta oko 60%, pamukovom ulju oko 45%, ulju kukuruznih klica oko 40%, te ulju soje oko 50%. Linolna kiselina pripada u skupinu esencijalnih kiselina (Swern, 1972.).

Linolenska kiselina je široko rasprostranjena u prirodi, prisutna je kao glavna komponenta samo u visokonezasićenim biljnim uljima. Glavna je kiselinska komponenta u lanenom ulju (45 do 50%) i perilla ulju (65%) (Knight i sur. 1946; Brice i sur. 1945.).



Slika 3 Kemijska struktura linolne i linolenske kiseline (Mandić, 2007.).

Arahidonska kiselina se nalazi samo u animalnim mastima, u vrlo malim količinama (0,3 do 1,0%).



Slika 4 Kemijska struktura arahidonske kiseline (Mandić, 2007.).

Thomasson (1962.) je prvi ispitao djelovanje esencijalnih masnih kiselina i izradio bio-testove kako bi odredio njihov biološki aktivitet. Kao temelj ispitivanja uzeo je biološki aktivitet od 10 mg linolne kiseline što predstavlja jednu jedinicu (1 J). Na taj je način određen biološki aktivitet masnih kiselina koje dolaze u biljnim uljima: linolna kiselina 1,0 J/g, linolenska 0,09 J/g i arahidonska 1,4 J/g.

Biološka vrijednost nekog ulja procjenjuje se prema sadržaju linolne kiseline. Linolnu i linolensku kiselinu organizam ne može sintetizirati, dok arahidonska kiselina nastaje u organizmu iz oleinske, linolne i linolenske kiseline tijekom metabolizma. Unošenje esencijalnih masnih kiselina (SMK) u organizam se mora uskladiti sa unosom određene količine vitamina E, biološkog antioksidansa, koji štiti ove kiseline od oksidacije. EMK su polinezasićene kiseline, pa lako oksidiraju. Sprječavanje oksidacije je važno, jer EMK samo prirodne, koje su u cis formi, imaju ulogu esencijalnih masnih kiselina, ali i kako bi se spriječilo nastajanje produkata oksidacije koji reagiraju sa sastojcima tkiva i izazivaju nepoželjne promjene (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA

Uljarice su glavni izvor sastojaka kao što su masti, proteini, ugljikohidrati, te imaju veliku primjenu kao funkcionalna hrana. Izvor su i visokovrijednih spojeva poput tokoferola i masnih kiselina, pa postaju sastavni dio dojenačkih formula i različitih prehrambenih proizvoda koji se koriste kao dodatak prehrani (Oomah i Mazza, 1999; Moyod, 2005; Lampi i sur., 2002.).

Za proizvodnju biljnih ulja koristi se veliki broj biljaka no samo njih 12 ima veći značaj u proizvodnji. Ulja možemo podijeliti na sljedeći način:

1. Ulja i masti iz mesnatog dijela ploda: avokado, maslinovo ulje, palmino ulje i dr.
2. Ulja i masti iz sjemenki i ploda prema dominirajućim masnim kiselinama:
    - laurinske masti i ulja (kokos, palmine koštice),
    - masti palmitinske i stearinske kiseline (kakao maslac, shea maslac),
    - ulje palmitinske kiseline (pamukovo ulje, palmino ulje),
    - ulje oleinske i linolne kiseline (ulje šafranike, suncokreta, sezama, repice, buče, kukuruznih klica),
    - ulja linolenske kiseline (Camelina sativa, lan, konoplja).
3. Ulja prema porijeklu biljke
    - ulja iz leguminoza (soja, kikiriki).

2.2.1. Ulje šafranike

Šafranika (*Carthamus tinctorius* L.) je biljka koja ima dugu povijest kultivacije. U Egiptu je uzgajana još prije 4000 godina. Stoljećima je uzgajana u Indiji i zemljama Mediterana, a u novije vrijeme je dosta raširena u SAD i Australiji (Hui, 1996.).

Šafranika je biljka u obliku žbuna koja može dosegnuti visinu i do 1,5 m. Cvjetovi su nalik na cvijet čička, čiji broj može biti i do 100 po biljci, a nalaze se na vrhovima. Svaki cvijet daje plod u obliku sjemena nalik na sjeme suncokreta. Jedna biljka može imati prinos od 1000 do 2500 sjemenki. Prinos sjemenki ovisi o klimatskim uvjetima, pa će tako u sušnom razdoblju prinos biti oko 400 kg/ha a tijekom kišnog razdoblja i do 5 t/ha (Patterson, 1989.).

Pri uobičajenim uvjetima uzgoja prinos sjemena varira u širokom rasponu od 549 kg/ha u Indiji, do 1786 kg/ha u SAD. Ukupna svjetska proizvodnja šafranike 1995. godine je iznosila 900 000 t, od čega je u Indiji proizvedeno 460 000 t. Iste godine u zemljama EU je proizvedeno oko 10 000 t (Bockisch, 1998; Hui, 1996.).

Prve komercijalne sorte šafranike su imale udio ulja u sjemenkama oko 30%, preostali udio čak od 70% bila je ljuska. Kod novih sorti udio ljuske je smanjen ispod 45%, a udio ulja je povećan i kreće se od 35 do 55%. Sadržaj proteina u sjemenu šafranike se kreće od 17 do 25% (Patterson, 1989; Hui, 1996; Bockisch, 1998).

Sjemenke šafranike se moraju skladištiti s optimalnim udjelom vlage od 5 do 8%. U silos se može stavljati sjeme koje ima udio vlage ispod 5%, a u manjim skladištima je dozvoljeno i do 8%. Sjeme se kod prerade djelomično ljušti. S obzirom da je ljuska jako tvrda, ljuštenje je otežano. Ljuska se koristi za proizvodnju celuloze i izolacijskog materijala (Bockisch, 1998.).

Danas su selekcijama sorti šafranike stvorena dva tipa ulja šafranike:

- ulje šafranike linolnog tipa (bogat omega-6 masnim kiselinama),
- ulje šafranike oleinskog tipa (bogato omega-9 masnim kiselinama).

Ulje šafranike ima najveći sadržaj linolne kiseline, koja je esencijalna, u odnosu na sva druga komercijalna jestiva ulja. Udio linolne kiseline kreće se i do 80%. Međutim, zbog sve većih zahtjeva potrošača za uljima koja imaju manji stupanj nezasićenosti selekcionirane su nove sorte šafranike sa udjelom oleinske kiseline do 60%, i sorte sa visokim sadržajem oleinske kiseline od 76 do 81% (Dimić, 2005.).

Tablica 2 Sastav i fizikalno kemijske karakteristike ulja sjemenki šafranike

Pokazatelj	Bockisch	Hui	H.L.S kompanija
Relativna zapreminska masa (t °/voda t °C)	t = 25 0,919 – 0,924	t = 20 0,922 – 0,927	t = 15 0,925 – 0,928
Indeks refrakcije (n^t_D)	t = 25 1,473 – 1,467	t = 40 1,467 – 1,470	t = 40 1,467 – 1,469
Jodni broj (g/100g)	141 – 147	130 – 150	140 – 150
Saponifikacijski broj (mgKOH/g)	186 – 194	186 – 198	188 – 194
Sastav masnih kiselina (% m/m)			
$C_{16:0}$ – palmitinska	4 – 6	2 – 10	4
$C_{18:0}$ – stearinska	1 – 2	1 – 10	3
$C_{18:1}$ – oleinska	12 – 16	7 – 42	20
$C_{18:2}$ – linolna	75 – 79	55 – 81	70
$C_{18:3}$ – linolenska	0	<1	-

Ulje sjemenki šafranike je zlatnožute boje, pogodnih senzorskih svojstava. Boja ulja potječe od β -karotena, čiji se sadržaj kreće oko 13 mg/kg. U ulju su prisutni i tokoferoli, pretežno u α obliku u količini od oko 400 mg/kg (Patterson, 1989.).

Održivost ulja šafranike, zbog visokog sadržaja linolne kiseline je slaba, te ga nakon otvaranja treba držati na hladnom (Dimić, 2005.).

Kanadski znanstvenici su na Sveučilištu u Kalgari uspjeli modificirati šafraniku, tako što je dodan ljudski gen. Jednom kada se gen aktivira u ovoj biljci, on počinje proizvoditi inzulin mnogo brže od uobičajenih metoda. Šafranika je prva biljka koja proizvodi inzulin i to u velikim količinama. Površina od oko 65 km^2 mogla bi zadovoljiti godišnje potrebe za inzulinom cjelokupne svjetske populacije oboljele od dijabetesa (www.agroklub.com).

Ulje šafranike se koristilo kao začinsko ulje zajedno s uljem sezama, crvene paprike i perilla uljem. Tradicionalno, ovo se začinsko ulje proizvodi ekstrakcijom prženih sjemenki šafranike, nakon prženja sjemenki na odgovarajućim temperaturama (Kim, Kim i Lee, 1998; Yoshida i Takagi, 1997.).

Procesom prženja nastaje ugodna aroma i okus sjemenki šafranike (nalik orahovom i kikiriki maslacu) (Kim i sur., 2002.).

Proces prženja sjemenki je ključan korak za dobivanje ulja, te postizanje željene arome, mirisa, sastava i kvalitete. Temperatura koja se postiže tijekom prženja za neka ulja nema većeg utjecaja na sastav i oksidacijsku stabilnost, ali kod ulja šafranike to je uočljivo u manjoj mjeri. Pržene sjemenke šafranike su pokazale pozitivan utjecaj na kosti, dok prah prženih sjemenki utječe na ubrzan oporavak kod prijeloma kostiju (Kim i sur., 1998.).

U početku se šafranika koristila za proizvodnju nafte, te za dobivanje boje, dok se danas uzgaja uglavnom za proizvodnju ulja. Važnost šafranike leži u njenom visokom sadržaju linolne kiseline (Smith, 2005.).

2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA

Biljna ulja su proizvodi podložni raznim nepoželjnim promjenama, pa se u njima događaju kemijski, enzimski i mikrobiološki procesi koji ograničavaju njegovu trajnost, odnosno uzrokuju kvarenje ulja. Do koje vrste kvarenja će doći i koliko intenzivno će ono biti ovisi o vrsti ulja i njegovoj kvaliteti, te o uvjetima čuvanja. Svi ti nepoželjni procesi narušavaju organoleptička svojstva ulja, te smanjuju nutritivnu vrijednost jer dolazi do gubitka aktivnih tvari kao što su vitamini, provitamini, esencijalne masne kiseline. Pri tome, nastaju i nepoželjni spojevi poput peroksida i polimera. Da bismo spriječili kvarenje ulja, potrebno je u svakoj fazi provoditi kontrolne mjere počevši već od branja sirovine, skladištenja sjemena, proizvodnje ulja, pa sve do skladištenja gotovog proizvoda (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

- Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja ulja

Ovu vrstu kvarenja uzrokuju mikrooorganizmi i enzimi ukoliko postoje odgovarajući uvjeti za njihovo djelovanje (vlažnost, temperatura, pH vrijednost). Procesi koji uzrokuju enzimi bitno se razlikuju od onih do kojih dolazi djelovanjem mikroorganizama. Kvarenje ulja u sirovinama uglavnom je uzrokovano prirodno prisutnim enzimima u biljkama. Disanjem sjemena oslobađa se toplina, što povećava temperaturu i aktivnost autohtonih enzima. Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja se dijele na β-ketooksidaciju i hidrolitičku razgradnju. Značajni su za neka ulja i proizvode s visokim sadržajem ulja i masti (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Hidrolitička razgradnja je reakcija hidrolize triglicerola djelovanjem lipolitičkih enzima uz prisustvo vode i povišene temperature. Hidrolizom se cijepa esterska veza masnih kiselina i alkohola glicerola u molekuli triglicerida, što dovodi do nastanka slobodnih masnih kiselina (SMK). Slobodne masne kiseline povećavaju kiselost ulja, te nastanak diglicerida, monoglicerida i glicerola. Inaktivacija lipolitičih enzima se postiže temperaturama višim od 80 ^{o}C ili nižim od -20 ^{o}C, pri ovim temperaturama je zaustavljen proces hidrolitičke razgradnje ulja (Rade i sur., 2001.).

Stupaj nastalih hidrolitičkih promjena se prati određivanjem SMK u ulju. U rafiniranim uljima slobodnih masnih kiselina može biti do 0,3% izraženih kao postotak oleinske kiseline (Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 41/12).

Važno je spriječiti povećanje sadržaja SMK u ulju sjemena, budući da se višak SMK mora ukloniti u procesu rafinacije. Tijekom neutralizacije, faze rafinacije uklanjaju se SMK, te se gubi i određena količina neutralnog ulja, iskorištenje na jestivom ulju je znatno smanjeno. Stoga je važno spriječiti porast SMK u sjemenu uljarica (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

ß-ketooksidacija je mikrobiološki proces kvarenja ulja kojeg uzrokuju:

- plijesni (*Aspergillus* i *Penicillium*),
- bakterije (*Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*)

Ova vrsta kvarenja je karakteristična za masti i ulja kojima u sastavu pevladavaju masne kiseline kraćeg i srednjeg lanca, pri čemu nastaju β-keto kiseline kao primarni produkt i metil ketoni kao sekundarni produkti reakcije. Mikroorganizmi, u prisustvu kisika iz zraka, napadaju zasićene masne kiseline i to metilensku skupinu u β-položaju prema karboksilnoj skupini. Metil ketoni i pri malim koncentracijama narušavaju organoleptička svojstva ulja i masti. β-ketooksidaciju je moguće spriječiti pasterizacijom, sterilizacijom, snižavanjem pH vrijednosti ispod 5 te primjenom aditiva ili konzervanasa.

$$RCH_2CH_2COOH \longrightarrow RCH{=}CHOOH \longrightarrow RCHOHCH_2COOH \longrightarrow$$

Zasićena masna kiselina α, β-nezasićena masna kiselina β-hidroksi masna kiselina

$$RCOCH_2COOH \longrightarrow RCOCH_3 + CO_2$$

β-keto kiselina metil-keton

Ukoliko je prisutna voda, iz β-keto kiseline mogu nastati i dvije masne kiseline umjesto metil ketona.

Djelovanjem nekih vrsta mikroorganizama, koji uzrokuju ovu vrstu kvarenja, stvaraju se i pigmenti (žuti, crveni, plavo-zeleni) što ima za posljedicu „obojenje“ masti. U praksi je česta pojava „ružičaste“ masti uz neugodan miris i okus (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Kemiski procesi kvarenja ulja

U kemijske procese kvarenja se ubrajaju: autooksidacija, termooksidacijske promjene i reverzija.

Autooksidacija je proces kojem podliježu sva ulja djelovanjem kisika iz zraka na dvostruke veze u lancu nezasićenih masnih kiselina. Brzina ovog procesa ovisi o vrsti i kvaliteti ulja, uvjetima skladištenja, sastavu ulja i prisustvu sastojaka koji ove procese ubrzavaju ili usporavaju. Početna faza autooksidacije je indukcija i počinje na $–CH_2$ skupinama koje se nalaze u α položaju u odnosu na dvostruku vezu u lancu masne kiseline. Na metilnim skupinama se događa homolitičko cjepanje tj. dolazi do nastanka alkil radikala masne kiseline i izdvajanja vodika. Homolitičko cjepanje potiče utjecaj topline, vidljivog i ultraljubičastog svjetla, te djelovanje katalizatora poput iona metala. Zbog premještanja dvostruke veze iz cis u trans položaj, slobodan elektron u alkil radikalu masne kiseline može biti u bilo kojem položaju od četiri atoma (Shahidi, 1997.).

Na alkil radikale se vežu molekule nepobuđenog, triplet kisika ($^3O_2$) te nastaju peroksidni radikali koji stupaju u reakciju s drugim nezasićenim masnim kiselinama, stvarajući hidroperokside i nove alkil radikale.

Reakcije se nastavljaju, te dolazi do stvaranja radikala peroksida i hidroperoksida. Nastali radikali djeluju kao katalizatori narednih procesa. U završnoj fazi, terminaciji, dolazi do međusobne reakcije slobodnih radikala, pri čemu nastaju polimeri (R-R, ROOR), oni nemaju svojstva radikala pa se reakcija autooksidacije završava (Koprivnjak, 2006.).

U procesu autooksidacije nastaju primarni i sekundarni produkti. Primarni produkti su hidroperoksidi, a sekundarni: aldehidi, ketoni, kiseline, alkoholi i dr. Nastaju razgradnjom primarnih produkata oksidacije, te daju neugodan, užegnut miris i okus uljima čak i u vrlo

malim koncentracijama. Većina ovih spojeva je reaktivna i uzrokuje nove lančane reakcije oksidacije *in vivo* (Shahidi, 1997.).

U nastavku je prikazan mehanizam autooksidacije (Oštić- Matijašević i Turkulov, 1980.).

Početak reakcije:

$$RH + O_2 \longrightarrow R\bullet + \bullet HOO$$

masna kiselina slobodni radikali

Tok reakcije: stvaranje hidroperoksida

$$R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$$

$$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet$$

slobodni radikali masna kiselina hidroperoksid

razgradnja hidroperoksida

$$ROOH \longrightarrow RO\bullet + \bullet OH$$

$$2ROOH \longrightarrow ROO\bullet + RO\bullet + H_2O$$

hidroperoksidi slobodni radikali

$$OH\bullet + RH \longrightarrow R\bullet + H_2O$$

$$RO\bullet + RH \longrightarrow R\bullet + ROH$$

slobodni radikali masna kiselina slobodni radikali

Završetak reakcije

finalni produkti oksidacije

$$R\bullet + R\bullet \longrightarrow R\text{-}R$$

$$R\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR$$

$$ROO\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR + O_2$$

reakcije između slobodnih radikala polimeri

Termooksidacijske promjene ulja i masti se događaju pri zagrijavanju ulja na temperaturama iznad 150 ^oC, uz prisustvo vodene pare i zraka. Stupanj termooksidacijskih promjena ovisi o vrsti ulja, temperaturi i vremenu trajanja. Nakon određenog vremena zagrijavanja ulja, pri povišenim temperaturama, osim nastanka produkata oksidacije (hidroperoksida i njihovih razgradnih produkata) nastaju i produkti termooksidacije (cikličke masne kiseline, dimeri i polimeri triglicerida, oksipolimeri i veći broj drugih spojeva).

Povećanjem stupnja nezasićenosti raste i broj nastalih produkata termooksidacije. Ulja koja imaju sadržaj linolne kiseline iznad 50%, brže podliježu ovim promjenama. Stvaranje ovih produkata je veoma brzo, tako da nakon 10 do 20 sati zagrijavanja pri 170 do 180 ^oC ova ulja

postaju neupotrebljiva. Stoga se preporučuje za prženje hrane koristiti ulja koja imaju niži sadržaj linolne kiseline, kako bi stupanj termooksidacijskih promjena bio što niži.

Cikličke masne kiseline i polimeri su nepoželjni produkti termooksidacije za ljudski organizam, pa je potrebno provoditi kontrolu ulja tijekom prženja. Ukoliko se utvrde promjene u ulju potrebno ga je zamijeniti svježim. Proizvod tijekom prženja apsorbira 25 do 40% ulja i nije svejedno kakva kvaliteta ulja će se naći u proizvodu poslije prženja.

Termooksidacija uzrokuje promjene izgleda i sastava ulja: tamnija boja, porast viskoznosti, a druge promjene se određuju kemijskim i fizikalnim metodama.

Jedna od metoda je određivanje jodnog broja. Tijekom zagrijavanja ulja na povišenim temperaturama dolazi do stvaranja dimera, trimera i polimera povezivanjem preko dvostrukih veza masnih kiselina, ove promjene prati sniženje jodnog broja. Pad jodnog broja za 5% siguran je znak da se ulje ne može više koristiti.

Da bi se spriječile termooksidacijske promjene ulja primjenjuju se aditivi koji su u pojedinim zemljama dozvoljeni. Najčešće se koriste silikoni. Primjena ovog aditiva još uvijek je upitna (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Reverzija je pojava, karakteristična za neka ulja, kod kojih se poslije kraćeg vremena čuvanja javlja neugodan miris (na sirovinu, riblji, koji je osobitno naglašen pri zagrijavanju ulja). Najčešće se javlja u ulju soje i uljane repice. Unatoč intenzivnom radu uzrok reverzije još uvijek nije potpuno poznat, kao ni njegovo sprječavanje. Utvrđeno je, da miris reverzije nije posljedica autooksidacije ulja, jer se miris karakterističan za reverziju bitno razlikuje od mirisa oksidiranih, užeglih ulja.

U praksi su poznata dva načina, koja u određenoj mjeri, ublažavaju problem reverzije:

- pravilan odabir uvjeta rafinacije da bi se dobilo kvalitetno ulje i dodatak limunske kiseline,
- djelomična selektivna hidrogenacija da se ukloni linolna kiselina.

Pojavu reverzije znatno ubrzava i svjetlo, pa je potrebno ulje pakirati u ambalažu koja ga štiti od utjecaja svjetla.

Ovi postupci nisu riješili problem reverzije, ali ga jesu ublažili (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

2.4. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA

Oksidacijska stabilnost ulja ovisi o mnogim čimbenicima: sastavu masnih kiselina, raspodjeli masnih kiselina u molekuli triglicerida, te o prisustvu različitih komponenti u ulju o kojima ovisi stabilnost (Shahidi, 2005.).

Na terminaciju ili zaustavljanje procesa oksidacije ulja važnu ulogu imaju tvari koje usporavaju propagaciju na način da deaktiviraju slobodne radikale u sustavu (Eskin i Przybylski, 2001.).

2.4.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje produžuju održivost biljnih ulja i sprječavaju tj. usporavaju proces oksidacijskog kvarenja prisutni i u vrlo malim koncentracijama (Yanishlieva i Marinova, 2001.). Postoji veliki broj prirodnih i sintetskih antioksidanasa koji se koriste u svrhu inhibicije autooksidacije biljnih ulja (Merill u sur., 2008.).

Djelovanje antioksidansa u biljnim uljima ovisi o vrsti antioksidansa, vrsti ulja, uvjetima čuvanja, koncentraciji u kojoj je dodan. Zaštitno djelovanje ima dok se ne potroši cjelokupni prisutni antioksidans u ulju. Antioksidacijsko djelovanje antioksidansa se može odrediti preko zaštitnog ili stabilizacijskog faktora (PF). On pokazuje koliko se puta povećava održivost ulja dodatkom odgovarajućeg antioksidansa.

$$\text{Zaštitini faktor (PF)} = IPx / IPk$$

IPx – indukcijski period uzorka ulja s dodatkom antioksidansa (h)

IPk – indukcijski period uzorka ulja bez dodanog antioksidansa (h)

Vrijeme indukcije predstavlja broj sati potrebnih da ulje postigne peroksidni broj od 5 mmol O_2/kg.

Povećanje koncentracije antioksidansa, u nekim slučajevima, povećava održivost ulja, dok u drugim djeluju u smijeru smanjenja oksidacijske stabilnosti (Bandoniene i sur., 2000.).

Antioksidansi djeluju na jednu ili više faza oksidacijskog kvarenja ulja:

- inicijaciju autooksidacije,
- propagaciju autooksidacije,

- stvaranje singlet kisika,
- razaranje hidroperoksida na spojeve neugodnog mirisa i okusa,
- stadiji u kojem se radikali peroksida i hidroperoksida pregrađuju i daju izomerne spojeve koji potiču različitu razgradnju produkata i utječu na okus (Gunstone, 2004.).

Antioksidanse dijelimo na primarne i sekundarne, ovisno o fazi na koju djeluju.

Ukoliko se uspoređuje djelovanje antioksidanasa, mora se uzeti u obzir vrsta ulja zbog različitog sastava masnih kiselina i udjela antioksidanasa koji su već prisutni u ulju.

Rezultati dobiveni na različitim temperaturama ne moraju biti izravno usporedivi jer se mehanizmi nastajanja i razgradnje hidroperoksida mijenjaju s temperaturom što utječe na postojanost antioksidansa.

Rezultati ispitivanja oksidacijske stabilnosti ulja variraju ovisno o primjenjenoj metodi. Postoje metode koje određuju primarne produkte oksidacije, dok druge određuju sekundarne produkte oksidacije (Gunstone, 2004.).

- Mehanizam djelovanja antioksidanasa

Primarni antioksidansi su radikal-akceptori ili tzv. „hvatači“ radikala. U fazi indukcije (inicijacije) „hvataju“ alkil radikale (R•), a u fazi propagacije peroksi radikale (ROO•). Antioksidansi imaju vodikov atom kojeg daju slobodnom radikalu ili reagiraju zajedno s radikalima. Konačni produkti su stabilni, te ne ulaze u proces oksidacije. Indukcijski period je vrijeme kada nastaju slobodni radikali, a antioksidansi djeluju.

$$ROO\bullet + AH \longrightarrow ROOH + A\bullet \ \ldots \longrightarrow \text{produkt}$$

$$ROO\bullet + B \longrightarrow ROOB\bullet \ \ldots \longrightarrow \text{produkt}$$

AH – amini ili fenoli, B – polinezasićeni spojevi poput β-karotena

Ovisno o vrsti antioksidansa, neki mogu spriječiti dva ili više nizova propagacija, jer produkti koji se prvi formiraju iz antioksidansa i dalje imaju antioksidacijsku aktivnost (Gunstone, 2004.).

U skupinu primarnih antioksidanasa se ubrajaju: BHA (butil hidroksianisol), BHT (butil hidroksitoluen), fenoli, galati, hidrokvinoni, flavonoidi, askorbati, tokoferoli, ekstrakti začina i biljaka, te antioksidansi nastali procesiranjem (Eskin i Przybylski, 2001.).

Sekundarni antioksidansi uklanjaju metalne ione koji potpomažu fazu inicijacije u procesu autooksidacije. U ovu skupinu antioksidanasa se ubrajaju: EDTA (etilendiamin tetra-octena kiselina), fosforna kiselina, limunska kiselina i neke aminokiseline. Koriste se i u kombinaciji s primarnim antioksidansima (Gunstone, 2004.).

- Vrste antioksidanasa

Veliki je broj poznatih prirodnih i sintetskih antioksidanasa, ali se u praksi ne koriste svi za stabilizaciju biljnih ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Tablica 3 Primarni antioksidansi koji se koriste u hrani (Shahidi, 2005.)

Prirodni antioksidansi	Sintetski antioksidansi
Karotenoidi	Butil hidroksianisol
Flavonoidi	Buti hidroksitoluen
Fenolne kiseline	Etoksiquin
Tokoferoli i tokotrienoli	Propil galat
	Tercijarni butilhidrokinon

2.4.1.1. Sintetski antioksidansi

Sintetski antioksidansi se ubrajaju u skupinu aditiva, dobiveni kemijskim putem i nisu prirodan sastojak hrane. Po kemijskom sastavu su to spojevi uglavnom fenolnog tipa. Količina antioksidansa koja se smije dodati uljima regulirana je Pravilnikom o prehrambenim aditivima NN 81/2008.

Sintetski fenolni antioksidansi su supstituirani s alkil skupinama zbog poboljšanja topljivosti u uljima i mastima, te zbog smanjenja toksičnosti. Umjetni antioksidansi fenolnog tipa su u para supstituciji (*p*-), dok su prirodni fenolni sastojci u orto supstituciji (o-). Manja je toksičnost para supstitucije. Spojevi fenolnog tipa u meta supstituciji (m-) nemaju antioksidacijsku aktivnost (Shahidi, 2005.).

Najpoznatiji i najviše korišteni sintetski antioksidansi su: butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), esteri galne kiseline: propil galat (PG), butil galat (BG), oktil galat (OG), dodecil galat (DG), te tercijarni butilhidrokinon (TBHQ) (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

BHA – E320 – ima dobru topljivost u mastima te stabilnost u prženim i pečenim proizvodima. Bolju učinkovitost ima prema životinjskim mastima u odnosu na biljna ulja. Ima sinergističko djelovanje sa butiliranim hidroksitoluenom i propil galatom. Može se koristiti u koncentraciji od maksimalno 200 ppm.

BHT – E321 – ima slabiju topljivost nego BHA, nije topljiv u propilen glikolu koji se najčešće koristi kao otapalo za antioksidanse. Djeluje sinergistički sa BHA. Pokazuje veću stabilnost prema visokim temperaturama nego li je to slučaj kod BHA. Može se koristiti u koncetraciji od maksimalno 200 ppm.

TBHQ – E319 – preporučuje se za stabilizaciju sirovih i jestivih biljnih ulja, dobre je topljivosti i stabilan pri visokim temperaturama. Uklanja se dezodorizacijom ulja. Najčešća mu je primjena pri transportu i skladištenju ulja.

PG – E310 – manja mu je topljivost u odnosu na BHA i BHT. Budući da se gubi njegova djelotvornost pri temperaturama iznad 148 ^{o}C, nije pogodan za ulja koja se koriste za prženje. Najčeši je galat koji se koristi, te se može dodati u maksimalnoj koncentraciji od 100 ppm. Ima dobru učinkovitost u kombinaciji s BHA.

Tablica 4 Fizikalna svojstva sintetskih antioksidanasa (Shahidi, 2005.)

Svojstva	BHA	BHT	Dodecil galat (DG)	Propil galat (PG)	TBHQ
Izgled	Čvrst kao vosak	Bijeli kristal	Bijeli kristal	Bijeli kristal	Bjelkasti-žućkastosmeđi kristali
Vrelište	264 – 270	265	-	Iznad 148 se razgrađuje	300
Talište	50 – 52	69 – 70	146 – 148	146 – 148	126 – 128
Kukuruzno ulje	30	30	0	0	5 – 10
Glicerol	1	0	-	25	<1
Svinjska mast	30 – 40	50	-	1	5 – 10
Voda	0	0	<1	<1	<1
Sinergizam	BHT, galati	BHA	BHA	BHA	-

2.4.1.2. Prirodni antioksidansi

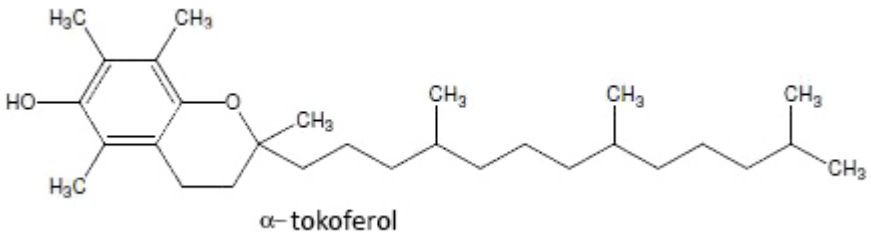
Tokoferoli su najčešće korišteni prirodni antioksidansi za stabilizaciju biljnih ulja. Oni su neosapunjivi sastojci koji se nalaze u gotovo svim prirodnim uljima i mastima, ali znatno više u uljima i mastima biljnog podrijetla. Tokoferoli su visoko molekularni ciklički alkoholi, metil derivati tokola. Poznato je osam tokola – četiri tokoferola koji se razlikuju prema rasporedu metilnih skupina i četiri tokotrienola koji su slični tokoferolima, ali posjeduju tri nezasićene veze u lancu. U biljnim uljima se prirodno nalaze tokoli u koncentraciji od 200 do 800 ppm (Gunstone, 2004.).

Najvažniji tokoferoli su α-tokoferol, β-tokoferol, γ-tokoferol i δ-tokoferol. Razlikuju se po antioksidacijskom i biološkom djelovanju. Najbolje vitaminsko djelovanje ima α-tokoferol koji se naziva i vitamin E. Vitamin E je nestabilan na povišenoj temperaturi kao i u prisustvu UV svjetla (Sabilov i sur., 2009.).

Najbolje antioksidacijsko djelovanje imaju γ-tokoferol i δ-tokoferol (Gunstone, 2004.).

Tokotrienoli imaju snažnije antioksidacijsko djelovanje od tokoferola (Shahidi i Zhong, 2005.).

α-tokoferol štiti nezasićene masne kiseline od procesa oksidacije, te sprječava stvaranje slobodnih radikala. Koncentrati tokoferola se dobivaju iz prirodnih ulja, a dodani u velikim količinama mogu djelovati i kao prooksidansi (Gunstone, 2004.).



Slika 5 Kemijska struktura α-tokoferola (Mandić, 2007.)

Ekstrakt zelenog čaja je vrlo važan antioksidans za stabilizaciju ulja i masti. Katehini iz zelenog čaja imaju dobra antioksidacijska svojstva. Najvažniji katehini u zelenom čaju su: (-)-epikatehin, (+)-katehin, (-)-epigalokatehin-3-galat, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin, (-)-epikatehin-3-galat (Madhavi, 1996.).

Listići ružmarina imaju antioksidacijsko djelovanje i pri povišenim temperaturama. Antioksidansi ekstrakta ružmarina su: rosmanol, karnosol, karnosolna kiselina, karnosat,

epirosmanol, rosmadial i dr. (Škevin, 2003.). Ekstrakt ružmarina u kombinaciji s α-tokoferolom ima negativno sinergističko djelovanje (Harš i sur., 2000.).

2.4.2. Sinergisti

Sinergisti su kemijski spojevi koji nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali dodani uz neki antioksidans produžuju njegovo djelovanje (obično 1 do 3 puta). Uz antioksidanse sinergisti koji se najčešće koriste su: limunska, askorbinska i octena kiselina, monoizopropil citrat, askorbil palmitat i lecitin. Ne odgovara svaki sinergist svakom antioksidansu. Najbolji sinergist tokoferolima je limunska kiselina, askorbinska kiselina ili askorbil palmitat tako da se održivost biljnih ulja, koja već sadrže tokoferole, povećava dodatkom 0,01 do 0,02% ovih sinergista.

Sinergisti imaju tri načina djelovanja:

- vežu tragove metala – inaktiviraju ih i isključuju njihovo prooksidacijsko djelovanje na proces autooksidacije,
- daju H atom antioksidansu, reduciraju ga i time regeneriraju, te produžuju vrijeme njegova trajanja,
- sprječavaju djelovanje antioksidansa na razgradnju peroksida, sinergisti se vežu s radikalom antioksidansa i sprječavaju njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Oštić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Čimbenici koji ubrzavaju proces autooksidacije – prooksidansi

Prooksidansi skraćuju indukcijski period autooksidacije ili ga potpuno uklanjaju te kataliziraju proces oksidacije. Neki od najčešćih prooksidanasa kao uzroka kvarenja su: temperatura, svjetlo, tragovi metala (Cu, Fe, Ni i dr.), pigmenti. Prisustvo samo jednog od ovih prooksidanasa znatno ubrzava autooksidaciju, stoga je potrebno masti i ulja čuvati na hladnom (+5 ^{o}C), u tami (odgovarajuća ambalaža i skladište), te da ulje ne sadrži tragove metala, što se postiže pravilnim vođenjem procesa rafinacije. Također je važno da mast ima nizak peroksidni broj (<1) i da ne sadrži sekundarne produkte oksidacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Temperatura

Porastom temperature, proces autooksidacije se ubrzava, sniženjem smanjuje, ali nikad se ne može u potpunosti spriječiti. Proces autooksidacije se događa čak i pri temperaturama < -20 ^{o}C. To je razlog zbog kojeg određeni proizvodi užegnu nakon određenog vremena čuvanja čak i pri niskim temperaturama.

Povišena temperatura ubrzava i djelovanje kisika na nezasićene masne kiseline i razgradnju hidroperoksida. Utjecaj temperature na brzinu oksidacije osobitno je izražen kod biljnih ulja koja imaju visoki sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (Oštrić-Matijašević, 1980.).

- Svjetlost

Svjetlost kraće valne duljine (< 380 nm) u većoj mjeri ubrzava oksidaciju, jer pospješuje reakciju autooksidacije te razgradnju hidroperoksida.

Za održivost jestivih ulja i masti važan je utjecaj i vidljivog dijela spektra koji opet djeluje u smijeru ubrzavanja autooksidacije, ali ipak u manjoj mjeri u usporedbi s nižim valnim duljinama.

Jedan od načina za sprječavanje utjecaja svjetla na autooksidaciju i povećanje održivosti ulja je pakiranje ulja u ambalažu nepropusnu na svjetlo (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Tragovi metala

Metali prisutni i u vrlo malim koncentracijama su izraziti prooksidansi. Dovoljan je 0,1 ppm Cu ili 1 ppm Fe za smanjenje održivosti ulja na više od pola. Tragovi metala djeluju kao prooksidansi samo u slučaju kada su već nastali hidroperoksidi. Kod djelovanja iona metala na hidroperokside dolazi do stvaranja hidroksi iona i slobodnih radikala.

$$M^{n+} + ROOH \longrightarrow M^{(n+1)+} + OH^{-} + RO\bullet$$

ili u slučaju bakra (Cu)

$$Cu^{+} + ROOH \longrightarrow Cu^{++} + OH^{-} + RO\bullet$$

Može doći i do redukcije metala:

$$ROOH + Cu^{++} \longrightarrow ROO\bullet + Cu^{+} + H^{+}$$

Slobodni radikali nastali u ovim reakcijama nastavljaju lančanu reakciju oksidacije ulja.

Prooksidacijsko djelovanje pojedinih metala nije isto:

Cu > Mn > Fe > Cr > Ni > Zn > Al

Budući da su u ulju redovito prisutni tragovi metala (osobito Cu i Fe), njihov negativan utjecaj se može spriječiti dodatkom kemijskih spojeva, inaktivatora metala, koji vežu tragove metala u komplekse. Ovi spojevi su poznati pod nazivom helati. Stvaraju s metalom cikličku strukturu, u kojoj je metal vezan između dva atoma jedne molekule. Ion metala, vezan na ovakav način djeluje katalitički na razgradnju hidroperoksida. Poznati inaktivatori metala su: limunska, askorbinska i fosforna kiselina, lecitin i dr. (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Pigmenti

Određeni pigmenti, poput klorofila i hem spojeva, su izraziti prooksidansi biljnih ulja ili proizvoda koji sadrže ove pigmente. Sastavni su dio određenih proizvoda (koncentrati juha, proizvoda od mesa i dr.), pa nije moguće isključiti njihov prooksidacijski utjecaj. Zbog toga se kod izrade ovih proizvoda, mora koristiti mast koja ima Pbr < 1 i dobru održivost (Oštić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA

Postoji veliki broj metoda za određivanje stupnja oksidacije ulja. Niti jedna metoda ne može dati dovoljno precizne i točne podatke o stupnju oksidacije ulja, pa se istovremeno primjenjuje više metoda i na bazi dobivenih rezultata se dobiva uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena. Poznavanje stupnja okisdacije važno je kako bi se odredila kvaliteta ulja, na temelju čega se procjenjuje može li se ulje koristiti u prehrani, te može li se i koliko dugo skladištiti.

Metode koje se koriste za određivanje stupnja okisacijskih promjena dijele se na:

- organoleptičke metode,
- kemijske metode,
- fizikalne metode.

- Organoleptičke metode

Organoleptičke metode ili senzorske metode ispitivanja su subjektivne metode, dugotrajne i nedovoljno reproducibilne, ali su vrlo važne za ispitivanje kvalitete ulja i masti. Organoleptičke metode temelje se na određivanju pojave neugodnog mirisa, užeglog mirisa nastalog usljed stvaranja razgradnih, sekundarnih produkata oksidacije. Ovi razgradni produkti čak i u malim koncentracijama oko 10^{-6} ppm daju neugodan i užegao miris ulju i masti. Radi se na eliminiranju subjektivnosti ovih metoda jer ispitivanja provodi veći broj stručnih članova komisije za ocjenjivanje. U industriji ulja i masti, redovna je praksa ispitivati kvalitetu ulja ovim metodama uz fiziklane i kemijske metode ispitivanja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Kemijske metode

Kemijske metode kojima se određuje stupanj oksidacijskih promjena masti dijele se na:

- metode kojima se određuju primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi),
- metode kojima se određuju sekundarni produkti oksidacije, nastali razgradnjom hidroperoksida (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Peroksidni broj je jedna od najstarijih i najčešće primjenjivanih metoda za ispitivanje stupnja oksidacije masti. Ovom metodom se određuju primarni produkti oksidacije. Za određivanje sadržaja peroksida najčešće se koristi Lea i Wheeler metoda. To su jodometrijske metode koje se temelje na određivanju količine joda kojeg, iz kalijevog jodida oslobađaju peroksidi (Gunstone, 2004.).

Koriste se i kolorimetrijske metode za određivanje peroksidnog broja. Jedna od ovih metoda se zasniva na oksidaciji željezo (II) soli, u prisustvu amonijevog tiocijanata u željezo (III) soli (Oštić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Za rafinirana jestiva ulja dozvoljen je peroksidni broj do 5 mmol O_2/kg, dok je za hladno prešana i nerafinirana ulja dozvoljen peroksidni broj do 7 mmolO_2/kg (pravilnik NN 41/12). Peroksidni broj rafiniranih ulja nakon procesa dezodorizacije mora biti 0 mmol O_2/kg kako bi se ulje moglo duže čuvati i skladištiti (Gunstone, 2004.).

TBK vrijednost (test tiobarbiturne kiseline) je metoda kod koje se određuje stupanj oksidacijskih promjena ulja na temelju sadržaja sekundarnih produkata oksidacije. Kod ove kolorimetrijske metode određivanja, tiobarbiturna kiselina reagira s malonaldehidom (jednim od razgradnih produkata polinezasićenih masnih kiselina) i pri tome se stvara crvena boja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Intenzitet nastale crvene boje se očitava na 532 nm valne duljine (Rade i sur., 2001.).

Anisidinski broj (Abr) pokazuje udio sekundarnih produkata oksidacije. Temelji se na reakciji p-anisidina s višim nezasićenim aldehidima (2,4-dienal i 2-enal). Anisidinski broj daje sadržaj nehlapljivih aldehida, pa se na temelju ovog broja može odrediti tzv. „oksidativna prošlost ulja“. Sadržaj nehlapljivih produkata se vrlo malo mijenja tijekom rafinacije, pa je moguće, s obzirom na udio ovih spojeva u jestivom biljnom ulju, procijeniti kvalitetu i stupanj nastalih oksidacijskih promjena sirovog ulja.

Postoji dobra korelacija između anisidinske vrijednosti i održivosti ulja. Što je veći anisidinski broj slabija je održivost ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Totox broj (OV) predstavlja oksidacijsku vrijednost ulja, koja se dobiva iz peroksidnog broja (Pbr) i anisidinskog broja (Abr): OV= 2 Pbr + Abr

Oksidacijska vrijednost daje dobar uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena ulja, jer daje sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oskidacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Krajs metoda je najstarija metoda za određivanje stupnja oksidacije masti. Temelji se na obojenoj reakciji floroglucina s produktima oksidacije, prvenstveno s epihidrinaldehidom, pri čemu se stvara crvena boja, čiji se intenzitet mjeri na 540 nm. Ova metoda se sve manje koristi u praksi, jer intenzitet boje, nastale u ovoj reakciji, ne odgovara potpunom stupnju oksidacije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Fizikalne metode

UV spektrofotometrija je fizikalna metoda koja se temelji na praćenju ovisnosti apsorbancije od valne duljine zračenja koje je prošlo kroz analiziranu otopinu. Produkti oksidacije polinezasićenih masnih kiselina pokazuju karakterističan spektar u UV području. Hidroperoksidi linolne kiseline i konjugirani dieni imaju apsorbcijski maksimun pri 232 nm. Sekundarni produkti oksidacije i konjugirani trieni imaju maksimum pri 270 nm. Odnos ovih vrijednosti izražen je kao R vrijednost. Njome se procjenjuje stupanj oksidacije.

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

A_{232} – apsorbancija na 232 nm valne dužine

A_{270} – apsorbancija na 270 nm valne dužine

Što je niža R vrijednost ulje je lošije kvalitete jer sadrži više sekundarnih produkata oksidacije i konjugiranih triena. R vrijednost je moguće koristiti kao procjenu samo kod sirovih ulja, jer se kod rafiniranih tijekom dekoloracije aktivnom zemljom stvaraju konjugirani trieni koji nisu rezultat oksidacijskih promjena (Dimić i Turkulov, 2000.).

Plinska kromatografija određuje 3-cis heksanal (CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2CHO), i druge aldehide, nositelje neugodnog mirisa užegle masti. Plinskom kromatografijom moguće je odrediti ove aldehide, ukoliko je njihov sadržaj > 1 ppm (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Ova metoda se sve češćće koristi za praćenje oksidacijskih promjena nezasićenih masnih kiselina. Otežano je praćenje kompleksnih lipidnih sustava, a uspješno za čista ulja i masti (Rade i sur., 2001.).

IR spektroskopija također određuje oksidacijsku stabilnost, budući da konjugirani dieni hidroperoksida i polimeri povećavaju indeks refrakcije (Rade i sur., 2001.).

2.6. ODRŽIVOST ILI OKSIDACIJSKA STABILNOST

Održivost ili oksidacijska stabilnost ulja je vrijeme tijekom kojeg se ulja mogu sačuvati od autooksidacije. Poznavanje održivosti sirovih i jestivih ulja je važno zbog određivanja vremena tijekom kojeg se ulja mogu sačuvati od negativnih promjena koje utječu na kvalitetu. Metode koje se koriste za određivanje stabilnosti, temelje se na ubrzanoj oksidaciji ulja utjecajem nekog od faktora koji ubrzavaju ovaj proces. U praksi se najčešće primjenjuju

metode kod kojih se oksidacija ubrzava utjecajem temperature. Održivost ulja je vrijeme u satima potrebno da uzorak ulja dostigne određenu vrijednost peroksidnog broja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Tablica 5 Analitičke metode za određivanje održivosti ulja i masti (Dimić i Turkulov, 2000.)

Analitička metoda	Ispitivani parametri
Oven test	Peroksidi, promjene senzorskih svojstava
AOM test (Active Oxygen Method) ili Swift test	Peroksidi
Rancimat test	Provodljivost, niže molekularne kiseline
Metoda apsorbcije kisika	Apsorbirani kisik
Test na bazi fluorescentnog svjetla	Peroksidi, senzorske promjene

Metode koje se najćešće koriste u praksi su:

- AOM test ili Swift test (Active Oxygen Method)

Uzorci masti kod ove metode se zagrijavaju u Swift aparatu pri 98 ^{o}C. U pravilnim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci masti i određuje peroksidni broj (Rade i sur., 2001.).

Uzorci se drže u aparatu toliko dugo dok peroksidni broj ne dostigne određenu vrijednost. Metoda je standardizirana, daje reproducibilne rezultate, pa ima veliku primjenu i u praksi. Jedan sat AOM testa odgovara približno 20 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi, pa se pomoću nje može izračunati približna održivost pri sobnoj temperaturi (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Kvalitetu ulja koja su dobre održivosti nakon 8 sati ovog testa moraju imati peroksidni broj manji od 5 mmol O_2/kg (Rade i sur., 2001.).

- Test održivosti na 98 ^{o}C

U nedostatku originalne Swift aparature, koristi se i metoda praćenja održivosti ulja na 98 ^{o}C u sušioniku. Postoji dobra korelacija između rezultata dobivenih ovom metodom, rezultata AOM testa, Oven testa i održivosti masti pri sobnoj temperaturi. Jedan sat testa održivosti odgovara 10 do 15 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

- Oven test (Schaal oven test)

Oven test je jedna od najstarijih i najjednostavnijih načina ispitivanja održivosti biljnih ulja. Kod ovog testa uzorci se zagrijavaju u sušioniku pri 60 ili 63 ^{o}C te se prati porast peroksidnog broja i organoleptička promjena ulja. Za održivost se uzima vrijeme u danima za koje peroksidni broj dostigne određenu vrijednost ili se organoleptičkim ispitivanjima utvrdi pojava užeglosti.

Rezultati Oven testa se mogu prikazati kao:

- vrijednost peroksidnog broja nakon određenog vremena držanja uzorka (u danima) pri temperaturi od 63 ^{o}C (jestiva ulja uglavnom 4 dana),
- broj dana za koje se postiže određena, unaprijed utvrđena vrijednost peroksidnog broja,
- vrijeme u danima za koje se pojavi užeglost i utvrdi senzorskim ispitivanjem.

Jedan dan Oven testa odgovara održivosti ulja od 6 do 12 dana pri sobnoj temeraturi (Dimić, i Turkulov, 2000.).

- Rancimat test

Rancimat testom se provodi ubrzana oksidacija ulja pri točno definiranim uvjetima. Oksidacijska stabilnost se određuje primjenom Rancimat uređaja pri povišenoj temperaturi (100 ^{o}C, 110 ^{o}C, 120 ^{o}C) uz kontinuirani dovod zraka. Hlapljivi spojevi koji nastaju oksidacijom ulja pri povišenoj temperaturi (kratkolančane hlapljive organske kiseline) se uvode u deioniziranu vodu. Hlapljivi spojevi se određuju konduktometrijski s automatskim registriranjem vodljivosti u funkciji vremena. Mjerenjem porasta vodljivosti indirektno se

prati tijek oksidacije ulja. Indukcijski period (IP) u satima, određen na ovaj način, označava se kao indeks održivosti pri određenoj temperaturi i protoku zraka (Rade i sur., 2001.).

Ako vrijeme indukcije duže traje, ulje ima bolju održivost tj. oksidacijsku stabilnost (Laubli i Bruttal, 1986.). Dakle, IP (h) predstavlja otpornost biljnog ulja prema oksidacijskom kvarenju.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, te utjecaj dodatka pojedinačnih prirodnih antioksidanasa i sinergista na njegovu održivosti. Ispitivanje oksidacijske stabilnost ulja, sa i bez dodatnog antioksidansa, provedeno je primjenom Oven testa na 63 ^{o}C. Prije određivanja oksidacijske stabilnosti ulja šafranike, određeni su parametri kavalitete ulja (peroksidni broj i slobodne masne kiseline) primjenom standardnih metoda. Uzorci su praćeni tijekom četiri dana provedbe testa u termostatu, te se svakih 24 sata provodila analiza peroksidnog broja.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

3.2.1.1. Hladno prešano ulje šafranike

Za ispitivanje oksidacijske stabilnosti koristilo se hladno prešano ulje šafranike nabavljeno u trgovini.

Ulje šafranike je hladno prešano, pakirano u boce od 0,5 L, proizvedeno u Njemačkoj.



Slika 6 Ulje šafranke podvrgnuto analizi

3.2.1.2. Antioksidansi

Za ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja šafranike korišteni su prirodni antioksidansi: ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less CS), ekstrakt nara, ekstrakt maslinovog lista, te eterična ulja rtanjskog čaja, majčine dušice i bosiljka. Također, istražen je

utjecaj dodatka sinergista (limunske kiseline) u kombinaciji s ekstraktom zelenog čaja te ružmarinovim ekstraktom na održivost ulja šafranike tijekom 4 dana Oven testa.

- Ekstrakt zelenog čaja

Ekstrakt zelenog čaja je proizveden iz lišća biljke *Camellia sinensis* L. Proizvod je u praškastom obliku, žute do smeđe boje, s maksimalnim udjelom vode do 8%. Udio epigalokatehin galata (EGCG) je veći od 45%, udio ukupnih polifenola veći od 98%, udio kofeina je manji od 2%, te udio katehina veći od 80%. Proizveden u firmi NATUREX (Francuska).

U ispitivanju oksidacijske stabilnosti ulja šafranike korišten je u koncentraciji 0,1 i 0,3%, te u kombinaciji sa sinergistom limunskom kiselinom (0,01%).

- Ekstrakt ružmarina (tip OXY'LESS® CS)

Ekstrakt ružmarina je proizveden iz listova ružmarina *Rosmarinus officinalis* L. Proizvod je u praškastom obliku, bež boje, karakterističnog mirisa, te topljiv u ulju. Udio karnosolne kiseline se kreće od 18 do 22%, zaštitni faktor mu je veći od 12, suha tvar ekstrakta je u udjelu od 92 do 98%. Proizveden je u firmi NATUREX (Francuska).

U ispitivanju održivosti ulja korišten je u koncentraciji 0,1 i 0,3%, te uz sinergist limunsku kiselinu (0,01%).

- Ekstrakt nara

Ekstrakt nara je prirodni ekstrakt, dobiven iz voća *Punica granatum* L. Pripada u skupinu maltodekstrina. U praškastom je obliku, smeđe boje, karakteristične arome, topljiv u vodi. Sadrži više od 10% elagične kiseline, te više od 95% suhog ekstrakta.

U određivanju promjene oksidacijske stabilnosti ulja šafranike korišten je u koncentracijama 0,1 i 0,3%.

- Ekstrakt maslinovog lista

Ekstrakt maslinovog lista je suhi ekstrakt u praškastom obliku. Proizveden je iz lista masline *Olea europaea* L. U svom sastavu sadrži 4,41% DPE. Proizvođač je Exxentia (Španjolska).

U ispitivanju održivosti ulja korišten je u koncentraciji 0,1 i 0,3% računato na masu ulja.

- Eterično ulje rtanjskog čaja

Eterično ulje je dobiveno destilacijom cvjetnih vrhova rtanjskog čaja *Satureja Montana* L. Proizvedeno je od strane Instituta za ratarstvo i povrtarstvo (Novi Sad, Srbija). Određena je antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja rtanjskog čaja DPPH metodom i iznosi IC_{50} = 0,0629 (mg/mL).

U ispitivanju održivosti ulja šafranike korišten je u koncentraciji od 0,05% računato na masu ulja.

Pored navedenih prirodnih antioksidanasa korišteno je i eterično ulje bosiljka i majčine dušice u koncentraciji 0,05%.

3.2.1.3 Sinergisti

- Limunska kiselina

Kao sinergist upotrebljena je limunska kiselina u koncentraciji 0,01% računato na masu ulja. Korištena je u kombinaciji s ekstraktom zelenog čaja (udjela 0,1%) i ekstraktom ružmarina (udjela 0,1%).

3.2.2. Metode rada

3.2.2.1. Određivanje parametara kvalitete ulja

Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Kiselost biljnih ulja je rezultat hidrolize triglicerida djelovanjem lipolitičkih enzima, a izražava se najčešće kao % slobodnih masnih kiselina. Nastale slobodne masne kiseline određene su standardnom metodom (ISO 660: 1996) koja se temelji na titraciji s otopinom natrij-hidroksida c(NaOH) = 0,1 mol/L. Rezulat se izražava kao udio (%) slobodnih masnih kiselina (SMK) računato kao oleinska kiselina:

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

V – utrošak otopine 0,1 mol/L natrij-hidroksida za titraciju uzorka (mL)

c – koncentracija otopine natrij-hidroksida za titraciju c(NaOH) = 0,1 mol/L

m – masa uzorka za ispitivanje u gramima (g)

M – molekulska masa oleinske kiseline, M = 282 g/mol

Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj je indikator svježine ili užeglosti masti i ulja, pokazatelj je oksidacijskog kvarenja ulja ili masti. Ova metoda se najčešće koristi da bi se odredili primarni produkti oksidacije biljnih ulja. Peroksidni broj ulja šafranike određen je standardnom metodom (ISO: 3960: 1998). Metoda određivanja peroksidnog broja se temelji na sposobnosti peroksida da oslobodi jod iz otopine kalij jodida, koji se određuje titracijom s otopinom natrij tiosulfata. Peroksidni broj predstavlja mL 0,002 M otopine natrij tiosulfata potrebnog za redukciju one količine joda koju oslobodi 1 g masti ili ulja iz kalij jodida. Rezultat se izražava kako mmol O_2/kg.

$$Pbr = (V_1 - V_0) \cdot 5 / m \ \ (\text{mmol } O_2/\text{kg})$$

V_0 – volumen otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

V_1 – volumen otopine natrij-tiosulfata, c($Na_2S_2O_3$) = 0,1 mol/L utrošen za titraciju uzorka ulja

M – masa uzorka u gramima (g)

3.2.2.2. Priprema uzorka za ispitivanje oksidacijske stabilnosti

U staklene čašice je izvagano po 50 g uzorka ulja šafranike, te dodano pojedinačno ispitivane prirodne antioksidanse u koncentraciji 0,1 i 0,3%, odnosno 0,05% ovisno o vrsti antioksidansa, računato na masu ulja. Test se provodio u 2 paralele, te se iz dobivenih vrijednosti računala srednja vrijednost kao konačan rezultat. Antioksidans i uzorak ulja je miješan staklenim štapićem i zagrijavan na temperaturu od 70 do 80 ^{o}C. Postignutu temperaturu bilo je potrebno održavati 30 minuta uz neprestano miješanje ulja kako bi se antioksidans otopio. Potom se uzorak hladi na sobnoj temperaturi prekriven satnim stakalcem. Nakon hlađena uzorci se stavljaju u termostat, u našem slučaju, to je bio sušionik Memmert UFE 500. Svakih 24 sata uzimaju se određeni uzorci ulja sa i bez dodanog antioksidansa i sinergista, te ispituje Pbr čija vrijednost ukazuje na promjenu oksidacijske stabilnosti ulja šafranike.

Tablica 6 Udio prirodnih antioksidanasa dodanih u ulje šafranike tijekom ispitivanja održivosti ulja

Uzorak	Antioksidans	Udio antioksidasa (% na masu ulja)
Ulje šafranike (hladno prešano)	-	-
Ulje šafranike (hladno prešano)	Ekstrakt zelenog čaja	0,1
		0,3
Ulje šafranike (hladno prešano)	Ekstrakt ružmarina (tip OXY'LESS CS)	0,1
		0,3
Ulje šafranike (hladno prešano)	Ekstrakt nara	0,1
		0,3
Ulje šafranike (hladno prešano)	Ekstrakt maslinovog lista	0,1
		0,3
Ulje šafranike (hladno prešano)	Eterično ulje rtanjskog čaja	0,05
Ulje šafranike (hladno prešano)	Eterično ulje bosiljka	0,05
Ulje šafranike (hladno prešano)	Eterično ulje majčine dušice	0,05

Tablica 7 Udio sinergista dodanog u ulje šafranike

Uzorak	Antioksidansi i sinergist	Udio sinergista (% na masu ulja)
Ulje šafranike	Ekstrakt zelenog čaja	0,1
	Limunska kiselina	0,01
Ulje šafranike	Ekstrakt ružmarina (OXY'LESS CS)	0,1
	Limunska kiselina	0,01

3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Schaal oven testom

U ovom radu je određivana oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, kako bi se dobio uvid o kvaliteti ulja i mogućnost skladištenja ulja na duže vrijeme bez promjene svojstava ulja. Korišten je test ubrzane oksidacije ulja, Schaal oven test, tijekom četiri dana zagrijavanja ulja u termostatu pri konstantnoj temperaturi. Kao dodatak korišteni su isključivo prirodni antioksidansi za ispitivanje promjene stabilnosti ulja.

Schaal oven test je najčešće primjenjivan test za određivanje održivosti biljnih ulja i animalnih masti. Uzorci ulja koji se ispituju zagrijavaju se na 63 ^{o}C u termostatu ili sušioniku, te se prati porast vrijednosti peroksidnog broja i organoleptičke promjene na ulju nastale oksidacijskim kvarenjem ulja u određenim vremenskim razmacima. Test se najčešće provodi četiri dana, te se svakih 24 sata određuje peroksidni broj čistog ulja i ulja s dodanim antioksidansima i sinergistima. Ovaj test je veoma pogodan za usporedbu biljnih ulja prema oksidacijskoj stabilnosti. Dobiveni rezultati nam daju precizne podatke za procjenu održivosti ulja.

Oven test je proveden na čistom uzorku ulja šafranike te na uzorcima u koje su dodani pojedinačni prirodni antioksidansi, te uzorcima gdje je uz antioksidans dodan i sinergist u ovom slučaju limunska kiselina. U sušioniku (termostatu) Memmert UFE 500, uzorci su zagrijani na 63 ^{o}C, te se svakih 24 sata tijekom 4 dana pratio porast vrijednosti peroksidnog broja standardnom metodom. Na taj način se dobio uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena. Uzorci su prije uzimanja dobro homogenizirani staklenim štapićem, te je nakon toga u čašice vagano 3 do 5 g ulja koje su se analizirale. Preostalo ulje je vraćeno u Memmert

sušionik do sljedećeg dana uzorkovanja na istoj temperaturi. Nakon što su uzorci ulja koji su izvađeni iz sušonika postigli sobnu temperaturu, određuje se, titracijski, peroksidni broj.

Rezultati Oven testa su prikazani kao vrijednost peroksidnog broja (mmol O_2/kg).



Slika 7 Termostat Memmert UFE 500 pomoću kojeg je proveden proces ubrzanog kvarenja ulja



Slika 8 Uzorci ulja šafranike u sušioniku Memmert

4. REZULTATI

Tablica 8 Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja šafranike

Parametri kvalitete	
Peroksidni broj (Pbr), mmol O_2/kg	3,62
Slobodne masne kiseline (SMK), %	0,88

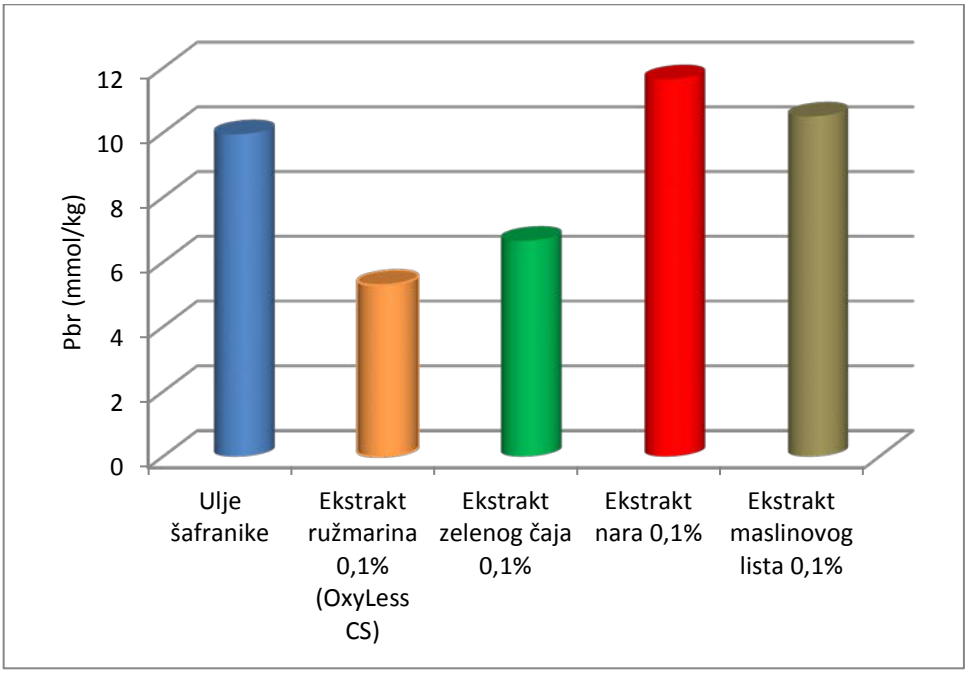
SMK – slobodne masne kiseline (%)

Pbr – peroksidni broj (mmol O_2/kg)

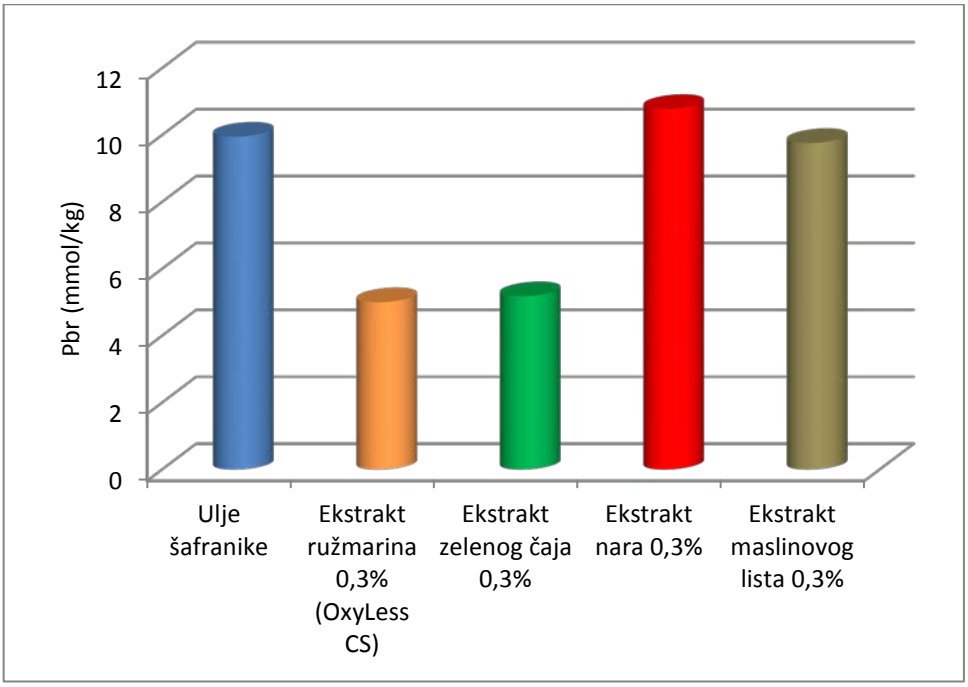
Tablica 9 Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, sa i bez dodanog antioksidansa i sinergista, ispitivana Oven testom tijekom 4 dana praćenjem Pbr svakih 24 sata

Uzorak	Udio antioksidansa (%)	Pbr (mmol O_2/kg)				
		0. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan
Ulje šafranike	-	3,62	5,00	7,47	8,46	9,95
Ekstrakt ružmarina (Oxy Less CS)	0,1		4,66	4,99	5,06	5,29
	0,3		4,27	4,37	4,71	5,00
+ 0,01% limunska kiselina	0,1		4,04	4,21	4,73	5,03
Ekstrakt zelenog čaja	0,1		5,00	5,10	6,10	6,66
	0,3		4,78	4,78	4,93	5,18
+ 0,01% limunska kiselina	0,1		4,41	4,55	5,42	6,00
Ekstrakt nara	0,1		4,98	6,77	9,55	11,65
	0,3		5,02	6,96	8,62	10,78
Ekstrakt maslinovog lista	0,1		4,95	6,47	8,83	10,50
	0,3		4,93	6,00	8,17	9,76
Eterično ulje rtanjskog čaja	0,05		4,97	6,10	8,50	9,71
Eterično ulje bosiljka	0,05		4,93	6,34	8,46	9,67
Eterično ulje majčice dušice	0,05		5,00	6,97	8,00	9,48

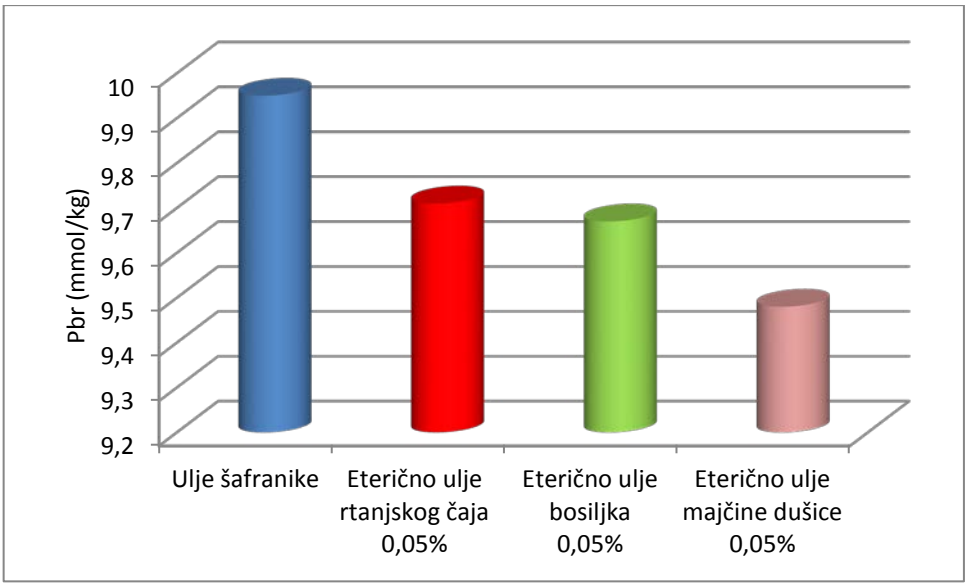
Pbr – peroksidni broj (mmol O_2/kg)



Slika 9 Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,1%) na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, nakon 4 dana Oven testa



Slika 10 Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (0,3%) na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, nakon 4 dana Oven testa



Slika 11 Utjecaj dodatka eteričnog ulja (0,05%) na oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, nakon 4 dana Oven testa

5. RASPRAVA

U **Tablici 8** prikazani su osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja šafranike (peroksidni broj – Pbr i slobodne masne kiseline – SMK). Rezultati određivanja Pbr i SMK pokazuju da je ulje šafranike dobre kvalitete. Dobiveni rezultati su u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 41/12).

Oksidacijska stabilnost hladno prešanog ulja šafranike, sa i bez dodanog prirodnog antioksidansa i sinergista, ispitivana Oven testom tijekom 4 dana praćenjem Pbr svakih 24 sata prikazana je u **Tablici 9** i na **Slikama 9 do 11.**

Ispitivanjem stabilnosti tj. otpornosti ulja šafranike prema oksidacijskom kvarenju testom ubrzane oksidacije (Oven test) pri 63 ^{o}C, vidljivo je u **Tablici 9** da se tijekom 4 dana testa postepeno povećava vrijednost Pbr s početnih 3,62 (mmol O_2/kg) ulja na 9,95 (mmol O_2/kg) nakon 4 dana testa. Dodatkom prirodnih antioksidanasa (ekstrakta ružmarina tipa Oxy Less CS, ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta nara, ekstrakta maslinovog lista, udjela 0,1% i 0,3% te eteričnog ulja rtanjskog čaja, bosiljka i majčine dušice, udjela 0,05% u ulje šafranike željela se postići veća stabilizacija ulja tj. otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju. Primjenom ekstrakta ružmarina Oxy'Less CS (0,1%) i ekstrakta zelenog čaja (0,1%) postignuta je određena zaštita ulja šafranike od oksidacije. Ekstrakt ružmarina dodan u udjelu 0,1%, efikasnije štiti ulje šafranike od oksidacijskog kvarenja (nakon 4 dana testa Pbr je 5,29 mmol O_2/kg) u odnosu na ekstrakt zelenog čaja gdje je Pbr nakon 4 dana 6,66 mmol O_2/kg. Dodatkom ekstrakta nara (0,1%) i ekstrakta maslinovog lista (0,1%) ne postiže se porast stabilizacije tj. dodatna zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja u odnosu na ulje šafranike bez dodanog antioksidansa (kontrolni uzorak). Primjenom ova dva antioksidansa, u ovim koncentracijama, postiže se veća vrijednost Pbr nakon 4 dana testa i to 11,65 mmol O_2/kg (nara) i 10,50 mmol O_2/kg (maslinovog lista) u odnosu na kontrolni uzorak. Dakle, njihova antioksidacijska aktivnost nije dovoljna za zaštitu ulja šafranike od oksidacijskog kvarenja.

Povećanjem koncentracije (udjela) ispitivanih antioksidanasa (ekstrakta ružmarina i ekstrakta zelenog čaja) u ulje šafranike sa 0,1% na 0,3% postiže se još veća i efikasnija zaštita ulja od oksidacije. Dodatkom ekstrakta ružmarina Oxy Less CS (0,3%) značajno se povećava stabilnost ulja šafranike, dobivena je veća otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju, Pbr je 5,00 mmol O_2/kg nakon 4 dana testa u odnosu na kontrolni uzorak ulja. Također, ekstrakt

zelenog čaja (0,3%) dodatno povećava stabilnost ulja šafranike Pbr je 5,18 mmol O_2/kg, nakon 4 dana testa, u odnosu na dodatak ekstrakta zelenog čaja udjela 0,1%.

Ekstrakt nara, dodan u koncentraciji 0,3% još uvijek ne dovodi do porasta stabilnosti ulja šafranike, Pbr je 10, 78 mmol O_2/kg, dakle, opet je veći u odnosu na kontrolni uzorak nakon 4 dana testa.

Neznatnu efikasnost zaštite ulja šafranike od oksidacijskog kvarenja pokazuje dodatak ekstrakta maslinovog lista udjela 0,3%. Vrijednost Pbr nakon 4 dana testa je malo niža (9,76 mmol O_2/kg) u odnosu na kontrolni uzorak ulja.

Na **Slici 9** i **10** vidljiva je efikasna zaštita ulja šafranike dodatkom ekstrakta ružmarina i zelenog čaja, kod obje koncentracije, u odnosu na primjenu ekstrakta nara i ekstrakta maslinovog lista, gdje je nakon 4 dana testa Pbr veći u odnosu na kontrolni uzorak.

Dodatkom sinergista, limunske kiseline (0,01%) uz prirodni antioksidans ekstrakt ružmarina Oxy Less CS (0,1%) te uz ekstrakt zelenog čaja (0,1%) u ulje šafranike postignuta je veća stablinost tj. otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju u odnosu na primjenu tih antioksidanasa bez dodatka ovog sinergista. Dakle, ispitivani sinergist dodatno stabilizira ulje šafranike već u ovako maloj koncentraciji. Ova pojava naročito je zapažena u kombinaciji ekstrakta ružmarina i limunske kiseline gdje je postignuta gotovo ista razina zaštite ulja šafranike kao sa dodatkom ekstrakta ružmarina (0,3%), što nije slučaj u kombinaciji s dodatkom ekstrakta zelenog čaja.

Dodatkom eteričnog ulja rtanjskog čaja, bosiljka i majčine dušice (0,05%) u ulje šafranike ostvarena je neznatna zaštita ovog ulja od oksidacijskog kvarenja. Vrijednost Pbr nakon 4 dana testa malo je niža u odnosu na kontrolni uzorak ulja. Veću antioksidacijsku aktivnost u ulju šafranike pokazuje eterično ulje majčine dušice pri čemu je dobivena niža vrijednost Pbr ulja 9,48 mmol O_2/kg u odnosu na primjenu eteričnog ulja rtanjskog čaja i bosiljka (**Tablica 9** i **Slika 11**).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja dodatka prirodnih antioksidanasa i sinergista na održivost ili oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja šafranike mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Isptivano ulje šafranike ima relativno dobru oksidacijsku stabilnost, nakon 4 dana Oven testa nije dobivena visoka vrijednost peroksidnog broja.

2. Primjena prirodnog antioksidansa ekstrakta ružmarina (Oxy Less CS), i ekstrakta zelenog čaja doprinosi većoj stabilizaciji ulja šafranike tj. povećava se otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju.

3. Dodatkom ekstrakta ružmarina (Oxy Less CS), udjela 0,1%, u ulje šafranike postiže se veća razina zaštite ulja od oksidacije u odnosu na primjenu ekstrakta zelenog čaja (0,1%).

4. Ekstraktom nara (0,1%) i ekstraktom maslinovog lista (0,1%) ne postiže se zaštita ulja šafranike od oksidacijskog kvarenja, nakon 4 dana testa veća je vrijednost peroksidnog broja u odnosu na kontrolni uzorak ulja.

5. Korištenjem veće koncentracije dodanog ekstrakta ružmarina (0,3%), kao i ekstrakta zelenog čaja (0,3%) postiže se veća efikasnost zaštite ulja šafranike od oksidacije u odnosu na dodatak 0,1%.

6. Većom koncentracijom ekstrakta nara i ekstrakta maslinovog lista (0,3%) ne postiže se zaštita ulja šafranike od oksidacije.

7. Korišteni sinergist limunska kiselina, udjela 0,01%, u kombinaciji sa ekstraktom ružmarina (0,1%) te s ekstraktom zelenog čaja (0,1%) dodatno povećava zaštitu ulja šafranike od oksidacijskog kvarenja.

8. Kombinacijom limunske kiseline (0,01%) sa ekstraktom ružmarina tipa Oxy Less CS (0,1%) postiže se ista razina zaštite ulja šafranike od oksidacije kao sa primjenom samo ekstrakta ružmarina veće koncentracije (0,3%). Ova pojava nije zapažena kod primjene ekstrakta zelenog čaja i ovog sinergista.

9. Dodatkom eteričnog ulja rtanjskog čaja, bosiljka i majčine dušice u koncentraciji 0,05% u ulje šafranike ostvarena je neznatna zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja .

10. Veću zaštitu ulja šafranike pokazuje eterično ulje majčine dušice.

7. LITERATURA

Abramović H, Abram H: Effect of added rosemary extract on oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Acta agriculturae Slovenica* 87 (2):225-261, 2006.

Bandoniene D, Pukalskas A, Venskutonis P, P.R. 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.

Brice BA, Swain ML, Schaeffer BB, Ault WC: Oil and Soap. *J. Opt. Soc. Am*., 22:219-224, 1945.

Brice BA, Swain ML: Oil and Soap. *J. Opt. Soc. Am*., 35:532-544, 1945.

Broadbent C.J, Pike O.A: 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 and lipoprotein cholesterol concetrations. Epidemiologic studies, *Am.J.Clin.Nutr*., 65 (suppl), 1597S-1610S, 1997.

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

Dimić E: *Hladno ceđena ulja*. Tehnološki fakultet, Novi sad, 2005.

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

Farhoosh R, Einafshar S, Sharayei P: The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chemistry* 115:933-938, 2009.

Farhoosh R, Niazmand R, Rezaei M, Sarabi M: Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (6):587-592, 2008.

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 FD, Norris FA: *Lipids in Foods*. Pergamon Press, Frankfurt, 1983.

Gunstone FD: *The Chemistry of Oils and Fats*. Blackwell Publishing, UK, 2004.

Harš AR, Hadolin M, Knez Z, Bauman D: Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower *oil. Food Chem*., 71, 2000.

Hui YH: Safflower oil*. In Bailey's industrial oil and fat products 2*, *Edible oils and fat products*: *Oils and oil seeds* 411-455, Fifth Edition, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996.

Kim IH, Kim CJ, You JM, Lee KW, Kim CT, Chung SH, Tae BS: Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *Journal of The American Oil Chemist's Society*, 79:413-418, 2002.

Kim IH, Kim MH, Lee YC: Oxidative stabiity and extraction of perilla seed oil with supercritical carbon dioxide. *Food Sience and Biotechnology*, 7:177-180, 1998.

Kim JH, Jeon SM, An, MY, Ku, SK, Lee JH, Choi MS, Moon KD: Effects of diet Korean safflower (Chartamus tinctorius L.) seed powder on bone tissue in rats during the recovery of rib fracture*. Journal of Korean Society Food Science and Nutrition* 27:698-704, 1998.

Knight HB, Jordan EF, Jr., Swern J: *J Biolo. Chem.,* 164:477-482, 1946.

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

Lampi AM, Kamal-Eldin A, Piironen V: Tocopherols and tocotrienols from oil and ceral grains. *In Shi J, Mazza G, Maguer ML, Functional Foods*. *Biochemical and Processing Aspects*, str. 2. CRC Press, Boca Raton, 2002.

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. J. *Am. Oil. Chem. Soc*., str 63, 1986.

Madhavi DL: *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives Food Science and Technology*, CRC Press, 1996.

Mandić ML: *Znanost o prehrani*. Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Merill LI, Pike OA, Ogden LV, Dunn ML: Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils With Added Antioxidans*. J. Am. Chem. Soc*., 85:771-776, 2008.

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: Pravilnik o jestivim uljima i mastima. Narodne novine 41/12, 2012.

Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: Pravilnik o prehrambenim aditivima. Narodne novine 81/08, 2008.

Moyad MA: *An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention.* Part I. Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations 23:23-35, 2005.

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

Oomah BD, Mazza G: Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends Food Sci. Technol*. 10:193-198, 1999.

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

Patterson HBW: *Handling and storage of oilseeds: Oils, fats and meals*. Elsevier, London i New York, 1989.

Prospektni materijal kompanije H.L.S. Ltd.: *Characteristics and composition of vegetable oils*. Industrial Engineering Company, Petah-Tikva, Israel.

Przybylski R, Malcolmson LJ, Eskin NAM, Durance-Tod S,Mickle J, Carr R: Stability of Low Linolenic Acid Canola Oil to Accelerated Storage at 60 ^{o}C. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 26 (3):205-209, 1993.

Rade D, Morkovčak Z, 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.

Sabilov CM, Fronczek C, Astete CE, Khachaturyan L, Leonardi C: Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α-Tocopherol in Free and Dissolved Form. *J. Am. Oil Chem. Soc*., 86:895-902, 2009.

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

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

Shahidi F: Quality Assurance of Fats and Oils. *In F. Shahidi: Bailey's Industrial Oil and Fats Products*. Newfoundland, Canada, 2005.

Smith J: Safflower oil. *In Shahidi F, Bailey's Industrial Oil and fat Products*, str. 2. John Wiley i Sons, Inc.,pp. 491-535, 2005.

Suja KP, Abraham JT, Thamizh SN, Jayalekshmy A, Arumughan C: Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry* 84:393-400, 2004.

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

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

Thomasson HJ: *Les acides gras essentiels*. Journées d'information sur les corps gras alimentaires. ITERG, Paris, 1962.

Yanishlieva NV, Marinova EM: Stabilization of edible oils with nature antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 103, 2001.

Yoshida H, Takagi S: Effects of seed roasting temperature and the time on the quality characteristics of sesame (Sesamum indicum) oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75:19-26, 1997.

Agroklub: *Šafranika*. http://www.agroklub.com/sortna-lista/uljarice-predivo-bilje/safranika-81/ [15.05.2015]

Ivanov D: Masne kiseline. 2008. http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/masne-kiseline [20.06.2015]