

# UTJECAJ TERMIČKE OBRADJE MASLINOVOG I SUNCOKRETOVOG ULJA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

---

**Luketina, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:149985>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lucija Luketina

UTJECAJ TERMIČKE OBRADJE MASLINOVOG I SUNCOKRETOVOG  
ULJA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Diplomski rad

Rijeka, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lucija Luketina

UTJECAJ TERMIČKE OBRADJE MASLINOVOG I SUNCOKRETOVOG  
ULJA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Diplomski rad

Rijeka, rujan 2020.

Mentori rada: Prof. dr. sc. Srećko Valić, znanstveni savjetnik

Doc. dr. sc. Damir Klepac, znanstveni suradnik

Diplomski rad obranjen je dana 22. rujna 2020. na Medicinskom fakultetu u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Marin Tota, predsjednik

2. Prof. dr. sc. Srećko Valić, član

3. Doc. dr. sc. Damir Klepac, član

Rad sadrži 14 slika, 4 tablice i 13 literaturnih navoda na 45 stranice.

## ZAHVALA

Htjela bih izraziti par riječi zahvale ljudima koji su mi omogućili i pomagali prilikom izrade ovog rada. Svakako bi se prvo zahvalila svome mentoru prof. dr. sc. Srećku Valiću, koji mi je pružio veliku čast omogućivši izradu ovog rada pod svojim vodstvom. Zahvaljujem na posvećenom vremenu uloženom trudu i utkanom znanju, te svakako na odnosu prema ljudima i studentima s kojima surađuje koji će mi uvijek poslužiti kao primjer izvrsnosti. Zahvaljujem na svim znanstvenim i stručnim savjetima kojima je oblikovao ideju i pomogao mi u izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem na suradnji, ugodnom boravku i strpljenju prilikom izvođenja eksperimenata u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta “Ruđer Bošković” u Zagrebu. Hvala i doc. dr. sc. Damiru Klepcu, na pomoći u svladavanju programske podrške potrebne za prikaz i obradu rezultata u ovom radu. Želim zahvaliti i svim profesorima i asistentima na medicinskom fakultetu u Rijeci koji su svojim radom pomogli u stjecanju moga znanja. Također zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je bila podrška i oslonac kroz cijelo moje školovanje.

## SAŽETAK

U radu je praćen utjecaj termičke obrade maslinovog i suncokretovog ulja u atmosferi zraka na njegovu antioksidacijsku aktivnost. Varirana su dva parametra: vrijeme i temperatura termičkog tretiranja. Pri tome su odabrani parametri koji odgovaraju realnim parametrima pripreme namirnica i to temperatura od 150 °C i 180 °C te vrijeme 10 min i 20 min. Antioksidacijsko djelovanje praćeno je mjerenjem relativne koncentracije radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) elektronskom spinskom rezonancijom (ESR) tijekom 20 min po dodatku ulja otopini radikala. Ispitivana su četiri uzorka maslinovog ulja i jedan uzorak suncokretovog ulja. Pokazalo se da kod svih uzoraka termička obrada, bez obzira na vrijeme i temperaturu tretiranja, dovodi do porasta antioksidacijske moći prema DPPH radikalu. To se može objasniti prisutnošću radikala nastalih tijekom procesa termičke obrade kao posljedica lipidne peroksidacije. Ti radikali vjerojatno doprinose bržoj redukciji DPPH. Različito antioksidacijsko djelovanje termički tretiranih uzoraka najvjerojatnije potječe od različitog kemijskog sastava ulja. Neki su uzorci za vrijeme tretiranja tijekom 10 min pri 150 °C pokazali bolju aktivnost nego kada su bili tretirani u istom vremenskom intervalu pri višoj temperaturi, dok su drugi pokazali jače antioksidacijsko djelovanje nakon tretiranja tijekom 10 min pri 180 °C. Za dulje vrijeme tretiranja (20 min) pri 180 °C, većini je uzoraka oslabila antioksidacijska moć, u usporedbi s kraćim vremenskim tretiranjem ili tretiranjem pri nižoj temperaturi. U suncokretovom ulju su tokoferoli odgovorni za njegovo antioksidacijsko djelovanje. Njihova uloga u neutraliziranju novonastalih radikala čini se različitom u odnosu na ulogu polifenola kod maslinovog ulja. Može se pretpostaviti da tokoferoli slabije reagiraju s novonastalim radikalima od polifenola pa je stoga uloga tih radikala u neutralizaciji DPPH znatno izraženija kod suncokretovog ulja u usporedbi s maslinovim uljem.

## ABSTRACT

The influence of thermal treatment of olive oil and sunflower oil in the presence of air on their antioxidant activity was studied. Two parameters were varied: time and temperature of thermal treatment. The parameters that correspond to the real parameters of food preparation were selected, namely the temperature of 150 ° C and 180 ° C and the time of 10 min and 20 min. Antioxidant activity was monitored by measuring the relative concentration of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical by electron spin resonance (ESR) during 20 min after the addition of oil to the radical solution. Four samples of olive oil and one sample of sunflower oil were investigated. It was shown that for all samples the heat treatment, regardless of the time and temperature of treatment, leads to an increase in antioxidant power against the DPPH radical. This can be explained by the presence of radicals formed during the heat treatment process as a consequence of lipid peroxidation. These radicals probably contribute to a faster reduction of DPPH. The different antioxidant activity of thermally treated samples most likely originates from the different chemical composition of the oil samples. Some samples showed better activity during treatment for 10 min at 150 ° C than when treated during the same time interval at higher temperature, while others showed stronger antioxidant activity after treatment for 10 min at 180 ° C. For a longer treatment time (20 min) at 180 ° C, antioxidant power decreased for most samples, compared to a shorter time treatment or treatment at a lower temperature. In sunflower oil, tocopherols are responsible for its antioxidant activity. Their role in neutralizing newly formed radicals appears to be different from the role of polyphenols in olive oil. It can be assumed that tocopherols react less well with newly formed radicals than polyphenols and therefore the role of these radicals in neutralizing DPPH is significantly more pronounced in sunflower oil compared to olive oil.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	8
1.1. Povijest korištenja maslinovog ulja.....	8
1.2. Kemijski sastav maslinovog ulja.....	8
1.3. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje.....	10
1.4. Maslinovo ulje i termička obrada.....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali.....	14
3.2. Metoda elektronska spinska rezonancija (ESR).....	14
3.2.1. Priprema uzoraka za ESR mjerenja.....	14
3.3. Radikal 2,2-difenil-pikrilhidrazil (DPPH).....	15
3.4. ESR mjerenja.....	16
3.5. Senzorska analiza maslinovog ulja.....	17
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA.....	36
6. ZAKLJUČAK.....	42
7. LITERATURA.....	44
ŽIVOTOPIS.....	45



## **1. UVOD**

### **1.1. Povijest korištenja maslinovog ulja**

Maslina se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Uzgoj masline započeo je prije više od 6000 godina u Aziji. Od trećeg tisućljeća prije Krista uzgoj masline iz Sirije prelazi i postaje popularan u raznim mediteranskim područjima poput Egipta, Palestine i Grčke. Doprinos širenju masline, sadeći stabla maslina na svim osvojenim područjima, dali su stari Rimljani i Grci. Oni su klasificirali maslinovo ulje u pet kategorija: „oleum cibarium“ koje je bilo namijenjeno prehrani robova, „oleum caducum“ koje se dobivalo od plodova koji se nađu na zemlji, „oleum maturum“ od potpuno zrelih plodova, „oleum viride“ koje se dobivalo od zrelijih maslina te „oleum exalbis ulivis“ dobiveno mljevenjem zelenih maslina.

Maslinovo ulje nije bilo korišteno isključivo kao prehrambena namirnica već je svoju svrhu imalo u raznim vjerskim obredima, prilikom masaža te kao gorivo za uljane svijeće.

Blagotvorni učinak maslinovog ulja na zdravlje čovjeka je odavno poznat. U novije vrijeme maslinovo ulje postaje prepoznatljivo kao simbol zdravog načina prehrane i modernog života. Broj znanstvenih istraživanja o pozitivnom učinku ekstra djevičanskog maslinovog ulja na zdravlje je u porastu, tako da i obični potrošač postaje svjestan važnosti njegove visoke kakvoće [1].

### **1.2. Kemijski sastav maslinovog ulja**

Vrijeme žetve, varijacije u procesu proizvodnje, sustav navodnjavanja, lokacija, godina uzgoja, zrelost ploda i sorta su čimbenici koji imaju utjecaj na sastav maslinovog ulja. Sastav maslinovog ulja dijelimo na sastojke osapunjivog dijela maslinovog ulja (99%) i na neosapunjive sastojke koji čine svega 1%. Trigliceridi čine najveći dio osapunjivog dijela. Udio masnih kiselina u maslinovom ulju varira. Maslinovo ulje sadrži pretežno oleinsku

kiselinu, zatim linolnu i linolensku te vrlo malu količinu zasićenih masnih kiselina poput palmitinske i stearinske. Takav sastav i omjer masnih kiselina daje prednost maslinovom ulju u usporedbi s drugim biljnim uljima. Za brojne fiziološke procese u maslinovom ulju zaslužni su neosapunjivi sastojci. Većina spojeva su prirodni antioksidansi koji sprječavaju kvarenje maslinovog ulja, dok su neki od spojeva zaslužni za okus i miris ili imaju terapijski učinak na zdravlje.

Ugljikovodici su najzastupljenija skupina spojeva neosapunjive frakcije. Antioksidans i važan kemijski prekursor sterola koji dominira među ugljikovodicima je skvalen. Od drugih važnih sastojaka izdvajaju se tokoferoli, od kojih je najvažniji je  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E).

Za boju maslinovog ulja zaslužan je pigment klorofil koji u mraku djeluje antioksidativno, dok u kontaktu sa svjetlosti inducira oksidaciju. Osim navedenog, u neosapunjivom dijelu nalaze se i fenolni spojevi, karotenoidi te alifatski alkoholi koji daju aromu ulju. Na količinu ukupnog sadržaja polifenola, koncentracije klorofila te palmitinske i linolenske masne kiseline utječe sadržaj ulja koji se nalazi u plodu masline. Povećanje razine masnih kiselina sazrijevanjem povezuje se s povećanjem aktivnosti lipolitičkog enzima i smanjenjem aktivnosti enzima lipooksigenaze.

### 1.3. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje

Glavni izvor masti u mediteranskoj prehrani je maslinovo ulje. Mediteransku prehranu karakterizira velika zastupljenost žitarica, povrća te ribe. Optimalan omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina te antioksidacijska aktivnost polifenola, tokoferola, karotenoida i klorofila zaslužni su za njegovo preventivno i terapijsko djelovanje. Maslinovo ulje dokazano smanjuje rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Također treba istaknuti značajnu ulogu  $\beta$ -sitosterola koji inhibira apsorpciju kolesterola i time pridonosi sniženju povišene razine kolesterola. Dokazano da je korištenje maslinovog ulja smanjuje rizik od niza degenerativnih bolesti kao što su ateroskleroza, karcinom debelog crijeva, astma, šećerna bolest te artritis. Maslinovo ulje potencijalno može umanjiti rizik od Alzheimerove bolesti i demencije povezane s godinama. Povećana konzumacija masti jedan je od glavnih okidača za razvoj ovakvih bolesti. Mediteranske zemlje bilježe smanjenje pojavnosti degenerativnih bolesti, upravo iz razloga što je maslinovo ulje glavni izvor masti na Mediteranu.[3] Nova studija objavljena u časopisu Osteoporosis International [4] dokazala je pozitivan učinak maslinovog ulja kod osteoporoze, sarkopenije te prijeloma kostiju. Prehrana može utjecati na napredovanje i promjene u koštanim mišićima. Znanstvenici su dokazali da upravo mediteranska prehrana, bogata maslinovim uljem, ima značajnu ulogu u prevenciji navedenih bolesti. Uspoređivane su referetne vrijednosti mase bez masnoća (FFMI) i indeks masne mase (FMI) kod 2570 žena u rasponu od 18-79 godina. Mediteranska prehrana pridonosi mišićnoj snazi te na taj način sprječava ili prolongira pojavljivanje navedenih stanja.[4] Umjereno konzumiranje maslinovog ulja, temeljne namirnice mediteranske prehrane, uspješno smanjuje krvni tlak, pokazuje istraživanje objavljeno u časopisu Journal of Nutrition.[5] Ispitanici su tijekom 4 tjedna konzumirali prehranu obogaćenu suncokretovim uljem ili maslinovim uljem. Rezultati su pokazali da je maslinovo ulje smanjilo ukupni i LDL-kolesterol te su vrijednosti

bile znatno niže nego u skupini koja je konzumirala suncokretovo ulje.[5] Prema istraživanju provedenom na University of East Anglia [6] maslinovo ulje sprječava stvaranje ulceroznog kolitisa. Maslinovo ulje je bogato oleinskom kiselinom. Istraživači su proučavali više od 25000 ljudi u dobi od 40 do 65 godina koji žive u Velikoj Britaniji. Sudionici, od kojih nijedan nije imao ulcerozni kolitis, vodili su detaljne dnevnike prehrane koje su kasnije analizirali nutricionisti. U određenom razdoblju, 22 sudionika u koja su sudjelovala u studiji razvili su ulcerozni kolitis i istraživači su usporedili njihovu prehranu s onima koji nisu razvili bolest. Zaključili su da oni s najvećim unosom oleinske kiseline iz maslinovog ulja imaju 90% niži rizik od razvoja bolesti.[6]

#### **1.4. Maslinovo ulje i termička obrada**

Maslinovo ulje se dobiva mehaničkim i fizikalnim postupcima te se može konzumirati sirovo npr. u raznim salatama ali se može podvrgnuti i termičkim obradama poput kuhanja i prženja. Prerada maslina se sastoji od sljedećih postupaka: čišćenja i pranja plodova, mljevenja, miješanja tijesta, odvajanja čvrstog od tekućeg dijela, separacije uljnog mošta na ulje i vodu. Ispravan izbor ulja za prženje važan je iz više razloga. Ulje kao medij za prijenos topline mora biti u stanju izdržati visoke temperature te imati visoku oksidacijsku stabilnost s obzirom da hrana apsorbira dio ulja prilikom prženja. Prilikom termičke obrade hrane događaju se razne kemijske reakcije poput hidrolize, polimerizacije te oksidacije koje mogu narušiti organoleptičku i nutritivnu kvalitetu same namirnice.

Zbog porasta popularnosti pržene hrane, u ovom su radu simulirani uvjeti prženja odabirom uobičajenih temperatura i vremena termičke obrade namirnica. Pratili su se promjene antioksidativnih svojstava u četiri različita uzorka maslinovog i jednog suncokretovog ulja. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi.

Kod termičkog tretiranja potrebno je obratiti pozornost da ulje ne prelazi točku dimljenja, odnosno temperaturu pri kojoj se ulje može kontinuirano dimiti što se vidi u obliku plavih para. Dim je indikator razgradnje ulja na slobodne masne kiseline i glicerol. Razgradnjom glicerola dolazi do stvaranja kancerogenog spoja 2-propenala. Ulje je pogodnije za prženje što je njegova točka dimljenja viša. Za maslinovo ulje ona iznosi 210 °C, što je više od uobičajene maksimalne temperature koja se postiže prilikom prženja namirnica (približno 180 °C). Ono što zasigurno daje prednost u odabiru maslinovog ulja za prženje je njegovo bogatstvo prethodno spomenutim antioksidansima i visokim udjelom oleinske kiseline.

Višu energiju aktivacije oksidacije lipida ima samo kokosovo ulje, koje zbog svoje niske točke dimljenja nije prikladno za termičku obradu. Svi navedeni podaci upućuju na doprinos maslinovog ulja nutritivnoj vrijednosti termički pripremljene namirnice.[7]

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je bio ispitati kako termička obrada, odnosno termičko tretiranje maslinovog ulja, utječe na njegovu antioksidacijsku aktivnost. Posebna pozornost bila je na tretiranju pri temperaturama od 150 °C i 180 °C, koje se najčešće koriste prilikom pripreme jela, te vremenima tretiranja 10 min i 20 min koja odgovaraju realnim vremenima pripreme namirnica.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

U radu je ispitivano četiri uzorka maslinovog ulja, od toga jedan komercijalni uzorak (ekstra djevičansko maslinovo ulje, proizvođač Zvijezda, godina proizvodnje 2019.) i tri uzorka domaće proizvodnje (porijeklo Dalmacija, okolica Makarske, 2019. godina) te jedan uzorak komercijalno dostupnog suncokretovog ulja (proizvođač Zvijezda, 2019.). Antioksidacijsko djelovanje praćeno je mjerenjem relativne koncentracije radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, poznatijim pod skraćenima nazivom DPPH.

#### **3.2. Metoda elektronska spinska rezonancija (ESR)**

Za praćenje relativne koncentracije radikala korištena je elektronska spinska rezonancija (ESR), spektroskopska tehnika koja je izuzetno osjetljiva i vrlo precizno mjeri koncentraciju (broj) radikala u uzorku. Riječ je o tehnici koja se temelji na apsorpciji mikrovalnog zraćenja od strane nesparenih elektrona smještenih u magnetskom polju. Spareni elektroni poništavaju svoje magnetske momente pa signal u elektronskoj spinskoj rezonanciji daju samo one čestice (molekule i ioni) koje posjeduju nesparene elektrone.

##### **3.2.1. Priprema uzoraka za ESR mjerenja**

Svi uzorci ulja termički su tretirani pri temperaturama od 150 °C i 180 °C. Vrijeme tretiranja za obje temperature je varirano i iznosilo je 10 min i 20 min.

**Tablica 1.** Prikaz uzoraka s oznakama s obzirom na vrijeme i temperaturu tretiranja.

UZORCI	Netretirani uzorci T=22-24°C	Uzorci na T=150°C t=10 min	Uzorci na T=180°C t=10 min	Uzorci na T=150°C t=20 min	Uzorci na T=180°C t=20 min
Maslinovo ulje, Zvijezda	1	1A	1B	1C	1D
Domaće maslinovo ulje I	2	2A	2B	2C	2D
Domaće maslinovo ulje J	3	3A	3B	3C	3D
Domaće maslinovo ulje K	4	4A	4B	4C	4D
Suncokretovo ulje, Zvijezda	5	5A	5B	5C	5D

Pripremljena je svježa otopina DPPH u etanolu, koncentracije 0,15 mmol/L. Kao slijepa proba koristila je otopina DPPH sljedećeg sastava: 4,80 mL otopine DPPH u koju je dodano 0,20 mL čistog etanola. Uzorci maslinovog ulja pripremani su tako da je koncentracija ulja u otopini DPPH iznosila 4% po volumenu. Preciznije, volumenu od 4,80 mL otopine DPPH dodano je 0,20 mL maslinovog ulja i zabilježeno je vrijeme ( $t = 0$ ) kad je ulje stupilo u kontakt s otopinom DPPH. Potom je svaki uzorak promiješan na Vortex miješalici tijekom 3 sekunde i unesen kapilaru koja je zatim smještena u ESR cjevčicu od kvarcnog stakla i stavljena u magnetsko polje (ESR šupljinu).

### 3.3. Radikal 2,2-difenil-pikrilhidrazil (DPPH)

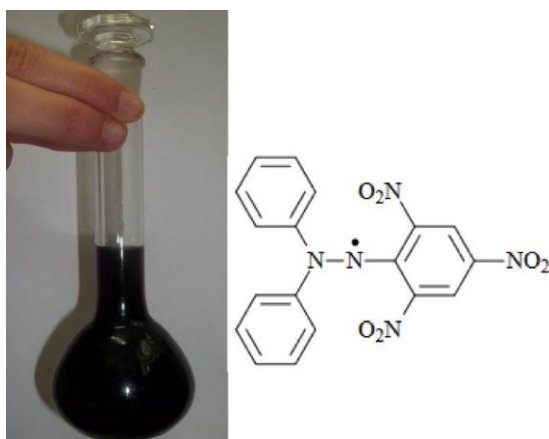
Radikal 2,2-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), prema IUPAC-ovoj nomenklaturi di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazan, je najčešće korišteni radikal u ispitivanju antioksidacijskih svojstava. Njegova alkoholna otopina je tamnoljubičaste boje, kao što je vidljivo na slici 1, na kojoj je ujedno prikazana i strukturna formula DPPH. Relativna atomska masa ovog radikala



iznosi 394,32, dok je njegova molekulska formula  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ . Ovaj radikal mora biti skladišten na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  u frižideru te treba biti zaštićen od utjecaja sunčevog svjetla.

Osim u ESR spektroskopiji, ovaj se radikal koristi i u spektrofotometriji. Dok oksidirani oblik radikala oboji otopinu ljubičasto, prijelazom u reducirani oblik dolazi do promjene boje u žutu. Ova se promjena opaža pri valnoj duljini od 517 nm.

Iako su ESR spektroskopija i spektrofotometrija komparabilne metode i njihovi se rezultati često podudaraju, prednost ESR spektroskopije je u tome što je ona preciznija jer izravno mjeri broj radikala. Povrh toga, za razliku od spektrofotometrije, ESR može mjeriti i netransparentne odnosno čvrste uzorke.



**Slika 1.** Otopina DPPH u etanolu i strukturna formula DPPH.

### 3.4. ESR mjerenja

Mjerenja ESR spektara 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala provedena su u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta “Ruđer Bošković” u Zagrebu na spektrometru Varian E-109 uz sljedeće spektroskopske parametre: magnetski posmak 80 G (8 mT), vrijeme jednog „scana“ 20 s, frekvencija 9,27 GHz, snaga mikrovalnog polja 10 mW i amplituda modulacije 1 G (0,1 mT).

Za svaki uzorak mjereno je signal radikala u ovisnosti o vremenu proteklom nakon dovođenja u kontakt otopine radikala s određenom količinom maslinovog ulja tijekom dvadeset minuta. Vremenski razmaci između dva uzastopna mjerenja bili su 0,5 min tijekom prvih pet minuta mjerenja, 1 min u intervalu od pete do desete minute te 2 min u intervalu od desete do dvadesete minute. Spektri u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija su akumulirani pomoću EW (EPRWare) programske podrške. Njihovim dvostrukim integriranjem dobiven je broj koji je proporcionalan koncentraciji radikala u uzorku.

Potrebno je napomenuti da je neposredno prije mjerenja svakog pojedinog uzorka snimljen spektar slijepe probe te da su integrali signala uzoraka normirani na intenzitet slijepe probe snimljene neposredno prije mjerenja svakog uzorka.

### **3.5. Senzorska analiza maslinovog ulja**

Utvrđivanje organoleptičkih svojstava pomoću osjeta okusa i mirisa naziva senzorska analiza. U radu je korištena senzorska analiza maslinovog ulja, koja se inače koristi kao važna tehnika u ocjenjivanju kvalitete maslinovog ulja. Ona je temeljena na Panel testu, posebnoj standardiziranoj analitičkoj metodi, kojeg provodi grupa od 8-12 educiranih ocjenjivača, koji imaju položeni test fiziološke sposobnosti za organoleptičku ocjenu maslinovog ulja. Radom panela upravlja vođa panela čiji je zadatak da nadgleda ocjenjivanje, vrši pripremu uzoraka te unosi rezultate u odgovarajuću programsku podršku. Prema važećim propisima EU i IOOC –a objašnjena je tehnika i pravila koja se moraju poštivati prilikom senzorske analize. Ulje se nalazi u posebnim plavim čašama koje onemogućuju uvid u boju kako ne bih došlo do vizualnog utjecaja na ocjenjivača. Maksimalan broj uzoraka koji se obrađuje ne smije prelaziti tri uzorka. Uzorci maslinovog ulja prije degustacije moraju biti zagrijani na temperaturi od 28°C. Treba biti pažljiv prilikom odabira mjesta gdje će se vršiti senzorska analiza maslinovog ulja. Prostor treba zadovoljavati uvjete u pogledu opreme (čaše, grijač, kabina),

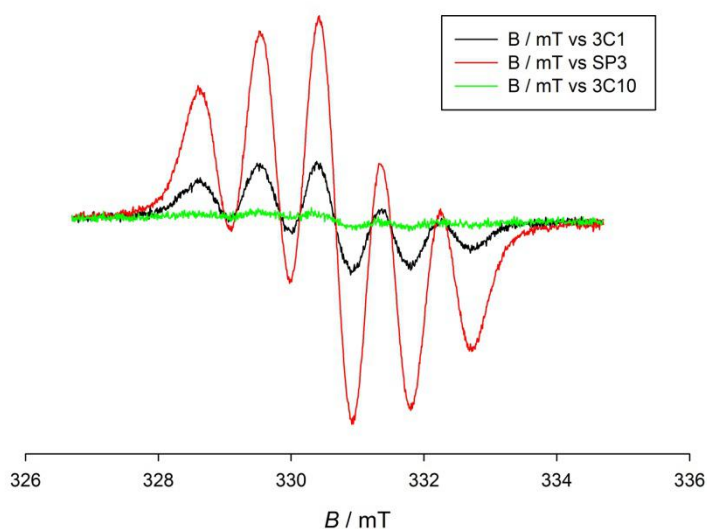
vlažnosti zraka (60-70%) te temperature (20-22 °C). Prije degustacije maslinovog ulja ispitivači ne smiju konzumirati alkohol, kavu ni začinjenu hranu kako ne bih preopteretili svoja osjetila. Prema standardiziranom rječniku Međunarodnog savjeta za maslinovo ulje razlikujemo dvije osnovne skupine svojstava djevičanskih maslinovih ulja, i to: skupina poželjnih svojstava i skupina nepoželjnih svojstava. Tri skupine poželjnih svojstava imamo, a to su voćnost, gorkost i pikantnost. Voćnost može biti zrela ili zelena, te ovisi o sorti masline. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa. Gorkost je karakteristika ulja dobivenog od zelenih ili djelomično obojenih maslina, koji percipiramo putem okruženih papila, poredanih na jeziku u obliku slova V. Pikantnost, poznata kao taktilni osjet peckanja svojstven uljima proizvedenih od još nedozrelih maslina, možemo raspoznati po cijeloj usnoj šupljini, a osobito u grlu. Nepoželjnih svojstava ili defekata maslinovog ulja ima mnogo više. Dotaknuti ćemo se samo onih koji će biti spomenuti i obrađeni u daljnjem radu. Pljesnivost ulja je defekt koji je prepoznatljiv okus i miris od masline na kojima je došlo do razvoja pljesni. Kiselo ili vinski-octikavo je ulje koje mirisom i okusom podsjeća na vino. Metalni okus i miris kao defekt se javlja kod ulja koja su bili duži period u kontaktu s metalnim površinama. Užeglost je prepoznatljiv miris i okus ulja koja su bila izložena intenzivnim oksidacijskim procesima. Kod stabla masline koje je imalo dosta sasušanih plodova javlja se defekt sjena ili drva. Osjećaj gustoće i pastoznosti koji je karakterističan za starija ulja nazivamo defektom teškog ili grubog ulja. Sredstvo za podmazivanje još je jedno nepoželjno svojstvo koje se može javiti kod maslinovog ulja, kojeg možemo prepoznati po okusu i mirisu ulja na naftu ili mineralno ulje. Ako su masline prije prerade bile dugo čuvane u vodi dolazi do stvaranja nepoželjnog svojstva salamure. Blatnjave ili masline skupljene sa zemljom su također izvrsna podloga za razvoj defekta kod maslinovog ulja. Smrznute masline ili vlažno drvo je nepoželjno svojstvo maslinovog ulja koje dolazi od plodova masline koje su duži period bile smrznute na stablu. Ovaj defekt je učestao nakon oštih i hladnih zima.

Klasificiranje uzorka ulja provodi se uspoređivanjem vrijednosti medijana negativnih svojstava i medijana voćnog mirisa.

Nepoželjno svojstvo s najvećim intenzitetom se smatra medijanom negativnog svojstva. Rezultati svake od senzorskih analiza prikazuju se grafički ili tablično. Senzorska analiza obrađena u ovom radu zbog nedostatka uvjeta bila je isključivo na bazi prepoznavanja poželjnih svojstava i defekata maslinovog ulja na sobnoj temperaturi.

## 4. REZULTATI

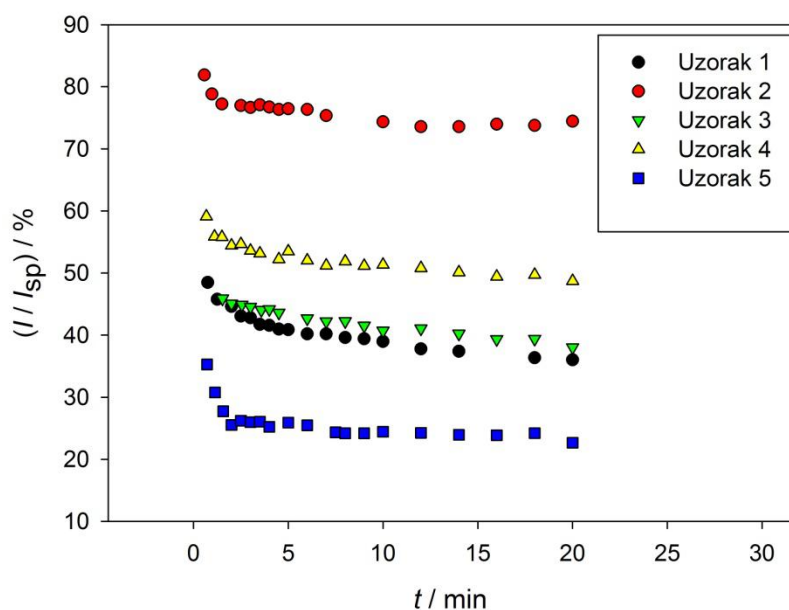
ESR spektri većine paramagnetnih supstanci nisu jednolinijski, već se sastoje iz većeg broja linija, što je posljedica magnetnih interakcija. Spin nesparenog elektrona, osim međudjelovanja s vanjskim magnetskim poljem, može međudjelovati i sa susjednim jezgrama rezultantnog spina ( $I$ ) različitog od nule. Ovakvo međudjelovanje naziva se hiperfinim međudjelovanjem, a u ESR spektru uzrokuje cijepanje osnovne rezonantne linije na više linija što se naziva hiperfino cijepanje. Na slici 2. to cijepanje vidimo u obliku 5 linija u spektru koje su karakteristične za DPPH radikal.



**Slika 2.** ESR spektri radikala DPPH: (—) slijepa proba, (—) 30 sekundi nakon dodatka uzorka 3, (—) 5 minuta nakon dodatka uzorka 3. Uzorak 3 bio je izložen temperaturi od 180 °C tijekom 10 minuta.

Uzrok cijepanju je interakcija spina elektrona sa spinovima jezgara dva dušikova atoma (spin dušikovog atoma je  $I=1$ ). Spektri uzorka 3 snimani su u različitim vremenskim intervalima. Promatramo li priložene slike možemo jasno uočiti ovisnost intenziteta signala o vremenu. Intenzitet signala s vremenom pada, zbog toga spektar mjeren pri  $t=30$  s ima veći signal od spektra pri  $t=5$  min.

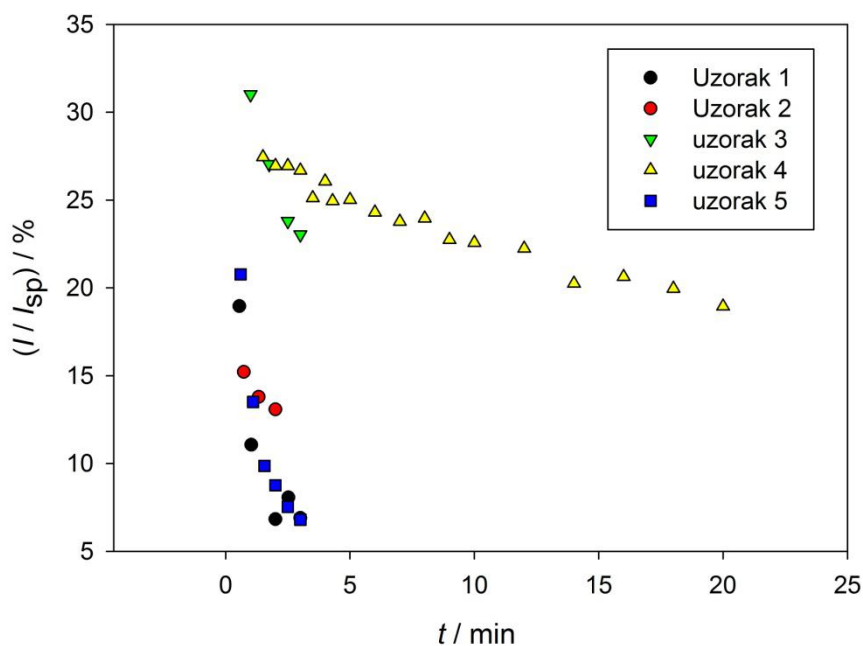
Relativni intenziteti ESR spektara ( $I/I_{sp}$ ) računati su normiranjem vrijednosti dvostrukih integrala na vrijednost dvostrukog integrala slijepe probe, za svaki pojedini uzorak i za svako pojedino vrijeme  $t$ . Na slici 3. prikazani su relativni intenziteti ESR spektara svih uzoraka mjerenih u vremenskom intervalu od 20 minuta po dodatku ulja otopini DPPH. Uzorci ulja nisu bili prethodno termički tretirani.



**Slika 3.** Vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala DPPH za uzorke 1(●), 2(●), 3(▼), 4(▲) i 5(■) bez termičkog tretiranja.

Rezultati prikazani na slici 3 pokazuju pad relativnih intenziteta signala za sve uzorke. Najveći pad signala zabilježen je kod uzorka 5, a najmanji kod uzorka 2. Nakon 20 min uzorak 2 zadržao je 74% početnog signala, dok je kod uzorka 5 zadržao svega 22% signala. Relativni intenzitet nakon 20 minuta za ostale uzorke bili su sljedeći: 48% za uzorak 4, 38% za uzorak 3 i 36% za uzorak 1.

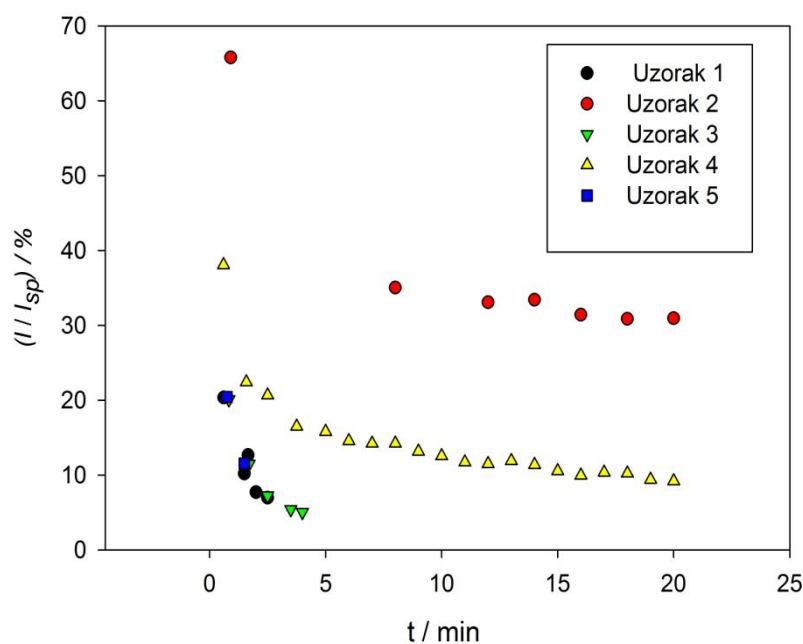
Slika 4. prikazuje rezultate ESR mjerenja za sve uzorke tretirane termički pri temperaturi od 150 °C tijekom 10 min.



**Slika 4.** Relativni intenziteti ESR signala DPPH radikala u ovisnosti o vremenu proteklom nakon dodatka ulja otopini DPPH radikala za uzorke 1(●), 2(●), 3(▼), 4(▲) i 5(■), termički tretirane 10 min pri 150 °C.

Nakon što su uzorci tretirani termički tijekom 10 min pri 150°C, vidljive su promjene u odnosu na netretirane uzorke. Uzorak 1, 3 i 5 pokazali su potpuni gubitak signala već nakon 3 minute, dok je uzorak 4 zadržao približno 20% signala i nakon 20 min. Relativni intenziteti nakon tri minute mjerenja iznosili su: 6% za uzorak 1, 23% za uzorak 3 i 6% za uzorak 5. Uzorak 2 izgubio je signal nakon 2 min po dodatku ulja otopini DPPH te je relativni intenzitet nakon 2 min iznosio 13%. Najveći pad signala zabilježen je kod uzorka 1 i 5, a najmanji kod uzorka 4.

Slika 5. prikazuje rezultate ESR mjerenja za sve uzorke tretirane termički pri temperaturi od 150 °C tijekom 20 min.

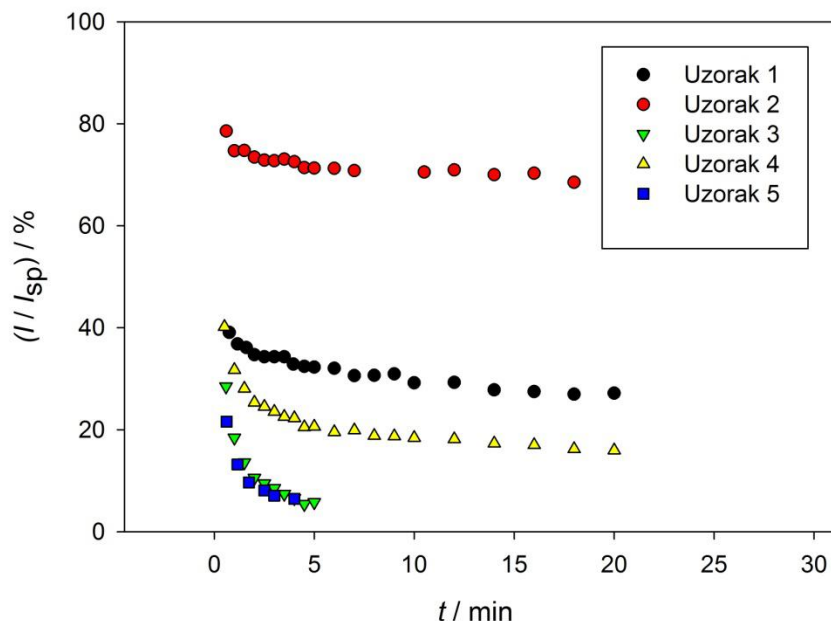


**Slika 5.** Relativni intenziteti ESR signala DPPH radikala u ovisnosti o vremenu proteklom nakon dodatka ulja otopini DPPH radikala za uzorke 1(●), 2(●), 3(▼), 4(▲) i 5(■) termički tretirane 20 min pri 150 °C.

Nakon što su uzorci zagrijavani 20 minuta pri istoj temperaturi vidi se promjena i veći pad relativnih intenziteta kod većine uzoraka u odnosu prema uzorcima koji su tretirani kraće (10 min). Kod nekih je uzoraka dulje vrijeme zagrijavanja rezultiralo bržim padom signala, a kod nekih nije pokazalo utjecaj na brzinu gubitka signala. Uzorak 2 pokazao je suprotan efekt, kod njega je pad signala bio sporiji od pada signala nakon kraćeg tretiranja. Uzorci 1, 3 i 5 izgubili su signal prije pete minute mjerenja. Uzorci ulja 2 i 4 zadržali su početni signal i nakon 20 minuta mjerenja, a vrijednosti zadržanog početnog signala su iznosile 30% za uzorak 2 i 9% za uzorak 4. Najveći pad signala zabilježen je kod uzorka 3, a najmanji kod uzorka 2.

Nakon što su svi uzorci bili tretirani termički pri temperaturi od 150 °C tijekom 10 min i 20 min, ista su mjerenja napravljena s uzorcima tretiranim pri 180 °C tijekom 10 min i 20 min. Slika 6. prikazuje rezultate ESR mjerenja za sve uzorke tretirane termički pri temperaturi od 180 °C tijekom 10 min.

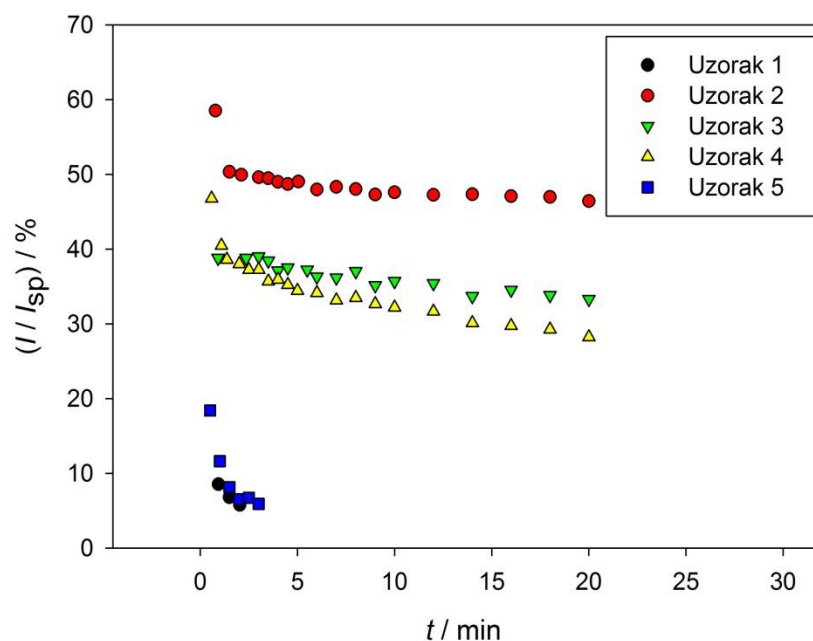




**Slika 6.** Relativni intenziteti ESR signala DPPH radikala u ovisnosti o vremenu proteklom nakon dodatka ulja otopini DPPH radikala za uzorke 1(●), 2(●), 3(▼), 4(▲) i 5(■) termički tretirane 10 min pri 180 °C.

Povišenjem temperature termičkog tretiranja za 30 °C zapaža se sporiji gubitak signala za uzorke 1, 2 i 4 u odnosu na iste uzorke tretirane pri nižoj temperaturi tijekom 10 min, dok je uzorke 4 i 5, koji i inače pokazuju najbrži pad signala, razlika u intenzitetima gotovo neznatna. U stvari, ova dva uzorka dosežu istu vrijednost preostalog signala (približno 6%) nešto kasnije (u petoj minuti) nego kad su bili tretirani pri nižoj temperaturi (istu su vrijednost postigli nakon treće minute). Najveća razlika u brzini nestanka signala pri višoj temperaturi uočava se za uzorak 2. Naime, ovaj uzorak je nakon 10 minuta zadržao približno 70% signala, dok je kod tretmana pri nižoj temperaturi signal već prije 3 min pao ispod granice detekcije. Isti se učinak, samo znatno slabije izražen, opaža i kod uzoraka 1 kod kojeg je nakon 10 min zaostalo oko 30% signala, a pri nižoj temperaturi je signal potpuno iščeznuo već nakon tri min. Zanimljivo je da uzorak 4 nije pokazao gotovo nikakvu promjenu u brzini gubitka signala nakon tretmana pri višoj temperaturi (nakon 20 minuta zaostalo je približno 20% signala pri obje temperature).

Slika 7. prikazuje rezultate ESR mjerenja za sve uzorke tretirane termički pri temperaturi od 180 °C tijekom 20 min.



**Slika 7.** Relativni intenziteti ESR signala DPPH radikala u ovisnosti o vremenu proteklom nakon dodatka ulja otopini DPPH radikala za uzorke 1(●), 2(●), 3(▼), 4(▲), 5(■) termički tretirane 20 min pri 180°C.

S odmakom vremena mjerenja bilježi se lagani pad signala DPPH radikala. Uzorak 1 pokazao je potpuni gubitak početnog signala u 2 minuti mjerenja, dok je za uzorak 5 gubitak signala bio u 3 minuti mjerenja. Ostali uzorci zadržali su početni signal svih 20 minuta mjerenja, a vrijednosti relativnih intenzitet bili su sljedeći: 28% uzorak 4, 33% uzorak 3 i 46% uzorak 2. Najveći pad signala zabilježen je kod uzorka 1 i 5, a najmanji kod uzorka 2.

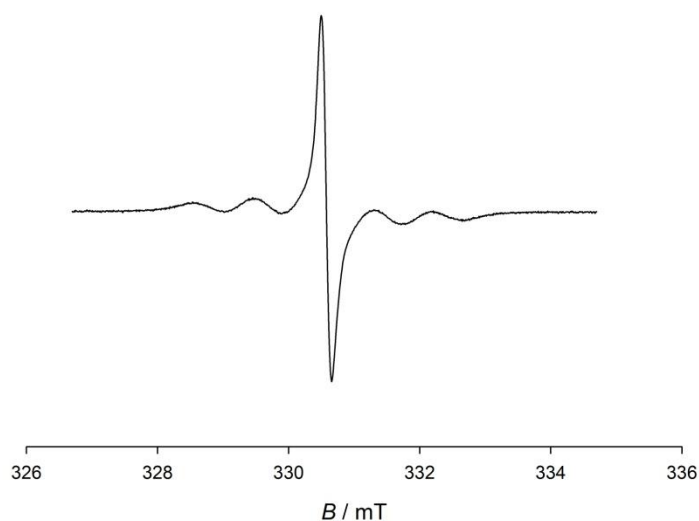
U tablici 2 prikazani su relativni intenziteti ESR signala svih uzoraka nakon treće i dvadesete minute mjerenja. Lako se uočava da kod nekih uzoraka signal u potpunosti iščezava vrlo brzo, prije 3 min po dodatku ulja otopini DPPH. Kod drugih uzoraka zaostali relativni signali variraju u širokom rasponu od 6% pa sve do 72%.

**Tablica 2.** Relativni intenziteti ESR signala ispitivanih uzoraka zaostali nakon treće i dvadesete minute mjerenja.

Uzorak	$T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$				$T = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$			
	$t = 10\text{ min}$		$t = 20\text{ min}$		$t = 10\text{ min}$		$t = 20\text{ min}$	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
1	6%	-	-	-	34%	28%	-	-
2	-	-	64%	30%	72%	68%	49%	46%
3	23%	-	7%	-	8%	-	39%	33%
4	26%	18%	20%	9%	24%	15%	37%	28%
5	6%	-	-	-	7%	-	6%	-

(a) nakon 3. minute, (b) nakon 20. minute mjerenja.

Na slici 8. prikazan je ESR spektar otopine DPPH u koju je dodano 4% uzorka 2 koji je prethodno termički tretiran pri  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  u vremenskom intervalu od 10 minuta.

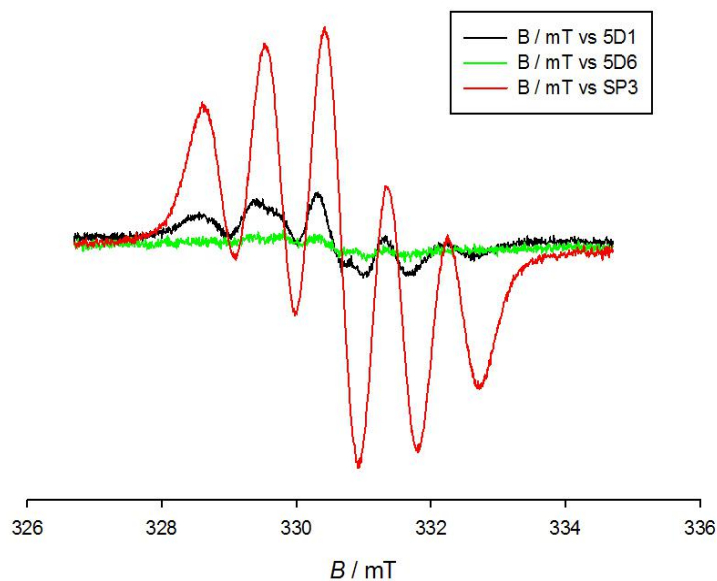


**Slika 8.** ESR spektar otopine DPPH radikala s dodatkom 4 vol.% uzorka 2 izloženog temperaturi od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 min. Spektar je snimljen 2 min nakon dodatka ulja otopini DPPH radikala.

Lako se uviđa da se ovaj spektar bitno razlikuje od spektra karakterističnog za DPPH.

Uska centralna linija visokog intenziteta superponirana je na spektar koji potječe od DPPH.

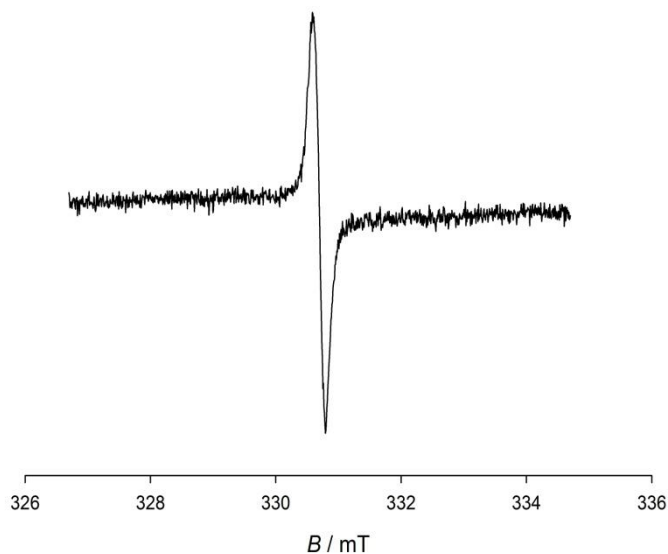
Slika 9. Prikazuje ESR spektre otopine DPPH u koju je dodano 4 % uzorka 5 (suncokretovog ulja) koji je prethodno termički tretiran pri  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 20 min. Spektri su snimani u različitim vremenskim intervalima nakon stupanja u kontakt otopine DPPH s uljem.



**Slika 9.** ESR spektri slijepe probe (—) i otopine DPPH 30 s nakon dodatka uzorka 5 (—) i 3 minute nakon dodatka uzorka 5 (—) tretiranog 20 min pri 180 °C.

Vidljiva je jasna razlika između spektara, a ona se prvenstveno odnosi na razliku u intenzitetu spektralnih linija, ali i u obliku spektra. Spektar snimljen nakon 30 s vrlo je sličan spektru slijepe probe, kako po obliku, tako i po intenzitetu linija. Uspoređujemo li spektre prikazane na slici 9, možemo jasno uočiti pad intenziteta signala s vremenom pa tako spektar za  $t=30$  s ima veći signal od spektra za  $t=3$  min, koji opet ima veći signal od spektra za  $t=20$  min.

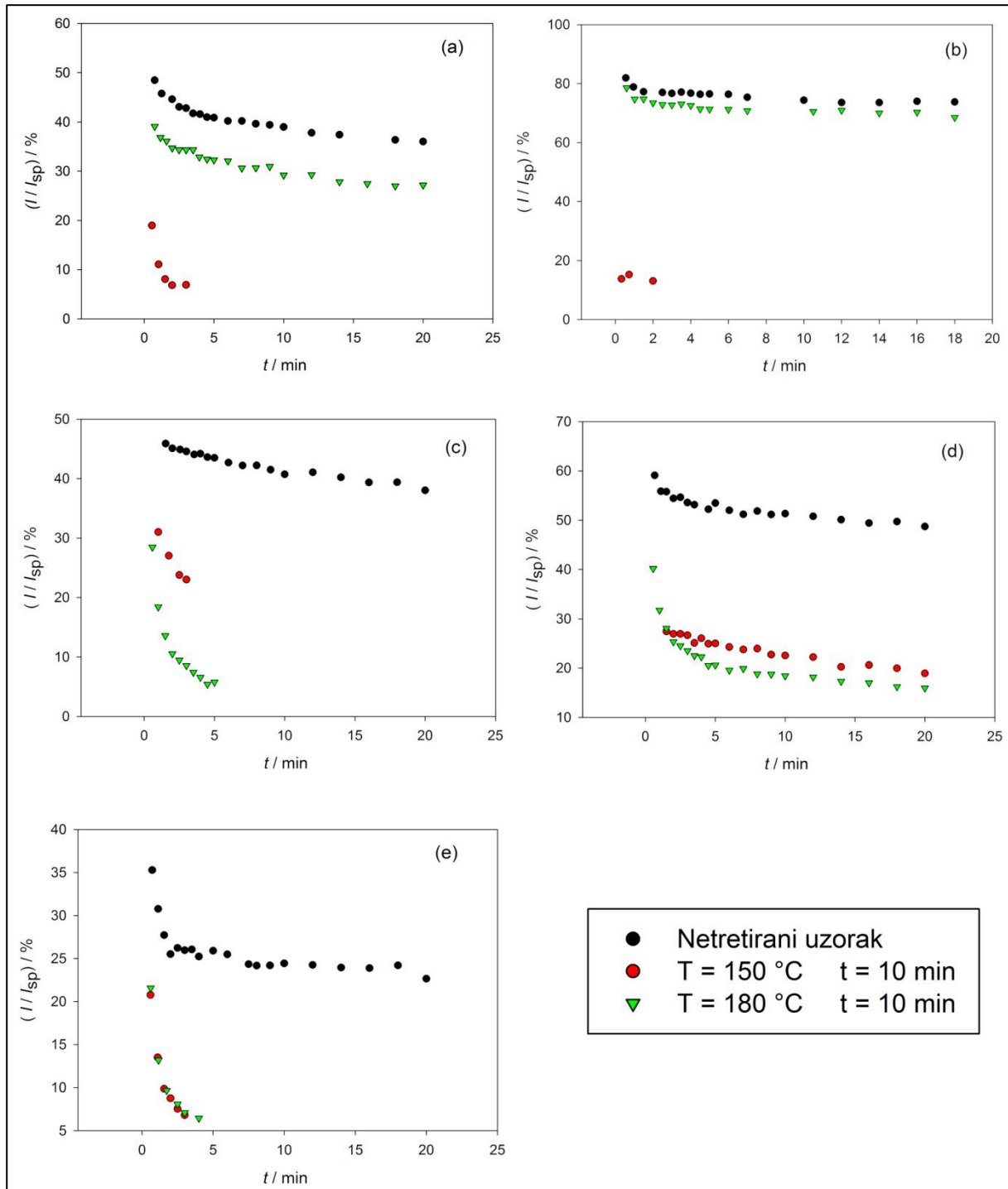
Na slici 10. Prikazan je spektar koji je dobiven snimanjem čistog suncokretovog ulja, uzorak 5, bez otopine DPPH. Ulje je prethodno bilo bio termički tretirano 10 min pri 180 °C. Spektar se sastoji od jedne uske, dobro definirane linije visokog intenziteta.



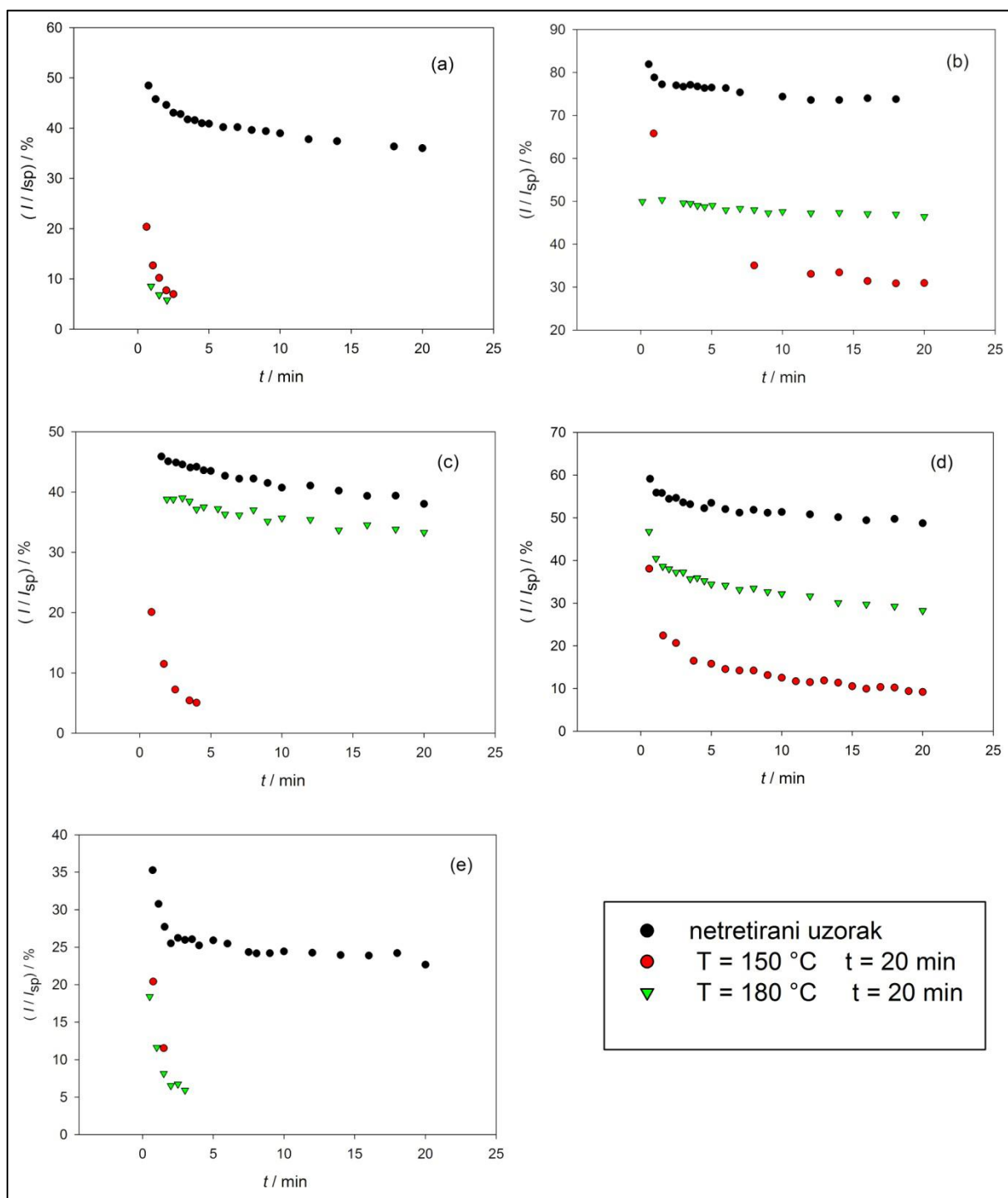
**Slika 10.** ESR spektar uzorka 5 tretiranog 10 min pri 180 °C.

Radi lakše usporedbe ESR rezultata i ocjenjivanja uloge temperature termičkog tretiranja na antioksidacijsku aktivnost ispitivanih uzoraka, na slikama 11 i 12 prikazani su rezultati dobiveni s netretiranim i tretiranim uzorcima. Slika 11 prikazuje rezultate dobivene za uzorke tretirane tijekom 10 min, a na slici 12 tijekom 20 min pri temperaturama 150 °C i 180 °C. Zamjetno je da kod svih uzoraka, bez obzira na temperaturu termičkog tretiranja, netretirani uzorci pokazuju znatno sporiji gubitak signala od tretiranih uzoraka. Također se uočava, da kod uzoraka 3 i 4 (slika 11(c) i 11(d)), viša temperatura tretmana izaziva brži pad signala, dok je kod uzoraka 1 i 2 (slika 11(a) i 11(b)) obrnuto. Uzorak 5 (slika 11(e)) ne pokazuje osjetljivost na temperaturu tijekom 10 min tretmana. Najveća razlika u brzini nestanka signala između netretiranog i tretiranog uzorka, za vrijeme tretiranja od 10 min, bilježi se za uzorak 5 (slika 11(e)) i za uzorak 3 (slika 11(c)). Kod uzoraka 2 i 4 (slike 11(b) i 11(d)) opažaju se znatno manje razlike, slično kao i kod uzorka 1 (slika 11(a)). Prema slici 12, za dulje vrijeme tretiranja (20 min), uzorak 1 (slika 12(a)) i uzorak 5 (slika 12(e)) pokazuju najveće razlike uzrokovane termičkim tretiranjem. Nasuprot tomu, slično kao i kod kraćeg tretmana, uzorci 2 i 4 (slike 12(b) i 12(d)) pokazuju manje razlike. Iz slike 12 se također

uočava da su padovi signala brži za nižu temperaturu tijekom 20 min tretmana. Taj učinak je vrlo slabo izražen kod uzoraka 1 i 5 (slike 12(a) i 12(e)), dok je kod ostala tri uzorka lako uočljiv.



**Slika 11.** Vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala za uzorke tretirane tijekom 10 min pri temperaturi od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  za uzorke 1(a),2(b),3(c),4(d) i 5(e).



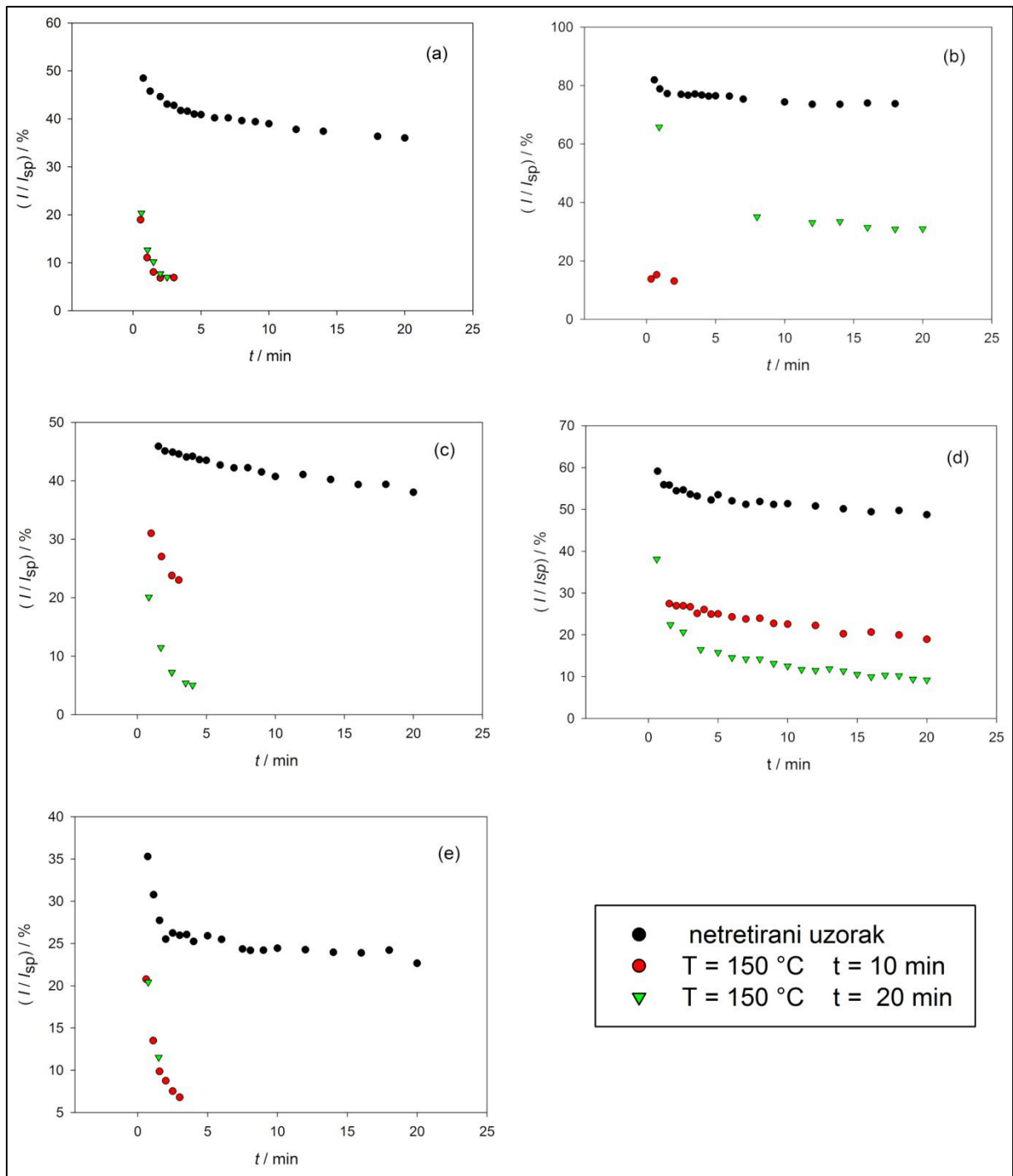
**Slika 12.** Vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala za uzorke tretirane tijekom 20 minuta pri temperaturi od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  za uzorke 1(a),2(b),3(c),4(d) i 5(e).

Slike 13 i 14 prikazuju rezultate ESR mjerenja svih ispitivanih uzoraka dobivene za različita vremena termičkog tretiranja pri 150 °C (slika 13) i pri 180 °C (slika 14).

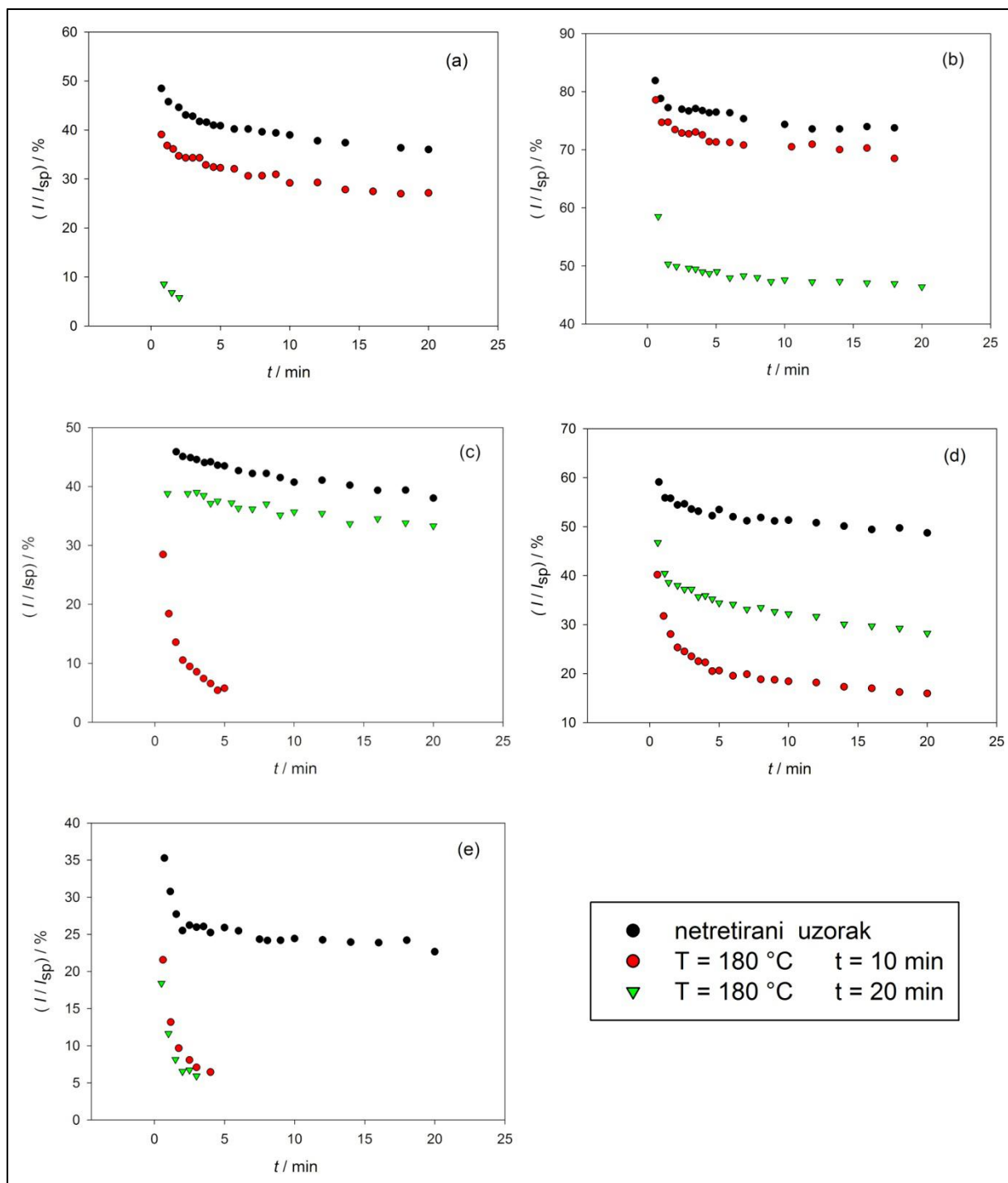
Kao što je već navedeno, netretirani uzorci pokazuju znatno sporiji gubitak signala od tretiranih uzoraka. Pri nižoj temperaturi, zapaža se brži gubitak signala za dulje vrijeme tretiranja kod uzoraka 3, 4 i 5 (slike 13(c), 13(d) i 13(e)). Nasuprot tomu, uzorak 2 pokazuje suprotan efekt - sporiji gubitak signala za dulje vrijeme tretiranja (slika 13(b)), dok kod uzorka 1 dulje vrijeme tretiranja nije pokazalo nikakav učinak (slika 13(a)).

Pri višoj temperaturi, uzorci 1, 2 i 5 pokazuju brži gubitak signala za dulje vrijeme tretiranja (slike 14(a), 14(b) i 14(e)), dok uzorci 3 i 4 pokazuju sporiji gubitak signala ako su tretiran i dulje vrijeme (slike 14(c) i 14(d)).





**Slika 13.** Vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala za uzorke tretirane tijekom 10 min i 20 min pri temperaturi od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  za uzorke 1(a),2(b),3(c),4(d) i 5(e).



**Slika 14.** Vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala za uzorke tretirane tijekom 10 min i 20 min pri temperaturi od  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  za uzorke 1(a),2(b),3(c),4(d) i 5(e).

U tablicama 3 i 4 prikazani su rezultati senzorske analize uzoraka, tj. nepoželjnih i poželjnih svojstava maslinovog ulja, određenih pri sobnoj temperaturi ( $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

**Tablica 3.** Prikaz nepoželjnih svojstava (defekata) maslinovog ulja na bazi prepoznavanja.

UZORAK /SVOJSTVA	1	2	3	4
Pljesnivost	-	-	-	-
Kiselost	-	-	-	-
Metalno	-	-	-	-
Užeglo	-	-	-	-
Sijeno/drvo	-	+/-	-	-
Teško/grubo	+/-	-	-	+/-
Salamura	-	-	-	-
Zemlja	-	-	-	-
Smrznute masline	-	-	-	-
Sredstvo za podmazivanje	-	-	-	-

Prije samog objašnjenja rezultata senzorske analize važno je naglasiti da su svi uzorci maslinovog ulja, osim konvencionalnog uzorka (uzorak 1), imali isti način prerade. Odmah nakon branja masline su išle na preradu, te nisu čuvane u vodi ili salamuri. Niti jedno maslinovo ulje nije pokazalo prisutnost defekta. Kod uzoraka 1 i 4 blago se osjetila gruboća i teški okus, ali ne na intenzivan način da bi se moglo reći da je riječ o defektu. Uzorak 2 imao je okus i miris na sijeno ili drvo, ali također u blažem intenzitetu.

**Tablica 4.** Prikaz poželjnih svojstava (defekata) maslinovog ulja na bazi prepoznavanja.

UZORAK ULJA/ SVOJSTVO	VOĆNO	GORKO	PIKANTNO
1	Intenzivno	Blago	Intenzivno
2	Blago	Blago	Blago
3	Intenzivno	Blago	Intenzivno
4	Srednje	Blago	Srednje

Što se tiče poželjnih svojstava maslinovog ulja (voćnost, gorčina i pikantnost) oni su kategorizirani u tri različita intenziteta: blago, srednje i intenzivno.

Uzorak 1 (konvencionalni uzorak) imao je intenzivno voćno i pikantno svojstvo, dok je gorčina ocijenjena blagim intenzitetom. Iste rezultate analize imao je uzorak 3, maslinovog ulja domaće proizvodnje, dok su uzorci 2 i 4 pokazali drugačije rezultate. Kod uzorka 2, sva tri analizirana poželjna svojstva ocijenjena su blagima. Intenziteti voćnosti i pikantnosti uzorka 4 ocijenjeni su sa srednjim, dok je gorčina ovog uzorka bila blagog intenziteta.

## 5. RASPRAVA

DPPH je vrlo raširena metoda koja se koristi za mjerenje antioksidacijskih svojstava prehrambenih proizvoda i dodataka hrani. Ona se najčešće koristi kao spektrofotometrijska tehnika kojom se detektira promjena boje otopine DPPH iz ljubičaste (oksidirani oblik) u žutu (reducirani oblik). Preciznije, mjeri se intenzitet apsorpcije pri valnoj duljini 515 nm [9]. U ovom istraživanju nije korištena spektrofotometrija, već elektronska spinska rezonancija. Njezina je prednost u preciznosti mjerenja. Naime, ova metoda vrlo precizno mjeri broj, odnosno koncentraciju slobodnih radikala u uzorku jer je intenzitet signala proporcionalan broju radikala.

Obzirom da su ESR spektri detektirani u obliku prve derivacije apsorpcijskih linije, bilo je potrebno računati dvostruke integrale spektralnih linija pomoću programske podrške kojom je opremljen ESR spektrometar. Dobivene vrijednosti dvostrukih integrala su proporcionalne broju radikala te su stoga uzete kao intenziteti. Prije svakog mjerenja određen je intenzitet signala slijepe probe (otopina DPPH u koju je dodano 4 % etanola) te je taj signal uzet kao baza za normiranje intenziteta po dodatku ulja otopini DPPH. Drugim riječima, računati su relativni intenziteti signala u funkciji vremena proteklom po dodatku uzorka ulja otopini DPPH. Ti relativni intenziteti signala, izraženi u postotcima, predstavljaju preostali dio živućih radikala u otopini.

Na temelju navedenoga, pad relativnog intenziteta po dodatku ulja mjera je antioksidacijske aktivnosti. Pri tome veći i brži gubitak signala znači da uzorak ima jaču antioksidacijsku aktivnost.

Početna pretpostavka je bila da bi termičko tretiranje ulja moglo negativno utjecati na njegovu antioksidacijsku aktivnost, tj. da bi se ona termičkom obradom mogla smanjiti.

Nasuprot tomu, rezultati istraživanja provedenih u sklopu ovoga rada potvrđuju porast antioksidacijske aktivnosti kao posljedicu termičke obrade ulja.

Na slici 3. prikazana je vremenska ovisnost relativnih intenziteta ESR signala za sve uzorke ulja prije termičkog tretiranja. Jasno je vidljiva osjetljivost metode kroz razlike u padu signala za svaki pojedini uzorak. Prema rezultatima na slici 3, najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazalo je suncokretovo ulje. G. Kalantzakis i suradnici su pokazali da suncokretovo ulje ima znatno veći sadržaj tokoferola od maslinovog ulja [10], što može objasniti zašto je upravo suncokretovo ulje pokazalo najveći porast antioksidacijske aktivnosti prije termičkog tretiranja [10]. Dok je kod suncokretovog ulja antioksidacijska aktivnost pripisana ukupnim tokoferolima, kod maslinovog ulja se ona povezuje s ukupnim sadržajem polifenola [9]. Razlike u padu signala pojedinih uzoraka maslinovog ulja se stoga mogu uglavnom pripisati različitim udjelima polifenola.

Na slikama 4, 5, 6 i 7. prikazani su rezultati ESR mjerenja svih uzoraka nakon termičkog tretiranja pri različitim temperaturama i za različita vremena tretiranja. Termičko tretiranje uzoraka ubrzalo je reakciju neutralizacije DPPH radikala. Bez obzira na vrijeme i temperaturu termičkog tretiranja zamjetan je porast antioksidacijske aktivnosti kod svih uzoraka. Iz tablice 2 vidljivo je da kod nekih tretiranih uzoraka signal vrlo brzo nestaje, već nakon 3 min, dok kod onih uzoraka kod kojih se zadržao do 20 min, pokazuje znatno niži relativni intenzitet. Ova činjenica navodi na zaključak da u procesu termičke obrade ulja dolazi do stvaranja novih komponenata, vjerojatno radikala, koji su posljedica termičkog raspada određenih spojeva. Pretpostavlja se da ti novonastali radikali mogu reducirati DPPH.

Prema podacima nađenim u literaturi [10-12], u usporedbi s drugim biljnim uljima, maslinovo ulje ima znatno bolju termičku stabilnost. Ono je bogato mononezasićenim masnim kiselinama, od kojih je najznačajnija oleinska kiselina koja pridonosi 50% manjoj oksidaciji maslinovog ulja [11]. Osim spomenutih polifenolnih komponenata na kojima se

najvećim dijelom temelji antioksidacijska aktivnost maslinovog ulja, potrebno je naglasiti i doprinos skvalena, koji prilikom termičke obrade ostaje stabilan, kako navode Y. Allouche i suradnici [12]. Na temelju literaturnih navoda, polifenolne komponente u maslinovom ulju također su termički stabilne pri temperaturama koje su korištene u ovom radu, a njihova se djelomična degradacija počinje pojavljivati pri temperaturama višim od 200 °C. Međutim, ove činjenice ne mogu objasniti pojačanu antioksidacijsku aktivnost termički tretiranih uzoraka.

Slika 8 prikazuje spektar otopine DPPH u koji je dodan termički tretiran uzorak 2. Na toj se slici jasno vidi pojava novog radikala nastalog tijekom termičkog tretiranja ulja. Uska centralna linija visokog intenziteta koja je superponirana na signal DPPH ukazuje na prisutnost organskog radikala. Taj novonastali radikal vrlo vjerojatno reagira s DPPH te na taj način utječe na pojačanu antioksidacijsku aktivnost ulja. Podaci koji su do sada poznati iz literature, vezano uz ovu temu, vrlo su oskudni pa bi stoga za detaljno objašnjenje mehanizma pojačanog antioksidacijskog djelovanja termički tretiranih uzoraka bilo nužno napraviti dodatna sistematska ESR mjerenja, ali i uključiti druge spektroskopske tehnike (FTIR i NMR) koje bi pomogle u identifikaciji radikala nastalih termičkom obradom ulja.

Slično kao kod uzorka 2 i u uzorku 5 (suncokretovo ulje) također je detektiran organski radikal, s time da je spektar prikazana na slici 10 spektar čistog termički tretiranog uzorka 5, bez otopine DPPH radikala. I u ovom se slučaju jače antioksidacijsko djelovanje termički tretiranog ulja može isto tako povezati s pojavom novonastalog radikala.

Analiza sastava masnih kiselina kod različitih vrsta maslinovog ulja pokazala je da zagrijavanje ulja dovodi do promjene u sastavu masnih kiselina nakon dulje izloženosti ulja temperaturi od 180 °C. I dok se sadržaj oleinske kiseline, kao većinske masne kiseline nije promijenio zagrijavanjem, udjeli linolne i linolenske kiseline jako su se smanjili (približno na 50% od početne vrijednosti) [12].

Termičkom obradom ulja smanjuje se oksidacijska stabilnost maslinovog ulja, međutim to se smanjenje stabilnosti jako razlikuje od jednog do drugog ulja [12], a ovisi i o uvjetima obrade (temperaturi i vremenu tretiranja). Fenoli i glavne komponente fenolnih frakcija (hidroksitirozol, tirozol i njihovi derivati) reagiraju s lipidnim radikalima te sprječavaju lipidnu peroksidaciju, koja je složena lančana reakcija oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina [12]. Kako se udio fenola može izravno povezati s pikantnošću ulja, može se zaključiti da uzorak 2, koji jedini pokazuje blagu pikantnost (tablica 4), sadrži manju količinu polifenola. Stoga ne čudi činjenica da se jedino kod njega pojavljuje centralna singletna linija koja dokazuje prisutnost radikala nastalih termičkom obradom. Osim toga, ovaj uzorak pokazuje daleko najslabiju antioksidacijsku moć od svih uzoraka prije termičke obrade, slika 3. Ove činjenice daju naslutiti da koncentracija polifenola u uzorku 2 nije dovoljna da bi neutralizirala lipidne radikale koji i u prisustvu DPPH ostaju aktivni odmah po dodatku ulja otopini DPPH (slika 8 prikazuje spektar snimljen nakon 2 min), a neutraliziraju se tek nakon duljeg vremena. Stoga se može zaključiti da antioksidacijsko djelovanje uzorka 2 nakon tretmana tijekom 10 min pri temperaturi od 150 °C u odnosu prema DPPH (slika 11 (b)) potječe uglavnom od produkata nastalih lipidnom peroksidacijom.

Kod ostalih je uzoraka senzorska analiza (tablica 4) pokazala srednju (uzorak 4) ili intenzivnu pikantnost (uzorci 1 i 3). Može se zaključiti da je količina polifenola u uzorcima 1 i 3, pa i u uzorku 4, dovoljno visoka da neutralizira radikale koji su nastali tijekom termičke obrade. No, ne treba zaboraviti da ti radikali, dok reagiraju s polifenolnim komponentama, istovremeno i neutraliziraju DPPH.

Što se tiče utjecaja vremena i temperature termičkog tretiranja, u usporedbi s podacima iz literature [11,12], u ovom su radu korištena znatno kraća vremena tretiranja uzoraka koja su realna za pripremu namirnica. Neki su autori tretirali ulje pri 180 °C tijekom 10 sati [11], dok su drugi išli čak i do 36 sati tretiranja [12]. Prema rezultatima tih radova, za



kraća vremena tretiranja nisu uočene velike promjene u sastavu ulja. No već u prva dva sata izloženosti visokoj temperaturi kod nekih uzoraka oksidacijska stabilnost raste, dok kod drugih pada. Kod vremena duljih od 4 sata svi uzorci počinju gubiti oksidacijsku stabilnost. Produljeno ili opetovano izlaganje ulja termičkoj obradi dovodi do niza nepoželjnih kemijskih reakcija, kao što su oksidacija, hidroliza i polimerizacija [13]. Razlike u sastavu ulja mogu biti toliko velike da utječu na njegovu termičku stabilnost. Prema navedenoj literaturi postoje razni čimbenici o kojima ovisi sadržaj tokoferola, fenola, fitosterola pa i sastava masnih kiselina u maslinovom ulju. Ti čimbenici uključuju sortu, postupak ekstrakcije ulja, razdoblje berbe te pedoklimatske uvjete [11].

Za razliku od podataka iz literature, kao što je već spomenuto, svi uzorci ispitivani u ovom radu pokazuju pojačanu antioksidacijsku aktivnost, bez obzira na temperaturu i trajanje tretiranja. Pri tome treba uzeti u obzir da je maksimalno trajanje termičke obrade bilo 20 min. Različito antioksidacijsko djelovanje termički tretiranih uzoraka, ovisno o temperaturi i vremenu tretiranja može se vrlo vjerojatno pripisati različitom kemijskom sastavu ulja. Tako npr. uzorci 1 i 2 za vrijeme tretiranja tijekom 10 min pri 150 °C pokazuju bolju aktivnost nego kada su bili tretirani u istom vremenskom intervalu pri višoj temperaturi (slika 11 (a) i 11 (b)). Nasuprot tomu, uzorci 3 i 4 pokazali su jače antioksidacijsko djelovanje nakon tretiranja tijekom 10 min pri 180 °C. Za dulje vrijeme tretiranja (20 min), uzorcima 2, 3 i 4 oslabila je antioksidacijska moć kad su bili izloženi temperaturi od 180 °C, u usporedbi s istim uzorcima tretiranim pri 150 °C. Uzorak 1 pokazao je visoku stabilnost kod duljeg vremena tretiranja za obje temperature; praktički povišenje temperature nije utjecalo na njegovu aktivnost (slika 12 (a)).

Potrebno je spomenuti da je suncokretovo ulje u ovom radu uzeto samo radi usporedbe s maslinovim uljima, obzirom da se ono najčešće koristi kod termičke obrade namirnica, vjerojatno zbog višestruko više cijene maslinovog ulja u usporedbi sa suncokretovim uljem.

Prema podacima iz tablice 2, suncokretovo ulje je pokazalo daleko najjaču antioksidacijsku aktivnost, kako nakon termičke obrade, tako i prije nje (slika 3). No, povećanje aktivnosti u odnosu na DPPH radikal nakon termičkog tretmana može se pripisati novonastalim radikalima (slika 9) koji su upravo posljedica termičke obrade ulja. Uloga tokoferola u neutraliziranju novonastalih radikala čini se različitom u odnosu na ulogu polifenola kod maslinovog ulja. Na temelju ESR rezultata, može se pretpostaviti da tokoferoli slabije i/ili sporije reagiraju s novonastalim radikalima od polifenola pa je stoga uloga tih radikala u neutralizaciji DPPH znatno izraženija kod suncokretovog ulja u odnosu na maslinova ulja.

Za preciznije informacije o mehanizmima antioksidacijske aktivnosti maslinovog i suncokretovog ulja nakon termičke obrade bilo bi nužno napraviti dodatna eksperimentalna mjerenja koja po svom obimu prelaze okvire ovoga rada.

## 6. ZAKLJUČAK

Maslinovo ulje jedinstveno je među biljnim uljima zbog svog poželjnog lipidnog sastava. Sadrži triacilglicerole, monoacilglicerole, diacilglicerole, slobodne masne kiseline, te komponente poput sterola, skvalena, tokoferola, razne pigmente i alifatske alkohole. Brojni faktori utječu na brzinu i stupanj propadanja ulja tijekom prženja, uključujući temperaturu prženja i trajanje postupka, vrstu ulja za prženje koju koristimo te prisutnost antioksidanata, dok kvaliteta ulja utječe na apsorpciju ulja i nusproizvode koji nastaju prilikom termičke obrade namirnice. Znanstveni dokazi dosada pokazuju da je maslinovo ulje za prženje obično jednako ili superiornije u odnosu na druga biljna ulja. Ono sadrži veći udio oleinske kiseline koja nije sklona oksidaciji kao linolna kiselina koja prevladava kod većine drugih biljnih ulja. Povrh toga, točka dimljenja maslinovog ulja (210 °C) je znatno iznad preporučene temperature prženja hrane (150 °C - 180 °C). Prisustvo raznih prirodnih antioksidanata, kojima je maslinovo ulje bogato, štiti ljudski organizam od nepoželjnog oksidacijskog stresa. Sve navedeno upućuje na to da je maslinovo ulje bolji izbor za prženje raznih namirnica od ostalih biljnih ulja.

Antioksidacijska aktivnost uzoraka mjerena je prije i nakon termičke obrade. Suprotno očekivanom, pokazalo se da termička obrada pojačava antioksidacijsku aktivnost svih ispitivanih uzoraka. To se vjerojatno može pripisati novonastalim radikalima koji se formiraju tijekom procesa termičke obrade kao posljedica lipidne peroksidacije. I dok je najvećim udjelom u maslinovom ulju prisutna oleinska kiselina oksidacijski prilično stabilna, linolna i linolenska kiselina termički degradiraju što rezultira novonastalim radikalima koji mogu imati ulogu u redukciji DPPH.

Različito antioksidacijsko djelovanje termički tretiranih uzoraka, ovisno o temperaturi i vremenu tretiranja, može se najvjerojatnije pripisati različitom kemijskom sastavu ulja. Tako

su neki uzorci za vrijeme tretiranja tijekom 10 min pri 150 °C pokazali bolju aktivnost nego kada su bili tretirani u istom vremenskom intervalu pri višoj temperaturi, dok su drugi pokazali jače antioksidacijsko djelovanje nakon tretiranja tijekom 10 min pri 180 °C. Za dulje vrijeme tretiranja (20 min) pri 180 °C, većini je uzoraka oslabila antioksidacijska moć, u usporedbi s kraćim vremenskim tretiranjem ili tretiranjem pri nižoj temperaturi.

Kod suncokretovog ulja su tokoferoli odgovorni za njegovo antioksidacijsko djelovanje. Uloga tokoferola u neutraliziranju novonastalih radikala čini se različitom u odnosu na ulogu polifenola kod maslinovog ulja. Može se pretpostaviti da tokoferoli slabije reagiraju s novonastalim radikalima od polifenola pa je stoga uloga tih radikala u neutralizaciji DPPH znatno izraženija kod suncokretovog ulja u usporedbi s maslinovim uljem.

## 7. LITERATURA

1. M. Žanetić, M. Gugić, *Polmologia Croatica* 12 (2006) 159-173.
2. S. Barbarić, Utjecaj proizvodnih uvjeta i vremena skladištenja na kvalitetu ulja dobivenog iz sorte Levatinka, Završni rad, kemijsko-tehnološki fakultet, Split, (2017.) 17-20.
3. <https://olivewellnessinstitute.org/article/11-health-benefits-of-extra-virgin-olive-oil-that-you-cant-ignore/>, pristupljeno 15.07.2020
4. E. Kelaiditi, A. Jennings, C.J. Steves, Measurements of skeletal muscle mass and power are positively related to a Mediterranean dietary pattern in women, *Osteoporosis International* 27 (2016) 3251-3260.
5. J.S. Perona, J. Cañizares, E. Montero, J.M. Sánchez-Domínguez, A. Catalá, V. Ruiz-Gutiérrez, Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects, *Clinical Nutrition* 23 (2004) 1113-1121.
6. University of East Anglia. "Olive oil could guard against developing ulcerative colitis." *ScienceDaily*, 3 may 2010.
7. I. Marinac Anđić, Utjecaj zagrijavanja maslinovog ulja na sadržaj polifenolnih tvari, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb (2016).
8. O. Koprivnjak, V. Majetić Germek, Skripta za vježbe iz kolegija Tehnologija i kontrola kakvoće hrane II, Medicinski fakultet, Rijeka (2017).
9. O. Koprivnjak, D. Škevin, S. Valić, V. Majetić, S. Petričević, I. Ljubenkov, The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids, *Food Chemistry* 111 (2008) 121-126.
10. G. Kalantzakis, G. Blekas, K. Pegklidou, D. Boskou, Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils, *European Journal of Lipid Science and Technology* 4 (2006) 329-335.
11. A. Chiou, N. Kalogeropoulos, Virgin Olive Oil as Frying Oil, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (2017) 632-646.
12. Y. Allouche, A. Jiménez, J.J. Gaforio, M. Uceda, G. Beltrán, How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 9646-9654.
13. C.S.P. Santos, R. Cruz, S.C. Cunha, S. Casal, Effect of cooking on olive oil quality attributes, *Food Research International* 54 (2013) 2016-2024.

## ŽIVOTOPIS

Ime i prezime : Lucija Luketina

Rođena 21.2.1997 u Makarskoj. Završila opću gimnaziju u Srednjoj školi Fra Andrije Kačića Miošića u Makarskoj. Završila preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva 12.7.2018. u Zagrebu na Zdravstvenom veleučilištu. Volontirala 75 dana u Crvenom križu. Vodila edukacije volontera, vatrogasaca, HGSS i ostalih gradskih službi o provođenju epidemioloških mjera i zaštiti. Ušla u tri moguća izbora za volontera godine 2020.