

Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

MIHAELA SEVEREC

7702/PT

FIZIKALNE I KEMIJSKE METODE U PRAĆENJU OKSIDACIJE MASLINOVOG ULJA
ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina“ HRZZ, 2020.-2024.

Mentor: Doc. dr. sc. *Marko Obranović*

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Fizikalne i kemijske metode u praćenju oksidacije maslinovog ulja

Mihaela Severec, 0058213527

Sažetak: Maslinovo ulje prepoznato je zbog svojih jedinstvenih senzorskih karakteristika te brojnih istraživanjima koje ga povezuju s pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Iako je zbog svog sastava relativno stabilno i manje podložno oksidaciji, ipak je jedna od najčešćih uzroka kvarenja tijekom prerade i skladištenja. Svrha ovog istraživanja je usporediti parametre oksidacije svježeg ekstra djevičanskog i termooksidiranog maslinovog ulja kroz određene vremenske intervale s mjerenjima dobivenim putem diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. U ovom radu uzorcima koji su bili podložni termooksidaciji u različitim vremenskim intervalima određivao se peroksidni broj, K – brojevi te je uzorak podvrgnut diferencijalnoj motridbenoj kalorimetriji. Peroksidni brojevi kreću se od 4,74 za svježeg, pa sve do 12,19 za maslinovo ulje koje je najduže bilo izloženo termooksidaciji. K_{232} , K_{270} i ΔK vrijednosti također su najviše za uzorak koji je najduže bio izložen povišenoj temperaturi. Diferencijalno skenirajuća motridbena krivulja hlađenja pokazuje glavni egzotermni pik oko $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ koja predstavlja temperaturu kristalizacije triglicerida.

Ključne riječi: maslinovo ulje, oksidacija, DSC

Rad sadrži: 22 stranice, 2 slike, 5 tablica, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Marko Obranović

Pomoć pri izradi: Melisa Trputec, tehnički suradnik

Datum obrane: rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology**

Monitoring of oxidative stability of olive oils using physical and chemical methods

Mihaela Severec, 0058213527

Abstract: Olive oil is recognized for its unique sensory characteristics and numerous studies that link it to improving human health. Although due to its composition it is relatively stable and less susceptible to oxidation, it is still one of the most common causes of spoilage during processing and storage. The purpose of this study is to compare the oxidation parameters of fresh and thermooxidized extra virgin olive oil over certain time intervals with measurements obtained by differential scanning calorimetry. In this paper, samples that were subject to thermal oxidation in different time periods is determined peroxide and K – numbers. Samples were also subjected to differential scanning calorimetry. Peroxide numbers range from 4.74 for thermally untreated, to 12.19 for olive oil which has been subject to thermal oxidation for the longest time. K_{232} , K_{270} and ΔK values are also the highest for the sample that has been exposed to elevated temperature for the longest time. The DSC cooling curve shows the main exothermic peak at approximately - 50 °C which represents the crystallization temperature of the triglycerides.

Keywords: olive oil, oxidation, DSC

Thesis contains: : 22 pages, 2 figures, 5 tables, 25 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in: the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Marko Obranović, Assistant Professor

Technical support and assistance: Melisa Trputec, technical associate

Defence date: September 2021

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje.....	2
2.1.1. Sastav ekstra djevičanskog maslinovog ulja.....	2
2.1.2. Oksidacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja	4
2.1.2.1. Primarni i sekundarni produkti oksidacije.....	4
2.1.2.2. Termooksidacija	5
2.1.2.3. Fotooksidacija	5
2.2. Diferencijalna motridbena kalorimetrija	6
2.2.1. Princip rada diferencijalno skenirajuće kalorimetrije	6
2.2.2. DSC u analitici ulja.....	7
2.2.3. Primjena DSC-a kod oksidacijskih kvarenja ulja	8
2.3. Fizikalno – kemijski parametri oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja	10
2.3.1. Peroksidni broj	10
2.3.2. K – brojevi	11
2.3.3. Kiselinski broj	12
3. Eksperimentalni dio	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Uređaji.....	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Uzorak	13
3.2. Metode	13
3.2.1. Određivanje peroksidnog broja	14
3.2.2. Određivanje K – brojeva	14
3.2.3. Diferencijalna motridbena kalorimetrija – karakteristike topljenja ulja	15
4. Rezultati i rasprava.....	16
4.1. Određivanje peroksidnih brojeva	16
4.2. Određivanje K- brojeva	17
4.3. Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DSC)	18
5. Zaključak	19
6. Literatura.....	20

1.Uvod

Ekstra djevičansko maslinovo ulje, iako se najviše konzumira i proizvodi u zemljama Mediterana, danas je svjetski prepoznato najviše zbog svojih jedinstvenih senzorskih karakteristika i povezivanja s brojnim pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka. Sadrži visoke udjele mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (najviše oleinska) kao i brojne druge poželjne molekule poput fenola, tokoferola i karotenoida koje osim na organizam imaju pozitivan učinak i u samozaštiti ulja od peroksidacije. Budući da sadrži uglavnom oleinsku kiselinu koja je jednostruko zasićena možemo reći da je maslinovo ulje relativno stabilno i manje podložno oksidaciji. Bazirano na Delegiranoj uredbi Komisije (EU) 2016/2095, kao i na Međunarodnom vijeću za maslinu (IOC), ulje ekstrahirano iz maslina mehaničkim metodama mora ispunjavati brojne indikatore kvalitete kako bi se klasificiralo kao ekstra djevičansko (Conte i sur., 2020).

Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC) termoanalitička je metoda koja prati fizikalne i kemijske promjene u sastavu materijala. Široko je primjenjiva te se pokazala kao vjerodostojna metoda pri mjerenju promjena u sastavu triglicerida kao posljedica dovođenja i odvođenja topline stoga je vrlo korisna u određivanju termodinamičkih parametara ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Mjeri promjene entalpije (koje nastaju zbog vezanja ili oslobađanja topline) kao funkcija temperature. Endotermni i egzotermni pikovi nastali na DSC krivulji pripisuju se izmjeni sastava samog uzorka zbog tretiranja unutar širokog raspona temperatura te ovise o oksidacijskom stanju samog ulja (Kanavouras i Selke, 2004).

Svrha ovog istraživanja je usporediti parametre oksidacije svježeg ekstra djevičanskog i kvarenog maslinovog ulja kroz određene vremenske intervale s mjerenjima dobivenim putem diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.

2. Teorijski dio

2.1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje

Ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiva se mehaničkim ili drugim fizičkim procesima u specifičnim toplinskim uvjetima koji ne uzrokuju promjene u samom ulju i nisu pretrpjeli nikakav tretman osim pranja, dekantiranja, centrifugiranja ili filtriranja (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Vrlo je cijenjeno kako u zemljama Mediterana, tako i u zemljama širom svijeta. Konzumacija ovog ulja povezana je sa smanjenjem napredovanja brojnih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. To se uglavnom povezuje sa samim sastavom ekstra djevičanskog maslinovog ulja koje uglavnom čine mono i polinezasićene masne kiseline, oleinska kiselina u najvećem postotku, kao i drugi bioaktivni spojevi (Rodríguez-López i sur., 2020).

Podrijetlo maslina veže se uz zemlje Mediterana i regijama s blagim zimama te vrućim i suhim ljetima iako se danas sama proizvodnja proširila na područja svih kontinenata. Međutim, mediteranske zemlje i dalje vode u samoj proizvodnji maslina i maslinovog ulja predvođene Španjolskom, Italijom i Grčkom. Posljedično, danas je Europska unija odgovorna za 70% globalne proizvodnje maslina. Ekstra djevičansko maslinovo ulje zlatne je boje te se dobiva isključivo mehaničkim postupcima, njegova kiselost ne smije prelaziti 0,8%, mora sadržavati voćnu notu te ne smije pokazivati defekte u boji, okusu i mirisu. Kako bi zadržalo svoja svojstva, ekstra djevičansko maslinovo ulje podvrgava se analizama kako tijekom same proizvodnje, tako i tijekom skladištenja. Tijekom skladištenja potrebno je kontrolirati različite čimbenike poput izlaganja svjetlosti, temperaturi, prisutnosti kisika i odabranog materijala za pakiranje kako bi se očuvala njegova kvaliteta i produžio vijek trajanja do same potrošnje (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

2.1.1. Sastav ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Sastav ekstra djevičanskog maslinovog ulja posljedica je različitih faktora poput genotipa, vanjskih uvjeta, dozrijevanja, vremena žetve, poljoprivrednih čimbenika (navodnjavanje, sunčeva svjetlost), tehnoloških čimbenika poput metode korištene za ekstrakciju ulja i samog skladištenja. Stoga se može reći da nijedno maslinovo ulje pa tako i ekstra djevičansko nema u potpunosti identičan sastav (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Kemijski sastav ekstra djevičanskog maslinovog ulja čine dvije glavne komponente: sapunjivi i neosapunjivi spojevi. Prvu skupinu čine triacilgliceroli, djelomični gliceridi, esteri masnih kiselina ili slobodne masne kiseline te fosfatidi. Oni predstavljaju gotovo 98% kemijskog sastava ulja. Drugih 2% čine manje komponente poput ugljikovodika, fitosterola (β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol), tokoferola, karotenoida, pigmenata (klorofili), alifalnih i triterpenskih alkohola, triterpenske kiseline (oleanolna kiselina) i hlapljivih spojeva. Što se masnih kiselina tiče u maslinovom ulju prisutna je oleinska (C18:1), palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3). U tragovima nalaze se miristinska (C14: 0), heptadekanska i eikozanova kiselina (Serreli i Deiana, 2018). U najvećem postotku nalaze se mononezasićene masne kiseline (u najvećem postotku oleinska) od 65 do 80% dok ostatak čine polinezasićene masne kiseline i ostali lipidi. Što se tokoferola tiče, u ekstra djevičanskom maslinovom ulju mogu biti prisutne 3 izoforme: α -, β - i γ -tokoferol. α -Tokoferol može biti prisutan i u slobodnom obliku te se nalazi u najvećem postotku dok se β - i γ -tokoferoli nalaze u manjim količinama. Koncentracija ukupnih tokoferola smanjuje se dozrijevanjem masline, a rafinacija i hidrogenacija uzrokuje njihovu razgradnju stoga ih nalazimo samo u djevičanskom i ekstra djevičanskom maslinovom ulju. Od ugljikovodika najprisutniji su skvalen i β -karoten, dok se u tragovima nalaze triterpen i diterpen, izoprenoidni poliolefini i n-parafini. Za karakterističnu boju ulja odgovorni su karotenoidni i klorofilni pigmenti. Obojenost ekstra djevičanskog maslinovog ulja zelenija je ako su prisutne zelene masline koje imaju veći udio klorofila, dok se uporabom zrelih maslina s većim udjelom karotenoida u proizvodnji dobiva više žućkasto ulje. Možemo reći da je konačna boja rezultat omjera ovih pigmenata. Općenito, u ekstra djevičanskom maslinovom ulju prisutna je velika raznolikost klorofila i karotenoida, od β -karotena, violaksantina, neoksantina, luteina i drugih ksantofila do klorofila a i b, feofitin a i b i drugih manjih derivata (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Polifenoli imaju ključnu ulogu u blagotvornim učincima na zdravlje koje se pripisuje ekstra djevičanskom maslinovom ulju. Pokazalo se da posjeduju antimikrobna, antikancerogena, antioksidativna i protuupalna svojstva. Također, fenolni spojevi doprinose senzorskim svojstvima ulja dajući im gorak, snažan voćni okus. Ekstra djevičansko maslinovo ulje s visokim razinama fenola pokazuje visoku stabilnost zbog svog antioksidativnog kapaciteta koji sprječava njihovu autooksidaciju i pridonosi dužem vijeku trajanja. Identificirano je više od 30 fenolnih spojeva, a njihova raznolikost u strukturama i koncentracijama prisutnih u različitim uljima ovisi o sorti, regiji u kojoj se maslina uzgaja, poljoprivrednim tehnikama, zrelosti ploda masline u berbi i samoj preradi. Polifenoli prisutni u najvećim koncentracijama su: sekoiridoidi, feniletanoidi, fenolne kiseline, flavonoidi, hidroksi-izokromani i lignani (Serreli i Deiana, 2018).

2.1.2 Oksidacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Oksidacija i hidroliza najčešći su uzroci kvarenja ulja tijekom prerade i skladištenja. Toplina, svjetlost i izloženost kisiku ubrzavaju proces oksidacije stoga je vrlo bitno pravilno tretiranje sirovine od branja do konačnog proizvoda, kao i njegovo skladištenje.

2.1.2.1. Primarni i sekundarni produkti oksidacije

Autooksidacijsko kvarenje ulja (užeglost) nastaje uslijed vezanja kisika iz zraka na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina. Posljedično, što je veći broj dvostrukih veza proces autooksidacije se brže odvija.

U početnoj fazi kisik se veže na nezasićene masne kiseline pri čemu dolazi do tvorbe slobodnih radikala. Time se pokreće cijeli lanac reakcija između radikala i masnih kiselina pri čemu su krajnji produkti slobodni radikali. U drugoj fazi dolazi do razvijanja hidroperoksida i slobodnih peroksida vezanjem kisika na slobodne radikale masnih kiselina. Hidroperoksidi predstavljaju primarne produkte oksidacije. Vrlo su nestabilni i dalje se razgrađuju na krajnje produkte oksidacije. Pokazatelj primarnih produkata oksidacije je peroksidni broj. Krajnje produkte (sekundarni produkti) čine aldehidi, alkoholi, masne kiseline, ketoni i dr., koji u vrlo malim količinama ulju daju neugodan okus i miris te dolazi do porasta viskoznosti, tamnjenja i otežane probavljivosti ulja. Određivanjem apsorpcije u UV-području spektrofotometrijskom metodom obuhvaćamo mjerenja i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije. Primarni produkti oksidacije pokazuju maksimalnu apsorpciju na valnoj duljini 232 nm, a sekundarni produkti (aldehidi i ketoni) na 268 odnosno 270 nm. Reakcije oksidacije se odvijaju lančano, a njen završetak (treću fazu) čini međusobna reakcija slobodnih radikala koji stvaraju neaktivne polimere. Budući da je u maslinovom ulju najzastupljenija mononezasićena oleinska masna kiselina može se reći da je ono relativno stabilnije od drugih ulja. Brzina reakcije oksidacije ovisi i o prisutnosti spojeva koji je ubrzavaju (prooksidansi) ili usporavaju (antioksidansi). U prooksidanse ubrajamo kisik, svjetlost, temperatura, metali i određene enzime – npr. peroksidaze. Antioksidansi su spojevi koji zaustavljaju reakcije autooksidacije tako da otpuštaju aktivni H-atom donirajući ga slobodnom aktivnom radikalu peroksida ili masne kiseline pri čemu dolazi do prekida lančane reakcije (Rotich i sur., 2020).

Stupanj oksidacijskog kvarenja maslinova ulja najčešće se iskazuje peroksidnim brojem te K-brojevima. Granične vrijednosti za određene kategorije maslinova ulje određene su Delegiranom uredbom Komisije (EU) 2016/2095.

2.1.2.2. Termooksidacija

Termička oksidacijska stabilnost vrlo je važna jer utječe na hranjivu vrijednost ulja te izravno ovisi o samom sastavu ulja odnosno omjeru mono i polinezasićenih lanaca u trigliceridima. Toplinska stabilnost je niža što je veći stupanj nezasićenja. Ovisi o vrsti ulja, temperaturi i vremenu zagrijavanja. Zbog svoga sastava ekstra djevičansko maslinovo ulje podnosi visoke temperature i pogodna su za prženje (Rotich i sur., 2020). Pod utjecajem visoke temperature, vodene pare i zraka dolazi do složenih kemijskih reakcija gdje osim nepoželjnih produkata oksidacije dolazi i do stvaranja nepoželjnih produkata termooksidacije. U istraživanju koje su proveli Morales i sur. (1997) uočeno je da su hlapljivi spojevi (njih 60-ak) odgovorni za poželjne senzorske karakteristike proizvedeni biokemijskim putevima. Tijekom prvih nekoliko sati nestaju te su zamijenjeni drugim spojevima nekusne arome koji su nastali oksidacijskim putevima. Također su ustanovili da nezasićene masne kiseline predstavljaju glavne prekursore hlapljivih spojeva pronađenih u oksidiranim uzorcima. Produkte termooksidacije čine cikličke masne kiseline, dimeri i polimeri masnih kiselina i triglicerida, oksipolimeri te ostali hlapljivi i nehlapljivi spojevi (Morales i sur., 1997).

2.1.2.3 Fotoooksidacija

Fotoooksidacija je također prisutna kod ekstra djevičanskog maslinovog ulja zbog prisustva klorofila u svom sastavu. U slučaju da je ulje izloženo svjetlosti, pigment klorofil ponaša se kao fotosenzibilator za proizvodnju pobuđenog kisika što doprinosi ubrzanoj reakciji oksidacije ekstra djevičanskog maslinovog ulja. S druge strane, ako je ulje stavljeno u mrak, pigment klorofil djeluje kao antioksidans donirajući vodik slobodnim radikalima. Degradacija klorofila i pojava primarnih i sekundarnih produkata oksidacije međusobno su povezani procesi. Zbog toga je maslinovo ulje potrebno skladištiti i čuvati u primjerenoj ambalaži (Mishra i sur., 2018).

2.2. Diferencijalna motridbena kalorimetrija

Kalorimetrija je primarna metoda za mjerenje toplinskih svojstava materijala zbog izravne koleracije između temperature i fizikalnih svojstava tvari te je jedina metoda za izravno određivanje promjena entalpija u određenom procesu. Kalorimetri se koriste u kemiji, biokemiji, biotehnologiji, farmakologiji i u novije vrijeme u nanoznanosti. Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DSC) najpoznatija je među različitim vrstama. DSC je termoanalitička metoda koja mjeri razliku toplinskog toka između samog uzorka i referentnog uzorka pri reguliranoj promjeni temperature. Točnije, ona mjeri razliku u količini topline koja je potrebna tijekom zagrijavanja ili hlađenja da razlika temperature između ispitivanog uzorka i referentnog bude jednaka nuli (Gill i sur., 2010).

Pomoću diferencijalno skenirajuće kalorimetrije možemo odrediti različita termofizička svojstva materijala (točka taljena, specifični toplinski kapacitet), fazne prijelaze (taljenje, isparavanje, sublimacija, kristalizacija) te analizu sastava materijala (Höhne i sur., 2013).

DSC je vrlo poželjan u radu budući da omogućuje otkrivanje faznih prijelaza u širokom rasponu temperatura (-90 do 550 °C) i pomaže u njihovoj kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi. Široko je rasprostranjen i u prehrambenoj industriji. Prehrambeni proizvodi su višekomponentni sustavi u kojima sastojci prolaze kroz razne fazne prijelaze pri temperaturama i tlakovima na kojima su proizvodi obrađeni, skladišteni i konzumirani. Promjene na molekularnoj razini nastale tijekom faznih prijelaza očituju se u promjenama toplinskih, mehaničkih i transportnim svojstvima proizvoda stoga možemo zaključiti da je proučavanje faznih prijelaza od velike važnosti za adekvatnu kontrolu, distribuciju i skladištenje prehrambenih proizvoda (Leyva-Porras i sur., 2020).

2.2.1. Princip rada diferencijalno skenirajuće kalorimetrije

DSC mjeri energetske promjene dok se uzorak zagrijava, hladi ili drži izotermno zajedno s temperaturom na kojoj se te promjene događaju. Energetske promjene omogućuju pronalaženje i mjerenje prijelaza koji se javljaju u uzorku na određenim temperaturama te omogućuju karakterizaciju materijala u procesima taljenja, mjerenje staklenih prijelaza i niza složenijih događaja. Mjerenja se mogu izvršiti brzo i jednostavno (Almoselhy, 2020). Pri upotrebi DSC-a, energija se istovremeno uvodi u promatrani uzorak i referentni uzorak. Temperature oba uzorka tijekom vremena identično se povišuju. Razlika ulazne energije potrebne kako bi temperature promatranog i referentnog uzorka bile jednake predstavlja višak apsorbirane ili oslobođene temperature u uzorku (ovisno dešava li se endoterman ili egzoterman proces). Zbog prisutnosti molekule koja nas zanima potrebna je veća količina

energije da se uzorak dovede na jednaku temperaturu kao i referentni (Gill i sur., 2010). DSC nudi dvije metode mjerenja. Postoje dvije vrste izvedbe DSC uređaja, a to su DSC toplinskog toka i DSC kompenziranog toplinskog toka. DSC toplinskog toka je tehnika u kojoj se mijenja temperatura promatranog i referentnog uzorka, a razlika temperature ta dva uzorka se mjeri kao funkcija temperature. DSC kompenziranog toplinskog toka najviše je upotrjebljena tehnika u kojoj se toplinska energija koja je primijenjena na uzorak i na referentni materijal mjeri kao funkcija temperature po jedinici vremena, kako bi se njihova temperatura izjednačila, dok se temperatura samog uzorka mijenja u specifičnom programu. U principu, mjeri se električna snaga grijanja potrebna za kompenzaciju razlike u protoku topline (Almoselhy, 2020). Mjerni sustav se sastoji od dvije identične mikropeći koje su ugrađene u termostatirani aluminijski blok. Peći su izgrađene od legure platine-iridija od kojih svaka sadrži temperaturni senzor (termometar od platine) i otpornik (od platinske žice) (Höhne i sur., 2013). Prijenos topline, protok energije u ili iz uzorka koji se mjere kao funkcija temperature ili vremena obično se prikazuje u mjernoj jedinici mW na osi y. mW je mJ/s te označuje protok energije u jedinici vremena. Postoje dva različita prikaza toplinskih krivulja: jedna prikazuje endotermnu promjenu i usmjerena je prema dolje, a druga je usmjerena prema gore. Kod DSC-a toplinskog toka endoterme su prikazane u smjeru prema dolje (budući da endotermne tranzicije rezultiraju negativnom promjenom temperature), dok kod DSC-a kompenziranog toplinskog toka su prikazane u smjeru prema gore budući da ova metoda rezultira u porastu energije koja je dovedena uzorku. Međutim, ta metoda onemogućuje identifikaciju različitih prijelaza koji se mogu pojaviti u uzorku tijekom hlađenja ili grijanja (Almoselhy, 2020).

2.2.2. DSC u analitici ulja

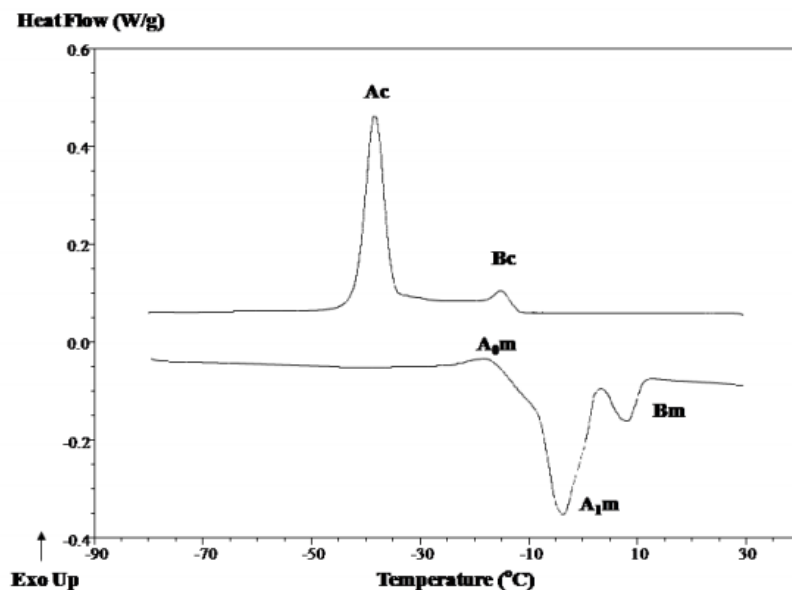
Lipidi, jestiva ulja i masti sadrže mnoge nutritivno vrijedne spojeve. Stoga, istraživanja o autooksidaciji i oksidacijskoj stabilnosti ovih molekula od velikog su interesa budući da imaju važne ekonomske, prehrambene i zdravstvene vrijednosti. Instrumentalne metode poput elektronske spin rezonancije, IR i NMR-a osjetljive su na smetnje koje proizlaze iz same autooksidacije i međuprodukata. Budući da tijekom oksidacije dolazi do oslobađanja topline, toplinska analiza je najjednostavnija, izravna analitička metoda koja kontinuirano prati oksidaciju lipida i njezinih toplinskih učinaka. Također, mjerenje kinetičkih parametara puno je brža od gore spomenutih metoda što je posljedica neizotermnih uvjeta mjerenja (Gill i sur., 2010). DSC je termoanalitička metoda koja omogućuje određivanje parametara oksidacije bez potrebe za kemikalijama. Oksidacijska stabilnost ulja uglavnom ovisi o sastavu masnih kiselina,

stupnju nezasićenja i prisutnosti spojeva s antioksidacijskom aktivnosti. Malvis i sur. (2019) u svom su istraživanju dokazali su da je DSC tehnika prikladna za praćenje kvalitativnih promjena u sastavu ekstra djevičanskog maslinovog ulja u uvjetima koje najbolje oponašaju kinetiku oksidacije koja se dešava tijekom skladištenja na sobnoj temperaturi. Dakle, DSC može se koristiti za predviđanje promjena u sastavu tijekom samog skladištenja što je od velike koristi za proizvođače i trgovce. U istraživanju koje su proveli Paciulli i sur. (2021) dokazano da je se DSC također može koristiti kao pouzdana metoda za uspješno utvrđivanje botaničkog i zemljopisnog podrijetla određene sorte te njihove autentičnosti na temelju različitog sastava masnih kiselina koje su u izravnoj korelaciji s entalpijom hlađenja i zagrijavanja i rezultiraju specifičnim DSC krivuljama. Također, DSC se pokazao kao pouzdana metoda za razlikovanje maslinovog ulja različitih kategorija te sprječavanja patvorenja maslinovog ulja. Chiavaro i sur. (2008) potvrdili su da termogrami za hlađenje i grijanje mogu biti koristan alat za razlikovanje kategorija maslinovog ulja budući da su različite kategorije ulja razvijala različite profile kristalizacije i topljenja. DSC termogrami mogu pružiti dodatne informacije za klasifikaciju maslinovog ulja te omogućuju bolje razumijevanje odnosa između kemijskog sastava (glavnih i sporednih komponenata) i toplinskih svojstava. Dakle, na temelju specifičnih DSC termograma mogu se iščitati promjene u fizikalnim i kemijskim svojstvima ulja, a iščitavanje dobivenih rezultata ima široku primjenu u industriji ulja.

2.2.3. Primjena DSC-a kod oksidacijskih kvarenja ulja

DSC krivulje koje nastaju za vrijeme zagrijavanja i hlađenja posljedica su oksidacijskog stanja uzorka, odnosno maslinovog ulja te su uspješno dovedena u korelaciju s konvencionalnim kemijskim indikatorima oksidacije. DSC se također koristi u istraživanju kinetike faznih prijelaza koja su potaknuta oksidacijom. Unatoč visokoj stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja tijekom skladištenja dolazi do oksidacijske razgradnje koja je posljedica kako enzimskih tako i kemijskih reakcija – lipolize i užeglosti. Utjecaj malih molekula koje nastaju tijekom oksidacije na trigliceride i njihovu sposobnost da se kristaliziraju i tale omogućio je korištenje DSC-a za procjenu oksidacije u mastima i uljima. Termooksidacija maslinovog ulja u svrhu istraživanja postiže se različitim tehnikama – konvencionalnom peći, mikrovalnom pećnicom, termogravimetrijskim aparatom ili direktnim stavljanjem uzorka u DSC pod strujom zraka (Ciprioti i sur., 2017).

Kada se sirovo maslinovo ulje podvrgne diferencijalno skenirajućoj kalorimetriji, rezultat je karakteristična toplinska krivulja.



Slika 1. Prikaz karakteristične DSC krivulje svježeg maslinovog ulja (Cipriotti i sur., 2017)

Krivulja hlađenja prikazuje dva egzotermna pika. Jedan se nalazi na približno $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ac), a drugi na $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bc). S druge strane, kod krivulje zagrijavanja dolazi do nastanka tri pika: manji egzotermni, na približno $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aom) i dva endotermna pika (A1m i B1m) koji se nalaze u rasponu temperatura između 18 i $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri različitim brzinama skeniranja može doći do promjene u izgledu krivulje uslijed različitih interakcija molekula ili drugačijeg prijenosa topline koji se ostvaruje između DSC-a i uzorka. Sastav triglicerida utječe na krivulju kristalizacije (početno kristalno stanje neovisno je o izgledu krivulje), a krivulja taljenja jako ovisi o toplinskoj povijesti uzorka za što je zaslužan fenomen polimorfizma. Glavni egzotermni pik (Ac) povezan je s kristalizacijom triglicerida (osobito oleinski dio i triolein), a glavni endotermni pik (A1m) se povezuje s njihovim taljenjem. Bc i A1m pikovi na krivulji hlađenja i taljena povezuju se s kristalizacijom i taljenjem monozasićenih i dizasićenih triglicerida (Cipriotti i sur., 2017). Barba i sur. (2013) prvi egzotermni pik na krivulji taljenja povezuju s raspoređivanjem molekula metastabilnih β' kristala u termodinamički stabilniju β formu, dok su endotermni pikovi pri višim temperaturama označavaju taljenje β' kristalnih struktura. Manje komponente poput polifenola nemaju značajan utjecaj na proces kristalizacije, kao ni na taljenje maslinovog ulja, za razliku od produkata oksidacije koji ometaju prijelaze.

U istraživanju koje su proveli Vittadini i sur. (2003), gdje su uspoređivali DSC krivulje autooksidiranih (50 °C) i termooksidiranih (93 i 180 °C) maslinovih ulja pri hlađenju može se uočiti da povećanjem temperature zagrijavanja dolazi do bržeg pomaka vrha kristalizacije prema nižim temperaturama. Također, dolazi do širenja temperaturnog raspona pika, visina pika se smanjila, a samim time smanjila se i entalpija kristalizacije. Promjene su izraženije kada se vrijeme toplinske obrade povećava. Maggio i sur. (2012) i Kanavouras i Selke (2004) također su istraživali oksidaciju maslinovog ulja u konvencionalnoj peći (135 i 180 °C) i u mikrovalnoj peći tijekom različitih vremenskih intervala. DSC krivulje oba istraživanja (bez obzira na upotrebljeni način zagrijavanja) pokazala su slične rezultate: glavni kristalizacijski pik je pomaknut prema nižim temperaturama, postao je širi, a visina mu se smanjila. Što se zagrijavanja tiče, došlo je do širenja krivulje taljenja, promjene glavnog endotermnog pika prema nižim temperaturama te je također došlo do smanjenja njegove visine. U istraživanju Kanavourasa i Selke-a (2004), promjene su bile uočljivije kod toplinski tretiranih uzoraka u odnosu na uzorke tretirane zrakom. Maggio i sur. (2012) primijetili su da do opisanih promjena brže dolazi kod uzoraka zagrijavanih u mikrovalnoj pećnici nego u konvencionalnoj peći.

2.3 Fizikalno – kemijski parametri oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja

Kvalitativna analiza maslinovog vrlo je bitna u određivanju parametara kvalitete. Kako bi se utvrdila sama kvaliteta ulja postoje razne kemijske metode koje daju informacije o kakvoći samog ulja. Sukladno uredbi Komisije (EU) 2016/2095 to su određivanje kiselinskog broja, K – broja i peroksidnog broja.

2.3.1. Peroksidni broj

Peroksidni broj jest količina tvari u danom uzorku koje oksidiraju kalijev jodid, izražena u milimolima aktivnog kisika po kilogramu ulja (mmolO_2/kg) ili po miliekvivalentima aktivnog kisika po kilogramu ulja (mEqO_2/kg) (Mandić i sur., 2020). Peroksidni broj govori o oksidativnoj stabilnosti ulja i ukazuje na oksidaciju koja može biti enzimska i kemijska. Maslinovo ulje u svom sastavu najviše sadrži nezasićenih masnih kiselina, tj. masnih kiselina koje imaju dvostruku vezu na koje se veže kisik iz zraka. Vezivanjem kisika (nastajanjem hidroperoksida) počinje niz procesa koji dovode do kemijskih i senzorskih promjena (Dobra, 2017). Oksidacija masnih kiselina događa se u dva koraka. Prvo, nezasićene masne kiseline reagiraju s kisikom,

stvarajući perokside bez mirisa koji se, u drugom koraku, razlažu u aldehide, odgovorne za užegli okus. Stupanj prvog stupnja oksidacije procjenjuje se peroksidnim brojem (Spano i sur., 2020).

Tablica 1. Maksimalno dozvoljena vrijednost peroksidnog broja za maslinovo ulje.

Izvor: Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/2095

Kategorija djevičanskih maslinovih ulja	Maksimalno dozvoljena vrijednost peroksidnog broja (mEq O ₂ /kg)
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 20
Djevičansko maslinovo ulje	≤ 20

2.3.2. K – brojevi

Spektrofotometrijsko dobivenim K-brojevima u UV području dobivamo uvid o početnom oksidacijskom stanju ulja te mogućem patvorenju s rafiniranim uljima. Apsorbancijom pri valnoj duljini od 232 nm dobivamo podatke o prvom stupnju oksidacije gdje nastaju hidroperoksidi vezanjem kisika na dvostruku vezu masnih kiselina. Primarni proizvodi oksidacije pokazuju najvišu apsorbanciju pri 232 nm. Razgradnjom hidroperoksida nastaju konjugirani dieni koji apsorbiraju u istom području. Sekundarni produkti oksidacije najviše apsorbiraju na 270 nm. Apsorbancija u ovom području uzrokovana je nastankom karbonilnih spojeva zbog pucanja lanaca masne kiselina na mjestu vezanja kisika. To ujedno predstavlja i drugi stupanj oksidacije ulja. Pri 270 nm apsorbiraju i konjugirani trieni koji nastaju pri rafinaciji ulja stoga povećanje ovog parametra ukazuje na moguće miješanje maslinovog ulja s nekim rafiniranim biljnim uljem. ΔK služi identifikaciju lošeg maslinova ulja (oksidirano ulje) i patvorenog maslinovog ulja dodatkom rafiniranog ulja (Dobra, 2017).

Tablica 2. Maksimalno dozvoljena vrijednost K_{232} , K_{270} i ΔK .

Izvor: Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/2095

Kategorija djevičanskih maslinovih ulja	K_{232}	K_{270}	ΔK
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	$\leq 2,50$	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$
Djevičansko maslinovo ulje	$\leq 2,60$	$\leq 0,25$	$\leq 0,01$

2.3.3. Kiselinski broj

Enzimi lipaze prirodno su prisutni u plodu masline te njihovim djelovanjem nastaju slobodne masne kiseline. Djeluju tako da razgrađuju ulje na njihove gradivne dijelove, slobodne masne kiseline i diacilgliceroli. Djelovanjem lipaza dolazi do povećanja kiselinskog broja (Mandić i sur., 2020). Kiselinski broj nam pokazuje sadržaj slobodnih masnih kiselina u maslinovom ulju. Lipaze su prirodno prisutne u plodu masline te je najčešći uzrok povećanja kiselinskog broja oštećenje ploda koje ih aktivira (Dobra., 2017). Maslinova ulja se razlikuju prema udjelu SMK izraženih kao oleinska na 100 g ulja (Mandić i sur., 2020).

Tablica 3. Maksimalno dozvoljen udio slobodnih masnih kiselina

Izvor: Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/2095

Kategorija djevičanskih maslinovih ulja	Maksimalno dozvoljen udio SMK (g / 100 g ulja)
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	$\leq 0,8$
Djevičansko maslinovo ulje	$\leq 2,0$

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Uređaji

- Uređaj za diferencijalnu motridbenu kalorimetriju (DSC 214 Polyma Differential Scanning Calorimeter, NETZSCH-Gerätebau GmbH)
- Spektrofotometar (Secomam UviLine 9400)
- Analitička vaga
- Pećnica

3.2.2. Kemikalije

- Otopina izooktana i octene kiseline u omjeru 2:3 (V:V)
- Zasićena otopina kalijevog jodida (14 g kalijeva jodida otopine se u 8 g svježe prokuhane i destilirane vode – potrebno ju je čuvati od svjetla i svježe pripremati svaki dan)
- Otopina škroba (0,5 g škroba pomiješa se u maloj količini vode te se doda u 50 mL kipuće vode, ostavi se da vrije nekoliko sekundi i odmah ohladi – otopina se priprema svaki dan)
- Izooktan, p.a. čistoće
- Otopina natrij – tiosulfata, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/L}$

3.1.3. Uzorak

- Ekstra djevičansko maslinovo ulje – Zvijezda plus d.o.o.

3.2. Metode

Ubrzano kvarenje ekstra djevičanskog maslinovog ulja

U petrijevim posudama izvagano je 20 g ekstra djevičanskog maslinovog ulja te su uzorci podvrgnuti ubrzanom kvarenju pri 98 °C u termostatu i uzeti na analizu u vremenskim intervalima od 2, 4, 8, 16 i 24 sata. Uzorcima su određeni peroksidni broj i K-vrijednosti u UV-području (K270, K232 i ΔK) te su podvrgnuti diferencijalno skenirajućoj kalorimetriji. Dobivene vrijednosti su uspoređene s nekvarenim/svježim uzorkom ulja.

3.2.1. Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj određuje se prema standardnoj HRN EN ISO 3960:2017 normi. 5 g ulja odvaže se u Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL koja je propuhana inertnim plinom. Uzorak se otopi u 50 mL otopini izooktana i octene kiseline, a zatim se doda 0,5 mL zasićene otopine kalijeva jodida i miješa se točno 1 min s odstupanjem od 1 s više ili manje. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 mL vode te se zatim doda 0,5 mL 1%-tne otopine škroba i odmah titrira s otopinom natrij – tiosulfata $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/L}$ do obezbojenja. Na isti način određuje se i slijepa proba. Peroksidni broj računa se prema jednadžbi:

$$\text{PB} = \frac{V - V_0}{m} * 5 \quad (1)$$

gdje je:

V – volumen natrijevog tiosulfata utrošenog za titraciju (mL)

V₀ – volumen natrijevog tiosulfata utrošenog za titraciju slijepe probe (mL)

m – masa uzorka ulja (g)

3.2.2. Određivanje K – brojeva

Uzorak se pripremi i analizira metodom propisanom hrvatskom normom za određivanje apsorbancije u UV spektru izraženih kao specifična UV ekstinkcija koja se koristi za životinjske i biljne masti i ulja (HRN EN ISO 3656:2011). Od homogenog uzorka odvaže se 0,1 g u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se zatim napuni do oznake izooktanom spektrofotometrijske čistoće. S priređenom otopinom napuni se kvarcna kiveta s duljinom prolaza zrake 1 cm te se na UV/Vis spektrofotometru mjere ekstinkcije pri valnim duljinama od 232 do 270 nm. Koeficijenti ekstinkcije pri raznim valnim duljinama računaju se prema izrazu:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c*s} \quad (2)$$

gdje je:

$K\lambda$ – specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ

$E\lambda$ – izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini λ

c – koncentracija otopine u g/100 mL

s – duljina puta zrake u cm

Izračunavanje vrijednosti ΔK provodi se prema izrazu:

$$\Delta K = Km - \frac{K(m-2) - K(m+2)}{2} \quad (3)$$

gdje je:

Km – specifična ekstinkcija pri valnoj duljini m tj. Valnoj duljini oko 270 +-2 nm na kojoj je zabilježena maksimalna apsorbancija.

3.2.3. Diferencijalna motridbena kalorimetrija – karakteristike topljenja ulja

Analiza je provedena prema prilagođenoj metodi iz rada Ostrowska-Ligenza i sur. (2021). Mjerenja su rađena na DSC uređaju - DSC 214 Polyma Differential Scanning Calorimeter, NETZSCH-Gerätebau GmbH. Uzorci ulja (10 – 20 mg) stavljeni su u aluminijsku posudicu koja je hermetički zapečaćena aluminijskim poklopcem. Referentni uzorak predstavlja prazna posudica koja se nalazi u kućištu uređaja uz posudicu s uzorkom. Analize su rađene pri protoku dušika od 40 mL/min i normalnom tlaku. Uzorci ulja su zagrijavani od sobne temperature do 80 °C brzinom od 10 °C/min uz zadržavanje od 10 min kako bi se otopili svi kristali i izbrisala termalna memorija. Nakon toga uzorci su hlađeni do -73 °C brzinom od 10 °C/min uz zadržavanje od 30 min na -73 °C. Drugo zagrijavanje (tzv. druga fuzija) provedena je brzinom od 15 °C/min do 80 °C. Prikazana je samo krivulja hlađenja (Slika 2).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Određivanje peroksidnih brojeva

Tablica 4. Prikaz peroksidnih brojeva ekstra djevičanskog maslinovog ulja nakon različitih vremena zagrijavanja.

VRIJEME ZAGRIJAVANJA / h	PEROKSIDNI BROJ /(meq O₂/kg)
0	4,74
2	5,92
4	6,70
8	7,80
16	9,54
24	12,19

Delegirana uredba komisije EU 2016/2095 nalaže da bi se maslinovo ulje karakteriziralo kao ekstra djevičansko potrebno je da peroksidni broj izražen kao meq O₂/kg ne smije prelaziti 20. Iz priložene tablice vidimo kako sirovo maslinovo ulje ima peroksidni broj čak 4x manji od dopuštenog što znači da ga možemo svrstati u kategoriju ekstra djevičanskog. Vidimo kako se s povećanjem vremena zagrijavanja povećava i peroksidni broj. Najveća vrijednost peroksidnog broja dobivena je nakon izlaganja ulja toplini 24 sata (12,19). U istraživanju koje su proveli Mandić i sur. (2020) gdje su mjerili peroksidne brojeve 12 različitih uzoraka ekstra djevičanskih maslinovih ulja na različitim temperaturama (30 °C, 40 °C i 50 °C) skladištenih tijekom tri dana vidi se isti trend povećanja peroksidnog broja u skladu s povećanjem temperature, a i duljinom skladištenja. Međutim, povećanje peroksidnog broja najizraženije je tijekom prvog dana skladištenja (i kod najviše temperature od 50°C) dok se kasnije smanjuje. To se može objasniti povećanom vjerojatnošću raspada nestabilnih hidroperoksida za vrijeme skladištenja i njihovo razlaganje na sekundarne produkte oksidacije. Dakle, iz navedenog istraživanja može se vidjeti kako porast temperature utječe na brži početak primarne oksidacije u ulju što dovodi do bržeg stvaranja peroksida i hidroperoksida te posljedično porasta peroksidnog broja. Također, duže vremensko izlaganje konstantnoj temperaturi također pridonosi porastu peroksidnog broja (što je duži vremenski period veći je porast peroksidnog broja zbog brzih kemijskih reakcija prvog stupnja oksidacije) gdje nakon predugog izlaganja također može doći do pada peroksidnog broja uslijed početka sekundarne oksidacije i razlaganja peroksida i hidroperoksida na produkte sekundarne oksidacije – aldehide i ketone.

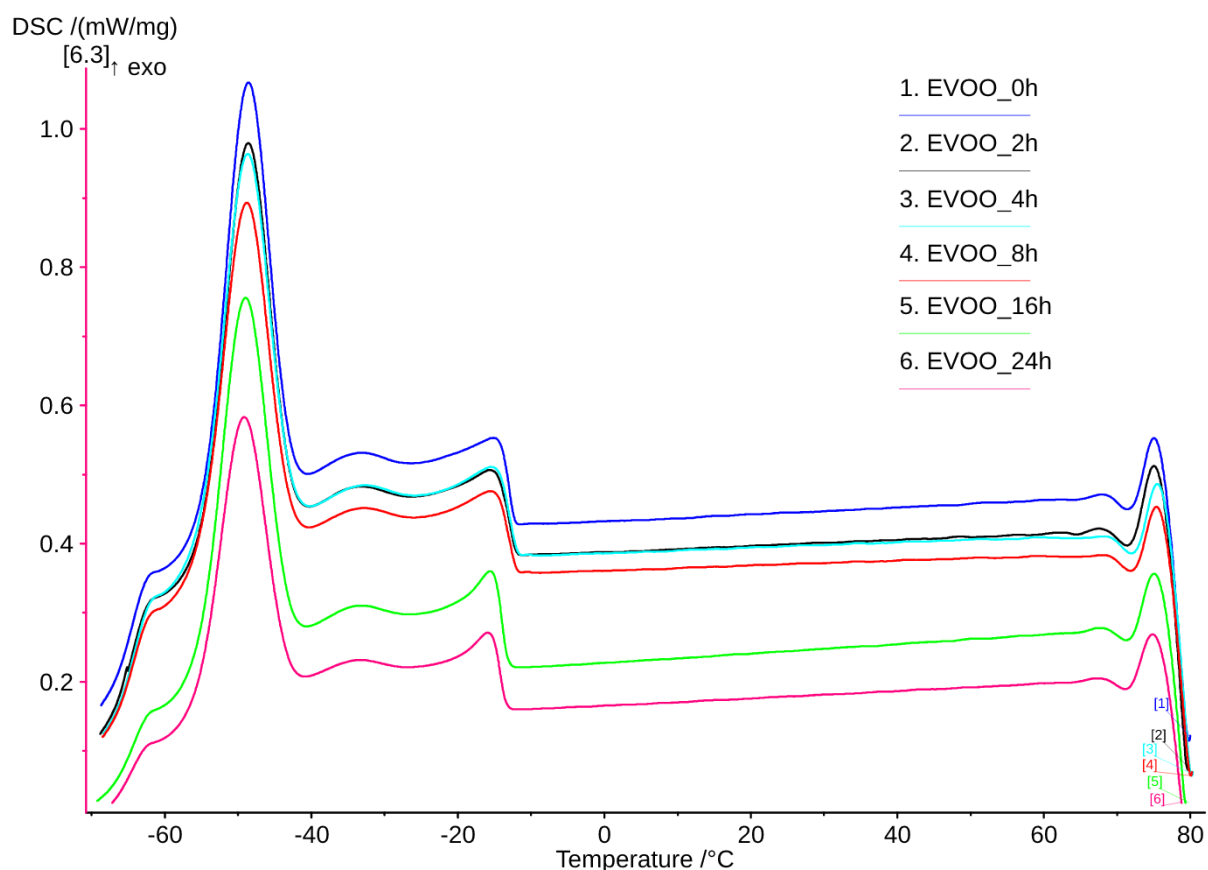
4.2. Određivanje K- brojeva

Tablica 5. Prikaz specifičnih ekstinkcija i vrijednosti ΔK pri određenim valnim duljinama .

Uzorak (vrijeme)	K₂₃₂	K₂₇₀	ΔK
0h	1,85	0,16	-0,66
2h	1,88	0,16	-0,68
4h	2,05	0,20	-0,67
8h	2,09	0,21	-0,72
16h	2,33	0,23	-0,77
24h	2,37	0,26	-0,83

Početne vrijednosti K_{232} , K_{270} i ΔK odgovaraju Delegiranoj uredba Komisije (EU) 2016/2095. Kako bi se maslinovo ulje smatralo ekstra djevičanskim apsorbancija pri 232 nm mora biti manja ili jednaka od vrijednosti 2,5, apsorbancija pri 270 nm mora biti manja ili jednaka od vrijednosti 0,22, a gornja granica za ΔK je 0,01. U našim uzorcima povećanjem vremenskog intervala zagrijavanja dolazi i do povećanja svih spomenutih vrijednosti. Tijekom mjerenja iako se K_{232} povećava ne prelazi graničnu vrijednost od 2,5, za razliku od K_{270} . U uzorku koji je povišenoj temperaturi bio izložen 16h vrijednost K_{270} koja iznosi 0,24 prelazi graničnu vrijednost od 0,22, dok se kod uzorka koji je povišenoj temperaturi bio izložen 24h ta vrijednost je 0,26 koja također prelazi propisanu granicu. Vrijednosti ΔK zadovoljavaju kriterij tijekom svih mjerenja. U istraživanju koje su proveli Mandić i sur. (2020) gdje su 12 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja skladištili pri različitim temperaturama (30 °C, 40 °C i 50 °C) tijekom tri dana također su zapazili povećanja vrijednosti K_{232} povećanjem vremena skladištenja i povišenjem temperature skladištenja. Na početku, pri sobnoj temperaturi svi uzorci spadali su u ekstra djevičanska maslinova ulja, a pri višim temperaturama i duljem izlaganju tim temperaturama u djevičanska maslinova ulja. Dva su uzorka pri temperaturama od 40 °C i 50 °C prelazila granicu kategorije djevičanskog maslinova ulja i spadala pod rafinirana maslinova ulja. Istim uzorcima mjerena je apsorbancija i na 270 nm gdje je utvrđeno da pripadaju kategoriji ekstra djevičanskog maslinovog ulja s obzirom na K_{270} . Također dolazi do povećanja vrijednosti tijekom izlaganja ulja višim temperaturama. S obzirom na ΔK svi su uzorci i nakon tri dana skladištenja pri svim temperaturama u kategoriji ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

4.3. Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DSC)



Slika 2. DSC skupna krivulja hlađenja tijekom različitih vremenskih perioda

Na slici 2 vidimo kako se ponašaju krivulje hlađenja termooksidiranih uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja snimljenih DSC uređajem. Vidimo da je glavni egzotermni pik sirovog uzorka najviši i najuži te da se nalazi otprilike na -50 °C, dok je onaj snimljen nakon 24h najmanji i najširi. Isto se odnosi i na manji egzotermni pik koji se pojavljuje na otprilike -16 °C. Odnosno, što je vrijeme izlaganja uzorka povišenoj temperaturi duže, dolazi do smanjenja površine glavnog egzotermnog pika i širenja temperaturnog raspona pika. Cerretani i sur. (2012) snimali su DSC krivulje hlađenja tri različita uzorka ekstra djevičanskog maslinovog ulja koje je bilo skladišteno pri 60 °C tijekom 21 tjedna. Krivulje su snimljene na početku te nakon 4, 12 i 21 tjedna. U njihovom slučaju također je vidljivo kako se povećanjem vremenskog perioda izlaganja uzorka povišenim temperaturama glavni egzotermni pik pomiče prema nižim temperaturama, visina (entalpija) mu se smanjuje, a temperaturni raspon

povećava. Vittadini i sur. (2003) snimali su krivulje hlađenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja pri različitim temperaturama (50 °C, 93 °C i 180 °C) tijekom vremenskog perioda do 216 sati. Krivulje prikazuju isti profil kao i u istraživanju koje su proveli Cerretani i sur. (2012), međutim kod njih je vidljivo da temperatura na kojoj su uzorci skladišteni ima veliki utjecaj na izgled samih krivulja. Što je temperatura skladištenja viša, do opisanih promjena dolazi brže te su očitije. Smanjenje površine pika, povećanje temperaturnog raspona i njegovo pomicanje prema nižim temperaturama pojava je koja se povezuje s nastankom produkata oksidacije lipida koje mogu oslabiti i/ili ometati veze između molekula triglicerida što posljedično vodi do stvaranja većeg broja nepravilnih kristala, povećanja viskoznosti ulja i povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina. Takvim kristalima potrebna je niža energija za kristalizaciju te usporavaju fazne prijelaze (Cerretani i sur., 2012).

5. Zaključak

- Peroksidni broj ekstra djevičanskog maslinovog ulja povećava se sukladno s vremenom termooksidacije
- Uslijed duljeg izlaganja ekstra djevičanskog maslinovog ulja povišenoj temperaturi dolazi do povećanja specifičnih ekstinkcija pri 232 i 270 nm, kao i povećanja ΔK vrijednosti
- Što je ekstra djevičansko maslinovo ulje dulje termički tretirano na DSC krivulji hlađenja egzotermni pik postaje sve niži, a temperaturni raspon mu se povećava

6. Literatura

Almoselhy R.I.M. (2020) Applications of Differential Scanning Calorimetry (DSC) in Oils and Fats Research. A Review. *American Research Journal of Agriculture* **6**(1).

Barba L., Arrighetti G., Calligaris S. (2013) Crystallization and melting properties of extra virgin olive oil studied by synchrotron XRD and DSC. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**:322 - 309.

Cerretani L., Bendini A., Rinaldi M., Paciulli M., Vecchio S., Chiavaro E. (2012) DSC evaluation of extra virgin olive oil stability under accelerated oxidative test: effect of fatty acid composition and phenol contents. *Journal Oleo Science* **61**(6): 303 - 309.

Chiavaro E., Rodriguez-Estrada MT., Barnaba C., Vittadini E., Cerretani L., Bendini A. (2008) Differential scanning calorimetry: A potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *Analytica Chimica Acta* **625**(2): 215 - 226.

Cipriotti S.V., Paciulli M., Chiavaro, E. (2017) Application of different thermal analysis techniques to characterize oxidized olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **119**(1).

Conte L., Milani A., Calligaris S., Rovellini P., Lucci P., Nicoli M.C. (2020) Temperature dependence of oxidation kinetics of extra virgin olive oil (EVOO) and shelf-life prediction. *Foods* **9**(3): 295.

Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/2095 od 26. rujna 2016. o izmjeni Uredbe (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize.

Dobra M. (2017) Laboratorijska analiza maslinovog ulja.

Gill P., Moghadam T.T., Ranjbar B. (2010) Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques* **21**: 167 - 193.

Jimenez-Lopez C., Carpena M., Lourenço-Lopes C., Gallardo-Gomez M., Lorenzo J.M., Barba

F.J., Prieto M.A., Simal-Gandara J. (2020) Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* **9(8)**: 1014.

Höhne G., Hemminger W. F., Flammersheim H.J. (2013) *Differential Scanning Calorimetry*, 2. izd. Springer, str. 1-7.

HRN EN ISO 3656:2011, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje apsorbancija u ultraljubičastom spektru izraženih kao specifična UV ekstinkcija.

HRN EN ISO 3960:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko određivanje točke završetka.

Kanavouras A., Selke S. (2004) Evolution of thermograph parameters during the oxidation of extra virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **106(6)**: 359 – 368.

Leyva-Porras C., Cruz-Alcantar P., Espinosa-Solís V., Martínez-Guerra E., Balderrama CIP., Martínez IC., Saavedra-Leos MZ. (2020) Application of differential scanning calorimetry (DSC) and modulated differential scanning calorimetry (MDSC) in food and drug industries. *Polymers* **12(1)**: 5.

Malvis A., Šimon P., Dubaj T., Sládková A., Ház A., Jablonský M., Sekretár S., Schmidt Š., Kreps F., Burčová Z., Hodaifa G., Šurina I. (2019) Determination of the thermal oxidation stability and the kinetic parameters of commercial extra virgin olive oils from different varieties. *Journal of Chemistry* **2019**: 1 - 8.

Mandić M., Sliva P., Krković J., Rajević J., Pierobon A., Serdar S., Bošnjir, J. (2020) Research on the Impact of Temperature on Change in Olive Oil Quality. *Journal of applied health sciences* **6(2)**: 249 - 259.

Mishra P., Lleó L., Cuadrado T., Ruiz-Altisent M., Hernández-Sánchez N. (2018) Monitoring oxidation changes in commercial extra virgin olive oils with fluorescence spectroscopy-based prototype. *European Food Research and Technology* **244(3)**: 565 – 575.

Morales M. T., Rios J. J., Aparicio R. (1997) Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

45(7): 2666–2673.

Ostrowska-Ligeża E., Dolatowska-Żebrowska K., Wirkowska-Wojdyła M., Bryś J., Górská A. (2021) Comparison of Thermal Characteristics and Fatty Acids Composition in Raw and Roasted Cocoa Beans from Peru (Criollo) and Ecuador (Forastero). *Applied Sciences* **11(6)**: 2698.

Paciulli M., Difonzo G., Conte P., Flamminii F., Piscopo A., Chiavaro E. (2021) Physical and thermal evaluation of olive oils from minor Italian cultivars. *Foods* **10(5)**: 1004.

Rodríguez-López P., Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I., Emanuelli T., Menéndez JA., Segura-Carretero A. (2020) Structure–biological activity relationships of extra-virgin olive oil phenolic compounds: Health properties and bioavailability. *Antioxidants* **9(8)**: 685.

Rotich V., Al Riza D.F., Giametta F., Suzuki T., Ogawa Y., Kondo N. (2020) Thermal oxidation assessment of Italian extra virgin olive oil using an UltraViolet (UV) induced fluorescence imaging system. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 237.

Serrelli G., Deiana M. (2018) Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants* **7(12)**: 170.

Spano M., Di Matteo G., Rapa M., Ciano S., Ingallina C., Cesa S., Menghini L., Carradori S., Giusti AM., Di Sotto A., Di Giacomo S., Sobolev AP., Vinci G., Mannina L. (2020) Commercial hemp seed oils: A multimethodological characterization. *Applied Sciences (Switzerland)* **10(19)**.