

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Darko M. Micić

**HEMIJSKA I TERMALNA ANALIZA  
SEMENA JAGODASTOG VOĆA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Darko M. Micić

**CHEMICAL AND THERMAL ANALYSIS  
OF BERRY SEEDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

***Mentori:***

**dr Ljiljana Damjanović**

vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

**dr Branislav Simonović**

naučni savetnik Instituta za opštu i fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

***Članovi komisije:***

---

**dr Ljiljana Damjanović**

vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

---

**dr Branislav Simonović**

naučni savetnik Instituta za opštu i fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

---

**dr Vera Dondur**

redovni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

---

**dr Miroslav Vrvčić**

redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

---

*Iskreno se zahvaljujem*

*mentoru dr Branislavu Simonoviću, naučnom savetniku, na nesebičnoj pomoći i podršci, bez čijeg vođstva izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća,*

*mentoru dr Ljiljani Damjanović, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, na velikoj posvećenosti i korisnim savetima i sugestijama tokom finalizacije doktorske disertacije,*

*dr Veri Dondur, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, na korisnim savetima i sugestijama tokom finalizacije doktorske disertacije,*

*dr Miroslavu Vrvicu, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, na korisnim savetima i sugestijama tokom finalizacije doktorske disertacije.*

*Doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za termalnu analizu na Institutu za opštu i fizičku hemiju u okviru projekta pod rukovodstvom dr Branislava Simonovića.*

*Posebnu zahvalnost dugujem kolegici dr Sanji Ostojić na korisnim savetima koji su značajno olakšali izradu ove doktorske disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj majci, Marici, koja mi je najveća podrška u životu. Njoj posvećujem ovu doktorsku disertaciju.*

## Hemijska i termalna analiza semena jagodastog voća

### *Rezime*

Cilj ovog rada bio je da se ispituju hemijske i termalne osobine i oksidativna stabilnost ulja i brašna iz semena kupine (*R. fruticosus* L., sorta Čačanska bestrna) i maline (*Rubus idaeus* L., sorta Vilamet). Analiziran je i uticaj sastava ulja (sadržaj masnih kiselina) i antioksidanata, koji su prirodno prisutni u uljima, na termalne osobine i oksidativnu stabilnost ovih ulja. Određeni su kinetički parametri: energija aktivacije ( $E_a$ ), predeksponencijalni faktor ( $A$ ) i konstanta brzine ( $k$ ) procesa oksidacije ulja, u izotermnim i neizotermnim uslovima, i analizirano je kako zastupljenost pojedinih masnih kiselina u sastavu ulja utiče na njih.

Hemijskom analizom ispitivanih ulja određeni su kiselinski, peroksidni, saponifikacioni i jodni broj. Sadržaj masnih kiselina u uljima određen je pomoću gasno-masene hromatografije (*GC/MS*). Termalna analiza brašna i ulja iz semena maline i kupine, kao i čistih masnih kiselina (palmitinske, stearinske, oleinske, linolne i linoleinske) izvršena je metodama diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (*DSC*), modulovane diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (*MDSC*) i termogravimetrije (*TG*). Za izračunavanje kinetičkih parametara procesa oksidacije u neizotermnim uslovima korišćene su *Kissinger-Akahira-Sunose (KAS)* i *Kissinger* metode, dok je u izotermnim uslovima korišćena *Integralna izokonverzionna metoda za izotemske uslove*.

Termalnom analizom brašna iz semena maline i kupine utvrđeno je da se fazni prelazi triacilglicerola prisutnih u ispitivanim semenima odvijaju u temperaturnom opsegu od oko -50 do 10 °C. Fazni prelazi udela nezasićenih molekula triacilglicerola dešavaju se na nižim temperaturama (-50 do -10 °C) od faznih prelaza udela zasićenih molekula triacilglicerola (na oko 10 °C). Denaturacija proteina u semenima dešava se na oko 46 °C, dok termo-oksidativno razlaganje organskih sastojaka semena (lipidi, proteini, polisaharidi) počinje na oko 210 °C.

Kiselinski broj, kao pokazatelj sadržaja slobodnih masnih kiselina u sirovom ulju, je manji kod ulja iz semena kupine (2,34 mg KOH/g) u odnosu na ulje iz semena maline (6,44 mg KOH/g). Vrednosti jodnog broja (188,32 mg I<sub>2</sub>/g za ulje iz semena kupine i 162,38 mg I<sub>2</sub>/g za ulje iz semena maline) ukazuju da su ova ulja visoko nezasićena ulja, dok vrednosti saponifikacionog broja (192,30 mg KOH/g za ulje iz semena kupine i 188,59 mg KOH/g za ulje iz semena maline) ukazuju na mogućnost korišćenja ovih ulja

u proizvodnji različitih kozmetičkih proizvoda. Gasno-hromatografska merenja su pokazala da je sadržaj nezasićenih masnih kiselina oko 94-95 % u oba ulja, od toga esencijalnih masnih kiselina (linolne i linoleinske) ima 80,95 % u ulju iz semena kupine i 83,09 % u ulju iz semena maline.

Kod oba ulja je pri zagrevanju nađen polimorfizam. Temperature topljenja stabilnog polimorfnog oblika i kristalizacije, -21,29 i -66,32 °C, redom, ulja iz semena maline su niže od istih temperatura, -19,03 i -61,36 °C, redom, kod ulja iz semena kupine. Razlog je veći sadržaj linoleinske kiseline u ulju iz semena maline, jer povećanje broja dvostrukih veza u molekulima masnih kiselina smanjuje temperature topljenja i kristalizacije triacilglicerola. Iako su visoko nezasićena, ulja iz semena maline i kupine su oksidativno stabilnija od čistih nezasićenih masnih kiselina. Razlog za to je što se pri ekstrakciji ulja, pored triacilglicerola, iz semena ekstrahuju i antioksidanti koji su prirodno prisutni u semenu.

Vrednosti kinetičkih parametara procesa oksidacije  $E_a$ ,  $k_{25}$  ( $k$  na 25 °C) i  $k_{120}$  ( $k$  na 120 °C) ulja iz semena maline i kupine, za izotermske i neizotermske uslove, su:  $E_a = 92-102$  kJ/mol,  $k_{25} = (4,50-16,64) \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  i  $k_{120} = (9,62-13,53) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  za ulje iz semena maline i  $E_a = 96-101$  kJ/mol,  $k_{25} = (3,41-6,09) \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  i  $k_{120} = (6,68-7,47) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  za ulje iz semena kupine. Konstanta brzine oksidacije ulja iz semena maline je oko 1,5 do 2 puta veća od konstante brzine oksidacije ulja iz semena kupine, što ukazuje da je ulje iz kupine oksidativno stabilnije. Razlog za to je veći sadržaj linoleinske masne kiseline u ulju iz semena maline, jer se ispitivanjem oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina pokazalo da su masne kiseline s većim brojem dvostrukih veza podložnije procesu oksidacije.

**Ključne reči:** seme maline, seme kupine, brašno iz semena, ulje iz semena, termalna analiza, DSC, MDSC, TG, oksidacija ulja, kinetički parametri oksidacije.

**Naučna oblast:** Fizička hemija

**Uža naučna oblast:** Hemijska kinetika i termodinamika

**UDK broj:**

## Chemical and thermal analysis of berry seeds

### Summary

The objective of the present work was investigation of chemical and thermal properties of blackberry (*R. fruticosus* L., Čačak Thornless cultivar) and raspberry (*Rubus idaeus* L., Willamette cultivar) seed flours and oils, as well as oxidative stability of these berry seed oils. The impact of fatty acid composition of examined berry seed oils on their oxidative stability and thermal characteristics was analyzed, as well as the effect of antioxidants, which are naturally present in oils, on their oxidative stability. Comparison with the oxidative stability of pure fatty acids was performed. Also, the kinetic parameters (activation energy,  $E_a$ , pre-exponential factor,  $A$ , and rate constant,  $k$ ) related to the oxidation process of analyzed oils were determined in isothermal and non-isothermal conditions.

The acid, peroxide, saponification and iodine values in the oil samples were determined. The fatty acid composition of the oils was determined by gas chromatography analysis. Thermal analysis of blackberry and raspberry seed flours, oils and pure fatty acids (palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid) have been performed by differential scanning calorimetry (DSC), modulated differential scanning calorimetry (MDSC) and thermogravimetry (TG) methods. Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) and Kissinger methods were employed for kinetic computations for non-isothermal conditions, while an integral isoconversional method was used for isothermal conditions.

In temperature region from about -50 to 10 °C phase transitions of triacylglycerols in the examined berry seeds were detected. The phase transitions of the unsaturated fraction of triacylglycerols happened at lower temperatures (-50 to -10 °C) than phase transitions of saturated fraction of triacylglycerols (at about 10 °C). Denaturation of proteins in berry seeds happened at about 46 °C, while thermo-oxidative decomposition of organic components in berry seeds (proteins, lipids and polysaccharides) started at about 210 °C.

Acid value, as an indicator of free fatty acids content in crude oils, is a lower for blackberry seed oil (2.34 mg KOH/g) than for raspberry seed oil (6,44 mg KOH/g). The obtained iodine values of both berry seed oils (188.32 mg I<sub>2</sub>/g for blackberry seed oil and 162.38 mg I<sub>2</sub>/g for raspberry seed oil) suggest that examined oils are highly unsaturated oils, while the saponification values (192.30 mg KOH/g for blackberry seed

oil and 188.59 mg KOH/g for raspberry seed oil) suggest the use of the oils in the production of different cosmetic products. Gas chromatography analysis showed that examined berry seed oils contain about 94-95 % of unsaturated fatty acids. These oils are rich in essential fatty acids (linoleic and linolenic acid); blackberry seed oil contains 80.95 %, while raspberry seed oil contains 83.09 % of essential fatty acids.

Polymorphism was detected during heating in both berry seed oils. Melting temperature of stable polymorph and crystallization temperature (-21.29 and -66.32 °C, respectively) of raspberry seed oil are lower than these temperatures (-19.03 and -61.36 °C, respectively) for blackberry seed oil. The reason for this lies in a higher content of linolenic acid in the raspberry than in blackberry seed oil. Namely, increasing the number of double-bonds in fatty acids affects decrease of triacylglycerols melting and crystallization temperatures. Despite the fact that these oils are highly unsaturated, examined berry seed oils are more oxidatively stable compared to the pure unsaturated fatty acids. The reason for this is that during the extraction of oils from the seeds, in addition to triacylglycerols, antioxidants, naturally present in the seeds, were extracted.

Obtained kinetic parameters ( $E_a$ ,  $k_{25}$  ( $k$  at 25 °C) and  $k_{120}$  ( $k$  at 120 °C)) of the oxidation process of berry seed oils, for isothermal and non-isothermal conditions, are:  $E_a = 92-102$  kJ/mol,  $k_{25} = (4.50-16.64) \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  and  $k_{120} = (9.62-13.53) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  for raspberry seed oil and  $E_a = 96-101$  kJ/mol,  $k_{25} = (3.41-6.09) \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  and  $k_{120} = (6.68-7.47) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  for blackberry seed oil. The  $k$  of raspberry seed oil is about 1.5 to 2 times higher than that of blackberry seed oil, which indicates that blackberry seed oil is more stable in terms of oxidation. The reason for this is a higher content of linolenic acid in the raspberry seed oil at the expense of linoleic acid, compared to the content of these fatty acids in the blackberry seed oil. Namely, analysis of oxidative stability of pure fatty acids showed that fatty acids, with a higher number of double-bonds in the molecule, are more susceptible to the oxidation.

**Key words:** raspberry seed, blackberry seed, seed flour, seed oil, thermal analysis, DSC, MDSC, TG, oxidation of oil, oxidation kinetic parameters.

**Scientific field:** Physical Chemistry

**Specialized scientific field:** Chemical Kinetics and Thermodynamics

**UDK number:**



## Sadržaj:

1.UVOD.....	1
1.1. Jagodasto voće, seme i ulje iz semena jagodastog voća .....	1
1.2. Masti, oksidacija i polimorfizam .....	5
1.2.1. Oksidacija masti i ulja.....	7
1.2.2. Polimorfizam masti i ulja .....	12
1.3. Metode termalne analize ( <i>DSC, MDSC, TGA</i> ) .....	17
1.4. Sastav semena i ulja iz semena .....	20
1.5. Ispitivanje termalnih karakteristika i oksidativne stabilnosti ulja pomoću metoda termalne analize .....	24
1.6. Cilj rada.....	37
2. EKSPERIMENTALNI DEO.....	40
2.1. Priprema brašna i ulja iz semena maline i kupine.....	40
2.2. Hemijska analiza ulja iz semena maline i kupine .....	41
2.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semena maline i kupine .....	41
2.2.2. Određivanje sadržaja masnih kiselina u uljima iz semena maline i kupine pomoću gasno-masene hromatografije ( <i>GC/MS</i> ).....	41
2.3. Termalna analiza brašna i ulja iz semena maline i kupine.....	42
2.3.1. Termalna analiza brašna iz semena maline i kupine .....	42
2.3.2. Termalna analiza ulja iz semena maline i kupine .....	44
2.3.3. Određivanje oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine pomoću <i>DSC</i> metode.....	45

2.3.4. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine pomoću <i>DSC</i> metode.....	45
2.3.4.1. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u neizotermnim uslovima.....	46
2.3.4.2. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u izotermnim uslovima.....	48
2.4. Statistička analiza .....	49
3. REZULTATI I DISKUSIJA.....	50
3.1. Termalna analiza brašna iz semena maline i kupine.....	50
3.2. Hemijska karakterizacija ulja iz semena maline i kupine.....	57
3.3. Termalna analiza ulja iz semena maline i kupine .....	62
3.3.1. Termalne karakteristike čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine .....	62
3.3.2. Oksidativna stabilnost čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine .....	73
3.3.3. Kinetički parametri ( $E_a$ , $A$ i $k$ ) procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u izotermnim i neizotermnim uslovima .....	78
4. ZAKLJUČCI .....	88
Literatura .....	90
Prilog A .....	108
Prilog B.....	114
Prilog C.....	117
Biografija.....	124

## 1.UVOD

### 1.1. Jagodasto voće, seme i ulje iz semena jagodastog voća

Kupina (*Rubus fruticosus* L.) i malina (*Rubus idaeus* L.) spadaju u grupu jagodastog voća ili sitnog jagodastog voća. U sistematici biljaka one zauzimaju mesto navedeno u tabeli 1.

**Tabela 1.** Mesto maline i kupine u sistematici biljaka [1,2].

Odeljak	Angiospermae (skrivenosemenjače)
Klasa	Dicotyledones (dikotile)
Podklasa	Rosidae (ruže)
Nadred	Rosanae (ruže)
Red	Rosales (ruže)
Familija	Rosaceae (ruže)
Podfamilija	Rosaideae (jagodasto voće)
Rod	Rubus (Tourn) L. (malina i kupina)

Rod *Rubus* L. sadrži oko 750 vrsta, koje su podeljene na kupine i maline prema načinu odvajanja ploda od peteljke u toku berbe. Naime, kod maline se plod odvaja od srži (plodišta), koja ostaje na biljci kad se plod ubere, tako da su ubrani plodovi maline sa šupljinom u sredini, dok se kod kupine ubrani plodovi odvajaju od biljke u osnovi plodišta, tako da uključuju i srž u svom sastavu. I maline i kupine su rasprostranjene širom sveta, jer uspevaju kako u tropskim tako i u umerenim i hladnim predelima, pa se s pravom smatraju kosmopolitskim biljkama. Još su stari Grci i Rimljani koristili biljke i voće iz roda *Rubus* L. u medicini i u ishrani, kao sveže ili prerađeno voće skupljeno u divljini. Tokom 18. i 19. veka neke vrste malina i kupina se kultivisu i počinje njihovo intenzivno uzgajanje [1–3]. Danas malina ima najveći privredni značaj u grupi

jagodastog voća, što potvrđuju podaci o njenoj rasprostranjenosti i obimu proizvodnje. U tabeli 2 prikazani su najveći proizvođači malina u svetu.

**Tabela 2.** Proizvodnja maline u svetu u 2012. godini [4–6].

<b>Zemlja</b>	<b>Površina (ha)</b>	<b>Tone (1000t)</b>	<b>Vrednost (u hiljadama \$ U.S.)</b>
Poljska	11502	127,05	245850
Rusija	10521	133,00	257354
Srbija	8884	70,32	185910
SAD	3947	100,77	194999
Ukrajina	2023	30,30	58630
Azerbejdžan	1052	11,60	22445
Kanada	906	10,87	21033
Velika Britanija	654	15,58	29218
Bugarska	554	4,85	9384
Litvanija	526	0,15	4063

Kao što se iz tabele 2 vidi Srbija se nalazi u samom vrhu liste zemalja po proizvodnji i izvozu malina.

Maline i kupine imaju plodove koji su lepo obojeni, ukusni, mirišljavi i sočni. Oni u sebi sadrže značajan broj organskih i neorganskih jedinjenja, koja im daju visoku hranljivu i lekovitu vrednost. Sadržaj ovih sastojaka je različit i zavisi od brojnih činilaca, kao što su: sorta, klimatski i ekološki uslovi pri gajenju, količina roda, stepen zrelosti ploda i dr. U tabeli 3 prikazan je sastav maline i kupine, koji je dalo Američko ministarstvo za poljoprivredu (*United States Department of Agriculture*).

**Tabela 3.** Sastav maline i kupine [7,8].

	<b>Malina (100g)</b>	<b>Kupina (100g)</b>
Voda (g)	85,75	88,15
Energija (kcal)	52	43
Proteini (g)	1,20	1,39
Ukupni lipidi (g)	0,65	0,49
Ugljeni hidrati (iz razlike)	11,94	9,61
Vlakna (g)	6,5	5,3
Šećeri, ukupni (g)	4,42	4,88
<b>Minerali</b>		
Kalcijum (mg)	25	29
Gvožđe (mg)	0,69	0,62
Magnezijum (mg)	22	20
Fosfor (mg)	29	22
Kalijum (mg)	151	162
Natrijum (mg)	1	1
Cink (mg)	0,42	0,53
<b>Vitamini</b>		
Vitamin C (mg)	26,2	21,0
Tiamin (mg)	0,032	0,020
Riboflavin (mg)	0,038	0,026
Niacin (mg)	0,598	0,646
Vitamin B6 (mg)	0,055	0,030
Folat (µg)	21	25
Vitamin A (µg)	2	11
Vitamin E (alfa tokoferol) (mg)	0,87	1,17
Vitamin K (µg)	7,8	19,8
<b>Lipidi</b>		
Ukupne zasićene masne kiseline (g)	0,019	0,014
Ukupne mononezasićene masne kiseline (g)	0,064	0,047
Ukupne polinezasićene masne kiseline (g)	0,375	0,280
Ukupne trans masne kiseline (g)	0,000	0,000
Holesterol (mg)	0	0

Kao što se vidi plodovi maline i kupine u sebi najviše sadrže vodu (85-89 %). Bogati su vitaminom C i mineralima kalijumom i kalcijumom. Blagotvorno dejstvo vitamina C na ljudsko zdravlje je naširoko poznato. On je pre svega jak antioksidant koji smanjuje oksidativni stres u organizmu, snižava nivo holesterola u krvi, jača imunološki sistem i povećava otpornost prema zaraznim bolestima. Kalijum i kalcijum su veoma bitni za pravilno funkcionisanje organizma. Kalijum je jedan od glavnih unutarćelijskih jona i učestvuje u održavanju kiselo-bazne ravnoteže i osmotskog pritiska u ćelijama i igra važnu ulogu u funkcionisanju ćelijske membrane. Kalcijum ulazi u sastav kostiju, a ima i ulogu u zgrušavanju krvi, provođenju bioelektričnih impulsa, grčenju mišića i dr. Plodovi maline i kupine su, takođe, bogati pektinima, koji mogu preventivno da deluju na bolesti srca tako što smanjuju visok nivo holesterola u krvi. Hrana bogata pektinima, takođe, može blagotvorno da deluje na dijabetičare, tako što usporava oslobađanje ugljenih hidrata u krvotok i na taj način održava nivo glukoze u krvi. Pored toga, maline i kupine sadrže antioksidante i fitohemikalije (tokoferoli,  $\beta$ -karoten i elaginska kiselina) koji smanjuju rizik od pojave nekih kancera tako što deluju na slobodne radikale i neutrališu ih. Jagodasto voće je bogato fenolima, kao što su fenolna kiselina, flavonoidi i antocijanini, a utvrđeno je da ove komponente imaju antikancerogeno, antiinflamatorno i antineurodegenerativno dejstvo [9–14].

Zbog ovih svojih odlika plodovi maline i kupine su jako poželjni u ljudskoj ishrani, jer svojim sastojcima blagotvorno i preventivno deluju na ljudsko zdravlje. Pored toga što se u ishrani koriste kao sveži plodovi, ovo voće može da se prerađuje na različite načine za dobijanje proizvoda koji su izuzetno traženi na tržištu: sirup, vino, sok, slatko, prirodni liker, kompot, džem, marmelada, žele, kandirano voće, sladoled i dr. Takođe, gledano sa ekonomske strane mnogo je isplativije izvoziti i prodavati gotove proizvode, umesto sirovih plodova voća.

Pri preradi u prehrambenoj industriji kod najvećeg broja biljaka koriste se celi plodovi. Međutim za dobijanje nekih proizvoda koriste se samo određeni delovi plodova, uglavnom mesnati deo ploda (mezokarp), a njihovo seme se odbacuje kao nusproizvod. Takvi proizvodi su uglavnom sokovi, džemovi, koncentrat sokova, vina i dr. A odbačeno seme se koristi kao jeftina stočna hrana ili se jednostavno baca. U poslednje vreme dosta pažnje se posvećuje što boljem iskorišćavanju poljoprivrednih sirovina pri

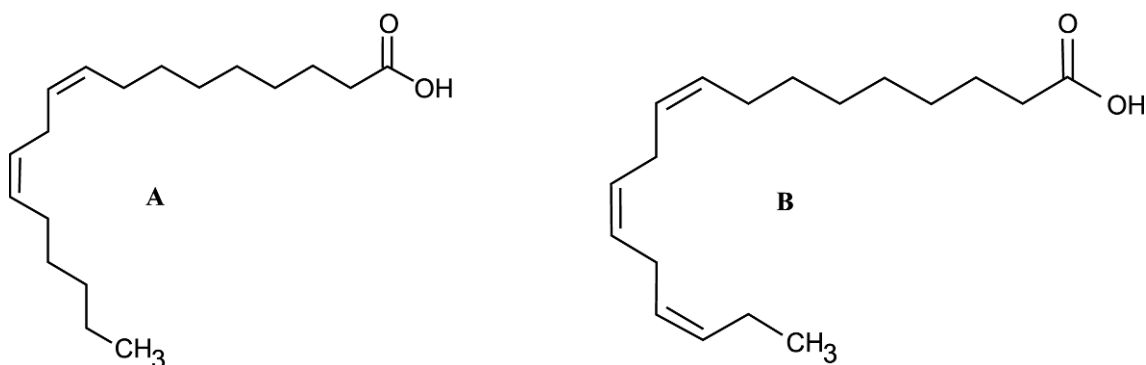
njihovoj preradi u odgovarajuće prehrambene proizvode [15]. Zbog toga kao sirovine za dobijanje novih proizvoda počinju da se koriste nusproizvodi i otpad koji se javljaju u procesu prerade. Na taj način se pojeftinjuje proizvodnja i proširuje se paleta prehrambenih proizvoda. Kad je reč o malinama i kupinama pri njihovoj preradi u neke od gore pomenutih proizvoda (sirup, vino, sok, marmelada, žele i dr.) kao nusproizvod se javlja njihovo seme čija bi moguća upotreba kao nove sirovine povećala asortiman proizvoda od jagodastog voća na tržištu, a samim tim i poboljšala ekonomiju prerade ovog voća. Upotreba semena jagodastog voća je moguća, jer ono sadrži biološki vredne sastojke kao što su: elaginska kiselina, polifenoli, tokoferol, nezasićene masne kiseline i dr. Jedan od mogućih proizvoda iz semena jagodastog voća jeste ulje [16].

## **1.2. Masti, oksidacija i polimorfizam**

Masti i ulja su važni sastojci u ljudskoj ishrani, kako u pogledu hranljivih vrednosti tako i u pogledu organoleptičkih svojstava (miris, ukus). Kako su dokazi o blagotvornom dejstvu biljnih ulja na zdravlje ljudi sve dostupniji, tako i potrošači sve više koriste biljna ulja u ishrani umesto životinjske masti. Jestiva ulja se uglavnom sastoje od triglicerida, gde su tri masne kiseline esterifikacijom vezane za molekul glicerola. Masne kiseline su komponente od životnog značaja u ljudskoj ishrani, ne samo kao izvor energije, već i kao gradivne jedinice u svim ćelijama, jer u obliku fosfolipida učestvuju u izgradnji ćelijske membrane. One imaju veliku energetska vrednost, oko dva puta veću u odnosu na proteine i ugljene hidrate. Klasifikuju se prema stepenu zasićenja, pa tako zasićene masne kiseline nemaju dvostruke veze u svom lancu, dok monozasićene (*monounsaturated fatty acid, MUFA*) imaju jednu dvostruku vezu u svom lancu. Polinezasićene (*polyunsaturated fatty acid, PUFA*) imaju dve ili više dvostrukih veza u svom lancu. Ulja iz semena sadrže masne kiseline različitih dužina ugljeničnog lanca, ali uglavnom se ti lanci sastoje od 16, 18 ili 20 C atoma. Dve masne kiseline koje mogu da se nađu u biljnim uljima su esencijalne masne kiseline - linolna i linoleinska. Ove masne kiseline su, pored brojnih fitohemikalija (kao što su tokoferoli, karotenoidi, fenolna i polifenolna jedinjenja [17–19]) koje se takođe nalaze u uljima dobijenim iz različitih biljaka, od velikog značaja u ljudskoj ishrani. Esencijalne masne kiseline su polinezasićene masne kiseline, koje u organizmu čoveka i životinja ne mogu da se

sintetišu, ali igraju važnu ulogu u metaboličkim procesima [17–23], pa stoga moraju da se unose preko hrane. Pri nedostatku ovih masnih kiselina u organizmu, njihovo mesto zauzimaju trans-masne kiseline, koje nastaju industrijskom preradom biljnih ulja, a smatraju sa glavnim uzrokom pojave ateroskleroze. Zato su ulja bogata esencijalnim masnim kiselinama veoma poželjna u ishrani čoveka.

I linolna i linoleinska masna kiselina imaju po 18 C atoma u svom molekulu, s tim što linolna ima dve, a linoleinska tri dvostruke veze u svom ugljeničnom lancu (slika 1). Kod linolne kiseline prva dvostruka veza nalazi se iza šestog C atoma računato sa metil (CH<sub>3</sub>) kraja ugljeničnog niza, pa je ona ω-6 masna kiselina, dok je linoleinska ω-3 masna kiselina.



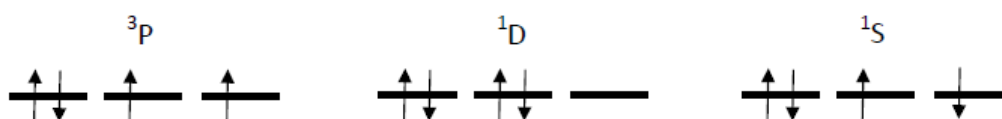
*Slika 1. Strukturna formula (A) linolne i (B) linoleinske masne kiseline.*

Postojanje dvostrukih veza kod esencijalnih masnih kiselina čini da su one osetljivije na oksidaciju od zasićenih masnih kiselina, pa samim tim i ulja koja su bogata esencijalnim masnim kiselinama su osetljivija od zasićenih ulja. Proces oksidacije polinezasićenih masnih kiselina tokom skladištenja i korišćenja veoma utiče na kvalitet ulja i proizvoda koji u sebi sadrže ulje. Pri oksidaciji dolazi do razlaganja hranljivih i stvaranja otrovnih jedinjenja i ulje postaje neprijatnog mirisa i ukusa, štetno i opasno po zdravlje [16,24]. Hemijski mehanizmi kojima se objašnjava oksidacija jestivih ulja su: autooksidacija i fotosenzitivna oksidacija [25].



### 1.2.1. Oksidacija masti i ulja

Poznato je da atomski kiseonik ima ukupno 8 elektrona, koji popunjavaju elektronske orbitale, po Paulijevom principu isključenja, na sledeći način:  $1s^2 2s^2 2p^4$ . Pošto su 2p orbitale samo delimično popunjene, one mogu da se popunjavaju na tri načina, raspoređivanjem elektrona u  $2p_x$ ,  $2p_y$  i  $2p_z$  orbitalama, kao što je prikazano na slici 2.

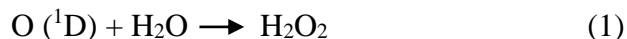


*Slika 2. Elektronske konfiguracije  $^3P$ ,  $^1D$  i  $^1S$  delimično popunjenih 2p orbitala atomskog kiseonika.*

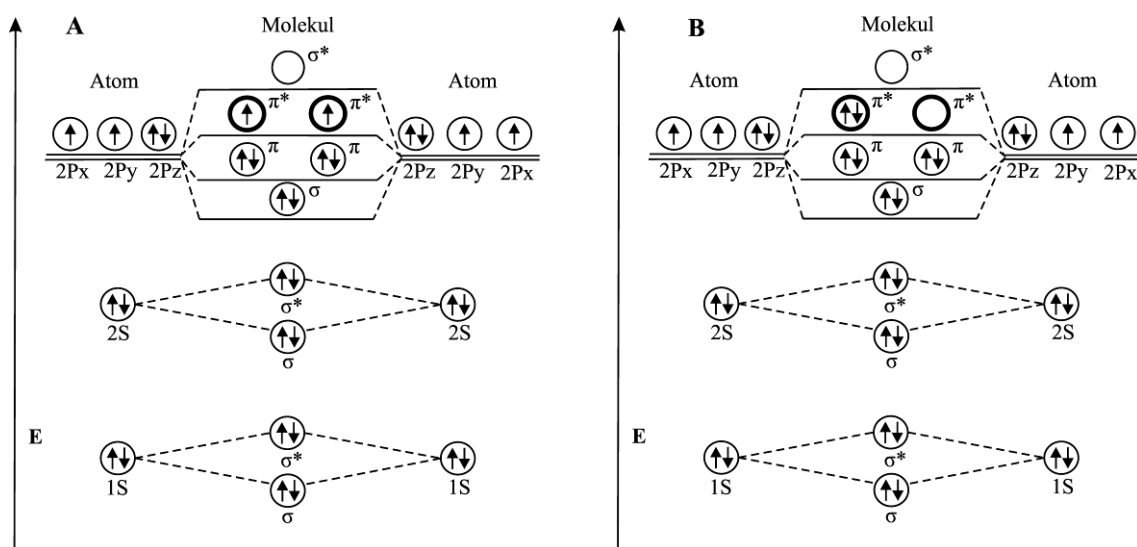
Prema prvom Hundovom pravilu konfiguracija osnovnog stanja odgovara onoj popunjenosti orbitala koja daje najveću multipletnost, a multipletnost je data kao  $2s + 1$ , gde je  $s$  spin, koji kod elektrona može da bude  $\pm 1/2$ . Elektronska konfiguracija označena sa  $^3P$  (slika 2) ima multipletnost 3 (zato se ovo stanje naziva "triplet"), dok druge dve konfiguracije, označene sa  $^1D$  i  $^1S$ , imaju multipletnost 1 (zato se ova stanja nazivaju "singlet"). Osnovno stanje atomskog kiseonika je  $^3P$  i u njemu atom kiseonika ima dva nesparena elektrona (ponaša se kao "biradikal"). Prema drugom Hundovom pravilu, za stanja čije dve konfiguracije imaju istu multipletnost, konfiguracija s najvećim orbitalnim ugaonim momentom ( $L$ ) ima najmanju energiju. Konfiguracija  $^1D$  ima veću  $L$ -vrednost i manju energiju od konfiguracije  $^1S$ , pa predstavlja prvo pobuđeno (ekscitovano) stanje atomskog kiseonika. Konfiguracija  $^1S$  je drugo pobuđeno stanje atomskog kiseonika.

Prisustvo dva nesparena elektrona daje  $^3P$  kiseoniku dva reaktivna mesta na kojima mogu da se grade veze s drugim atomima ili molekulima. Zbog toga kiseonik u  $^3P$  osnovnom stanju može lako da reaguje sa vodonikovim atomom iz C-H veze ili iz molekula koji sadrže vodonik ili da reaguje s molekulima koji imaju nesparene elektrone. Ipak, ove reakcije ne dozvoljava princip očuvanja spina. Za razliku od  $^3P$

stanja (tripletno osnovno stanje), prvo pobuđeno stanje atomskog kiseonika ( $^1D$ ) ima praznu jednu 2p orbitalu, pa je pobuđeni molekul elektrofilniji i sklon je građenju veza u tzv. adicionim reakcijama, kao što je slučaj u reakciji:



Slično je objašnjenje i za molekulski kiseonik. Dijagram molekularskih orbitala može da se napravi na osnovu teorije molekularskih orbitala, i prikazan je na slici 3.



**Slika 3.** Energetski dijagram za molekulski kiseonik ( $O_2$ ): (A) tripletno stanje, (B) singletno stanje [26].

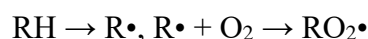
U molekulskom kiseoniku ima 16 elektrona koji mogu da se smeste u molekulske orbitale dajući elektronsku konfiguraciju:  $(\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\sigma_{2p})^2(\pi_{2p})^4(\pi_{2p}^*)^2(\sigma_{2p}^*)$ . Ovakva elektronska konfiguracija pokazuje da između dva atoma kiseonika postoji dvoguba veza i da su  $\pi_{2p}^*$  orbitale samo do pola popunjene. Kao i kod atomskog kiseonika, postoje tri različita stanja koja odgovaraju različitom rasporedu ovih elektrona. Ta stanja su označena sa  $^3\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$  i  $^1\Sigma_g^-$ . Osnovno stanje molekulskog kiseonika je tripletno stanje ( $^3\Sigma_g^+$ ) i odgovara  $^3P$  stanju kod atomskog kiseonika. Zato je i molekulski kiseonik biradikal. Iako su termodinamički veoma povoljne, mnoge

reakcije molekuskog kiseonika su veoma spore zbog pravila spinskog ograničenja, što je i eksperimentalno potvrđeno [27].

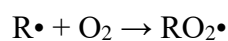
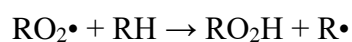
Reakcija oksidacije jestivih ulja može da se odvija u prisustvu atmosferskog kiseonika, koji je u tripletnom stanju ( $^3\text{O}_2$ ) i ona se objašnjava mehanizmom autooksidacije. Tripletni kiseonik reaguje s lipidnim radikalima koji nastaju pri termolizi lipida, jer na višim temperaturama dolazi do raskidanja kovalentnih veza unutar molekula masnih kiselina. Nezasićene masne kiseline homolizuju (cepaju se na dva radikala, pri čemu od neutralnog molekula nastaju dva radikala sa po jednim elektronom iz raskinute veze) na nižim temperaturama nego kod zasićenih masnih kiselina, što čini ulja bogata nezasićenim masnim kiselinama podložnijim procesu oksidacije. Neposredna reakcija atmosferskog kiseonika s nezasićenim kiselinama nije izvodljiva s termodinamičke tačke gledišta, jer je potrebna velika energija aktivacije (145-270 kJ/mol). Fotosenzitivna oksidacija se odvija u prisustvu singletnog kiseonika ( $^1\text{O}_2$ ), koji je elektrofilni molekul i neposredno reaguje s delovima molekula koji imaju veliku elektronsku gustinu, kakvi su recimo dvostruke veze kod nezasićenih masnih kiselina. Singletni kiseonik nastaje iz osnovnog stanja kiseonika pobuđivanjem UV-zračenjem ili kroz aktivaciju sudarima s hromoforama (konjugovani alkeni ili aromatični molekuli) u pobuđenom stanju. Autooksidacija ulja je jako zavisna od temperature i s porastom temperature brzina oksidacije se povećava [28,29], dok na fotosenzitivnu oksidaciju temperatura ima mali uticaj a zračenje ima najveći uticaj [30,31]. Fotosenzitivna oksidacija ulja može da se svede na najmanju meru ako se za čuvanje ulja i proizvoda koji u sebi sadrže ulje koristi ambalaža koja ne propušta svetlost.

Autooksidacija masti je lančana reakcija slobodnih radikala koja se odvija kroz sledeće faze (R-lipidni alkil, In-inhibitor) [32]:

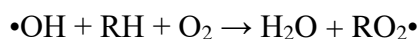
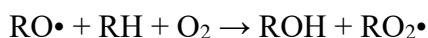
– Početak (inicijacija)



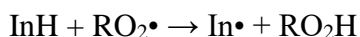
– Proširivanje (propagacija)



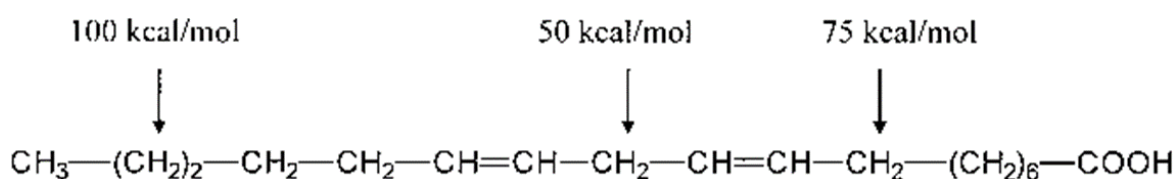
– Grananje



– Završetak (terminacija)



Za početak procesa autooksidacije potrebno je da u sistemu nastane slobodni radikal, a on u slučaju masti i ulja najlakše nastaje uklanjanjem atoma vodonika iz molekula masne kiseline, pri čemu nastaje lipidni alkil radikal. Toplota, prisustvo nekih metalnih jona kao katalizatora ili ultraljubičasto zračenje mogu da ubrzaju nastanak slobodnih radikala iz masnih kiselina [33]. Energija koja je potrebna za uklanjanje atoma vodonika iz molekula masne kiseline zavisi od položaja C atoma u molekulu kiseline za koji je vezan taj vodonik. Na slici 4 prikazana je ta zavisnost [26].

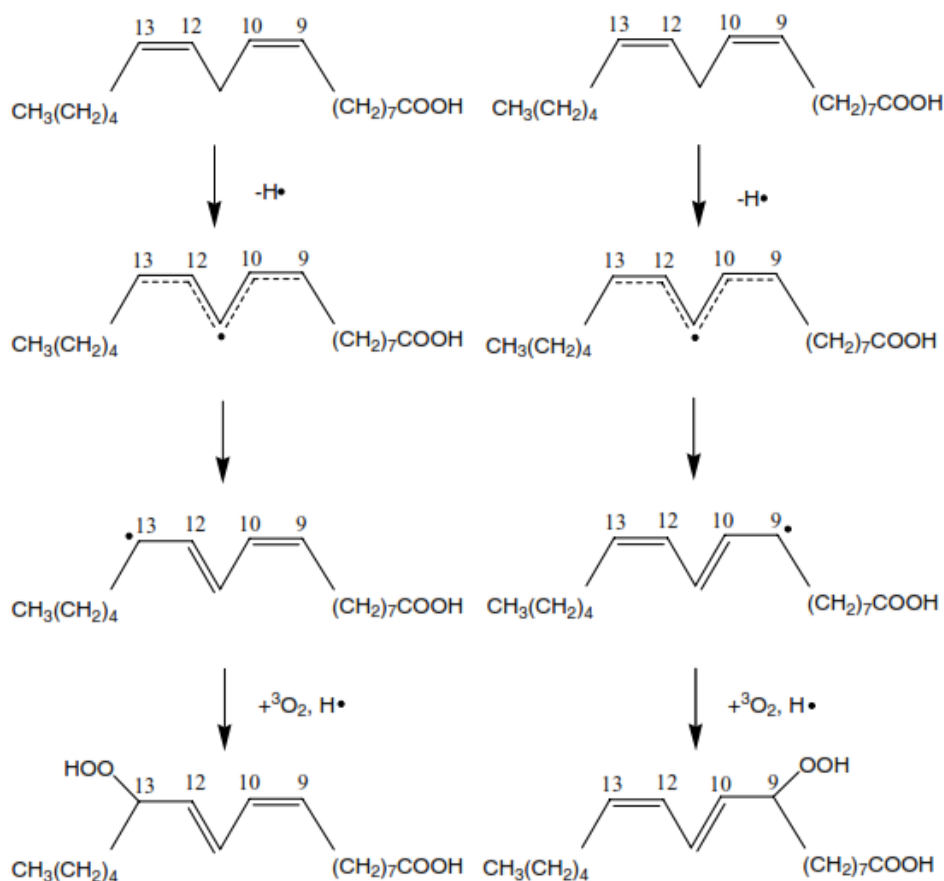


*Slika 4. Energija potrebna za uklanjanje atoma vodonika u zavisnosti od njegovog položaja u molekulu masne kiseline [26].*

Vidi se da je najmanja energija potrebna za vodonik koji se nalazi na C atomu smeštenom između dve dvostruke veze, što ukazuje da su polinezasićene masne kiseline, kakve su i esencijalne, najosetljivije na proces autooksidacije.

Tokom procesa autooksidacije prvo nastaju peroksidi (primarni oksidacioni proizvodi) koji se dalje razgrađuju do manjih molekula kao što su aldehidi, ketoni, alkoholi i ugljovodonici (sekundarni oksidacioni proizvodi). Užegao i neprijatan miris koji se

oseća kod masti koje su oksidovale upravo potiče od ovih jedinjenja. Na slici 5 je prikazana oksidacija linolne masne kiseline do odgovarajućeg peroksida:



*Slika 5. Šematski prikaz reakcije oksidacije linolne masne kiseline (18:2) [33].*

Postoje različite metode pomoću kojih može da se prati oksidacija lipida. Tako promene u hemijskim, fizičkim ili organoleptičkim svojstvima masti i ulja koje nastaju tokom procesa oksidacije mogu da posluže za procenu stepena oksidacije posmatranih lipida. Tokom godina, sprovedena su mnogobrojna ispitivanja procesa oksidacije lipida pomoću *Rancimat* metode, određivanjem peroksidnog broja, određivanjem anizidne vrednosti, pomoću gasne hromatografije, spektrofotometrijskom i NMR analizom [26,34]. Međutim, oksidacija ulja je egzotermna reakcija i tokom nje dolazi do oslobađanja toplote koja može da se meri primenom diferencijalne skenirajuće

kalorimetrije (*DSC*). Ova metoda je jednostavna, ne zahteva puno vremena, kao ni korišćenje nekih otrovnih hemikalija, tako da *DSC* predstavlja metodu izbora za rutinske analize u industriji ulja i masti [32,35–39]. U poslednje vreme *DSC* je jedna od najčešće korišćenih tehnika za određivanje oksidativne stabilnosti različitih tipova ulja.

### 1.2.2. Polimorfizam masti i ulja

U mnogim prehrambenim proizvodima, tokom procesa prerade, važna je mogućnost kontrole kristalizacije lipida radi dobijanja kristalne faze željenih odlika (broj, veličina i disperzija kristalnih čestica, vrsta polimorfnog oblika). U najvećem broju namirnica, kristalizacija molekula triacilglicerola (*TAG*) je ta koja najviše utiče na željeni kvalitet proizvoda, mada ponekad to može da bude i kristalizacija nekih drugih lipida (monoacilglicerola, diacilglicerola, fosfolipida i dr). Dobra kontrola kristalne mikrostrukture vodi proizvodima željenih teksturnih osobina i fizičkih odlika. Takođe, kristalizacija se često koristi da poboljša odlike ulja tokom njihove prerade. Tako, pri proizvodnji različitih funkcionalnih masti, kristalizacija se koristi za frakcionisanje (razdvajanje) na osnovu razlika u njihovoj temperaturi topljenja.

Postoji nekoliko aspekata u kristalizaciji lipida koji je čine jedinstvenom u odnosu na kristalizaciju drugih komponenata hrane (voda, šećeri, soli i dr.). Oni se odnose na složeni molekulski sastav prirodnih masti i ulja, kao i na orijentaciju molekula triacilglicerola. Približno 98 % masti i ulja čine molekuli triacilglicerola, dok ostala 2 % čine više polarni lipidi kao što su diacilgliceroli (*DAG*), monoacilgliceroli (*MAG*), slobodne masne kiseline (*free fatty acid, FFA*), fosfolipidi, glikolipidi i dr. Iako molekuli *TAG*-a formiraju glavnu kristalnu fazu, beznačajne komponente (nečistoće) mogu da odigraju značajnu ulogu u procesu kristalizacije, tako da npr. kod prečišćenih (rafinisanih) ulja kristalizacija može da bude značajno drugačija od kristalizacije početnog neprečišćenog ulja.

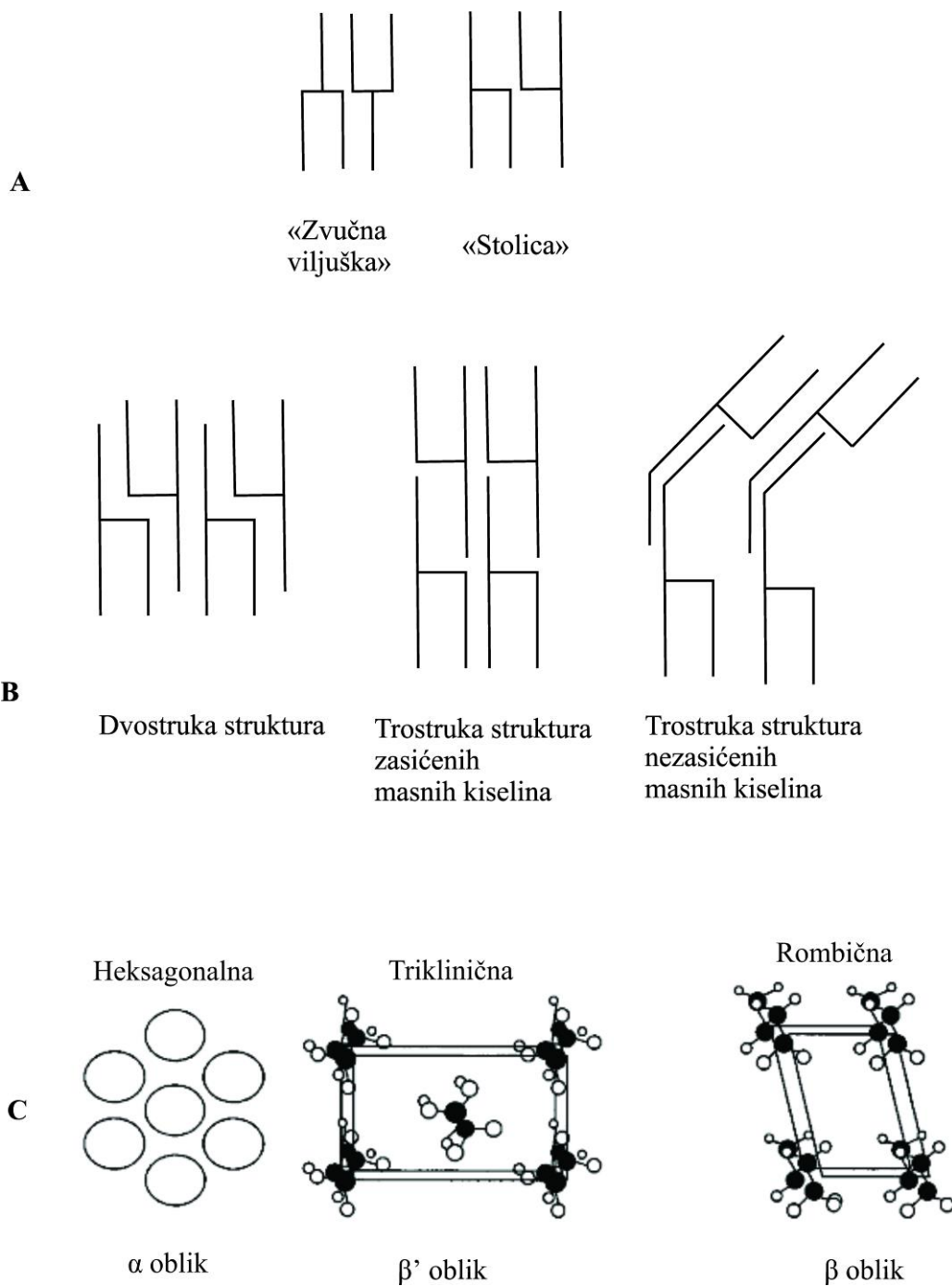
Prirodne masti, takođe, sadrže široki spektar molekula *TAG*-a. S obzirom da triacilgliceroli u svom sastavu imaju tri molekula masnih kiselina koje su prikačene na molekul glicerola, promene u dužini ugljeničnog lanca i stepenu nezasićenosti masnih kiselina daju široki spektar komponenata. Priroda molekula *TAG*-a je takva da pri

kristalizaciji oni mogu da grade različite oblike u kristalnoj rešetki, što znači da isti molekul može da kristališe u različite kristalne oblike u zavisnosti od uslova kristalizacije [40]. Ova pojava se naziva polimorfizam masti. Molekulska struktura TAG-a i nekoliko spoljašnjih činilaca kao što su temperatura, pritisak, brzina kristalizacije i nečistoće utiču na polimorfizam [41]. Sve ovo čini proces kristalizacije prirodnih masti i ulja jako složenim.

Molekuli TAG-a, zbog tri duga ugljenična lanca masnih kiselina, prilikom pakovanja u kristalnoj rešetki najčešće zauzimaju konfiguraciju „stolice“ ili „zvučne viljuške“ (slika 6A). Pri slaganju ovih konfiguracijskih oblika u kristalu, triacilgliceroli mogu graditi dvostruku ili trostruku strukturu ugljeničnih lanaca, kako je prikazano na slici 6B. U dvostrukoj strukturi ugljeničnih lanaca parovi molekula TAG-a se preklapaju, dok se u trostrukoj strukturi ne preklapaju.

Uopšteno, molekuli TAG-a sa tri zasićene masne kiseline u kristalu imaju dvostruku strukturu ugljeničnih lanaca, dok molekuli TAG-a koji sadrže masne kiseline s različitom strukturom (dužina lanaca i zasićenje) imaju trostruku strukturu ugljeničnih lanaca. Lutton [42] tvrdi da kad se masne kiseline u molekulu TAG-a razlikuju za više od četiri C atoma, gradi se trostruka struktura ugljeničnih lanaca. Ova struktura je, takođe, primećena kod TAG molekula koji sadrže *cis*-nezasićene masne kiseline, zato što kod njih dolazi do lomljenja ugljeničnog lanca [43]. *Trans*-nezasićene masti se ugrađuju u kristalnu strukturu na isti način kao zasićene masne kiseline.

Na osnovu subćelijske strukture jedinične ćelije kristalne rešetke, polimorfni oblici masti i ulja se najčešće jednostavno klasifikuju u tri kategorije,  $\alpha$ ,  $\beta'$  i  $\beta$  (slika 6C) [41], s porastom stabilnosti.  $\alpha$  je najmanje stabilni oblik s najnižom temperaturom i toplotom topljenja, dok je  $\beta$  najstabilniji oblik s najvećom temperaturom i toplotom topljenja. Svaki polimorfni oblik ima različito rastojanje između paralelnih acil grupa molekula TAG-a, što se koristi za njihovo razlikovanje pomoću difraktograma, tabela 4. Na osnovu jedinstvene konfiguracije molekula unutar kristalne rešetke, svaki polimorf ima različitu kristalografsku jediničnu ćeliju.



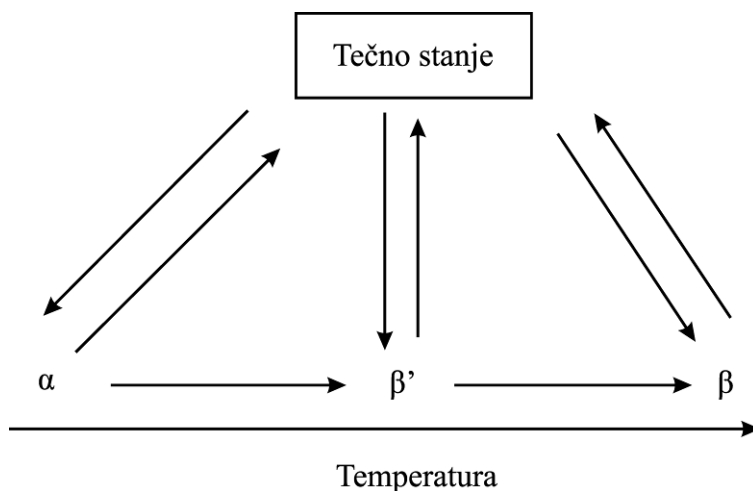
**Slika 6.** (A) Konfiguracija molekula TAG-a u kristalnoj rešetki; (B) Slaganje molekula TAG-a u kristalnoj rešetki; (C) Polimorfni oblici i odgovarajuće jedinične ćelije kristalne rešetke [41].



**Tabela 4.** Karakteristike polimorfnih oblika lipida na osnovu rendgenske analize, [44].

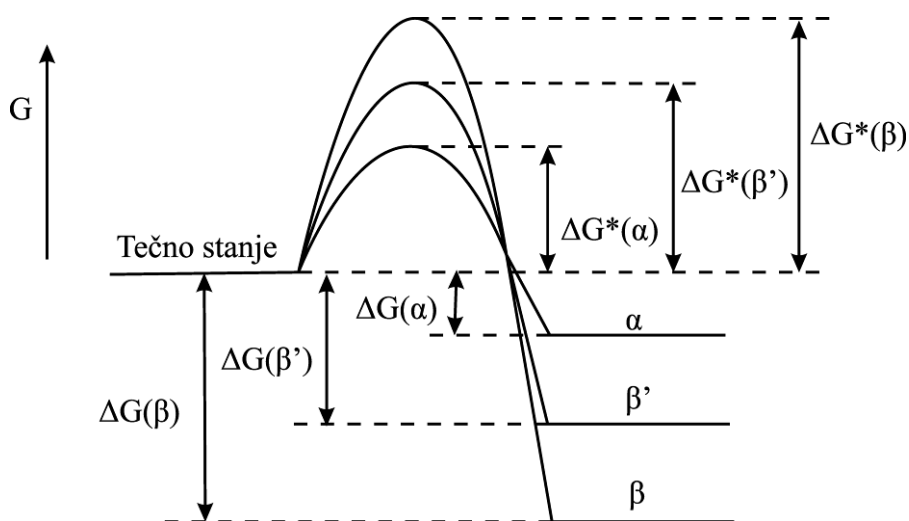
Polimorfni oblik	Jedinična ćelija	Difrakcioni pikovi	Međuravansko rastojanje (Å)
$\alpha$	Heksagonalna	Jedan intenzivan i širok	4,15
$\beta'$	Ortorombična	Dva intenzivna	4,2 i 3,8
$\beta$	Triklinična	Jedan intenzivan	4,6

Postoje dva tipa polimorfizma: enantiotropski i monotropski [45]. Enantiotropski polimorfizam se karakteriše većim brojem stabilnih kristalnih oblika u datom temperaturskom opsegu i prelazak iz jednog kristalnog oblika u drugi je reverzibilan proces. Kod monotropskog polimorfizma postoji samo jedan stabilni kristalni oblik i prelazak drugih kristalnih oblika u ovaj stabilni oblik je ireverzibilan proces. Lipidi pokazuju monotropski polimorfizam, što znači da iz tečnog stanja, hlađenjem, oni mogu da pređu u bilo koji od tri polimorfna oblika, i obrnuto, sva tri polimorfna oblika mogu direktno da pređu u tečno stanje zagrevanjem. Međutim, polimorfni oblici mogu direktno da prelaze iz jednog u drugi oblik samo sledećim redosledom  $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$  [46]. Monotropski polimorfizam kod masti i ulja šematski je prikazan na slici 7.



**Slika 7.** Monotropski polimorfizam kod lipida [47].

Relativna stabilnost polimorfni oblika, kao i pokretačka snaga za prelazak iz jednog u drugi oblik na konstantnoj temperaturi i pritisku su određeni njihovom Gibsovom slobodnom energijom (G). Polimorfni oblik koji ima najnižu Gibsovu slobodnu energiju je najstabilniji. Na slici 8 prikazan je odnos Gibsovih slobodnih energija različitih polimorfni oblika lipida. Kao što se vidi, prelazak iz tečnog u čvrsto stanje (energetski stabilnije) odvija se kroz nestabilno prelazno stanje, što zahteva prevazilaženje energetske barijere. Polimorfni oblik sa najmanjom slobodnom energijom topljenja ( $\Delta G$ ), tj., najmanje stabilni oblik, takođe, ima i najnižu energetska barijeru ( $\Delta G^*$ ) za prelazak (nastajanje) iz tečnog stanja. Zato se pri kristalizaciji u prehlađenim (*subcooled*) mastima nestabilni oblici prvi formiraju [41]. Pored toga, stabilni polimorfi imaju više temperature i toplote topljenja nego manje stabilni kristalni oblici.



**Slika 8.** Šematski prikaz Gibsovih slobodnih energija topljenja ( $\Delta G$ ) i aktivacije ( $\Delta G^*$ ) za tri polimorfna oblika ( $\alpha$ ,  $\beta'$  i  $\beta$ ) triacilglicerola [47].

Vrednosti Gibsove slobodne energije su najveće za  $\alpha$  oblik (najmanja gustina pakovanja u kristalu), srednje za  $\beta'$  oblik i najmanje za  $\beta$  oblik (najveća gustina pakovanja u kristalu). Prelazak nestabilnog polimorfa u stabilniji oblik može da se postigne blagim zagrevanjem masti iznad temperature topljenja manje stabilnog kristalnog oblika.

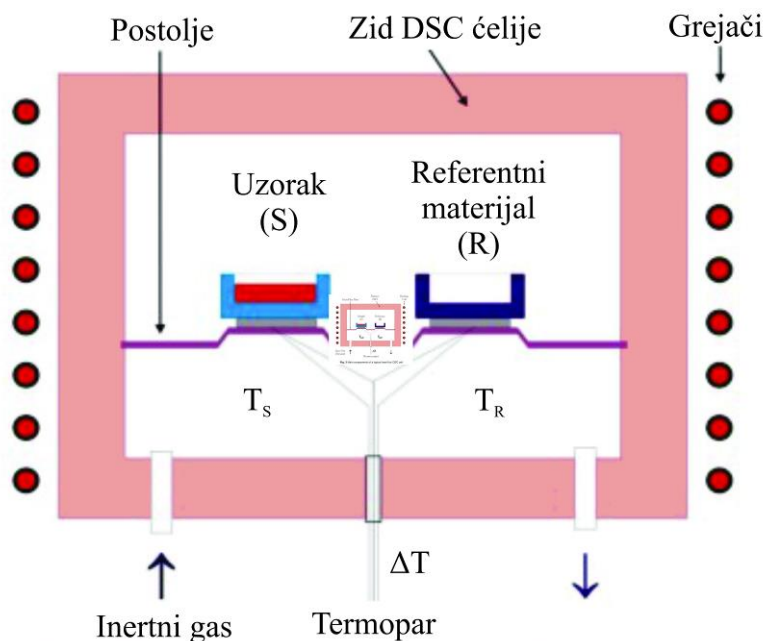
Zagrevanje najpre dovodi do topljenja nestabilnog oblika, a odmah zatim i do rekristalizacije u stabilniji oblik. Prelazak u stabilniji oblik može da se odvija i direktno (kao što se vidi na slici 7), bez topljenja, tokom nekog vremenskog perioda. Razlika između polimorfa u Gibsovoj slobodnoj energiji je pokretačka snaga za ovaj prelazak [43].

### 1.3. Metode termalne analize (*DSC, MDSC, TG*)

Pojam termalne analize (TA) odnosi se na praćenje promena bilo koje fizičke osobine ispitivane supstance u toku njenog izlaganja određenom toplotnom tretmanu uz strogu kontrolu temperature. Fizička svojstva koja se tom prilikom najčešće prate su:

- entalpija (i sa njom povezano svojstvo, toplotni kapacitet) – odgovarajuća metoda termalne analize naziva se kalorimetrija.
- masa – metoda termalne analize je termogravimetrija (*TG*).

Kalorimetrija je primarna tehnika za određivanje toplotnih osobina materijala i ona je jedina metoda pomoću koje neposredno može da se meri entalpija procesa od interesa. Kalorimetrija se učestalo koristi u hemiji, biohemiji, biologiji ćelije, biotehnologiji, farmakologiji, kao i za ispitivanje nanomaterijala. Među različitim tipovima kalorimetrije, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*DSC*) je najpopularnija. *DSC* je eksperimentalna tehnika koja meri energiju potrebnu za održavanje temperaturske razlike što bliže nuli između ispitivane supstance (S) i referentnog materijala (R), koji su podvrgnuti identičnom temperaturskom programu (grejanje, hlađenje, izotermalni uslovi). Razlika u energiji potrebnoj za održavanje uzorka i referentnog materijala na istoj temperaturi je mera energetske promene u ispitivanom uzorku (u odnosu na referentni materijal). Na slici 9 je prikazana šema ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra.



**Slika 9.** Šema ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra [48].

Radi efikasnijeg ispitivanja i određivanja termalnih svojstava različitih tipova uzoraka, razvijene su različite tehnike zasnovane na *DSC* metodi. Jedna od najčešće korišćenih tehnika jeste modulovana diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*MDSC*). Primenom tradicionalne (standardne) *DSC* metode, meri se razlika u toplotnom toku između uzorka i referentnog materijala, koji se greju, hlade ili drže na stalnoj temperaturi, pri čemu se temperatura uvek menja linearno, brzinom ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) koju zada eksperimentator. Kao rezultat toga dobija se samo jedan signal (toplotni tok), koji je u stvari zbir svih termalnih događaja nastalih u nekoj tački temperature ili vremena tokom eksperimenta. Za razliku od standardne *DSC* metode kod *MDSC* metode postoje istovremeno dve brzine grejanja: linearna brzina grejanja koja pruža slične podatke o uzorku kao standardni *DSC* i sinusoidna ili modulovana brzina grejanja koja omogućava istovremeno merenje i toplotnog kapaciteta uzorka. Za sinusoidni način grejanja operator treba da unese modulacioni period (s) i amplitudu modulacije temperature ( $\pm ^{\circ}\text{C}$ ). Poboljšanje *MDSC* metode u odnosu na tradicionalnu *DSC* metodu ogleda se u tome što se ovom metodom meri ukupni protok toplote (kao i standardnom *DSC* metodom), ali i njegova komponenta toplotnog kapaciteta (reverzibilni toplotni tok) i iz njihove razlike kinetička komponenta (ireverzibilni toplotni tok) [49,50]. Zbog toga on

ima mogućnost da razdvoji složene termalne prelaze i na taj način olakšava tumačenje dobijenih rezultata. *MDSC* ne meri reverzibilnost ili ireverzibilnost prelaza. Naziv "reverzibilni" je uzet zato što je pravi toplotni kapacitet (toplota povezana s povećanjem ili smanjenjem temperature materijala) reverzibilan. Međutim, promene toplotnog kapaciteta tokom prelaza gotovo nikad nisu reverzibilne. Tako, promene u reverzibilnom signalu su povezane s promenom toplotnog kapaciteta, a one same mogu da budu i reverzibilne i ireverzibilne [51].

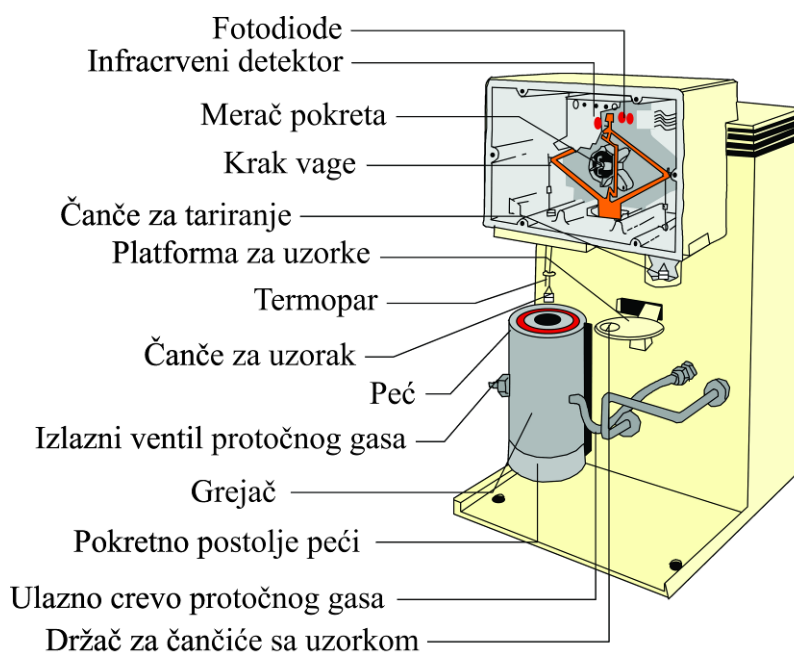
*DSC* je posebno pogodna metoda za ispitivanje hrane jer ona tokom prerade često biva podvrgnuta hlađenju ili grejanju. *DSC* je jednostavna tehnika za izvođenje i u najvećem broju slučajeva nikakva priprema uzoraka nije potrebna. Pri proučavanju hrane pomoću metoda termalne analize, mnoge fizičko-hemijske pojave mogu da se primete u temperaturskom opsegu između -100 i 300 °C. Ove termalne pojave mogu da budu kako endotermne (topljenje, denaturacija, isparavanje) tako i egzotermne (kristalizacija, oksidacija, fermentacija). Tipični uzorci hrane i podaci koji mogu da se dobiju iz njih pomoću *DSC* metode prikazani su u tabeli 5.

**Tabela 5.** Uzorci hrane i podaci koji mogu da se dobiju iz njih pomoću *DSC* metode, [52,53].

Vrsta uzorka	Dobijeni podatak
Ulja i masti	Temperatura početka topljenja/kristalizacije, polimorfizam, oksidativna stabilnost
Skrob iz brašna i pirinča	Retrogradacija*, želatinizacija, staklasti prelaz ( $T_g$ )
Biljni prahovi	Staklasti prelaz ( $T_g$ )
Paste i gelovi koji sadrže polisaharide	Specifična toplota ( $C_p$ ), temperatura početka topljenja/kristalizacije
Proteini	Denaturacija, agregacija

\* Pojava ponovne kristalizacije viskoznog rastvora skroba pri hlađenju.

Termogravimetrija (*TG*) je metoda kojom se meri količina i brzina promene mase ispitivane supstance kao funkcija temperature ili vremena u kontrolisanoj atmosferi. Koristi se prvenstveno za određivanje sastava uzorka, kao i za predviđanje njegove termalne stabilnosti na temperaturama do 1000 °C. Tehnika može da se koristi za karakterizaciju materijala koji pokazuju porast ili smanjenje mase usled razlaganja, oksidacije, dehidratacija i dr. Iz dobijenih podataka mogu da se vrše i kinetička izračunavanja. Često se pri tumačenju i analizi *TG* rezultata koristi i derivativna kriva po vremenu (temperaturi) (*DTG*). Na slici 10 je prikazana šema termogravimetrijskog analizatora.



*Slika 10. Šema termogravimetrijskog analizatora [54].*

#### 1.4. Sastav semena i ulja iz semena

Uopšteno, seme ima veoma raznolik i složen hemijski sastav koji po hranljivoj vrednosti može da se grupiše kao makronutritijenti, mikronutritijenti i druge komponente (fitohemikalije kao što su fenolni antioksidanti, elaginska kiselina, koji mogu da imaju povoljno dejstvo na zdravlje).

U makronutritijente spadaju proteini, ugljeni hidrati, masti i dijetna vlakna (fiber). *Bushman* i saradnici [16] su pokazali da seme crvene maline sadrži 12,2 % proteina i 11-23 % ulja. Od svih makronutritijenata najveći značaj ima ulje, odnosno masne kiseline koje ulaze u njegov sastav. U ulju dobijenom iz semena maline i kupine najveći udeo imaju nezasićene masne kiseline (oko 95 %), od čega su najviše zastupljene esencijalne masne kiseline, linolna i linoleinska (od 80 do 85 %) [55–59].

U poslednjih par decenija velika pažnja je posvećena ispitivanju uticaja esencijalnih masnih kiselina ( $\omega$ -3 i  $\omega$ -6) na zdravlje ljudi i sprečavanje (prevenciju) različitih bolesti. Nedostatak ovih masnih kiselina u ishrani može da izazove pojavu suve i grube kože, ekceme i osip, slabu kosu i slabe nokte [32]. Ove masne kiseline su neophodne za pravilan rad mozga i nervnog sistema, kao i za normalan rast i razvoj dece [60,61]. U nedostatku esencijalnih masnih kiselina u ishrani rane sporije zaceljuju, javlja se dijareja, anemija, a povećana je i stopa infekcija [62]. Pored toga što je esencijalna, smatra se da linolna kiselina deluje i na smanjenje *LDL* holesterola u krvi [63–67]. Pokazalo sa da povećani unos linolne kiseline smanjuje holesterol dva puta više u odnosu na oleinsku kiselinu [63]. Linoleinska kiselina takođe deluje na smanjenje holesterola, ali ne u toj meri kao linolna. Međutim, pokazano je da linoleinska kiselina ima zaštitničko dejstvo na srce i kardiovaskularni sistem. Tako ona pozitivno deluje na srčane aritmije, tromboze i upale, a što se povezuje s njenim pretvaranjem u dokozaheksaenoinsku (*DHA*) kiselinu u organizmu [67].

I linolna i linoleinska kiselina se *in vivo* pretvaraju u masne kiseline s dužim ugljeničnim lancem, koje u organizmu imaju određene biološke funkcije. Linolna se pretvara u arahidonsku masnu kiselinu (20:4n-6), od koje dalje nastaju signalni molekuli – eikosanoidi (prostaglandini, prostaciklin, tromboksan i leukotrieni), koji deluju kao lokalni regulatori i za razliku od hormona ne sintetišu se u žlezdama i ne prenose se krvlju do mesta delovanja. Oni posreduju pri osetljivosti na bol, upalama, otocima i agregaciji trombocita [68]. Linoleinska kiselina se pretvara u eikozapentaenoinsku (*EPA*) (20:5n-3), i dalje u dokozaheksaenoinsku (*DHA*) (22:6n-3). Od *EPA* se dalje sintetišu prostanoidi i leukotrieni koji imaju anti-inflamatorno i anti-agregativno dejstvo i mogu da uravnotežuju dejstvo eikosanoida. *DHA* se povezuje s mnogim povoljnim delovanjima na zdravlje uključujući smanjenje rizika od bolesti srca, kancera,

hipertenzije i autoimunih bolesti [69–73]. Takođe je pokazano da međusobni odnos  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina treba da bude što manji, jer se na taj način smanjuje rizik od pojave nekih bolesti [74].

Mikronutritijenti koji se nalaze u semenu su vitamini, provitamini i minerali [15]. U mastima rastvorni (liposolubilni) vitamini, prvenstveno, vitamini E, K i provitamin A nalaze se u uljima ekstrahovanim iz semena. Vitamin E se sastoji od tokoferola i tokotrienola. Vitamin E prvenstveno deluje kao antioksidant, tako što neutrališe slobodne radikale i sprečava oksidaciju nezasićenih masnih kiselina [75]. Vitamin A, kao retinol, nije nađen u semenu, međutim njegovi prekursori  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ -karoten jesu. Vitamin A ima mnoge funkcije u organizmu, pre svega on je neophodan za pravilno funkcionisanje vida, a deluje i kao hormon pri ekspresiji gena u jedru ćelije [76]. Vitamin A je takođe neophodan u nerazvijenim ćelijama epitela u plućima, koži, traheji za njihov normalan razvoj. Vitamin A, kao retinol, je neophodan kako u muškim tako i u ženskim reproduktivnim sistemima. On je uključen u razvoj kostiju i bitan je za normalno funkcionisanje imunog sistema [77]. Drugi karoteniodi koji su nađeni u semenu uključuju lutein, kriptoksantin i zeaksantin, a svi oni mogu da imaju antioksidativno dejstvo.

Antioksidanti su jedinjenja koja mogu da reaguju sa slobodnim radikalima i da spreče oksidaciju drugih molekula. Mnoga epidemiološka ispitivanja su pokazala da su antioksidanti prisutni u hrani povezani sa smanjenjem rizika od pojave nekih hroničnih bolesti kao što su bolesti srca, karcinomi i dijabetes [78–80]. Prirodni antioksidanti koji se nalaze u jestivom ulju iz semena uključuju pored vitamina E i karotenoida, takođe, i fenolne i polifenolne kiseline, antocijanine i elaginsku kiselinu. Fenolne komponente su se pokazale kao moćni antioksidanti [81]. Naglašeno je da polifenoli koji se nalaze u crvenom vinu sprečavaju srčane bolesti koje nastaju usled oksidacije *LDL* holesterola [81]. U tabeli 6 prikazan je literaturni pregled sadržaja antioksidanata (karotenoidi, tokoferoli, polifenoli) u nekim biljnim uljima.



**Tabela 6.** Sadržaj antioksidanata u nekim biljnim uljima.

Vrsta ulja [literatura]	Ukupni karotenoidi (mg/kg)	Tokoferoli (mg/kg)	Polifenoli (mg/kg)
Ulje iz semena maline [55,57,82,83]	39-41	1139-3600	178-205*
Ulje iz semena kupine [55,57,82]	32-34	1389-2054	227-306*
Suncokretovo ulje [18,19,84–86]	0,7	535-750	12**
Maslinovo ulje [17,18,86,87]	3,15-13,29	177-293	69-186**
Ulje iz semenki grožđa [18,83,88]	-	193-554	100-238*

\*mg GAE/kg, GAE – ekvivalent galne kiseline;

\*\*mg CAE/kg, CAE – ekvivalent kafeinske kiseline.

Iz tabele 6 se vidi da ulja dobijena ekstrakcijom iz semena maline i kupine sadrže značajno više tokoferola, polifenola i karotenoida u odnosu na komercijalna ulja (suncokretovo, maslinovo, groždano ulje). *Daniel* i saradnici [89] nalaze da elaginske kiseline ima više u semenu crvene maline i kupine nego u nekom drugom voću, a ona pokazuje antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost u malim životinjskim modelima [90,91]. *Juranić* i saradnici [92] su testirali antiproliferativni uticaj vodenog ekstrakta iz semena pet podvrsti malina na ljudske ćelije kancera debelog creva. Vodeni ekstrakti su pokazali inhibicioni efekat na proliferaciju ćelija raka, a inhibicija je bila u korelaciji sa koncentracijom elaginske kiseline. *Gođevac* i saradnici [93] su pokazali da ekstrakt iz semena kupine, kao i čiste polifenolne komponente izolovane iz njega pokazuju zaštitnički efekat na citogenetska oštećenja u ljudskim limfocitima. Ulje iz semena maline je korišćeno kao sastavni deo nekih kozmetičkih proizvoda koji imaju antiinflamatorna svojstva, a pokazalo se da ono preventivno deluje i na gingivitis, pojavu ekcema, osipa i drugih kožnih bolesti. Takođe može da se koristi kao losion za zaštitu od UV zračenja jer ga apsorbuje [83].

Ove osobine i komponente semena čine ulje hranljivo vrednim i primenljivim za dobijanje nekih novih proizvoda koji će povećati vrednost samog voća kao sirovine, ali i prihode uzgajivačima i prehrambenoj industriji.

### **1.5. Ispitivanje termalnih karakteristika i oksidativne stabilnosti ulja pomoću metoda termalne analize**

U poslednjih 30 godina došlo je do značajnog razvoja i unapređenja u oblasti termalne analize [94]. Brzi i stalni razvoj u analitičkoj instrumentaciji vodio je značajnom poboljšanju osobina instrumenata. Sve to omogućilo je bolju karakterizaciju ulja i masti, samim tim i bolje razumevanje ovih važnih sastojaka hrane. Topljenje i kristalizacija, dva najčešće korišćena fizička procesa za karakterizaciju termalnih osobina ulja, zahtevaju potrošnju ili oslobađanje toplote, tako da *DSC* predstavlja pogodnu tehniku za određivanje ovih fizičkih karakteristika ulja. Shodno tome, *DSC* je dosta korišćena tehnika za određivanje termalnih karakteristika (temperatura i entalpija kristalizacije i topljenja) različitih vrsta ulja, kao i za praćenje pogoršanja kvaliteta ulja na osnovu promena u termalnim osobinama ispitivanog ulja.

Značajno različite temperature i toplote topljenja  $\alpha$ ,  $\beta'$  i  $\beta$  kristalnih oblika, različitih tipova triacilglicerola, su navedene u literaturi [95,96]. *Hoffmann* [97] razvrstava sve *TAG* molekule u četiri grupe na osnovu njihovog sadržaja masnih kiselina: *SSS*, *SSU*, *SUU* i *UUU* (S – zasićena masna kiselina, U – nezasićena masna kiselina). Za nas su od posebnog interesa molekuli *TAG*-a koji mogu da se svrstaju u grupe *SUU* i *UUU*, jer se na osnovu sadržaja masnih kiselina u uljima iz semena maline i kupine može pretpostaviti da one preovlađuju u ovim uljima. U tabeli 7 su prikazani rezultati koje su *Tolstorebrov* i saradnici [98] dobili iz *DSC* krivih topljenja sledećih molekula *TAG*-a: *OOO*, *PPO*, *LnLnLn*, *OOLi*, *OPO*, *LiLiP*, *LnOLn*, *OOP*, *OOLn* (*P*-palmitinska, *O*-oleinska, *Li*-linolna, *Ln*-linoleinska masna kiselina).

**Tabela 7.** Termalne karakteristike nekih vrsta triacilglicerola [98].

Vrsta TAG-a	Polimorfizam, temperatura topljenja (°C)			Toplota topljenja $\beta$ kristalnog oblika (J/g)
OOO	$\alpha=-35,0$	$\beta'=-15,6$	$\beta=1,5$	113
PPO	$\alpha=17,1$	$\beta'=27,9$	$\beta=31,1$	132,6
LnLnLn	$\alpha=-47,7$	-	$\beta=-24,8$	62,1
OOLi	-	-	$\beta=-17,2$	76,5
OPO	-	-	$\beta=18,5$	140,2
LiLiP	-	-	$\beta=-8,3$	78,3
LnOLn	-	-	$\beta=-21,9$	76,4
OOP	-	-	$\beta=17,8$	119,3
OOLn	-	-	-	78,4

P-palmitinska, O-oleinska, Li-linolna, Ln-linoleinska masna kiselina.

Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da se pojedinačne vrste triacilglicerola međusobno veoma razlikuju po svojim termalnim osobinama, kako u pogledu pojave polimorfizma, tako i u temperaturama i entalpijama topljenja odgovarajućih kristalnih oblika. Temperatura topljenja čistih triacilglicerola zavisi od stepena zasićenosti masnih kiselina u njihovim molekulima. Triacilgliceroli s većim stepenom nezasićenosti se tope na nižim temperaturama, a opadanje temperature topljenja praćeno je i smanjenjem entalpije topljenja [95,96]. Ovo je predvidljivo jer triacilgliceroli s većim stepenom zasićenosti zahtevaju veću energiju pri topljenju.

Temperaturski opseg topljenja/kristalizacije i oblik pikova na *DSC* krivama pri zagrevanju/hlađenju ulja je rezultat polimorfizma ulja, termalne istorije uzorka i termalnih procesa koji se odvijaju na bliskim temperaturama (dolazi do preklapanja njihovih *DSC* signala) usled složenog sastava ulja (veliki broj različitih vrsta molekula

*TAG*-a). Tako, npr. dva ili više različita tipa molekula *TAG*-a mogu da se tope u temperaturskim intervalima koji su međusobno bliski, usled čega dolazi do njihovog preklapanja, što se ogleda u pojavi širokog i složenog pika (dva ili više maksimuma i pojava ramena) na *DSC* krivi. Ukoliko se ulje sastoji od dve ili više frakcija molekula *TAG*-a različitog stepena zasićenosti, onda na *DSC* krivama može da se javi veći broj razdvojenih pikova. Poreklo višestrukih pikova kod ulja potrebno je odrediti od slučaja do slučaja, mada u skoro svim slučajevima najveći endotermni/egzotermni pikovi na *DSC* krivama odgovaraju topljenju/kristalizaciji najzastupljenije frakcije molekula *TAG*-a u uljima. Zbog složenosti *DSC* kriva pri topljenju/kristalizaciji ulja, u literaturi se pri karakterizaciji ulja pomoću *DSC* metode uglavnom navode početak topljenja/kristalizacije (*onset temperature*,  $T_{on,m/c}$ ), završetak topljenja/kristalizacije (*offset temperature*,  $T_{off,m/c}$ ), temperaturski opseg topljenja/kristalizacije ( $\Delta T_{m/c}$ ) i entalpija topljenja/kristalizacije ( $H_{m/c}$ ). U tabelama 8 i 9 prikazani su ovi parametri za ulja koji se mogu naći u literaturi [99–102].

Zbog svog složenog i jedinstvenog sastava (pre svega velike raznovrsnosti molekula *TAG*-a, kao i njihove različite zastupljenosti), svako ulje će pri topljenju/kristalizaciji dati *DSC* krivu jedinstvenog izgleda, koja može poslužiti kao "otisak prsta" pri identifikaciji tog ulja [99,100]. *Tan* i saradnici [100] nalaze da su dva parametra sa *DSC* krive,  $T_{on}$  kristalizacije i  $T_{off}$  topljenja, datog ulja najosetljiviji pokazatelji za identifikaciju tipa ulja. Jedino ograničenje za korišćenje *DSC* metode u tu svrhu je zavisnost faznih prelaza od brzine grejanja, odnosno hlađenja. Brzina grejanja (hlađenja) ima jak uticaj na  $T_{on}$  i  $T_{off}$ . Oni preporučuju korišćenje manjih brzina grejanja (1 do 5 °C/min) jer se tad temperatursko kašnjenje (*lag*) (temperatura uzorka je uvek niža od temperature ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra, jer je potrebno određeno vreme da se toplota prenese u uzorak) svodi na najmanju meru, ispitivani sistem je bliži ravnotežnom stanju i *DSC* kriva ima bolju rezoluciju, pa dolazi do boljeg razdvajanja pikova što je jako bitno ako se vrši identifikacija ulja [99].

**Tabela 8.** Kristalizacija ulja ( $T_{on,c}$  – temperatura početka kristalizacije,  $T_{off,c}$  – temperatura završetka kristalizacije,  $\Delta T_c$  – temperaturski opseg kristalizacije,  $H_c$  – entalpija kristalizacije).

Vrsta ulja [literatura]	$T_{on,c}$ (°C)	$T_{off,c}$ (°C)	$\Delta T_c$ (°C)	$H_c$ (J/g)
Ulje iz kokosa [99,100]	2,11	-11,78	13,90	-106,5
Ulje iz palme [99,100]	17,00	-63,62	80,62	-92,9
Ulje iz palme kernel [99,100]	4,39	-7,32	11,71	-104,0
Ulje iz kukuruza [100]	-16,20	-85,71	69,51	-
Ulje iz kikirikija [100]	-2,96	-85,37	82,42	-
Ulje iz šafranike [100]	-19,56	-89,28	69,72	-
Ulje iz susama [100]	-7,23	-85,78	78,56	-
Ulje iz soje [100]	-14,13	-86,76	72,63	-
Ulje iz suncokreta [100]	-15,53	-86,14	70,61	-
Ulje iz lešnika [100]	-23,82	-85,27	61,44	-
Ulje iz oraha [100]	-22,63	-82,55	59,92	-
Ulje iz semena grožđa [100]	-18,84	-83,45	64,60	-
Ulje iz uljane repice [100]	-20,33	-85,74	65,41	-
Ulje iz masline [100]	-17,33	-86,22	68,89	-

**Tabela 9.** Topljenje ulja ( $T_{on,m}$  – temperatura početka topljenja,  $T_{off,m}$  – temperatura završetka topljenja,  $\Delta T_m$  – temperaturski opseg topljenja,  $H_m$  – entalpija topljenja).

Vrsta ulja [literatura]	$T_{on,m}$ (°C)	$T_{off,m}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$H_m$ (J/g)
Ulje iz kokosa [99,100]	-21,80	25,30	47,10	120,6
Ulje iz palme [99,100]	-26,66	40,59	67,25	86,3
Ulje iz palme kernel [99,100]	-25,56	28,98	54,54	114,1
Ulje iz kukuruza [100]	-46,02	-4,21	41,31	-
Ulje iz kikirikija [100]	-56,52	11,83	68,35	-
Ulje iz šafranike [100]	-48,36	-6,64	41,72	-
Ulje iz susama [100]	-46,03	3,36	49,40	-
Ulje iz soje [100]	-46,11	1,89	47,75	-
Ulje iz suncokreta [100]	-46,79	-4,72	42,57	-
Ulje iz lešnika [100]	-19,99	-2,87	17,11	-
Ulje iz oraha [100]	-48,20	-11,63	36,57	-
Ulje iz semena grožđa [100]	-48,70	-11,00	37,70	-
Ulje iz uljane repice [100]	-34,69	-9,17	25,52	-
Ulje iz masline [100]	-25,07	6,27	31,34	-
Ulje iz suncokreta, lanenog semena, masline, semena grožđa [101]	-60	9	69	70-94
Puter, maslac i poboljšano ulje iz kokosa [101]	-30	50	80	120-150
Ulje iz haringe [102]	-83,3	22,9	106,2	41,8
Ulje iz skuše [102]	-84,6	23,0	107,6	31,5
Ulje iz pastrmke [102]	-92,6	13,7	106,3	32,5
Ulje iz lososa [102]	-91,3	19,0	110,3	38,8

Nekoliko grupa autora uspešno su pratili promenu kvaliteta ulja pomoću *DSC* metode na osnovu promena u kristalizacionom piku. Tako, na primer, Gloria i Aguilera [103] pomoću *DSC* metode određuju kvalitet tri različita ulja (ulje iz kikirikija, uljane repice i suncokreta), koja su držana 2, 4, 6, 8 i 10 h na temperaturi od 180 °C (temperatura prženja). Oni su posmatrali promenu pika kristalizacije (položaja maksimuma i oblika pika, tj. temperature pika i entalpije) ovih ulja na *DSC* krivama u zavisnosti od vremena grejanja. Utvrdili su da se s povećanjem vremena, maksimum pika pomera ka nižim temperaturama, a da entalpija opada. Istovremeno su pratili i promene u boji, viskoznosti i sadržaju ukupnih polarnih komponenata u ulju (pokazatelji kvaliteta ulja) s vremenom grejanja. Našli su dobru vezu između promena pika kristalizacije i drugih pokazatelja kvaliteta na osnovu čega su zaključili da je *DSC* brza i pogodna metoda za analizu kvaliteta ulja.

Sličnu studiju sprovedli su i *Tan* i saradnici [104]. Oni su pratili oksidaciju tri različita tipa ulja u zavisnosti od dužine grejanja ulja tako što su posmatrali kako se menja kristalizacioni pik (položaj maksimuma i oblik pika, tj. temperatura maksimuma pika i entalpija). Pogoršanje kvaliteta ulja je istovremeno praćeno i standardnim hemijskim metodama (sadržaj ukupnih polarnih komponenata, jodni broj, sadržaj slobodnih masnih kiselina, anizidna vrednost i peroksidni broj). Na osnovu sprovedene uporedne statističke analize utvrđeno je da postoji dobra korelacija ( $p < 0,01$ ) između rezultata dobijenih na osnovu *DSC* metode i rezultata iz standardnih hemijskih metoda, pa su zaključili da je *DSC* jednostavna i pouzdana metoda za praćenje stepena oksidacije ulja koje je prethodno držano na relativno visokoj temperaturi.

*Tan* i saradnici [105] su, takođe, ispitivali uticaj mikrotalasnog grejanja ulja pomoću *DSC* metode. Pri tom je vršena procena pogoršanja kvaliteta ulja u zavisnosti od snage mikrotalasnog zračenja i vremena izlaganja tom zračenju. Pratili su promene na *DSC* krivama (položaj maksimuma egzotermnih i endotermnih pikova) pri hlađenju i grejanju ulja koje je prethodno bilo, u različitom režimu, izloženo mikrotalasnom zračenju. Istovremeno je vršena i hemijska analiza ulja (peroksidni broj, anizidna vrednost, sadržaj slobodnih masnih kiselina, jodni broj, odnos linolne i palmitinske kiseline). Na osnovu statističke uporedne analize, utvrđena je dobra korelacija između *DSC* rezultata i

rezultata hemijske analize, što ukazuje na to da *DSC* može da se koristi kao instrumentalna tehnika, bez upotrebe nekih hemikalija, za praćenje oksidacije ulja izloženih mikrotalasnom zračenju.

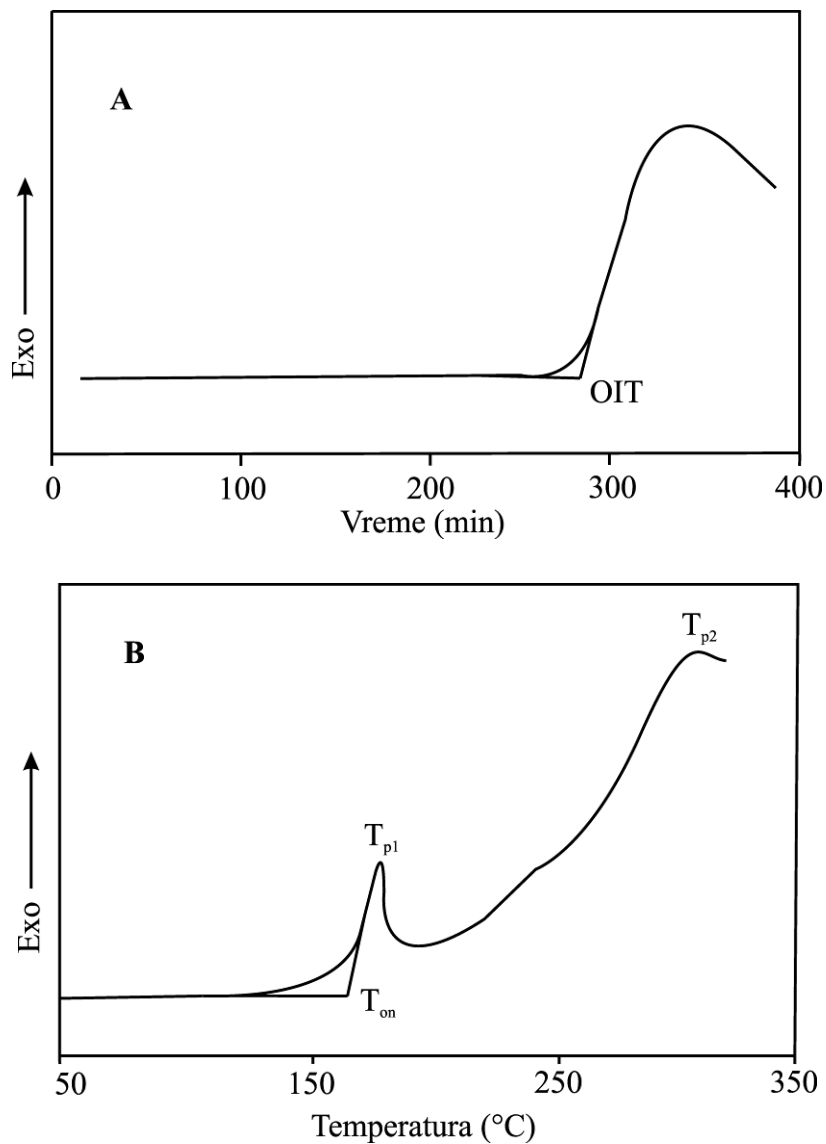
Kvalitet i stabilnost biljnih ulja su glavni činioci koji utiču na njihovu upotrebljivost i vrednost. Oksidativna stabilnost je jedan od najvažnijih pokazatelja kvaliteta biljnih ulja. Uopšteno, vreme pre nego što dođe do naglog povećanja brzine oksidacije ulja je mera oksidativne stabilnosti i naziva se indukciono vreme [106]. Mnoge instrumentalne i hemijske metode za procenu kvaliteta i stabilnosti ulja su bile predlagane proteklih godina. Danas se oksidativna stabilnost ulja i masti najčešće određuje pomoću *Rancimat metode* i *Instrumenta za oksidativnu stabilnost*. Kao rezultat obe ove metode daju *indeks oksidativne stabilnosti* ulja (*Oxidative Stability Index, OSI*) [107–111]. Indeks oksidativne stabilnosti je mera relativne otpornosti ulja i masti na oksidaciju. Određuje se tako što se 5 g ulja sipa u epruvetu koja se postavi u grejno telo na temperaturi od 110 °C i kroz koju se barbotira čist suvi vazduh. Vazduh se posle prolaska kroz zagrejanu epruvetu uvodi u drugu epruvetu napunjenu vodom, a u nju je uronjena elektroda za merenje elektroprovodljivosti povezana s konduktometrom. Kad ulje počne da se oksiduje iz njega izlaze isparljive organske kiseline koje se rastvaraju u vodi i povećavaju joj elektroprovodljivost. Iz grafika na čijoj je ordinati elektroprovodljivost, a na apscisi vreme zagrevanja, određuje se prevojna tačka koja daje indeks oksidativne stabilnosti [112].

Kako je oksidacija ulja egzotermna reakcija, *DSC* je metoda koja može uspešno da se primeni za određivanje oksidativne stabilnosti ulja. *Cross* [113] i *Hassel* [114] su 70-tih godina prošlog veka među prvima ispitivali mogućnost korišćenja *DSC* metode za određivanje oksidativne stabilnosti ulja i utvrdili da pomoću nje oksidativna stabilnost može mnogo brže da se odredi nego pomoću nekih u to vreme korišćenih metoda. Tako je, na primer, za određivanje oksidativne stabilnosti pomoću metode aktivnog kiseonika (*Active Oxygen Method (AOM)*) bilo potrebno 14 dana, dok se to isto pomoću *DSC* metode uradi za manje od 4h. Od tada do danas mnogi istraživači su ispitivali oksidativnu stabilnost različitih vrsta jestivog ulja i određivali kinetičke parametre procesa oksidacije pomoću *DSC* metode, kako u izotermnim tako i u neizotermnim uslovima [24,32,35–37,39,104,115–132]. Takođe su našli dobru korelaciju s rezultatima



dobijenim pomoću drugih metoda (*Rancimat*, *OSI*, peroksidni broj) kojima se određuje oksidativna stabilnost.

Na slici 11 su prikazane tipične *DSC* krive oksidacije ulja u izotermnim (A) [129] i neizotermnim uslovima (B) [131].



**Slika 11.** Tipične *DSC* krive oksidacije ulja u (A) izotermnim [129] (*OIT* – indukciono vreme oksidacije) i (B) neizotermnim uslovima [131] ( $T_{on}$  – temperatura početka oksidacije,  $T_{p1}$  – temperatura maksimuma prvog pika,  $T_{p2}$  – temperatura maksimuma drugog pika).

U izotermnim uslovima kao rezultat se dobija indukciono vreme oksidacije (*Oxidation Induction Time, OIT*) u tački preseka bazne linije i tangente na nagib egzotermnog pika. U neizotermnim uslovima na *DSC* krivoj se javljaju dva egzotermna pika usled oksidacije ulja i shodno tome mogu da se odrede tri karakteristične tačke: temperatura početka oksidacije (*Oxidation Onset Temperature, T<sub>on</sub>*) u tački preseka bazne linije i tangente na nagib prvog pika, temperatura maksimuma prvog pika (*T<sub>p1</sub>*) i temperatura maksimuma drugog pika (*T<sub>p2</sub>*).

*Ulkowski* i saradnici [131] daju šemu reakcionog mehanizma koja objašnjava oblik *DSC* krive pri procesu oksidacije ulja u neizotermnim uslovima:



Iz šeme se vidi da prvi pik odgovara autooksidaciji ulja pri čemu se grade peroksidi, dok drugi pik odgovara termo-oksidativnom razlaganju peroksida do krajnjih proizvoda (aldehidi, ketoni, alkoholi, ugljovodonici).

*DSC* tehnika je takođe uspešno primenjivana i za dobijanje kinetičkih parametara procesa oksidacije različitih tipova biljnih ulja. Prema uslovima u kojima se vrši oksidacija (izotermni ili neizotermni) razvijene su odgovarajuće metode za određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije (*E<sub>a</sub>*, *A*, *k*) [133,134]. Međutim, kako je oksidacija jestivih ulja veoma složen proces (zbog složenog sastava ulja) treba naglasiti da na ovaj način dobijeni kinetički parametri u stvari predstavljaju neke usrednjene vrednosti celokupnog procesa oksidacije, a ne samo određene reakcije oksidacije. Izračunate vrednosti energije aktivacije predstavljaju ukupni efekat svih energija aktivacije u sistemu tokom oksidacije, uključujući i intermedijere koji imaju sopstvene vrednosti kinetičkih parametara. U tabelama 10 i 11 prikazani su kinetički parametri procesa oksidacije različitih tipova ulja u izotermnim i neizotermnim uslovima.

**Tabela 10.** Rezultati ispitivanja procesa oksidacije ulja u izotermnim uslovima.

Vrsta ulja [literatura]	OIT (min)		k (min <sup>-1</sup> )	A (min <sup>-1</sup> )	E <sub>a</sub> (kJ/mol)
	120 °C	130 °C			
Ulje iz uljane repice [135–137]	72,8	33-38,2	$k_{100}^*=0,0035$ $k_{150}=0,0847$	$1,2 \times 10^8$	64,4-83,4
Ulje iz soje [39,129,135,136]	63,1- 65,55	33,70- 35,2	$k_{100}=0,0047$ $k_{120}=0,0153$ $k_{150}=0,0734$	$2,7 \times 10^7$	51,3-80,8
Ulje iz suncokreta [39,135–138]	33,4- 70,50	17,2- 33,34	$k_{100}=0,0076$ $k_{120}=0,0142$	$1,4 \times 10^{10}$	84,6-86,2
Ulje iz canola [39,129]	126,41	61,67	$k_{120}=0,0079$	-	86,0
Ulje iz kokosa [39,129]	168,28	86,60	$k_{120}=0,0059$	-	86,9
Ulje iz semena grožđa [39,129]	36,29	17,60	$k_{120}=0,0276$	-	99,9
Ulje iz susama [39,129]	251,70	139,37	$k_{120}=0,0040$	-	88,8
Ulje iz palme [39,129]	273,36	138,22	$k_{120}=0,0035$	-	82,3-89,4
Ulje iz masline [39,138]	51,00-175	21,99-105	-	-	-
Ulje iz crne ribizle [138]	95	50	-	-	-
Ulje iz kukuruza [129,135,138]	78-83,57	47,74-50	$k_{120}=0,012$	$5,1 \times 10^{11}$	77,5-98,6
Ulje iz šafranike [39,129,138]	39,50-43	18-18,19	$k_{120}=0,0253$	-	104,3
Ulje iz lanenog semena [127,138]	50	21-23,1	-	-	-

**Tabela 10** (nastavak). Rezultati ispitivanja procesa oksidacije ulja u izotermnim uslovima.

Vrsta ulja [literatura]	OIT (min)		$k$ (min <sup>-1</sup> )	A (min <sup>-1</sup> )	$E_a$ (kJ/mol)
	120 °C	130 °C			
Ulje iz kikirikija [39,129,138]	67,36-68	39,36-54	$k_{120}=0,0149$	-	99,1
Ulje iz pamuka [35]	92	42	-	-	-
Ulje iz pirinča [35]	72	36	-	-	-
Ulje iz <i>B. purpurea</i> [35]	269	99	-	-	-
Ulje iz buritija [32]	165	65	-	-	-
Ulje iz semena <i>Hevea brasiliensis</i> -a [32]	25	7,5	-	-	-

\* Broj u indeksu označava temperaturu (°C) na kojoj je izračunata konstanta brzine.

\*\* OIT je indukciono vreme oksidacije.

**Tabela 11.** Rezultati ispitivanja procesa oksidacija ulja u neizotermalnim uslovima.

Vrsta ulja [literatura]	$E_a$ (kJ/mol)	A (min <sup>-1</sup> )	$k$ (min <sup>-1</sup> )
Ulje iz kukuruza [139]	$E_{a,on}=69,5$	$A_{on}=1,25 \times 10^8$	-
	$E_{a,p1}=75,4$	$A_{p1}=1,70 \times 10^8$	
Ulje iz lanenog semena [139]	$E_{a,on}=132,7$	$A_{on}=1,15 \times 10^{16}$	-
	$E_{a,p1}=73,1$	$A_{p1}=1,10 \times 10^8$	
Linoleinska kiselina [37,131]	$E_{a,on}=65,0-70,4$	$A_{on}=5,65 \times 10^9$	$k_{90,on}=0,792$
	$E_{a,p1}=78,9-80,1$	$A_{p1}=2,05 \times 10^9$	$k_{90,p1}=0,013$
Sojin lecitin [131]	$E_{a,on}=97$	$A_{on}=2,44 \times 10^{11}$	-
	$E_{a,p1}=141$	$A_{p1}=9,46 \times 10^{15}$	
Ulje iz slačice (mustard) [120]	$E_{a,on}=90,6$	$A_{on}=3,48 \times 10^9$	$k_{223,on}=0,97$
	$E_{a,p1}=88,5$	$A_{p1}=1,49 \times 10^9$	$k_{223,p1}=0,90$

**Tabela 11** (nastavak). Rezultati ispitivanja procesa oksidacija ulja u neizotermalnim uslovima.

Vrsta ulja [literatura]	$E_a$ (kJ/mol)	$A$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Ulje iz masline [123]	$E_{a,on}=72-104$	$A_{on}=3,37 \times 10^8 - 1,12 \times 10^{12}$	$k_{120,on}=0,015-0,090$
Palmitinska kiselina [36,140]	$E_{a,on}=125,3$	$A_{on}=4,16 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=3,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=115,8$	$A_{p1}=7,82 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,p1}=8,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Glicerol-tripalmitat [36,140]	$E_{a,on}=108,0$	$A_{on}=1,33 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=91,0$	$A_{p1}=1,22 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_{160,p1}=1,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Etil-palmitat [36,140]	$E_{a,on}=124,5$	$A_{on}=5,91 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=5,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=131,3$	$A_{p1}=9,09 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,p1}=1,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Stearinska kiselina [36,140]	$E_{a,on}=115,4$	$A_{on}=1,60 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=126,7$	$A_{p1}=5,17 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,p1}=2,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Glicerol-tristearat [36,140]	$E_{a,on}=117,8$	$A_{on}=1,09 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=6,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Etil-stearat [36,140]	$E_{a,on}=106,0$	$A_{on}=5,26 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{160,on}=8,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=99,1$	$A_{p1}=2,63 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{160,p1}=2,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Oleinska kiselina [141]	$E_{a,on}=88,4$	$A_{on}=1,08 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,05 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=74,5$	$A_{p1}=2,05 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=3,93 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Glicerol-trioleat [141]	$E_{a,on}=91,8$	$A_{on}=4,49 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,78 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=45,8$	$A_{p1}=3,6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=9,56 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Etil-oleat [141]	$E_{a,on}=95,0$	$A_{on}=9,43 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=76,7$	$A_{p1}=1,07 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=9,99 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Linolna kiselina [141]	$E_{a,on}=72,0$	$A_{on}=1,63 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=7,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=84,5$	$A_{p1}=8,73 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=6,11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Glicerol-trilonolat [141]	$E_{a,on}=74,3$	$A_{on}=9,66 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,00 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=73,6$	$A_{p1}=1,29 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=3,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Etol-linolat [141]	$E_{a,on}=76,4$	$A_{on}=2,41 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,41 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=75,8$	$A_{p1}=2,43 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=2,98 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Linoleinska kiselina [141]	$E_{a,on}=62,4$	$A_{on}=2,69 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=2,77 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$E_{a,p1}=66,8$	$A_{p1}=8,53 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,p1}=2,19 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

**Tabela 11 (nastavak). Rezultati ispitivanja procesa oksidacija ulja u neizotermalnim uslovima.**

Vrsta ulja [literatura]	$E_a$ (kJ/mol)	$A$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Etil-linoleinat [141]	$E_{a,on}=74,5$ $E_{a,p1}=65,7$	$A_{on}=4,29 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ $A_{p1}=3,14 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_{90,on}=8,25 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ $k_{90,p1}=1,09 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
Ulje iz semena pamuka [24]	$E_{a,p1}=63,30$	$A_{p1}=9,2 \times 10^6$	$k_{204,p1}=0,37$
Ulje iz kukuruza [24]	$E_{a,p1}=77,78$	$A_{p1}=2,4 \times 10^8$	$k_{191,p1}=0,43$
Ulje iz uljane repice (canola) [24]	$E_{a,p1}=88,45$	$A_{p1}=7,6 \times 10^9$	$k_{181,p1}=0,51$
Ulje iz šafranike [24]	$E_{a,p1}=75,27$	$A_{p1}=1,8 \times 10^8$	$k_{182,p1}=0,44$
Ulje iz suncokreta bogato oleinskom kiselinom [24]	$E_{a,p1}=86,57$	$A_{p1}=1,8 \times 10^9$	$k_{198,p1}=0,47$
Ulje iz soje [24]	$E_{a,p1}=79,66$	$A_{p1}=4,1 \times 10^8$	$k_{191,p1}=0,44$
Ulje iz suncokreta [24,142]	$E_{a,p1}=59,8-64,0$	$A_{p1}=1,1 \times 10^7$	$k_{173,p1}=0,38$
Ulje iz uljane repice [142]	$E_{a,p1}=62,3-73,4$	$A_{p1}=7,4 \times 10^5-4,4 \times 10^6$	-

\*Oznaka on/p1 u indeksima odnosi se na parametre dobijene iz  $T_{on}/T_{p1}$ .

\*\*Broj u indeksu za  $k$  označava temperaturu ( $^{\circ}\text{C}$ ) na kojoj je izračunata konstanta brzine.

Na osnovu rezultata ispitivanja oksidativne stabilnosti i kinetičkih parametara procesa oksidacije različitih vrsta ulja, kao i čistih masnih kiselina i njihovih estara pomoću *DSC* metode, kako u izotermnim, tako i u neizotermnim uslovima, različite grupe autora su došle do sledećih zaključaka:

- dobijeni kinetički parametri pomoću *DSC* metode u izotermnim uslovima su uporedivi sa onim dobijenim pomoću *Rancimat* metode [32,35,39,127,136].
- *OIT* vrednosti se smanjuju za pola kad se izotermna temperatura poveća za  $10^{\circ}\text{C}$  [32,129].

- $E_a$  vrednosti procesa oksidacije strogo zavise od sadržaja nezasićenih masnih kiselina u uljima [121].
- $E_a$  vrednosti zasićenih masnih kiselina ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) i njihovih estara dobijene u izotermским uslovima ne zavise od dužine ugljeničnog lanca [36,140].
- konstanta brzine je mnogo pogodniji parametar za upoređivanje oksidativne stabilnosti različitih lipidnih sistema nego što je to energija aktivacije, ali samo na temperaturama koje su približne onima u eksperimentu, jer s promenom temperature može da dođe do promene reakcionog mehanizma [130].
- $T_{on}$  vrednosti se smanjuju s povećanjem udela nezasićenih masnih kiselina u ulju, kod neizotemske oksidacije [122].
- $T_{on}$  nije samo zavisna od sadržaja nezasićenih masnih kiselina u ulju, već i od prisustva i količine aromatičnih jedinjenja i njihovih alkil supstituenata [24,143].
- DSC je pogodna metoda za određivanje efikasnosti veštačkih antioksidanata, pri čemu je definisana veličina zaštitni činilac (*protective factor*, PF) [124]:

$$PF = T_{on,sa\ antioksidantom} / T_{on,bez\ antioksidanta} \quad (2)$$

Vrednosti PF-a manje od 1 ukazuju da antioksidans ima prooksidativni uticaj na dato ulje.

- Postoji dobra korelacija između rezultata dobijenih u izotermским uslovima sa onim dobijenim u neizotermским uslovima [121].

## 1.6. Cilj rada

Tokom prerade i čuvanja prehrambenih proizvoda mogu da nastupe promene u sastojcima hrane (vitamini, lipidi, ugljeni hidrati i proteini). Takve promene vode strukturnim i funkcionalnim promenama hrane na mikro i makromolekulskom nivou koje mogu da utiču na fizička, organoleptička i hranljiva svojstva hrane. Kombinacija složenih struktura izgrađenih od različitih bioloških komponenata čini da karakterizacija namirnica predstavlja pravi izazov. Zbog velikih promena kako u sastavu tako i u strukturi, mnoge biofizičke tehnike su korišćene za karakterizaciju prehrambenih proizvoda pre i posle njihove prerade radi suštinskog razumevanja uticaja prerade i uslova skladištenja na kvalitet. Rezultati takvih istraživanja mogu da budu korisni za

određivanje najboljih uslova prerade i skladištenja hrane radi dobijanje namirnica najboljeg kvaliteta.

Kako mnoge metode prerade hrane uključuju i termalni tretman (grejanje, hlađenje, zamrzavanje) prehrambenog materijala, termalna karakterizacija prehrambenih proizvoda i njihovih komponenti daje korisne podatke koji mogu da se povežu s protokolom procesa prerade. Određivanje termalnih karakteristika prehrambenih sirovina (materijala), kao na primer specifični toplotni kapacitet u funkciji temperature, je ključno za proračun prenosa toplote i energetske bilansa [144]. Takođe, namirnice i njihove komponente prolaze kroz konformacione promene i fazne prelaze tokom prerade. Podaci dobijeni termalnom analizom mogu da posluže za procenu termalne i termodinamičke stabilnosti različitih faza radi pojednostavljenja procesa prerade i skladištenja hrane. Termalne osobine hrane strogo zavise od sastava hrane. Zato je određivanje termalnih karakteristika glavnih sastojaka hrane (ugljeni hidrati, proteini, lipidi) od velikog značaja za razumevanje termalnih svojstava prehrambenih namirnica kao celine.

Seme jagodastog voća je izvor većeg broja jedinjenja koja imaju bioaktivnu i hranljivu vrednost [57]. Zbog toga se sve više iskazuje interes da se i seme jagodastog voća, koje je inače nusproizvod pri proizvodnji različitih proizvoda iz jagodastog voća, koristi za proizvodnju različitih proizvoda (brašno, ulje) koji nalaze primenu u farmaciji, kozmetičkoj industriji i za dobijanje zdrave hrane. I u semenu maline i kupine nalaze se značajne količine nekih biološki vrednih komponenti (elaginska kiselina, elagitanini, tokoferol, polifenoli, karotenoidi, nezasićene masne kiseline i dr.). Da bi proizvodi iz semena ovog voća mogli u potpunosti da se iskoriste, neophodno je da se ispituju, ne samo kvalitativni i kvantitativni sastav semena, već i promene koje mogu da nastanu u njima pri različitim uslovima u procesu proizvodnje i skladištenja. Gotovo svi procesi u proizvodnji i preradi hrane obuhvataju i temperaturski tretman, ako ni zbog čega drugog onda zbog sterilizacije (pasterizacije). Poznato je da su biološki vredna jedinjenja (proteini, neki vitamini, nezasićene masne kiseline i mnoga nezasićena jedinjenja) podložna promenama čak i pri relativno niskim temperaturama, a te promene mogu da budu veoma značajne (gubitak lako isparljivih jedinjenja, denaturacija proteina i vitamina, termičko razlaganje nezasićenih jedinjenja i dr.) da u potpunosti promene prirodu jedinjenja, čime se gubi i biološka vrednost, odnosno funkcija prvobitnog



jedinjenja. Zbog toga je izbor metoda termalne analize pravo, ako ne i jedino rešenje za ovakvu vrstu ispitivanja.

U dosadašnjoj literaturi nema podataka o termalnoj analizi semena maline i kupine, a nema ni podataka o kinetici procesa oksidacije ulja iz semena ovog voća. Postoji samo podatak o oksidativnoj stabilnosti ulja iz semena crne maline. Zbog toga je cilj ove disertacije termalna analiza semena maline i kupine, kao i ispitivanje oksidativne stabilnosti ulja iz semena maline i kupine.

U okviru ove disertacije pomoću *DSC* metode odrediće se termalne karakteristike semena, a potom i ulja iz semena maline i kupine (temperature i entalpije faznih transformacija i ostalih promena koje nastaju tokom hlađenja i grejanja). Takođe, pratiće se proces oksidacije ulja iz njihovih semena, kako u izotermnim, tako i u neizotermnim uslovima radi utvrđivanja njihove oksidativne stabilnosti i izračunavanja kinetičkih parametara vezanih za proces oksidacije. Određivanje kinetičkih parametara je bitno, jer omogućuje procenu stabilnosti ulja u uslovima skladištenja, kao i upoređivanje s nekim drugim uljima koja su već u komercijalnoj upotrebi. Analiziraće se uticaj zastupljenosti pojedinih nezasićenih masnih kiselina na oksidativnu stabilnost samih ulja. Izvršiće se upoređivanje kinetičkih parametara dobijenih pri izotermnim uslovima sa onim pri neizotermnim uslovima oksidacije i preporučiće se najbolja metoda za ispitivanje oksidativne stabilnosti ovih ulja. Na osnovu dobijenih rezultata ovih ispitivanja odrediće se temperaturni opseg stabilnosti komponenti semena maline i kupine, što je značajno za njihov termički tretman tokom procesa prerade, kao i za njihovu trajnost.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

### 2.1. Priprema brašna i ulja iz semena maline i kupine

Plodovi maline (*Rubus idaeus* L., sorta Vilamet) i kupine (*R. fruticosus* L., sorta Čačanska bestrna), koji su ispitivani u okviru ove doktorske disertacije dobijeni su od Instituta za voćarstvo u Čačku, Srbija. Po dobijanju, sveži plodovi su pakovani u plastične kese i smrzavani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i na toj temperaturi su skladišteni do upotrebe (oko mesec dana). Seme je dobijeno kao nusproizvod posle prerade plodova maline i kupine u odgovarajuće proizvode (džem, žele, sok). Posle izdvajanja semena iz voćne pulpe, ono je sušeno na sobnoj temperaturi do stalnog sadržaja vlage od 6-6,5 %. Neposredno pre termalne analize seme je mleveno pomoću laboratorijskog mlina radi dobijanja brašna.

Jedan deo tako dobijenog brašna korišćen je za dobijanje ulja (iz semena maline/kupine) ekstrakcijom pomoću heksana (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) na sledeći način: 100 g uzorka brašna je mešano 2 h na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  u 1 l heksana. Posle toga se heksan pomoću vakuumske filtracije odvaja od uzorka i preostali uzorak se još dva puta tretira na isti način. Tako dobijena tri uzorka ekstrakta se na kraju pomešaju i u uslovima smanjenog atmosferskog pritiska heksan se ukloni isparavanjem na  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dobijena ulja (iz semena maline/kupine) su čuvana na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

Posle ekstrakcije ulja iz brašna semena maline/kupine, dobijeni talog je dalje ekstrahovan vodom radi izdvajanja iz semena komponenata rastvorljivih u vodi (proteini). Vodeni ekstrakt je potom uparavan na sobnoj temperaturi do suvog ostatka, koji je zatim analiziran pomoću *DSC* metode. Uzorak koji ostaje posle ekstrakcije brašna heksanom i vodom (uglavnom sačinjen od polisaharida), u daljem tekstu ostatak, sušen je do konstantne mase i, takođe, analiziran *DSC* metodom.

Čiste masne kiseline (palmitinska - 16:0, stearinska - 18:0, oleinska - 18:1, linolna - 18:2 i linoleinska - 18:3), koje su ispitivane u okviru ovog rada, kupljene su od *Sigma-Aldrich-a* (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) i njihova čistoća prema specifikaciji proizvođača bila je  $\geq 99\%$ .

## **2.2. Hemijska analiza ulja iz semena maline i kupine**

### **2.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semena maline i kupine**

Kiselinski, peroksidni i saponifikacioni broj određeni su pomoću *ISO* standardnih metoda [145–147], dok je za određivanje jednog broja korišćena *Wijs* metoda [148] (Prilog B). Sva merenja vršena su po tri puta.

### **2.2.2. Određivanje sadržaja masnih kiselina u uljima iz semena maline i kupine pomoću gasno-masene hromatografije (GC/MS)**

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima ulja određivan je pomoću gasno-masene hromatografije (*GC/MS*), posle transesterifikacije ulja.

Transesterifikacija ulja izvršena je na sledeći način: u 6 ml metanola dodato je 36,2/30,0 mg ulja iz semena maline/kupine i kap koncentrovane sumporne kiseline. Tako dobijena smeša je refluktovana 2 sata uz stalno mešanje. Po završetku procesa transesterifikacije kiselina je neutralisana dodatkom zasićenog rastvora kalijum-hidrogenkarbonata (promena u pH vrednosti praćena je univerzalnim pH indikatorom). Posle neutralizacije smeša je ekstrahovana heksanom (tri puta sa po 6 ml heksana). U dobijeni rastvor heksana je dodat anhidrovani natrijum-sulfat, rastvor je proceden i uparen do suva. Masa transesterifikovanog malinovog/kupinovog ulja je bila 40,7/33,1 mg. Od dobijenog transesterifikovanog ulja je napravljen rastvor koncentracije oko 1 mg/ml i potom je urađena *GC/MS* analiza.

Gasno hromatografska merenja izvršena su na *Agilent 7890A GC* sistemu, koji je opremljen *5975C MSD* i *FID* detektorima, pri čemu je korišćena *J&W 122-2362: 1721.45507 DB-23* kolona (60 m x 250 µm x 0,25 µm). Kao noseći gas korišćen je helijum sa protokom od 0,9 ml/min. Temperatura kolone je bila programirana na sledeći način: prvo je na 50 °C držana 1 minut, onda je brzinom 25 °C/min zagrejana do 175 °C i na toj temperaturi držana 0 minuta, a zatim brzinom 4 °C/min zagrejana do 235 °C i na toj temperaturi držana 5 minuta. Linija transfera je zagrejana na 240 °C, a temperatura

FID detektora je bila 300 °C. EI spektar masa (70 eV) je određivan u m/z oblasti od 40-500. Analiza je trajala 26 min.

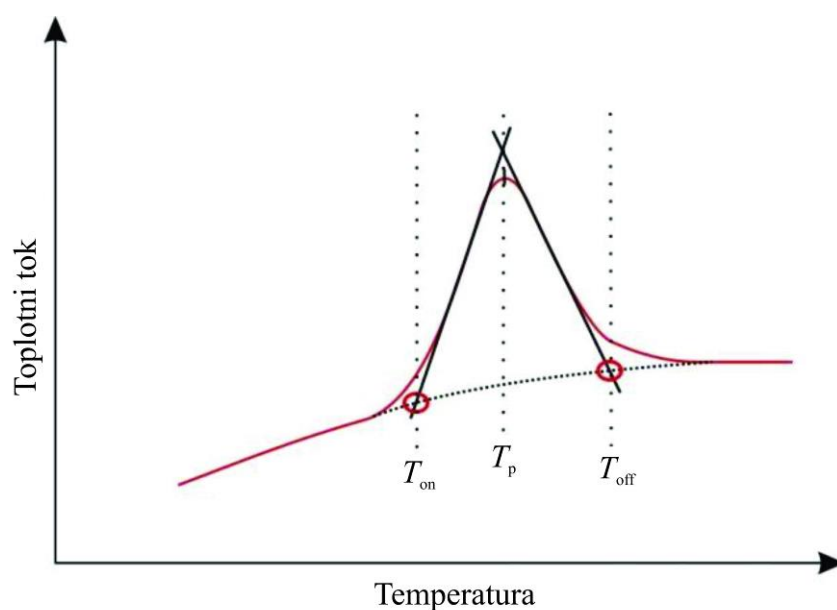
### **2.3. Termalna analiza brašna i ulja iz semena maline i kupine**

Sva merenja su izvršena na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru *TA Instruments DSC Q1000, Delaware, USA* i termogravimetrijskom analizatoru *TA Instruments TGA Q500, Delaware, USA*. Analiza podataka dobijenih termalnom analizom rađena je pomoću softvera *TA Universal analysis 2000*. Diferencijalni skenirajući kalorimetar je kalibrisan pomoću standarda indijuma visoke čistoće (tačka topljenja 156,60 °C, entalpija topljenja 28,51 J/g). Termogravimetrijski analizator je za masu kalibrisan pomoću standardnih tegova od 100 mg i 1 g, a za temperaturu pomoću Ni na osnovu njegove Kirijeve temperature (358 °C).

#### **2.3.1. Termalna analiza brašna iz semena maline i kupine**

Za analizu brašna iz semena maline i kupine *DSC* metodom korišćeni su zatvoreni aluminijumski čančići. Uzorci brašna mase  $5,0 \pm 0,5$  mg odmeravani su u aluminijumske čančice koji se potom zatvaraju pomoću odgovarajuće prese i postavljaju na platformu za uzorke u ćeliji diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Kao referentni čančić korišćen je prazan zatvoren aluminijumski čančić. Kroz ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra se održavao protok vazduha od 50 ml/min. Merenja su vršena u temperaturskom opsegu od -90 do 300 °C pod sledećim temperaturskim režimom: uzorak brašna je odmah po zatvaranju ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra ohlađen na -90 °C i držan na ovoj temperaturi 5 min do uravnoteženja, a potom je brzinom od 5 °C/min grejan do 300 °C. Pod istim uslovima snimani su i osušeni vodeni ekstrakti iz ispitivanih vrsta brašna, kao i ostatak iz ispitivanih vrsta brašna, posle ekstrakcije heksanom i vodom. Na taj način može da se utvrdi od koje frakcije (uljane, vodene ili ostatka) potiču termalni efekti koji se detektuju *DSC* analizom ispitivanih vrsta brašna iz semena.

Radi boljeg razdvajanja termalnih procesa na niskim temperaturama, brašna iz semena maline i kupine su, takođe, u temperaturskom opsegu od  $-50$  do  $-10$  °C snimana brzinom od  $2$  °C/min. Iz dobijenih DSC krivih određivane su karakteristične tačke: temperatura početka termalnog procesa (*onset temperature*,  $T_{on}$ ), temperatura završetka termalnog procesa (*offset temperature*,  $T_{off}$ ) i temperatura maksimuma pika ( $T_p$ ).  $T_{on}$  i  $T_{off}$  određivane su kao tačke preseka ekstrapolisane bazne linije i tangente na nagib egzotermnog/endotermnog pika (slika 12).



**Slika 12.** Način određivanja karakterističnih tačaka ( $T_{on}$  – temperatura početka procesa,  $T_{off}$  – temperatura završetka procesa i  $T_p$  – temperatura maksimuma pika) na piku DSC krive [149].

Ispitivanje termo-oksidativnog razlaganja brašna iz semena maline i kupine vršeno je pomoću termogravimetrijske analize. U tu svrhu uzorci brašna grejani su u temperaturskom opsegu od  $25$  do  $700$  °C, u struji vazduha sa protokom od  $60$  ml/min. Uzorci brašna mase  $12,0 \pm 0,5$  mg odmeravani su u čančiću od platine i potom unošeni u TG peć pomoću autosamplera. Dobijene TG krive, kao i njihove derivativne krive (DTG), korišćene su za analizu termalne stabilnosti brašna iz semena maline i kupine. Temperatura početka ( $T_{on}$ ) termo-oksidativnog razlaganja ispitivanih vrsta brašna

određivana je pomoću *DTG* krive (kao presek ekstrapolisane bazne linije i tangente na nagib pika koji nastaje kao rezultat termalnog razlaganja).  $T_{on}$  je korišćena kao pokazatelj otpornosti brašna na termo-oksidativno razlaganje.

### **2.3.2. Termalna analiza ulja iz semena maline i kupine**

Za analizu ulja iz semena maline i kupine pomoću *DSC* metode korišćeni su otvoreni aluminijumski čančići. Uzorci ulja mase  $3,0 \pm 0,3$  mg odmeravani su u aluminijumske čančice koji se potom pomoću autosampler-a postavljaju na platformu za uzorke u ćeliji diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Kao referentni čančić korišćen je prazan otvoren aluminijumski čančić. Kroz ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra se održavao protok vazduha od 50 ml/min. Merenja su vršena u temperaturskom opsegu od -90 do 40 °C primenom sledećeg temperaturskog režima: uzorak ulja je po zatvaranju ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra uravnotežen na 40 °C a potom hlađen do -90 °C brzinom hlađenja od 2 °C/min, na temperaturi od -90 °C je držan 5 min radi uravnoteženja, a potom je brzinom od 2 °C/min grejan nazad do 40 °C. Pri istim uslovima snimane su i čiste masne kiseline, radi određivanja njihovih termalnih karakteristika i ispitivanja uticaja njihove zastupljenosti u ispitivanim uljima na termalne osobine ulja.

Tokom grejanja ispitivanih ulja korišćen je modulovani *DSC* radi uspešnijeg razdvajanja termalnih procesa. Pri tom je korišćena modulaciona temperatura od  $\pm 0,5$  °C sa periodom od 40,0 s. *MDSC* pomaže da se bolje razumeju procesi topljenja i rekristalizacije, koji se odvijaju u uljima tokom njihovog grejanja. Kad su u pitanju ulja, reverzni toplotni tok, koji se dobija kao jedan od signala *MDSC* metodom, ukazuje na topljenje i staklasti prelaz u uljima, dok ireverzni toplotni tok ukazuje na rekristalizaciju u uljima [98]. Upoređivanjem reverznog toplotnog toka sa ireverznom može da se razdvoji egzotermni rekristalizacioni pik od endoternog pika topljenja ulja, kad se ova dva preklapaju. Specifični toplotni kapacitet ( $C_p$ ) oba ispitivana ulja određen je u temperaturskom opsegu od -90 do 40 °C pri brzini grejanja od 2 °C/min pomoću *MDSC* krivih.

### **2.3.3. Određivanje oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine pomoću DSC metode**

Određivanje oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine pomoću DSC metode rađeno je u izotermnim i neizotermnim uslovima, prema ASTM metodama [150,151].

U neizotermnim uslovima ispitivani uzorak, mase  $3,0 \pm 0,3$  mg, se greje brzinom  $10$  °C/min u otvorenom aluminijumskom čančiću, pri protoku kiseonika od  $50$  ml/min, od  $40$  °C do početka procesa oksidacije uzorka, što se na DSC krivoj vidi pojavom egzotermnog pika. Sa dobijene DSC krive određuju se temperatura početka oksidacije ( $T_{on}$ ) i temperatura maksimuma pika ( $T_p$ ).

U izotermnim uslovima ispitivani uzorak, mase  $3,0 \pm 0,3$  mg, se greje brzinom  $10$  °C/min u otvorenom aluminijumskom čančiću, pri protoku azota od  $50$  ml/min, do  $120$  °C, kada se u ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra uvodi kiseonik (protok  $50$  ml/min). Pod ovim uslovima uzorak se održava do pojave egzotermnog pika na DSC krivoj, što ukazuje na početak procesa oksidacije ispitivanog uzorka. Sa dobijene DSC krive određuje se indukciono vreme oksidacije (OIT) uzorka i vreme maksimuma pika ( $t_p$ ). OIT vrednosti su određivane u tački preseka ekstrapolisane bazne linije i tangente na nagib egzotermnog pika oksidacije.

### **2.3.4. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine pomoću DSC metode**

Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine pomoću DSC metode rađeno je po uputstvima i preporukama za skupljanje kinetičkih podataka i sprovođenje kinetičkih izračunavanja od strane ICTAC Kinetics Committee [133,134] (Prilog A). Za snimanje uzoraka ulja pomoću DSC metode i ovde su korišćeni otvoreni aluminijumski čančići. Uzorci ulja mase  $3,0 \pm 0,3$  mg odmeravani su u aluminijumske čančice koji se potom pomoću autosampler-a postavljaju na platformu za uzorke u ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Kao referentni čančić korišćen je prazan otvoren aluminijumski čančić. Kroz ćeliju diferencijalnog skenirajućeg

kalorimetra se održavao protok kiseonika (čistoće 99,95 %) od 50 ml/min. Tokom procesa oksidacije ulja, zbog velikog viška kiseonika usled stalnog protoka, potrošnja kiseonika se može zanemariti. Takvi uslovi omogućavaju stvaranje peroksida nezavisno od koncentracije kiseonika, što čini autooksidaciju ulja reakcijom prvog reda. Ovo je osnovna aproksimacija koja je korišćena pri računanju kinetičkih parametara procesa oksidacije: energije aktivacije,  $E_a$  (J/mol), predeksponencijalnog ili frekventnog faktora,  $A$  ( $\text{min}^{-1}$ ) i reakcione konstante brzine,  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ). Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ispitivanih ulja rađeno je i u izotermnim i u neizotermnim uslovima.

#### **2.3.4.1. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u neizotermnim uslovima**

U neizotermnim uslovima ispitivana ulja su grejana sa šest različitih brzina grejanja,  $\beta_i$  (2, 5, 7,5, 10, 15, 20 °C/min) s početkom od 40 °C do početka procesa oksidacije, što se na DSC krivoj pokazuje u vidu egzotermnog pika. Iz dobijenih DSC krivih određivane su karakteristične tačke: temperatura početka procesa oksidacije ( $T_{on}$ ) i temperatura maksimuma pika ( $T_p$ ).

$T_{on}$  je temperatura u kojoj se može smatrati da je stepen konverzije ( $\alpha$ ) procesa oksidacije ulja približno isti (teži nuli) za sve brzine grejanja. Stepem konverzije u hemijskoj reakciji ili obim reakcije pojedine komponente koja učestvuje u reakciji jeste broj molova te komponente u datom vremenu podeljen brojem molova iste komponente na početku reakcije ( $0 \leq \alpha \leq 1$ ). U termalnoj analizi stepen konverzije ( $\alpha$ ) definiše se kao protok toplote u datom vremenu ili na datoj temperaturi podeljen protokom toplote u vremenu ili na temperaturi na kojoj je signal protoka toplote dostigao svoj maksimum [152]:

$$\alpha = (\text{signal}_0 - \text{signal}) / (\text{signal}_0 - \text{signal}_f) \quad (3)$$

gde su ( $\text{signal}_0$ ) i ( $\text{signal}_f$ ) početni i maksimalni signali protoka toplote, redom.



Zbog toga je za računanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ispitivanih ulja u tački  $T_{on}$  korišćena izokonverzna *Kissinger-Akahira-Sunose (KAS)* metoda [133]. Ova metoda se zasniva na korišćenju sledeće jednačine:

$$\ln(\beta_i / T_{on,i}^2) = a \cdot (1/T_{on,i}) + b \quad (4)$$

gde je  $\beta_i$  brzina grejanja (K/min), a  $T_{on,i}$  je temperatura početka oksidacije (K). Indeks  $i$  se odnosi na različite brzine grejanja. Linearnom regresijom ( $\ln(\beta_i/T_{on,i}^2)$ ) u funkciji  $1/T_{on,i}$ , iz nagiba i odsečka računaju se energija aktivacije i predeksponencijalni faktor za proces oksidacije ulja u tački  $T_{on}$  prema sledećim jednačinama:

$$a = -E_{a,on} / R \quad (5)$$

$$b = \ln(A'_{on} R / E_{a,on}) \quad (6)$$

gde su  $a$  i  $b$  nagib i odsečak iz jednačine (4), redom,  $R$  je univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK), a  $A'_{on} = A_{on}/g(\alpha)$  ( $g(\alpha)$  je integralni oblik reakcionog modela, a kako je  $\alpha = \text{const.}$  u  $T_{on}$ , takođe je i  $g(\alpha)$  konstanta). Dakle, na osnovu *KAS* metode energija aktivacije se računa po sledećoj jednačini:

$$E_{a,on} = -R \frac{d \ln(\beta_i / T_{on,i}^2)}{d(1/T_{on,i})} \quad (7)$$

Za računanje aktivacione energije i predeksponencijalnog faktora procesa oksidacije ulja u maksimumu *DSC* pika, pomoću  $T_p$ , korišćena je *Kissinger* metoda [153], koja se zasniva na sledećoj jednačini:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{p,i}^2}\right) = \ln\left(-\frac{A_p R}{E_{a,p}} f'(\alpha_p)\right) - \frac{E_{a,p}}{RT_{p,i}} \quad (8)$$

gde je  $f'(\alpha) = df(\alpha)/d\alpha$ , a  $f(\alpha)$  je diferencijalni oblik reakcionog modela. U slučaju reakcije prvog reda, kakva je u ovom slučaju reakcija oksidacije ulja,  $f'(\alpha) = -1$ , pa jednačina (8) može da se napiše kao:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{p,i}^2}\right) = \ln\left(\frac{A_p R}{E_{a,p}}\right) - \frac{E_{a,p}}{RT_{p,i}} \quad (9)$$

Linearnom regresijom leve strane jednačine ( $\ln(\beta_i/T_{p,i}^2)$ ) u funkciji od  $1/T_{p,i}$  dobijaju se nagib i odsečak iz kojih se dalje izračunavaju aktivaciona energija i predeksponencijalni faktor procesa oksidacije u maksimumu pika.

Dobijene vrednosti energije aktivacije i predeksponencijalnog faktora mogu da se iskoriste za izračunavanje konstante brzine procesa oksidacije ulja, pomoću Arenijusove jednačine:

$$k = A \cdot \exp(-E_a / RT) \quad (10)$$

#### 2.3.4.2. Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u izotermnim uslovima

U izotermnim uslovima uzorci ispitivanih ulja zagrevani su brzinom 10 °C/min u struji azota (50 ml/min) do željene temperature,  $T_i$  (110, 115, 120, 125, 130, 135, 140 i 145 °C). Zatim se u ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra uvodi kiseonik (50 ml/min) i održava se temperatura  $T_i$ , pri čemu se meri vreme koje protekne do početka oksidacije (*Oxidation Induction Time, OIT*), a na *DSC* krivoj se javlja egzotermni pik. *OIT* vrednosti, u principu, predstavljaju vreme za koje proces oksidacije ulja, na različitim temperaturama  $T_i$ , postigne isti stepen konverzije (blizak nuli). Shodno tome, za računanje aktivacione energije i predeksponencijalnog faktora na osnovu *OIT* vrednosti korišćena je integralna izokonverzionna metoda za izotemske uslove [133]. Ona se zasniva na korišćenju sledeće jednačine:

$$\ln t_{\alpha,i} = \ln\left(\frac{g(\alpha)}{A_\alpha}\right) + \frac{E_{a,\alpha}}{RT_i} \quad (11)$$

gde je  $t_{\alpha,i}$  (min) vreme potrebno za postizanje datog stepena konverzije ( $\alpha$ ) na različitim temperaturama  $T_i$  (K),  $g(\alpha)$  je integralni oblik reakcionog modela (za  $\alpha = \text{const.}$ ,  $g(\alpha)$  je takođe konstanta),  $E_{a,\alpha}$  i  $A_\alpha$  su aktivaciona energija i predeksponencijalni faktor za dati stepen konverzije, redom. Za *OIT* jednačina (11) može da se napiše:

$$\ln k_{OIT,i} = \ln A'_{OIT} - \frac{E_{a,OIT}}{RT_i} \quad (12)$$

gde je  $k_{OIT} = 1/OIT$ , a  $A'_{OIT}$  je proporcionalno sa  $A_{OIT}$  zbog konstantnog stepena konverzije. Energija aktivacije i pre-eksponencijalni faktor mogu da se izračunaju iz nagiba i odesečka, redom, prave dobijene linearnom regresijom  $\ln k_{OIT,i}$  u funkciji  $1/T_i$ , pomoću metode najmanjih kvadrata. U ovom slučaju nagib i odsečak su  $-E_{a,OIT}/R$  i  $\ln A'_{OIT}$ , redom.

## 2.4. Statistička analiza

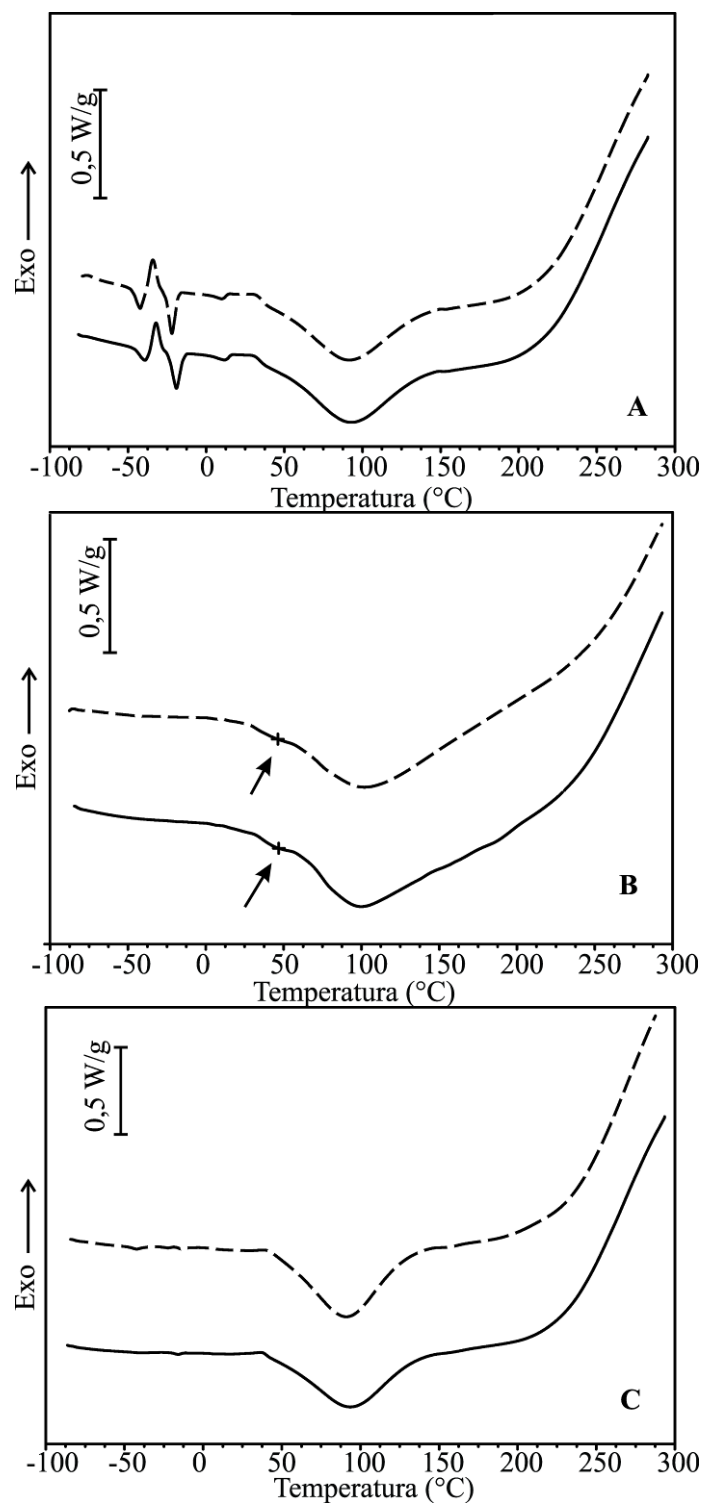
Sva merenja i eksperimenti u okviru ovog rada su ponavljani po tri puta i dobijene vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standardna devijacija). Svi dobijeni podaci su podvrgnuti analizi varijanse (*ANOVA*) radi poređenja njihovih srednjih vrednosti. *ANOVA* kao rezultat daje odgovor na to da li su sve ispitivane srednje vrednosti međusobno jednake ili nisu. Kada je slučaj da se upoređuju dve srednje vrednosti onda se *ANOVA* analizom dobija kompletan rezultat. Međutim, kad se *ANOVA* koristi za analizu više od dve srednje vrednosti, u slučaju kad je rezultat da srednje vrednosti nisu sve međusobno jednake, ne može se znati da li je razlika statistički značajna između svih ispitivanih srednjih vrednosti, ili samo između pojedinih (što znači da u okviru ispitivanih srednjih vrednosti neke od njih mogu biti međusobno jednake, ali ne sve). Da bi se utvrdilo između kojih srednjih vrednosti postoji statistički značajna razlika korišćen je *post-hoc Tukey-jev HSD (honestly significant differences)* test sa nivoom statističke značajnosti od  $p < 0,05$  i intervalom poverenja od 95 %. Pomoću ovog testa utvrđuje se da li su međusobne razlike između svih ispitivanih srednjih vrednosti statistički značajne ili ima srednjih vrednosti koje se statistički ne razlikuju značajno. U skladu sa rezultatima ovog testa srednje vrednosti u tabelama prikazane su sa slovima u indeksu. Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ .  $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $OIT$  vrednosti su korišćene za izračunavanje kinetičkih parametara ( $E_a$ ,  $A$ ,  $k$ ). Linearna regresiona analiza kinetičkih podataka pri računanju kinetičkih parametara vršena je pomoću softvera *OriginPro 8.0*.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 3.1. Termalna analiza brašna iz semena maline i kupine

Na slici 13 prikazane su *DSC* krive dobijene zagrevanjem brašna iz semena maline i kupine (A), osušenih vodenih ekstrakata iz brašna (B) i ostataka iz brašna posle ekstrakcije heksanom i vodom (C), u temperaturskom opsegu od -90 do 300 °C, brzinom grejanja od 5 °C/min.

Na osnovu dobijenih *DSC* krivih jasno se vidi da su termalne osobine ispitivanih vrsta brašna iz semena maline i kupine međusobno veoma slične. Kod oba brašna iz semena (slika 13A) u temperaturskom opsegu od oko -50 do -10 °C javlja se složen *DSC* signal, koji je posledica odvijanja dva ili više termalna procesa na međusobno bliskim temperaturama, pa se njihovi toplotni efekti preklapaju i daju složen *DSC* signal. Takođe, kod oba uzorka se na oko ( $T_p$ ) 10 °C javlja endotermni pik manjeg intenziteta. Na *DSC* krivama vodenih ekstrakata iz ispitivanih brašna iz semena (slika 13B) i ostataka brašna iz semena posle ekstrakcije heksanom i vodom (slika 13C), vidi se da termalni procesi u temperaturskom intervalu od -50 do -10 °C i endotermni pik na oko 10 °C izostaju. Na osnovu toga može da se zaključi da oni nastaju usled faznih prelaza frakcije koja je iz semena uklonjena ekstrakcijom heksanom. Ova frakcija predstavlja ulja koja se nalaze u ispitivanom semenu [154–156]. Pri ispitivanju palminog ulja *Tan* i saradnici [100] su na *DSC* krivi u fazi grejanja ulja dobili dva endotermna pika, od kojih su pik na nižoj temperaturi pripisali topljenju triacilglicerola bogatih oleinskom kiselinom (frakcija nezasićenih molekula *TAG*-a), a pik na višoj temperaturi topljenju triacilglicerola bogatih stearinskim kiselinom (frakcija zasićenih molekula *TAG*-a). Slične rezultate (razdvojene endotermne pikove usled topljenja zasićene i nezasićene frakcije molekula *TAG*-a) dobili su i *Chatziantoniou* i saradnici [157] pri topljenju grčkog devičanskog maslinovog ulja. Na osnovu toga može da se zaključi da fazni prelazi u temperaturskom intervalu od -50 do -10 °C kod ispitivanog semena potiču od frakcije nezasićenih molekula *TAG*-a, dok endotermni pik na oko 10 °C nastaje usled topljenja frakcije zasićenih molekula *TAG*-a prisutnih u semenu maline i kupine.



**Slika 13.** DSC krive pri grejanju (A) brašna iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija); (B) vodenih ekstrakata iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija), (strelicama su označeni endotermni pikovi nastali usled denaturacije proteina); (C) ostataka brašna iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija) posle ekstrakcije heksanom i vodom; brzina grejanja 5 °C/min, protok vazduha 50 ml/min.

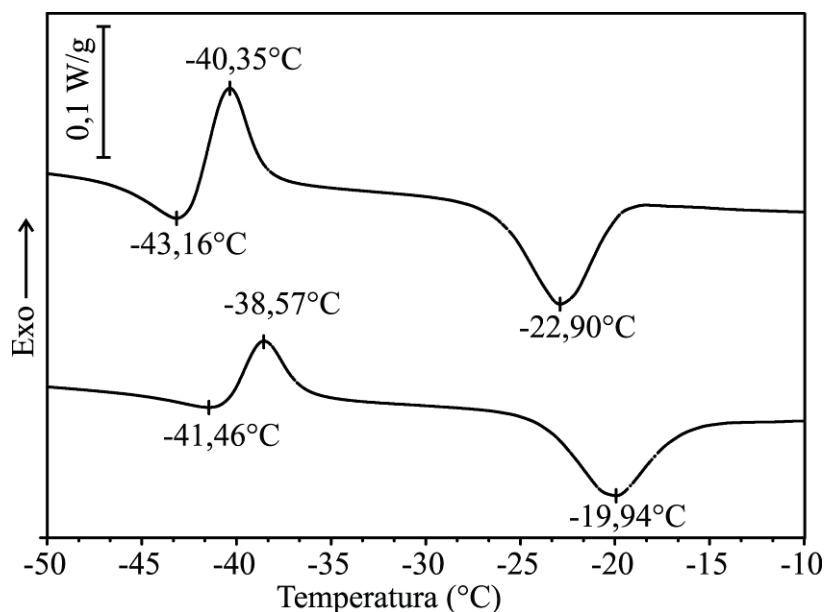
Kako je iz literature poznato da su semena maline i kupine veoma bogata nezasićanim masnim kiselinama [55–57], takođe može da se zaključi da je frakcija zasićenih molekula TAG-a prisutna u ovim semenima veoma mala, pa je shodno tome i termalni efekat koji proističe iz njihovih faznih prelaza dosta manji u odnosu na efekat koji daje nezasićena frakcija molekula TAG-a prisutna u ispitivanim semenima.

U temperaturskom opsegu od oko 35 do 140 °C kod oba brašna se na DSC krivama (slika 13A) javlja širok endotermni pik s maksimumom ( $T_p$ ) na 91,22 °C za brašno iz semena maline i na 92,89 °C za brašno iz semena kupine. Ovaj signal je posledica isparavanja vode prisutne u ispitivanom semenu [158,159]. Na DSC krivama vodenih ekstrakata iz semena maline i kupine (slika 13B), koji zbog rastvorljivosti proteina u vodi, u stvari, predstavljaju proteinsku frakciju ispitivanih semena, pored širokih endotermnih pikova sa  $T_p$  na 101,88 °C za malinu i 99,96 °C za kupinu, vide se i endotermni pikovi manjeg intenziteta (označeni strelicama na slici 13B) sa  $T_p$  na 46,31 °C za malinu i 46,92 °C za kupinu. *Cuq* i *Lcard-Verniere* [160] su našli slične endotermne pikove (između 41 i 54 °C) na DSC krivama griza (11 % vlage), koje su pripisali raskidanju slabo energetskih interakcija proteina, odnosno, denaturaciji proteina prisutnih u grizu. Uzorci proteina iz suncokreta sa vlažnošću od 6 do 17 %, takođe, na DSC snimcima daju endotermni pik na oko 60 °C [161], dok proteini iz soje pokazuju mali endotermni pik na oko 52 °C [158]. Na osnovu toga može se zaključiti da endotermni pikovi na 46,31 °C za malinu i 46,92 °C za kupinu, nastaju usled denaturacije proteina. Glavni razlog što se ovi endotermni pikovi ne vide izdvojeni od širokog endoternog pika na DSC krivama brašna iz semena maline i kupine (slika 13A) je relativno mala koncentracija proteina u semenima maline i kupine (oko 12 %) [16]. Usled male koncentracije, a uz to i malog energetskog efekta denaturacije proteina u odnosu na energetski efekat isparavanja vode prisutne u ispitivanim semenima [158], endotermni pik denaturacije proteina je prekriven endotermnim pikom isparavanja vode. U slučajevima vodenih ekstrakata, gde proteini iz semena čine glavni udeo, usled povećane koncentracije proteina energetski efekat njihove denaturacije postaje merljiv, iako i dalje dosta manji u odnosu na energetski efekat isparavanja preostale vode (voda vezana za proteine), što se i vidi na dobijenim DSC krivama (slika 13B).

Kad se uporede endotermni pikovi koji nastaju usled isparavanja vode iz brašna ispitivanih semena (slika 13A) sa onima nastalim isparavanjem vode iz vodenih ekstrakata (slika 13B), vidi se da se pikovi kod brašna završavaju na nižim temperaturama ( $T_{\text{off}}$  oko 140 °C za oba brašna), dok temperatura završetka pikova kod vodenih ekstrakata ne može da se odredi s dobrom tačnošću (gruba procena, ekstrapolacijom bazne linije na početku *DSC* krive,  $T_{\text{off}}$  je oko 185 °C za oba vodena ekstrakta), jer se endotermni pikovi nastavljaju na egzotermne. Razlog za to je međudejstvo preostale vode i proteina u vodenim ekstraktima [158]. Usled tog međudejstva, proteini jače ili slabije vezuju vodu za sebe, u zavisnosti od vrste interakcije. Proteini, koji jače vezuju vodu, zadržavaju je u uzorcima do većih temperatura pri zagrevanju uzoraka, što dovodi do širenja endotermnih pikova isparavanja vode ka većim temperaturama.

S porastom temperature na *DSC* krivama oba brašna (slika 13A) javlja se egzotermni proces s početkom na temperaturi ( $T_{\text{on}}$ ) od 210 °C za oba uzorka. Ovaj egzotermni proces odgovara termo-oksidativnom razlaganju ispitivanih uzoraka brašna, tokom kojeg dolazi do razgradnje organskih sastojaka prisutnih u semenu maline i kupine (lipidi, proteini i polisaharidi) [162–164]. Sa slike 13C, odnosno *DSC* krivih grejanja ostataka ispitivanih brašna posle ekstrakcije heksanom i vodom, može se videti da termo-oksidativno razlaganje preostalih organskih sastojaka semena maline i kupine (uglavnom polisaharida) počinje na nešto višoj temperaturi ( $T_{\text{on}}$ ) oko 225 °C. To ukazuje da su ulja i proteini, od prisutnih organskih komponenata u ispitivanim semenima, najpodložniji termo-oksidativnom razlaganju.

Radi boljeg razdvajanja termalnih efekata koji se javljaju u temperaturskom opsegu od -50 do -10 °C, a samim tim i preciznijeg određivanja njihovih karakterističnih tačaka ( $T_{\text{on}}$ ,  $T_{\text{off}}$  i  $T_{\text{p}}$ ), ispitivana brašna su u ovom temperaturskom intervalu snimljena brzinom grejanja od 2 °C/min, a odgovarajuće *DSC* krive su prikazane na slici 14.

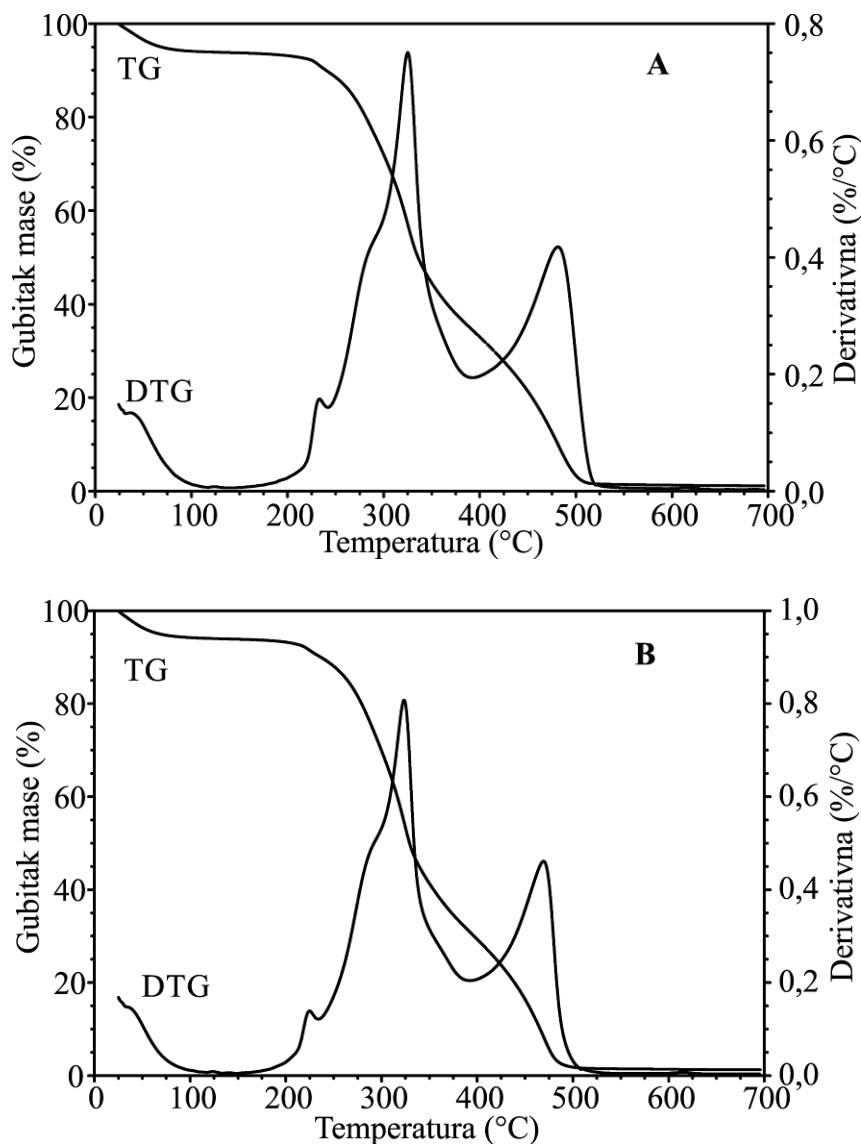


*Slika 14. DSC krive pri grejanju brašna iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija), brzina grejanja 2 °C/min, protok vazduha 50 ml/min.*

Na DSC krivama prikazanim na slici 14 vide se dva endotermna pika, s maksimumima ( $T_p$ ) na -43,16 i na -22,90 °C za brašno iz semena maline i na -41,46 i na -19,94 °C za brašno iz semena kupine. Vidi se i jedan egzotermni pik, s maksimumom ( $T_p$ ) na -40,35 °C za brašno iz semena maline i -38,55 °C za brašno iz semena kupine. Endotermni pik na nižoj temperaturi i egzotermni pik potiču od polimorfizma ulja prisutnih u ispitivanim semenima, o čemu će više reči biti u poglavlju 3.3.1., dok endotermni pik na višoj temperaturi potiče od topljenja kristalnog oblika ulja [83]. Na osnovu ovog endoternog pika može da se odredi da triacilgliceroli prisutni u semenu maline i kupine počinju da se tope na temperaturi ( $T_{on}$ ) -26,44 i na -24,02 °C, a potpuno prelaze u tečno stanje na temperaturi ( $T_{off}$ ) -19,77 i na -15,99 °C, redom. Poznavanje ovih temperatura je veoma važno pri određivanju uslova u kojima će se skladištiti malina i kupina, a samim tim i njihovo seme, tokom čuvanja do prerade u odgovarajuće proizvode, jer je bitno da u toku skladištenja triacilgliceroli prisutni u semenu budu u čvrstom stanju. Čvrsto stanje ograničava pokretljivost molekula triacilglicerola i na taj način čini da su oni manje podložni procesu oksidacije, kao i hidrolizi u prisustvu enzima lipaze [82,98]. Smrznute plodove maline i kupine trebalo bi skladištiti na temperaturama nižim od temperatura početka ( $T_{on}$ ) topljenja triacilglicerola prisutnih u



semenu maline i kupine, radi očuvanja kvaliteta ulja prisutnog u ovom semenu, a naročito kad je vreme skladištenja duže.



*Slika 15. TG/DTG krive brašna iz semena: (A) kupine; i (B) maline, brzina grejanja 5 °C/min, protok vazduha 60 ml/min.*

Za ispitivanje termo-oksidativne stabilnosti brašna iz semena maline i kupine u temperaturskom intervalu od 25 do 700 °C korišćena je termogravimetrijska analiza. Na slici 15 prikazane su dobijene TG krive i njihove diferencijalne DTG krive pri brzini

grejanja od 5 °C/min u atmosferi vazduha, za oba brašna, a u tabeli 12 su prikazani rezultati dobijeni termogravimetrijskom analizom brašna iz semena maline i kupine. Prvi gubitak mase odmah na početku *TG* krive, kod oba uzorka, predstavlja isparavanje vode prisutne u semenima [163,165]. Upoređivanjem *DSC* krivih (slika 13A) sa *TG* krivama vidi se da široki endotermni pik u temperaturskom opsegu od oko 35 do 140 °C na *DSC* krivama odgovara gubitku vode na *TG/DTG* krivama. Takođe, na *TG/DTG* krivama se vidi da termo-oksidativno razlaganje oba brašna počinje na oko 210 °C, što je u skladu s rezultatima dobijenim iz *DSC* krivih.

**Tabela 12.** Rezultati termogravimetrijske analize brašna iz semena maline i kupine.

	<b>Brašno iz semena kupine</b>	<b>Brašno iz semena maline</b>
Vlažnost (%)	6,19 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,10 ± 0,31 <sup>a</sup>
I stepen termo-oksidativnog razlaganja (%)	59,39 ± 2,28 <sup>a</sup>	63,04 ± 2,49 <sup>b</sup>
II stepen termo-oksidativnog razlaganja (%)	32,99 ± 1,43 <sup>a</sup>	29,36 ± 2,02 <sup>b</sup>
Pepeo (na 700 °C) (%)	1,42 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,26 <sup>a</sup>

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar istog reda su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *ANOVA* analizi, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

*ANOVA* analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike između vrednosti sadržaja vlage i pepela u brašnu iz semena kupine u odnosu na vrednosti ovih parametara u brašnu iz semena maline.

Na osnovu oblika *TG/DTG* krivih oba uzorka može da se zaključi da se termo-oksidativno razlaganje brašna iz semena maline i kupine odvija kroz dva stupnja, jer *TG/DTG* krive imaju dva stepena gubitka mase, koja odgovaraju razlaganju uzoraka. Karakteristične tačke, početka ( $T_{on}$ ) i završetka ( $T_{off}$ ) procesa, oba stupnja termo-oksidativnog razlaganja određene su iz *DTG* krivih. Što se tiče termalne stabilnosti

semena maline i kupine, prvi stupanj razlaganja je daleko važniji, zato što u toku ovog stupnja dolazi do razgradnje organskih sastojaka prisutnih u semenima koji imaju nutritivnu vrednost, kao što su nezasićene masne kiseline, proteini, polisaharidi i dr. [164]. Prvi stupanj termo-oksidativnog razlaganja oba brašna odvija se u temperaturskom opsegu od 210 do 392 °C, dok se drugi stupanj odvija u opsegu od 392 do 490 °C za seme maline i od 392 do 513 °C za seme kupine. Ovaj drugi stupanj termo-oksidativnog razlaganja odgovara razgradnji zasićenih masnih kiselina i drugih supstanci koje nastaju polimerizacijom proizvoda nastalih razlaganjem u prethodnoj fazi [156,166].

### 3.2. Hemijska karakterizacija ulja iz semena maline i kupine

Prinos ulja posle ekstrakcija iz semena pomoću heksana bio je 16-18 %, za oba semena. To je u skladu s literaturnim podacima gde se ta vrednost kreće od 11-23 % [16,55,82,83]. Posle dobijanja ulja urađena je njegoa fizičko-hemijska karakterizacija, pri čemu su određeni kiselinski, peroksidni, jodni i saponifikacioni broj. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 13.

**Tabela 13.** Fizičko-hemijske karakteristike ulja iz semena maline i kupine.

Parametar	Ulje iz semena kupine	Ulje iz semena maline
Kiselinski broj (mg KOH/g)	2,34 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,08 <sup>b</sup>
Peroksidni broj (meqO <sub>2</sub> /kg)	5,21 ± 0,13 <sup>a</sup>	9,54 ± 0,27 <sup>b</sup>
Jodni broj (mg I <sub>2</sub> /g)	188,32 ± 0,43 <sup>a</sup>	162,38 ± 0,51 <sup>b</sup>
Saponifikacioni broj (mg KOH/g)	192,30 ± 0,36 <sup>a</sup>	188,59 ± 0,24 <sup>b</sup>

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar istog reda su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema ANOVA analizi, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Na osnovu sprovedene ANOVA analize utvrđeno je da su vrednosti fizičko-hemijskih parametara (kiselinski, peroksidni, jodni i saponifikacioni broj) ulja iz semena kupine

različite u odnosu na vrednosti ovih parametara dobijenih za ulje iz semena maline sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ .

Kiselinski broj je najčešći parametar koji se koristi pri karakterizaciji nekog ulja ili masti. On se definiše kao količina kalijum-hidroksida, izražena u mg, potrebna da se neutrališu organske kiseline prisutne u 1g ulja ili masti. Kiselinski broj je u stvari mera slobodnih masnih kiselina prisutnih u ispitivanom ulju. Kvalitet sirovog ulja se često vrednuje prema sadržaju slobodnih masnih kiselina, odnosno njegovoj kiselosti, zato što su slobodne masne kiseline podložnije procesu oksidacije, pa će ulje s većim sadržajem slobodnih masnih kiselina brže oksidovati, a samim tim i izgubiti na kvalitetu. Ovaj parametar (kiselinski broj), takođe, je i pokazatelj kako je seme iz kojeg su ova ulja dobijena tretirano pre i za vreme ekstrakcije ulja iz njega, tj. ako mu je vrednost visoka (prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti iz 2013. godine prihvatljiva vrednost kiselinskog broja za jestiva nerafinisana ulja je do 4,0 mg KOH/g) to ukazuje na neodgovarajuće uslove skladištenja (npr. visoka temperatura i relativna vlažnost), kao i procesa primenjenih u toku njegove prerade. Povećanje sadržaja slobodnih masnih kiselina u uzorcima ulja ukazuje da je u toku skladištenja došlo do hidrolize molekula triacilglicerola, koja se odvija pod dejstvom enzima lipaze [82]. Zbog toga je neophodno da triacilgliceroli, koji se nalaze u semenima, budu u čvrstom stanju (smrznuti) tokom skladištenja, kako bi se dejstvo enzima svelo na najmanju meru. Kako je pokazano u poglavlju 3.1., triacilgliceroli prisutni u semenima maline i kupine, počinju da se tope na temperaturama iznad  $-26,44$  i  $-24,02$  °C, redom, tako da je određeni deo ulja u semenima u tečnom stanju ako je temperatura skladištenja veća od pomenutih temperatura i samim tim podložniji su hidrolizi. Uzorci kupine i maline, korišćeni u ovom radu, čuvani su mesec dana na  $-20$  °C do upotrebe i to je najverovatnije razlog što je vrednost kiselinskog broja za ulje iz semena maline veća od dozvoljene (4,0 mg KOH/g).

Vrednosti kiselinskog broja za ulja iz semena maline i kupine, koje mogu da se nađu u literaturi, razlikuju se od onih koje su dobijene u ovom radu. Vrednosti koje su dobili *Dimić* i saradnici [55,82] su veće za oba ulja u odnosu na vrednosti u ovom radu, dok su *Van Hoed* i saradnici [59] dobili slične vrednosti za ulje iz kupine i manje vrednosti za ulje iz maline u odnosu na vrednosti dobijene u ovom radu. Jedan od razloga za to može da bude što sadržaj slobodnih masnih kiselina može da se menja u zavisnosti od sorte

plodova iz kojih je ulje dobijeno. Drugi razlog, koji je i bitniji sa tehnološkog gledišta, jesu uslovi skladištenja voća pre upotrebe, kao i vreme trajanja skladištenja.

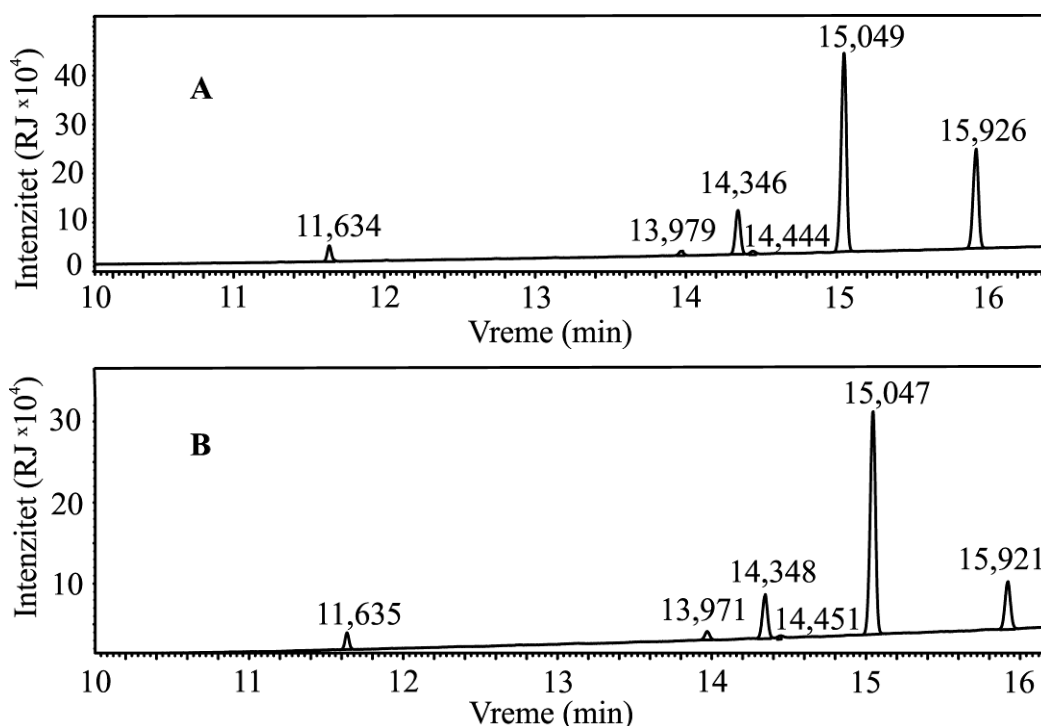
*Dimić* i saradnici su koristili iste sorte kupine i maline kao i sorte koje su korišćene u ovom radu. Međutim, oni su čuvali smrznute plodove maline i kupine (a samim tim i njihovo seme) osam meseci do njihove upotrebe na temperaturi od  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok su plodovi maline i kupine, koji su korišćeni u ovom radu, čuvani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jedan mesec do upotrebe. U poglavlju 3.1. pokazano je da se triacilgliceroli prisutni u semenu maline i kupine tope na temperaturama iznad  $-26,44$  i  $-24,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ , redom. Na osnovu toga može da se zaključi da je u semenu smrznutih plodova maline i kupine, koje su koristili *Dimić* i saradnici, kao i u plodovima korišćenim u ovom radu, jedan deo triacilglicerola bio u tečnom stanju tokom skladištenja. Razlog što su *Dimić* i saradnici dobili veće vrednosti kiselinskog broja jeste u tome što je period skladištenja smrznutih plodova bio duži (osam meseci), pa su samim tim i molekuli triacilglicerola duže bili izloženi dejstvu enzima, odnosno hidrolizi. *Van Hoed* i saradnici koristili su sorte maline i kupine različite od onih u ovom radu, i pri tom su koristili sveže plodove.

Za procenu kvaliteta uzoraka ulja, takođe, je važno ispitati i njihovo oksidativno stanje, jer je oksidacija ulja jedna od glavnih reakcija koja utiče na kvalitet ulja i proizvoda od ulja. Proces oksidacije ulja može da se podeli u dve faze: prva faza – nastajanje hidroperoksida (primarni oksidacioni proizvodi) i druga faza – razlaganje hidroperoksida do daljih proizvoda (sekundarni oksidacioni proizvodi), koji daju užegao ukus i miris oksidovanih ulja. Peroksidna vrednost, kao pokazatelj primarnih oksidacionih proizvoda, je oko dva puta veća u ulju iz semena maline u odnosu na onu u ulju iz semena kupine, što ukazuje na to da je ulje iz semena kupine stabilnije u pogledu oksidacije od ulja iz maline. O oksidativnoj stabilnosti ova dva ulja biće više reči u poglavljima 3.3.2. i 3.3.3.

Vrednost jodnog broja je mera nezasićenosti masnih kiselina koje ulaze u sastav molekula triacilglicerola i ona može da se koristi za određivanje tipa i porekla ispitivanih ulja. Vrednosti jodnog broja dobijene za ulja iz semena maline i kupine su relativno visoke (vrednosti za suncokretovo ulje, koje ima oko 70 % polinezasićenih masnih kiselina, kreću se od 125 do 136 mg I<sub>2</sub>/g [167]), što ukazuje na to da su ova ulja visoko nezasićena ulja, tj. bogata nezasićenim masnim kiselinama. Vrednost

saponifikacionog broja predstavlja sadržaj kalijum-hidroksida potrebnog za saponifikaciju svih slobodnih i vezanih masnih kiselina u ispitivanom ulju. Vrednosti saponifikacionog broja dobijene u ovom radu su slične vrednostima koje su dobijali drugi autori za ulje iz semena maline (191 – 211 mg KOH/g) [56,83]. Dobijene vrednosti saponifikacionog broja ukazuju na mogućnost korišćenja ispitivanih ulja u proizvodnji tečnih sapuna, šampona, krema za brijanje i drugih kozmetičkih proizvoda [83].

Za analizu sastava ulja, odnosno, određivanje procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina koje ulaze u sastav ispitivanih ulja, korišćena je gasno-masena hromatografija. Na slici 16 su prikazani dobijeni hromatogrami, a u tabeli 14 rezultati dobijeni na osnovu ovih hromatograma [168,169].



**Slika 16.** Hromatogrami dobijeni GC-MS analizom ulja iz semena (A) maline i (B) kupine.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 14 može da se zaključi da su oba ispitivana ulja visoko nezasićena ulja, što je u skladu s dobijenim vrednostima jodnog broja (tabela 13), na osnovu kojih je takođe zaključeno da su ispitivana ulja visoko nezasićena.

Dobijeni udeo ukupnih nezasićenih masnih kiselina je u skladu s rezultatima koji mogu da se nađu u literaturi (oko 95 %) [55–57]. Takođe se vidi da od nezasićenih masnih kiselina najviše ima esencijalnih masnih kiselina (linolne i linoleinske) – 80,95 % u ulju iz semena kupine i 83,09 % u ulju iz semena maline. Ovako visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina čini ova ulja jako poželjnim u ljudskoj ishrani, jer kao što je ranije rečeno, nedostatak esencijalnih masnih kiselina u ishrani može da bude uzrok različitih poremećaja u funkcionisanju organizma.

**Tabela 14.** Sadržaj masnih kiselina (% w/w) u uljima iz semena maline i kupine.

<b>Masne kiseline</b>	<b>Ulje iz semena kupine (% w/w)</b>	<b>Ulje iz semena maline (% w/w)</b>
(16:0) Palmitinska	3,65 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,47 ± 0,09 <sup>a</sup>
(18:0) Stearinska	2,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,03 <sup>b</sup>
(18:1) Oleinska	12,53 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,55 ± 0,10 <sup>b</sup>
(18:2) Linolna	66,33 ± 0,13 <sup>a</sup>	55,29 ± 0,24 <sup>b</sup>
(18:3) Linoleinska	14,62 ± 0,32 <sup>a</sup>	27,80 ± 0,21 <sup>b</sup>
Neidentifikovani metil ester sa 18 C atoma, položaj dvostruke veze nepoznat	0,60 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Ukupno zasićene masne kiseline</b>	<b>5,92</b>	<b>4,53</b>
<b>Ukupno nezasićene masne kiseline</b>	<b>94,08</b>	<b>95,47</b>

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar istog reda su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema ANOVA analizi, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

ANOVA analiza je pokazala da se sadržaj stearinske, oleinske, linolne i linoleinske kiseline u ulju iz semena kupine razlikuje od sadržaja ovih masnih kiselina u ulju iz semena maline sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , dok je sadržaj palmitinske kiseline isti u oba ulja.

Još jedan bitan parametar kad su u pitanju esencijalne masne kiseline jeste odnos ( $\omega$ -6):( $\omega$ -3) masnih kiselina. Neravnoteža, odnosno, manjak  $\omega$ -3 masnih kiselina u odnosu na količinu  $\omega$ -6 kiselina smatra se uzrokom različitih bolesti, a danas se smatra da je idealan odnos ( $\omega$ -6):( $\omega$ -3) masnih kiselina 2:1 [71,170]. Poznato je iz literature

[74,171] da je ovaj odnos u hrani u zapadno i severno evropskim zemljama oko 15, a u SAD-u oko 16,7, čime se objašnjava veliki broj obolelih od raka, kardiovaskularnih, zapaljenskih i autoimunih bolesti u ovim zemljama. Na osnovu podataka datih u tabeli 14 vidi se da je odnos ( $\omega$ -6):( $\omega$ -3) masnih kiselina oko 2:1 u ulju iz semena maline i oko 4:1 u ulju iz semena kupine, što je još jedan pokazatelj preventivnog i blagotvornog dejstva ovih ulja na zdravlje ljudi, a naročito ulja iz semena maline koje ima baš preporučljiv odnos ( $\omega$ -6):( $\omega$ -3) masnih kiselina.

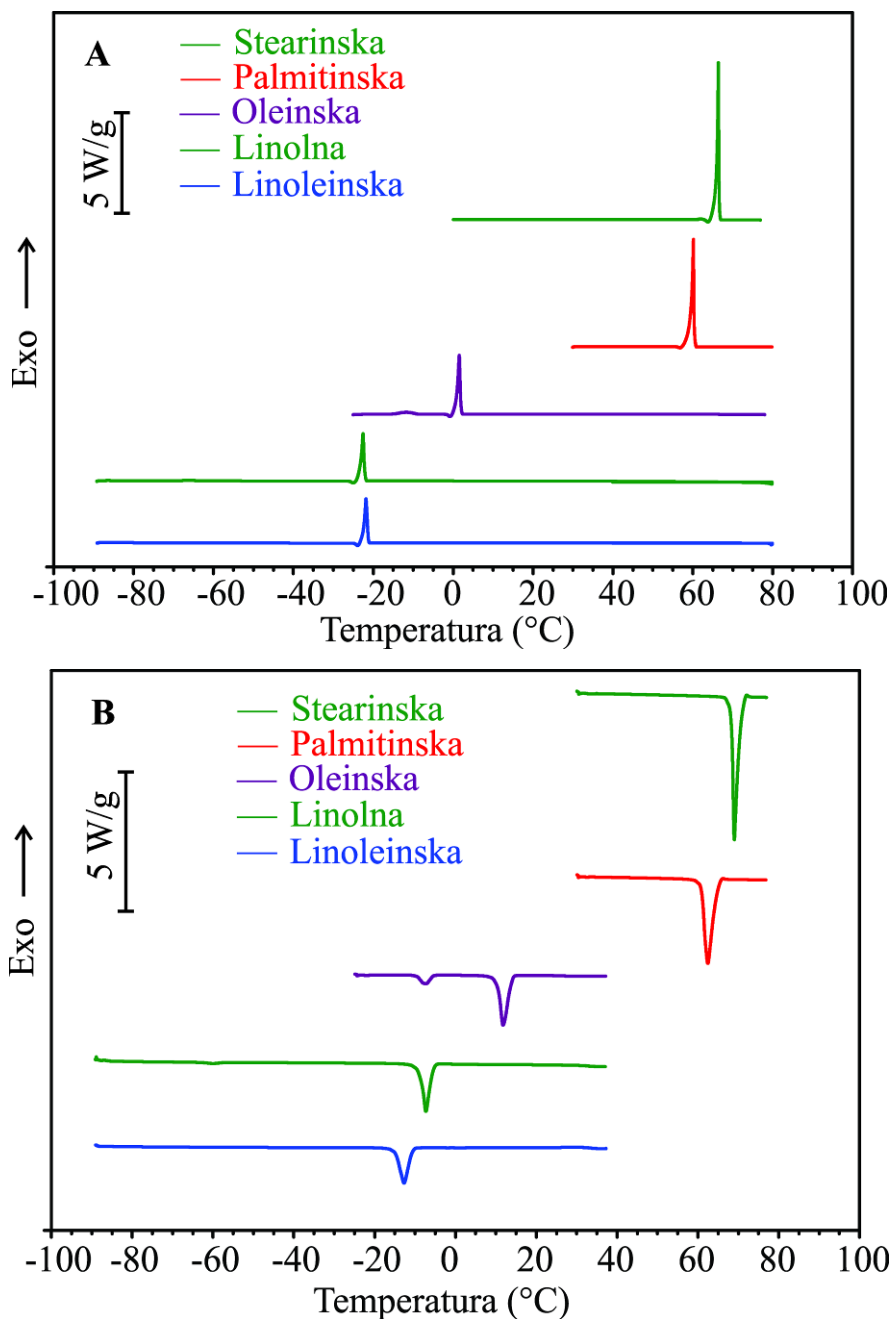
### **3.3. Termalna analiza ulja iz semena maline i kupine**

#### **3.3.1. Termalne karakteristike čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine**

Detaljno određivanje karakteristika ulja iz semena maline i kupine vezanih za procese njihovog topljenja i kristalizacije je jako bitno u industriji masti i ulja, kao i u prehrambenoj tehnologiji pri proizvodnji proizvoda na bazi ulja. Na osnovu ovih karakteristika određuju se odgovarajući parametri u procesu prerade ulja da bi se dobili proizvodi naboljeg kvaliteta i željenih fizičkih osobina i teksture.

Radi što boljeg razumevanja termalnih karakteristika ispitivanih ulja, pre njihove analize ispitane su termalne karakteristike masnih kiselina koje ulaze u sastav ovih ulja. Određivanjem termalnih karakteristika čistih masnih kiselina može da se utvrdi uticaj njihove zastupljenosti u uljima na termalne karakteristike samih ulja. Na slici 17 prikazane su *DSC* krive dobijene snimanjem masnih kiselina pomoću *DSC* metode u fazi hlađenja (A) i fazi grejanja (B), brzina hlađenja/grejanja bila je 2 °C/min.





**Slika 17.** DSC krive masnih kiselina pri (A) hlađenju i (B) grejanju, brzina hlađenja/grejanja 2 °C/min, protok vazduha 50 ml/min.

Sa dobijenih DSC krivih se vidi da sve ispitivane masne kiseline imaju oštre i jasno definisane pikove koji odgovaraju faznim prelazima masnih kiselina pri njihovom grejanju ili hlađenju [172]. Jedino se kod oleinske kiseline, osim pikova koji odgovaraju faznim prelazima ove kiseline, javlja još jedan pik manjeg intenziteta na nižim temperaturama, što ukazuje na to da se u oleinskoj kiselini u čvrstom stanju dešava još

neka promena, koja ima energetski efekat dosta manji u odnosu na energetski efekat topljenja ili kristalizacije. Ovaj toplotni efekat pripisuje se polimorfnom prelazu čvrste oleinske kiseline iz  $\gamma$  u  $\alpha$  oblik [173]. Polimorfni prelaz u čvrstom stanju karakterističan je i za neke druge *cis*-mononezasićene masne kiseline i dobro je opisan u literaturi [174,175]. Ukratko, razlika između dva polimorfna oblika ogleda se u konformacionoj strukturi  $\omega$ -lanca (deo ugljeničnog lanca između dvostruke veze i metilenskog kraja molekula masne kiseline): uređena "*all-trans*" struktura u  $\gamma$  obliku naspram neuređene (*liquid-like*) konformacione strukture u  $\alpha$  obliku.  $\Delta$ -lanac (deo ugljeničnog lanca između dvostruke veze i karboksilnog kraja molekula masne kiseline) ima uređenu "*all-trans*" konformacionu strukturu u oba polimorfna oblika [176]. Pikovi koji odgovaraju faznim prelazima oleinske kiseline u stvari predstavljaju topljenje/kristalizaciju  $\alpha$  oblika.

Karakteristične temperature faznih promena - kristalizacije i topljenja ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) masnih kiselina, kao i vrednosti entalpija kristalizacije i topljenja određene iz dobijenih DSC krivih hlađenja i grejanja, prikazane su u tabelama 15 i 16, redom.

**Tabela 15.** Karakteristične temperature ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) i entalpija ( $H_m$ ) topljenja masnih kiselina.

Masna kiselina	$T_{on}$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_{off}$ (°C)	$H_m$ (J/g)
Linoleinska	$-14,94 \pm 0,10^b$	$-12,73 \pm 0,07^a$	$-10,40 \pm 0,08^a$	$101,40 \pm 0,16^c$
Linolna	$-8,70 \pm 0,06^d$	$-7,33 \pm 0,09^b$	$-5,36 \pm 0,04^b$	$116,30 \pm 0,36^d$
Oleinska	$10,44 \pm 0,04^e$	$11,77 \pm 0,04^d$	$14,17 \pm 0,23^d$	$128,70 \pm 1,19^e$
	$-9,6 \pm 0,09^c$	$-7,27 \pm 0,02^b$	$-5,41 \pm 0,21^b$	$25,11 \pm 0,22^b$
Stearinska	$68,34 \pm 0,46^g$	$69,01 \pm 0,43^f$	$70,97 \pm 0,23^f$	$261,20 \pm 0,64^g$
Palmitinska	$60,92 \pm 0,57^f$	$62,45 \pm 0,58^e$	$65,24 \pm 0,96^e$	$232,90 \pm 2,49^f$

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar iste kolone su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *Tukey*-evom testu, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

**Tabela 16.** Karakteristične temperature ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) i entalpija ( $H_c$ ) kristalizacije masnih kiselina.

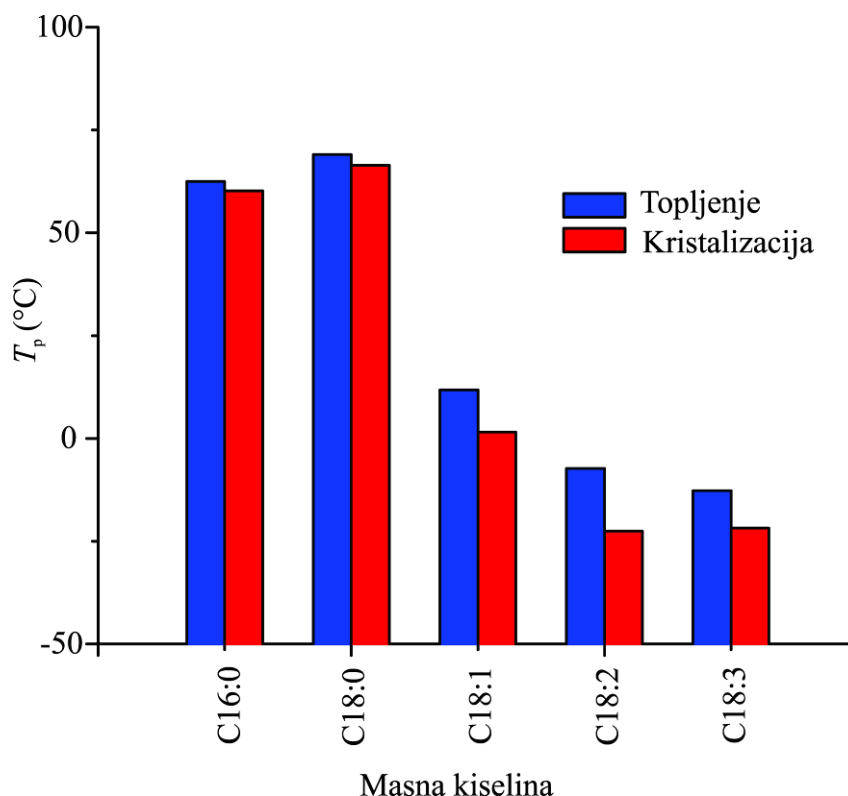
Masna kiselina	$T_{on}$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_{off}$ (°C)	$H_c$ (J/g)
Linoleinska	$-21,18 \pm 0,13^d$	$-21,82 \pm 0,19^b$	$-23,17 \pm 0,07^c$	$-130,20 \pm 1,07^b$
Linolna	$-22,15 \pm 0,20^b$	$-22,55 \pm 0,13^b$	$-24,00 \pm 0,18^b$	$-151,60 \pm 0,86^a$
Oleinska	$1,97 \pm 0,02^e$	$1,53 \pm 0,01^d$	$0,41 \pm 0,01^e$	$-181,40 \pm 1,20^c$
	$-8,78 \pm 0,67^c$	$-11,7 \pm 0,11^c$	$-14,74 \pm 0,19^d$	$-23,46 \pm 0,32^f$
Stearinska	$66,57 \pm 0,52^g$	$66,40 \pm 0,41^f$	$64,64 \pm 0,15^g$	$-415,60 \pm 4,32^e$
Palmitinska	$60,28 \pm 0,36^f$	$60,16 \pm 0,57^e$	$58,59 \pm 0,55^f$	$-358,80 \pm 1,98^d$

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar iste kolone su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *Tukey*-evom testu, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

*Post-hoc Tukey*-jev *HSD* test je pokazao da se vrednosti karakterističnih temperatura i entalpija procesa kristalizacije i topljenja ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ), određene *DSC* metodom, razlikuju između svih ispitanih masnih kiselina sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ . Ovaj rezultat ukazuje na to da struktura masnih kiselina (broj C atoma i broj dvostrukih veza u molekulu) značajno utiče na njihove termalne karakteristike.

Pikovi topljenja i kristalizacije ispitivanih masnih kiselina su uski, a iz njih određene karakteristične temperature ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) su međusobno jako bliske, pa je za analizu zavisnosti termalnih karakteristika od vrste masnih kiselina dovoljno razmatrati samo jednu karakterističnu temperaturu i u ovom slučaju to je  $T_p$ . Radi lakšeg uočavanja te zavisnosti na slici 18 prikazano je kako se menja  $T_p$  (i kod topljenja i kod kristalizacije) s vrstom masne kiseline.

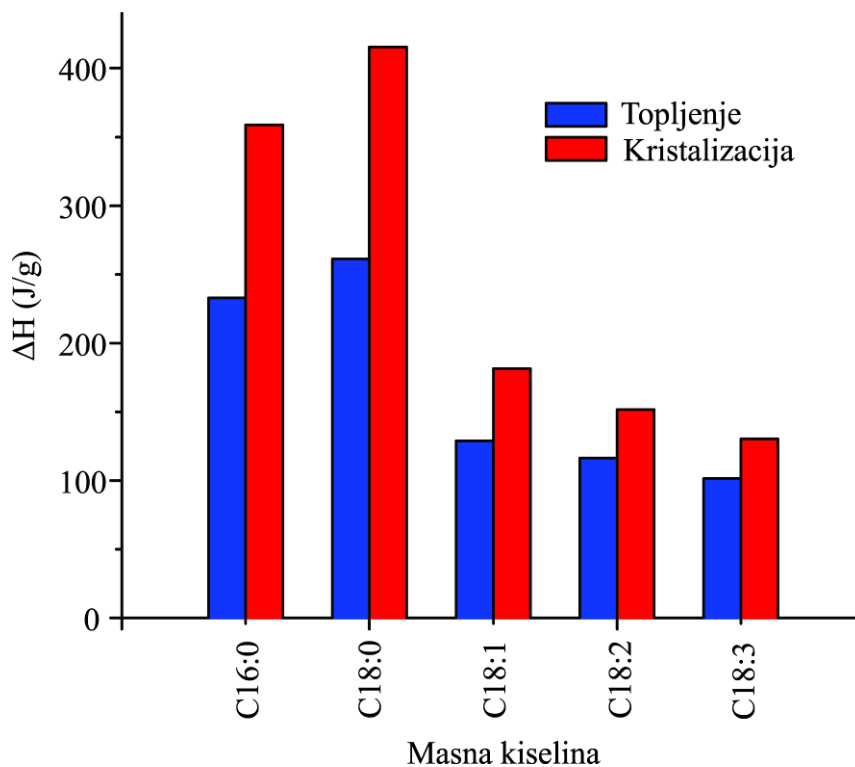
Sa slike se jasno vidi da vrednosti temperatura topljenja i kristalizacije prate isti trend kretanja u zavisnosti od strukture masnih kiselina, kao i da postoji veza između hemijske strukture masnih kiselina i njihovih temperatura topljenja/kristalizacije.



*Slika 18. Zavisnost  $T_p$  topljenja i kristalizacije od vrste masne kiseline.*

Prva stvar koja je uočljiva sa slike 18 jeste da zasićene masne kiseline imaju značajno veće temperature topljenja/kristalizacije u odnosu na nezasićene masne kiseline. Razlog za to je što nezasićene masne kiseline imaju linearnu strukturu (molekuli nezasićenih masnih kiselina se zbog dvostruke veze savijaju), pa se prilikom kristalizacije gušće pakuju i grade stabilniju kristalnu rešetku i shodno tome tope se na višim temperaturama [172]. Temperature topljenja/kristalizacije zasićenih masnih kiselina rastu s porastom dužine ugljeničnog lanca. To je, verovatno, zbog toga što međumolekulske disperzione sile rastu s porastom broja ugljenikovih atoma u lancu [177]. Što se tiče nezasićenih masnih kiselina, povećanje broja dvostrukih veza smanjuje temperature topljenja/kristalizacije. Razlog tome je što s povećanjem broja dvostrukih veza, molekul masne kiseline sve više odstupaju od linearne strukture, pa se samim tim sve teže pakuju u kristalnoj rešetki [172].

Na slici 19 prikazana je zavisnost apsolutnih vrednosti entalpija topljenja i kristalizacije od vrste masne kiseline, odnosno od strukture masnih kiselina.

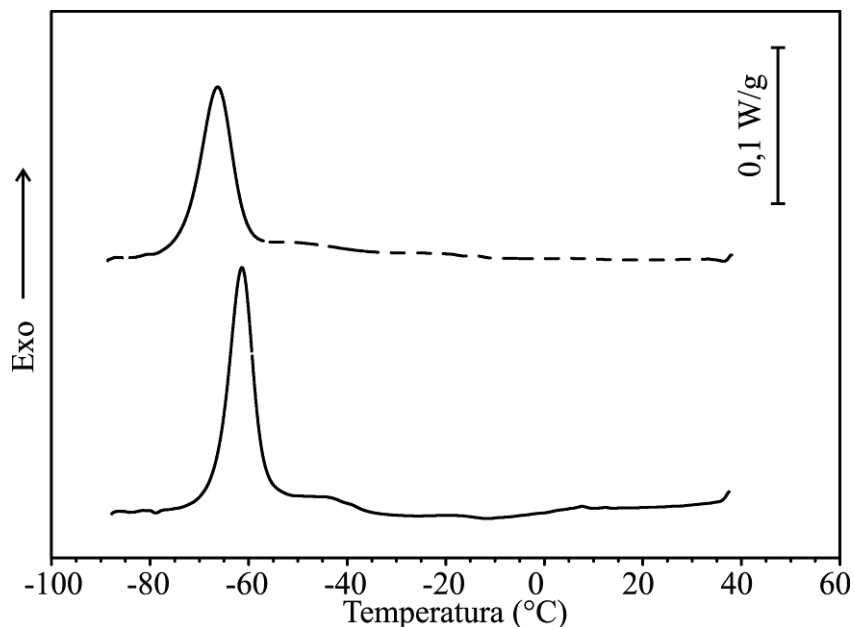


*Slika 19. Zavisnost apsolutnih vrednosti entalpija topljenja i kristalizacije od vrste masne kiseline.*

Sa slike 19 se vidi da je trend kretanja vrednosti entalpija topljenja/kristalizacije isti kao i trend kretanja temperatura topljenja/kristalizacije u zavisnosti od strukture masnih kiselina. Uopšteno, apsolutne vrednosti entalpija kod zasićenih masnih kiselina su veće od vrednosti entalpija kod nezasićenih masnih kiselina. Takođe, vrednosti entalpija kod zasićenih masnih kiselina rastu s porastom broja ugljenikovih atoma u molekulu, a vrednosti entalpija kod nezasićenih masnih kiselina opadaju sa porastom broja dvostrukih veza u molekulu.

DSC krive kristalizacije ulja iz semena maline i kupine dobijene pri brzini hlađenja od 2 °C/min prikazane su na slici 20. Na obe krive može da se vidi po jedan egzotermni pik, koji odgovara procesu kristalizacije ispitivanih ulja. Zbog složenog sastava ulja (raznolikost molekula triacilglicerola), a samim tim i procesa kristalizacije, širina kristalizacionih pikova ulja je veća u odnosu na kristalizacione pikove čistih masnih

kiselina. Iz ovih kristalizacionih pikova određene su karakteristične temperature ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) i entalpije procesa kristalizacije ispitivanih ulja. Dobijeni podaci su prikazani u tabeli 17.



**Slika 20.** DSC krive kristalizacije ulja iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija), brzina hlađenja 2 °C/min, protok vazduha 50 ml/min.

**Tabela 17.** Temperature i entalpije kristalizacije ulja iz semena maline i kupine ( $T_{on}$  – temperature početka prelaza,  $T_p$  – temperatura maksimuma pika prelaza i  $T_{off}$  – temperature završetka prelaza).

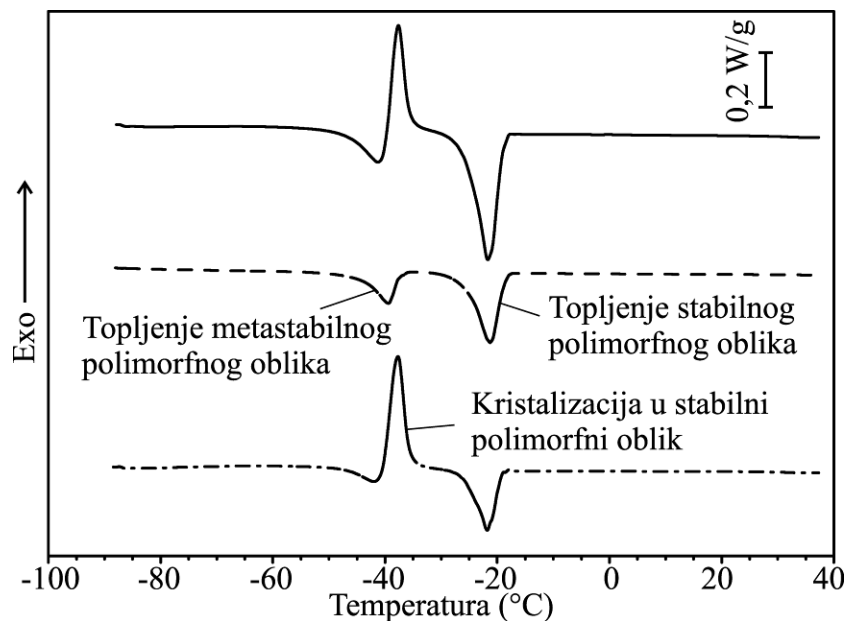
Fazni prelaz	Ulje iz semena kupine	Ulje iz semena maline	
Kristalizacija (°C)	$T_{on}$	$-57,02 \pm 1,01^a$	$-60,56 \pm 0,98^b$
	$T_p$	$-61,36 \pm 0,53^a$	$-66,32 \pm 0,84^b$
	$T_{off}$	$-66,57 \pm 1,18^a$	$-73,40 \pm 1,11^b$
Entalpija kristalizacije, $\Delta H_c$ (J/g)	$-29,0 \pm 2,1^a$	$-25,1 \pm 2,5^b$	

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar istog reda su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema ANOVA analizi, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Kad se uporede  $T_p$  vrednosti kristalizacije ulja sa  $T_p$  vrednostima kristalizacije čistih masnih kiselina vidi se da ulja kristališu na dosta nižim temperaturama (oko 40 °C nižoj temperaturi u odnosu na linoleinsku masnu kiselinu). Razlog tome je što su ispitivana ulja veoma bogata nezasićenim masnim kiselinama (85 %), a uz to je i najveći deo masnih kiselina u uljima vezan za molekul glicerola u obliku triacilglicerola. Oblici molekula triacilglicerola su mnogo složeniji od jednog molekula masne kiseline, pa se shodno tome teže pakuju u kristalne rešetke. Takođe, energije kristalnih rešetki ispitivanih ulja su niže u odnosu na energije kristalnih rešetki čistih masnih kiselina što se vidi iz nižih vrednosti entalpije kristalizacije ulja.

Iz tabele 17 se, takođe, vidi da ulje iz semena maline kristališe na oko 5 °C nižoj temperaturi ( $T_p$ ) u odnosu na ulje iz semena kupine [156]. Razlog za to leži u većem sadržaju linoleinske masne kiseline u ulju iz semena maline (Tabela 14). Povećanje broja dvostrukih veza u molekulima masnih kiselina utiče tako što smanjuje temperaturu kristalizacije triacilglicerola [41]. Naime, građenje kristala zavisi od linearnosti molekula masnih kiselina koje ulaze u sastav triacilglicerola. Dvostruka veza u *cis*-položaju lomi linearnu strukturu ugljeničnog lanca masne kiseline, tako da što se više dvostrukih veza nalazi u molekulima masnih kiselina, to će molekuli triacilglicerola imati složeniji oblik, pa samim tim teže će se složiti (spakovati) u kristalnu strukturu [172].

Na slici 21 prikazane su *MDSC* krive dobijene pri topljenju ulja iz semena maline i kupine pri brzini grejanja od 2 °C/min. Pored ukupnog toplotnog toka, kao signala, prikazane su i njegove komponente – reverzibilni i ireverzibilni toplotni tok. Dobijene *MDSC* krive imaju sličan oblik za oba ulja, što ukazuje na to da se ispitivana ulja slično ponašaju pri faznim prelazima. Takođe, može da se vidi da ukupni toplotni tok sa *MDSC* kriva oba ulja ima sličan oblik sa *DSC* krivama brašna (slika 14) ispitivanih semena u datom temperaturskom opsegu (-50 do -10 °C), što još jednom potvrđuje da složen *DSC* signal u tom temperaturskom opsegu na *DSC* krivama brašna proizilaze iz faznih prelaza ulja prisutnih u semenima. Sve karakteristične temperature ( $T_{on}$ ,  $T_p$  i  $T_{off}$ ) koje se javljaju tokom procesa topljenja ispitivanih ulja, a koje su dobijene na osnovu *MDSC* kriva prikazane su u tabeli 18 [156,166].



**Slika 21.** MDSC krive pri grejanju (ukupni toplotni tok – puna linija, reverzni toplotni tok – isprekidana linija, ireverzni toplotni tok – linija tačka linija) ulja iz semena maline, brzina grejanja 2 °C/min, protok vazduha 50 ml/min, modulaciona amplituda  $\pm 0,5$  °C na svakih 40 s.

Opseg topljenja ispitivanih ulja je dosta veći u odnosu na opseg topljenja čistih masnih kiselina. Razlog tome je već pomenuta složenost sastava ulja u odnosu na čiste masne kiseline. Sa MDSC krivih se vidi da se ispitivana ulja tope u temperaturskom opsegu od oko -45 do -15 °C. U literaturi se sreću različite vrednosti temperaturskih opsega topljenja u zavisnosti od vrsta ulja. *Kaisersberger* [101] je za četiri biljna ulja (suncokretovo, laneno, maslinovo i groždano) našao da se tope u intervalu od -60 do 9 °C, dok je za industrijski prerađene masti (maslac, poboljšano ulje iz kokosa) našao da se tope u opsegu od -30 do 50 °C. *Tolstorebrov* i saradnici [98] su pokazali da se neka od ribljih ulja (iz haringe, skuše, pastrmke i lososa) tope u temperaturskom opsegu od oko -92 do 23 °C.

Temperaturski opseg topljenja, kao i oblik DSC krivih topljenja ulja su rezultat složenog i jedinstvenog sastava (udeo različitih masnih kiselina) ulja dobijenih iz različitih izvora, ali i polimorfizma triacilglicerola, koji su glavni sastojci najvećeg broja masti i ulja. Zapravo, već je rečeno da triacilgliceroli imaju sposobnost da prilikom hlađenja



kristališu u različite kristalne strukture, odnosno polimorfne oblike. Ukoliko ulje tokom hlađenja kristališe u neku od manje stabilnih kristalnih oblika (metastabilni oblik), onda će tokom zagrevanja takvog ulja, određena količina triacilglicerola da se otopi, dok će ostatak da se preuredi i prekrystalise u stabilni kristalni oblik, koji se topi na višim temperaturama.

**Tabela 18.** Temperature i entalpije faznih prelaza, dobijene na osnovu MDSC kriva grejanja ulja iz semena maline i kupine ( $T_{on}$  – temperature početka prelaza,  $T_p$  – temperatura maksimuma pika prelaza i  $T_{off}$  – temperature završetka prelaza).

Fazni prelaz		Ulje iz semena kupine	Ulje iz semena maline
Topljenje metastabilnog polimorfa (°C)	$T_{on}$	$-43,72 \pm 0,56^a$	$-44,29 \pm 0,47^b$
	$T_p$	$-38,84 \pm 1,31^a$	$-39,36 \pm 0,99^b$
	$T_{off}$	$-36,76 \pm 1,03^a$	$-37,37 \pm 1,01^b$
Rekristalizacija (°C)	$T_{on}$	$-40,30 \pm 0,63^a$	$-40,38 \pm 0,71^b$
	$T_p$	$-37,78 \pm 0,58^a$	$-37,72 \pm 0,63^b$
	$T_{off}$	$-35,57 \pm 0,31^a$	$-35,66 \pm 0,28^b$
Topljenje stabilnog polimorfa (°C)	$T_{on}$	$-22,52 \pm 0,51^a$	$-25,56 \pm 0,62^b$
	$T_p$	$-19,03 \pm 0,48^a$	$-21,29 \pm 0,73^b$
	$T_{off}$	$-15,79 \pm 0,28^a$	$-18,44 \pm 0,51^b$
Entalpija topljenja, $\Delta H_m$ (J/g)		$72,4 \pm 3,7^a$	$63,9 \pm 3,1^b$

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar istog reda su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema ANOVA analizi, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Ranije je rečeno da reverzni toplotni tok, kao deo ukupnog signala na MDSC krivoj, pokazuje topljenje, dok ireverzni toplotni tok ukazuje na rekristalizaciju kad su u pitanju ulja. Na krivama koje predstavljaju reverzni toplotni tok, kod oba ispitivana ulja, vide se dva endotermna pika (slika 21). Endotermni pik na nižoj temperaturi,  $T_p$  oko  $-39$  °C za oba ulja, predstavlja topljenje metastabilnog polimorfnog oblika, dok drugi, endotermni pik na višoj temperaturi ( $T_p$ )  $-21,29$  °C za ulje iz semena maline i  $-19,03$  °C za ulje iz

semena kupine odgovara topljenju stabilnog polimorfnog oblika. Egzotermni pik na krivoj ireverzno toplog toka s maksimumom ( $T_p$ ) na oko  $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (za oba ulja) predstavlja rekristalizaciju otopljenog dela triacilglicerola u stabilni polimorfni oblik. Slične rezultate dobili su i *Kaisersberger* [101] za ulja iz čička i semenki grožđa, kao i *Tolstorebrov* i saradnici [102] za neka riblja ulja (iz pastrmke i lososa).

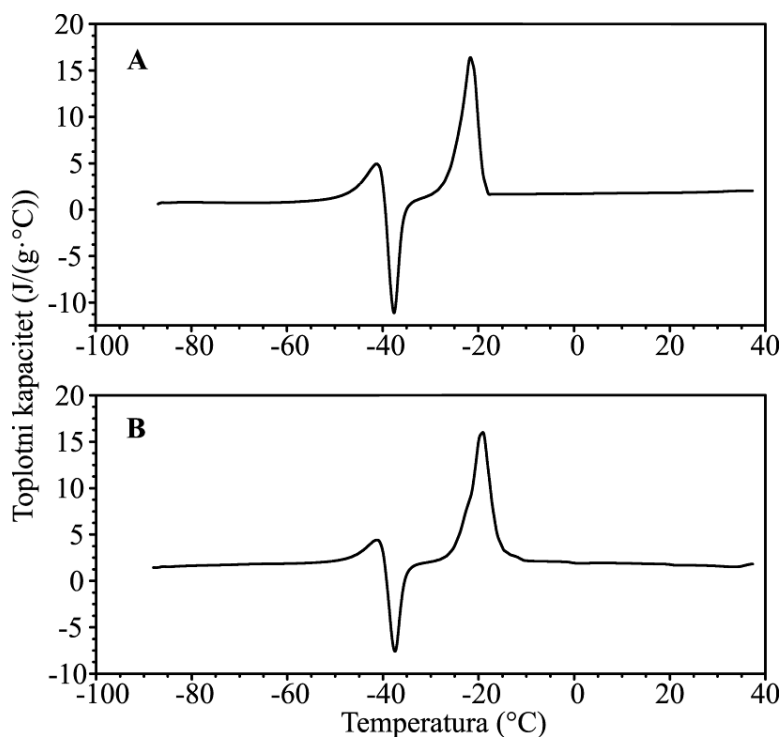
Entalpija topljenja je, za oba ulja, računata integracijom pikova koji nastaju usled topljenja stabilnog polimorfnog oblika na krivoj ukupnog toplog toka. Dobijene vrednosti entalpija topljenja su u skladu s vrednostima koje su dobili *Tan* i *Che Man* [178] za vrste palminih ulja s visokim stepenom nezasićenosti. Entalpija topljenja ulja iz semena maline je manja u odnosu na entalpiju topljenja ulja iz semena kupine. Razlog za to je veći sadržaj linoleinske kiseline, koja ga čini više nezasićenim uljem. Ovaj zaključak proizilazi iz već utvrđene činjenice da ulja s većim stepenom nezasićenosti zahtevaju manje energije pri procesu topljenja [178,179].

Kad se uporede vrednosti entalpija topljenja s vrednostima entalpija kristalizacije (tabele 17 i 18), vidi se da su entalpije topljenja oko 2,5 puta veće kod oba ispitivana ulja. To je najverovatnije zbog toga, što pri hlađenju izvesna količina ulja ostaje u tečnom, pothlađenom (*supercooled*) stanju, jer je rast kristala u uljima difuziono ograničen proces. Kasnije tokom stajanja ulja 5 min na  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , radi uravnotežavanja, ovaj pothlađeni deo ulja postepeno kristališe, tako da se pri topljenju ulja, u fazi grejanja, javlja veća količina ulja u kristalnoj fazi koja se topi, pa je i toplotni efekat veći na *MDSC* krivoj, a samim tim i izračunata entalpija topljenja ulja.

Na osnovu *ANOVA* analize utvrđeno je da se vrednosti temperatura i entalpija faznih prelaza ulja iz semena kupine razlikuju od vrednosti ovih parametara za ulje iz semena maline sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ . Ovaj rezultat ukazuje na to da razlika u sadržaju masnih kiselina između dva ispitivana ulja ima značajnog uticaja na njihove termalne karakteristike.

Sa slika 20 i 21 se vidi da su *DSC* krive topljenja ulja složenije u odnosu na *DSC* krive kristalizacije ulja, u pogledu širine pikova i preklapanja termalnih procesa. Najverovatniji razlog za to je što kristalizacija ulja zavisi samo od brzine hlađenja [180,181] i sastava ispitivanog ulja, dok je *DSC* profil topljenja ulja posledica dobro poznate pojave, polimorfizma, koja strogo zavisi od termalne istorije uzoraka ulja [100].

Na slici 22 prikazane su krive specifičnih toplotnih kapaciteta ( $C_p$ ) ispitivanih ulja u čvrstom (od  $-85$  do  $-50$  °C) i tečnom (od  $-10$  do  $40$  °C) stanju, kao i u oblasti faznih prelaza (od  $-50$  do  $-10$  °C). Jasno se vidi da se specifični toplotni kapacitet, oba ulja, ne menja značajno kada su ulja u čvrstom ili u tečnom stanju. Vrednosti specifičnih toplotnih kapaciteta se kreću od  $0,75$  do  $1,00$   $J/(g \cdot ^\circ C)$  u čvrstom i od  $1,67$  do  $2,02$   $J/(g \cdot ^\circ C)$  u tečnom stanju za ulje iz semena maline, a za ulje iz semena kupine u čvrstom od  $1,53$  do  $2,06$   $J/(g \cdot ^\circ C)$  i od  $2,13$  do  $1,63$   $J/(g \cdot ^\circ C)$  u tečnom stanju. Dobiene vrednosti specifičnih toplotnih kapaciteta su slične sa vrednostima specifičnih toplotnih kapaciteta nekih drugih biljnih ulja, koje mogu da se nađu u literaturi [116,128].

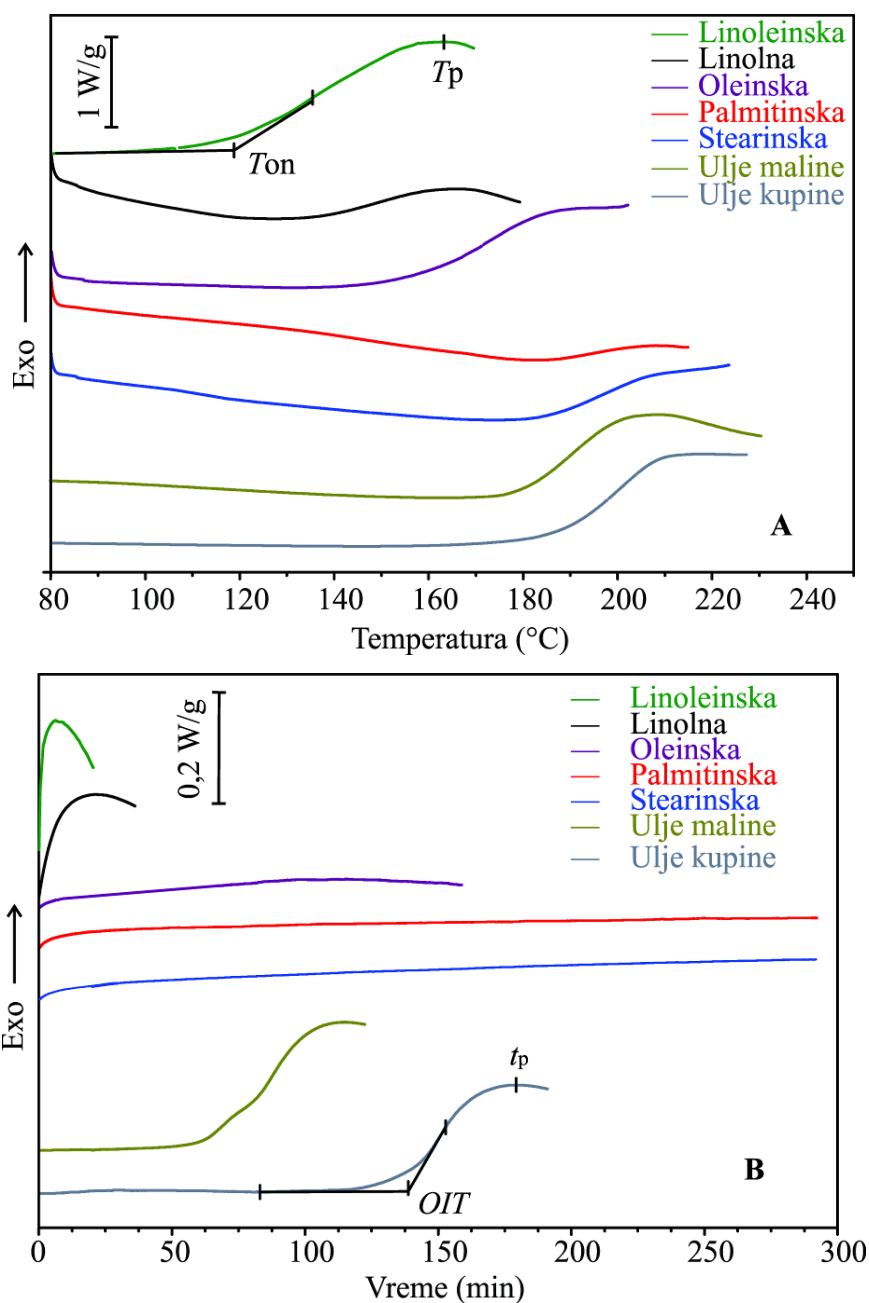


*Slika 22. Specifični toplotni kapacitet ( $C_p$ ) ulja iz semena: (A) maline i (B) kupine u funkciji temperature, dobijen pomoću MDSC metode, brzina grejanja  $2$  °C/min, protok vazduha  $50$  ml/min, modulaciona amplituda  $\pm 0,5$  °C na svakih  $40$  s.*

### 3.3.2. Oksidativna stabilnost čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine

Određivanje oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine pomoću DSC metode urađeno je u izotermnim i neizotermnim uslovima i

dobijene DSC krive prikazane su na slici 23. Na slici je, takođe, prikazan i način određivanja parametara oksidativne stabilnosti  $T_{on}$  i  $T_p$  u neizotermnim uslovima (A) i  $OIT$  i  $t_p$  u izotermnim uslovima (B).



**Slika 23.** DSC krive oksidacije čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine u: (A) neizotermnim uslovima, brzina grejanja  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , protok kiseonika  $50\text{ ml}/\text{min}$  ( $T_{on}$  – početak oksidacije,  $T_p$  – maksimum pika); (B) izotermnim uslovima, na temperaturi od  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protok kiseonika  $50\text{ ml}/\text{min}$  ( $OIT$  – indukciono vreme oksidacije,  $t_p$  – maksimum pika).

Iz prikazanih rezultata se vidi da u neizotermkim uslovima sa *DSC* krivih mogu da se odrede parametri oksidativne stabilnosti ( $T_{on}$  i  $T_p$ ) svih ispitivanih uzoraka, dok u izotermkim uslovima oba parametra ( $OIT$  i  $t_p$ ) mogu da se odrede samo za ulja, a za nezasićene masne kiseline samo  $t_p$ . Kod zasićenih masnih kiselina ne može da se odredi nijedan parametar oksidativne stabilnosti u izotermkim uslovima na 120 °C.

Nepostojanje indukcionog perioda procesa oksidacije u izotermkim uslovima kod čistih nezasićenih masnih kiselina ukazuje na to da oksidacija ovih masnih kiselina, na 120 °C, počinje odmah posle uvođenja kiseonika u ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Takođe, sa slike 23B se vidi da s porastom stepena zasićenosti masnih kiselina (smanjene broja dvostrukih veza u molekulu) oksidacioni pik se širi (maksimum pika se pomera ka većim vrednostima vremena), površina ispod oksidacionog pika se smanjuje, tako da je kod oleinske kiseline jedva vidljiv. Kod zasićenih masnih kiselina oksidacioni pik se ne javlja do 300-tog minuta. Razlog tome može da bude da se oksidacija zasićenih masnih kiselina odvija sporo pri čemu je toplotni efekat vrlo mali i nije detektovan pri korišćenim eksperimentalnim uslovima.

U tabeli 19 prikazani su parametri oksidativne stabilnosti očitani sa *DSC* krivih oksidacije čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine, u izotermkim i neizotermkim uslovima.

Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da je za procenu oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina najbolje koristiti *DSC* krive dobijene u neizotermkim uslovima, jer parametri oksidativne stabilnosti ne mogu da se odrede u izotermkim uslovima. Kad su u pitanju ispitivana ulja, oksidativna stabilnost može uspešno da se odredi i u izotermkim i u neizotermkim uslovima. Prednost određivanja u neizotermkim uslovima je kraće vreme trajanja analize.

**Tabela 19.** *Prameni oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina i ulja iz semena maline i kupine u izotermnim i neizotermnim uslovima.*

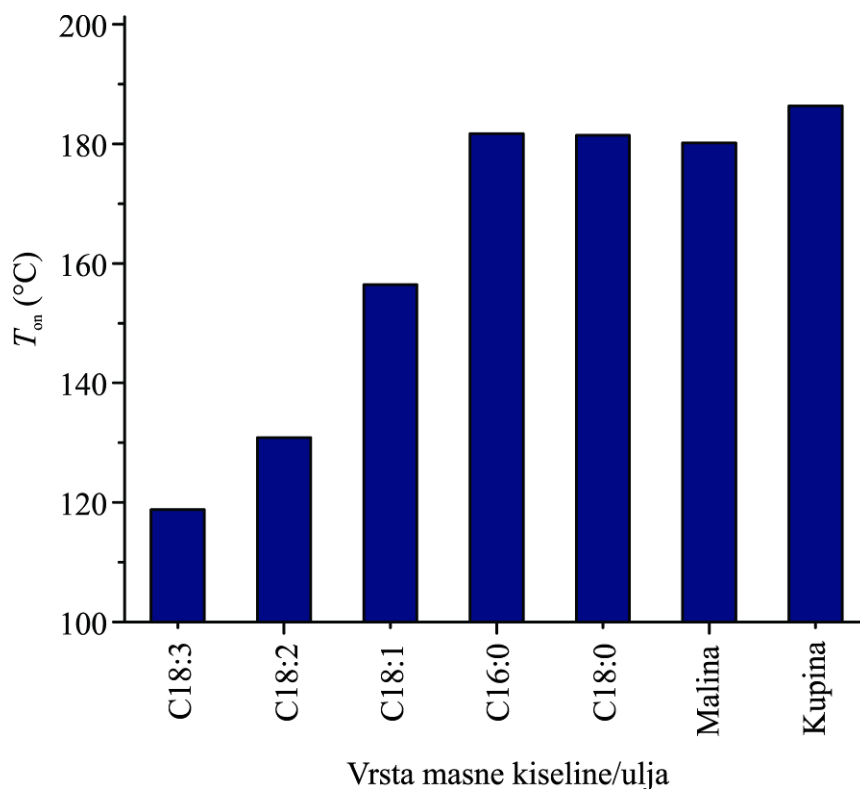
Tip uzorka	Neizotermni uslovi		Izotermni uslovi	
	$T_{on}$ (°C)	$T_p$ (°C)	$OIT$ (min)	$t_p$ (min)
Linoleinska	118,80 ± 1,60 <sup>b</sup>	163,24 ± 1,72 <sup>b</sup>	-	6,17 ± 2,04 <sup>a</sup>
Linolna	130,83 ± 1,93 <sup>c</sup>	165,95 ± 2,33 <sup>b</sup>	-	21,47 ± 2,20 <sup>c</sup>
Oleinska	156,47 ± 2,90 <sup>d</sup>	194,01 ± 3,04 <sup>c</sup>	-	115,59 ± 1,69 <sup>b</sup>
Palmitinska	181,72 ± 2,00 <sup>a</sup>	208,13 ± 2,65 <sup>a</sup>	-	-
Stearinska	181,44 ± 1,89 <sup>a</sup>	210,85 ± 2,35 <sup>a</sup>	-	-
Ulje iz semena maline	180,16 ± 1,00 <sup>a</sup>	208,51 ± 1,69 <sup>a</sup>	72,25 ± 2,79 <sup>a</sup>	114,69 ± 1,24 <sup>b</sup>
Ulje iz semena kupine	186,37 ± 2,95 <sup>e</sup>	216,94 ± 3,14 <sup>d</sup>	138,27 ± 2,21 <sup>b</sup>	179,15 ± 1,87 <sup>d</sup>

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar iste kolone su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *Tukey*-evom testu, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Sproveden *post-hoc Tukey*-ev *HSD* test nad vrednostima dobijenim u neizotermnim uslovima ( $T_{on}$  i  $T_p$ ) je pokazao da se ove vrednosti statistički značajno ne razlikuju između ulja iz semena maline i zasićenih masnih kiselina (palmitinske i stearinske), dok su vrednosti ovih parametara za ulje iz semena kupine i nezasićenih masnih kiselina (oleinske, linolne i linoleinske) statistički značajno različite. Takođe, vrednosti dobijene u izotermnim uslovima ( $OIT$  i  $t_p$ ) se statistički značajno razlikuju između ulja iz semena maline i ulja iz semena kupine. Vrednosti  $t_p$  su statistički značajno različite i između nezasićenih masnih kiselina. Ovi rezultati statističke analize ukazuju da struktura masnih kiselina (stepen nezasićenosti), kao i njihova zastupljenost u ispitivanim uljima značajno utiče na oksidativnu stabilnost ulja.

Da bi se jasnije uvidelo kako struktura masnih kiselina utiče na njihovu oksidativnu stabilnost, kao i da bi se uporedila oksidativna stabilnost čistih masnih kiselina sa

oksidativnom stabilnošću ispitivanih ulja, gde su masne kiseline uglavnom vezane za molekule glicerola, na slici 24 prikazano je kako se  $T_{on}$  oksidacije menja u zavisnosti od vrste masnih kiselina i ulja.



*Slika 24. Zavisnost  $T_{on}$  oksidacije od vrste masne kiseline i ulja.*

Sa grafika se vidi da zasićene masne kiseline imaju veće vrednosti  $T_{on}$  u odnosu na nezasićene masne kiseline, što ukazuje na to da su nezasićene masne kiseline podložnije oksidaciji. Kad su u pitanju nezasićene masne kiseline, sa smanjenjem broja dvostrukih veza u molekulu vrednosti  $T_{on}$  rastu, što znači da sa smanjenjem nezasićenosti oksidativna stabilnost čistih masnih kiselina raste, što je u skladu s literaturnim podacima [139,141]. Ispitivane zasićene masne kiseline imaju približno iste vrednosti  $T_{on}$ , što ukazuje da dužina ugljeničnog lanca u molekulu masne kiseline ne utiče značajno na oksidativnu stabilnost zasićenih masnih kiselina.

Kad se uporede vrednosti  $T_{on}$  dobijene za ispitivana ulja s vrednostima za čiste masne kiseline, vidi se da ulja imaju vrednosti slične vrednostima zasićenih masnih kiselina,

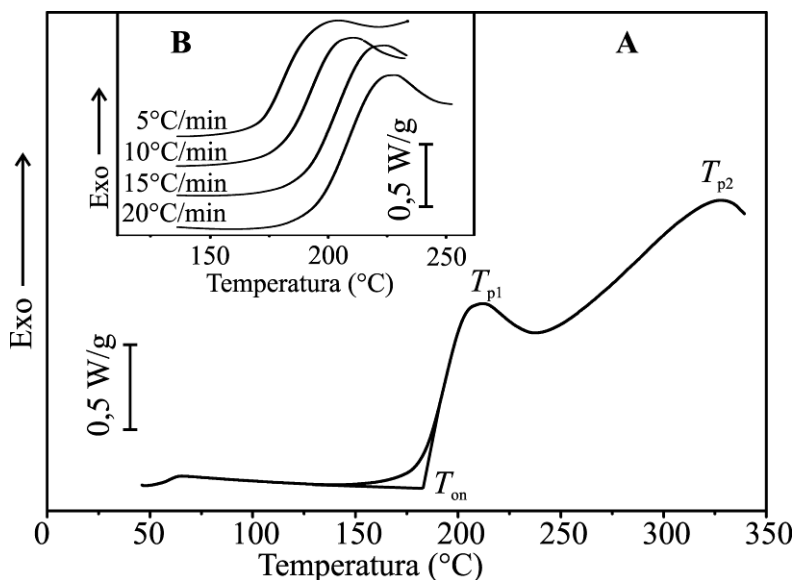
što je neočekivano, jer se iz tabele 14 vidi da su ova ulja visoko nezasićena (sadrže oko 85 % nezasićenih masnih kiselina). Dva su glavna razloga za to. Prvi razlog je taj što su u uljima masne kiseline vezane za molekul glicerola u obliku triacilglicerola, što ih čini stabilnijim pri dejstvu kiseonika. Drugi razlog, koji je sa nutricionističke tačke i bitniji, jeste taj što biljna ulja ne predstavljaju samo običnu smešu različitih molekula triacilglicerola, već u sebi sadrže i brojna druga liposolubilna jedinjenja (kakva su i različiti antioksidanti), koja se zajedno sa uljima ekstrahuju iz njihovog izvora. U literaturi [57,83] je poznato da su ulja iz semena maline i kupine jako bogata antioksidantima, pa su stoga uprkos visokom sadržaju nezasićenih masnih kiselina relativno stabilna u pogledu oksidacije. Upravo i taj nedostatak antioksidanata kod čistih masnih kiselina može da bude razlog za nepostojanje indukcionog perioda pri njihovoj oksidaciji u izotermkim uslovima.

Na osnovu svega navedenog može da se zaključi da je pri proizvodnji funkcionalne hrane mnogo bolje koristiti ulja iz semena maline i kupine, jer su bogata esencijalnim masnim kiselina, s poželjnim odnosom  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina, nego dodavati čiste esencijalne masne kiseline. Ulja iz semena maline i kupine pored visokog sadržaja esencijalnih masnih kiselina sadrže i značajne količine prirodnih antioksidanata, koji čine ova ulja dosta stabilnijim u odnosu na čiste esencijalne masne kiseline, pa samim tim će i proizvodi kojima se dodaju u toku proizvodnje biti značajno stabilniji nego kad bi se dodavale čiste esencijalne masne kiseline.

### **3.3.3. Kinetički parametri ( $E_a$ , $A$ i $k$ ) procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u izotermkim i neizotermkim uslovima**

Određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine je bitno, jer na osnovu njih može da se izvrši procena oksidativne stabilnosti ispitivanih ulja u datim uslovima (npr. tokom skladištenja, prerade, upotrebe za prženje). Kinetički parametri određeni su u izotermkim i neizotermkim uslovima [168,169,182–184], po postupcima opisanim u poglavlju 2.3.4.1.





**Slika 25.** (A) Neizotemska DSC kriva oksidacije ulja iz semena maline, brzina grejanja 10 °C/min, protok kiseonika 50 ml/min ( $T_{on}$  – temperatura početka oksidacije,  $T_{p1}$  – temperatura maksimuma prvog pika i  $T_{p2}$  – temperatura maksimuma drugog pika); (B) uticaj brzine grejanja na  $T_{on}$  i  $T_{p1}$ .

Na slici 25A prikazana je tipična DSC kriva procesa oksidacije ulja iz semena maline u neizotemskim uslovima, s brzinom grejanja od 10 C/min. DSC krive oksidacije ispitivanih ulja i na ostalim brzinama grejanja imaju isti oblik. I na ovim DSC krivama, kao i na DSC krivama oksidacije drugih ulja, dostupnih u literaturi, mogu da se vide dva egzotermna pika koja nastaju usled oksidacije ulja. Litwinienko i Kasprzycka-Guttman [120] su pokazali da model sekvencijalnih reakcija sa autokatalitičkim početkom najbolje objašnjava oblik DSC krivih koje nastaju usled oksidacije ulja. Ovaj model ukazuje da je prvi pik na DSC krivoj nastao usled stvaranja hidroperoksida, dok drugi pik nastaje kao rezultat razlaganja nastalih hidroperoksida do daljih proizvoda. Na osnovu toga jasno je da pri određivanju kinetičkih parametara procesa oksidacije ispitivanih ulja, radi procene njihove oksidativne stabilnosti, treba razmatrati samo temperaturu početka oksidacije,  $T_{on}$ , i temperaturu maksimuma prvog pika,  $T_{p1}$ .

Na slici 25B prikazano je kako različite brzine grejanja utiču na DSC krive oksidacije ispitivanih ulja, a samim tim i na vrednosti  $T_{on}$  i  $T_{p1}$ . Vidi se da ove vrednosti rastu s porastom brzine grejanja. Razlog za to je što na nižim brzinama grejanja, primarni

oksidacioni proizvodi (kao što su hidroperoksidi), koji nastaju u početnoj fazi procesa oksidacije, odmah reaguju s viškom kiseonika pri čemu nastaju molekuli s manjom molekulskom masom, kao što su aldehidi i kiseline (intermedijeri procesa oksidacije), koji ostaju u rastvoru ulja, ubrzavajući proces razlaganja. S druge strane, pri većim brzinama grejanja, ovi intermedijarni proizvodi isparavaju iz ulja pre nego što stignu da reaguju dalje i na taj način pomeraju *DSC* signal ka većim temperaturama [122].

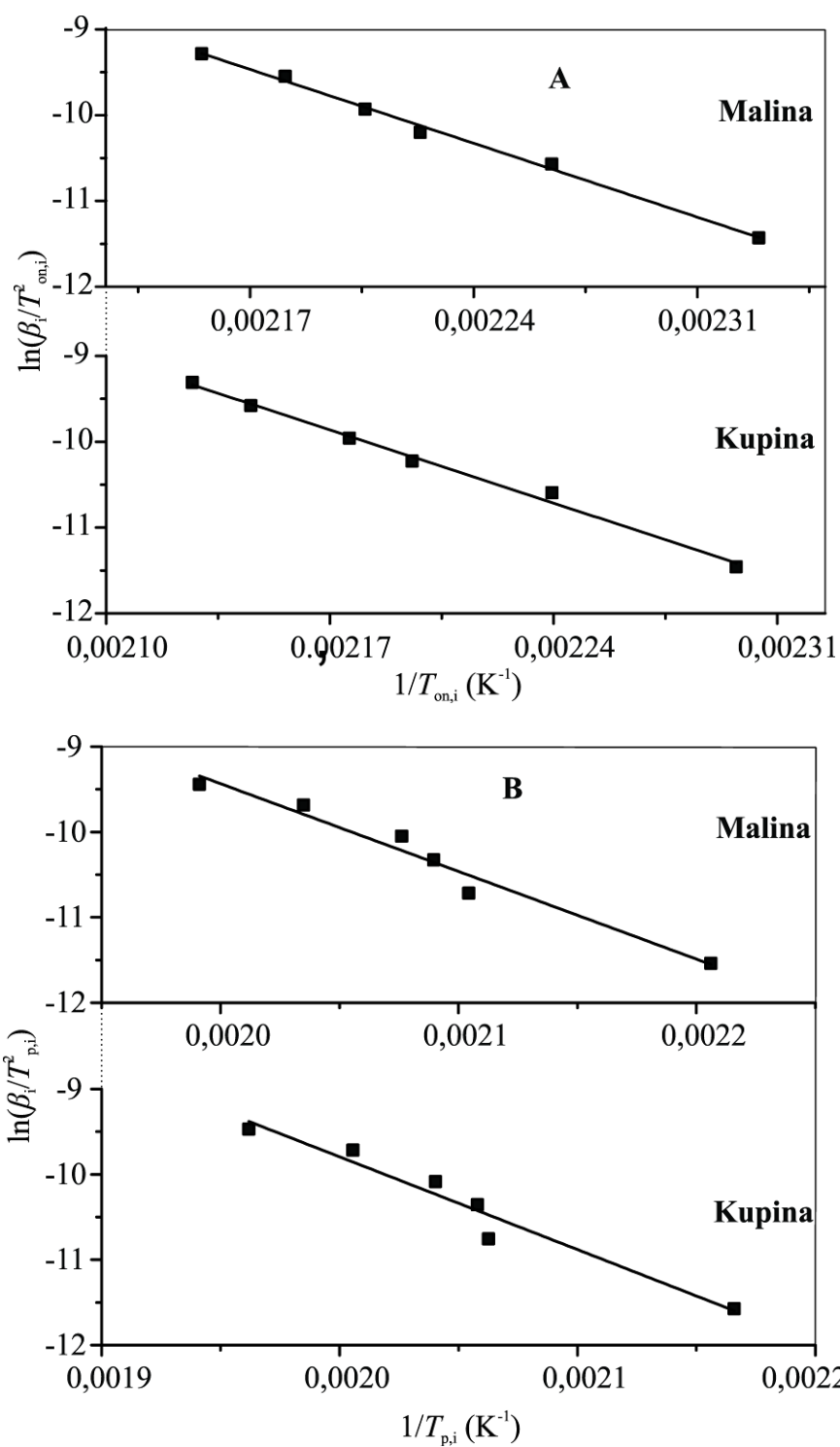
Vrednosti  $T_{on}$  i  $T_{p1}$  određene iz *DSC* kriva, koje su dobijene zagrevanjem ulja pri različitim brzinama grejanja, prikazane su u tabeli 20, za oba ulja.

**Tabela 20.**  $T_{on}$  i  $T_{p1}$  vrednosti za ulja iz semena maline i kupine, dobijene na različitim brzinama grejanja,  $\beta_i$ .

Brzina grejanja, $\beta$ (°C/min)	Ulje iz semena kupine		Ulje iz semena maline	
	$T_{on}$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_{on}$ (°C)	$T_p$ (°C)
20	197,01 ± 3,15 <sup>d</sup>	236,57 ± 4.48 <sup>c</sup>	190,90 ± 4,15 <sup>c</sup>	229,07 ± 3,63 <sup>d</sup>
15	192,99 ± 3,30 <sup>cd</sup>	225,44 ± 3.28 <sup>bc</sup>	185,35 ± 2,95 <sup>ac</sup>	218,28 ± 4,35 <sup>b</sup>
10	186,37 ± 2,95 <sup>bc</sup>	216,94 ± 3.14 <sup>ab</sup>	180,16 ± 1,00 <sup>a</sup>	208,51 ± 1,69 <sup>ab</sup>
7,5	182,28 ± 1,29 <sup>ab</sup>	212,76 ± 1.79 <sup>a</sup>	176,63 ± 2,62 <sup>ab</sup>	205,40 ± 3,62 <sup>a</sup>
5	173,38 ± 2,65 <sup>a</sup>	211,66 ± 2.57 <sup>a</sup>	168,45 ± 1,67 <sup>b</sup>	202,06 ± 4,03 <sup>a</sup>
2	162,16 ± 3,12 <sup>e</sup>	188,54 ± 5.04 <sup>d</sup>	156,18 ± 3,33 <sup>d</sup>	180,14 ± 3,14 <sup>c</sup>

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar iste kolone su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *Tukey*-evom testu, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Na osnovu statističke analize vrednosti  $T_{on}$  i  $T_{p1}$  pomoću *post-hoc Tukey*-evog *HSD* testa utvrđeno je da je razlika između ovih vrednosti dobijenih na različitim brzinama grejanja statistički značajna za oba ispitivana ulja. Ovi rezultati ukazuju da brzina grejanja značajno utiče na vrednosti  $T_{on}$  i  $T_{p1}$  i samim tim potvrđuju validnost upotrebe ovih parametara za kinetička izračunavanja.



*Slika 26. Primena (A) KAS i (B) Kissinger-ove metoda za dobijanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine u neizotermnim uslovima.*

Na osnovu dobijenih  $T_{on}$  i  $T_{p1}$  vrednosti izračunati su kinetički parametri procesa oksidacije na početku i na položaju maksimuma prvog pika, pomoću KAS metode i Kissinger-ove metode, redom (slika 26). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 21.

**Tabela 21.** Parametri linearne regresije dobijeni pomoću KAS metode za  $T_{on}$  i Kissinger-ove metode za  $T_{p1}$ , za ulja iz semena maline i kupine.

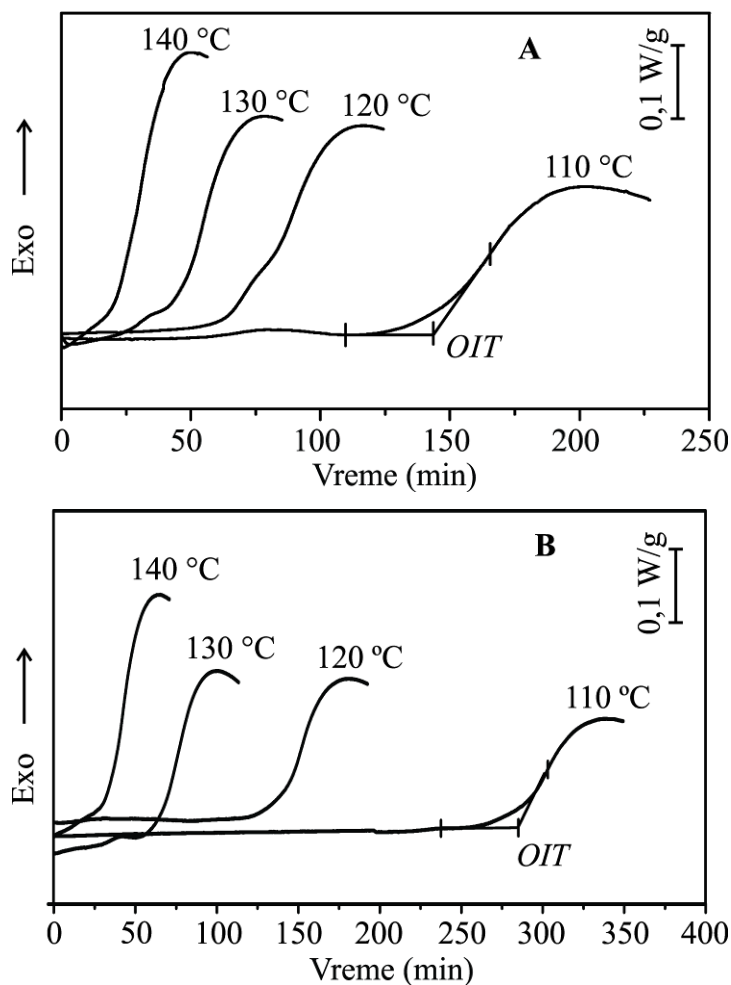
Parametri	Ulje iz semena kupine		Ulje iz semena maline	
	$T_{on}$	$T_{p1}$	$T_{on}$	$T_{p1}$
a	$-12194 \pm 499$	$-10870 \pm 1198$	$-12301 \pm 410$	$-10274 \pm 943$
b	$16,60 \pm 1,10$	$11,95 \pm 2,46$	$17,23 \pm 0,91$	$11,11 \pm 1,97$
$R^2$	0,99	0,95	0,99	0,97
$E_a^*$ (kJ/mol)	$101 \pm 4$	$90 \pm 10$	$102 \pm 3$	$85 \pm 8$
$A^*$ ( $\times 10^{10} \text{ min}^{-1}$ )	19,7	0,17	37,3	0,69

\*  $E_{a,on}$  i  $A'_{on}$  za  $T_{on}$ ;

$E_{a,p}$  i  $A_p$  za  $T_{p1}$ .

Kao što može da se vidi iz tabele 21, aktivacione energije izračunate pomoću  $T_{p1}$  su niže (za oba ulja) u odnosu na one dobijene pomoću  $T_{on}$ . Ovo ukazuje na to da se dve različite reakcije, u okviru procesa oksidacije, odvijaju na početku i na maksimumu pika DSC krive. To može da se objasni pomoću mehanizma autooksidacije, koja predstavlja lančanu reakciju započetu nastajanjem slobodnih radikala u uljnom sistemu [131]. U početnom stupnju lančane reakcije, relativno veća energija je potrebna da bi se lančana reakcija pokrenula, jer tada nastaju prvi slobodni radikali u sistemu. Kako proces oksidacije ulja sa vremenom napreduje, dolazi do nagomilavanja slobodnih radikala u uljnom sistemu, pa je sada dovoljna manja energija za dalje odvijanje oksidacije ulja. Prema tome, može da se zaključi da oksidativna stabilnost ulja prvenstveno zavisi od reakcije koja se odvija na početku (u  $T_{on}$ ) DSC krive oksidacije (reakcija nastajanja radikala). Shodno tome, u daljoj diskusiji, pri upoređivanju ovih rezultata s kinetičkim parametrima dobijenim u izotermalnim uslovima samo će se razmatrati kinetički parametri dobijeni pomoću  $T_{on}$ .

Izotemske DSC krive oksidacije ulja iz semena maline i kupine prikazane su na slici 27. Na slici je prikazan i način na koji je određivano indukciono vreme oksidacije (*OIT*). Uticaj različitih izoternih temperatura na oksidaciju ispitivanih ulja je očigledan.



*Slika 27. Izotemske DSC krive oksidacije ulja iz semena (A) maline i (B) kupine na četiri različite temperature (110, 120, 130, 140 °C), protok kiseonika 50 ml/min, OIT – indukciono vreme oksidacije.*

Vrednosti *OIT* određene iz ovih krivih prikazane su u tabeli 22. Na osnovu dobijenih rezultata može da se vidi da s povećanjem izotemske temperature za 10 °C, *OIT* vrednosti padaju na približno polovinu svoje prethodne vrednosti. To je u skladu sa  $Q_{10}$

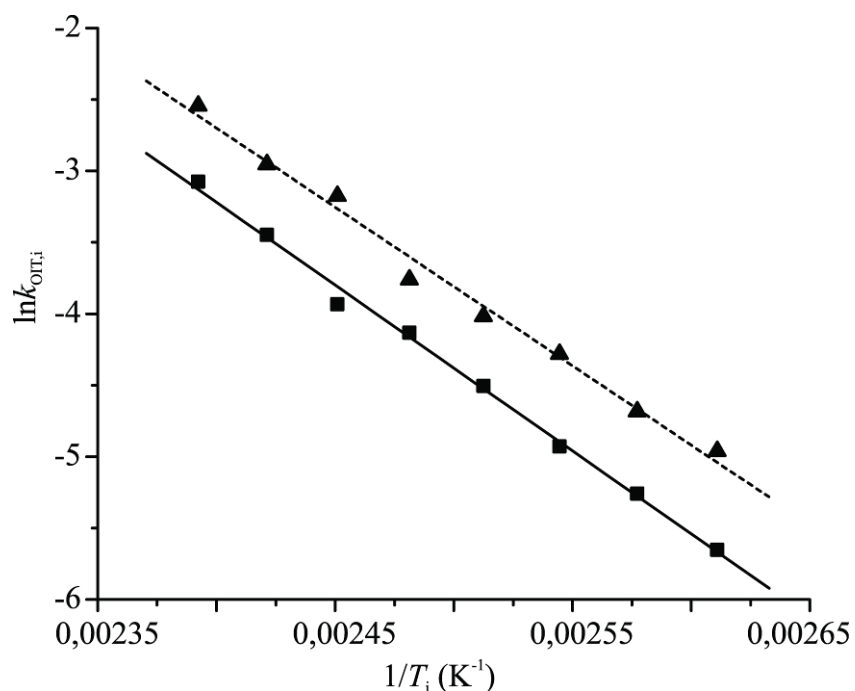
zakonom, koji povezuje reakcionu brzinu s temperaturom [32]. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) je utvrđena između svih *OIT* vrednosti, na osnovu sprovedenog *post-hoc Tukey-evog HSD* testa, što ukazuje da temperatura značajno utiče na dobijene *OIT* vrednosti. Konstante brzina procesa oksidacije ispitivanih ulja u izotermnim uslovima izračunate su kao recipročne vrednosti od *OIT* i one su takođe prikazane u tabeli 22. Vrednosti ovako izračunatih konstanti brzina rastu s povećanjem temperature. Dakle, proces oksidacije ulja je brži na višim temperaturama.

**Tabela 22.** *OIT* vrednosti i konstante brzina oksidacije ( $k_{OIT}=1/OIT$ ) na osam različitih temperatura ( $T_i$ ) dobijene za ulja iz semena maline i kupine.

$T_i$ (°C)	Ulje iz semena kupine		Ulje iz semena maline	
	<i>OIT</i> (min)	$k_{OIT}$ ( $\times 10^{-3}$ min <sup>-1</sup> )	<i>OIT</i> (min)	$k_{OIT}$ ( $\times 10^{-3}$ min <sup>-1</sup> )
110	284,93 ± 10,70 <sup>f</sup>	3,5	142,68 ± 2,92 <sup>h</sup>	7,0
115	192,35 ± 9,13 <sup>e</sup>	5,2	108,28 ± 2,95 <sup>g</sup>	9,2
120	138,27 ± 2,21 <sup>d</sup>	7,2	72,25 ± 2,79 <sup>f</sup>	13,8
125	90,45 ± 2,64 <sup>c</sup>	11,1	55,54 ± 3,70 <sup>e</sup>	18,0
130	62,37 ± 3,85 <sup>bc</sup>	16,0	42,98 ± 1,16 <sup>d</sup>	23,3
135	51,17 ± 4,37 <sup>b</sup>	19,5	23,91 ± 1,86 <sup>c</sup>	41,8
140	31,44 ± 2,03 <sup>ab</sup>	31,8	19,16 ± 1,25 <sup>b</sup>	52,2
145	21,65 ± 1,76 <sup>a</sup>	46,2	12,73 ± 1,08 <sup>a</sup>	78,5

Srednje vrednosti sa različitim slovom u indeksu unutar iste kolone su međusobno različite sa statističkom značajnošću od  $p < 0,05$ , prema *Tukey-evom* testu, broj ponavljanja:  $n = 3$ .

Aktivacione energije i predeksponencijalni faktori procesa oksidacije ulja u izotermnim uslovima su izračunati iz nagiba i odsečka prave dobijene linearnom regresijom  $\ln k_{OIT,i}$  u funkciji od  $1/T_i$  (slika 28). Izračunate vrednosti su prikazane u tabeli 23.



**Slika 28.** Linearna regresija  $\ln k_{OIT,i}$  u funkciji  $1/T_i$  za ulje iz semena maline (isprekidana linija) i kupine (puna linija).

**Tabela 23.** Arenijusovi parametri određeni za oksidaciju ulja iz semena maline i kupine u neizotermnim uslovima ( $\ln k_{OIT}$  vs.  $1/T_i$ ).

Parametri	Ulje iz semena kupine	Ulje iz semena maline
a	$24,63 \pm 0,74$	$23,94 \pm 1,13$
b	$-11605 \pm 298$	$-11099 \pm 453$
$R^2$	0,99	0,99
$E_{a,OIT}$ (kJ/mol)	$96 \pm 3$	$92 \pm 4$
$A'_{OIT}$ ( $\times 10^{10} \text{min}^{-1}$ )	5,00	2,49

Na osnovu razlika u vrednostima aktivacionih energija ispitivanih ulja, kako u izotermnim tako i u neizotermnim uslovima, nemoguće je da se tačno zaključi koje od ispitivanih ulja je oksidativno stabilnije, jer su dobijene vrednosti  $E_a$  međusobno jednake u okviru eksperimentalne greške. Međutim, *Thurgood* i saradnici [130] su istakli ranije, da aktivaciona energija ne bi trebalo da bude jedini parametar koji se

razmatra pri upoređivanju oksidativnih stabilnosti različitih lipidnih sistema i da je konstanta brzine procesa oksidacije mnogo pogodniji parametar za to. Shodno tome, iz dobijenih vrednosti aktivacionih energija i predeksponencijalnih faktora izračunate su konstante brzina procesa oksidacije, u izotermnim i u neizotermnim uslovima, na 25 °C ( $k_{25}$ ) i 120 °C ( $k_{120}$ ) pomoću Arenijusove jednačine. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 24.

**Tabela 24.** Konstante brzine na 25 °C ( $k_{25}$ ) i 120 °C ( $k_{120}$ ) procesa oksidacije ulja iz semena maline i kupine, izračunate na osnovu Arenijusove jednačine.

Oksidacione konstante brzina	Ulje iz semena maline		Ulje iz semena kupine	
	Neizotermni uslovi	Izotermni uslovi	Neizotermni uslovi	Izotermni uslovi
$k_{25}^*$ ( $\times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$ )	3,41	6,09	4,50	16,64
$k_{120}^*$ ( $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	6,68	7,47	9,62	13,53

\*  $k_{on}$  za neizotermne uslove;

$k_{oIT}$  za izotermne uslove.

Upoređivanjem dobijenih konstanti brzina, jasno se vidi da je oksidaciona konstanta brzine ulja iz semena maline oko 1,5 do 2 puta veća u odnosu na oksidacionu konstantu brzine ulja iz semena kupine, što ukazuje na to da je ulje iz kupine oksidativno stabilnije. Razlog za to, verovatno, leži u većem sadržaju linoleinske masne kiseline u ulju iz maline (tabela 14), pošto su *Fatemi* i *Hammond* [185] ranije pokazali da je relativni odnos brzina autooksidacije linolnog i linoleinskog estra oko 1:2.

Takođe, upoređivanjem konstanti brzina procesa oksidacije dobijenih za ulja iz semena maline i kupine sa konstantama brzina oksidacije nekih komercijalnih ulja (maslinovo ulje,  $k_{120}=0,015-0,090 \text{ min}^{-1}$  [123] i suncokretovo ulje  $k_{120}=0,014 \text{ min}^{-1}$  [39]), koje mogu da se nađu u literaturi, može da se vidi da one imaju približno iste ili čak i manje vrednosti. Ovo je u suprotnosti sa očekivanjima, jer su ulja iz semena maline i kupine visoko nezasićena ulja, pa bi shodno tome trebalo da budu i osetljivija na proces oksidacije od pomenutih komercijalnih ulja. Razlog za to je najverovatnije u tome što



ulja iz semena maline i kupine imaju veoma visok sadržaj tokoferola (veći od 1000 mg/kg za oba ulja, tabela 6), a koji su poznati kao jedan od najefikasnijih prirodnih antioksidanata. *Tan* i saradnici [129] su dobili slične rezultate za ulje iz susama, koje je takođe visoko nezasićeno ulje, ali sa veoma dobrom oksidativnom stabilnošću zbog visokog sadržaja antioksidanata (sesamol i sesaminol, zajedno sa tokoferolima).

Upoređivanjem kinetičkih parametara ( $E_a$ ,  $k_{25}$  i  $k_{120}$ ), dobijenih u neizotermским uslovima, sa onima dobijenim u izotermским uslovima, za oba ispitivana ulja (tabele 21, 23 i 24), vidi se da  $E_a$  i  $k_{120}$  imaju približno iste vrednosti, dok su vrednosti za  $k_{25}$  dobijene u izotermским uslovima veće od onih dobijenih u neizotermским uslovima. Ovo je verovatno zbog toga što su kinetički parametri procesa oksidacije ulja određeni na ovaj način, tj. podaci dobijeni na visokim temperaturama su korišćeni za određivanje kinetičkih parametara na nižim temperaturama. Proces oksidacije ulja može da se odvija različitim reakcionim putevima na niskim i visokim temperaturama, zavisno od reaktivnosti metalnih jona i antioksidanata prisutnih u ulju. Pored toga, i rastvorljivost kiseonika u uljima se menja s porastom temperature [129]. Na osnovu ovih činjenica može da se zaključi da *DSC*, u izotermским i neizotermским uslovima, može da se koristi za kvantitativno određivanje oksidativne stabilnosti ulja na visokim temperaturama (npr. tokom prženja), dok za predviđanje oksidativne stabilnosti ulja na nižim temperaturama (npr. tokom skladištenja na sobnoj temperaturi), mnogo je pogodnija kvalitativna procena, kad se, recimo, upoređuju oksidativne stabilnost različitih tipova ulja.

#### 4. ZAKLJUČCI

- U ovoj tezi ispitivane su hemijske i termalne osobine brašna i ulja iz semena maline i kupine, kao i oksidativna stabilnost ovih ulja u odnosu na oksidativnu stabilnost čistih masnih kiselina (palmitinske, stearinske, oleinske, linolne i linoleinske).
- Termalna analiza brašna iz semena maline i kupine je pokazala da se fazni prelazi udela nezasićenih molekula triacilglicerola, prisutnih u ispitivanim semenima, odvijaju odvojeno i na nižim temperaturama (od -50 do -10 °C) od faznih prelaza udela zasićenih molekula triacilglicerola (na oko 10 °C) kod oba semena.
- Utvrđeno je da se denaturacija proteina prisutnih u ovim semenima dešava na oko 46 °C, dok termo-oksidativno razlaganje ispitivanih vrsta brašna počinje na temperaturi od oko 210 °C, pri čemu dolazi do razgradnje organskih sastojaka semena (lipida, proteina i polisaharida).
- Gasno-hromatografska merenja su pokazala da su ulja dobijena ekstrakcijom iz semena maline i kupine visoko nezasićena ulja (oko 95 % nezasićenih masnih kiselina), pri čemu esencijalne masne kiseline (linolna i linoleinska) čine većinski udeo (81-83%). Odnos ( $\omega$ -6):( $\omega$ -3) esencijalnih masnih kiselina kreće se oko 2:1 u ulju iz semena maline i oko 4:1 u ulju iz semena kupine.
- Termalnom analizom je kod oba ulja u fazi grejanja detektovan polimorfizam. Utvrđeno je da se zbog većeg stepena nezasićenosti ulja iz semena maline njegovi fazni prelazi (topljenje stabilnog polimorfnog oblika i kristalizacija) odvijaju na nižim temperaturama od faznih prelaza ulja iz semena kupine.
- Po prvi put su određene entalpije topljenja i kristalizacije ulja iz semena maline i kupine. Ove vrednosti su niže kod ulja iz semena maline zbog većeg stepena nezasićenosti ovog ulja. Prvi put su određeni i specifični toplotni kapaciteti ovih ulja u čvrstom i tečnom stanju.
- Pokazalo se da su, usled prisustva antioksidanata (koji se prirodno nalaze u uljima iz semena maline i kupine), ova ulja, u pogledu oksidacije, znatno stabilnija u odnosu na čiste nezasićene masne kiseline, s obzirom na činjenicu da su ova ulja visoko nezasićena. Na osnovu toga zaključeno je da je pri

proizvodnji funkcionalne (zdrave) hrane bolje koristiti ulja iz semena maline i kupine nego čiste (esencijalne) masne kiseline, jer su ova ulja bogata esencijalnim masnim kiselinama, s poželjnim odnosom  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina i s dobrom oksidativnom stabilnošću.

- Po prvi put su izračunati kinetički parametri procesa oksidacije ( $E_a$ ,  $k_{120}$  i  $k_{25}$ ) ulja iz semena maline i kupine, za izotemske i neizotemske uslove. Izračunate konstante brzina procesa oksidacije ulja iz semena maline su oko 1,5 do 2 puta veće od konstanti brzina procesa oksidacije ulja iz semena kupine, čime je utvrđeno da je ulje iz semena maline podložnije procesu oksidacije. Razlog za to je veći sadržaj linoleinske kiseline u ulju iz semena maline, jer se ispitivanjem oksidativne stabilnosti čistih masnih kiselina pokazalo da sa porastom stepena nezasićenosti molekula masnih kiselina njihova oksidativna stabilnost opada.

## Literatura

- [1] R. Blagojević, V. Božić, Tehnologija proizvodnje maline, Prvo izd., Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš, 2012.
- [2] R. Blagojević, V. Božić, Tehnologija proizvodnje kupine, Prvo izd., Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš, 2012.
- [3] N. Veličković, Malina, praktični priručnik, Prvo izd., Pegaz - Bijelo Polje, Bijelo Polje, 2007.
- [4] K. Radosavljević, Unapređenje kapaciteta za proizvodnju i izvoz maline iz Republike Srbije, *Marketing* 45/3 (2014) 240–251.
- [5] The North American Raspberry & Blackberry Association.  
<http://www.raspberryblackberry.com/local.cfm?doc=webdocs/Brambleindustry.htm> (preuzeto, 6. oktobar 2015).
- [6] FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (preuzeto, 8. oktobar 2015).
- [7] United States Department of Agriculture.  
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2161?manu=&fgcd=> (preuzeto, 9. oktobar 2015).
- [8] United States Department of Agriculture.  
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2374?manu=&fgcd=> (preuzeto 9. oktobar 2015).
- [9] M.H. Carlsen, B.L. Halvorsen, K. Holte, S.K. Bøhn, S. Dragland, L. Sampson, C. Willey, H. Senoo, Y. Umezono, C. Sanada, I. Barikmo, N. Berhe, W.C. Willett, K.M. Phillips, D.R. Jacobs, R. Blomhoff, The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide, *Nutr. J.* 9 (2010) 3. doi:10.1186/1475-2891-9-3.
- [10] E. Sariburun, S. Şahin, C. Demir, C. Türkben, V. Uylaşer, Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars, *J. Food Sci.* 75 (2010) 328–335. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x.
- [11] G. Pantelidis, M. Vasilakakis, G. Manganaris, G. Diamantidis, Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries, *Food Chem.* 102

- (2007) 777–783. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.021.
- [12] N.P. Seeram, Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 627–9. doi:10.1021/jf071988k.
- [13] N.P. Seeram, L.S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H.S. Scheuller, D. Heber, Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9329–39. doi:10.1021/jf061750g.
- [14] B. de Ancos, E.M. González, M.P. Cano, Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4565–4570. doi:10.1021/jf0001684.
- [15] T.A. El-Adawy, K.M. Taha, Characteristics and composition of different seed oils and flours, *Food Chem.* 74 (2001) 47–54. doi:10.1016/S0308-8146(00)00337-X.
- [16] B.S. Bushman, B. Phillips, T. Isbell, B. Ou, J.M. Crane, S.J. Knapp, Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7982–7. doi:10.1021/jf049149a.
- [17] E. Fuentes, M.E. Báez, M. Bravo, C. Cid, F. Labra, Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV–visible Spectrometry and Multivariate Calibration, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 1311–1319. doi:10.1007/s12161-012-9379-5.
- [18] R. Rafalowski, Z. Zegarska, A. Kuncewicz, Z. Borejszo, Fatty Acid Composition, Tocopherols and B-Carotene content in Polish Commercial Vegetable Oils, *Pakistan J. Nutr.* 7 (2008) 278–282. doi:10.3923/pjn.2008.278.282.
- [19] A. Siger, M. Nogala-Kalucka, E. Lampart-Szczapa, The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils, *J. Food Lipids* 15 (2008) 137–149. doi:10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x.
- [20] G.O. Burr, M.M. Burr, E.S. Miller, On the fatty acids essential in nutrition. III, *J. Biol. Chem.* 97 (1932) 1–9.
- [21] M. Haag, Essential fatty acids and the brain, *Can. J. Psychiatry* 48 (2003) 195–

203.

- [22] S.M. Innis, Essential fatty acids in growth and development, *Prog. Lipid Res.* 30 (1991) 39–103. doi:10.1016/0163-7827(91)90006-Q.
- [23] A.P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 560S–569S.
- [24] A. Adhvaryu, S.Z. Erhan, Z.S. Liu, J.M. Perez, Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Thermochim. Acta* 364 (2000) 87–97. doi:10.1016/S0040-6031(00)00626-2.
- [25] O.S. Privett, M.L. Blank, The initial stages of autoxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39 (1962) 465–469. doi:10.1007/BF02637226.
- [26] D.B. Min, J.M. Boff, Lipid Oxidation of Edible Oil, in: C.C. Akoh, D.B. Min (Eds.), *Food Lipids Chem. Nutr. Biotechnol.*, Second, Marcel Dekker, New York, 2002: pp. 353–429.
- [27] R.Y.N. Ho, J.F. Liebman, V.J. Selverstone, *Active Oxygen in Chemistry*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1995. doi:10.1007/978-94-007-0874-7.
- [28] F. Shahidi, S.A. Spurvey, Oxidative stability of fresh and heat-processed dark and light muscles of mackerel (*Scomber scombrus*), *J. Food Lipids* 3 (1996) 13–25. doi:10.1111/j.1745-4522.1996.tb00051.x.
- [29] J.R. Vercellotti, A.J.S. Angelo, A.M. Spanier, *Lipid Oxidation in Food*, American Chemical Society, Washington, DC, 1992. doi:10.1021/bk-1992-0500.
- [30] D.B. Min, J.M. Boff, Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1 (2002) 58–72. doi:10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x.
- [31] M. Rahmani, A.S. Csallany, Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 837–843. doi:10.1007/s11746-998-0234-1.
- [32] J.J.R. Pardaul, L.K.C. Souza, F.A. Molfetta, J.R. Zamian, G.N. Rocha Filho, C.E.F. Da Costa, Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 5873–5877. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.022.
- [33] E. Choe, D.B. Min, Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation, *Compr.*

- Rev. Food Sci. Food Saf. 5 (2006) 169–186.  
doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x.
- [34] A.W.D. Claxson, G.E. Hawkes, D.P. Richardson, D.P. Naughton, R.M. Haywood, C.L. Chander, M. Atherton, E.J. Lynch, M.C. Grootveld, Generation of lipid peroxidation products in culinary oils and fats during episodes of thermal stressing: A high field <sup>1</sup>H NMR study, *FEBS Lett.* 355 (1994) 81–90.  
doi:10.1016/0014-5793(94)01147-8.
- [35] S. Arain, S.T.H. Sherazi, M.I. Bhangar, F.N. Talpur, S.A. Mahesar, Oxidative stability assessment of *Bauhinia purpurea* seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods, *Thermochim. Acta* 484 (2009) 1–3. doi:10.1016/j.tca.2008.11.004.
- [36] G. Litwinienko, A. Daniluk, T. Kasprzycka-guttman, A differential scanning calorimetry study on the oxidation of C12-C18 saturated fatty acids and their esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 655–657.  
doi:10.1007/s11746-999-0156-6.
- [37] G. Litwinienko, T. Kasprzycka-Guttman, M. Studzinski, Effects of selected phenol derivatives on the autoxidation of linolenic acid investigated by DSC non-isothermal methods, *Thermochim. Acta* 307 (1997) 97–106.  
doi:10.1016/S0040-6031(97)00366-3.
- [38] C.P. Tan, Y.B. Che Man, Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetable oils, *Trends Food Sci. Technol.* 13 (2002) 312–318.
- [39] C.P. Tan, Y.B. Che Man, J. Selamat, M.S.A. Yusoff, Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods, *Food Chem.* 76 (2002) 385–389.  
doi:10.1016/S0308-8146(01)00272-2.
- [40] R. Purohit, P. Venugopalan, Polymorphism: An Overview, *Resonance* 14 (2009) 882–893. doi:10.1007/s12045-009-0084-7.
- [41] K. Sato, Crystallization behaviour of fats and lipids — a review, *Chem. Eng. Sci.* 56 (2001) 2255–2265. doi:10.1016/S0009-2509(00)00458-9.
- [42] E.S. Lutton, Review of the polymorphism of saturated even glycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 27 (1950) 276–281. doi:10.1007/BF02634906.

- [43] K. Larsson, Classification of Glyceride Crystal Forms, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2255–2260. doi:10.3891/acta.chem.scand.20-2255.
- [44] R.E. Timms, Phase behaviour of fats and their mixtures, *Prog. Lipid Res.* 23 (1984) 1–38. doi:10.1016/0163-7827(84)90004-3.
- [45] J.O. Henck, M. Kuhnert-Brandstätter, Demonstration of the terms enantiotropy and monotropy in polymorphism research exemplified by flurbiprofen., *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 103–8. doi:10.1021/js9801945.
- [46] K. Sato, S. Ueno, Polymorphism in fats and oils, *Bailey's Ind. Oil Fat Prod.* 1 (2005) 77–120.
- [47] C. Himawan, V.M. Starov, A.G.F. Stapley, Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization, *Adv. Colloid Interface Sci.* 122 (2006) 3–33. doi:10.1016/j.cis.2006.06.016.
- [48] D. Stanier, *An introduction to Differential Scanning Calorimetry*, (2013).
- [49] E. Verdonck, K. Schaap, L.C. Thomas, A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC), *Int. J. Pharm.* 192 (1999) 3–20. doi:10.1016/S0378-5173(99)00267-7.
- [50] S.R. Rabel, J.A. Jona, M.B. Maurin, Applications of modulated differential scanning calorimetry in preformulation studies., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 339–45. doi:10.1016/S0731-7085(99)00142-9.
- [51] L.C. Thomas, Technical paper TP 006: Modulated DSC® Paper #1 Why modulated DSC®, *An Overv. Summ. Advantages Disadvantages Relat. to Tradit. DSC*, TA Instruments (2005) 1–8.
- [52] P. Gill, T.T. Moghadam, B. Ranjbar, Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience, *J. Biomol. Tech.* 21 (2010) 167–193.
- [53] P. De Meuter, H. Rahier, B. Van Mele, The use of modulated temperature differential scanning calorimetry for the characterisation of food systems, *Int. J. Pharm.* 192 (1999) 77–84. doi:10.1016/S0378-5173(99)00274-4.
- [54] How the TGA Works. <https://sites.google.com/site/isumate453lab10group8/how-the-tga-works> (preuzeto 19. novembar 2015).
- [55] O. Radocaj, V. Vujasinovic, E. Dimic, Z. Basic, Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after



- longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1015–1024.  
doi:DOI 10.1002/ejlt.201400014.
- [56] A. Šučurović, N. Vukelić, L. Ignjatović, I. Brčeski, D. Jovanović, Physical-chemical characteristics and oxidative stability of oil obtained from lyophilized raspberry seed, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111 (2009) 1133–1141.  
doi:10.1002/ejlt.200900022.
- [57] V. Van Hoed, N. De Clercq, C. Echim, M. Andjelkovic, E. Leber, K. Dewettinck, R. Verhé, Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value, *J. Food Lipids* 16 (2009) 33–49.  
doi:10.1111/j.1745-4522.2009.01130.x.
- [58] Y. Xu, Y. Zhang, M. Chen, P. Tu, Fatty acids, tocopherols and proanthocyanidins in bramble seeds, *Food Chem.* 99 (2006) 586–590.  
doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.059.
- [59] V. Van Hoed, I. Barbouche, N. De Clercq, K. Dewettinck, M. Slah, E. Leber, R. Verhé, Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics, *Food Chem.* 127 (2011) 1848–1855.  
doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.134.
- [60] J.P. SanGiovanni, S. Parra-Cabrera, G.A. Colditz, C.S. Berkey, J.T. Dwyer, Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants, *Pediatrics* 105 (2000) 1292–1298.
- [61] Z. Friedman, A. Danon, M.T. Stahlman, J.A. Oates, Rapid onset of essential fatty acid deficiency in the newborn, *Pediatrics* 58 (1976) 640–9.
- [62] H. Sampath, J.M. Ntambi, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression, *Nutr. Rev.* 62 (2004) 333–339.  
doi:10.1111/j.1753-4887.2004.tb00058.x.
- [63] S.M. Grundy, M.A. Denke, Dietary influences on serum lipids and lipoproteins, *J. Lipid Res.* 31 (1990) 1149–1172.
- [64] D.M. Hegsted, R.B. McGandy, M.L. Myers, F.J. Stare, Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man, *Am. J. Clin. Nutr.* 17 (1965) 281–295.
- [65] R.P. Mensink, P.L. Zock, A.D.M. Kester, M.B. Katan, Effects of dietary fatty

- acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 1146–1155.
- [66] K.C. Hayes, Saturated fats and blood lipids: new slant on an old story, *Can. J. Cardiol. Suppl G* (1995) 39G–46G.
- [67] V. Wijendran, K.C. Hayes, Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health, *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004) 597–615.  
doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106.
- [68] G. Ertl, Eicosanoid effects on coronary blood flow and ischaemic myocardium, *Eur. Heart J.* 8 (1987) 457–461. doi:10.1093/eurheartj/8.suppl\_J.457.
- [69] W.E. Connor, Importance of n-3 fatty acids in health and disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 171S–175S.
- [70] P. Hung, J.Y. Gu, S. Kaku, S. Yunoki, K. Ohkura, I. Ikeda, H. Tachibana, M. Sugano, K. Yazawa, K. Yamada, Dietary effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid esters on lipid metabolism and immune parameters in Sprague-Dawley rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 2588–93.  
doi:10.1271/bbb.64.2588.
- [71] W.J. Aronson, J.A. Glaspy, S.T. Reddy, D. Reese, D. Heber, D. Bagga, Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer, *Urology* 58 (2001) 283–288.  
doi:10.1016/S0090-4295(01)01116-5.
- [72] H. Iso, S. Sato, U. Umemura, M. Kudo, K. Koike, A. Kitamura, H. Imano, T. Okamura, Y. Naito, T. Shimamoto, Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke, *Stroke - J. Cereb. Circ.* 33 (2002) 2086–93.
- [73] H. Tapiero, G.B. Nguyen, P. Couvreur, K.D. Tew, Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 215–222. doi:10.1016/S0753-3322(02)00193-2.
- [74] V. Maillard, P. Bougnoux, P. Ferrari, M.L. Jourdan, M. Pinault, F. Lavillonnière, G. Body, O. Le Floch, V. Chajès, N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France, *Int. J. Cancer* 98 (2002) 78–83. doi:10.1002/ijc.10130.
- [75] P.M. Bramley, I. Elmadfa, A. Kafatos, F.J. Kelly, Y. Manios, H.E. Roxborough,

- W. Schuch, P.J.A. Sheehy, K.H. Wagner, Vitamin E, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 913–938.
- [76] L.N. Wei, Retinoids and receptor interacting protein 140 (RIP140) in gene regulation, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 1527–1532.  
doi:10.2174/0929867043365017#sthash.DvA11Ake.dpuf.
- [77] S.M. O’Byrne, W.S. Blaner, Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1731–43. doi:10.1194/jlr.R037648.
- [78] J. Slavin, D. Jacobs, L. Marquart, Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms, *Nutr. Cancer* 27 (1997) 14–21.  
doi:10.1080/01635589709514495.
- [79] W.C. Willett, Diet and health: what should we eat?, *Science* 264 (1994) 532–7.
- [80] N.J. Temple, Antioxidants and disease: More questions than answers, *Nutr. Res.* 20 (2000) 449–459. doi:10.1016/S0271-5317(00)00138-X.
- [81] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152–159.  
doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2.
- [82] E.B. Dimić, V.B. Vujasinović, O.F. Radočaj, O.P. Pastor, Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils, *Acta Period. Technol.* (2012) 1–9.  
doi:10.2298/APT1243001D.
- [83] B.D. Oomah, S. Ladet, D. V. Godfrey, J. Liang, B. Girard, Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil, *Food Chem.* 69 (2000) 187–193.  
doi:10.1016/S0308-8146(99)00260-5.
- [84] S. Franke, K. Fröhlich, S. Werner, V. Böhm, F. Schöne, Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 1122–1129. doi:10.1002/ejlt.200900251.
- [85] E.C. Grilo, P.N. Costa, C.S.S. Gurgel, A.F.L. Beserra, F.N.S. Almeida, R. Dimenstein, Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils, *Food Sci. Technol.* 34 (2014) 379–385.  
doi:10.1590/S0101-20612014005000031.
- [86] H. Schwartz, V. Ollilainen, V. Piironen, A.M. Lampi, Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 152–161. doi:10.1016/j.jfca.2007.07.012.

- [87] B. Gandul-Rojas, M.I. Mínguez-Mosquera, Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils from Various Spanish Olive Varieties, *J. Sci. Food Agric.* 72 (1996) 31–39.  
doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199609)72:1<31::AID-JSFA619>3.0.CO;2-5.
- [88] N.G. Baydar, G. Özkan, E.S. Çetin, Characterization of grape seed and pomace oil extracts, *Grasas Y Aceites* 58 (2007) 29–33. doi:10.3989/gya.2007.v58.i1.5.
- [89] E.M. Daniel, A.S. Krupnick, Y.H. Heur, J.A. Blinzler, R.W. Nims, G.D. Stoner, Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts, *J. Food Compos. Anal.* 2 (1989) 338–349. doi:10.1016/0889-1575(89)90005-7.
- [90] G.D. Stoner, M.A. Morse, Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer, *Cancer Lett.* 114 (1997) 113–119.  
doi:10.1016/S0304-3835(97)04639-9.
- [91] H. Xue, R.M. Aziz, N. Sun, J.M. Cassady, L.M. Kamendulis, Y. Xu, G.D. Stoner, J.E. Klaunig, Inhibition of cellular transformation by berry extracts, *Carcinogenesis* 22 (2001) 351–356. doi:10.1093/carcin/22.2.351.
- [92] Z. Juranic, Z. Zizak, S. Tasic, S. Petrovic, S. Nidzovic, A. Lepsavic, T. Stanojkovic, Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars, *Food Chem.* 93 (2005) 39–45.  
doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.041.
- [93] D. Gođevac, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, M. Stanković, Blackberry Seed Extracts and Isolated Polyphenolic Compounds Showing Protective Effect on Human Lymphocytes DNA, *J. Food Sci.* 76 (2011) 1039–1044.  
doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02305.x.
- [94] S. Vyazovkin, Thermal analysis, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4936–4949.  
doi:10.1021/ac100859s.
- [95] A.L. Márquez, M.P. Pérez, J.R. Wagner, Solid fat content estimation by differential scanning calorimetry: prior treatment and proposed correction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90 (2012) 467–473. doi:10.1007/s11746-012-2190-z.
- [96] P. Walstra, Crystallization, in: O.R. Fennema, Y.H. Hui, M. Karel, P. Walstra, J.R. Whitaker (Eds.), *Phys. Chem. Foods*, Marcel Dekker, Inc., New York • Basel, 2003: pp. 601–667.
- [97] G. Hoffmann, *The chemistry and technology of edible oils and fats and their high*

- fat products, Elsevier, 1989. doi:10.1016/B978-0-12-352055-5.50008-5.
- [98] I. Tolstorebrov, T.M. Eikevik, M. Bantle, A DSC determination of phase transitions and liquid fraction in fish oils and mixtures of triacylglycerides, *Food Res. Int.* 58 (2014) 132–140. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.064.
- [99] C.P. Tan, Y.B. Che Man, Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation, *Food Chem.* 76 (2002) 89–102. doi:10.1016/S0308-8146(01)00241-2.
- [100] C.P. Tan, Y.B. Che Man, Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 143–155. doi:10.1007/s11746-000-0024-6.
- [101] E. Kaisersberger, DSC investigations of the thermal characterization of edible fats and oils, *Thermochim. Acta* 151 (1989) 83–90. doi:10.1016/0040-6031(89)85339-0.
- [102] I. Tolstorebrov, T.M. Eikevik, M. Bantle, A DSC study of phase transition in muscle and oil of the main commercial fish species from the North-Atlantic, *Food Res. Int.* 55 (2014) 303–310. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.026.
- [103] H. Gloria, J.M. Aguilera, Assessment of the Quality of Heated Oils by Differential Scanning Calorimetry, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1363–1368. doi:10.1021/jf9703664.
- [104] C. Tan, Y. Che Man, Differential scanning calorimetric analysis for monitoring the oxidation of heated oils, *Food Chem.* 67 (1999) 177–184. doi:10.1016/S0308-8146(99)00115-6.
- [105] C.P. Tan, Y.B. Che Man, S. Jinap, M.S.A. Yusoff, Effects of microwave heating on changes in chemical and thermal properties of vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 1227–1232. doi:10.1007/s11745-001-0418-5.
- [106] E.A. Coppin, O.A. Pike, Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 13–18. doi:10.1007/s11746-001-0212-4.
- [107] M.H. Gordon, E. Mursi, A comparison of oil stability based on the metrohm rancimat with storage at 20°C, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 649–651. doi:10.1007/BF02540595.
- [108] C.C. Akoh, Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the

- oxidative stability index method, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 211–216. doi:10.1007/BF02541558.
- [109] S.E. Hill, E.G. Perkins, Determination of oxidation stability of soybean oil with the oxidative stability instrument: Operation parameter effects, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 741–743. doi:10.1007/BF02635665.
- [110] T.A. Jebe, M.G. Matlock, R.T. Sleeter, Collaborative study of the oil stability index analysis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (1993) 1055–1061. doi:10.1007/BF02632142.
- [111] M.W. Läubli, P.A. Bruttel, Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63 (1986) 792–795. doi:10.1007/BF02541966.
- [112] B. Nelson, Oil Stability Index, *Tech. Bull.*  
[http://www.medallionlabs.com/Downloads/Oil Stability Index.pdf](http://www.medallionlabs.com/Downloads/Oil%20Stability%20Index.pdf) (preuzeto 23. oktobar 2015).
- [113] C.K. Cross, Oil stability: A DSC alternative for the active oxygen method, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47 (1970) 229–230. doi:10.1007/BF02638879.
- [114] R.L. Hassel, Thermal analysis: An alternative method of measuring oil stability, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53 (1976) 179–181. doi:10.1007/BF02633299.
- [115] V.B. Borugadda, V. V. Goud, Thermal, oxidative and low temperature properties of methyl esters prepared from oils of different fatty acids composition: A comparative study, *Thermochim. Acta* 577 (2014) 33–40. doi:10.1016/j.tca.2013.12.008.
- [116] T. Kasprzycka-Guttman, M. Jarosz-Jarszewska, G. Litwinienko, Specific heats and kinetic parameters of thermo-oxidative decomposition of peanut oil, *Thermochim. Acta* 250 (1995) 197–205. doi:10.1016/0040-6031(94)01941-9.
- [117] B. Kowalski, E. Gruczynska, K. Maciaszek, Kinetics of rapeseed oil oxidation by pressure differential scanning calorimetry measurements, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102 (2000) 337–341.
- [118] B. Kowalski, K. Ratusz, A. Miciula, K. Krygier, Monitoring of rapeseed oil autoxidation with a pressure differential scanning calorimeter, *Thermochim. Acta* 307 (1997) 117–121. doi:10.1016/S0040-6031(97)00415-2.

- [119] B. Kowalski, Evaluation of activities of antioxidants in rapeseed oil matrix by pressure differential scanning calorimetry, *Thermochim. Acta* 213 (1993) 135–146. doi:10.1016/0040-6031(93)80011-X.
- [120] G. Litwinienko, T. Kasprzycka-Guttman, A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil, *Thermochim. Acta* 319 (1998) 185–191. doi:10.1016/S0040-6031(98)00410-9.
- [121] G. Litwinienko, T. Kasprzycka-Guttman, M. Jarosz-Jarszewska, Dynamic and isothermal DSC investigation of the kinetics of thermooxidative decomposition of some edible oils, *J. Therm. Anal.* 45 (1995) 741–750. doi:10.1007/BF02548890.
- [122] S.I. Martínez-Monteagudo, M.D.A. Saldaña, J.J. Kennelly, Kinetics of non-isothermal oxidation of anhydrous milk fat rich in conjugated linoleic acid using differential scanning calorimetry, *J. Therm. Anal. Calorim.* 107 (2011) 973–981. doi:10.1007/s10973-011-1649-8.
- [123] E. Ostrowska-Ligeza, W. Bekas, D. Kowalska, M. Lobacz, M. Wroniak, B. Kowalski, Kinetics of commercial olive oil oxidation: Dynamic differential scanning calorimetry and Rancimat studies, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 268–274. doi:10.1002/ejlt.200900064.
- [124] J. Polavka, J. Paligová, J. Cvengroš, P. Simon, Oxidation stability of methyl esters studied by differential thermal analysis and rancimat, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 519–524. doi:10.1007/s11746-005-1103-4.
- [125] S.Y. Reda, Evaluation of antioxidants stability by thermal analysis and its protective effect in heated edible vegetable oil, *Ciência E Tecnol. Aliment.* 31 (2011) 475–480.
- [126] S. Republic, P. Šimon, Ľ. Kolman, I. Niklová, Š. Schmidt, Analysis of the induction period of oxidation of edible oils by differential scanning calorimetry, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 639–642. doi:10.1007/s11746-000-0103-8.
- [127] E. Rudnik, A. Szczucinska, H. Gwardiak, A. Szulc, A. Winiarska, Comparative studies of oxidative stability of linseed oil, *Thermochim. Acta* 370 (2001) 135–140. doi:10.1016/S0040-6031(00)00781-4.
- [128] J.C.O. Santos, I.M.G. Santos, M.M. Conceição, S.L. Porto, M.F.S. Trindade, A.G. Souza, S. Prasad, V.J. Fernandes, A.S. Araújo, Thermoanalytical, kinetic

- and rheological parameters of commercial edible vegetable oils, *J. Therm. Anal. Calorim.* 75 (2004) 419–428. doi:10.1023/B:JTAN.0000027128.62480.db.
- [129] C.P. Tan, Y.B.C. Man, J. Selamat, M.S.A. Yusoff, Y.B. Che Man, J. Selamat, M.S.A. Yusoff, Application of arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 1133–1138. doi:10.1007/s11746-001-0401-1.
- [130] J. Thurgood, R. Ward, S. Martini, Oxidation kinetics of soybean oil/anhydrous milk fat blends: A differential scanning calorimetry study, *Food Res. Int.* 40 (2007) 1030–1037. doi:10.1016/j.foodres.2007.05.004.
- [131] M. Ulkowski, M. Musialik, G. Litwinienko, Use of differential scanning calorimetry to study lipid oxidation. 1. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9073–9077. doi:10.1021/jf051289c.
- [132] E. Vittadini, J.H. Lee, N.G. Frega, D.B. Min, Y. Vodovotz, DSC determination of thermally oxidized olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (2003) 533–537. doi:10.1007/s11746-003-0733-x.
- [133] S. Vyazovkin, A.K. Burnham, J.M. Criado, L.A. Pérez-Maqueda, C. Popescu, N. Sbirrazzuoli, ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data, *Thermochim. Acta* 520 (2011) 1–19. doi:10.1016/j.tca.2011.03.034.
- [134] S. Vyazovkin, K. Chrissafis, M.L. Di Lorenzo, N. Koga, M. Pijolat, B. Roduit, N. Sbirrazzuoli, J.J. Suñol, ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations, *Thermochim. Acta* 590 (2014) 1–23. doi:10.1016/j.tca.2014.05.036.
- [135] B. Kowalski, Determination of oxidative stability of edible vegetable oils by pressure differential scanning calorimetry, *Thermochim. Acta* 156 (1989) 347–358. doi:10.1016/0040-6031(89)87201-6.
- [136] B. Kowalski, K. Ratusz, D. Kowalska, W. Bekas, Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat measurements, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004) 165–169. doi:10.1002/ejlt.200300915.
- [137] J. Gromadzka, W. Wardencki, R. Pawłowicz, G. Muszyński, Photoinduced and



- thermal oxidation of rapeseed and sunflower oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 1229–1235. doi:10.1002/ejlt.201000057.
- [138] A. Raemy, I. Froelicher, J. Loeliger, Oxidation of lipids studied by isothermal heat flux calorimetry, *Thermochim. Acta* 114 (1987) 159–164.  
doi:10.1016/0040-6031(87)80255-1.
- [139] G. Litwinienko, Autooxidation of unsaturated fatty acids and their esters, *J. Therm. Anal. Calorim.* 65 (2001) 639–646.
- [140] G. Litwinienko, A. Daniluk, T. Kasprzycka-Guttman, Study on Autoxidation Kinetics of Fats by Differential Scanning Calorimetry. 1. Saturated C 12 –C 18 Fatty Acids and Their Esters, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 7–12.  
doi:10.1021/ie9905512.
- [141] G. Litwinienko, T. Kasprzycka-Guttman, Study on the Autoxidation Kinetics of Fat Components by Differential Scanning Calorimetry. 2. Unsaturated Fatty Acids and Their Esters, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 13–17.  
doi:10.1021/ie990552u.
- [142] B. Kowalski, Thermal-oxidative decomposition of edible oils and fats. DSC studies, *Thermochim. Acta* 184 (1991) 49–57.  
doi:10.1016/0040-6031(91)80134-5.
- [143] A. Adhvaryu, J.M. Perez, I.D. Singh, Application of Quantitative NMR Spectroscopy to Oxidation Kinetics of Base Oils Using a Pressurized Differential Scanning Calorimetry Technique, *Energy & Fuels* 13 (1999) 493–498.  
doi:10.1021/ef980176a.
- [144] G. Kaletunc, J. Lee, H. Alpas, F. Bozoglu, Evaluation of Structural Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in *Leuconostoc mesenteroides*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 1116–1122.  
doi:10.1128/AEM.70.2.1116-1122.2004.
- [145] ISO 3657:2002 - Animal and vegetable fats and oils - Determination of saponification value, (2002).
- [146] ISO 660:2009 - Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and acidity, (2009).
- [147] ISO 3960:2001 - Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value, (2001).

- [148] J.W. McCutcheon, Wijs Iodine Method, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 12 (1940) 465–465. doi:10.1021/ac50148a012.
- [149] DSC | hydrates. <http://www.hydrateweb.org/dsc> (preuzeto 3. decembar 2015).
- [150] ASTM E2009 - 08(2014)e1 Standard Test Methods for Oxidation Onset Temperature of Hydrocarbons by Differential Scanning Calorimetry.
- [151] ASTM E1858 - 08(2015)e1 Standard Test Methods for Determining Oxidation Induction Time of Hydrocarbons by Differential Scanning Calorimetry.
- [152] M.D.A. Saldaña, S.I. Martínez-Monteagudo, Oxidative Stability of Fats and Oils Measured by Differential Scanning Calorimetry for Food and Industrial Applications, in: A.A. Elkordy (Ed.), *Appl. Calorim. a Wide Context - Differ. Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorim. Microcalorim.*, 2013: pp. 445–473. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/54486>.
- [153] H.E. Kissinger, Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis, *Anal. Chem.* 29 (1957) 1702–1706. doi:10.1021/ac60131a045.
- [154] D. Micić, S. Ostojić, L. Pezo, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours followed by MDSC, in: *Proceedings, Reg. Biophys. Conf. 2012, Kladovo, Serbia, 2012*: pp. 74–76.
- [155] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal analysis of raspberry and blackberry seed flours, in: *Proceedings, 11th Int. Conf. Fundam. Appl. Asp. Phys. Chem., Belgrade, Serbia, 2012*: pp. 751–753.
- [156] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours and oils, *Thermochim. Acta* 617 (2015) 21–27. doi:10.1016/j.tca.2015.08.017.
- [157] S.E. Chatziantoniou, D.J. Triantafillou, P.D. Karayannakidis, E. Diamantopoulos, Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by differential scanning calorimetry, *Thermochim. Acta* 576 (2014) 9–17. doi:10.1016/j.tca.2013.11.014.
- [158] C.H. Tang, S.M. Choi, C.Y. Ma, Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 96–104. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.06.013.
- [159] L. Di Gioia, B. Cuq, S. Guilbert, Thermal properties of corn gluten meal and its

- proteic components, *Int. J. Biol. Macromol.* 24 (1999) 341–350.  
doi:10.1016/S0141-8130(99)00048-3.
- [160] B. Cuq, C. Icard-Vernière, Characterisation of Glass Transition of Durum Wheat Semolina using Modulated Differential Scanning Calorimetry, *J. Cereal Sci.* 33 (2001) 213–221. doi:10.1006/jcrs.2000.0357.
- [161] A. Rouilly, O. Orliac, F. Silvestre, L. Rigal, DSC study on the thermal properties of sunflower proteins according to their water content, *Polymer (Guildf)*. 42 (2001) 10111–10117. doi:10.1016/S0032-3861(01)00555-9.
- [162] G.G. Fontanari, J.P. Batistuti, G. Bannach, I.A. Pastre, E.Y. Ionashiro, F.L. Fertoni, Thermal study and physico-chemical characterization of some functional properties of guava seeds protein isolate (psidium guajava), *J. Therm. Anal. Calorim.* 83 (2006) 709–713. doi:10.1007/s10973-005-6802-9.
- [163] G.G. Fontanari, J.M. Martins, M. Kobelnik, I.A. Pastre, J.A.G. Arêas, J.P. Batistuti, F.L. Fertoni, Thermal studies on protein isolates of white lupin seeds (*Lupinus albus*), *J. Therm. Anal. Calorim.* 108 (2011) 141–148.  
doi:10.1007/s10973-011-1898-6.
- [164] J.C.O. Santos, I.M.G. dos Santos, A.G. de Souza, S. Prasad, A.V. dos Santos, Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry, *J. Food Sci.* 67 (2002) 1393–1398.  
doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb10296.x.
- [165] M. Tomassetti, L. Campanella, T. Aureli, M.P. Sammartino, TG and NMR analysis of commercial plant oil seeds, *Thermochim. Acta* 190 (1991) 131–141.  
doi:10.1016/0040-6031(91)85239-E.
- [166] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seeds oils followed by DSC, *J. Process. Energy Agric.* 18 (2014) 204–206.
- [167] R.C. Gupta, G. Kanwar, Determination of iodine numbers of edible oils, *Biochem. Educ.* 22 (1994) 47. doi:10.1016/0307-4412(94)90174-0.
- [168] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, G. Krstić, L. Pezo, B. Simonović, Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC, *Thermochim. Acta* 601 (2015) 39–44. doi:10.1016/j.tca.2014.12.018.
- [169] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Fatty acid composition and

- oxidation kinetic of raspberry and blackberry seed oils, in: Proceedings, Phys. Chem. 2014, Satel. Event, 4th Work. Specif. Methods Food Saf. Qual., Belgrade, Serbia, 2014: pp. 21–23.
- [170] T.D. Parker, D.A. Adams, K. Zhou, M. Harris, L. Yu, Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils, *J. Food Sci.* 68 (2003) 1240–1243. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09632.x.
- [171] B. Villa, Omega-3 fatty acid ethyl esters increase heart rate variability in patients with coronary disease, *Pharmacol. Res.* 45 (2002) 475–478. doi:10.1006/phrs.2002.0989.
- [172] S. Sathivel, W. Prinyawiwatkul, I.I. Negulescu, J.M. King, Determination of Melting Points, Specific Heat Capacity and Enthalpy of Catfish Visceral Oil During the Purification Process, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85 (2008) 291–296. doi:10.1007/s11746-007-1191-9.
- [173] M. Suzuki, T. Ogaki, K. Sato, Crystallization and transformation mechanisms of  $\alpha$ ,  $\beta$ - and  $\gamma$ -polymorphs of ultra-pure oleic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62 (1985) 1600–1604. doi:10.1007/BF02541697.
- [174] N. Hiramatsu, T. Sato, T. Inoue, M. Suzuki, K. Sato, Pressure effect on transformation of cis-unsaturated fatty acid polymorphs 2. Palmitoleic acid (cis-9-hexadecenoic acid), *Chem. Phys. Lipids* 56 (1990) 59–63. doi:10.1016/0009-3084(90)90088-9.
- [175] M. Suzuki, K. Sato, N. Yoshimoto, S. Tanaka, M. Kobayashi, Polymorphic behavior of erucic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65 (1988) 1942–1947. doi:10.1007/BF02546013.
- [176] M. Kobayashi, F. Kaneko, K. Sato, M. Suzuki, Vibrational spectroscopic study on polymorphism and order-disorder phase transition in oleic acid, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 6371–6378. doi:10.1021/j100281a062.
- [177] L. Shen, K.S. Alexander, A thermal analysis study of long chain fatty acids, *Thermochim. Acta* 340-341 (1999) 271–278. doi:10.1016/S0040-6031(99)00272-5.
- [178] C.P. Tan, Y.B. Che Man, Quantitative differential scanning calorimetric analysis for determining total polar compounds in heated oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 1047–1057. doi:10.1007/s11746-999-0203-3.

- [179] S. Sathivel, W. Prinyawiwatukul, I.I. Negulescu, J.M. King, Determination of melting points, specific heat capacity and enthalpy of catfish visceral oil during the purification process, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85 (2008) 291–296. doi:10.1007/s11746-007-1191-9.
- [180] X. Zhang, L. Li, H. Xie, Z. Liang, J. Su, G. Liu, B. Li, Comparative analysis of thermal behavior, isothermal crystallization kinetics and polymorphism of palm oil fractions, *Molecules* 18 (2013) 1036–1052. doi:10.3390/molecules18011036.
- [181] R. Campos, S.S. Narine, A.G. Marangoni, Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard, *Food Res. Int.* 35 (2002) 971–981. doi:10.1016/S0963-9969(02)00159-X.
- [182] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B.R. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberryseed oils by DSC, in: *Proceedings, 4th Int. Conf. Sustain. Postharvest Food Technol. - INOPTeP, Divčibare, Serbia, 2015*: pp. 144–148.
- [183] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Thermal characteristics and oxidative stability of raspberry and blackberry seed oils followed by DSC, in: *Proceedings, 12th Int. Conf. Fundam. Appl. Asp. Phys. Chem., Belgrade, Serbia, 2014*: pp. 973–976.
- [184] D. Micić, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B.R. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberry seed oils by DSC, *J. Process. Energy Agric.* 19 (2015) 202–205.
- [185] S.H. Fatemi, E.G. Hammond, Analysis of oleate, linoleate and linolenate hydroperoxides in oxidized ester mixtures, *Lipids* 15 (1980) 379–385. doi:10.1007/BF02533555.
- [186] T. Ozawa, Estimation of activation energy by isoconversion methods, *Thermochim. Acta* 203 (1992) 159–165. doi:10.1016/0040-6031(92)85192-X.
- [187] J.H. Flynn, L.A. Wall, General treatment of the thermogravimetry of polymers, *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* 70A (1966) 487.
- [188] N. Sbirrazzuoli, L. Vincent, A. Mija, N. Guigo, Integral, differential and advanced isoconversional methods. Complex mechanisms and isothermal predicted conversion-time curves, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2009) 219–226. doi:10.1016/j.chemolab.2009.02.002.

## Prilog A

### Metode za izračunavanje kinetičkih parametara iz podataka termalne analize

Termalna analiza se odnosi na termalno stimulisane procese, odnosno na procese koji se dešavaju pri kontrolisanoj promeni temperature. Brzina ovih procesa zavisi od tri promenljive: temperature ( $T$ ), stepena konverzije ( $\alpha$ ) i pritiska ( $P$ ), pa jednačina za njihovu brzinu uopšteno može da se napiše kao [133]:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha)h(P) \quad (\text{P1})$$

Zavisnost od pritiska,  $h(P)$ , se zanemaruje u najvećem broju metoda za kinetička izračunavanja, koje koriste podatke termalne analize, jer se pritisak održava konstantnim ( $h(P) = \text{const}$ ) u toku eksperimenta. Kad je ovaj uslov zadovoljen jednačina (P1) može da se napiše u sledećem obliku:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (\text{P2})$$

U ovom slučaju se dobija da brzina procesa zavisi od dve promenljive: temperature - preko konstante brzine,  $k(T)$  i od stepena konverzije - preko reakcionog modela,  $f(\alpha)$ . Jednačina (P2) opisuje brzinu procesa koji se odvija u jednom stupnju (*single-step process*). Stepen konverzije,  $\alpha$ , određuje se eksperimentalno kao udeo od ukupne promene fizičkog svojstva koje se menja tokom ispitivanog procesa. Ako je, recimo, to gubitak mase, onda je stepen konverzije udeo od ukupnog gubitka mase, a ako se tokom procesa oslobađa/apsorbuje toplota, onda je stepen konverzije udeo od ukupno oslobođene/apsorbovane toplote [134]. Vrednosti stepena konverzije kreću se od 0 do 1, pri čemu 0 označava da proces nije počeo, dok 1 da se proces završio. Treba imati na umu da fizičke osobine, koje se mere metodama termalne analize, ne mogu da se direktno pripišu određenoj specifičnoj reakciji molekula, tako da vrednosti  $\alpha$  zapravo oslikavaju napredovanje ukupnih promena koje se dešavaju tokom ispitivanog procesa. Ako se utvrdi da se proces pokorava jednačini (P2), to ne mora da znači da mehanizam kojim se proces odvija uključuje samo jedan stupanj. Više je verovatno da mehanizam procesa uključuje više stupnjeva, ali samo jedan od njih određuje ukupnu kinetiku

procesa [94] (na primer, u slučaju mehanizma koji uključuje dve uzastopne reakcije, od kojih je prva reakcija značajno sporija, pa ona određuje ukupnu kinetiku procesa).

Temperaturska zavisnost,  $k(T)$ , brzine procesa se uobičajeno opisuje pomoću Arenijusove jednačine:

$$k(T) = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \quad (\text{P3})$$

gde su  $E$  i  $A$  kinetički parametri, energija aktivacije i predeksponencijalni faktor, redom, a  $R$  je univerzalna gasna konstanta. Pogodno je da se eksperimentalno određeni kinetički parametri nazivaju "efektivnim", "ukupnim" ili "empirijskim" da bi se naglasilo da njihove vrednosti mogu da se razlikuju od pravih (*intrinsic*) parametara pojedinačnih stupnjeva procesa [152]. Uopšteno, efektivni kinetički parametri su funkcija pravih kinetičkih parametara pojedinačnih stupnjeva. Kombinovanjem jednačine (P2) i (P3) dobija se:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) f(\alpha) \quad (\text{P4})$$

Jednačina (P4) predstavlja osnovu za diferencijalne metode za izračunavanje kinetičkih parametara. U ovom obliku jednačina je primenljiva za bilo koji temperaturski program. U metodama termalne analize temperatura se kontroliše u skladu s programom koji postavlja operator. Temperaturski program može da bude izotermni, pri čemu je  $T = \text{const}$  ili neizotermni pri čemu je  $T = T(t)$ . Najčešće korišćeni temperaturski program je onaj pri kojem se temperatura menja linearno s vremenom:

$$\beta = \frac{dT}{dt} = \text{const} \quad (\text{P5})$$

gde je  $\beta$  brzina grejanja. Kombinovanjem jednačine (P4) i (P5) dobija se:

$$\beta \frac{d\alpha}{dT} = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) f(\alpha) \quad (\text{P6})$$

Integracijom jednačine (P6) dobija se:

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = A \int_0^t \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) dt \quad (\text{P7})$$

gde je  $g(\alpha)$  integralni oblik reakcionog modela. Jednačina (P7) predstavlja osnovu za razvoj velikog broja integralnih metoda za izračunavanje kinetičkih parametara [133]. U ovom obliku ona je primenljiva za bilo koji temperaturski program uvođenjem zavisnosti  $T(t)$  umesto  $T$ . U uslovima konstantne brzine grejanja jednačina (P7) dobija oblik:

$$g(\alpha) = \frac{A}{\beta} \int_0^T \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) dT \quad (\text{P8})$$

Pošto integral u jednačini (P8) nema analitičko rešenje, u literaturi je ponuđen veći broj približnih rešenja, iz kojih je proizašao veliki broj približnih integralnih metoda za izračunavanje kinetičkih parametara [133].

Sve izokonverzione metode vode poreklo od izokonverzionog principa kojim se tvrdi da brzina reakcije pri stalnom stepenu konverzije zavisi samo od temperature [133]. Ovo može lako da se pokaže diferenciranjem logaritamskog oblika jednačine (P2) po  $T^{-1}$ , pri stalnom stepenu konverzije ( $\alpha = const$ )

$$\left[ \frac{\partial \ln(d\alpha / dt)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} = \left[ \frac{\partial \ln k(T)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} + \left[ \frac{\partial \ln f(\alpha)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} \quad (\text{P9})$$

$\alpha$  u supskriptu se odnosi na određenu (stalnu) vrednost stepena konverzije. Pošto je  $\alpha = const$  i  $f(\alpha)$  je, takođe, konstanta, pa jednačina (P9) postaje:

$$\left[ \frac{\partial \ln(d\alpha / dt)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} = -\frac{E_{\alpha}}{R} \quad (\text{P10})$$

Iz jednačine (P10) proizilazi da temperaturska zavisnost brzine procesa u određenom stepenu konverzije može da se koristi za određivanje vrednosti energije aktivacije za dati stepen konverzije bez prethodne pretpostavke ili određivanja bilo kojeg oblika reakcionog modela za ispitivani proces. Upravo zbog ovoga izokonverzione metode se često nazivaju i "model-free" metode. Da bi se dobila temperaturska zavisnost brzine procesa za dati stepen konverzije potrebno je da se izvrši serija snimanja s različitim temperaturskim programima. To je obično serija sa nekoliko različitih brzina grejanja (neizotermiski uslovi) ili na nekoliko različitih stalnih temperatura (izotermiski uslovi).



Integralne izokonverzione metode se zaniavaju na primeni jednačine (P7) [133]. Integral u jednačini nema analitičko rešenje za proizvoljan temperaturski program, ali pri izotermnim uslovima ( $T = const$ ) njegovo rešenje je:

$$g(\alpha) = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right)t \quad (P11)$$

Jednostavnim preuređivanjem jednačine (P11) dobija se:

$$\ln t_{\alpha,i} = \ln \left[ \frac{g(\alpha)}{A_\alpha} \right] + \frac{E_\alpha}{RT_i} \quad (P12)$$

gde je  $t_{\alpha,i}$  vreme potrebno da se postigne određeni stepen konverzije na različitim temperaturama,  $T_i$ . Jednačina (P12) predstavlja *integralnu izokonverzionu metodu za izotemske uslove* [129]. Vrednosti energija aktivacije za dati stepen konverzije  $E_\alpha$  izračunavaju se iz nagiba prave dobijene linearnom regresijom  $\ln t_{\alpha,i}$  u funkciji  $1/T_i$ .

Pri neizotermnim uslovima kad se koristi konstantna brzina grejanja ( $\beta = const$ ) jednačina (P7) prelazi u (P8), za koju ne postoji analitičko rešenje. Iz tog razloga razvijene su različite integralne izokonverzione metode (za neizotemske uslove), koje se međusobno razlikuju po aproksimacijama koje su korišćene za rešavanje integrala u jednačini (P8). Najveći broj tih aproksimacija daje linearnu jednačinu opšteg oblika [133]:

$$\ln \left( \frac{\beta_i}{T_{\alpha,i}^B} \right) = \ln \left( \frac{A_\alpha R}{g(\alpha) E_\alpha} \right) - C \left( \frac{E_\alpha}{RT_{\alpha,i}} \right) \quad (P13)$$

gde su  $B$  i  $C$  parametri koji zavise od tipa aproksimacije koja je korišćena pri računanju temperaturskog integrala. Na primer, veoma gruba aproksimacija po *Doyle-u* daje vrednosti  $B = 0$  i  $C = 1,052$ , tako da jednačina (P13) dobija oblik poznat pod nazivom *Ozawa-Flynn-Wall (OFW)* [186,187] jednačina:

$$\ln(\beta_i) = \ln \left( \frac{A_\alpha R}{g(\alpha) E_\alpha} \right) - 1,052 \cdot \left( \frac{E_\alpha}{RT_{\alpha,i}} \right) \quad (P14)$$

Gruba aproksimacija pri rešavanju temperaturskog integrala daje manje tačne vrednosti  $E_\alpha$ . Tačnija aproksimacija *Murray-a* i *White-a* daje vrednosti  $B = 2$  i  $C = 1$ , što daje

jednačinu koja ja poznata pod nazivom *Kissinger-Akahira-Sunose* (*KAS*) [188] jednačina:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{\alpha,i}^2}\right) = \ln\left(\frac{A_\alpha R}{g(\alpha)E_\alpha}\right) - \left(\frac{E_\alpha}{RT_{\alpha,i}}\right) \quad (\text{P15})$$

*KAS* metoda u poređenju sa *OFW* metodom nudi značajno povećanje tačnosti izračunatih vrednosti  $E_\alpha$ . Uporedno korišćenje ove dve jednačine nema nikakvog smisla, jer se ne dobijaju nikakvi kinetički podaci iz toga. Razlike u izračunatim vrednostima  $E_\alpha$  pomoću ove dve metode posledica su različite tačnosti metoda. Zbog veće tačnosti *KAS* metode preporučljivo je da se ona koristiti za određivanje kinetičkih parametara nekog procesa.

U uslovima maksimalne brzine procesa (maksimum pika na *DSC* ili *TG* krivoj) iz jednačine (P4) izvodi se *Kissinger*-ova metoda [153], koja je jedna od najčešće korišćenih metoda za izračunavanje kinetičkih parametara na osnovu temperatura maksimuma pika. U tački maksimuma pika zadovoljen je sledeći uslov [153]:

$$\frac{d^2\alpha}{dt^2} = \left[ \frac{E_p\beta}{RT_p^2} + A_p f'(\alpha_p) \exp\left(\frac{-E_p}{RT_p}\right) \right] \left( \frac{d\alpha}{dt} \right)_p = 0 \quad (\text{P16})$$

gde je  $f'(\alpha) = df(\alpha)/d\alpha$ , a supskript  $p$  označava vrednosti temperatura u maksimumu pika. Iz jednačine (P16) sledi [153]:

$$\frac{E_p\beta}{RT_p^2} = -A_p f'(\alpha_p) \exp\left(\frac{-E_p}{RT_p}\right) \quad (\text{P17})$$

Preuređivanjem jednačine (P17) dobija se:

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_{p,i}^2}\right) = \ln\left(-\frac{A_p R}{E_p} f'(\alpha_p)\right) - \frac{E_p}{RT_{p,i}} \quad (\text{P18})$$

Linearnom regresijom leve strane jednačine u funkciji od  $1/T_m$  dobija se prava iz čijeg nagiba se izračunava energija aktivacije. Primena *Kissinger*-ove metode ima jedno ograničenje koje se ogleda u tome što je za tačno određivanje energije aktivacije neophodno da  $f'(\alpha)$  bude nezavisno od brzine grejanja. Striktne nezavisnosti  $f'(\alpha)$  javlja

se kod reakcija prvog reda jer je u tom slučaju  $f'(\alpha) = -1$  i jednačina (P18) dobija oblik [133]:

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_{p,i}^2}\right) = \ln\left(-\frac{A_p R}{E_p}\right) - \frac{E_p}{RT_{p,i}} \quad (\text{P19})$$

## Prilog B

### Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina i kiselinskog broja [146]

#### *Princip*

U rastvoru masti slobodne masne kiseline se određuju titracijom rastvorom NaOH.

#### *Postupak*

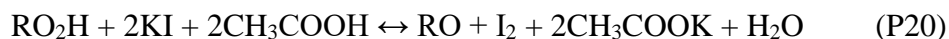
U erlenmajeru se izmeri 5 g uzorka (čvrste masti se prethodno otope zagrevanjem u vodenom kupatilu). Zatim se doda 25 ml smeše etanola i etra (1:1 vol), koja je prethodno neutralisana 0,1 M rastvorom NaOH uz fenolftalein (smeša etanol-etar mora se prethodno neutralisati, jer etar može da reaguje kiselo, pa bi se jedan deo baze utrošio na neutralizaciju kiselina iz etra). Sadržaj se mućka do potpunog rastvaranja masti. Zatim se doda 5 kapi fenolftaleina i vrši titracija 0,1 M rastvorom NaOH do pojave ružičaste boje.

Sadržaj slobodnih masnih kiselina se izražava kao kiselinski broj. Kiselinski broj (mg KOH/g) predstavlja broj mg KOH koji je potreban za neutralizaciju masnih kiselina u 1 g masti ili ulja.

### Određivanje peroksidnog broja [147]

#### *Princip*

Peroksidi, koji nastaju u procesu oksidacije masti i ulja, u kiseljoj sredini oksidišu jodid u jod koji se zatim titruje rastvorom natrijum-tiosulfata uz skrob kao indikator:



#### *Postupak*

Oko 1 g masti ili ulja odmeri se u erlenmajer od 100 ml. Doda se 10 ml smeše sirćetne kiseline i hloroforma (3:2), promeša, a zatim se doda i 0,2 ml zasićenog rastvora

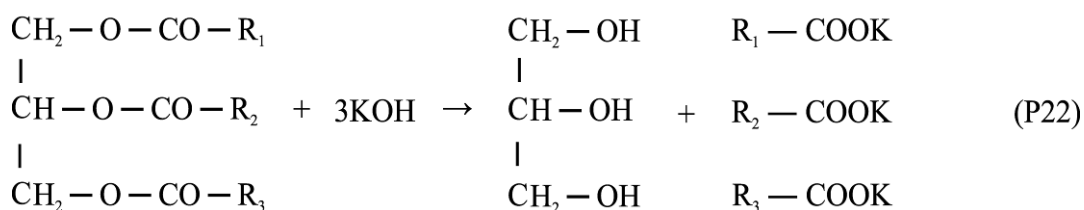
kalijum-jodida i mućka tačno 1 minut. Zatim se razblaži sa 20 ml vode, doda rastvor skroba i vrši titracija sa 0,01 M rastvorom Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Peroksidni broj (meqO<sub>2</sub>/kg) je broj mmol natrijum-tiosulfata, koji se utroši na jod oslobođen iz kalijum-jodida dejstvom peroksida iz 1 kg masti.

### Određivanje saponifikacionog broja [145]

#### *Princip*

Saponifikacija masti i ulja se vrši pomoću alkoholnog rastvora kalijum-hidroksida, a višak neutrošenih alkalija se titruje rastvorom hlorovodonične kiseline.



#### *Postupak*

Izmeri se oko 2 g masti ili ulja u erlenmajer od 300 ml. Zatim se pipetom doda 25 ml etanolnog rastvora KOH. Erlenmajer se spoji sa vazdušnim kondenzatorom, stavi na peščano kupatilo i kuva najmanje 1 h uz povremeno mućkanje, dok saponifikacija ne bude završena. Istovremeno se uradi i slepa proba pod istim uslovima i na isti način, samo bez ulja i masti. Posle završene saponifikacije, bistrom vrućem rastvoru doda se 0,5 ml indikatora i vrši se titracija 0,5 M rastvorom HCl do promene boje.

Saponifikacioni broj (mg KOH/g) predstavlja broj mg KOH koji je potreban za potpunu saponifikaciju (slobodnih i estarski vezanih) masnih kiselina u 1 g masti ili ulja.

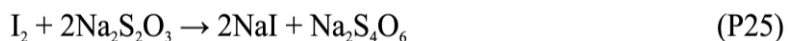
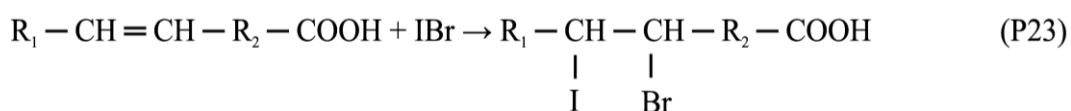
### Određivanje jodnog broja [148]

Nezasićene masne kiseline imaju osobinu da adiraju na svaku dvogubu vezu po jedan molekul halogena. Prema tome, vrednost jodnog broja zavisi od sadržaja nezasićenih masnih kiselina i broja dvogubih veza u njima. Jodni broj je karakterističan za masti i

ulja i predstavlja jedan od analitičkih parametara za određivanje identiteta i čistoće masti i ulja.

### *Princip*

Određena količina ispitivane masti ili ulja tretira se rastvorom jod-monobromida koji se adira na dvogube veze masnih kiselina. Dodatkom kalijum-jodida iz neutrošene količine jod-monobromida oslobađa se odgovarajuća količina joda. Oslobođeni jod se titruje rastvorom natrijum-tiosulfata:



### *Postupak*

U erlenmajer od 300 ml odmeri se oko 0,2 g masti ili ulja. Uzorak se rastvori sa 10-15 ml hloroforma i doda se 25 ml jod-monobromida. Dobro se promućka i ostavi u erlenmajeru sa šlifovanim zatvaračem da stoji na tamnom mestu 30 minuta. Nakon stajanja doda se 15 ml 10 % rastvora kalijum-jodida i oko 150 ml destilovane vode i vrši se titracija 0,1 M rastvorom natrijum-tiosulfata do svetlo žute boje. Zatim se doda 1-2 ml rastvora skroba i produži titracija do nestanka plave boje. Uporedo se radi slepa proba na isti način, samo bez masti ili ulja.

Jodni broj (mg I<sub>2</sub>/g) označava broj mg I<sub>2</sub> koji se adira na nezasićene masne kiseline u 1 g masti ili ulja.

## Prilog C

### Bibliografija Darka Micića

#### Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. A.R. Nesić, A. Onjia, S.B. Ostojić, **D. Micić**, S.J. Velicković, D.G. Antonović, Novel biosensor films based on chitosan, *Materials Letters*, 167 47-49 (2016). **IF: 2.489** [doi:10.1016/j.matlet.2015.12.124](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.12.124)
2. I.S. Stefanović, B.M. Ekmešić, D.D. Maksin, A.B. Nastasović, Z.P. Miladinović, Z.M. Vuković, **D. Micić**, M.V. Pergal, Structure, thermal, and morphological properties of novel macroporous amino-functionalized glycidyl methacrylate based copolymers, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54 (27) 6902-6911 (2015). **IF: 2.740** [doi:10.1021/acs.iecr.5b01285](https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01285)
3. **D. Micić**, B. Sljukić, Z. Zujovic, J. Travas-Sejdic, G. Cirić-Marjanović, Electrocatalytic activity of carbonized nanostructured polyanilines for oxidation reactions: sensing of nitrite ions and ascorbic acid, *Electrochimica Acta*, 120 147–158 (2014). **IF: 4.578** [doi:10.1016/j.electacta.2013.12.069](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.069)
4. A.R. Nešić, M.J. Kokunesoski, S.M. Ilić, M.V. Gordić, S.B. Ostojić, **D. Micić**, S.J. Veličković, Biocomposite membranes of highly methylated pectin and mesoporous silica SBA-15, *Composites Part B: Engineering*, 64 162–167 (2014). **IF: 3.242** [doi:10.1016/j.compositesb.2014.04.019](https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2014.04.019)
5. M.V. Pergal, J.V. Džunuzović, R. Poreba, **D. Micić**, P. Stefanov, L. Pezo, M. Špírková, Surface and thermomechanical characterization of polyurethane networks based on poly(dimethylsiloxane) and hyperbranched polyester, *eXPRESS Polymer Letters*, 7 (10) 806–820 (2013). **IF: 2.807** [doi:10.3144/expresspolymlett.2013.78](https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2013.78)

### **Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):**

1. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, G. Krstić, L. Pezo, B.R. Simonović, Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC, *Thermochimica Acta*, 601 39-44 (2015). **IF:2.392** [doi:10.1016/j.tca.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.12.018)
2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours and oils, *Thermochimica Acta*, 617 21-27 (2015). **IF:2.392** [doi:10.1016/j.tca.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.08.017)
3. N. Begović, V.A. Blagojević, S. Ostojić, **D. Micić**, N. Filipović, K. Andjelković, D.M. Minić, Thermally induced structural transformations of a series of palladium(II) complexes with N-heteroaromatic bidentate hydrazone ligands, *Thermochimica Acta*, 592 23–30 (2014). **IF:2.392** [doi:10.1016/j.tca.2014.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.08.005)

### **Rad u međunarodnom časopisu (M23):**

1. B. Šljukić, **D. Micić**, N. Cvjetičanin, G. Ćirić-Marjanović, Nanostructured materials for sensing Pb(II) and Cd(II) ions: manganese oxyhydroxide *versus* carbonized polyanilines, *J. Serb. Chem. Soc.* 78 (11) 1717–1727 (2013). **IF: 0.884** [doi:10.2298/JSC130731101S](https://doi.org/10.2298/JSC130731101S)

### **Saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u celini (M33):**

1. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberryseed oils by DSC, 4th International conference - Sustainable postharvest and food technologies - INOPTEP 2015 and 27th National conference - Processing and energy in agriculture - PTEP 2015, Divčibare, Serbia, April 19–24, 2015, Proceedings, pp: 144-148. ISBN: 978-86-7520-333-9
2. S. Ostojić, **D. Micić**, S. Zlatanović, O. Kovačević, L. Pezo, B.R. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of osmotically dehydrated fish meat, 4th International conference - Sustainable postharvest and food technologies - INOPTEP 2015 and 27th National conference - Processing and energy in agriculture - PTEP



- 2015, Divčibare, Serbia, April 19–24, 2015, Proceedings, pp: 175-178. ISBN: 978-86-7520-333-9
3. S. Ostojić, **D. Micić**, L. Pezo, B.R. Simonović<sup>1</sup> and Lj. Lević, Osmotically dehydrated pork meat - the glass transition, 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2014, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014, Proceedings, pp: 977-980. ISBN 978-86-82475-30-9
  4. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović and B. R. Simonović, Thermal characteristics and oxidative stability of raspberry and blackberry seed oils followed by DSC, 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2014, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014, Proceedings, pp: 973-976. ISBN 978-86-82475-30-9
  5. S. Ostojić, **D. Micić**, S. Zlatanović, L. Pezo, D. Šuput, B.R. Simonović, Lj. Lević, Rehydration of osmotically dehydrated pork meat followed by thermal analysis, 4<sup>th</sup> Workshop of specific methods for food safety and quality - Physical chemistry 2014 Satellite Event, Belgrade, Serbia, September 23, 2014, Proceedings, pp: 24-27. ISBN 978-86-7306-124-5
  6. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Fatty acid composition and oxidation kinetic of raspberry and blackberry seed oils, 4<sup>th</sup> Workshop of specific methods for food safety and quality - Physical chemistry 2014 Satellite Event, Belgrade, Serbia, September 23, 2014, Proceedings, pp: 21-23. ISBN 978-86-7306-124-5
  7. I. Stefanovic, M. Špírková, R. Poreba, M. Steinhart, **D. Micić**, V. Tešević, M. Pergal, Novel siloxane based polyurethane nanocomposites, 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2014, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014, Proceedings, pp: 807-810. ISBN 978-86-82475-30-9
  8. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flour followed by MDSC, Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo-Beograd,

- Serbia, September 03-07, 2012, Proceedings, pp: 74-76. ISBN 978-86-904161-1-0
9. S. Ostojić, S. Zlatanović, L. Pezo, **D. Micić**, D.A. Šuput, B.R. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of fresh and osmotically dehydrated pork muscle proteins, Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo-Belgrade, Serbia, September 03-07, 2012, Proceedings, pp: 80-82. ISBN 978-86-904161-1-0
  10. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal analysis of raspberry and blackberry seed flour, 11<sup>th</sup> International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2012, Belgrade, Serbia, September 24-28, 2012, Proceedings, Volume 2, pp: 751-753. ISBN 978-86-82475-28-6, 2012
  11. S. Ostojić, S. Zlatanović, **D. Micić**, D.A. Šuput, B.R. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of osmotically dehydrated meat, 11<sup>th</sup> International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2012, Belgrade, Serbia, September 24-28, 2012, Proceedings, Volume 2, pp: 751-753. ISBN 978-86-82475-28-6, 2012
  12. S. Ostojić, A. Radulović, **D. Micić**, J. Laličić-Petronijević, S. Zlatanović, L. Pezo, B.R. Simonović, Chocolate with probiotics crystal forms followed by DSC and XRPD, 3rd Workshop Of Specific Methods For Food Safety And Quality - Physical chemistry 2012 Satellite Event, Belgrade, Serbia, September 27, 2012, Proceedings, pp: 11-14. ISBN 978-86-7306-118-4
  13. S. Ostojić, **D. Micić**, J. Laličić-Petronijević, S. Zlatanović, O. Kovačević, L. Pezo, B.R. Simonović, Oxidative stability of chocolate fat, 3rd Workshop Of Specific Methods For Food Safety And Quality - Physical chemistry 2012 Satellite Event, Belgrade, Serbia, September 27, 2012, Proceedings, pp: 15-18. ISBN 978-86-7306-118-4

**Saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u izvodu (M34):**

1. S. Ostojić, L. Pezo, **D. Micić**, D. Šuput, B.R. Simonović, Lj. Lević, Kinetic parameters of meat protein denaturation, III International congress "Food

- technology, quality and safety”, Novi Sad, Serbia, 2014, Book of abstract, pp: 28. ISBN 978-86-7994-041-4
2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Oxidation kinetic of raspberry and blackberry seeds oils followed by DSC, 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, ICOSECS 8, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013, Book of abstracts, pp: 248. ISBN 978-86-7132-053-5
  3. S. Ostojić, **D. Micić**, S. Zlatanović, O. Kovačević, B.R. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of the molasses used for meat osmotic dehydration, 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, ICOSECS 8, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013, Book of abstracts, pp: 268, ISBN 978-86-7132-053-5
  4. M.V. Pergal, I.S. Stefanović, B.M. Ekmešćić, D.D. Maksin, **D. Micić**, Z. Miladinović, A.B. Nastasović, Study on preparation and properties of novel functionalized polyester copolymers based on siloxanes, 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, ICOSECS 8, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013, Book of abstracts, pp: 145, ISBN 978-86-7132-053-5
  5. S. Ostojić, **D. Micić**, S. Zlatanović, L. Pezo, D.A. Šuput, B.R. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of rehydrated pork meat, 15<sup>th</sup> International feed technology symposium, COST – “Feed for health” joint Workshop, Novi Sad, Serbia, October 03-05, 2012, Proceedings, pp: 10. ISBN 978-86-7994-032-2
  6. B. Šljukić, **D. Micić**, A. Janošević, G. Ćirić-Marjanović, Carbonized nanostructured polyanilines: application for lead and cadmium ions sensing, 16<sup>th</sup> European conference on analytical Chemistry EUROanalysis 2011, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, EC17, ISBN 978-86-7132-047-4

#### **Radovi u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51)**

1. S. Ostojić, **D. Micić**, S. Zlatanović, O. Kovačević, L. Pezo, B. Simonović, Lj. Lević, Thermal analysis of osmotically dehydrated fish meat, *Journal on processing and energy in agriculture*, 19 (3) 162-165 (2015). ISSN 1821-4487

2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberry seed oils by DSC, *Journal on processing and energy in agriculture*, 19 (4) 202-205 (2015). ISSN 1821-4487
3. S. Ostojić, **D. Micić**, M. Pavlović, S. Zlatanović, O. Kovačević, B. Simonović, Lj. Lević, The glass transition of osmotically dehydrated pork meat, *Journal on processing and energy in agriculture*, 18 (3) 100-102 (2014). ISSN 1821-4487
4. M. Pavlović, S. Ostojić, S. Zlatanović, O. Kovacević, **D. Micić**, Physicochemical characteristics of sugar beet molasses as the medium for osmotic dehydration of pork meat, *Journal on processing and energy in agriculture*, 18 (3) 115-118 (2014). ISSN 1821-4487
5. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed oils followed by DSC, *Journal on processing and energy in agriculture*, 18 (5) 204-206 (2014). ISSN 1821-4487

***Radovi i saopštenja proistekli iz teze***

**Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):**

1. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, G. Krstić, L. Pezo, B.R. Simonović, Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC, *Thermochimica Acta*, 601 39-44 (2015). **IF:2.392** [doi:10.1016/j.tca.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.12.018)
2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours and oils, *Thermochimica Acta*, 617 21-27 (2015). **IF:2.392** [doi:10.1016/j.tca.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.08.017)

**Radovi u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51)**

1. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberry seed oils by DSC, *Journal on processing and energy in agriculture*, 19 (4) 202-205 (2015). ISSN 1821-4487

2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed oils followed by DSC, *Journal on processing and energy in agriculture*, 18 (5) 204-206 (2014). ISSN 1821-4487

**Saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u celini (M33):**

1. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, B. Simonović, Kinetics of non-isothermal oxidation of raspberry and blackberryseed oils by DSC, 4th International conference - Sustainable postharvest and food technologies - INOPTEP 2015 and 27th National conference - Processing and energy in agriculture - PTEP 2015, Divčibare, Serbia, April 19–24, 2015, Proceedings, pp: 144-148. ISBN: 978-86-7520-333-9
2. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B.R. Simonović, Thermal characteristics and oxidative stability of raspberry and blackberry seed oils followed by DSC, 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2014, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014, Proceednigs, pp: 973-976. ISBN 978-86-82475-30-9
3. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, B. Simonović, Fatty acid composition and oxidation kinetic of raspberry and blackberry seed oils, 4<sup>th</sup> Workshop of specific methods for food safety and quality - Physical chemistry 2014 Satelite Event, Belgrade, Serbia, September 23, 2014, Proceednigs, pp: 21-23. ISBN 978-86-7306-124-5
4. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, L. Pezo, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flour followed by MDSC, Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo-Beograd, Serbia, September 03-07, 2012, Proceedings, pp: 74-76. ISBN 978-86-904161-1-0
5. **D. Micić**, S. Ostojić, M. Simonović, M. Dojčinović, S. Hranisavljević, B.R. Simonović, Thermal analysis of raspberry and blackberry seed flour, 11<sup>th</sup> International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical chemistry 2012, Belgrade, Serbia, September 24-28, 2012, Proceedings, Volume 2, pp: 751-753. ISBN 978-86-82475-28-6

## **Biografija**

Darko Micić je rođen 01.04.1983. godine u Vranju, gde je završio osnovnu i srednju medicinsku školu. 2006. godine upisao je Fakultet za fizičku hemiju u Beogradu, koji je završio 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,60. Školske 2010/2011 upisao je i završio master studije na istom fakultetu. U novembru 2011. godine upisao je doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju u Beogradu. Takođe, od novembra 2011. radi na Institutu za opštu i fizičku hemiju, laboratorija za termalnu analizu, na projektu: „Uticaj sorte i uslova gajenja na sadržaj bioaktivnih komponenti jagodastog i koštičavog voća i dobijanje biološki vrednih proizvoda poboljšanim i novim tehnologijama“, Evidencioni broj projekta 31093, oblast tehnološkog razvoja, rukovodilac dr Branislav Simonović, naučni savetnik, projektni period 2011-2016.

Tokom master studija bio je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije. Dobitnik je diplome Pavle Savić, koju dodeljuje Društvo fizikohemijara Srbije, za odličan uspeh postignut na studijama fizičke hemije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Дарко Мицић

број индекса 306/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хемијска и термална анализа семена јагодастог воћа

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дарко Мицић

Број индекса 306/11

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Хемијска и термална анализа семена јагодастог воћа

Ментори др Љиљана Дамјановић, др Бранислав Симоновић

Потписани/а Дарко Мицић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хемијска и термална анализа семена јагодастог воћа

---

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.