

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UTJECAJ DODATKA BILJNOG MATERIJALA I  
EKSTRAKTA LOVORA NA OKSIDACIJSKU  
STABILNOST RIBLJEG ULJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA ZELENKA**

**Matični broj: 1390**

**Split, rujan 2017.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**UTJECAJ DODATKA BILJNOG MATERIJALA I  
EKSTRAKTA LOVORA NA OKSIDACIJSKU  
STABILNOST RIBLJEG ULJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA ZELENKA**

**Matični broj: 1390**

**Split, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**COURSE: FOOD TECHNOLOGY**

**INFLUENCE OF THE LAUREL PLANT**  
**MATERIAL AND EXTRACT ADDITION ON FISH**  
**OIL OXIDATIVE STABILITY**

**BACHELOR THESIS**

**ANA ZELENKA**

**Parent number: 1390**

**Split, September 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Stručni studij kemijske tehnologije; smjer Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

### UTJECAJ DODATKA BILJNOG MATERIJALA I EKSTRAKATA LOVORA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST RIBLJEG ULJA

Ana Zelenika, 1390

**Sažetak:**

Ribljem ulju, kao dodatku prehrani, se posljednjih godina pridaje velika pažnja jer obiluje omega-3 masnim kiselinama koje imaju dokazan pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Ipak, zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, riblja ulja su izrazito osjetljiva na procese oksidacije, a samim time i riblja tkiva tijekom skladištenja, manipulacije i/ili obrade. Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima rezultira sa pojavom užeglosti i nastankom štetnih produkata oksidacijskog kvarenja koji rezultiraju negativnim organoleptičkim karakteristikama proizvoda. U ovom završnom radu se korištenjem uređaja Rancimat ispitivala oksidacijska stabilnost ribljeg ulja kao i potencijalno produljenje/skraćenje vremena stabilnosti ulja po dodatku homogeniziranog uzorka lista lovora kao i pripremljenih ekstrakata. Dokazano je kako dodatak biljnog materijala lovora i dodatak ekstrakta do određene granice utječu povoljno na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja.

**Ključne riječi:** riblje ulje, rancimat test, lovor, oksidacija, masne kiseline, masti, ulja, lipidi

**Rad sadrži:** 35 stranica, 16 slika, 5 tablica, 33 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur.
2. Dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, viši znan. sur.

**Datum obrane:** 20. rujana 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Professional study of Chemical Technology; Course: Food Technology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 21.  
**Mentor:** Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić

### **INFLUENCE OF THE LAUREL PLANT MATERIAL AND EXTRACT ADDITION ON FISH OIL OXIDATIVE STABILITY**

Ana Zelenika, 1390

**Abstract:**

Fish oil, as a nutrition supplement, has been paying great attention in recent years because it contains omega-3 fatty acids that have a proven positive impact on human health. However, due to the high content of unsaturated fatty acids, fish oils are extremely sensitive to the oxidation processes and thus the fish tissue during storage, manipulation and / or processing. Oxygenation of fats in fish and fish products results in the occurrence of rancidity and the formation of harmful products of oxidative degradation resulting in negative organoleptic characteristics of the product. In this bachelor thesis, Rancimat tested the oxidation stability of fish oil as well as potentially extending / shortening the stability time of the oil by adding a homogenized laurel leaf pattern as well as the prepared extracts. It has been shown that the addition of laurel plant material and the addition of extracts to a certain boundary advantageously affect the oxidative stability of fish oil.

**Keywords:** fish oil, rancimat test, laurel, oxidation, fatty acids, fats, oils, lipids

**Thesis contains:** 35 pages, 16 figures, 5 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ph. D. Mario Nikola Mužek
2. Ph. D. Danijela Skroza
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

**Defence date:** 20. september 2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of** thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od veljače do rujna 2017. godine.*

*Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.*

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić, bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć, na uloženom vremenu, trudu i stručnom savjetovanju tijekom izrade ovog završnog rada, a također i tijekom cijelog školovanja.*

*Posebno zahvaljujem obitelji, kolegama i prijateljima na podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je:

- homogenizirati suhi biljni materijal i korištenjem sita različitih veličina otvora razdvojiti ga na frakcije obzirom na veličinu čestica,
- pripremiti ekstrakte lovora korištenjem različitih metoda ekstrakcije pri čemu je praćen utjecaj veličine čestica frakcije i duljine trajanja ekstrakcije na udio ukupnih fenola u ekstraktima,
- korištenjem metode rancimat odrediti oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja u kojeg su u svrhu produljenja stabilnosti dodane različite frakcije homogeniziranog biljnog materijala kao i različite odvage istog,
- odrediti udio fenolnih spojeva koji su tijekom testa određivanja oksidacijske stabilnosti "migrirali" u medij nakon ekstrakcije polarnih komponenata ulja,
- korištenjem metode rancimat odrediti oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja u kojeg su u svrhu produljenja stabilnosti dodani različiti volumeni ekstrakata lovora pripremljeni korištenjem različitih metoda ekstrakcije.



## SAŽETAK

Ribljem ulju, kao dodatku prehrani, se posljednjih godina pridaje velika pažnja jer obiluje omega-3 masnim kiselinama koje imaju dokazan pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Ipak, zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, riblja ulja su izrazito osjetljiva na procese oksidacije, a samim time i riblja tkiva tijekom skladištenja, manipulacije i/ili obrade. Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima rezultira s pojavom užeglosti i nastankom štetnih produkata oksidacijskog kvarenja koji rezultiraju negativnim organoleptičkim karakteristikama proizvoda. U ovom završnom radu se korištenjem uređaja Rancimat ispitivala oksidacijska stabilnost ribljeg ulja kao i potencijalno produljenje/skraćenje vremena stabilnosti ulja po dodatku homogeniziranog uzorka lista lovora kao i pripremljenih ekstrakata lovora. Dokazano je kako dodatak biljnog materijala lovora i dodatak ekstrakta do određene granice utječu povoljno na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja.

**Ključne riječi:** riblje ulje, rancimat test, oksidacija, lovor, fenoli, masne kiseline, masti, ulja, lipidi

## **ABSTRACT**

Fish oil, as a nutrition supplement, has been paying great attention in recent years because it contains omega-3 fatty acids that have a proven positive impact on human health. However, due to the high content of unsaturated fatty acids, fish oils are extremely sensitive to the oxidation processes and thus the fish tissue during storage, manipulation and / or processing. Oxygenation of fats in fish and fish products results in the occurrence of rancidity and the formation of harmful products of oxidative degradation resulting in negative organoleptic characteristics of the product. In this final work, Rancimat tested the oxidation stability of fish oil as well as potentially extending / shortening the stability time of the oil by adding a homogenized laurel leaf pattern as well as the prepared extracts. It has been shown that the addition of laurel plant material and the addition of extracts to a certain boundary advantageously affect the oxidative stability of fish oil.

**Keywords:** fish oil, rancimat test, laurel, oxidation, fatty acids, fats, oils, lipids

## SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
Lipidi .....	2
1.2. Masne kiseline .....	4
1.3. Kvarjenje masti i ulja .....	6
1.3.1. Fizikalni čimbenici kvarenja masti i ulja .....	7
1.3.2. Kemijski čimbenici kvarenja masti i ulja .....	7
1.3.3. Biološki čimbenici kvarenja masti i ulja .....	8
1.3.4. Posljedica korištenja užeglih masti i ulja .....	8
1.3.5. Sprječavanje oksidacije masti i ulja .....	8
1.5. Riblje ulje .....	9
1.6. Lovor .....	10
1.6.1. Primjena lovora .....	11
1.6.2. Stanište i ekologija .....	11
1.7. Rancimat metoda .....	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
2.1. Shematski prikaz eksperimenta .....	15
2.2. Korištene kemikalije i reagensi .....	16
2.3. Korišteni uređaji .....	16
2.4. Predobrada biljnog materijala .....	17
2.5. Metode .....	18
2.5.1. Priprava ekstrakta lovora .....	18
2.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	19
2.5.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja .....	21
2.5.4. Ekstrakcija polarnih komponenti iz ulja .....	24
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
3.1. Predobrada biljnog materijala .....	25
3.2. Priprave ekstrakata i određivanje ukupnih fenola .....	26
3.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja uz dodatak biljnog materijala i ekstrakata lovora .....	27
4. ZAKLJUČAK .....	33
5. LITERATURA .....	34

## UVOD

Djelotvornost i pozitivan učinak ribljeg ulja poznat je već od davnina kada se uglavnom koristilo kao dodatak prehrani djeci u razvoju pa se osim klasične konzumacije ribe, konzumiralo i izolirano riblje ulje u tekućem stanju. Danas su vremena nešto drugačija ali primjena ribljeg ulja u prehrani je još uvijek značajna. Riblje ulje i pripravci koji ga sadrže uglavnom su pakirani u obliku kapsula, a veliku važnost mu pridaju sportaši, nutricionisti, liječnici (osobito kardiolozi) pa ga sve više ljudi uzima kao redovan dodatak prehrani.

Riblje ulje dokazano djeluje na povoljan rad srca i krvožilnog sustava, djeluje antiupalno i smanjuje krvni tlak, a kod djece ima povoljan učinak na rad mozga. Bogato je omega-3 masnim kiselinama čiji je unos u organizam izuzetno važan u svakodnevnoj prehrani. Preporučena dnevna doza unosa omega-3 masnih kiselina iznosi od 0,7 g do 1 g, što bi bilo oko 2 do 3 grama kvalitetnog ribljeg ulja dnevno.<sup>1</sup>

Lovor je također biljka koja se cijeni od davnina te se i danas učestalo koristi kao začin i dodatak jelima, a zbog prisutnosti fenolnih spojeva kojima biljka obiluje dokazani su mu brojni pozitivni biološki učinci između kojih su osobito značajna antibakterijska, fungicidna i antiseptička svojstva.<sup>21</sup>

U ovom završnom radu primjenom rancimat metode je istraživani dodatak lovora, usitnjenog biljnog materijala i ekstrakta, na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja.

## 1. OPĆI DIO

### Lipidi



*Slika 1. Masti i ulja*

Masti su skupina prirodnih, organskih spojeva koju nalazimo u svakoj životinjskoj i biljnoj stanici, a posebno u masnom tkivu morskih sisavaca i riba, kopnenih životinja te u sjemenkama viših biljaka. Po kemijskom sastavu masti su trigliceridi odnosno esteri masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola. Kemijske različitosti između pojedinih masti se temelje na tome da li navedeni esteri u svojoj strukturi sadrže samo jednu kiselinu (tri molekule iste kiseline), ili dvije, ili pak tri različite kiseline, što je najčešći slučaj. Od zasićenih kiselina u prirodnim mastima obično nalazimo palmitinsku i stearinsku, a od nezasićenih oleinsku, linoleinsku i linolnu. Ukoliko masti sadrže veći broj nezasićenih kiselina te su na sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju, nazivaju se uljima. Jednom riječju i masti i ulja nazivamo lipidima.<sup>3,4</sup>

Prema podrijetlu lipide dijelimo na <sup>4,5</sup>

- biljna ulja,
- riblja ulja,
- biljne masti i
- životinjske masti.

Masti i ulja imaju jednaku energetska vrijednost, a razlikuju se u konzistenciji te u nutritivnoj vrijednosti koja prvenstveno ovisi o profilu masnih kiselina. Životinjska mast je krute konzistencije i sadržava pretežno zasićene masne kiseline te kolesterol, dok su biljna ulja bogatija nezasićenim masnim kiselinama, ne sadržavaju kolesterol, ali sadržavaju spojeve kao što su vitamin E, klorofil i karotenoidi. <sup>4,6</sup>

Ulja se uglavnom dobivaju iz sjemenki jednogodišnjih biljaka, kao što su na primjer suncokret, lan, soja i drugi, ali naravno nisu isključene ni višegodišnje biljke poput masline i kokosove palme. Osim ulja, u ljudskoj prehrani od velike važnosti su masti dobivene od različitih domaćih životinja, kao što su na primjer svinjska, goveđa ili ovčja mast. Također, u životinjske masnoće spadaju i mliječne masti koje se najčešće konzumiraju u obliku mlijeka, maslaca i ostalih prerađevina. Lipidi u hrani su obično od velikog značaja za funkcionalna svojstva namirnica. Pojedini lipidi imaju i industrijsku upotrebu pa se koriste u medicini i kozmetičkoj industriji. Osim toga, masti i ulja učestalo se koriste i u kemijskoj industriji kao sirovina u proizvodnji raznih vrsta sapuna postupkom saponifikacije te sušiva biljna ulja koja se koriste kao osnovna sirovina u dobivanju uljnih lakova i linoleuma. <sup>3,7,8</sup>

Masti imaju veoma važnu ulogu u prehrani čovjeka i samom organizmu jer služe kao primarni izvor energije, pomažu u prijenosu hranjivih tvari te kao gradivne jedinice same stanice i ljudskog tijela u kojem obavijaju i na taj način štite određene organe. Masti su najveći izvor pričuvne energije tijela, doprinose boljoj apsorpciji kalcija i važne su za metabolizam karotena i njegovu pretvorbu u vitamin A te općenito za metabolizam drugih vitamina koji su topljivi u mastima (D, E, K). <sup>9</sup>

Pod pojmom lipida ne podrazumijevamo samo masti i ulja, već u lipide ubrajamo i širok spektar molekula različite kemijske strukture i biološkog porijekla, kao što su triacilgliceroli, voskovi, fosfolipidi, kolesteroli, steroidi, itd. Glavna karakteristika svih lipida je u tome što su netopivi u vodi, a topivi u organskim otapalima, lakši su od vode i u njoj se mogu emulgirati. Pri podjeli i klasifikaciji lipida mogu se uzimati različiti kriteriji, a

oni mogu biti: porijeklo, kemijski sastav, složenost, uloga u organizmu, nutritivni zahtjevi i utjecaj na zdravlje.<sup>7</sup> Bez unošenja lipida u organizam nema života, a količina masti koju je potrebno unositi u organizam ovisi o samoj osobi, njenom spolu, dobi, fizičkoj aktivnosti i drugim čimbenicima.<sup>11</sup>

Prema porijeklu smo već naveli da lipidi mogu biti biljni ili životinjski, dok ih prema kemijskom sastavu dijelimo na osapunjive i neosapunjive. Osapunjivi lipidi u svojoj molekuli sadrže ostatak bar jedne masne kiseline, a u ovu grupu spadaju: neutralne masti, fosfogliceridi, sfingolipidi i voskovi. Neosapunjivi lipidi se zovu još i izoprenoidi, a obuhvaćaju: steroide i terpene.<sup>11</sup>

Prema ulozi koju obavljaju u organizmu postoje lipidi kao spremnici energije, strukturni lipidi i regulatorni lipidi.<sup>7</sup>

Prema nivou složenosti kemijske strukture lipide možemo podijeliti na jednostavne, konjugirane, derivirane i ostale lipide.<sup>11</sup>

## 1.2. Masne kiseline

Masne kiseline ulaze u sastav prirodnih masti i ulja, a obzirom na vrste veza između ugljikovih atoma mogu biti zasićene (jednostruke veze) ili nezasićene (dvostruke veze), a one najčešće uglavnom imaju paran broj ugljikovih atoma u molekuli. Najrasprostranjenije trigliceride u prirodi ipak čine različite (mješovite) masne kiseline. Industrijski se masne kiseline dobivaju hidrolizom estera i uklanjanjem glicerola.<sup>3,12</sup>

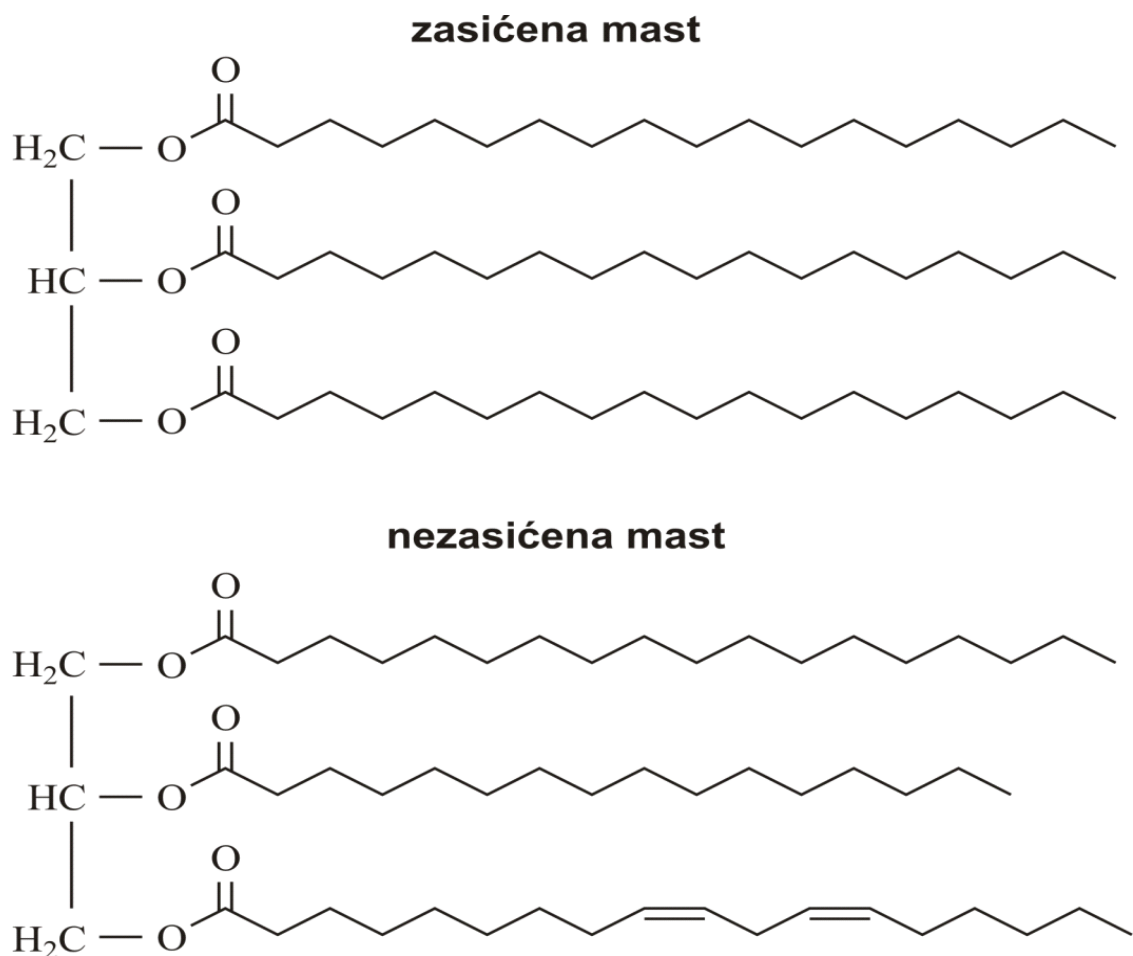
Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke veze niti druge funkcionalne skupine duž lanca, a kod ovih masnih kiselina ugljikovi atomi pored međusobnih veza, grade veze samo s vodikom. Ove masne kiseline su najvećim udjelom zastupljene u masnom tkivu životinja jer se time na manjem prostoru pohranjuje velika količina energije.<sup>12</sup> Najrasprostranjenije masne kiseline su: buterna, kapronska, kaprilna, laurinska, palmitinska, maslačna, stearinska i arhainska. Zasićene masne kiseline počevši od onih koje u svom lancu sadrže minimalno 10 ugljikovih atoma (C<sub>10</sub>) su pri sobnoj temperaturi u krutom obliku. S povećanjem broja C-atoma u molekuli masne kiseline povećava se talište i eksponent loma, a specifična težina kiseline je sve manja. Porastom molekularne težine smanjuje se njihova topljivost u vodi.<sup>3,13</sup>

Nezasićene masne kiseline slične su građe, ali posjeduju jednu ili više dvostrukih veza u ugljikovodičnom lancu. Osim vodika, kod nezasićenih masnih kiselina na atome ugljika vežu se i različite funkcionalne grupe. Ovisno o položaju koji vodikovi atomi pri tome zauzimaju razlikujemo *cis*- i *trans*- konfiguraciju. Najrasprostranjenije nezasićene masne kiseline su: palmitinska, oleinska, linolna, linolenska i arahinska. Stupanj nezasićenosti masti i masnih kiselina mjeri se jednim brojem, koji izražava postotak joda koji se adira na dvostrukim vezama u molekuli masne kiseline.<sup>3,12</sup>

Oblik *cis*- veze uvjetuje da se molekule uvijaju pa što je veći broj dvostrukih veza i *cis*- položaja vodika, to je uvijanje veće što dovodi do toga da se molekule međusobno nalaze na većim udaljenostima. U uljima dominiraju *cis*- masne kiseline, koje su znatno reaktivnije od *trans*- masnih kiselina. U *trans*- konfiguraciji molekule su pretežno linearne te su stoga gusto raspoređene pa su ove kiseline zastupljenije u krutim mastima. Ljudsko tijelo ima sposobnost sintetiziranja masnih kiselina, ali tri masne kiseline koje su mu neophodne za normalan metabolizam ipak nije u mogućnosti sam proizvesti. One se stoga nazivaju esencijalnim i unose se u organizam hranom. To su linolna, linolenska i arahinska kiselina koje se u većim količinama nalaze u biljkama i ribljem ulju. Ove masne kiseline su u ljudskom organizmu od iznimnog značaja jer sudjeluju u sintezi pojedinih hormona, a njihov deficit može izazvati depresiju ili agresivno ponašanje.<sup>10,12</sup>

Slobodne masne kiseline najčešće nastaju razlaganjem triacilglicerida pri čemu se dobiva i glicerol, predstavljaju izvor energije, s obzirom na to da mogu osloboditi relativno veliku količinu ATP-a.<sup>12</sup>





*Slika 2. Struktura molekula zasićenih i nezasićenih masnih kiselina <sup>14</sup>*

### 1.3. Kvarenje masti i ulja

Masti i ulja su vrlo kvarljive namirnice, a čimbenici koji utječu na njihovo kvarenje i degradaciju mogu biti kemijski, fizikalni i biološki. Navedeni čimbenici nikada ne djeluju odvojeno, nego uglavnom združeno, a rezultati i posljedice degradacije masti i ulja su gotovo uvijek različiti.

### 1.3.1. Fizikalni čimbenici kvarenja masti i ulja

Glavni fizikalni čimbenici koji uzrokuju kvarenja masti i ulja su <sup>3</sup>

- svjetlost, osobito ultraljubičasta koja djeluje kao katalizator odnosno ubrzava proces oksidacije;
- toplina, koja osim što utječe na proces oksidacije, često može izazvati i reakcije nastanka peroksida;
- adsorpcija svjetlosti, što je veća slobodna površina masti izložena svjetlosti, zraku i povišenoj temperaturi, ona će brže oksidirati.

### 1.3.2. Kemijski čimbenici kvarenja masti i ulja

Glavni kemijski čimbenici koji uzrokuju kvarenje masti i ulja se dijele na reakcije:

- oksidacije kisikom iz zraka,
- oksidacije kisikom iz vode,
- katalitičke reakcije uslijed prisutnosti iona metala prisutnih zbog djelovanja slobodnih masnih kiselina na metalne dijelove tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja. <sup>10</sup>

Kisik je osnovni čimbenik koji uzrokuje kemijske reakcije i promjene kod masti i ulja. Iako se uobičajeno kemijski i fizikalni faktori javljaju zajedno, proces kemijske oksidacije je u potpunosti različit od biološke oksidacije. Za procese kemijskog kvarenja je neophodan kisik, dok svjetlost i ostali katalizatori samo ubrzavaju reakcije oksidacije. Prvi korak u procesu kemijske oksidacije je nastanak peroksida. Masti i ulja s izraženim peroksidnim brojem se ne smiju dugo čuvati jer su vrlo nestabilne i lako polimeriziraju te se dalje razgrađuju čime utječu na organoleptiku masti i ulja uzrokujući pojavu raketljivog okusa i mirisa. Ipak, takve masti i ulja s povećanim peroksidnim brojem nisu pokvarene i mogu se koristiti za prehranu. Masne kiseline s više dvostrukih veza mnogo su reaktivnije od kiselina s jednostrukom vezom. <sup>3</sup>

### **1.3.3. Biološki čimbenici kvarenja masti i ulja**

U biološke čimbenike kvarenja masti i ulja ubrajamo:

- mikroorganizme koji djeluju na proteine i ugljikohidrate koji su otopljeni u vodi pri čemu dolazi do užeglosti koja je popraćena neugodnim mirisima i okusima,
- mikroorganizme koji hidroliziraju masti uz stvaranje enzima lipaze koji razgrađuje glicerol pa se na taj način se oslobađaju masne kiseline i molekule glicerida,
- mikroorganizme koji uzrokuju ketonsku oksidaciju kod masnih kiselina koje sadrže 4 do 14 C-atoma (od C<sub>4</sub> do C<sub>14</sub>).

Biološka oksidacija masti i ulja se može spriječiti eliminacijom, inhibicijom i sprečavanjem djelovanja mikroorganizama, što se uglavnom provodi primjenom čistoće tehnološkog procesa, sterilizacijom ambalaže, te održavanjem adekvatne higijene tijekom procesa pakiranja.<sup>3</sup>

### **1.3.4. Posljedica korištenja užeglih masti i ulja**

Oksidacijom masti i ulja gubi se jedan dio biološki aktivnih spojeva, vitamini, esencijalne masne kiseline i prirodni antioksidansi, no užegla mast ili ulje nije otrovno za organizam. Ipak prehrana takvim uljima i mastima pokazuje tipične nedostatke, što se očituje poremećajima metabolizma. Oksidacijom mogu biti zahvaćene i zasićene i nezasićene masne kiseline, a nastali produkti upućuju na pojavu užeglosti, što se najbolje očituje uslijed neugodnog okusa i mirisa takvih masti i ulja.<sup>3,10</sup>

### **1.3.5. Sprječavanje oksidacije masti i ulja**

Veliku ulogu u sprječavanju oksidacije masti i ulja imaju način i uvjeti skladištenja namirnica, način pakiranja odnosno vrsta ambalaže u koju se namirnice pakiraju, toplina i ostali uvjeti u kojima se mast ili ulje skladište, te potencijalni dodatak antioksidanasa u

svrhu sprječavanja, usporavanja ili odgode oksidacijskih procesa. Naravno, masti i ulja moraju biti dobro zaštićeni od već spomenutih čimbenika kvarenja; utjecaja zraka, vode i svjetla.<sup>3</sup> Najpoznatiji antioksidansi koji se koriste za sprječavanje oksidacije masti i ulja su tokoferoli koji su prisutni u gotovo svim biljnim uljima te karoteni, fosfolipidi i fitosteroli. Kao antioksidansi sve više se koriste i začinska bilja koja obiluju fenolnim spojevima kojima je dokazana vrlo dobra antioksidacijska aktivnost u lipidnim medijima.<sup>10</sup>

## 1.5. Riblje ulje

Životinje koje provode život na nižim temperaturama, kao što su temperature vode, sadrže lipide koji su na sobnoj temperaturi u tekućem stanju. U takve životinje ubrajamo i ribe te stoga njihove lipide nazivamo ribljim uljima. Riblja ulja proizvode se od morskih sisavaca, morskih riba ili pak iz pojedinih organa (najčešće jetre) nekih riba. Ulje izolirano iz riblje jetre upotrebljava se obično u medicinske svrhe, a ne za prehranu zbog velikog sadržaja joda, fosfora te vitamina A i D. Ulje kitova i drugih morskih riba se koristi u hidriranom stanju kao sirovina za proizvodnju riblje masti. Trigliceridi ribljih ulja od masnih kiselina uobičajeno sadrže oleinsku, stearinsku i palmitinsku kiselinu te još neke od nezasićenih kiselina.<sup>3</sup>

Riblja ulja se od davnina koriste u ljudskoj prehrani kao lijek zbog dokazanih pozitivnih utjecaja na ljudski organizam. Riblja ulja imaju visok sadržaj omega-3 masnih kiselina koje imaju antiupalni učinak. Također je dokazano da riblje ulje djeluje povoljno na rad srca, smanjuje krvni tlak i rizik od moždanog udara te doprinosi funkcijama mozga kod djece, ali i kod odraslih. Riblje ulje nadalje pomaže u liječenju depresije, stresa i anksioznosti, pridonosi čvrstoći kostiju te smanjenje suvišne masnoće. Smatra se da riblje ulje pomaže da djeca pravilno fizički i mentalno napreduju, a omega-3 masne kiseline se smatraju izuzetno važnima za razvoj vida, odnosno za formiranje mrežnice. Kao dodatak prehrani riblje ulje se može uzimati u tekućem obliku ili u vidu kapsula. Istraživanja su pokazala da ljudi koji svakodnevno konzumiraju ribe i riblja ulja koja sadrže relativno visoke koncentracije eikosapentaenske i dokozaheksenske kiseline rijetko obolijevaju od srčanih bolesti. Za takvu tvrdnju najbolji primjer su Grenlandski eskimi čija prehrana obiluje ribom i ribljim masnoćama.<sup>7, 15, 16</sup>

Riblje ulje je posljednjih godina postalo jedno od najpopularnijih dijetnih proizvoda s milijunima korisnika diljem svijeta. Najveća mana ribljeg ulja je što je vrlo podložno oksidaciji, upravo zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, a užeglo riblje ulje gubi svoju hranjivu vrijednost.<sup>17,18</sup> Angela Godwin i H. Ramachandra Prabhu<sup>19</sup>, u članku za Indian Journal of Clinical Biochemistry, govore o tome kako dodatak vitamina E u riblje ulje ima značajan učinak na smanjenje peroksidacije ribljeg ulja tijekom zagrijavanja na visokim temperaturama, što pokazuje da antioksidansi udruženi s omega-3 masnim kiselinama smanjuju brzinu oksidacije. No danas je korištenje sintetičkih antioksidansa privuklo pažnju ne samo znanstvenika nego i opće populacije zbog sve veće svijesti potrošača o onome što se konzumira, a i činjenice da brojnost aditiva i njihove količine u namirnicama nisu više zanemarive. Znanstvena istraživanja su također dovela do zaključaka da su pojedini aditivi koji se učestalo koriste u proizvodnji hrane toksični te da njihova prisutnost namirnice čini nesigurnim za zdravlje potrošača. Stoga se korištenje antioksidanasa iz različitih prirodnih izvora kao učinkovita metoda za suzbijanje kvarenja hrane te užeglosti smatra dobrom alternativom korištenju sintetskih aditiva. Prirodni fenolni spojevi s antioksidacijskim djelovanjem, kao što su ekstrakt ružmarina, tanini i slične fitokemikalije mogu potencijalno zaštititi hranu od kvarenja, ali je i učiniti sigurnijom za potrošača.<sup>16</sup>

## 1.6. Lovor

Lovor ili lovorika (lat. *Laurus nobilis L.*) je zimzeleno stablo ili grm autohtono u južnoj Europi koje se danas može naći širom svijeta. Pripada porodici *Lauraceae* ili lovornjače. To je višegodišnja kultura koja može narasti i do 15 m visine. Listovi lovora su duguljasti, prema vrhu oštri, duljine do 12 cm i razlikuju se s gornje i donje strane, kožnati su, valovitog ruba i aromatičnog mirisa. Listovi lovora obiluju mineralima te vitaminima B skupine. Cvijet lovora je sitan, plavo-bijel do žut, jednospolan te može biti muški ili ženski. Cvjetovi su skupljeni u paštaste cvatove koji se razvijaju tijekom travnja ili svibnja. Plod je koštunica ovalnog oblika i crne boje, a nastaje oplodnjom iz jednog cvijeta.<sup>20-22</sup> Odraslo stablo ima uzdignute grane te gustu i razgranatu krošnju. Kora mladog lovora je tanka, pepeljasta i glatka, dok je na starijim stablima crna i hrapava.<sup>23</sup> Lovor je od antike bio vrlo cijenjen, smatrao se svetim stablom, a lovorov vijenac je bio znak izvrsnosti pjesnika, sportaša te simbol mudrosti i slave. Danas je *laureat* dobitnik najveće

nagrade, a nakon završenog prvog stupnja obrazovanja na sveučilištu, polaznik postaje *bakalaureat*, što znači boba- plod lovora.<sup>20,24</sup>

### **1.6.1. Primjena lovora**

Plodovi lovora, odnosno tamne bobice se beru tijekom listopada i studenog, kada sazriju, a iz njih se izolira ulje koje se koristi kao dodatak jelima kojima daje ugodnu aromu. Ulje ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, utječe na smirivanje želuca i nadutosti, potiče aktivnost imunološkog sustava, ima protugljivična i stimulativna svojstva, ublažava reumatizam, uganuća i modrice. List lovora se obično dodaje suhim plodovima jer tako poprimaju poseban miris koji izbjegavaju štetnici. Ulje lovora se koristi za ublažavanje reume, a u farmaceutskoj industriji se koristi za izradu sapuna, krema i parfema. Ima baktericidno, antiseptičko i fungicidno djelovanje. Čaj i sirup od lovora koriste se za kašalj i grlobolju. Drvo lovora koristi se u tokarstvu za izradu štapova i za vinogradsko kolje.<sup>20,25</sup> Lovor sadrži i eterično ulje u udjelu od 0,5-3,5%, a koje se upotrebljava u proizvodnji parfema, sapuna, detergenata i slično, dok se u prehrambenoj industriji koristi za aromatiziranje.<sup>26</sup>

### **1.6.2. Stanište i ekologija**

Kako je lovor mediteranska biljka, iako je vrsta vrlo skromnih ekoloških zahtjeva, odgovaraju mu sunčana područja, no za vrijeme ljetnih mjeseci ipak ga je potrebno zaštititi od dugotrajnog izlaganja suncu. U području Dalmacije raste pojedinačno ili u skupinama u šumama, a u Hrvatskom primorju u listopadnim sastojinama crnog i bijelog graba. Lišće lovora moguće je brati tijekom cijele godine ili se čuva osušen, no u slučaju dužeg stajanja može izgubiti jačinu okusa.<sup>27</sup>

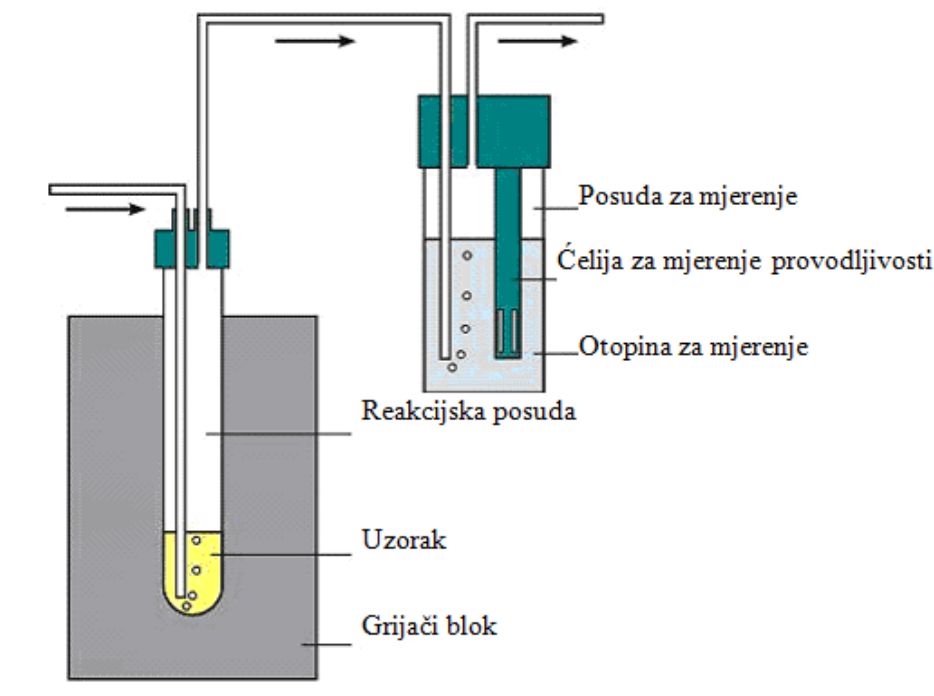


*Slika 3. Lovor* <sup>28,29</sup>

## 1.7. Rancimat metoda

Kvarenje masti i ulja se pri sobnoj temperaturi odvija vrlo sporo, a u procesu kvarenja nastaju različiti produkti degradacije masti i ulja kao što su alkoholi, aldehidi, peroksidi i karboksilne kiseline. Autooksidacija ulja može nastupiti brže ili sporije što prvenstveno ovisi o kemijskom sastavu masti ili ulja, prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju ili usporavaju procese oksidacije, te o uvjetima skladištenja.<sup>30</sup>

Metoda određivanja oksidacijske stabilnosti masti i ulja korištenjem uređaja Rancimat temelji se na automatskom određivanju vremena maksimalne promjene brzine oksidacije. Mjeri se povećanje vodljivosti destilirane vode u posudi za mjerenje, koja je uzrokovana otapanjem produkata oksidacije u njoj, a koji su nošeni strujom vrućeg zraka kojim se propuhuje uzorak. Na temelju zabilježenih podataka o promjeni provodljivosti destilirane vode izradi se rancimat krivulja na kojoj točka infleksije predstavlja indukcijsko vrijeme i mjera je oksidacijske stabilnosti uzorka. Osim vremena indukcije, također se može odrediti vrijeme stabilnosti, odnosno vrijeme potrebno da dođe do promjene provodljivosti otopine u mjernoj posudi.<sup>31</sup>

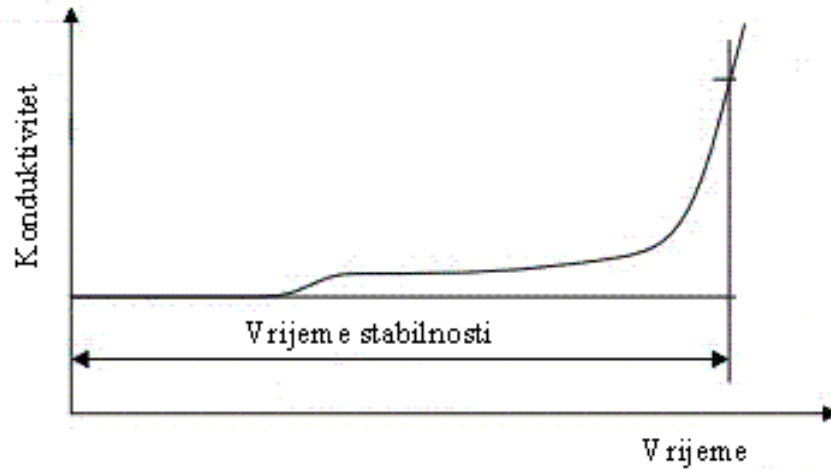


*Slika 4. Shematski prikaz spojene reakcijske i mjerne posude<sup>31</sup>*



Uređaj Rancimat 743 se sastoji od dva grijača bloka koja imaju po četiri položaja za mjerenje. Svaki grijač se može zasebno grijati kao i svaki uzorak u zasebnim položajima. Rancimat je povezan s računalom, programom koji omogućava lakše praćenje podataka, uzoraka i kontrolu metoda.<sup>32</sup>

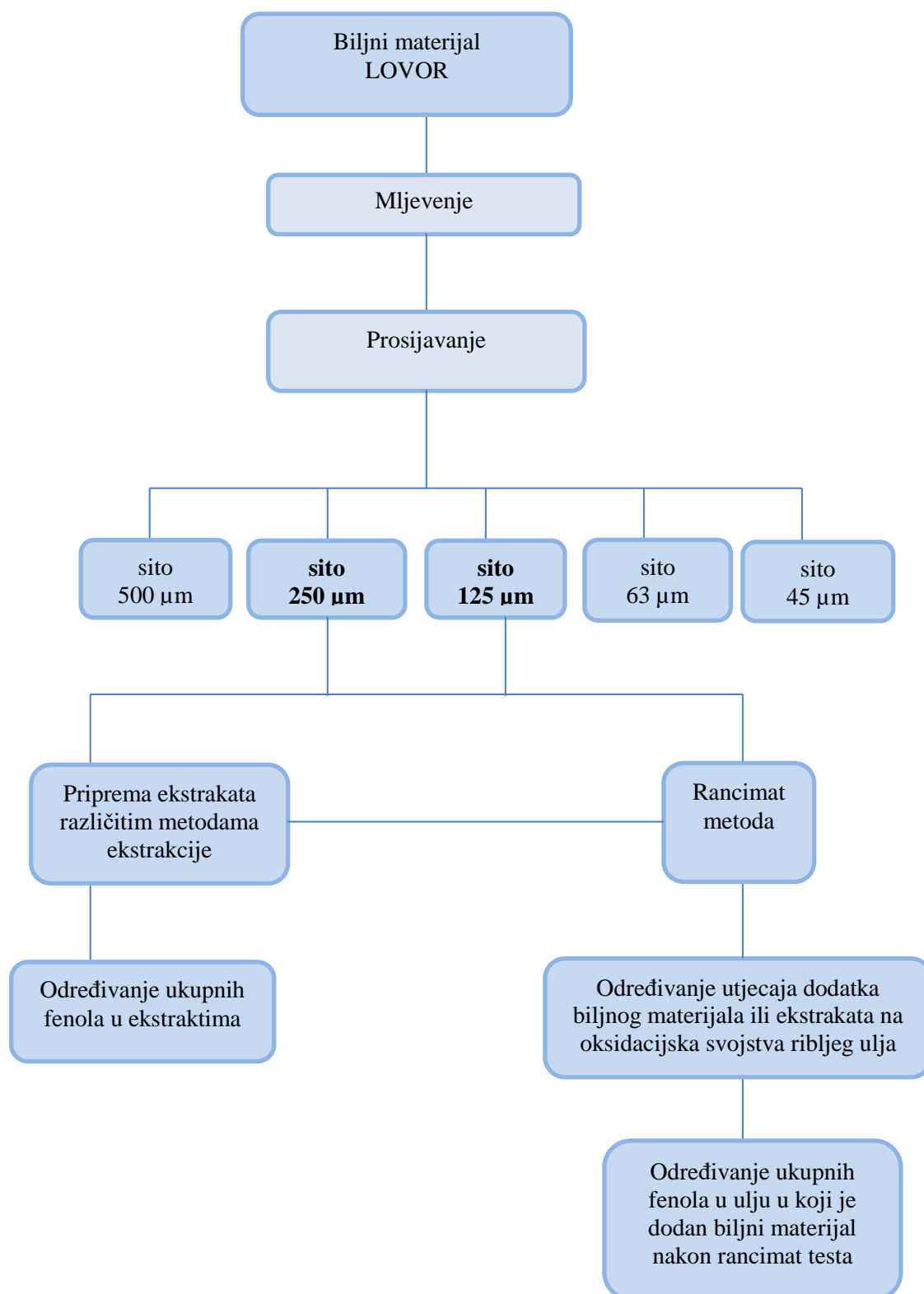
Na slici 5 prikazana je rancimat krivulja koja se dobije po završetku mjerenja.



*Slika 5. Rancimat krivulja za određivanje vremena stabilnosti uzorka<sup>31</sup>*

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Shematski prikaz eksperimenta



## 2.2. Korištene kemikalije i reagensi

- Metanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *n*-heksan, *Lach-Ner*, Neratovice, Češka Republika
- Folin-Cioaltea reagens, Sigma-Aldrich, Stenheim, Njemačka
- Natrijev karbonat, p.a., T.T.T. Sv. Nedelja, Hrvatska
- Galna kiselina, Acros organics, Geel, Belgija
- Metanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska

## 2.3. Korišteni uređaji

- Mlinac za kavu, 980 Moulinex, Francuska
- Digitalna vaga, Wagen Hanser electronic balance, Njemačka
- Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Inscale, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Tresilica, Analysette 3 Spartan, *Fritsch GmbH*, Idar-Oberstein, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj, RK 103 h, Bandelin, Sonorex, Berlin, Njemačka
- Centrifuga, Centric 322 A, Tehnica, Slovenija
- Miješalica, Vibromix 313 vortex mixer Tehnica, Slovenija
- Spektrofotometar, Perkin-Elmer UV-VIS spectrometar, Lambda EZ 201, SAD
- Rancimat, 743, *Metrohm USA, Inc*, Riverview, Florida, SAD

## 2.4. Predobrada biljnog materijala

Biljni materijal korišten u eksperimentalnom dijelu završnog rada je lišće lovora (lat. *Laurus nobilis* L.). Lovor je sušen na sobnoj temperaturi u tamnoj i prozračnoj prostoriji, a zatim homogeniziran pomoću električnog mlinca. Mljeveni biljni materijal je korištenjem tresilice i sita s različitim veličinom otvora razdvojen na četiri frakcije, 500  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  i 63  $\mu\text{m}$ . Frakcije koje su se u radu dalje koristile su 250  $\mu\text{m}$  i 125 $\mu\text{m}$ , dok se frakcija 500  $\mu\text{m}$  zbog izražene nehomogenosti materijala eliminirala iz istraživanja, a frakcija 63  $\mu\text{m}$  se eliminirala zbog nedovoljne količine biljnog materijala.



*Slika 6. Homogenizacija biljnog materijala*



*Slika 7. Tresilica*

## **2.5. Metode**

### **2.5.1. Priprava ekstrakta lovora**

Kao ekstrakcijsko otapalo kod priprave ekstrakata lišća lovora korištena je destilirana voda te biljni materijal frakcije veličina čestica 250  $\mu\text{m}$  i 125  $\mu\text{m}$ . Od svake frakcije, odvagano je po 1 g biljnog materijala u 2 epruvete i preliveno s 10 mL destilirane vode. Takva smjesa stavljena je u ultrazvučnu kupelj zagrijanu na 80°C. Po jedna epruveta od svake frakcije vađena je iz kupelji nakon 60 odnosno nakon 120 minuta. Uzorak je nakon vađenja iz kupelji ohlađen i centrifugiran (5 minuta pri brzini od 3000 okretaja/minuti). Dobiveno je 4 bistrih uzoraka koji su dalje korišteni u istraživanju oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja.



*Slika 8. Centrifuga*

### 2.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli u pripravljenim ekstraktima lovora određeni su metodom po Folin-Ciocalteu. To je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, pri čemu nastaje plavo obojenje. Intenzitet obojenja određuje se mjerenjem apsorbancije otopina pri 765 nm.<sup>33</sup>

#### **Reagensi:**

- *Folin-Ciocalteu reagens*: kupljeni, gotovi reagens.
- *Otopina natrijeva karbonata*;  $w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$ : otopi se 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 L proključale vode te se otopina nakon 24 sata filtrira.
- *Matična otopina standarda (galne kiseline)*,  $c(\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5) = 200 \text{ mg/L}$ : 100 mg galne kiseline se otopi u 50 mL destilirane vode.

### **Postupak određivanja:**

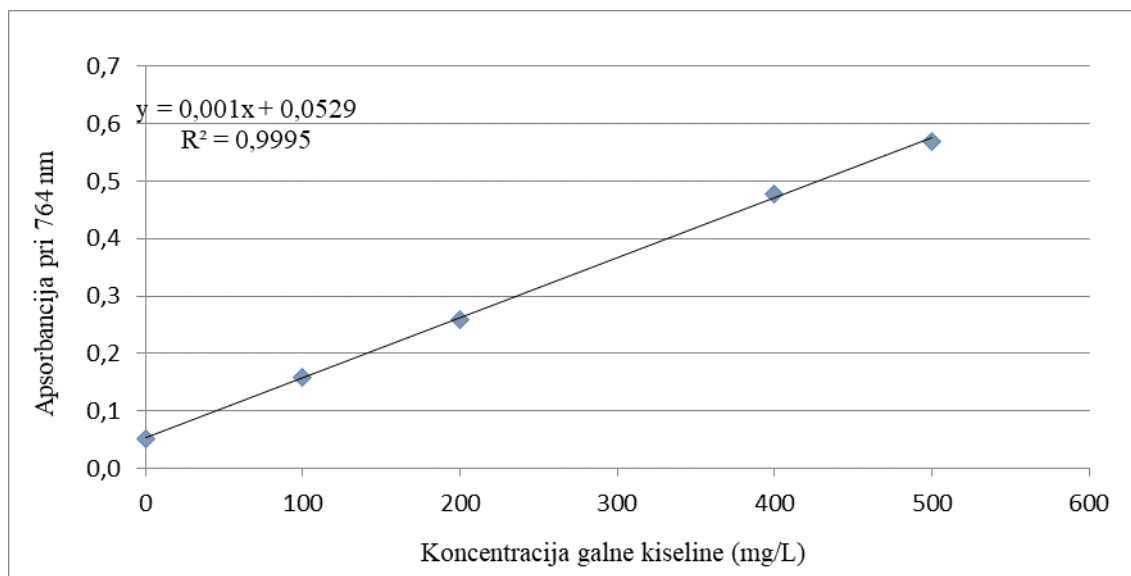
U kivetu se otpipetira 25  $\mu\text{L}$  prethodno razrijeđenog uzorka, doda se 1,975  $\mu\text{L}$  destilirane vode te 125  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se promiješa i nakon par minuta se doda 375  $\mu\text{L}$  otopine karbonata. Otopina se ostavi dva sata na sobnoj temperaturi u mraku nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 765 nm na spektrofotometru. Za svaki uzorak rađena su 4 mjerenja. Sadržaj fenolnih spojeva se računa preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta galne kiseline po 1 litri ekstrakta (mg GAE/L).

### **Izrada baždarnog pravca:**

Za izradu baždarnog pravca pripravljene su otopine galne kiseline koncentracija od 0-500 mg/L i testirane prema opisanom postupku. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije, izradi se baždarni pravac s vrijednostima koncentracija galne kiseline na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati.

*Tablica 1. Odnos koncentracije galne kiseline pri 765 nm korištene za izradu baždarnog pravca*

<b>Koncentracija galne kiseline (mg/L)</b>	<b>Abs srednja</b>	<b>SD</b>
0	0,052	0,003
100	0,159	0,004
200	0,259	0,004
400	0,478	0,006
500	0,570	0,004



*Slika 9. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola*

### 2.5.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja

Rancimat metoda služi za određivanje oksidacijske stabilnosti masti i ulja. Kod ove akcelerirane metode uzorak je izložen struji zraka i povišenoj temperaturi. Hlapljivi produkti oksidacije, nošeni strujom vrućeg zraka prelaze u posudu za mjerenje s destiliranom vodom u kojoj se apsorbiraju. Na temelju dobivenih podataka o porastu vodljivosti destilirane vode u vremenu automatski se izrađuje rancimat krivulja iz koje je vidljivo vrijeme oksidacijske stabilnosti uzorka odnosno tzv. indukcijski period.

#### **Postupak određivanja:**

U epruvete se izvaže po 3 g ribljeg ulja, a zatim se u 6 njih dodaju uzorci koji se testiraju, dok 2 epruvete ostaju napunjene samo uljem te služe kao slijepa proba. Epruvete su izložene protoku zraka od 20 L/h i temperaturi od 80°C.

U ovom radu istražena je prvo oksidacijska stabilnost ribljeg ulja u koje su dodane različite koncentracije (volumeni) pripremljenih ekstrakata lovora u svrhu određivanja utjecaja dodane koncentracije fenola na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja.



Testiran je dodatak 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 200  $\mu\text{L}$  ekstrakata pripremljenih opisanim postupkom u trajanju od 60 odnosno 120 minuta.

Osim ekstrakata ulju su dodane i različite odvage usitnjenog, homogeniziranog biljnog materijala različitih frakcija pripremljenih prema opisu u 2.4. *Predobrada biljnog materijala* i to 25 i 50 mg.

### **Izrada rancimat krivulje**

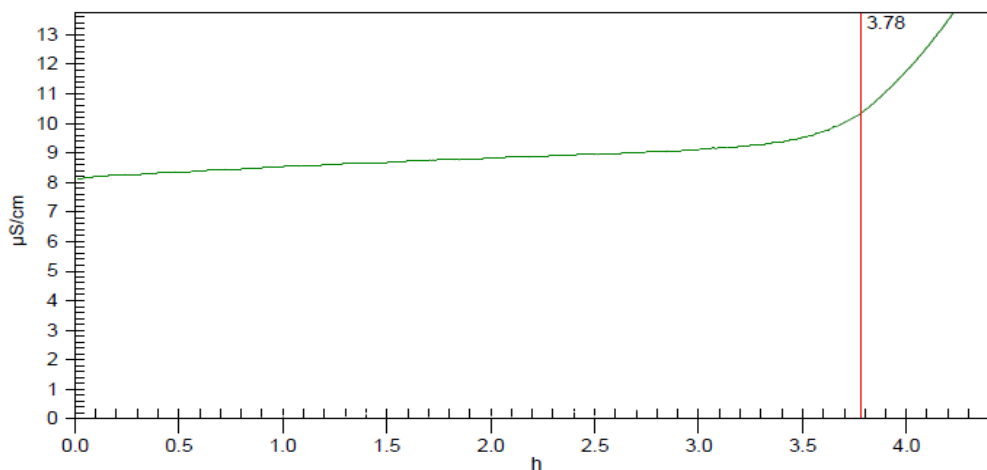
Rancimat krivulja se izrađuje za svaki uzorak. Za izradu krivulje oksidacije potrebni su podaci koji se kontinuirano prate u posudi za mjerenje punjenom destiliranom vodom. Točka infleksije određuje induksijsko vrijeme i mjera je oksidacijske stabilnosti uzorka odnosno pokazuje koliko se vrijeme oksidacijske stabilnosti ulja u koje je dodan uzorak produjilo/skratilo u odnosu na vrijeme stabilnosti slijepe probe (čistog ulja). Primjer oksidacijske krivulje prikazan je na slici 10.

Unit	1	Serial number	08146	Printing date	24.02.2017 10:48:01
Block	A	Cell constant	1	Determination date	24.02.2017 6:34:02
Channel	2	User	Rutinski		

ID 1

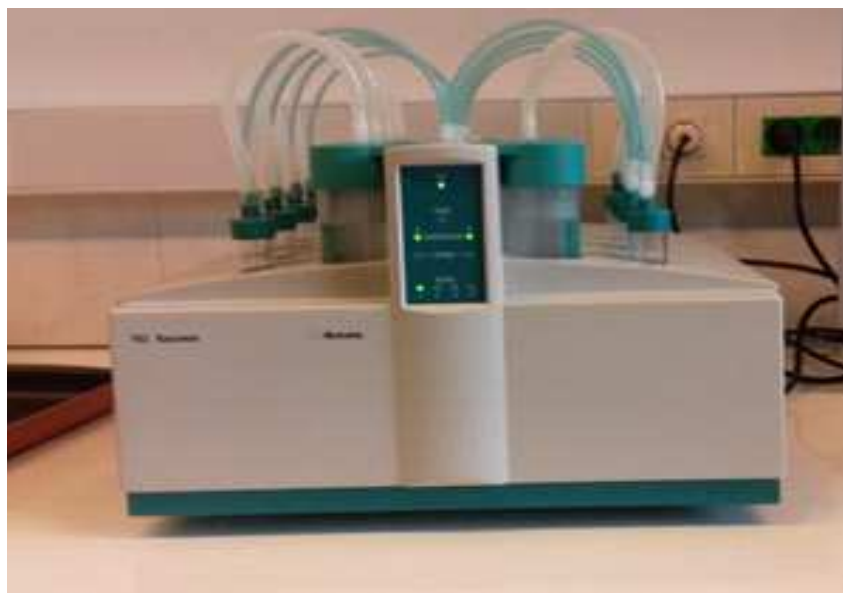
ID 2

Induction time 3.78 h



Method name	IGM_80C	Creation date	23.02.2017 8:30:27
Creator	Rutinski		
Temperature	80 °C	Stop time	0.00 h
Delta T	1.60 °C	Stop at conductivity	0 µS/cm
Gas flow	20 L/h	Stop at endpoint	<input checked="" type="checkbox"/>

*Slika 10. Prikaz dobivene oksidacijske/rancimat krivulje za riblje ulje*



*Slika 11. Rancimat uređaj*

Osim određivanja vremena indukcije odnosno oksidacijske stabilnosti ulja u rezultatima je prikazan i tzv. oksidacijski indeks stabilnosti (OSI) koji je računat prema sljedećem izrazu:

$$\text{OSI} = \text{vrijeme indukcije ulja s uzorkom} / \text{vrijeme indukcije čistog ulja}$$

#### 2.5.4. Ekstrakcija polarnih komponenti iz ulja

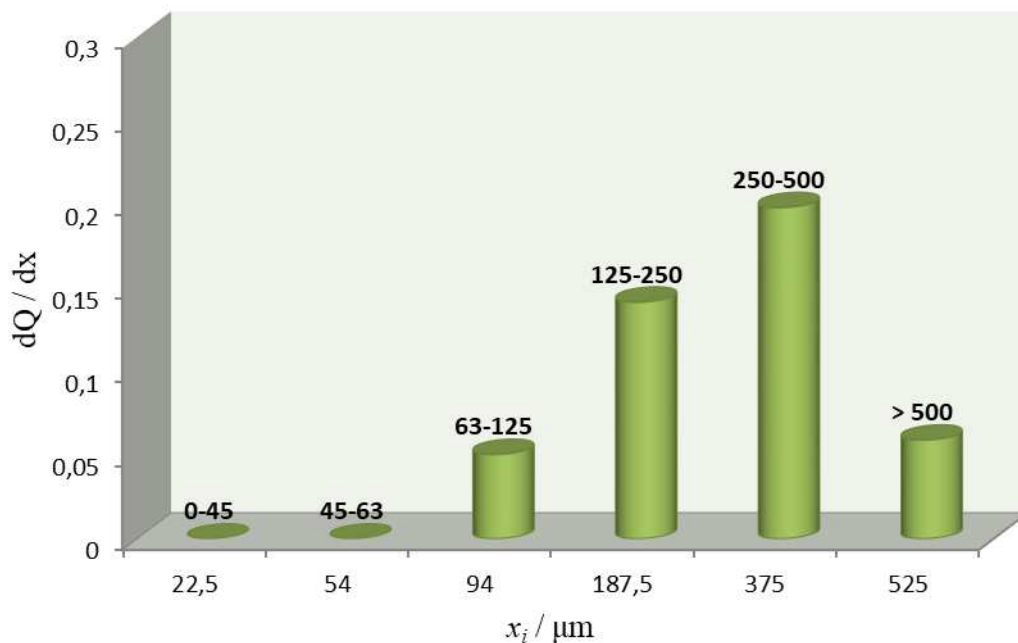
##### Postupak određivanja:

Za ovaj postupak korišteno je 2 g ulja odvagano u epruvetu. Uzorku ulja je dodano 1 mL *n*-heksana i 2 mL smjese metanol/voda (v/v 60/40). Smjesa se promiješa na vorteks miješalici u trajanju od 2 minute pri 2000 okretaja/minuti, a nakon toga centrifugira 3 minute pri 3000 okretaja/minuti. Nakon centrifugiranja od smjese se odvoji donji sloj (metanolni) u drugu epruvetu i ponovi postupak ekstrakcije iz gornjeg sloja (heksanskog) ponovnim dodatkom 2 mL otopine metanola. Poslije ponovljenog postupka se ponovno odvoji donji metanolni sloj i združi s prethodnim. Metanolni ekstrakt se još jednom ekstrahira dodatkom 2 mL *n*-heksana. Smjesa se ponovno vorteksira i centrifugira. Gornji heksanski sloj se ponovno odvoji te se ekstrakcija ponavlja dodatkom novih 2 mL *n*-heksana. Nakon što se odvojio, gornji sloj heksana se odbaci, a metanolni ekstrakt se prebaci u tikvicu za uparivanje uz ispiranje metanolom i upari do suha na rotacionom vakuum uparivaču pri 60°C. Upareni uzorak se otopi u 2 mL metanola te se u njemu odredio udio ukupnih fenolnih spojeva prema postupku opisanom u 2.5.2. *Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.*

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Predobrada biljnog materijala

Biljni materijal korišten za istraživanje u ovom završnom radu bio je lovor, odnosno pažljivo osušeni listovi lovora koji su homogenizirani korištenjem mlinca tijekom par minuta. Kako je dobiveni materijal bio dosta heterogen, isti je prosijan korištenjem tresilice sa sitima različite veličine otvora (500, 250, 125, 63 i 45  $\mu\text{m}$ ). Na situ s najvećim otvorima (frakcije 500  $\mu\text{m}$ ) zadržalo se 13,2 g usitnjenog biljnog materijala, na situ 250  $\mu\text{m}$  22,1 g, na situ 125  $\mu\text{m}$  7,9 g dok je na situ veličine otvora 63  $\mu\text{m}$  bilo 1,4 g biljnog materijala. Na slici 12 je prikazana raspodjela veličine čestica usitnjenog lovora nakon prosijavanja. Uočava se kako se radi o vrlo heterogenom materijalu koji se sastoji najviše od čestica između 125 i 500  $\mu\text{m}$ . Prosijavanje je također pokazalo kako se u uzorku nalazi i nešto čestica veličine između 63 i 125  $\mu\text{m}$ , kao i da ima čestica  $> 500$   $\mu\text{m}$ , što vjerojatno ovisi o vremenu usitnjavanja osušenih listova lovora u mlincu. Za daljnje istraživanje odabrane su frakcije 125 i 250 dok su ostale odbačene ili zbog izražene nehomogenosti veličine čestica ili pak zbog nedovoljne mase uzorka koja se zadržala na korištenom situ.



*Slika 12. Raspodjela veličine čestica lovora nakon prosijavanja.*

### 3.2. Pripreve ekstrakata i određivanje ukupnih fenola

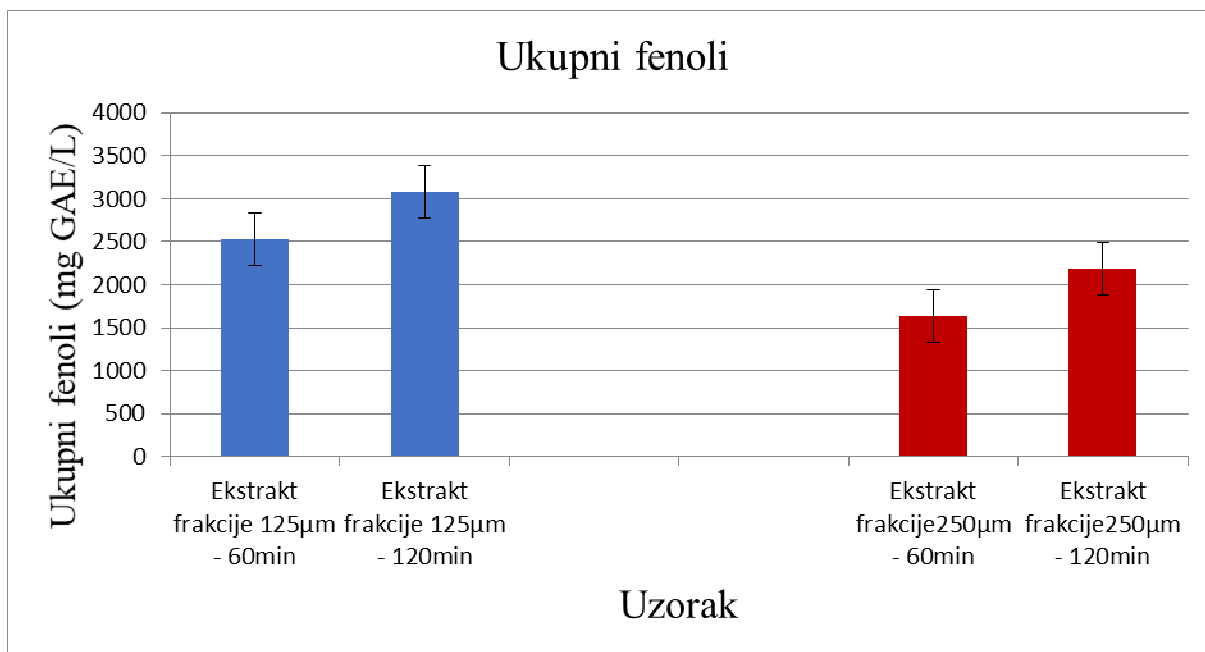
Nakon što su odabrane frakcije usitnjenog biljnog materijala koje će se koristiti u daljnjem istraživanju, iste su podvrgnute postupku ekstrakcije. Od uzoraka se odvaže po 1 g biljnog materijala u 2 epruvete s destiliranom vodom te stavi u ultrazvučnu kupelj tijekom 60, odnosno 120 minuta. U bistrim filtratima dobivenim nakon centrifugiranja uzorka po završetku ekstrakcije se odredi sadržaj ukupnih fenola.

Sadržaj ukupnih fenola koji je određen spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu prikazan je u tablici 2 te grafički na slici 13.

Kod ekstrakata frakcije 125 $\mu$ m vidljivo je da što su se duže uzorci držali u ultrazvučnoj kupelji to je više ukupnih fenola, što je i očekivano jer su čestice ove frakcije sitnije i više homogene, kod ekstrakata frakcije 250 $\mu$ m je isti slučaj no ipak je puno manje fenola nego kod frakcije 125 $\mu$ m

**Tablica 2.** Udio ukupnih fenola u ekstraktima pripravljenim od različitih frakcija u trajanju od 60 i 120 minuta.

Veličina čestica biljnog materijala ( $\mu$ m)	Trajanje ekstrakcije (min)	Ukupni fenoli (mg GAE/L)
125	60	2526 $\pm$ 78
	120	3086 $\pm$ 64
250	60	1631 $\pm$ 28
	120	2181 $\pm$ 0



*Slika 13. Grafički prikaz sadržaja ukupnih fenola u biljnom materijalu nakon ekstrakcije tijekom 60 i 120 minuta.*

### **3.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja uz dodatak biljnog materijala i ekstrakata lovora**

U prehrambenoj se industriji učestalo kao konzervansi rabe biljke, odnosno različiti začini. U ovom završnom radu se ispitala učinkovitost dodatka lovora na produljenje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja korištenjem rancimat metode. Iako je velik broj istraživanja usmjeren na ispitivanja dodatka različitih biljnih ekstrakata u hranu u svrhu konzerviranja, u nekim proizvodima se uglavnom dodaje samo usitnjeni biljni materijal. Takvo dodavanje za glavnu svrhu ima uglavnom aromatiziranje namirnice i pozitivan utjecaj na njen izgled, ali isto tako se smatra da pojedini sastojci iz dodanog bilja migriraju u samu namirnicu i na taj način također djeluju kao konzervansi. U ovom radu je stoga istraživao utjecaj dodatka biljnih ekstrakata u riblje ulje, ali i direktno dodavanje usitnjene biljke kao začina. U oba slučaja testirane su različite količine dodanih tvari, volumena kod ekstrakata i mase kod biljnog materijala kao i utjecaj veličine čestica biljke na sastav ekstrakata ili direktno na oksidacijsku stabilnost ulja.

Rezultati oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja u koje je dodan biljni materijal prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Utjecaj dodatka različitih frakcija biljnog materijala u količini od 25 i 50 mg na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja

Dodana količina biljnog materijala (mg)		Vrijeme inhibicije (h)	Oksidacijski indeks stabilnosti
Čisto riblje ulje (slijepa proba)		3,75	1
Frakcija 125	25	3,88	1,034
	50	3,95	1,053
Frakcija 250	25	4,14	1,104
	50	4,23	1,128

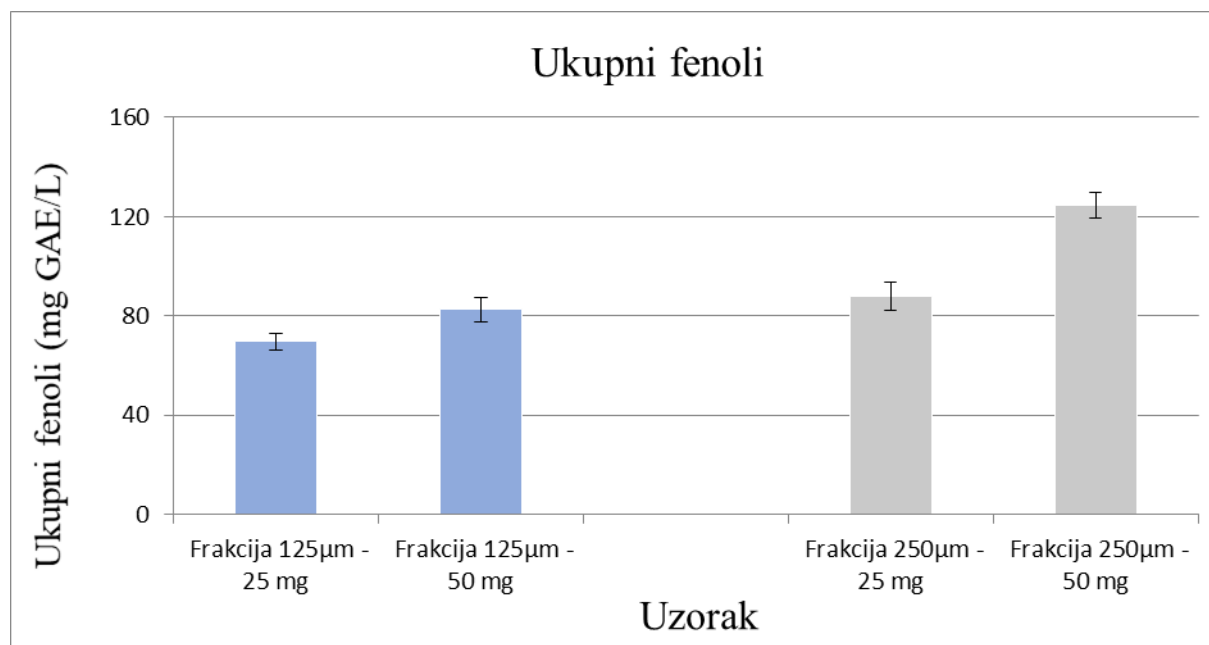
Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je u svim slučajevima kada je u ulje dodan biljni materijal, bilo frakcije veličine čestica 125 $\mu$ m ili 250 $\mu$ m, mase 25 mg ili 50 mg, postignuto produljeno vrijeme stabilnosti ulja. Kao kontrola je korišteno riblje ulje u koje ništa nije dodano i njegovo vrijeme inhibicije je bilo 3,75 h. Također, očekivano je i bilo da će uzorci kod kojih je dodana veća masa biljnog materijala (50 mg) imati dulje vrijeme inhibicije jer je kod ovih uzoraka veća ekstrakcija antioksidansa u okolni medij, odnosno riblje ulje. Dobiveni rezultati idu u prilog i toj pretpostavci. Usporedbom rezultata dobivenih za različite frakcija uočava se da je frakcija 250 $\mu$ m rezultirala sa dužim inhibicijskim vremenima u slučaju dodatka 25 mg i 50 mg. Najbolju aktivnost odnosno najdulje vrijeme stabilnosti pokazalo je ulje u koje je dodano 50 mg biljnog materijala frakcije 250  $\mu$ m (vrijeme inhibicije 4,23 h, OSI 3).

Kako bi se potvrdilo slaganje dobivenih rezultata, iz ribljih ulja se nakon završenog mjerenja na uređaju Rancimat (iz oksidiranih ulja) ekstrahirala polarna frakcija koja bi trebala sadržavati fenole koji su tokom mjerenja prešli iz biljnog materijala u ulje. Sadržaj fenola u metanolnom ekstraktu određen je prema proceduri određivanja fenola Folin-Ciocalteu metodom, a rezultati su prikazani u tablici 4 i na slici 14.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je slaganje udjela fenola s vremenom inhibicije oksidacije ulja te je najviše fenola sadržavao uzorak kojem je dodano 50 mg lovora frakcije 250  $\mu\text{m}$ .

**Tablica 4.** Udio ukupnih fenola u uljima nakon testiranja oksidacijske stabilnosti ulja u koje je dodan biljni materijal

Dodana količina biljnog materijala (mg)		Ukupni fenoli u ulju (mg GAE/L)
Frakcija 125	25	70 $\pm$ 4
	50	83 $\pm$ 5
Frakcija 250	25	88 $\pm$ 6
	50	125 $\pm$ 5



**Slika 14.** Grafički prikaz ukupnih fenola u uljima nakon testiranja oksidacijske stabilnosti ulja u koje je dodan biljni materijal rancimat metodom

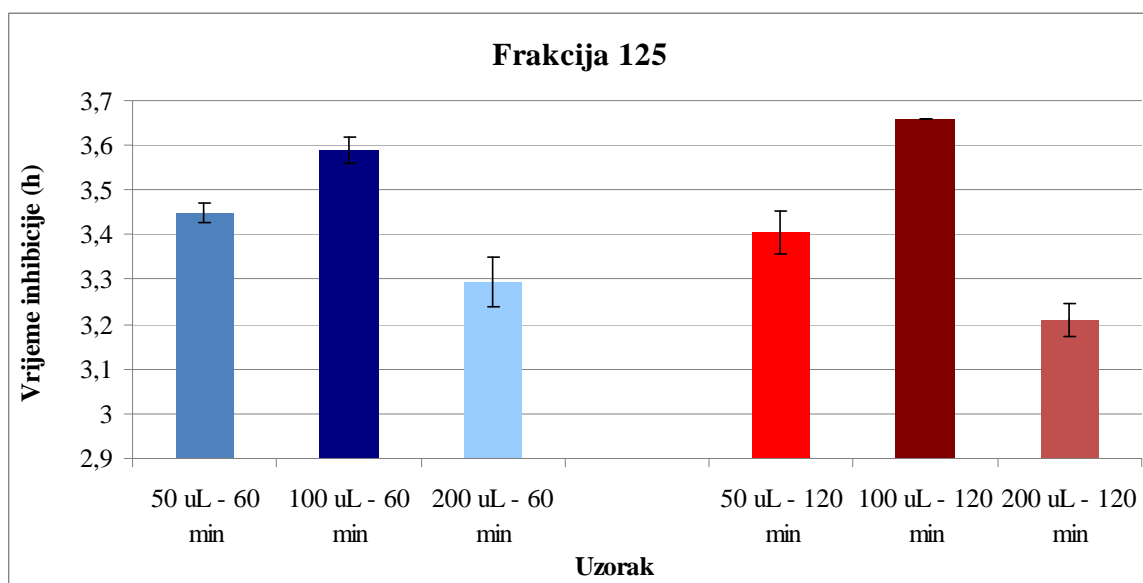


U drugom dijelu istraživanja ispitivan je utjecaj dodatka ekstrakata lovora na oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja. Vodeni ekstrakti su pripremljeni uz primjenu ultrazvuka u svrhu što iscrpnije ekstrakcije fenola iz biljnog materijala. Trajanje ekstrakcije je bilo 60 odnosno 120 minuta, a pripremljeni su ekstrakti od frakcija biljnog materijala 125 i 250. U ulje su dodane različite količine (volumeni) ekstrakata i to 50, 100 i 200  $\mu\text{L}$  kako bi se ispitala učinkovitost ekstrakata u stabilizaciji ulja ovisno o koncentraciji dodanih fenolnih spojeva. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na u tablici 5, te na slikama 15 i 16.

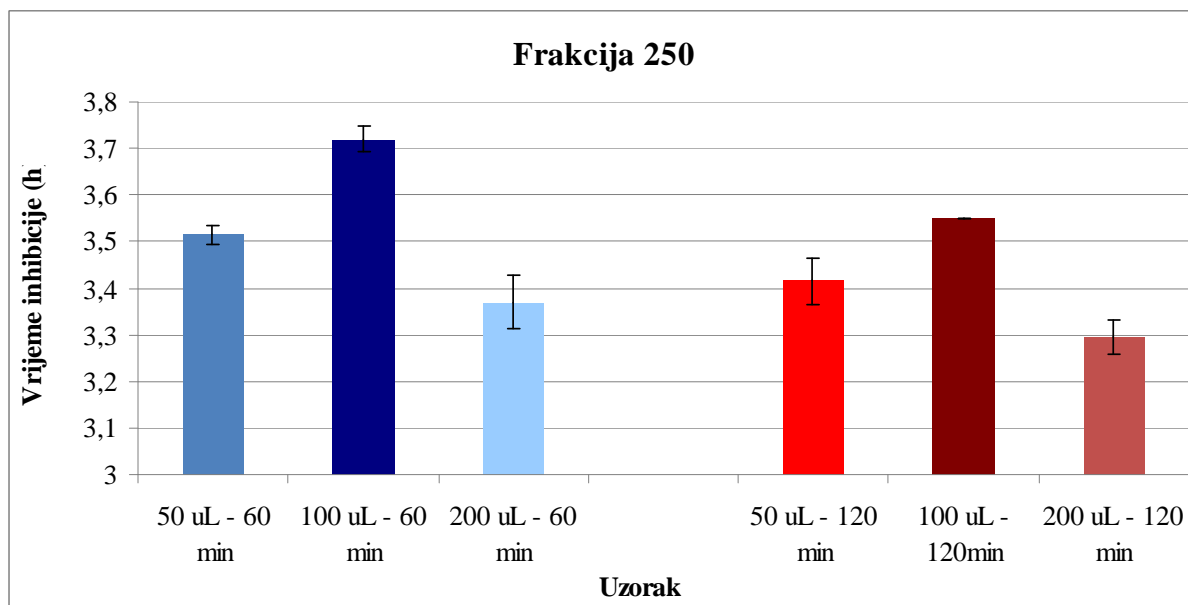
Kao što je vidljivo iz prikazanih rezultata, dodatkom 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta frakcije 125 učinkovitiji je bio ekstrakt pripremljen tijekom ekstrakcije u trajanju od 120 minuta, kod frakcije 250 nije bilo razlike među dobivenim rezultatima dok je kod svih ostalih uzoraka kraće vrijeme inhibicije dobiveno za ulja u koja su dodani ekstrakti pripremljeni postupkom ekstrakcije tijekom 120 minuta. Ono što se iz prikazanih rezultata također može vidjeti je da se najboljim kod uzoraka frakcije 125 i 250 pokazao dodatak ekstrakta u volumenu od 100  $\mu\text{L}$ , dok su najlošiji rezultati dobiveni testiranjem dodatka ekstrakta volumena 200  $\mu\text{L}$ . Prema tome se može zaključiti da dodatak veće koncentracije fenola uzrokuje obrnuti efekt odnosno prooksidacijsku aktivnost.

*Tablica 5. Rezultati određivanja oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja nakon dodatka ekstrakta lovora*

Dodani volumen ( $\mu\text{L}$ )		Trajanje ekstrakcije (min)	Vrijeme inhibicije (h)
Ekstrakt frakcije 125	50	60	3,45
		120	3,66
	100	60	3,69
		120	3,66
	200	60	3,29
		120	3,21
Ekstrakt frakcije 250	50	60	3,51
		120	3,51
	100	60	3,72
		120	3,55
	200	60	3,37
		120	3,29



*Slika 15. Usporedni prikaz oksidacijske stabilnosti ulja dodatkom različitih volumena ekstrakta pripremljenih od frakcije 125  $\mu$ m*



*Slika 16. Usporedni prikaz oksidacije stabilnosti ulja dodatkom različitih volumena ekstrakta pripremljenih od frakcije 250  $\mu$ m*

#### 4. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci koji su izvedeni iz rezultata dobivenih u ovom radu su:

- Dodatkom usitnjenog biljnog materijala u riblje ulje, bilo frakcije veličine čestica 125  $\mu\text{m}$  ili 250  $\mu\text{m}$ , mase 25 mg ili 50 mg, postiže se produljeno vrijeme oksidacijske stabilnosti ulja.
- Uzorci kod kojih je dodana veća masa biljnog materijala imaju dulje vrijeme inhibicije jer dolazi do veće ekstrakcije antioksidansa u okolni medij, odnosno ulje.
- U slučaju dodavanja biljnog materijala najdulje vrijeme stabilnosti pokazalo je ulje u koje je dodano 50 mg biljnog materijala frakcije 250  $\mu\text{m}$  te je u tom ulju bio i najveći sadržaj fenola.
- Dodatkom 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta frakcije 125  $\mu\text{m}$  učinkovitiji je bio ekstrakt pripremljen ekstrakcijom tijekom 120 minuta, kod frakcije 250  $\mu\text{m}$  nije bilo razlike među dobivenim rezultatima dok je kod svih ostalih uzoraka kraće vrijeme inhibicije dobiveno za ulja u koja su dodani ekstrakti pripremljeni postupkom ekstrakcije tijekom 120 minuta.
- Najboljim kod ekstrakata obiju frakcija se pokazao dodatak 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Od ekstrakata pripremljenih od frakcije 125  $\mu\text{m}$  najbolji je bio onaj pripremljen tijekom 60 minuta, dok je od ekstrakata frakcije 250  $\mu\text{m}$  bio najbolji onaj pripremljen tijekom 120 minuta.
- Dodatak od 200  $\mu\text{L}$  ekstrakta uzrokovao je ubranu oksidaciju ulja.

## 5. LITERATURA

1. <https://matrixworldhr.com/2013/11/16/zdravstvene-prednosti-ribljeg-ulja/>; Pristupljeno 25.6.2017.
2. <http://www.vitamini.hr/4329.aspx>
3. Krajčinović M. (1951): „Tehnologija masti i masnih ulja“, Tehnička knjiga, Zagreb
4. <http://definicijahrane.hr/definicija/hrana/masti-i-ulja/>; Pristupljeno 25.6.2017.
5. Rade D.: „Osnove tehnologije ulja i masti“
6. Matek Sarić M.: „Masti/lipidi“, Odjel za zdravstvene studije sveučilišta u Zadru
7. Jašić M. (2009): „Lipidi“, Tehnološki fakultet Tuzla
8. Milatović Lj. (1962): „Masti i ulja, poznavanje životnih namirnica“ Sveučilište u Zagrebu
9. Katalinić V. (2011): „Temeljno znanje o prehrani“, Sveučilišni priručnik
10. Rade D., Lelas V. (2008): „Procesi pripreme hrane“, Golden marketing-Tehnička knjiga
11. <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/lipidi> ; Pristupljeno: 25.6.2017.
12. Dušica I. (2008): „Masne kiseline“, Tehnologija hrane
13. Krajčinović M. (1950): „Analiza masti i ulja i srodnih produkata organske kemijske industrije“, Sveučilišna litografija, Zagreb
14. [http://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=nezasi%C4%87ena+masna+kiselina](http://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=nezasi%C4%87ena+masna+kiselina;); Pristupljeno 25.6.2017.
15. Maqsood S., Benjakul S. (2010): „Food Chemistry“ 119, 123-132,
16. Dujmušić I. (2013): „Zdravstvene prednosti ribljeg ulja“, Matrix World
17. Invited commentary, Journal of nutritional science
18. Šimat V., Maršić-Lučić J., Bogdanović T., Dokoza M. (2009) „Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima“ Stručni rad

19. Godwinand A., Prabhu R. (2006): Indian Journal of Clinical Biochemistry, 21 (1) 202-204
20. Hulina N. (2011): „Više biljke stablašice“, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb
21. Domac R. (2002): „Flora Hrvatske“, Školska knjiga, Zagreb
22. Šugar I., Gosti I. Hazler Pilepić K. (2002): „Hrvatsko biljno nazivlje“, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb
23. Kovačić S., Nikolić T., Rušić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jaspica N., Bogdanović S., Topić J. (2008): „Flora Jadranske obale i otoka“, Školska knjiga, Zagreb
24. Fox L. (1982): „Enciklopedija vrtnog bilja“, Globus Zagreb
25. Biggs M., McVicar J., Flowerdew B. (2005): „Enciklopedija voća, povrća i začinskog bilja“, Naklada Uliks, Rijeka
26. Mekinić Generalić I. (2017.): Maslina
27. Reader's Digest (2006): „Prirodni lijekovi – vodič kroz ljekovito bilje i njegovu primjenu“ Mozaik knjiga, Zagreb
28. <https://www.agroklub.com/soartna-lista/ljekovito-bilje/lovor-361/> ; Pristupljeno 25.6.2017.
29. <http://www.naturheilung.com/hr/?site=pflanze&pflanzeid=303&catid=303&highlight=> Pristupljeno 25.6.2017.
30. Farhoosh R. (2007): „Shelf-life prediction of edible fats and oils using Rancimat“
31. Rancimat 743 Metrohm. Ion analysis, Metrohm AG, CH-9101 Herisau, Switzerland. Manual. 8.743.8003EN, 03.2009 jb/ars
32. <https://www.environmental-expert.com/products/metrohm-rancimat-model-743-oxidative-stability-analysis-of-natural-fats-and-oils-220582> ; Pristupljeno 25.6.2017.
33. Amerine M.A., Ough C.S. (1980). "Methods for Analysis of Musts and Wines", *Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons Inc., New York*, 181-194.

