

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

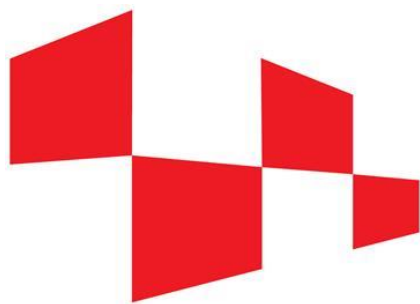
# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2022.

Ana Pejić

**UTJECAJ UBRZANOG  
TOPLINSKOG TRETMANA NA  
ANTIOKIDACIJSKI KAPACITET I  
AKTIVNOST DJEVIČANSKOG  
MASLINOVOG ULJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Klare Kraljić, te uz pomoć mag. ing. Katarine Filipan.



**HRZZ**

Hrvatska zaklada  
za znanost

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina" (HRZZ CROInEVOO, IP-2020-02-7553) čija je voditeljica prof. dr. sc. Dubravka Škevin.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić na uloženom vremenu, savjetima, strpljenju i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim curama koje su studentske dane učinile posebnima i zbog kojih ću odavde sa sobom ponijeti puno više toga od same diplome.*

*Mojem Nikoli hvala na bezbrojnim ohrabrenjima, vjeri i bezuvjetnoj ljubavi.*

*Hvala obitelji, mojoj Miji na vječnoj pozitivnosti, roditeljima koji su mi svojim odricanjem omogućili studiranje, a najviše mojoj mami koja se oduvijek borila i vjerovala u mene, bila mi podrška u svakom padu i veselila se svakom uspjehu i više od mene.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

## UTJECAJ UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET I AKTIVNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

*Ana Pejić*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058208600

**Sažetak:** Ubrzani toplinski tretman je inovativna tehnologija koja uzrokuje inaktivaciju mikroorganizama i enzima ili aktivaciju enzima u sirovini. Ispitan je utjecaj sorte, temperature i načina prijenosa topline ubrzanog toplinskog tretmana na antioksidacijski kapacitet i aktivnost djevičanskih maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline (oblice, rosulje, istarske bjelice i levantinke). Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta korištene su i uspoređene dvije tehnike, UV-Vis spektrofotometrija i EPR spektrometrija, a dobiveni rezultati pokazuju vrlo dobar koeficijent korelacije ovih dviju metoda. Sorta masline ima najveći utjecaj na antioksidacijski kapacitet. Optimalne temperature ubrzanog toplinskog tretmana za povećanje antioksidacijskog kapaciteta djevičanskih maslinovih ulja oblice i istarske bjelice je 20 °C, a levantinke 40 °C. Konvekcija kao tehnika prijenosa topline prilikom zagrijavanja tijesta produljuje trajanja tretmana i povećava antioksidacijski kapacitet ulja. CP50 ulja oblice iznosi 8,10 min, levantinke 9,90 min, a rosulje 10,41 min, dok ulje istarske bjelice nema dovoljnu količinu antioksidanasa za smanjenje koncentracije DPPH<sup>•</sup> za 50 %.

**Ključne riječi:** antioksidacijski kapacitet, antioksidacijska aktivnost, ubrzani toplinski tretman, djevičansko maslinovo ulje

**Rad sadrži:** 41 stranica, 15 slika, 5 tablica, 52 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Katarina Filipan

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (član)
4. prof. dr. sc. Zoran Herceg (zamjenski član)

**Datum obrane:** 19. prosinca 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Oil and Fat Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### INFLUENCE OF FLASH THERMAL TREATMENT ON ANTIOXIDANT CAPACITY AND ACTIVITY OF VIRGIN OLIVE OIL

*Ana Pejić, univ. bacc. ing. techn. aliment.*  
*0058208600*

**Abstract:** Flash thermal treatment is an innovative technology that causes the inactivation of microorganisms and enzymes or the activation of enzymes. Aim of this paper was to determine the influence of cultivar, temperature and type of heat transfer during flash thermal treatment on antioxidant capacity of virgin olive oils of Croatian varieties (Oblica, Rosulja, Istarska Bjelica and Levantinka). Two techniques are used and compared to determine antioxidant capacity: UV-Vis spectrophotometry and EPR spectrometry. Results show a very good correlation between the two techniques. The cultivar has the greatest influence on the antioxidant capacity. Optimal temperature for flash thermal treatment is 20 °C for oils of Oblica, Istarska Bjelica varieties and 40 °C for Levantinka. Heat transfer by convection resulted in an increase of antioxidant capacity. CP50 of Oblica oil is 8,10 min, of Levantinka 9,90 min and of Rosulja 10,41 min, while oil of Istarska Bjelica did not have sufficient amount of antioxidants to reduce DPPH<sup>·</sup> concentration by 50%.

**Keywords:** antioxidant capacity, antioxidant activity, flash thermal treatment, virgin olive oil

**Thesis contains:** 41 pages, 15 figures, 5 tables, 52 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Klara Kraljić, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Katarina Filipan, MSc

#### **Reviewers:**

1. Dubravka Škevin, PhD, Full professor (president)
2. Klara Kraljić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (member)
4. Zoran Herceg, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 19<sup>th</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. SASTAV MASLINOVA ULJA.....	2
2.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET I AKTIVNOST .....	5
2.2.1. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta/aktivnosti .....	7
2.2.2. Princip rada UV-Vis spektrofotometra .....	11
2.2.3. Princip rada spektrometra elektronske paramagnetske rezonancije.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI .....	15
3.2. METODE .....	15
3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman.....	15
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH' metodom pomoću UV-Vis spektrofotometra.....	16
3.2.2.1. Priprema uzoraka i reagensa za analizu .....	16
3.2.2.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta .....	16
3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama .....	17
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH' metodom pomoću EPR spektroskopije.....	18
3.2.3.1. Priprema reagensa za analizu .....	18
3.2.3.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta .....	18
3.2.3.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	20
3.3. OBRADA PODATAKA .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
4.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA POMOĆU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJE .....	22
4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA POMOĆU EPR SPEKTROMETRIJE.....	24
4.3. USPOREDBA UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJE I EPR SPEKTROMETRIJE .....	26
4.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI POMOĆU EPR SPEKTROMETRIJE.....	27
4.5. UTJECAJ NAČINA ZAGRIJAVANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET DMU-A OBLICE .....	34
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>



# 1. UVOD

U posljednjih dvadesetak godina sve se više povećava interes javnosti za većim unosom antioksidanasa putem prehrane zbog njihovih povoljnih učinaka na bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom kao što su visoki krvni tlak, kronična upala, neurodegenerativne bolesti (Alzheimerova i Parkinsonova bolest) te neke vrste raka. Djevičansko maslinovo ulje predstavlja jednu od namirnica koja zbog svog sastava bogatog antioksidansima, prvenstveno fenolima, fenolnim kiselinama, flavonoidima i tokoferolima utječe na smanjenje rizika od prethodno navedenih bolesti. Osim blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje, prirodno prisutni antioksidansi doprinose i očuvanju kvalitete djevičanskog maslinovog ulja usporavanjem ili onemogućavanjem reakcija autooksidacije, termooksidacije, fotooksidacije te oksidacije uzrokovane ionskim zračenjem ili prisustvom metala poput bakra i željeza.

Na količinu i sastav antioksidanasa u DMU-u utječu brojni faktori pri čemu se posebno ističe sorta masline, ali i agrotehničke mjere prilikom razvoja i zrenja ploda, područje rasta, meteorološki uvjeti zrenja, vrijeme sazrijevanja te način proizvodnje ulja.

Mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta dobiva se informacija o koncentraciji antioksidanasa prisutnih u nekom uzorku, dok antioksidacijska aktivnost uzorka daje informaciju o brzini reakcije prisutnih antioksidansa sa slobodnim radikalima. Razvijene su brojne analitičke metode kojima se mjeri antioksidacijski kapacitet i aktivnost, a koje se s obzirom na mehanizam određivanja mogu podijeliti na kromatografske, elektrokemijske i spektrometrijske metode.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana kao predtretmana procesa miješenja na antioksidacijski kapacitet autohtonih hrvatskih monosortnih djevičanskih maslinovih ulja. Osim toga, ispitan je i utjecaj načina, a posljedično i brzine zagrijavanja tijekom samog predtretmana, na antioksidacijski kapacitet proizvedenih djevičanskih maslinovih ulja. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ulja korištene su i uspoređene dvije tehnike, UV-Vis spektrofotometrija i EPR spektrometrija. Dodatno je u ovom radu ispitan i utjecaj sorte maslina na antioksidacijsku aktivnost proizvedenog djevičanskog maslinovog ulja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SASTAV MASLINOVA ULJA

Masti i ulja su pretežito sastavljeni od triglicerida koji uz digliceride, slobodne masne kiseline i glicerol čine gliceridnu frakciju. U sastavu triglicerida pojedine vrste ulja dominiraju neke masne kiseline koje mu daju posebnost. Masne kiseline djevičanskog maslinovog ulja (DMU) se uglavnom sastoje od 16 i 18 ugljikovih atoma. Od zasićenih masnih kiselina u DMU-u se nalaze: laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, arahinska, behenska i lignocerinska masna kiselina. Najzastupljenija nezasićena masna kiselina je oleinska kiselina (18:1, n – 9), a čini čak 55 – 83 % ukupnih masnih kiselina DMU-u. Karakterizira ju velika biološka i prehrambena vrijednost te laka probavljivost. Od ostalih jednostruko nezasićenih masnih kiselina u DMU-u su prisutne: palmitoleinska kiselina (16:1, n – 7) i gadoleinska (20:1, n – 11). Najvažnije esencijalne masne kiseline su linolna (18:2, n – 6) i linolenska (18:3, n – 3) (Žanetić i Gugić, 2006). Negliceridnu frakciju čine nepolarni fosfolipidi, tokoferoli, skvalen, steroli, triterpeni, pigmenti (klorofil *a* i *b*, feofitin *a* i *b*, karotenoidi:  $\beta$ -karoten, likopen, ksantofil), vitamini topivi u mastima (A i E koji djeluju sinergistički s drugim antioksidansima) te polarni fenoli (tirozol, hidroksitirozol), fenolne kiseline, lignani i flavonoidi koji osim što imaju ulogu u definiranju senzorskih svojstava, mogu imati i značajnu biološku aktivnost (Boskou, 2015).

Tokoferoli (poznatiji kao vitamin E) su nepolarni fenoli koji doprinose oksidacijskoj stabilnosti DMU skladištenog u mraku (zaštita od autooksidacije) i na svjetlosti (zaštita od fotooksidacije) (Yalcin i Schreiner, 2017). Od 4 poznata tokoferola  $\alpha$ -tokoferol čini 90 % ukupnih tokoferola prisutnih u DMU-u. Slijede ga  $\beta$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokoferol. DMU može biti dobar izvor vitamina E, ali kako bi se zadržala početna količina tokoferola mora se paziti da ono bude skladišteno na primjeren način (Boskou, 2015).

Skvalen predstavlja prirodni lipid izoprenoidne strukture koji pripada skupini terpenoida. Intermedijer je u biosintezi fitosterola u biljkama i kolesterola u ljudi i životinja, a posjeduje brojna antioksidacijska, protuupalna i antiaterosklerotska svojstva (Lou-Bonafonte i sur., 2018).

Glavni karotenoidi prisutni u DMU-u su  $\beta$ -karoten i lutein dok se u manjim količinama mogu naći i ksantofili kao što su violaksantin i neoksantin. Metode i temperature ekstrakcije ulja značajno utječu na konačan udjel karotenoida u ulju. Karotenoidi reagiraju s molekulama

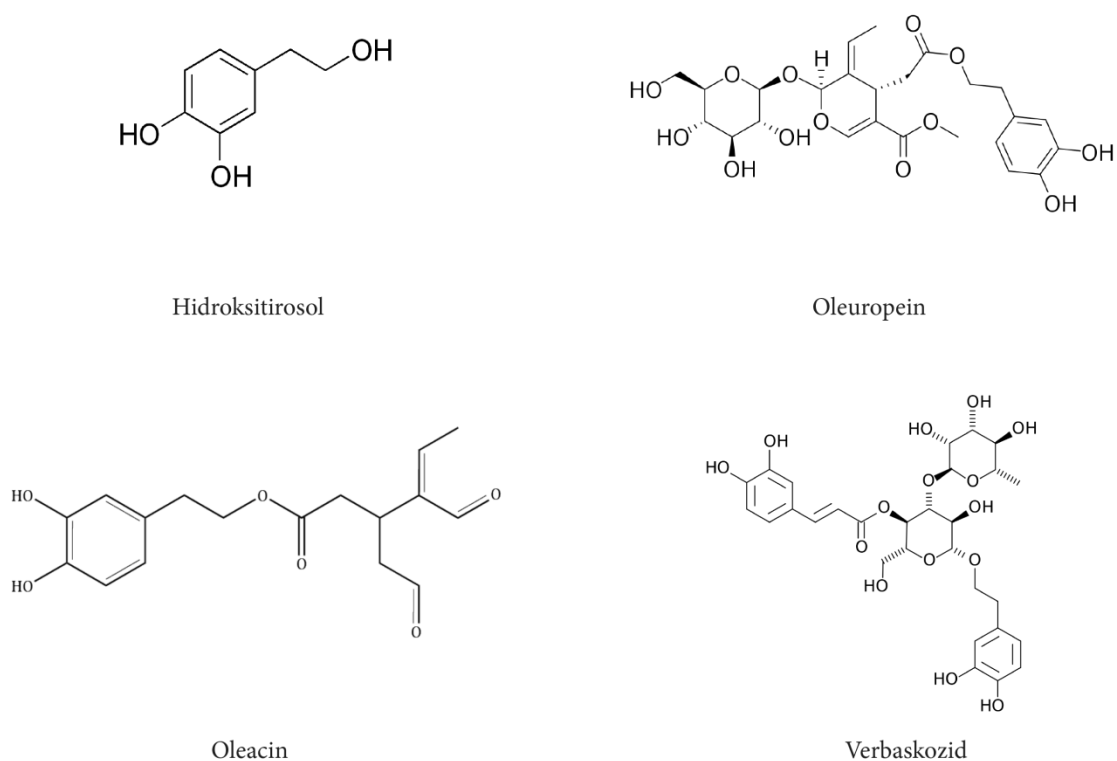
singlet kisika i štite ulje od fotooksidacije. Osim što DMU osigurava izvor karotenoida u prehrani, ono također pomaže pri apsorpciji karotenoida unesenih drugom hranom (Boskou, 2015). Klorofil je zeleni pigment koji DMU-u daje karakterističnu boju. U tami djeluje kao antioksidans, dok u prisutnosti svjetlosti pospješuje oksidaciju ulja (Žanetić i Gugić, 2006).

Fenolni spojevi pokazuju snažno antioksidativno, protuupalno i antimikrobno djelovanje, a prilikom konzumacije DMU-a manifestiraju se kroz gorčinu i pikantnost čime utječu na senzorska svojstva. Oni se u DMU-u nalaze u nekoliko kemijskih skupina: (1) benzojeve i cimetine kiseline nastale iz fenilalanina kao prekursora shikimatnim putem; (2) feniletil alkoholi nastali hidrolizom sekoiridoida; (3) flavonoidi koji su konačni produkti fenilpropanoidnog puta i fenilalanina kao prekursora; (4) sekoiridoidi nastali iz tirozina kao prekursora shikimatnim putem; (5) lignani nastali iz hidroksicinamil alkoholnih monomera shikimatnim putem (Kalogeropoulos i Kaliora, 2015).

Od fenolnih spojeva u DMU-u ističe se oleuropein, sekoiridoidni ester koji se sastoji od 3 podjedinice: molekule glukoze, elenolne kiseline i hidroksitirosola (Ray i sur., 2015). I glikozidni i aglikonski oblik oleuropeina pokazuje antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva te štiti rad srca i mozga. Oleuropein potiče autofagiju, proces kojim se stanicama uklanjaju oštećeni organeli, oštećeni proteini i nakupine amiloida što omogućava održavanje stanične homeostaze te sprječavanje razvoja srčanih oboljenja, raznih vrsta rakova, dijabetesa, Parkinsonove i autoimunih bolesti, osteoartritisa, osteoporozе itd. (Nediani i sur., 2019). Od ostalih sekoiridoidnih spojeva u DMU-u se ističu ligstrozid i demetiloleuropein (Romero-Segura i sur., 2009).

Fenolni glikozidi se hidroliziraju prilikom proizvodnje DMU-a pomoću endogenih glukozidaza masline pri čemu nastaju sekoiridoidni produkti koji čine najvažnije fenolne komponente DMU-a (Hachicha Hbaieb i sur., 2014; Montedoro i sur., 2002). Sekoiridoidni derivati nastali enzimskom hidrolizom oleuropeina, ligstrozida i demetiloleuropeina su dialdehidni oblici dekarboksimetioleuropeina i ligstrozidaglikona (3,4-DHPEA-EDA – oleacein odnosno p-HPEA-EDA – oleokantal) i aldehidni oblici oleuropeina i ligstrozidaglikona (3,4-DHPEA-EA i p-HPEA-EA). Navedeni spojevi su najzastupljenije fenolne komponente nađene u većini DMU-a (Romero-Segura i sur., 2009). Aglikonski derivat ligstrozida, oleokantal, ima posebnu važnost budući da je odgovoran za pikantnost ulja te predstavlja fenol snažnih neurozaštitnih i protuupalnih svojstava s izraženim ciklooksigenaznim inhibicijskim djelovanjem sličnim ibuprofenu (Termentzi i sur., 2015).

Uslijed djelovanja esteraza ili kiselih katalaza kao produkt hidrolize oleuropeina nastaje hidroksitirozol što se događa prilikom sazrijevanja, skladištenja te obrade maslina (Robles-Almazan i sur., 2018; Ray i sur., 2015). Iako hidroksitirozol nastaje uslijed degradacije oleuropeina, koncentracije oba spoja rastu tijekom sazrijevanja plodova masline (Termentzi i sur., 2015). Svoju antioksidativnu aktivnost duguju *orto* – difenolnoj strukturi, no jača antioksidacijska svojstva pokazuje hidroksitirozol (Ray i sur., 2015). Prilikom proizvodnje DMU-a hidroksitirozol se može naći u slobodnom acetatnom obliku ili kao dio kompleksnih molekula kao što su oleuropein, oleacein i verbaskozid (Slika 1) dok se tijekom skladištenja udio slobodnog oblika povećava uslijed hidrolize sekoiridoida. Kroz antioksidativna, antimikrobna i protuupalna svojstva hidroksitirozol povoljno djeluje na rad dišnog i krvožilnog sustava te smanjuje rizik od nastanka raka kože (Robles-Almazan i sur., 2018). Od fenolnih alkohola ističe se i tirozol koji se u velikim količinama nalazi u obliku estera elenolne kiseline kao oleokantal (Ray i sur., 2015).



Slika 1. Kemijska struktura hidroksitirosola, oleuropeina, olaceina i verbaskozida  
(Anonymous 1 – 4, 2022)

Sastav i koncentracija fenola u DMU-u ovisi o brojnim čimbenicima kao što su sorta, područje rasta i vrijeme sazrijevanja masline te proces proizvodnje DMU-a. DMU-a

proizvedena od maslina različitih sorti uzgojenih u istim uvjetima pokazuju velike razlike u koncentraciji glavnih sekundarnih metabolita, a isto tako postoje i kvantitativne varijacije kod maslina iste sorte uzgojenih na različitim područjima. Vrsta mlina i proizvodni proces su dva glavna čimbenika koji utječu na sastav fenola od ploda do ulja (Termentzi i sur., 2015). U istraživanju Montedora i sur. (2002) se pokazalo kako se tijekom mljevenja udio oleuropeina i demetiloleuropeina smanjuje dok se udio njihovih aglikonskih derivata kao što su 3,4-DHPEA-EDA značajno povećava. Nadalje, kada je maslinovo tijesto blanširano pri 95 °C u trajanju od 6 minuta u mikrovalnoj pećnici s ciljem inaktivacije endogenih glukozydaza, koncentracija oleuropeina i demetiloleuropeina se ne smanjuje, a njihovi aglikonski derivati se ne povećavaju. Ovi rezultati jasno ukazuju na to da je udio sekoiridoidnih aglikona u ulju u direktnoj korelaciji s aktivnosti endogenih glukozydaza aktiviranih tokom mljevenja (Termentzi i sur., 2015). Endogeni enzimi masline mogu imati i nepovoljan utjecaj na udio fenola u DMU-u. Takav negativan utjecaj pokazuju polifenol oksidaze i peroksidaze koje ubrzavaju oksidaciju fenolnih glikozida prilikom sazrijevanja ploda te proizvodnje ulja, posebno sekoiridoidnih glikozida nastalih iz oleuropeina (Garcia-Rodriguez i sur., 2015).

S obzirom na to da su fenoli hidrofilne prirode ne mogu se u potpunosti prenijeti iz maslinova tijesta u ulje te se veliki dio zadržava u komini. Miješenje uz mljevenje predstavlja najvažniju kritičnu tehnološku točku proizvodnje DMU-a budući da u ovim fazama dolazi do kontakta sastojaka kožice, sjemenke i pulpe s endogenim enzimima čime započinju kemijske i biokemijske reakcije (Termentzi i sur., 2015).

## **2.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET I AKTIVNOST**

Antioksidansi su prema definiciji molekule koje usporavaju ili sprječavaju oksidaciju drugih molekula, dok su biološki antioksidansi definirani kao svaka tvar koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidirajućeg supstrata, značajno odgađa ili sprječava oksidaciju tog supstrata (Capanoglu i sur., 2018). Posljednjih desetljeća, povećan je interes za ulogom antioksidanasa kao što su polifenoli, karotenoidi, vitamini C i E zbog povoljnih učinaka na bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom: ateroskleroza, visoki krvni tlak, dijabetes, kronična upala, neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te neke vrste raka (Munteanu i Apetrei, 2021; Capanoglu i sur., 2018). Osim blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje, antioksidansi doprinose očuvanju kvalitete DMU-a usporavanjem ili onemogućivanjem autooksidacije, termooksidacije, fotooksidacije,

oksidacije uzrokovane ionskim zračenjem ili prisustvom metala (bakar, željezo) (Shahidi i Zhong, 2015; Žanetić i Gugić, 2005).

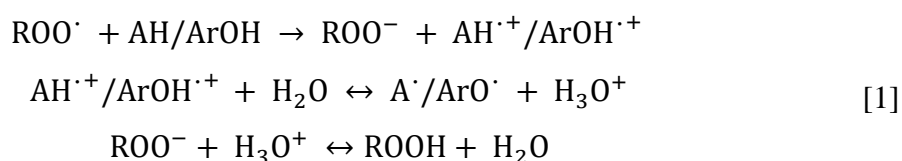
Antioksidansi se s obzirom na mehanizam djelovanja dijele na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni inhibiraju lančanu reakciju oksidacije djelujući kao donori vodika ili akceptor slobodnih radikala pri čemu stvaraju stabilnije radikale. Imaju uglavnom fenolnu strukturu, a uključuju antioksidativne minerale i vitamine te fitokemikalije (flavonoidi, katehini, karotenoidi,  $\beta$ -karoten, likopen, diterpeni i njihovi derivati). Neki od sintetskih primarnih antioksidansa su butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT) i propilgalat (PG). Ovi spojevi djeluju različitim mehanizmima uključujući vezanje metalnih iona, prevođenje hidroperoksida u neradikalne spojeve, apsorpiranje UV zračenja, deaktivaciju singletnog kisika te uklanjanje kisikovih radikala (Munteanu i Apetrei, 2021). Sekundarni antioksidansi ili sinergisti djeluju na način da vežu tragove metala čime inaktiviraju i isključuju prooksidacijsko djelovanje, obnavljaju i produljuju djelovanje antioksidansa davanjem vodikova atoma ili sprječavaju djelovanje antioksidanasa na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006).

Antioksidansi se također mogu podijeliti na enzimске i neenzimске antioksidanse. Enzimski obuhvaćaju primarne (superoksid dismutaza, katalaza, glutationperoksidaza) i sekundarne enzime (glutationreduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza) dok se pod neenzimskim podrazumijevaju prethodno opisani primarni i sekundarni antioksidansi (Munteanu i Apetrei, 2021).

Važno je razlikovati pojam antioksidacijske aktivnosti od antioksidacijskog kapaciteta. Antioksidacijska aktivnost neke tvari je kinetički pojam, a označava brzinu kojom promatrana tvar reagira s nekim kisikovim ili dušikovim spojem. Tlak, temperatura i pH su važni budući da imaju direktan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijski kapacitet daje informaciju o kumulativnom svojstvu uzorka u uklanjanju određene količine reaktivnih spojeva u određenom vremenu, ali ne daje informaciju o samoj brzini reakcija (Laguette i sur., 2007).

### 2.2.1. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta/aktivnosti

Analize za mjerenje antioksidacijske aktivnosti/kapaciteta se mogu kategorizirati ovisno o mehanizmu kemijskih reakcija na: (1) reakcije na bazi prijenosa jednog elektrona (SET; eng. *Single Electron Transfer*); (2) reakcije na bazi prijenosa atoma vodika (HAT; eng. *Hydrogen Atom Transfer*); (3) reakcije na bazi kelacije metalnog iona. Mehanizam prijenosa jednog elektrona (SET) uključuje redoks reakciju s oksidansom (radikalom) [1] koji je pokazatelj krajnje točke reakcije dok analize temeljene na mehanizmu prijenosa atoma vodika (HAT) prikazane jednadžbom [2] uključuju uporabu sintetičkog generatora slobodnih radikala, oksidirajuće molekularne sonde i antioksidansa. Analize temeljene na SET-u mjere redukcijski kapacitet antioksidansa, dok analize temeljene na HAT-u kvantitativno određuju sposobnost doniranja atoma vodika. U SET analizama antioksidans stabilizira radikal na način da mu preda slobodni elektron što uzrokuje promjenu boje radikala, a sam intenzitet promjene boje ovisi o koncentraciji antioksidansa u reakcijskoj smjesi. Završna točka reakcije je postignuta kad nema promjene boje odnosno kada je prijenos elektrona zaustavljen (Sadeer i sur., 2020).



Reakcije na bazi kelacije metalnog iona se temelje na svojstvu antioksidanasa da keliraju prijelazne metale  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  (Sadeer i sur., 2020). Osim 3 navedena mehanizma djelovanja koji se koriste u analitičke svrhe, antioksidansi djeluju i putem sljedećih mehanizama: (1) proton – spregnuti prijenos elektrona (PCET; eng. *proton – coupled electron transfer*); (2) formiranje radikalnog adukta (RAF; eng. *Radical adduct forming*); (3) sekvencijalni prijenos elektrona s gubitkom protona (SPLET; eng. *sequential proton – loss electron transfer*); (4) sekvencijalni prijenos elektrona i protona (SEPT; eng. *Sequential electron proton transfer*); (5) sekvencijalni prijenos vodikovog atoma s gubitkom protona (SPLHAT; eng. *sequential proton-loss hydrogen-atom transfer*) (Galano i sur., 2016).

Razvijene su razne analitičke metode za mjerenje antioksidativnih svojstava uzoraka, a mogu se razvrstati u sljedeće tri kategorije: spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske tehnike (Sadeer i sur., 2020). Spektrometrijske metode kao što su Folin – Ciocalteu, FRAP (eng. *ferric reducing antioxidant power*) i CUPRAC (eng. *cupric reducing antioxidant capacity*) mjere kapacitet antioksidansa preko redukcije oksidansa koji mijenja boju kada je reduciran. Stupanj promjene boje je u direktnoj korelaciji s količinom antioksidansa u uzorku. Elektrokemijske metode (ciklička voltometrija, voltometrija diferencijalnog pulsa i voltometrija kvadratnih valova) se temelje na proučavanju elektrokemijskih svojstava antioksidansa u uzorcima hrane pomoću ugljikove, dijamantne i grafitne elektrode (Sun i sur., 2018). Kromatografske metode uključuju razdvajanje komponenti uzorka između tekuće i plinovite ili tekuće i krute faze na osnovu njihovih različitih svojstava, a antioksidacijski kapacitet/aktivnost se određuje na različite načine kao što je ionizacija ili mjerenje konduktiviteta (u plinskoj kromatografiji - GC), UV-Vis detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska detekcija (u visokodjelotvornoj tekućinskoj kromatografiji - HPLC) i fotografiranje pod vidljivim svjetlom (u tankoslojnoj kromatografiji) (Sadeer i sur., 2020). U Tablici 1 su prikazane najčešće korištene metode za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta/aktivnosti.

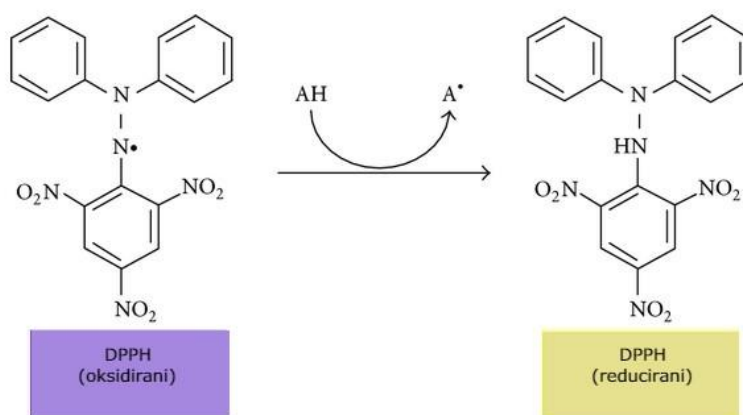


**Tablica 1.** Najčešće korištene metode za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta/aktivnosti (Capanoglu i sur., 2018)

Metoda	Oksidacijsko sredstvo	Proba	Detekcija
HAT metode			
ORAC	ROO• proizveden iz AAPH	β-fikoeritrin, fluorescein	Fluorometar
TRAP	ROO• proizveden iz ABAP	ABTS	Spektrofotometar
TOSC	ROO•	KMBA	HS-GC
Crocin test izbjeljivanja	ROO• proizveden iz AAPH	Crocin	Spektrofotometar
SET metode			
Folin – Ciocalteu	Fenolne komponente	Folin – Ciocalteu reagens	Spektrofotometar
FRAP	Fe (III)	TPTZ	Spektrofotometar
CUPRAC	Cu (II)	Neokuproin	Spektrofotometar
Kombinirane metode			
ABTS/TEAC	ABTS	ABTS	Spektrofotometar
DPPH•	DPPH•	DPPH•	Spektrofotometar
DMPD	DMPD	DMPD	Spektrofotometar

AAPH, 2,2-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorid; ABAP, 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid; ABTS, 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); CUPRAC, smanjenje antioksidacijskog kapaciteta pomoću bakra; DMPD, N,N-dimetil-p-fenilendiaminedihidroklorid; DPPH•, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP, smanjenje antioksidacijskog kapaciteta pomoću željeza; HSGC, headspaceplinska kromatografija, KMBA, keto-metiolbutirična kiselina; ORAC, kapacitet apsorpcije radikala kisika; ROO•, peroksilni radikal; TEAC, Troloxu ekvivalentan antioksidacijski kapacitet; TOSC, ukupni kapacitet hvatanja oksiradikala; TPTZ, 2,4,6-tripiridils-triazin; TRAP, ukupni antioksidativni parametar za hvatanje peroksilnih radikala.

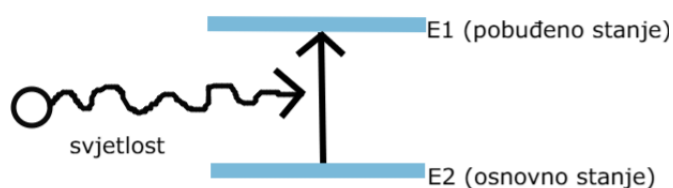
Danas su u analitici najčešće korištene metode kojima se mjeri antioksidacijski kapacitet/aktivnost bioloških uzoraka na temelju kolorimetrije kao što je DPPH<sup>•</sup> metoda (Sadeer i sur., 2020). DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je  $\pi$ -radikal koji se nalazi u obliku monomera u čvrstoj fazi i u otopini. Nije prirodni radikal, ali je mehanizam reakcije s antioksidansima sličan onom s peroksilnim radikalom. Topljiv je u raznim organskim otapalima (najčešće metanolu, etanolu i njihovim vodenim smjesama) te nije topljiv u vodi. Sama metoda se temelji na doniranju elektrona antioksidansa u svrhu neutralizacije DPPH radikala - SET metoda (Slika 2). Ova je reakcija popraćena promjenom boje (iz ljubičaste u žutu) izmjerenoj na valnoj duljini 515 – 518 nm koja djeluje kao pokazatelj antioksidacijske aktivnosti. Najčešće se antioksidacijski kapacitet izmjeren ovom metodom definira kao EC<sub>50</sub>, odnosno kao efikasna koncentracija antioksidansa koja je potrebna kako bi se početna količina DPPH<sup>•</sup> smanjila za 50 %. Ovo je jednostavna metoda za koju je potreban jedino Vis – spektrofotometar ili spektrometar elektronske paramagnetske rezonancije (EPR). Osim jednostavnosti ostale prednosti su niska cijena, reproducibilnost, primjenjivost na sobnoj temperaturi te mogućnost automatizacije (Munteanu i Apetrei, 2021).



Slika 2. Reakcija redukcije DPPH radikala (Teixeira i sur., 2013)

### 2.2.2. Princip rada UV-Vis spektrofotometra

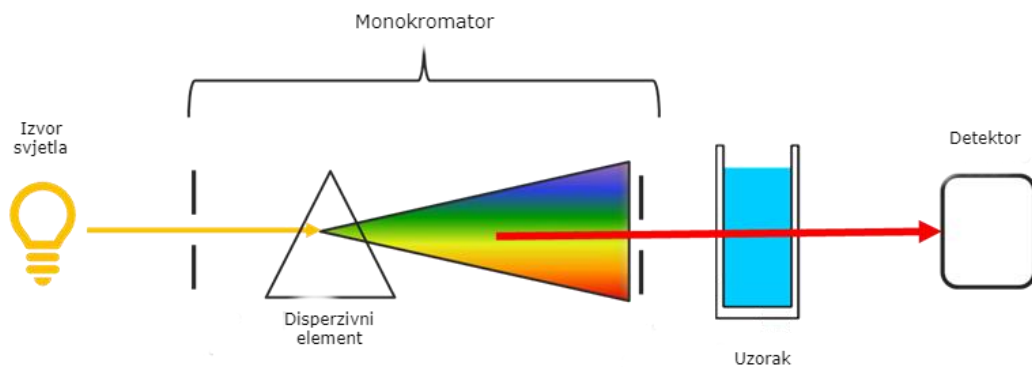
Spektrometrijske tehnike se koriste za mjerenje interakcije elektromagnetskog zračenja i materije. Materija apsorbira zračenje što uzrokuje prelazak atoma/molekula analita u drugo (najčešće više) energetska stanje. U spektrofotometriji se mjeri stupanj apsorbancije ili emisije elektromagnetskog zračenja, a sama interakcija zračenja s materijom direktno ovisi o energiji zračenja. UV-Vis spektrofotometrija se smatra najstarijom spektrofotometrijskom tehnikom koja se koristi za mjerenje intenziteta svjetlosti u ultraljubičastom (UV, 10 – 400 nm) i vidljivom (Vis, 400 – 800 nm) području valnih duljina elektromagnetskog zračenja. Princip rada UV-Vis spektrofotometra se temelji na fenomenu apsorpcije svjetlosti, a količina apsorbirane svjetlosti je direktno proporcionalna količini analita prisutnom u otopini uzorka. Kako se koncentracija analita povećava, apsorpcija svjetlosti se linearno povećava dok se transmisija svjetlosti eksponencijalno smanjuje. U UV-Vis području apsorpcija zračenja ovisi o elektronskoj konfiguraciji atoma, molekula, iona ili prisutnih kompleksa. Kada foton dođe u interakciju s molekulom može inducirati prijelaz u energetskoj razini molekule ukoliko energija koju foton daje odgovara razlici energije ovih razina (Slika 3). Količina zračenja koju apsorbira analit se mjeri i bilježi naspram valne duljine elektromagnetskog zračenja kako bi se dobio spektar (dijagram valne duljine ili frekvencije u odnosu na intenzitet apsorpcije) (Akash i Rehman, 2020).



Slika 3. Shematski prikaz elektronskih energetska razina (Akash i Rehman, 2020)

Koriste se dvije vrste izvora svjetlosti u obliku polikromatske svjetlosti. Za UV zračenje koriste se deuterijeve, vodikove, volframove, živine i ksenonske lampe, dok se za izvor vidljive svjetlosti koriste volframove, ugljikove i lampe sa živinom parom. Na Slici 4 prikazane su osnovne komponente UV-Vis spektrofotometra. Emitirana svjetlost dolazi do monokromatora

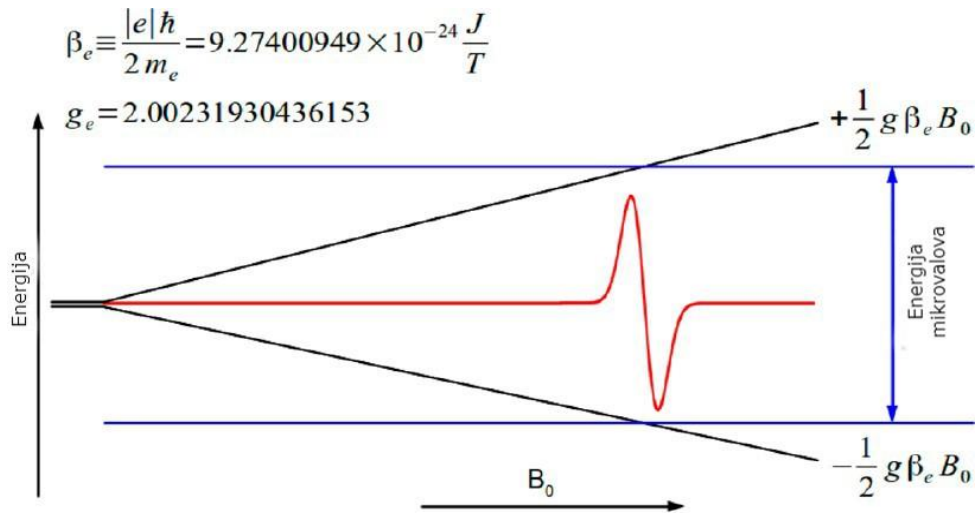
koji polikromatsku prevodi u monokromatsku svjetlost, odnosno propušta samo jednu valnu duljinu svjetlosti koja na njega pada. Svjetlo određene valne duljine dolazi do uzorka ili uzoraka koji se nalaze u kivetama. Kivete mogu biti različitih oblika, veličina, transmisijskih karakteristika te izrađene od različitih materijala (plastika, staklo, kvarc). Detektor mjeri količinu svjetlosti koja prođe kroz uzorak te svjetlosne signale prevodi u električne koji se obrađuju na uređaju za očitavanje signala (Akash i Rehman, 2020).



Slika 4. Osnovne komponente UV-Vis spektrofotometra (Anonymous 5, 2022)

### 2.2.3. Princip rada spektrometra elektronske paramagnetske rezonancije

Metoda elektronske paramagnetske rezonancije (EPR) spektroskopije zahtijeva prisutnost nesporenog elektronskog spina (Sahu i sur., 2013). Temelji se na apsorpciji mikrovalnog zračenja od strane paramagnetskog uzorka (materijala s nesporenim elektronima) postavljenog u vanjsko magnetsko polje što je korisno pri određivanju slobodnih radikala i prijelaznih metala (Barba i sur., 2020). Najjednostavniji EPR aktivni sustav se sastoji od jednog spina nesporenog elektrona u molekularnoj orbitali. Elektron može postojati u jednom od dva  $M_s$  kvantna stanja,  $+1/2$  ili  $-1/2$ . U odsutnosti magnetskog polja ova su dva stanja degenerirana i imaju istu energiju. Međutim kada se uključi magnetsko polje energija  $-1/2$  stanja se smanjuje, a  $+1/2$  raste kao funkcija jakosti magnetskog polja što je vidljivo na Slici 5. Stoga je prilikom provođenja EPR spektroskopije potrebno ispuniti uvjet rezonancije, odnosno paramagnetskom sustavu dovesti energiju promjenjivog magnetskog polja koja je jednaka razlici energijskih razina  $\alpha$  i  $\beta$ -elektrona (Sahu i sur., 2013). Određivanje antioksidacijskog kapaciteta/aktivnosti se temelji na mjerenju promjene intenziteta EPR spektra stabilnih radikala što je rezultat njihove interakcije s antioksidansima (Bartoszek i Polak, 2012).



Slika 5. Ovisnost promjene energije  $-\frac{1}{2}$  i  $+\frac{1}{2}$  stanja elektrona o jakosti magnetskog polja (Sahu i sur., 2013)

Energetska razlika između dva stanja elektrona može se prikazati sljedećom jednačinom:

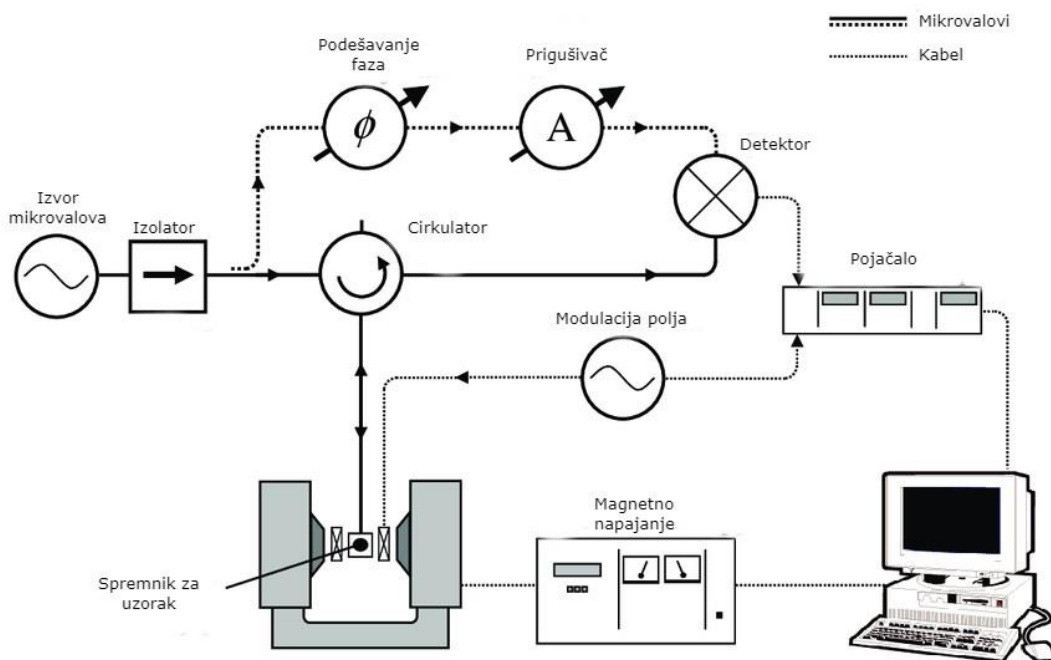
$$\Delta E = g\beta_e\beta_0 \quad [3]$$

gdje je  $g$  – Landeov  $g$ -faktor,  $\beta_e$  – Borov magneton ( $9,27 \times 10^{-24} \text{ Nm/kg}\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{A}^{-1}$ ),  $h$  – Plankova konstanta ( $6,626 \times 10^{-34} \text{ Nms}$ ),  $\nu$  – frekvencija mikrovalova,  $\beta_0$  – intenzitet vanjskog magnetskog polja. Osnovna SI jedinica za jakost magnetskog polja je tesla (T), ali je u EPR spektroskopiji uobičajeno koristiti gauss ( $1 \text{ T} = 10^4 \text{ G}$ ).

EPR spektrometar je uređaj pomoću kojeg se očitava pojava elektronske paramagnetske rezonancije. Dva su tipa spektrometra koji rade na različitim principima: CW (eng. *Continuous wave*) metoda gdje se uzorak izlaže zračenju konstantne frekvencije, a magnetsko polje se neprekidno mijenja te pulsni EPR spektrometar gdje se uzorak izlaže zračenju različitih frekvencija pri konstantnom magnetnom polju (Milić Komić, 2018).

EPR spektrometar se sastoji od elektromagneta koji stvara homogeno i stabilno polje između čijih je polova smještena rezonantna šupljina s uzorkom. U elektromagnet je ugrađena Hallova proba za mjerenje i kontrolu magnetskog polja. Uz elektromagnet i rezonantnu šupljinu, osnovni dio uređaja čini mikrovalni most koji je izvor mikrovalova i detektor EPR signala (Slika 6). Mikrovalni most sadržava klistron koji je izvor mikrovalnog zračenja i detektorsku diodu. Prigušivač omogućuje propuštanje mikrovalova samo u jednom smjeru čime

kontrolira intenzitet mikrovalnog zračenja i štiti klistron od eventualne refleksije mikrovalova iz rezonantne šupljine. Frekvencija mikrovalova iznosi 8,8 – 9,6 GHz, a maksimalna mikrovalna snaga je 200 mW. Moduliranjem magnetskog polja frekvencijom od 100 kHz se povećava osjetljivost detekcije. Kada frekvencija i magnetsko polje zadovolje uvjet rezonancije dolazi do prijelaza spinova u viši energetski nivo te sustav bilježi EPR signal (Vojnić Kortmiš, 2019).



Slika 6. Shema standardnog EPR spektrometra (CW) (Neugebauer, 2010)

EPR spektroskopija se ističe visokim stupnjem osjetljivosti, visokom specifičnosti te potrebom za malim količinama uzoraka (Barba i sur., 2020). Jedina je metoda za detekciju i direktnu kvantifikaciju broja nesparenih elektrona (Lund i sur., 2011). Trajanje mjerenja je između nekoliko minuta i nekoliko sati. Očitanje mjerenja je nedestruktivno te se može ponoviti više puta na istom uzorku. Nedostatak ove metode je mogućnost pogreške rezultata mjerenja izazvane prirodnim odnosno pozadinskim signalom (Vojnić Kortmiš, 2019).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJALI**

Kao materijal u ovom radu korišteni su uzorci DMU-a četiriju autohtonih hrvatskih sorti masline (oblica, rosulja, istarska bjelica i levantinka) proizvedeni na laboratorijskoj uljari bez i uz ubrzani toplinski tretman (UTT) pri 6 različitih temperatura (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C). Uz to su kao materijal korištena i četiri uzorka DMU-a proizvedena iz ranije navedenih sorti konvencionalnom tehnologijom u poluindustrijskom pogonu. Sva su ulja proizvedena 2021. godine. Svi uzorci ulja su nakon proizvodnje čuvani u bocama od tamnog stakla u kojima je prostor iznad ulja bio ispunjen dušikom pri temperaturi 15 – 20 °C.

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman**

Očišćeni i oprani plodovi maslina samljeveni su na mlinu čekićaru (MM-100) koji je dio laboratorijske pilot – uljare Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas). Uz mlin, pilot – uljara sadrži i termomiješalicu s vodenom kupelji (TM-100) i centrifugu (CF-100). Maslinovo tijesto je tretirano UTT-om pri 6 različitih temperatura: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C. Hlađenje na željene temperature (15 °C i 20 °C) je provedeno u uređaju za ubrzano hlađenje (Blastchiller ATT05 ATTILA ABB, TECNODOM) gdje je toplinska energija odvođena konvekcijom pri temperaturi od -18 °C. Oko 800 g maslinova tijesta se nanese na pladnjeve od inoksa u sloju visine 1 – 1,5 cm. Grijanje maslinova tijesta na temperature od 25 °C do 40 °C je provedeno na dva načina. U termostatu pomoću prijenosa topline konvekcijom pri temperaturi od 45 °C u kojem je tijesto bilo nanese na pladnjeve od inoksa kao i kod hlađenja tijesta. U drugom načinu tijesto je zagrijavano pomoću kondukcije u vodenoj kupelji (SUB Aqua Pro SAP12, GRANT). Tijesto je presipano u plastične posudice koje su s gornje strane oblagane s aluminijskom folijom kako bi se ravnomjerno raspodijelila toplina. Voda u kupelji je bila zagrijavana na 50 °C (za temperature tijesta 25 – 35 °C) i 52 °C (za temperaturu tijesta 40 °C). Željena temperatura provjeravana je ubodnim termometrom.

Tretirano tijesto je podvrgavano miješenju i centrifugiranju na laboratorijskoj uljari. Miješenje je provođeno u trajanju od 40 minuta pri temperaturi od 27 °C nakon čega slijedi centrifugiranje pri čemu se izdvaja ulje kroz 90 sekundi uz 3500 o/min. Dobiveno je ulje dodatno izbistreno finim centrifugiranjem na centrifugi Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG) na 18 °C u trajanju od 4 minute pri 5000 o/min.

### 3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH<sup>•</sup> metodom pomoću UV-Vis spektrofotometra

Uzorcima ulja određivana je sposobnost hvatanja 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil – DPPH radikala prema metodi Kalantzakisa i sur. (2006). Smanjenje udjela DPPH radikala (tehnička čistoća > 85 % (CHN), Fluka) u uzorku određuje se pomoću spektrofotometra (UviLine 9400, Secomam) mjerenjem promjene boje, odnosno apsorbancije, reakcijske smjese pri valnoj duljini od 515 nm.

#### 3.2.2.1. Priprema uzoraka i reagensa za analizu

U svrhu provođenja reakcije potrebno je pripremiti 10%-tnu ( $\text{mV}^{-1}$ ) otopinu ulja u etil – acetatu (HPLC čistoća, CARLO ERBA Reagents) i otopinu DPPH radikala u etil – acetatu (0,125 mM). Uz navedene, potrebno je pripremiti i otopine DPPH radikala u etil – acetatu različitih koncentracija (0,125, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 i 0,005 mM) koje se koriste za izradu baždarnog dijagrama.

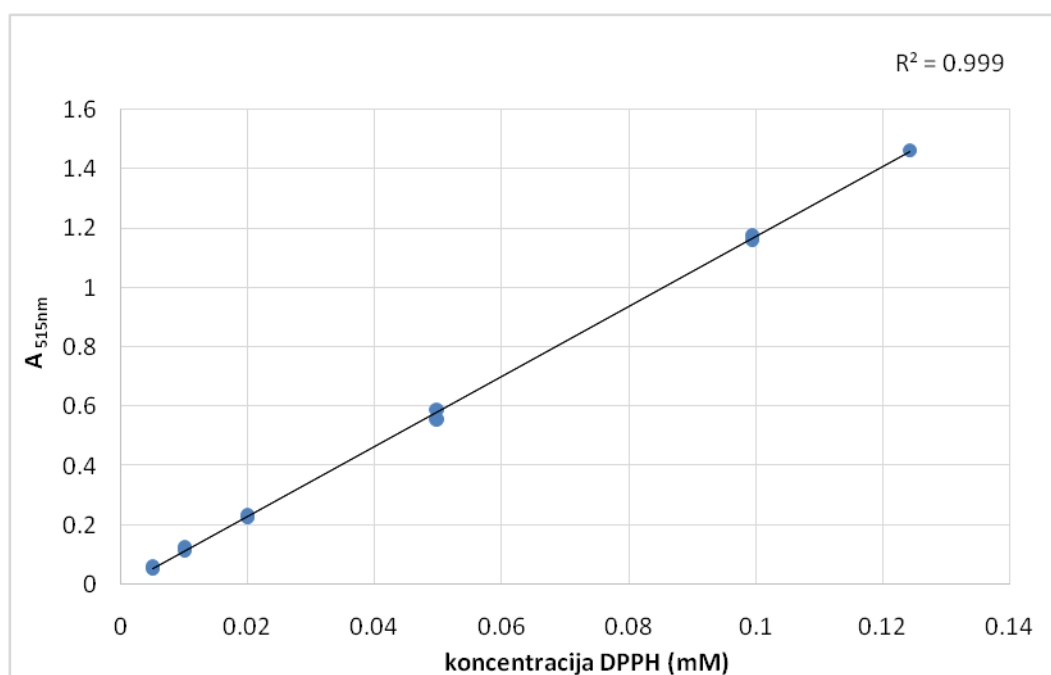
#### 3.2.2.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Otopini ulja volumena 1 mL dodaje se svježe pripremljena otopina DPPH radikala u volumenu od 4 mL. Reakcijska smjesa miješa se 10 sekundi na Vortex uređaju, drži u mraku točno 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija na 515 nm uz slijepu probu (1 mL otopine ulja i 4 mL etil acetata).



### 3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama

Postupak mjerenja za izradu baždarnog dijagrama provodi se identično postupku određivanja antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pri čemu se umjesto reakcijskih smjesa otopina ulja i DPPH radikala koriste otopine DPPH<sup>•</sup> u etil – acetatu na 6 koncentracijskih razina, a mjerenje se provodi u 2 ponavljanja. Mjeri se i apsorbancija slijepe probe koju čini samo etil – acetat. Na temelju dobivenih vrijednosti izrađuje se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DPPH radikala (Slika 7).



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DPPH<sup>•</sup>

Iz prikazane krivulje izvedena je jednadžba za izračun koncentracije DPPH<sup>•</sup> - formula [4]:

$$[DPPH^{\bullet}] = \frac{A + 0,0027}{11,7579} \quad [4]$$

gdje je [DPPH<sup>•</sup>] koncentracija DPPH radikala, a A izmjerena vrijednost apsorbancije na spektrofotometru.

Postotak redukcije DPPH<sup>•</sup>, koji je proporcionalan antioksidacijskom kapacitetu, izračunava se prema formuli [5]:

$$\% \text{ redukcije DPPH}^{\cdot} = 100 \cdot \left( 1 - \frac{[\text{DPPH}^{\cdot}]_{30}}{[\text{DPPH}^{\cdot}]_0} \right) \quad [5]$$

gdje je  $[\text{DPPH}^{\cdot}]_0$  izračunata koncentracija  $\text{DPPH}^{\cdot}$  u kontrolnom uzorku ( $t = 0$ ), a  $[\text{DPPH}^{\cdot}]_{30}$  izračunata koncentracija  $\text{DPPH}^{\cdot}$  u reakcijskoj smjesi nakon 30 minuta reakcije.

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta $\text{DPPH}^{\cdot}$ metodom pomoću EPR spektroskopije

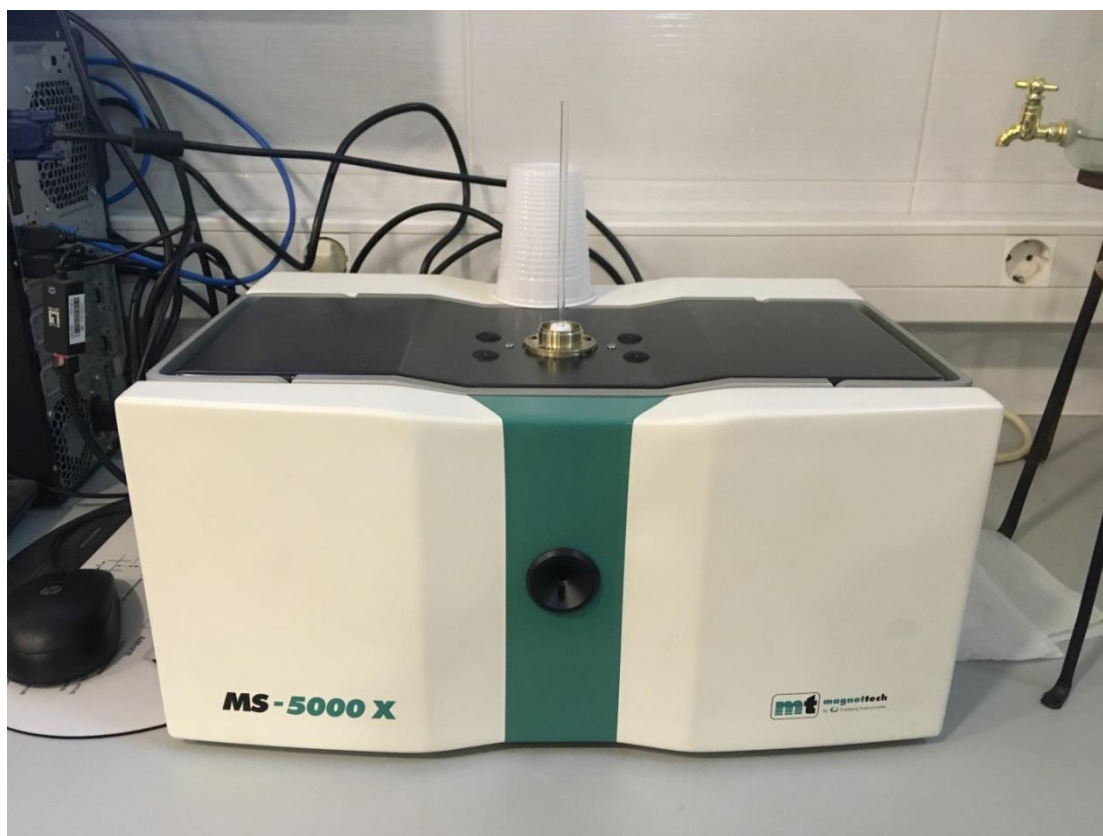
Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka ulja EPR spektroskopijom korištena je modifikacija metode Nutrizio i sur. (2021) kojom se ulje dodaje u otopinu slobodnog radikala DPPH te se prati njegova inaktivacija uslijed djelovanja spojeva ulja koji imaju antioksidacijsku aktivnost.

#### 3.2.3.1. Priprema reagensa za analizu

Otopinu DPPH radikala (tehnička čistoća > 85 % (CHN), Fluka) u etil – acetatu (HPLC čistoća, CARLO ERBA Reagents) potrebno je pripremiti dan prije provedbe analize. Za 0,15 mM otopinu izvaže se 5,91 mg DPPH radikala u laboratorijsku čašicu od 25 mL na analitičkoj vagi (KERN ABP 200-5DM, KERN & SOHN). Etil – acetat je potrebno propuhati dušikom u trajanju od 5 minuta kako bi se uklonio sav kisik koji može uzrokovati interferencije prilikom mjerenja. Izvagani  $\text{DPPH}^{\cdot}$  se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etil – acetatom propuhanim s dušikom do oznake. Odmjerna tikvica se omota u aluminijsku foliju kako bi se otopina zaštitila od svjetlosti nakon čega se mješa na Vortex uređaju 3 minute te skladišti u hladnjaku 24 sata pri temperaturi od +4 °C.

#### 3.2.3.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta provodi se na EPR spektrometru Marnettech MS – 5000 tvrtke Freiburg instruments (Slika 8). Prije početka rada na uređaju je potrebno pokrenuti inicijalizaciju u trajanju od 15 minuta.



Slika 8. Magnettech MS – 5000 (Freiburg instruments) EPR spektrometar (vlastita fotografija)

U mikropruvetu od 2 mL automatskom pipetom se dodaje 980  $\mu\text{L}$  otopine DPPH $\cdot$  i 20  $\mu\text{L}$  uzorka ulja. U trenutku dodatka ulja pokreće se štoperica, a uzorak se miješa na Vortex uređaju u trajanju od 10 sekundi. Reakcijska otopina se stavi u mrak te minutu do dvije prije isteka vremena od 30 minuta napuni u kapilaru i umetne u cjevčicu uređaja. Nakon točno 30 minuta pokrene se snimanje EPR spektra. Slijepa proba se priprema na način da se u 980  $\mu\text{L}$  otopine DPPH $\cdot$  umjesto uzorka ulja doda 20  $\mu\text{L}$  etil – acetata, a mjerenje slijepo probe se provodi na početku radnog dana te svaka slijedeća 2 sata tijekom provođenja analize. Mjerenje se vrši pri sobnoj temperaturi, jakosti centralnog magnetskog polja 331,00 – 343,00 mT, amplitudi modulacije 0,20 mT, frekvenciji 100 kHz i snazi mikrovalnog zračenja od 10 mW. Postavljanje parametara, snimanje spektra i obrada rezultata se vrši pomoću ESR Studio programskog paketa. Iz visine intenziteta signala u srednjem piksu spektra DPPH $\cdot$  u reakcijskoj smjesi i slijepoj probi računa se postotak redukcije DPPH $\cdot$  koji je proporcionalan antioksidacijskom kapacitetu prema formuli [6]:

$$\% \text{ redukcije DPPH} = 100 \cdot \frac{\text{visina signala}_{\text{stijepa proba}} - \text{visina signala}_{\text{uzorak}}}{\text{visina signala}_{\text{stijepa proba}}} \quad [6]$$

### 3.2.3.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti konvencionalnih uzoraka, reakcijska smjesa pripremljena prema metodi opisanoj u potpoglavlju 3.2.3.1. se odmah nakon miješanja na Vortex uređaju napuni u kapilaru, stavlja u cjevčicu uređaja te se pokreće mjerenje u trajanju od 30 minuta pri čemu se intenzitet signala mjeri svaku minutu pod istim uvjetima analize kao i za antioksidacijski kapacitet. Antioksidacijska aktivnost je za svaki uzorak izražena kao CP50, odnosno kao vrijeme potrebno da se početna koncentracija DPPH<sup>•</sup> smanji za 50%.

## 3.3. OBRADA PODATAKA

Rezultati istraživanja su statistički obrađeni pomoću dvofaktorske analize varijance s replikacijom – ANOVA u programu Microsoft Excel 2010.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

DMU ima visoku nutritivnu i biološku aktivnost te specifična senzorska svojstva zahvaljujući svom jedinstvenom sastavu fenolnih spojeva. Kemijski sastav plodova maslina, a time i ulja, ovisi o genetskim osnovama te o klimatskim, agrotehničkim i pedološkim čimbenicima uzgojnog područja (Klepo i Benčić, 2014). S obzirom da sorta masline ima najveći utjecaj na sastav DMU-a jedan od ciljeva ovog rada bio je utvrđivanje utjecaja sorte na antioksidacijski kapacitet i aktivnost DMU-a oblice, rosulje, levantinke i istarske bjelice.

No na sastav ulja dodatno utječu tehnološki postupci prilikom proizvodnje DMU. Prilikom mljevenja započinje hidrolitička i oksidativna aktivnost enzima koja se nastavlja tokom miješenja maslinova tijesta pri čemu dolazi do oblikovanja fenolnog sastava DMU-a čime se utječe na antioksidacijski kapacitet i aktivnost (Garcia-Rodriguez i sur., 2015). U posljednje vrijeme se istražuju brojne inovativne tehnologije čijim se uvođenjem u proizvodnju DMU-a želi utjecati na ekstraktabilnost ulja, ali i na povećanje nutritivne vrijednosti direktnim ili indirektnim djelovanjem na enzimski sastav samog ploda. Smanjenje ili povećanje temperature maslinova tijesta prilikom proizvodnje jedan je od najjednostavnijih načina kako utjecati na aktivnost endogenih enzima te potencijalno povećati kvalitetu DMU-a. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio utvrditi utjecaj UTT-a, odnosno ubrzanog hlađenja ili grijanja tijesta na temperature od 15 °C do 40 °C, na antioksidacijski kapacitet i aktivnost DMU-a oblice, rosulje, levantinke i istarske bjelice. UTT je korišten kao predtretman procesa miješenja. Treba napomenuti kako je UTT prilikom proizvodnje ulja iz sorte rosulja pri temperaturama zagrijavanja (30, 35 i 40 °C) proveden zagrijavanjem u termostatu (prijenos topline konvekcijom), dok je za ulja iz preostale 3 sorte za provođenje UTT-a korištena vodena kupelj (prijenos topline kondukcijom). Kako bi se ispitaio utjecaj načina prijenosa temperature na antioksidacijski kapacitet ulja, ulja iz sorte oblica proizvedena su na oba načina te korištena za ovo istraživanje.

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta i aktivnosti korištena je DPPH' metoda, a redukcija radikala koja se mjeri u samoj metodi, određivana je pomoću dva uređaja – UV-Vis spektrofotometra i EPR spektrometra. Rezultati spektrofotometrijskog i EPR određivanja antioksidacijskog kapaciteta su prikazani u tablicama kao srednja vrijednost provedenih mjerenja, dok su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti te utjecaja temperature i načina zagrijavanja na antioksidacijski kapacitet ulja oblice prikazani grafički.

#### 4.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA POMOĆU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJE

Tablica 2 prikazuje izmjerene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta proizvedenih DMU-a UV-Vis spektrofotometrom. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u proizvedenim uzorcima kreću se od 68,29 % do 95,56 %. Iz rezultata je vidljivo kako DMU-a rosulje pokazuju najveći antioksidacijski kapacitet. Slijede ih DMU-a proizvedena iz sorte oblica, dok ulja istarske bjelice i levantinke pokazuju gotovo jednake, ali značajno niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta od ulja iz ostale dvije sorte.

**Tablica 2.** Antioksidacijski kapacitet (prikazan kao % redukcije DPPH radikala) DMU-a proizvedenih od četiri autohtone sorte masline i pri različitim temperaturama UTT-a mjeren pomoću UV-Vis spektrofotometra

Temperatura tretmana (°C)	Antioksidacijski kapacitet (% red DPPH')			
	OBLICA	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	LEVANTINKA
<b>Kontrola</b>	87,55±1,63	93,21±0,84	74,02±1,05	78,99±2,69
<b>15</b>	79,33±1,70	89,02±0,75	74,57±1,00	69,74±1,93
<b>20</b>	84,22±1,45	92,62±2,45	77,99±2,90	71,29±2,12
<b>25</b>	81,00±3,84	84,99±1,00	78,95±2,69	71,72±2,48
<b>30</b>	83,90±3,89	92,12±0,93	78,39±2,69	77,64±1,50
<b>35</b>	77,57±2,47	90,37±1,52	68,29±2,56	78,44±1,72
<b>40</b>	81,73±2,52	95,56±0,98	75,47±1,62	79,66±3,46

Iz ranijih je istraživanja poznato kako sastav i koncentracija polifenola u DMU-u imaju najjači utjecaj na antioksidacijski kapacitet ulja (Fратиanni i sur., 2019; Del Carlo i sur., 2004). Istraživanja provedena na dalmatinskim sortama pokazuju je kako DMU-a oblice sadrže više koncentracije fenola od DMU-a levantinke (Šarolić i sur., 2015; Žanetić i sur., 2011). Također je usporedbom DMU-a oblice i istarske bjelice pokazano kako dalmatinska sorta ipak prednjači u udjelu ukupnih fenola (Torić i sur., 2020). Ovi su rezultati u skladu s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta dobivenim u ovom diplomskom radu. S druge strane, ranija istraživanja pokazala su kako DMU istarske bjelice ima veći udio ukupnih fenola, *o*-difenola i

te veći kapacitet "gašenja" slobodnih radikala od DMU-a rosulje, dok DMU rosulje ima veći udio ukupnih tokoferola (Koprivnjak i sur., 2016; Koprivnjak i sur. 2012). Razlozi ovakvih odstupanja mogu se pronaći u klimatskim uvjetima tijekom sazrijevanja samog ploda, jer je poznato kako različite sorte različito reagiraju na stresne uvjete.

Promatra li se utjecaj temperature na antioksidacijski kapacitet DMU-a oblice i istarske bjelice vidljivo je kako antioksidacijski kapacitet raste porastom temperature 15 – 25 °C, zatim padne na 35 °C te ponovno naraste na 40 °C. Dobivene vrijednosti imaju smisla promatraju li se sa strane aktivnosti enzima prisutnih u maslinovu tijestu. Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze, enzima koji katalizira hidrolizu fenolnih glikozida pri čemu nastali derivati pokazuju najveći stupanj antioksidacijske aktivnosti, najveća je pri temperaturama od 40 °C (Pavlič, 2021) odnosno 40 – 45 °C (Romero-Segura i sur., 2009). S druge strane, oksidoreduktaze kao što su peroksidaze i polifenol oksidaze nepovoljno djeluju na antioksidativni profil ulja, budući da kataliziraju oksidaciju fenolnih glikozida, posebice ključnih antioksidativnih komponenti, sekoiridoidnih glikozida nastalih hidrolizom iz oleuropeina (Garcia-Rodriguez i sur., 2015). Ovi enzimi pri temperaturama od 40 °C gube stabilnost i aktivnost čime se doprinosi povećanju fenolnog sadržaja ulja (Clodoveo i sur., 2014; Hachicha Hbaieb i sur., 2014). Peroksidaze najveću stabilnost pokazuju pri rasponu temperatura 30 – 40 °C (Ramirez i sur. 2014) odnosno pri 37 °C (Peres i sur., 2015) čime se može objasniti pad antioksidacijskog kapaciteta pri 35 °C. Ovom trendu ne podliježu DMU-a levantinke budući da ona porastom temperature pokazuju kontinuirani rast antioksidacijskog kapaciteta koji je značajno veći pri temperaturama 30 – 40 °C u odnosu na uzorke tretirane pri 15 – 25 °C. DMU-a rosulje se razlikuju od svih uzoraka budući da je maslinovo tijesto ove sorte prilikom proizvodnje zagrijavano konvekcijom u termostatu te je to zagrijavanje trajalo značajno dulje (do 1 sata). Iz rezultata prikazanih u tablici 2 vidljivo je kako se pri temperaturama hlađenja, proizvedena DMU rosulje ponašaju slično kao i ulja iz ostalih sorti. No rast antioksidacijskog kapaciteta pri temperaturama zagrijavanja je, iako pokazuje sličan trend kao i DMU-a oblice i istarske bjelice, značajno viši kod rosulje nego kod drugih sorti. Povećanjem temperature od 25 do 30 °C antioksidacijski kapacitet poraste za više od 7 %, zatim zbog povećane aktivnosti peroksidaze i polifenoloksidaze dolazi do blagog pada pri 35 °C te ponovno značajno raste pri 40 °C. Pretpostavljamo da bi produženo vrijeme tijesta na povišenim temperaturama koje uzrokuju povećanu aktivnost  $\beta$ -glukozidaze moglo biti glavni razlog dobivenih viših vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u uljima iz rosulje proizvedenim uz zagrijavanje tijesta.

U Tablici 3 prikazani su podaci statističke obrade. Rezultati ukazuju na to kako najveći utjecaj na antioksidacijski kapacitet ima sorta masline pa temperatura UTT-a te na kraju interakcija ovih dvaju parametara.

**Tablica 3.** Statistička značajnost sorte sirovine i temperature UTT-a na antioksidacijski kapacitet DMU-a mjereno pomoću UV-Vis spektrofotometra

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	P-vrijednost	F-kritična vrijednost
<b>Temperatura UTT-a</b>	26,14	<0,05	2,16
<b>Sorta</b>	485,00	<0,05	2,67
<b>Interakcija</b>	13,77	<0,05	1,68

#### **4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA POMOĆU EPR SPEKTROMETRIJE**

U Tablici 4 prikazani su podaci antioksidacijskog kapaciteta DMU-a mjereni pomoću EPR spektrometra. Dobiveni podaci pokazuju nešto niže vrijednosti u odnosu na vrijednosti mjerene UV-Vis spektrofotometrom. Razlog tome je što se prilikom razvoja same metode vodilo računa o tome da vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kontrolnih uzoraka budu oko 50 %. To je napravljeno prilagođavanjem volumena otopine DPPH i količine ulja u reakcijskoj smjesi a time je omogućena vidljivost promjene antioksidacijskog kapaciteta među uzorcima. Raspon dobivenih vrijednosti iznosi od 44,52 % do 76,08 %, s iznimkom uzorka DMU-a rosulje tretiranog na 40 °C koji se izdvaja s visokom vrijednosti od 95,40 %. Promatrajući rezultate svih toplinskih tretmana DMU rosulje pokazuje najveće, a levantinke najmanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta što je u skladu s podacima dobivenih mjerenjem na UV-Vis spektrofotometru. Do neslaganja dolazi prilikom usporedbe rezultata DMU-a oblice i istarske bjelice gdje potonja pokazuje nešto veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.



**Tablica 4.** Antioksidacijski kapacitet (prikazan kao % redukcije DPPH radikala) DMU-a proizvedenih od četiri autohtone sorte masline i pri različitim temperaturama UTT-a mjeren pomoću EPR spektrometra

Temperatura tretmana (°C)	Antioksidacijski kapacitet (% red DPPH')			
	OBLICA	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	LEVANTINKA
<b>Kontrola</b>	65,68±1,87	76,08±0,94	60,03±0,25	51,04±0,40
<b>15</b>	57,72±1,54	69,64±1,05	58,43±0,94	50,00±0,42
<b>20</b>	63,22±1,16	70,55±0,33	62,64±1,93	51,75±1,21
<b>25</b>	55,69±2,14	70,79±1,01	59,83±1,01	44,52±0,35
<b>30</b>	53,83±1,06	73,28±0,48	60,71±1,52	52,74±0,66
<b>35</b>	50,55±0,84	62,87±1,14	58,89±0,92	48,85±1,54
<b>40</b>	47,05±1,05	95,40±0,35	59,52±0,62	52,53±0,68

Promatraju li se rezultati kontrolnih uzoraka najveći antioksidacijski kapacitet pokazuje DMU rosulje, zatim oblice, istarske bjelice i levantinke što je u potpunosti u skladu s rezultatima mjerenim pomoću UV-Vis spektrofotometra. Kao i kod mjerenja spektrofotometrom, DMU rosulje pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet pri temperaturi od 40 °C. Slijede ih uzorci tretirani od 20 °C do 30 °C. DMU istarske bjelice ponovno pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet pri 20 i 30 °C, a DMU oblice na 20 °C što je u skladu s mjerenjima UV-Vis spektrofotometra. Razlika nastaje promatra li se sljedeća najveća vrijednost koja ovdje odgovara DMU-u oblice tretirane pri 15 °C. DMU levantinke najveće vrijednosti pokazuje na uzorcima tretiranim na 30 °C i 40 °C što je ponovno u višem temperaturnom rangu u odnosu na uzorke istarske bjelice, oblice i rosulje ukoliko se zanemari dulje tretirani uzorak rosulje (40 °C). Iako nema potpunog podudaranja rezultata mjerenih UV-Vis spektrofotometrom i EPR spektrometrom, širim pregledom dobivenih vrijednosti može se vidjeti kako je temeljni trend isti. Povećanom antioksidacijskom kapacitetu DMU-a proizvedenog od maslina sorti istarske bjelice, oblice i rosulje doprinose niže temperature UTT-a (od 30 °C na niže) kao i proizvodnja bez UTT-a. Suprotno tome, DMU levantinke je bogatije antioksidativnim komponentama ukoliko je maslinovo tijesto prije miješenja tretirano pri višim temperaturama (30 °C i 40 °C).

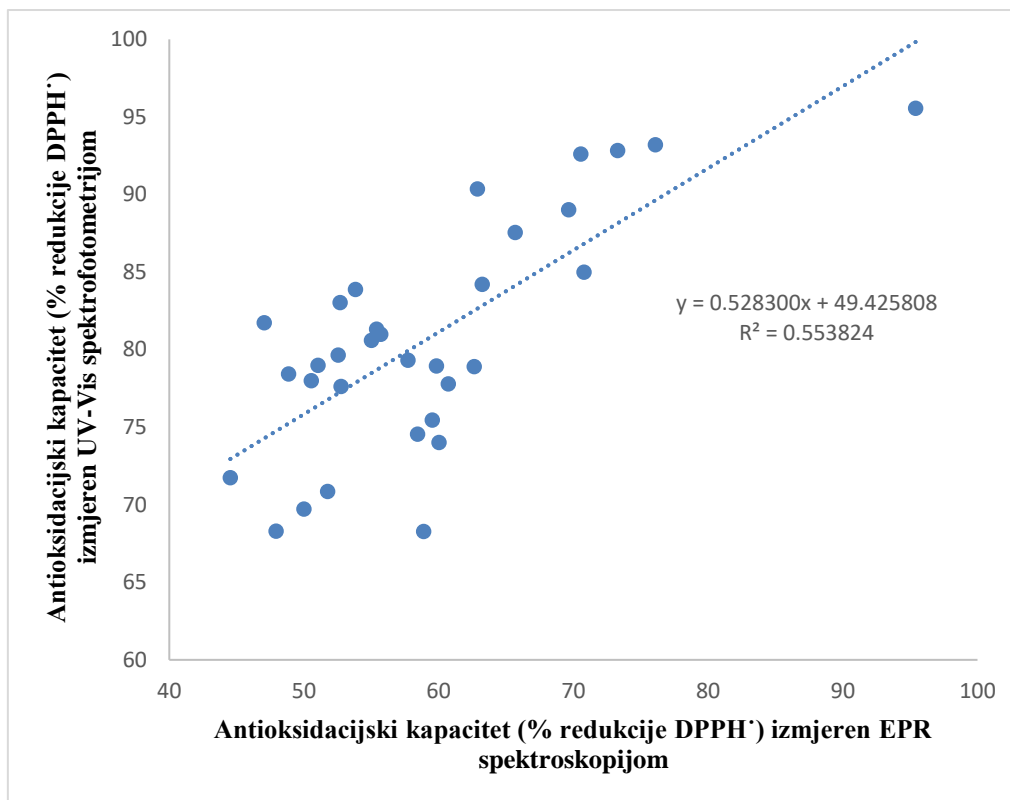
**Tablica 5.** Statistička značajnost sorte sirovine i temperature UTT-a na antioksidacijski kapacitet DMU-a mjeren pomoću EPR spektrometra

<b>Izvor varijabilnosti</b>	<b>F-vrijednost</b>	<b>P-vrijednost</b>	<b>F-kritična vrijednost</b>
<b>Temperatura UTT-a</b>	92,55	<0,05	2,27
<b>Sorta</b>	1784,19	<0,05	2,77
<b>Interakcija</b>	100,19	<0,05	1,79

Tablica 5 s podacima statističke značajnosti potvrđuje kako najvažniju ulogu za vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ima sorta, ali i da interakcija sorte masline i temperature UTT-a ima veći utjecaj od same temperature UTT-a.

#### **4.3. USPOREDBA UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJE I EPR SPEKTROMETRIJE**

Kako bi se odredilo u kojoj su mjeri vrijednosti izmjerene pomoću EPR spektrometra povezane s onima izmjerenim UV-Vis spektrofotometrom izračunat je koeficijent korelacije koji iznosi 0,75. Grafički prikaz korelacije rezultata vidljiv je na Slici 9. Prema Udovičić i sur. (2007) ova vrijednost ukazuje na vrlo dobru povezanost među varijablama, odnosno među vrijednostima dobivenim primjenom dviju metoda. Unatoč dobroj povezanosti, vidljive su razlike između dobivenih rezultata koje mogu biti posljedica greške pri mjerenju. Ukoliko se isključi ljudski faktor promatra se sama pouzdanost ovih dviju tehnika. Prema istraživanju Sanna i sur. (2011) u kojem su proveli usporedbu rezultata "gašenja" DPPH radikala mjerenih UV-Vis spektrofotometrom i EPR spektrometrom pokazalo se kako ove dvije tehnike nemaju jednaku razinu osjetljivosti. EPR je pouzdanija i osjetljivija tehnika zbog odsutnosti utjecaja prirode antioksidanasa i njihovih razgradnih produkata na same rezultate mjerenja te je pouzdan alat pri analizi raznih tipova uzoraka. S obzirom na razlike dobivenih rezultata dobro je uvijek, ukoliko postoji mogućnost, provesti paralelna mjerenja pomoću obje tehnike u svrhu dobivanja preciznijih rezultata.

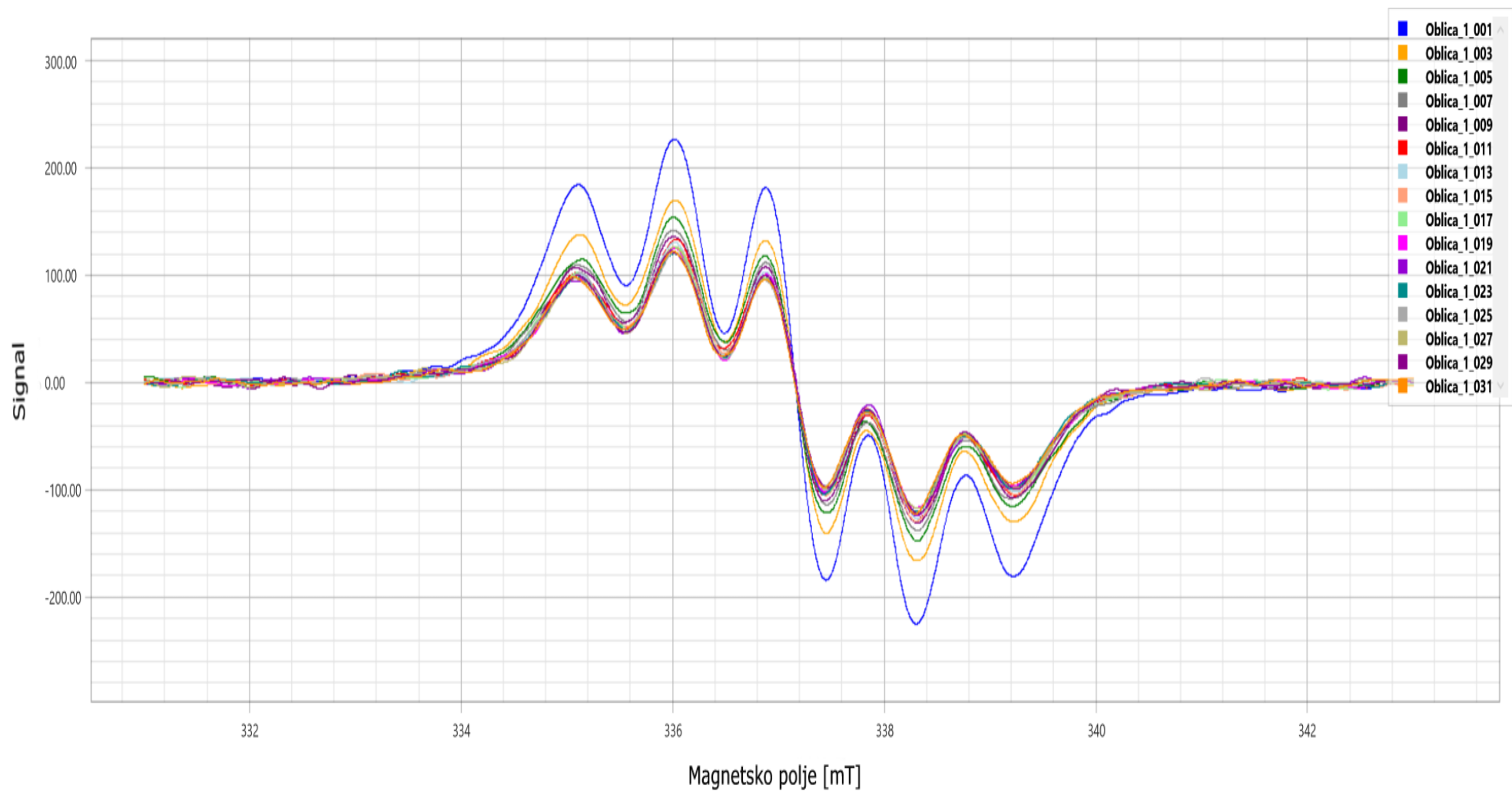


Koeficijent korelacije  $r = 0,75$

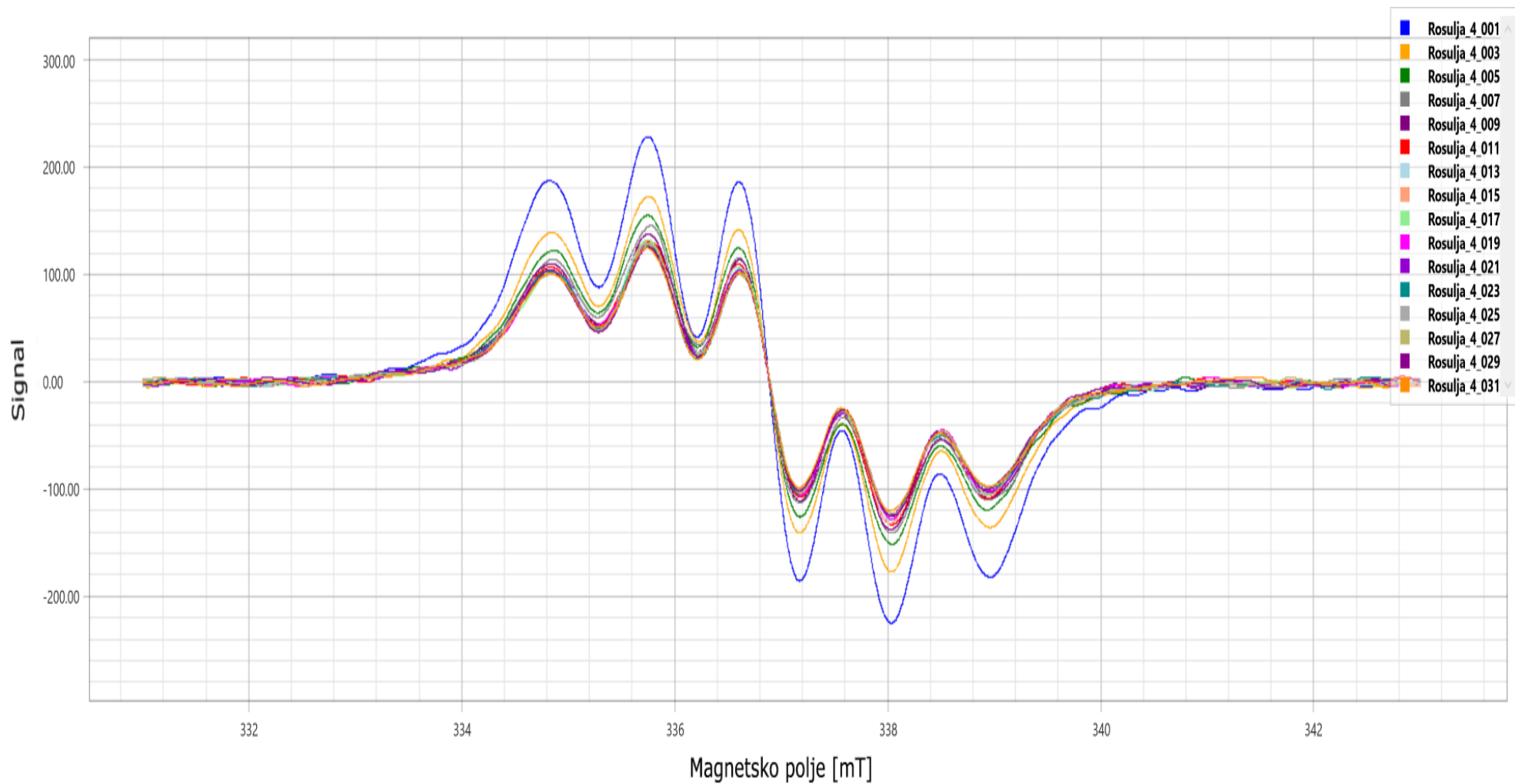
Slika 9. Grafički prikaz korelacije između vrijednosti antioksidacijskih kapaciteta mjerenih UV-Vis spektrofotometrom i EPR spektrometrom

#### 4.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI POMOĆU EPR SPEKTROMETRIJE

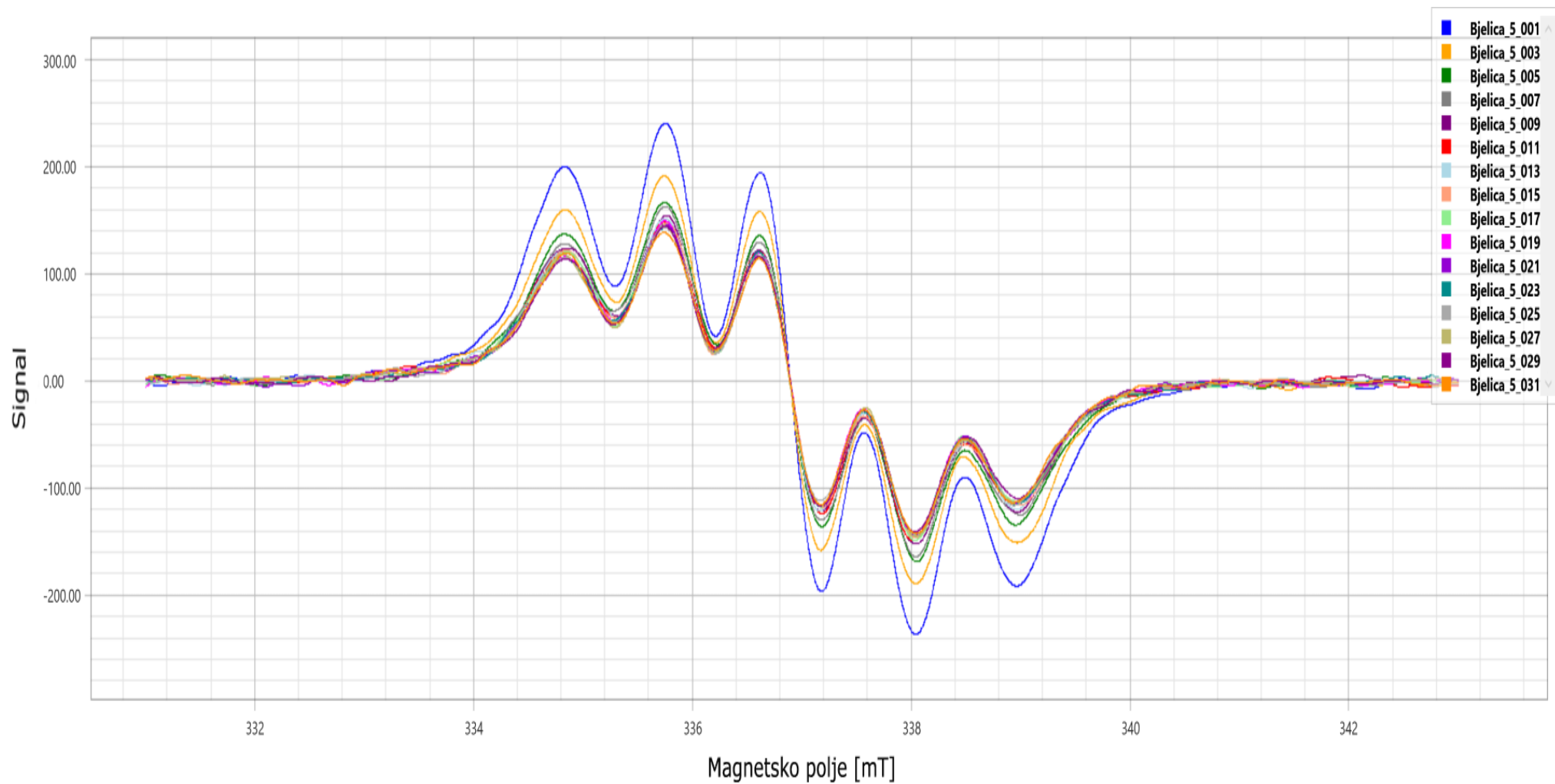
EPR spektrometri mjere apsorpciju elektromagnetskog zračenja od strane ispitivanog uzorka. Slike 10 – 13 grafički prikazuju antioksidacijsku aktivnost tijekom 30 minuta reakcije za svaku sortu konvencionalnih uzoraka DMU-a. Ovakav specifičan oblik krivulje je dobiven jer je apsorpcijski signal preveden u prvu derivaciju očitanoog signala. Mjerenje je provedeno za svaku minutu, no radi preglednosti samih slika krivulje na grafovima odgovaraju izmjerenim vrijednostima signala za svaku drugu minutu reakcije.



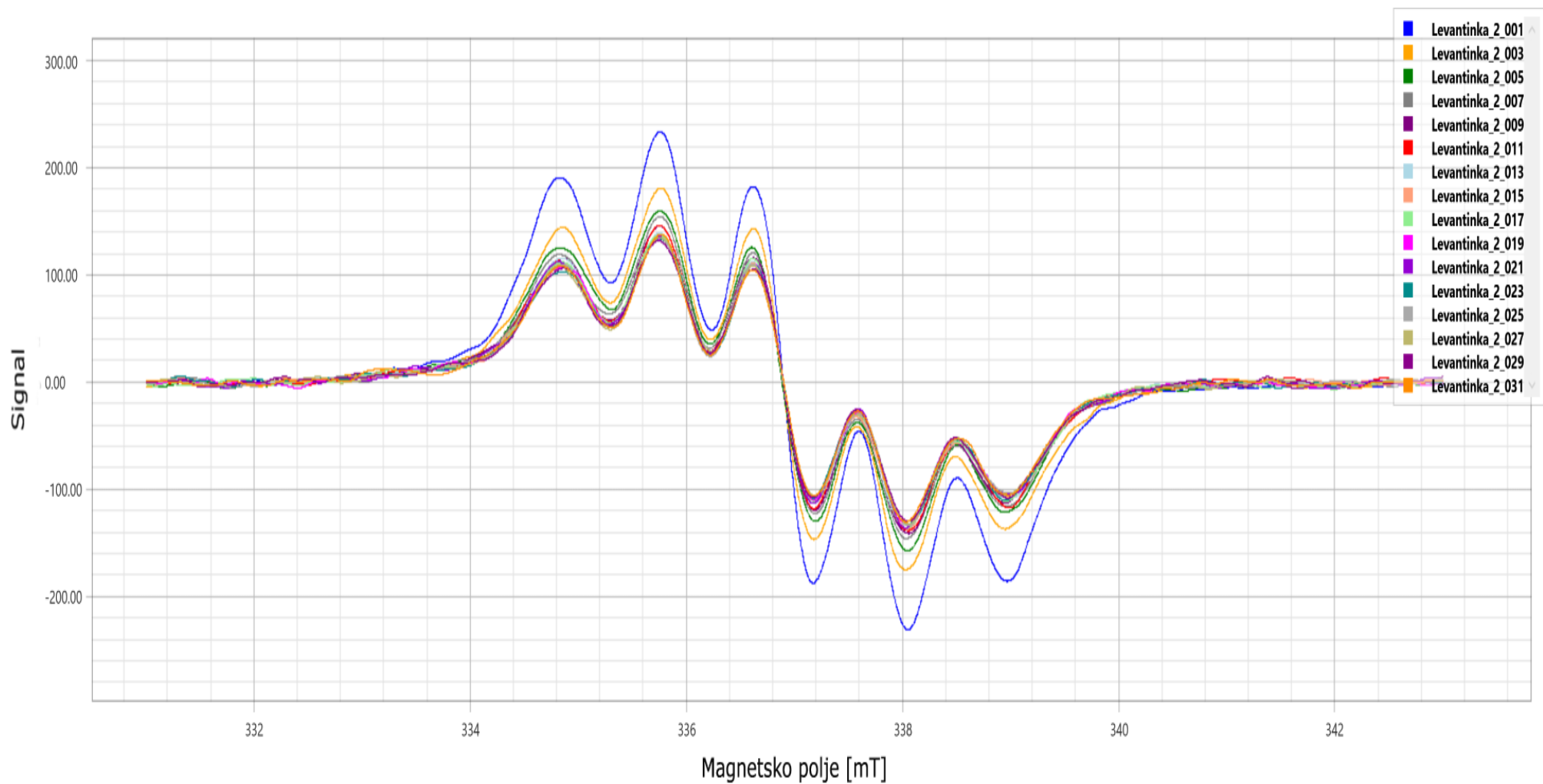
Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU-a oblice o jakosti magnetskog polja u vremenskom periodu od 30 minuta mjeren pomoću EPR spektrometra



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU-a rosulje o jakosti magnetskog polja u vremenskom periodu od 30 minuta mjeren pomoću EPR spektrometra



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU-a istarske bjelice o jakosti magnetskog polja u vremenskom periodu od 30 minuta mjeren pomoću EPR spektrometra

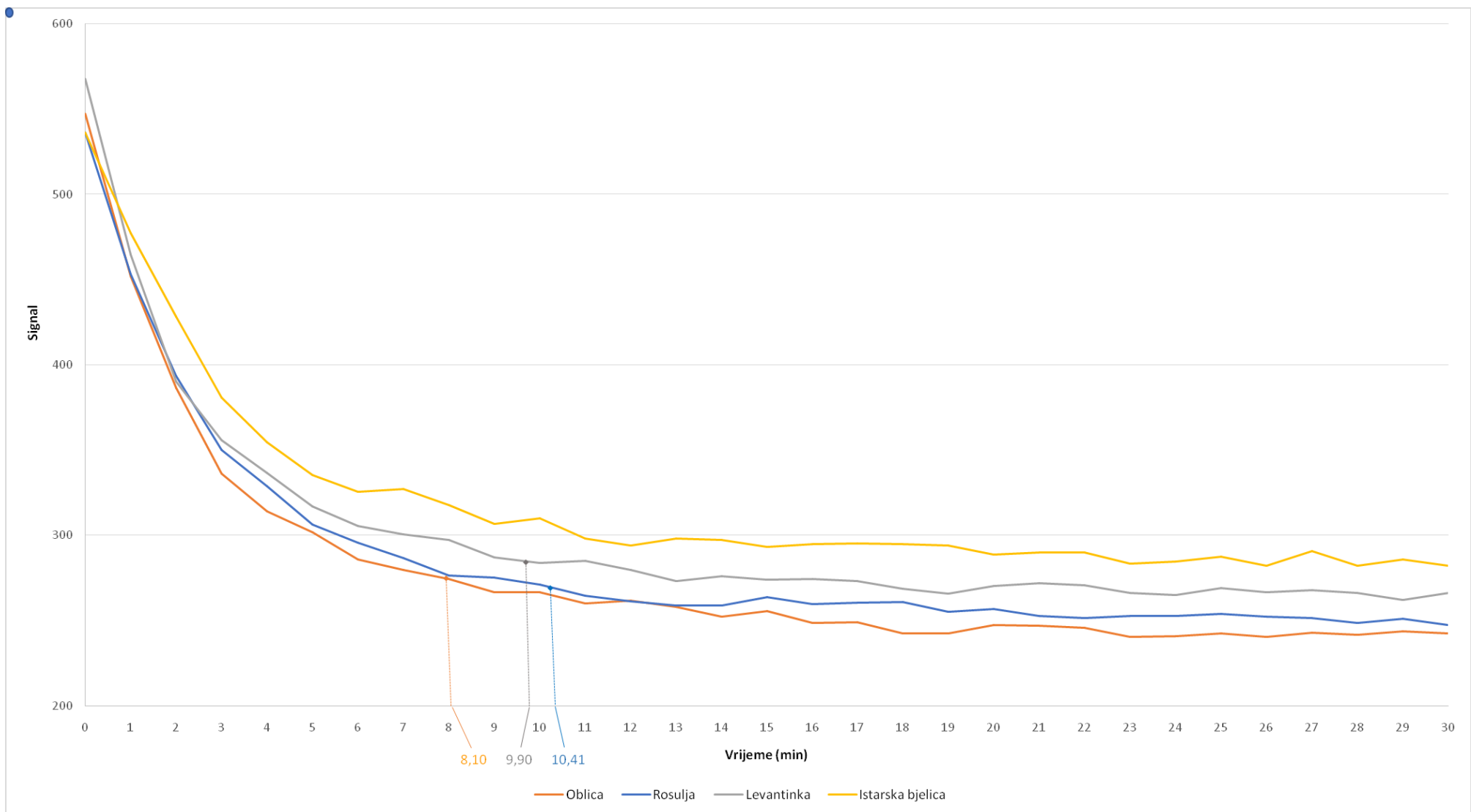


Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU-a levantinke o jakosti magnetskog polja u vremenskom periodu od 30 minuta mjeren pomoću EPR spektrometra

Vidljivo je kako se maksimumi pikova s vremenom smanjuju te je tako najveći maksimum očitao u prvoj minuti reakcije budući da je tada prisutna najveća koncentracija DPPH radikala. Također je vidljivo kako se razmaci između krivulja s vremenom postupno smanjuju te se nakon osme do desete minute reakcije razmaci toliko smanje da dolazi i do preklapanja krivulja. Razlog smanjenja razmaka među krivuljama je to što brzina smanjenja koncentracije DPPH radikala s vremenom opada, a do preklapanja krivulja dolazi u trenutku kada se potroše sve antioksidativne komponente te više nema značajne promjene očitano signala.

Navedeni su rezultati još jasnije prikazani na Slici 14 koja grafički prikazuje ovisnost očitano signala o vremenu za sve 4 sorte konvencionalnih uzoraka DMU-a. U prvih pet minuta reakcije dolazi do naglog, gotovo linearnog pada očitano signala što ukazuje na to da se glavina DPPH radikala "ugasi" pri početnom kontaktu s prisutnim antioksidansima. Od pete do desete minute reakcije nagib krivulje je znatno manji, ali je smanjenje udjela radikala i dalje vidljivo. Nakon desete minute gotovo da i nema smanjenja očitano signala, a nakon petnaeste minute reakcije krivulje zadržavaju približno istu vrijednost očitano signala sve do završetka mjerenja. Prema dobivenim rezultatima do konačne potrošnje antioksidativnih komponenta prisutnih u uzorcima dolazi u periodu od prvih 10 – 15 minuta od početka reakcije. Na ovom su grafu označene i CP50 vrijednosti, odnosno vrijeme potrebno da se početna koncentracija DPPH radikala smanji za 50%. Najmanji CP50 ima DMU oblice (8,10 min). Slijede ga redom DMU-a levantinke (9,90 min) i rosulje (10,41 min). Početna koncentracija DPPH radikala nije se smanjila na 50 % ni nakon 30 minuta reakcije za DMU istarske bjelice što ukazuje na nižu koncentraciju antioksidativnih komponenti u odnosu na konvencionalne uzorke ostalih sorti.

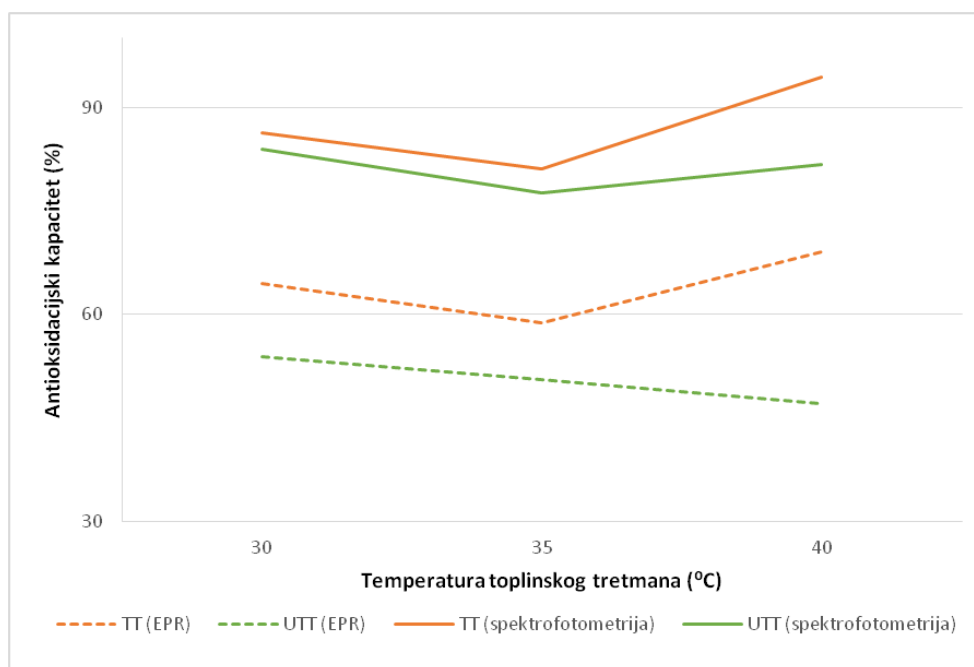




Slika 14. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti u vremenskom periodu od 30 minuta s označenim CP50 vrijednostima konvencionalnih uzoraka DMU-a

#### 4.5. UTJECAJ NAČINA ZAGRIJAVANJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET DMU-A OBLICE

Na Slici 15 vidljiv je grafički prikaz ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta o načinu zagrijavanja pri različitim temperaturama (30 °C, 35 °C i 40 °C) ulja proizvedenih iz sorte oblice. Uzorci zagrijavani u termostatu (prijenos topline konvekcijom) tretirani su toplinskim tretmanom (TT) u trajanju do sat vremena i pokazuju više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pri svim primijenjenim temperaturama. Oni uzorci koji su tretirani TT-om na 40 °C pokazuju najveće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Za razliku od njih, UTT-om tretirani uzorci koji su zagrijavani u vodenoj kupelji (prijenos topline kondukcijom), najveće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pokazuju pri 30 °C. Najmanje vrijednosti pri 35 °C imaju uzorci tretirani TT-om i uzorak tretiran UTT-om mjereno spektrofotometrom. Uzorak tretiran UTT-om mjereno pomoću spektrofotometra pak najmanju vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pokazuje pri primjeni temperature od 40 °C. Ovi su rezultati potvrda ranije postavljene hipoteze kako razlike u antioksidacijskom kapacitetu DMU-a iz sorte rosulja upravo proizlaze iz načina, a samim time i duljine trajanja samog zagrijavanja tijesta.



Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta o temperaturi toplinskog tretmana i različitom načinu tretiranja DMU-a oblice

## 5. ZAKLJUČAK

1. Najznačajniji utjecaj na antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja, odnosno na količinu antioksidanasa prisutnih u uljima ima izbor sorte.
2. Primjena UTT-a također pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja. Ulja sorti oblica i istarska bjelica pokazuju viši antioksidacijski kapacitet pri temperaturama hlađenja (20 °C) dok DMU-a levantinke imaju najveći antioksidacijski kapacitet kod primjene UTT-a pri 40 °C. Razlog tome vjerojatno je razlika u količini i aktivnosti endogenih enzima ploda masline u različitim sortama.
3. Visoki koeficijent korelacije ( $r = 0,75$ ) ukazuje na vrlo dobru povezanost rezultata antioksidacijskog kapaciteta dobivenih primjenom dviju mjernih tehnika.
4. Antioksidacijska aktivnost konvencionalno proizvedenih uzoraka DMU istraživanih sorti pokazuje kako prisutni antioksidansi izrazito brzo reagiraju s prisutnim slobodnim radikalima, unutar prvih 5-10 minuta. Brzina reakcija se nakon tog vremena značajno smanji.
5. Najkraće vrijeme potrebno za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50 % pokazuje konvencionalni uzorak DMU oblice (8,10 min), zatim levantinke (9,90 min) i rosulje (10,41 min). Konvencionalni uzorak DMU-a istarske bjelice nije postigao smanjenje DPPH' za 50 % ni nakon 30 minuta reakcije.
6. Zagrijavanje maslinova tijesta pomoću konvekcije i dulje trajanje toplinskog tretmana (30 min) pri 30, 35 i 40 °C ima povoljniji učinak na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta uzoraka DMU-a oblice u odnosu na zagrijavanje kondukcijom UTT-om. Iz dobivenih se rezultata može zaključiti kako DMU-a rosulje zbog drugačijeg načina zagrijavanja pokazuju više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta nego što bi imala da su tretirana zagrijavanjem kondukcijom u kraćem vremenskom periodu kao uzorci ostale 3 sorte.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 <<https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein>> Pristupljeno 22. kolovoza 2022.

Anonymous 2 <<https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxytyrosol>> Pristupljeno 22. kolovoza 2022.

Anonymous 3 <<https://mccordresearch.com.au/library/phenols/secoiridoids/oleacein/>> Pristupljeno 5. listopada 2022.

Anonymous 4 <<https://sh.wikipedia.org/wiki/Verbaskozid>> Pristupljeno 5. listopada 2022.

Anonymous 5 <<https://www.smacgigworld.com/blog/principle-uv-vis-spectroscopy-.php>> Pristupljeno 26. rujna 2022.

Akash MSH, Rehman K (2020) Essentials of pharmaceutical analysis, Springer Verlag, Singapur, str. 19-55.

Barba FJ, Roohinejad S, Ishikawa K, Leong SY, Bekhit AED, Saraiva JA, i sur. (2020) Electron spin resonance as a tool to monitor the influence of novel processing technologies on food properties. *Trends Food Sci Technol* **100**, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.032>

Bartoszek M, Polak J (2012) An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. *Food Chem* **132**, 2089-2093. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.060>

Boskou D (2015) Olivefruit, table olives, and olive oil bioactive constituents. U: Boskou D (ured.) Olive and olive oil bioactive constituents, AOCS Press, Urbana, str. 1-30.

Capanoglu E, Kamiloglu S, Ozkan G, Apak R (2018) Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. U: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F (ured.) Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications, Wiley, Hoboken, str. 275-285.

Clodoveo ML, Hachicha Hbaieb R, Kotti F, Mugnozza GS, Gargouri M (2014) Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **13**, 135-154. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12054>

- Del Carlo M, Sacchetti G, DiMattia C, Compagnone G, Mastrocola D, Liberatore L, i sur. (2004) Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J Agric Food Chem* **52**, 4072-4079. <https://doi.org/10.1021/jf049806z>
- Fратиани F, Cozzolino R, Martignetti A, Malorni L, d'Acierno A, De Feo V, i sur. (2019) Biochemical composition and antioxidant activity of three extra virgin olive oils from the Irpinia Province, Southern Italy. *Food Sci Nutr* **7**, 3233-3243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1180>
- Galano A, Mazzone G, Alvarez-Diduk R, Marino T, Alvarez-Idaboy JR, Russo N (2016) Foodantioxidants: chemical insights at the molecular level. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**, 335-352. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033206>
- Garcia-Rodriguez R, Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG (2015) Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil. *Food Chem* **171**, 364-369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.009>
- Hachicha Hbaieb R, Kotti F, Garcia-Rodriguez R, Gargouri M, Sanz C, Perez AG (2014) Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chem* **174**, 1-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.033>
- Kalantzakis G, Blekas G, Pegklidou K, Boskou D (2006) Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **108**, 329-335. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500314>
- Kalogeropoulos N, Kaliora AC (2015) Effect of fruit maturity on olive oil phenolic composition and antioxidant capacity. U: Boskou D (ured.) Olive and olive oil bioactive constituents, AOCS Press, Urbana, str. 123-145.
- Klepo T, Benčić Đ (2014) Utjecaj genotipa na kemijski sastav maslinovog ulja. *Glasnik zaštite bilja* **5**, 44-53.
- Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH d.o.o., Poreč, str. 18-27.
- Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Majetić Germek V (2012) Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti buža, istarska bjelica,

leccino i rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, 172-178. <https://hrcak.srce.hr/clanak/139924>

Koprivnjak O, Kriško A, Valić S, Carić D, Krapac M, Poljuha D (2016) Antioxidants, radical-scavenging and protein carbonylation inhibition capacity of six monocultivar virgin olive oils in Istria (Croatia). *Acta Aliment* **45**, 427-433. <https://doi.org/10.1556/aalim.2015.0018>

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* **46**, 244-282. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>

Lou-Bonafonte JM, Martínez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos LV, Sanchez-Marco J, i sur. (2018) Current insights into the biological action of squalene. *Mol Nutr Food Res* **62**, 1-59. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800136>

Lund A, Shiotani M, Shimada S (2011) Principles and applications of ESR spectroscopy, Springer, Dordrecht/Heidelberg/London/New York, str. 3-27.

Milić Komić SZ (2018) Redoks svojstva slobodnih aminokiselina i indola kao model jedinjenja u Fentonovom sistemu (doktorski rad), Kemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

Montedoro G, Baldioli M, Selvaggini R, Begliomini AL, Taticchi A (2002) Relationships between phenolic composition of olive fruit and live oil: the importance of the endogenous enzymes. *Acta Hort* **586**, 551-556. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.115>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *Int J Mol Sci* **22**, 1-30. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, Calorini R (2019) Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea L.*, as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. *Antioxidants* **8**, 1-26. <https://doi.org/10.3390/antiox8120578>

Neugebauer P (2010) Développement d'un spectromètre de Résonance Paramagnétique Electronique Haute Fréquence / Champ Magnétique Intense Hétérodyne Fonctionnant Autour de 285 GHz (doktorski rad), Laboratoire National des Champs Magnétiques Intenses, CNRS, Grenoble.

Nutrizio M, Maltar-Strmečki N, Chemat F, Duić B, Režek Jambrak A (2021) High – voltage electrical discharges in green extractions of bioactives from oregano leaves (*Origanum vulgare*

L.) using water and ethanol as green solvents assessed by theoretical and experimental procedures. *Food Eng Rev* **13**, 161-174. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09231-2>

Pavlić K (2021) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana i ultrazvuka na aktivnost enzima ploda masline (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Peres F, Martins LL, Ferreira-Dias S (2015) Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 3104-3126. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1092107>

Ramirez E, Medina E, Brenes M, Romero C (2014) Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *J Agric Food Chem* **62**, 9569-9575. <https://doi.org/10.1021/jf5027982>

Ray NB, Lam NT, Luc R, Bonvino NP, Karagiannis TC (2015) Cellulal and molecular effects of bioactive phenolic compounds in olives and olive oil. U: Boskou D (ured.) Olive and olive oil bioactive constituents, AOCS Press, Urbana, str. 53-91.

Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M (2018) Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int* **105**, 654-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>

Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG (2009) Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J Agric Food Chem* **57**, 7983-7988. <https://doi.org/10.1021/jf901293c>

Sadeer NB, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF (2020) The versatility of antioxidant assays in food science and safety – chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants* **9**, 1-39. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

Sahu ID, McCarrick RM, Lorigan GA (2013) Use of Electron Paramagnetic Resonance To Solve Biochemical Problems. *Biochemistry* **52**, 5967-5984. <https://doi.org/10.1021/bi400834a>

Sanna D, Delogu G, Mulas M, Schirra M, Fadda A (2011) Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: An EPR and UV-Vis study. *Food Anal Methods* **5**, 759-766. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9306-1>

Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757-781. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

Sun Y, Yang C, Tsao R (2018) Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays. U: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F (ured.) Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications, Wiley, Hoboken, str. 1-15.

Šarolić M, Gugić M, Friganović E, Tuberoso CIG, Jerković I (2015) Phytochemicals and other characteristics of Croatian monovarietal extra virgin olive oils from oblica, lastovka and levantinka varieties. *Molecules* **20**, 4395-4409. <https://doi.org/10.3390/molecules20034395>

Termentzi A, Halabalaki M, Skaltsounis AL (2015) From drupes to olive oil: an exploration of olive key metabolites. U: Boskou D (ured.) Olive and olive oil bioactive constituents, AOCS Press, Urbana, str. 147-177.

Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F (2013) Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int* **2013**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/251754>

Torić J, Brozovic A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, KarkovićMarković A, Benčić Đ, i sur. (2020) Biological activity of phenolic compounds in extra virgin olive oils through their phenolic profile and their combination of anticancer drugs observed in human cervical carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Antioxidants* **9**, 1-15. <https://doi.org/10.3390/antiox9050453>

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zule L, Petrovečki M (2007) Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochem Med (Zagreb)* **17**, 10-15.

Vojnić Kortmiš M (2019) Osjetljivost lijevanoga natrijeva kalcijeva silikatnoga stakla na male doze ionizirajućega zračenja u retrospektivnoj dozimetriji primjenom spektroskopije elektronske spinske rezonancije (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Yalcin S, Schreiner M (2017) Stabilities of tocopherols and phenolic compounds in virgin olive oil during thermal oxidation. *J Food Sci Technol* **55**, 244-251. <https://doi.org/10.1007%2Fs13197-017-2929-5>

Žanetić M, Gugić M (2005) Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **11**, 31-41.



Žanetić M, Gugić M (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **12**, 159-173.

Žanetić M, Škevin D, Vitanović E, Jukić Špika M, Perica S (2011) Ispitivanje fenolnih spojeva i senzorski profil dalmatinskih djevičanskih maslinovih ulja. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **17**, 19-30.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Ana Pejić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis