

Hrvoje Krajina<sup>1</sup>, Tihomir Moslavac<sup>2</sup>, Ivana Flanjak<sup>2</sup>,  
Ivana Duvnjak<sup>2</sup>, Daniela Paulik<sup>2</sup>, Karlo Dudaš<sup>3</sup>

Izvorni znanstveni rad

## Stabilizacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica

### Sažetak

Oksidacijska stabilnost biljnih ulja predstavlja vrijeme kroz koje se ulje može sačuvati od procesa oksidacije. Oksidacijsko kvarenje je jedan od glavnih problema tijekom proizvodnje i skladištenja maslinovog ulja. U ovom radu istraživao je utjecaj dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja hrvatske sorte Istarska bjelica. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja te utjecaj dodatka antioksidanasa provedeno je testom ubrzane oksidacije ulja Schaal Oven testom. Od antioksidanasa korišteni su ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less®CS), ekstrakt zelenog čaja, eterično ulje lavande, mješavina tokoferola i propil galat te sinergisti limunska i kofeinska kiselina. Ispitivani su parametri kvalitete maslinovog ulja: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vlage, udio netopljivih nečistoća, saponifikacijski broj i jodni broj. Rezultat oksidacije ulja izražen je peroksidnim brojem. Provedenim testom utvrđeno je kako maslinovo ulje pokazuje dobru otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Dodatkom ispitivanih antioksidanasa ostvarena je dodatna zaštita maslinovog ulja od oksidacije. Najbolja stabilnost ulja je postignuta dodatkom ekstrakta ružmarina i kofeinske kiseline. Mješavina tokoferola i eterično ulje lavande u ispitivanim koncentracijama nisu zaštitili ulje od oksidacijskog kvarenja.

**Ključne riječi:** ekstra djevičansko maslinovo ulje, sorta Istarska bjelica, oksidacijska stabilnost, antioksidansi

### Uvod

Maslinarstvo je u pogledu gospodarstva vrlo značajna grana u našoj poljoprivrednoj proizvodnji, a samim time je maslinovo ulje jedan od najstarijih prehrambenih proizvoda namijenjenih za ljudsku upotrebu. Ulje dobiveno iz ploda masline (*Olea europaea*) ima dugu povijest i vrlo je značajno zbog svojih ljekovitih, kozmetičkih i prehrambenih svojstava. U Hrvatskoj plodovi zimzelenog drveta *Olea europaea* L. su najviše zastupljeni u mediteranskom području, tj. u Dalmaciji i Primorju. Kako bi se dobilo maslinovo ulje, koristimo nekoliko

1 **Hrvoje Krajina**, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Vinkovci, Josipa Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Hrvatska

2 prof. dr. sc. **Tihomir Moslavac**, prof. dr. sc. **Ivana Flanjak**, **Ivana Duvnjak**, student, **Daniela Paulik**, tehnički suradnik, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

3 **Karlo Dudaš**, dipl. ing., Tvornica ulja Čepin d.d., Ulica Grada Vukovara 18, 31431 Čepin, Hrvatska

**Autor za korespondenciju:** tihomir.moslavac@ptfos.hr

ključnih tehnoloških koraka: pranje plodova i uklanjanje nečistoća, mljevenje, miješanje, izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta i odvajanje ulja od biljne vode. Djevičansko maslinovo ulje je jedno od rijetkih ulja koje se dobije jednostavnim cijedenjem ploda masline. Karakterizira ga intenzivan okus i miris, visoka biološka vrijednost i blagotvoran utjecaj na zdravlje ljudi (Koprivnjak, 2006). Ekstra djevičansko maslinovo ulje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama proizvoda što predstavlja najkvalitetniji tip maslinovog ulja. Pored oleinske masne kiseline, prisutne su linolna i linolenska masna kiselina (Koprivnjak, 2006.; Zadro i Perica, 2007.; Čorbo, 2008.). Primjenjivost biljnih ulja i njihova kvaliteta ovisi o oksidacijskoj stabilnosti. Oksidacijom dolazi do nepoželjnih senzorskih, kemijskih i nutritivnih promjena. Spojevi fenolne strukture koji usporavaju oksidacijsko kvarenje su antioksidansi koji mogu biti prirodni i sintetski. Reagiraju sa slobodnim radikalima koji nastaju oksidacijom nezasićenih masnih kiselina i na takav način zaustavljaju oksidacijsko kvarenje (Zadro i Perica, 2007.).

Čorbo (2008.) ukazuje da maslina ili drvo vječnosti spada među najstariji izvor za dobivanje ulja. Ulje iz ploda masline smatra se jedno od najstarijih i najcjenjenijih jestivih ulja. Plod je okrugli ili duguljast, a sastoji se od mesnatog dijela (pulpa ili mezokarp) obavijenog zaštitnom kožicom (epikarp) i koštice (endokarp) koja u tvrdoj ljusci ima sjemenku (endosperm). Udio ulja u plodu kao i sastav masnih kiselina varira ovisno od sorte, stupnja zrelosti, tla, klime, nadmorske visine i drugih čimbenika (Čorbo, 2008.). Udio ulja u plodu masline varira, iznosi 6-25 %, vode 40-70 % i ostali sastojci 24-35 % (Koprivnjak, 2006.). U ulju dominira oleinska kiselina (55-83 %), esencijalna omega-6 linolna masna kiselina (3,5-20 %), zatim uz manji udio zasićene palmitinske kiseline (5,7-18,6 %) te ukupni tokoferoli (15-20 mg/100g) čija uporaba pridonosi povećanju kvalitete života potrošačima (Čorbo, 2008.). Ulje je zelenkaste boje, ima izražena ugodna senzorska svojstva koje blagotvorno djeluje na ljudski organizam jer su sačuvane biološki aktivne komponente, naročito prisutni antioksidansi. Mogućnost primjene ovog ulja je u prehrambene i kozmetičke svrhe. Kod dijetetske prehrane uz malo masnoća utjecajem ulja rizik srčanih bolesti se smanjuje, dovodi do porasta nivoa HDL (dobar kolesterol) uz smanjenje LDL (loš kolesterol) (Dimić, 2005.). Djevičansko maslinovo ulje dobiva se preradom maslina uz primjenu isključivo mehaničkih postupaka. Stabilizacija ovog ulja uspješno se postiže dodatkom antioksidanasa koji ga štite od oksidacijskog kvarenja. Jestiva biljna ulja vrlo brzo podliježu nepoželjnim promjenama što rezultira njihovim kvarenjem. Autooksidacija je najčešća vrsta kvarenja ulja, a može nastupiti brže ili sporije ovisno od procesa proizvodnje, sastava ulja, uvjeta skladištenja, prisutnosti sastojaka koji usporavaju ili ubrzavaju ovu reakciju (Martin-Polvillo i sur., 2004.). Tijekom oksidacijskog kvarenja dolazi do stvaranja primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja (Gray, 1978.; Rovellini i sur., 1997.). Nastali produkti u malim količinama daju neugodan miris čime narušavaju senzorska svojstva ulja (Broadbent i Pike, 2003.). Poznavanje održivosti ili stabilnosti biljnih ulja je važno kako bi se moglo unaprijed utvrditi vrijeme za koje se mogu sačuvati od izraženije oksidacije te za određivanje vremenskog roka njihove upotrebe. Frega i sur. (1999.) u istraživanju utvrđuju da slobodne masne kiseline u biljnom ulju djeluju kao prooksidansi, ubrzavaju oksidacijsko kvarenje te kod većeg udjela smanjuju održivost ulja. Danas se primjenjuju razne metode za određivanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja temeljene na ubrzanoj oksidaciji: Oven test, AOM test i Rancimat test (Suja, 2004.; Shahidi, 2005.; Abramović, 2006.; Farhoosh, 2008.). Stabilnost biljnih ulja može se poboljšati dodatkom antioksidansa koji usporavaju proces oksidacijskog kvarenja. Poznati su sintetski i prirodni antioksidansi koji imaju primjenu za stabilizaciju ulja radi povećanja otpornosti

prema oksidaciji (Yanishlieva i Marinova, 2001.; Merrill i sur., 2008.; Alavi i Golmakani, 2017.). U zadnje vrijeme sve se više istražuju razni biljni materijali koji sadrže bioaktivne sastojke (fenolni spojevi) te pokazuju značajno antioksidacijsko djelovanje kod stabilizacije biljnih ulja (Bandoniene i sur., 2000.; Velasco i Dobarganes, 2002.; Zunin i sur., 2010.; Berra i sur., 2006.). Hladno prešana ulja mogu se stabilizirati primjenom ekstrakta raznih biljaka (ružmarina, zelenog čaja, kadulje, origana i dr.) u svrhu zaštite od oksidacijskog kvarenja (Pan i sur., 2007.; Ahn i sur., 2008.; Taghvaei i Jafari, 2013.). Erkan i sur. (2008.) u svom radu istraživali su antioksidacijsku aktivnost ekstrakta ružmarina i drugih spojeva na stabilizaciju jestivih ulja. Gramza i sur. (2006.) izvještavaju da visoku antioksidacijsku aktivnost, mjerenu kao indukcijski period, pokazuje etanolni ekstrakt zelenog čaja u odnosu na aktivnost butil hidroksitoluena (BHT) i ekstrakta crnog čaja u suncokretovom ulju. Hraš i sur. (2000.) istraživali su i utvrdili antioksidacijski i sinergistički utjecaj ekstrakta ružmarina i alfa tokoferola kod stabilizacije suncokretovog ulja.

Cilj istraživanja ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka antioksidanasa (prirodni i sintetski) te sinergista na promjenu oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja hrvatske sorte Istarska bjelica. Također, odrediti sastav masnih kiselina ovog ulja radi utvrđivanja autentičnosti ulja.

## Materijal i metode

Ispitivanje utjecaja dodatka prirodnih i sintetskih antioksidanasa na promjenu oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja hrvatske sorte Istarska bjelica (OPG Mikele Kalcina, Grožnjan) provedeno je s ekstraktom ružmarina (tip OxyLess<sup>®</sup>CS) 0,2 %, ekstraktom zelenog čaja (0,2 %), eteričnim uljem lavande (0,2 %), mješavinom tokoferola (0,1 %), propil galatom (0,01 %) te sinergistima limunska kiselina (0,01 %) i kofeinska kiselina (0,01 %). Ekstrakt ružmarina tip Oxy<sup>™</sup> Less CS je proizveden u firmi Naturex (Francuska), ekstrakt je dobiven od listova ružmarina, koje ima botaničko ime *Romarinus officinalis* L. Specifikacija ekstrakta ružmarina Oxy<sup>™</sup> Less CS: udio karnosolne kiseline 18-22 %, zaštitni faktor > 12, suha tvar ekstrakta 92-98 %.

Ekstrakt zelenoga čaja proizveden je u firmi Naturex (Francuska), iz lišća biljke *Camellia sinensis* L. Udjel epigalokatehin galata (EGCG) je veći od 45 %, udjel ukupnih polifenola veći je od 98 %, udjel kofeina manji je od 0,5 %, udjel katehina veći je od 80 %.

Mješavina tokoferola je žuto do smeđe-crveno, viskozno ulje bez karakterističnog mirisa. Minimalni udio tokoferola je 95 %. Sastav je:  $\alpha$  tokoferol 0-15 %,  $\beta$  tokoferol 5 %,  $\gamma$  tokoferol 55-75 %,  $\delta$  tokoferol 20-30 %. Proizvođač je DSM Nutritional Products Ltd, Švicarska.

Eterično ulje lavande je bezbojno do blijedo žućkaste ili zelenkasto- žućkaste boje. Sastoji se od linalola i linalil-acetata, a proizvedeno je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku.

Propil galat je propilni ester galne kiseline koji se koristi kao sintetski antioksidans. Dolazi u obliku praha koji je sivo bijele boje. Proizvođač je firma Danisco, Danska.

Sinergisti koji su se koristili u istraživanju su kofeinska i limunska kiselina.

Kofeinska kiselina predstavlja organsku hidroksicijamičnu kiselinu. To je žućkasti prah i njezina rasprostranjenost je široka jer predstavlja međuproizvod u sintezi lignina. Proizvođač je firma Sigma.

Limunska kiselina monohidrat je u obliku bijele kristalne tvari koja je topljiva u vodi. Proizvođač je T.T.T d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska.

### **Određivanje osnovnih parametara kvalitete ulja**

Na ispitivanom ekstra djevičanskom maslinovom ulju hrvatske sorte Istarska bjelica određeni su osnovni parametri kvalitete: peroksidni broj, slobodne masne kiseline, udio vode i udio netopljivih nečistoća primjenom standardnih metoda te parametri za identifikaciju ulja: jodni broj i saponifikacijski broj.

#### *Slobodne masne kiseline*

Slobodne masne kiseline (SMK) u ulju određene su standardnom metodom (ISO 660: 1996) koja se temelji na principu titracije s otopinom natrij-hidroksida. Rezultat je prikazan kao udjel (%) slobodnih masnih kiselina izražen kao oleinska kiselina prema jednadžbi:

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

V = utrošak otopine natrij-hidroksida za titraciju uzorka (mL);

c = koncentracija otopine natrij-hidroksida za titraciju,  $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$ ;

M = molekulska masa oleinske kiseline,  $M = 282 \text{ g/mol}$ ;

m = masa uzorka ulja za ispitivanje (g).

#### *Peroksidni broj*

Peroksidni broj (Pbr) je pokazatelj stupnja oksidacijskog kvarenja jestivih biljnih ulja. Za njegovo određivanje najviše se koristi metoda ispitivanja primarnih produkata oksidacije ulja (hidroperoksidi, peroksidi). Peroksidni broj ulja određen je standardnom metodom (ISO 3960:2007). Rezultat je izražen kao mmol aktivnog kisika koji potječe iz nastalih peroksida prisutnih u 1 kg ulja. Vrijednost se izračunava prema jednadžbi:

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

$V_1$  = volumen otopine natrij-tiosulfata,  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ mol/L}$  utrošen za titraciju uzorka ulja (mL);

$V_0$  = volumen otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe (mL);

m = masa uzorka ulja (g).

#### *Udio vlage*

Za određivanje udjela vlage u ulju korištena je standardna metoda ISO 662:1992. Udio vlage izračunava se prema izrazu:

$$\text{Udio vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

$m_0$  – masa staklene posudice (g);

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

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

*Udio netopljivih nečistoća*

Za određivanje netopljivih nečistoća u ulju korištena je standardna metoda ISO 663:1992. Udio netopljivih nečistoća izračunava se prema izrazu:

$$\text{Udio netopljivih nečistoća} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100 \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$

$m_0$  – masa uzorka (g);

$m_1$  – masa osušenog lijevka;

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

*Jodni broj*

Određivanjem jednog broja ukazuje se na nezasićenost ulja ili masti. Jodni broj predstavlja količinu joda u gramima koja se veže na 100 g ulja ili masti.

Jodni broj se određuje prema formuli:

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

$V_0$  = volumen utrošene 0,1 M otopine natrij – tiosulfata za titraciju slijepe probe (mL);

$V_1$  = volumen utrošene 0,1 M otopine natrij – tiosulfata za titraciju uzorka (mL);

$c$  = masa ispitivanog uzorka (g).

*Saponifikacijski broj*

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

Saponifikacijski broj se određuje prema formuli:

$$\text{Saponifikacijski broj} = \frac{(V_0 - V_1) \cdot 2,81}{m} \frac{(V_0 - V_1) \cdot 2,81}{m} \quad (\text{mg KOH/g ulja})$$

$V_0$  = volumen 0,5 M otopine HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL);

$V_1$  = volumen 0,5 M otopine HCl utrošen za titraciju uzorka (mL);

$m$  = masa uzorka (g).

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

**Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja**

Oksidacijsko kvarenje je najčešća vrsta kvarenja jestivih biljnih ulja. Poznavanje oksidacijske stabilnosti (održivosti) biljnih ulja važno je kako bi se unaprijed odredio vremenski period

za koji se mogu sačuvati od jače izraženog oksidacijskog kvarenja, bez značajnih promjena kvalitete. Ispitivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja hrvatske sorte Istarska bjelica provedeno je testom ubrzane oksidacije ulja Schaal Oven testom (Oven test) kod konstantne temperature 63 °C tijekom 18 dana praćenjem peroksidnog broja (Pbr) svakih 24 sata.

#### *Priprema uzorka za ispitivanje oksidacijske stabilnosti*

Izvaže se određena količina pojedinačnog prirodnog antioksidansa u udjelu 0,2 % te 50 g ulja, i uz miješenje 10 minuta zagrijava na temperaturi 65 °C. Nakon toga uzorak se hladi na sobnu temperaturu, pokriva satnim stakalcem i stavlja u termostat (Advantage Lab GmbH, Belgija, model AL01-04-100) kod konstantne temperature 63 °C čime započinje ispitivanje oksidacijske stabilnosti ulja sa i bez dodanog antioksidansa.

#### **Određivanje sastava masnih kiselina**

Određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima ulja provedeno je metodom plinske kromatografije sa plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Prije analize provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere masnih kiselina sa metanolnom otopinom KOH prema postupku opisanom u Prilogu B Uredbe Komisije br. 796/2002 (EZ, 2002). Uzorci ulja (1-2 kapi) pomiješani su sa 4 mL n-heptana, promiješani na vortex miješalici 30 sekundi, zatim je dodano 0,2 mL 2 mol/L metanolne otopine kalijevog hidroksida i ponovo promiješano 30 sekundi. Nakon odvajanja slojeva, gornji heptanski sloj koji sadrži metilne estere masnih kiselina profiltriran je kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm u vijalicu. Tako pripremljeni metilni esteri masnih kiselina analizirani su na plinskom kromatografu (Shimadzu GC-2010 Plus) opremljenom kapilarnom kolonom SH-FAMEWAXTM (Shimadzu, Kyoto, Japan) sljedećih karakteristika: 30 m duljina kolone; 0,32 mm unutarnji promjer i 0,25 µm debljina filma nepokretne faze. Plin nosioc bio je dušik uz protok od 1,26 mL/min. Temperatura injektora iznosila je 240 °C, a volumen injektiranog uzorka 2 µL uz omjer cijepanja 1:100. Početna temperatura kolone iznosila je 120 °C, nakon 5 minuta programirano je povećavana do 220 °C brzinom 5 °C/min koja je zadržana narednih 20 minuta. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora postavljena je na 250 °C. Identifikacija odijeljenih masnih kiselina u uzorcima analiziranih ulja provedena je temeljem usporedbe vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja masnih kiselina u certificiranom referentnom materijalu (Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24) analiziranog pri istim uvjetima. Analiza uzoraka ulja provedena je u tri ponavljanja. Udio masnih kiselina izražen je kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline (EZ, Komisija Europske zajednice: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002).

## **Rezultati i rasprava**

#### **Parametri kvalitete ulja**

Osnovni parametri kvalitete (kemijske karakteristike) ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica: peroksidni broj (Pbr), slobodne masne kiseline (SMK), udio vode, udio netopljivih nečistoća kao i parametri za identifikaciju ulja jodni broj i saponifikacijski broj prikazani su u tablici 1.



**Tablica 1.** Kemijske karakteristike ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica u usporedbi s maksimalnim dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009) / **Table 1.** Chemical characteristics of extra virgin olive oil of the Istarska bjelica variety in comparison with the maximum permitted values according to the Regulations on olive fruit and olive pomace oils

| Parametar kvalitete/ Quality parameter                                | Vrijednost/Value | Pravilnik/Regulations (NN 7/2009) |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Voda/Water (%)                                                        | 0,038            | 0,7-1,5                           |
| Netopljive nečistoće/ Insoluble impurities (%)                        | 0,62             | -                                 |
| Slobodne masne kiseline (SMK)/ Free fatty acids (% oleinske kiseline) | 0,27             | 0,8                               |
| Peroksidni broj (Pbr)/ Peroxide value (mmol O <sub>2</sub> /kg)       | 1,67             | 10                                |
| Jodni broj/ Iodine number (g I <sub>2</sub> /100g ulja)               | 96,45            | 75-94                             |
| Saponifikacijski broj/ Saponification number (mg KOH/g ulja)          | 219,29           | 184-196                           |

Prema dobivenim rezultatima ekstra djevičansko maslinovo ulje sorte Istarska bjelica je dobre kvalitete, analitički određene vrijednosti su u granicama propisanim Pravilnikom o uljima od ploda i komine maslina (NN 7/2009). Jodni broj i saponifikacijski broj nisu u skladu s Pravilnikom. Jodni broj za Istarsku bjelicu iznosi 96,45 g I<sub>2</sub>/100 g, a maksimalna dopuštena vrijednost je u rasponu od 75-94 g I<sub>2</sub>/100 g. Također, saponifikacijski broj se pokazao većim (219,29 mg KOH/g ulja) nego što je maksimalna dopuštena vrijednost (184-196 mg KOH/g ulja). Ostali parametri kvalitete i identifikacije ulja su u skladu s Pravilnikom. Vrijednost peroksidnog broja i slobodnih masnih kiselina su znatno niže od maksimalne vrijednosti što znači da nije došlo do oksidacijskog kvarenja niti do značajne hidrolitičke razgradnje triglicerida čiji produkti bi povećali kiselost ulja.

### **Oksidacijska stabilnost**

U tablici 2 prikazana je oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica te utjecaj dodatka antioksidanasa (prirodni i sintetski) te sinergista na stabilizaciju ulja.

**Tablica 2.** Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica sa i bez dodatka antioksidansa, utvrđena Schaal Oven testom (63 °C, tijekom 18 dana).

**Table 2.** Oxidation stability of extra virgin olive oil of the Istarska bjelica variety with and without antioxidant addition, determined by the Schaal Oven test (63 °C, during 18 days).

|                                                                                        |                                  | Peroksidni broj / Peroxide value (mmol O <sub>2</sub> /kg) |           |           |           |           |            |            |            |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Uzorci/Samples                                                                         | Antioksidans/<br>Antioxidant (%) | 0.<br>dan/<br>day                                          | 1.<br>dan | 2.<br>dan | 4.<br>dan | 7.<br>dan | 10.<br>dan | 11.<br>dan | 14.<br>dan | 18.<br>dan |
| Ulje Istarska bjelica<br>(kontrolni uzorak)                                            | -                                | 1,67                                                       | 1,91      | 2,35      | 2,43      | 3,87      | 4,55       | 4,98       | 5,53       | 7,54       |
| + Ekstrakt<br>ružmarina/<br>Rosemary Extract<br>(OxyLess CS)                           | 0,2                              |                                                            | 1,90      | 1,94      | 2,18      | 2,45      | 2,50       | 2,73       | 3,52       | 4,02       |
| + OxyLess CS +<br>limunska kiselina/<br>citric acid                                    | 0,2+0,01                         |                                                            | 1,91      | 2,03      | 2,06      | 2,24      | 2,65       | 2,74       | 3,72       | 4,27       |
| + OxyLess CS +<br>kofeinska kiselina/<br>caffeic acid                                  | 0,2+0,01                         |                                                            | 1,71      | 1,84      | 1,95      | 2,01      | 2,54       | 2,66       | 3,30       | 3,75       |
| + Ekstrakt zelenog<br>čaja/ Green tea<br>extract                                       | 0,2                              |                                                            | 1,67      | 1,83      | 2,52      | 2,59      | 3,23       | 3,64       | 4,35       | 4,74       |
| + Ekstrakt zelenog<br>čaja + limunska<br>kiselina/Green tea<br>extract+ citric acid    | 0,2+0,01                         |                                                            | 1,64      | 2,07      | 2,23      | 2,44      | 2,83       | 3,20       | 4,57       | 4,63       |
| + Ekstrakt zelenog<br>čaja + kofeinska<br>kiselina/ Green tea<br>extract+ caffeic acid | 0,2+0,01                         |                                                            | 1,85      | 2,06      | 2,28      | 3,29      | 2,74       | 3,06       | 4,13       | 4,55       |
| + Eterično ulje<br>lavande/ Lavender<br>essential oil                                  | 0,2                              |                                                            | 1,90      | 2,16      | 2,29      | 2,91      | 4,13       | 4,48       | 5,00       | 7,96       |
| + Mješavina<br>tokoferola/<br>Tocopherol mixture                                       | 0,1                              |                                                            | 1,84      | 2,30      | 2,50      | 3,73      | 4,90       | 5,86       | 5,96       | 8,68       |
| + Propil galat/<br>Propyl gallate                                                      | 0,01                             |                                                            | 1,45      | 1,83      | 1,91      | 2,39      | 3,18       | 3,29       | 3,69       | 3,98       |



Određivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica provedeno je primjenom Schaal Oven testa pri 63 °C što je prikazano u tablici 2. Test oksidacijske stabilnosti ulja provodio se 18 dana i održivost se prikazala u vrijednostima peroksidnog broja. Polazna vrijednost peroksidnog broja Istarske bjelice (kontrolni uzorak) je iznosila 1,67 mmol O<sub>2</sub>/kg, a nakon 18 dana vrijednost peroksidnog broja je bila 7,54 mmol O<sub>2</sub>/kg. Vrijednost peroksidnog broja ulja ove sorte nakon testa bila je ispod maksimalno dozvoljene vrijednosti koja iznosi 10 mmol O<sub>2</sub>/kg (Pravilnik). Na oksidacijsku stabilnost se utjecalo i dodavanjem različitih antioksidanasa i sinergista u ispitivano ulje. Njihov utjecaj na ispitivano ulje se također pratio tijekom 18 dana testa gdje je vidljiv postepeni porast peroksidnog broja. Pojedini ispitivani antioksidansi i kombinacija sa sinergistima su povećavali otpornost ovog ulja prema oksidacijskom kvarenju budući da je peroksidni broj bio niži u odnosu na kontrolni uzorak. Primjena prirodnog antioksidansa ekstrakta ružmarina (0,2 %), tip Oxy`Less CS, pokazala se najbolja u zaštiti ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica od oksidacijskog kvarenja, dakle efikasno se provela stabilizacija ovog ulja.

Iz rezultata u tablici primjećuje se niska vrijednost Pbr tijekom ispitanih dana, a nakon posljednjeg 18 dana testa vrijednost Pbr je 4,02 mmol O<sub>2</sub>/kg, što je vrlo mali porast u odnosu na Pbr kontrolnog ulja (bez dodatka antioksidansa). Dakle, dodatak ovog prirodnog antioksidansa pokazuje veliku učinkovitost kod stabilizacije ovog ulja, veća je otpornost prema oksidacijskom kvarenju. Najveća efikasnost zaštite ulja je postignuta kombinacijom dodatka ekstrakta ružmarina tipa Oxy`Less® CS kao antioksidansa i kofeinske kiseline kao sinergista.

Nakon 18 dana testa kod ulja sorte Istarska bjelica peroksidni broj uzorka je iznosio 3,75 mmol O<sub>2</sub>/kg. Dodatkom sinergista limunska kiselina zajedno s ekstraktom ružmarina ostvarena je slabija zaštita od oksidacije u odnosu na sinergist kofeinsku kiselinu. Antioksidansi eterično ulje lavande i mješavina tokoferola nisu pokazali antioksidacijsko djelovanje u zaštiti ispitivanog ulja. Vrijednosti peroksidnog broja u uzorcima ulja su premašili vrijednost peroksidnog broja u odnosu na kontrolni uzorak nakon 18 dana provedbe testa. Točnije, dodatkom mješavine tokoferola u koncentraciji 0,1 % nije postignuta zaštita od oksidacijskog kvarenja, budući da je peroksidni broj kod ulja sorte Istarska bjelica iznosio 8,68 mmol O<sub>2</sub>/kg ulja, a primjenom eteričnog ulja lavande Pbr je 7,96 mmol O<sub>2</sub>/kg što je veće od vrijednosti kontrolnog uzorka. Dodatkom prirodnog antioksidansa ekstrakta zelenog čaja ostvarena je malo slabija zaštita ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica u odnosu na primjenu ekstrakta ružmarina. Nakon provedbe testa Pbr je imao vrijednost 4,74 mmol O<sub>2</sub>/kg. Sinergisti limunska kiselina i kofeinska kiselina u kombinaciji s ekstraktom zelenog čaja malo su povećali otpornost ulja prema oksidacijskom kvarenju u odnosu na ekstrakt zelenog čaja. Kod ove sorte maslinovog ulja sinergisti su dodatno zaštitili ulje od oksidacije uz dodatak ekstrakta ružmarina i zelenog čaja. Sintetski antioksidans propil galat postigao je podjednaku zaštitu ovog ulja od oksidacijskog kvarenja kao i ekstrakt ružmarina.

U tablici 3. prikazan je sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica, a određen je separacijskom tehnikom plinske kromatografije uz FID detektor. Iz dobivenih vrijednosti sastava masnih kiselina je vidljivo da ulje ima najveći udio mononezasićene oleinske kiseline (C18:1n9c+t) 76,49 %, a od zasićenih masnih kiselina dominira palmitinska kiselina (C16:0) 12,28 %. Navedene vrijednosti za masne kiseline odgovaraju literaturnim podacima (Koprivnjak, 2006.).

**Tablica 3.** Sastav masnih kiselina ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica  
**Table 3.** Fatty acid composition of extra virgin olive oil of the Istarska bjelica variety

| Masna kiselina / Fatty acid | Udio/Share % | SD   |
|-----------------------------|--------------|------|
| C16: 0                      | 12,28        | 0,03 |
| C16: 1                      | 0,86         | 0,00 |
| C17: 0                      | 0,05         | 0,01 |
| C17: 1                      | 0,08         | 0,00 |
| C18: 0                      | 2,84         | 0,00 |
| C18: 1n9c+t                 | 76,49        | 0,04 |
| C18: 2n6c                   | 5,19         | 0,00 |
| C18: 3n3                    | 0,51         | 0,00 |
| C20: 0                      | 0,43         | 0,00 |
| C20: 1                      | 0,25         | 0,00 |
| C22: 0                      | 0,11         | 0,00 |
| C24: 0                      | 0,92         | 0,01 |

### Zaključak

Ispitivano ekstra djevičansko maslinovo ulje hrvatske sorte Istarska bjelica dobre je kvalitete, osnovni parametri kvalitete su u skladu s Pravilnikom o uljima od ploda i komine masline (NN 7/2009). Od ispitivanih prirodnih antioksidanasa dodani ekstrakt ružmarina (tip Oxy'Less®CS) postiže veću stabilizaciju ulja tj. otpornost prema oksidaciji. Dodatkom sinergista limunska kiselina i kofeinska kiselina uz ekstrakt ružmarina i ekstrakt zelenog čaja postignuta je dodatna zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja. Najbolja zaštita ulja od oksidacijskog kvarenja postignuta je dodatkom kombinacije antioksidansa ekstrakta ružmarina i sinergista kofeinska kiselina. Ekstrakt zelenog čaja pokazuje efikasnu zaštitu ulja od oksidacijskog kvarenja, ali manju od ekstrakta ružmarina. Primjenom mješavine tokoferola i eteričnog ulja lavande u ispitivanim koncentracijama nije se postigla željena zaštita od oksidacijskog kvarenja, budući da je nakon testa dobivena veća vrijednost peroksidnog broja u odnosu na kontrolni uzorak. Podjednako dobru antioksidacijsku aktivnost kod ulja sorte Istarske bjelice pokazao je sintetski antioksidans propil galat kao i ekstrakt ružmarina. Sastav masnih kiselina odgovara literaturnim podacima za ovu vrstu ulja.

## Literatura

- Abramović, H., Abram, H. (2006)** Effect of added rosemary extract on oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Acta agriculturae Slovenica*, 87 (2), 255-261.
- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Seo, E.-M., Choi, Y.-K., Kim, H.-S. (2008)** Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, 84, 327-334.
- Alavi, N., Golmakani, M.T. (2017)** Improving oxidative stability of olive oil: Incorporation of *Spirulina* and evaluation of its synergism with citric acid. *Grasas Y Aceites*, 68 (1), 1-11.
- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. and Gruzdiene (2000)** Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International*, 33, 785-791.
- Berra, D., Lahiri, D., Nag, A. (2006)** Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparasion with synthetic antioxidant. *J. Food Eng.*, 74, 542-545.
- Broadbent, C.J., Pike, O.A. (2003)** Oil stability indeks correlated with sensory determination of oxidative stability in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80, 59-63.
- Čorbo, S. (2008.)** Tehnologija ulja i masti. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu. Bemust Sarajevo.
- Dimić, E. (2005)** Hladno cedena ulja. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008)** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.*, 110, 76-82.
- Farhoosh, R., Niazmand, R., Rezaei, M., Sarabi, M. (2008)** Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (6), 587-592.
- Frega, N., Mozzon, M., Lercker, G. (1999)** Effect of Free Fatty Acids on Oxidative Stability of Vegetable Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76 (3), 325-329.
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., Korczak, J. (2006)** Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 351-362.
- Gray, J.I. (1978)** Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 55, 539-546.
- Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. (2000)** Comparasion of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$  - tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.*, 71, 229-233.
- Yanishlieva, Nedyalka V., Marinova, Emma M. (2001)** Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 752-767.
- Koprivnjak, O. (2006)** Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola. MIH, Poreč.
- Martin-Polvillo, M., Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C. (2004)** Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81, 577-583.
- Merrill, L.I., Pike, O.A., Ogden, L.V. (2008)** Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85, 771-776.
- Pan, Y., Zhang, X., Wang, H., Liang, Y., Zhu, J., Li, H., Zhang, Z., Wu, Q. (2007)** Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. *Food Chemistry*, 105, 1518-1524.
- Pravilnik o uljima od ploda i komine masline, NN 7/2009.
- Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E. (1997)** Ossidazioni dei lipidi. Nota 1. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 74, 181-189.
- Shahidi, F. (2005)** *Bailey's Industrial Oil & Fat Products (Sixth edition), Volume 1, Edible Oil & Fat*

Products: Chemistry, Properties and Health Effects, Wiley-Interscience publication: 269-513.

**Suja, K.P., Abraham, J.T., Thamizh, S.N., Jayalekshmy, A., Arumugan, C. (2004)** Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, 84, 393-400.

**Taghvaei, M., Jafari, S.M. (2013)** Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J. Food Sci. Technol.*, 52, 1272-1282.

Komisija Europske zajednice: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002.

**Velasco, J., Dobarganes, C. (2002)** Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 661-676.

**Zadro B., Perica, S. (2007)** *Maslina i maslinovo ulje*. Naklada Zadro, Zagreb.

**Zunin, P., Leardi, R., Bisio, A., Boggia, R., Romussi, G. (2010)** Oxidative stability of virgin olive oil enriched with carnolic acid. *Food Research International*, 43 (5), 1511-1516.

**Prispjelo/Received: 11.9.2025.**

**Prihvaćeno/Accepted: 15.10.2025.**

*Original scientific paper*

### **Stabilization of Extra Virgin Olive Oil of the Istarska Bjelica Variety**

#### **Abstract**

Oxidative stability of plant oils represents the time during which the oil can be preserved from oxidation processes. Oxidative spoilage is one of the main issues during the production and storage of olive oil. In this paper, the influence of the addition of antioxidants on the oxidation stability of extra virgin olive oil of the Croatian variety Istarska bjelica was investigated. The determination of the oxidation stability of the oil and the influence of the addition of antioxidants was carried out using the Schaal Oven test of accelerated oil oxidation. The antioxidants used were rosemary extract (Oxy'Less®CS), green tea extract, lavender essential oil, mixture of tocopherols and propyl gallate, as well as the synergists citric and caffeic acid. The quality parameters of the olive oils were analyzed, including peroxide value, free fatty acids, moisture content, insoluble impurities, saponification value, and iodine value. The result of oil oxidation is expressed by the peroxide number. The test conducted determined that olive oil shows good resistance to oxidative spoilage. With the addition of tested antioxidants, additional protection of olive oils from oxidation was achieved. The best oil stability was achieved with the addition of rosemary extract and caffeic acid. Mixed tocopherols and lavender essential oil did not protect the oil from oxidative deterioration.

**Key words:** extra virgin olive oil, Istarska bjelica variety, oxidative stability, antioxidants