

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Mateo Radić

**SASTAV TOKOFEROLA
DJEVIČANSKIH MASLINOVIH
ULJA PROIZVEDENIH UZ
UBRZANI TOPLINSKI TRETMAN**

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, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



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.

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

SASTAV TOKOFEROLA DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA PROIZVEDENIH UZ UBRZANI TOPLINSKI TRETMAN

Mateo Radić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058220789

Sažetak:

Djevičansko maslinovo ulje odlikuju specifična biološka, nutritivna i senzorska svojstva koja proizlaze iz karakterističnog kemijskog sastava. Antioksidansi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju značajno doprinose oksidacijskoj stabilnosti ulja. Faze proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja potrebno je optimirati kako bi se očuvali prisutni antioksidansi. Cilj ovoga rada je bio utvrditi utjecaj sorte i primjene ubrzanog toplinskog tretmana (kao predtretmana miješenju) na koncentraciju tokoferola djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih od maslina autohtonih hrvatskih sorti (Oblica, Rosulja, Istarska bjelica, Levantinka). Tijesto masline, dobiveno mljevenjem i drobljenjem, podvrgnuto je postupku brzog hlađenja ili zagrijavanja na određene temperature (15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C). Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti utvrđena je koncentracija tokoferola u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja (73-273 mg/kg, koncentracija α -tokoferola). Istraživanje je pokazalo da sorta i način proizvodnje ulja imaju značajan utjecaj na koncentraciju tokoferola djevičanskih maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje, tokoferoli, ubrzani toplinski tretman, autohtone hrvatske sorte

Rad sadrži: 42 stranice, 1 sliku, 8 tablica, 128 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: Katarina Filipan, mag. ing

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (mentor)
3. prof. dr. sc. Sandra Balbino (član)*
4. doc. dr. sc. Marko Obranović (zamjenski član)

Datum obrane: 24. svibnja 2023.

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

TOCOPHEROL COMPOSITION OF VIRGIN OLIVE OILS PRODUCED WITH FLASH THERMAL TREATMENT

Mateo Radić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058220789

Abstract:

Virgin olive oil is characterized by specific biological, nutritional and sensorial properties resulting from its characteristic chemical composition. Antioxidants present in virgin olive oil are responsible for the long shelf life of oil. Production stages of virgin olive oil need to be optimized in order to preserve present antioxidants. The aim of this work was to determine influence of variety and flash thermal treatment (pre-treatment to malaxation) on the tocopherol content of virgin olive oils produced from autochthonous Croatian varieties (Oblica, Rosulja, Istarska bjelica, Levantinka). Olive paste, obtained by milling and crushing, is subjected to process of rapid cooling or heating to certain temperatures (15, 20, 25, 30, 35, 40 °C). Using high-performance liquid chromatography, concentration of tocopherols in samples of virgin olive oil was determined (73-273 mg/kg, for α -tocopherol). Research showed that variety and method of production have significant influence on tocopherol concentration of virgin olive oils made from autochthonous Croatian cultivars.

Keywords: virgin olive oil, tocopherols, flash thermal treatment, autochthonous Croatian cultivars

Thesis contains: 42 pages, 1 figure, 8 tables, 128 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. Sandra, Balbino, PhD, Full professor (member)
4. Marko, Obranović, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: May 24th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. AUTOHTONE SORTE MASLINA U REPUBLICI HRVATSKOJ	3
2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	4
2.3. KEMIJSKI SASTAV I STABILNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	9
2.4. HPLC.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2. METODE	16
3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman.....	16
3.2.2. Određivanje tokoferola.....	17
3.3. OBRADA PODATAKA	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje je biljno ulje dobiveno mehaničkim postupcima iz zrelih i zdravih plodova maslina. Važne faze procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja su svakako: mljevenje i drobljenje, miješenje i izdvajanje ulja. Mljevenje, drobljenje i miješenje su faze u kojima se priprema maslinovo tijesto, odnosno poboljšavaju uvjeti za izdvajanje ulja. Izdvajanje ulja je faza u kojoj se vrši odvajanje ulja od ostalih komponenata iz maslinovog tijesta. Svaka od faza proizvodnje uključuje upotrebu određenih metoda, opreme i proizvodnih parametara. Cilj proizvodnog procesa je dobiti ulje što bolje kvalitete. Glavni parametri kvalitete djevičanskog maslinovog ulja se odnose na senzorska svojstva i prehrambenu vrijednost.

Prehrambena vrijednost i senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja proizlaze iz specifičnog kemijskog sastava. Djevičansko maslinovo ulje ima i blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje zahvaljujući karakterističnom sastavu masnih kiselina i prisutnim antioksidacijskim tvarima. Djevičansko maslinovo ulje sadrži antioksidanse poput fenola, tokoferola i klorofila. Koncentracije ovih komponenata ovise o nizu čimbenika koje je potrebno optimirati kako bi se što bolje očuvale. Tokoferoli djeluju protuupalno i inhibiraju procese koji dovode do raznih nepoželjnih stanja u organizmu. Iako je poznato da su fenolne tvari dominantni antioksidansi djevičanskog maslinovog ulja, značajnu ulogu u očuvanju kvalitete ulja imaju i tokoferoli.

Dosta napora se ulaže u istraživanje i optimiranje parametara uzgoja maslina i proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja kako bi se proizvelo ulje što bolje kvalitete. Eksperimentira se i s uvođenjem različitih metoda kojima se tretira tijesto maslina nakon mljevenja i drobljenja kako bi se dobilo ulje s poželjnim senzorskim i nutritivnim svojstvima. Neke od metoda uključuju primjenu ultrazvuka, mikrovalova, pulsirajućeg električnog polja i ubrzanog toplinskog tretmana. Cilj ovoga rada je bio utvrditi utjecaj sorte i ubrzanog toplinskog tretmana maslinovog tijesta na koncentraciju tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima iz četiri hrvatske autohtone sorte.

2. TEORIJSKI DIO

Djevičansko maslinovo ulje se dobiva ekstrakcijom ulja iz maslina mehaničkim postupcima pri određenoj temperaturi te se time razlikuje od procesa koji se koriste za većinu ulja dobivenih od sjemenki uljarica. Cilj procesa je ekstrahirati kapljice ulja iz stanica pulpe masline, a dobiveno ulje je, zbog primjene isključivo mehaničkih postupaka svojstvenog sastava i specifičnih senzorskih svojstava. Takvo ulje se može konzumirati izravno bez daljnjeg rafiniranja i procesiranja. Njegova biološka, nutritivna i zdravstvena dobrobit znanstveno je i stručno priznata u cijelom svijetu (Šarolić i sur., 2014).

Codex Alimentarius definira djevičanska ulja kao ulja dobivena mehaničkim postupcima (npr. prešanjem) bez mijenjanja prirode ulja. Takva ulja mogu biti pročišćena taloženjem, ispiranjem vodom, filtracijom ili centrifugiranjem (CX 210, 1999). Djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno od plodova masline korištenjem isključivo mehaničkih ili drugih fizikalnih postupaka pod optimalnim uvjetima koji ne uzrokuju promjenu sastojaka ulja. Pojam također podrazumijeva da je ulje obrađeno primjenom pranja, dekantacije, centrifugiranja ili filtriranja, pri čemu se isključuju ulja dobivena upotrebom otapala (Uredba EU 1308, 2013). Određivanjem fizikalnih, kemijskih i senzorskih svojstava, utvrđuju se parametri za svrstavanje ulja u pojedinu kategoriju (Delegirana uredba Komisije EU 2022/2014, 2022).

Epidemiološke studije dale su temelje za veliki interes pokazan za djevičansko maslinovo ulje kao funkcionalnu hranu. Smatra se da djevičansko maslinovo ulje ne samo da donosi hranjive tvari u prehranu, nego ima i blagotvoran utjecaj na zdravlje (Stark i Madar, 2002). Djevičansko maslinovo ulje je ključna komponenta prisutna u prehrani (osobito na području Mediterana), a njegovo pozitivno djelovanje na zdravlje potvrđeno je tek u periodu od posljednjih nekoliko desetljeća. Jednostruko nezasićene masne kiseline i antioksidansi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju odgovorni su za njegove zaštitne učinke protiv raznih bolesti, uključujući koronarnu bolest srca, različite vrste raka i kognitivne poremećaje povezane sa starenjem (Serra-Majem i sur., 2003). Mediteranska prehrana, koja uključuje djevičansko maslinovo ulje, je povezana s nižim rizikom obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti u raznim studijama. Različite komponente djevičanskog maslinovog ulja, posebice fenolni spojevi, igraju ključnu ulogu u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti. Princip djelovanja se temelji na učinkovitom snižavanju razine kolesterola čime se ciljaju upalni faktori povezani s kardiovaskularnim oboljenjima. Posljednjih godina uočen je sve veći trend uvrštavanja

djevičanskog maslinovog ulja u prehranu s ciljem smanjenja rizika obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti (Suvarna i Sharma, 2021). Djevičansko maslinovo ulje pokazalo se uspješnim i kao prevencija od pojave pojedinih tumora kao što su tumor prostate, maternice, debelog crijeva i dojke. Zaštitna svojstva djevičanskog maslinovog ulja proizlaze od prirodnih antioksidansa te balansirano sastava masnih kiselina. Pretpostavlja se da spojevi kao što su flavonoidi, fenolni spojevi i klorofili, koji su sastavni dio djevičanskog maslinovog ulja, inhibiraju pojedine kancerogene spojeve. Osim toga, djevičansko maslinovo ulje tonificira i štiti epidermu zbog antioksidacijskog djelovanja vitamina E prisutnog u ulju (Žanetić i Gugić, 2006).

2.1. AUTOHTONE SORTE MASLINA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Stoljećima se ljudi na jadranskom području bave uzgojem maslina i proizvodnjom djevičanskog maslinovog ulja. Dalmacija i Istra, obalna područja u Hrvatskoj, imaju dugu tradiciju uzgoja maslina. Duž jadranske obale i na hrvatskim otocima se nalazi preko 6 milijuna stabala maslina, a većinu čine autohtone sorte maslina. Neka od ovih stabala su tek posađena, dok su druga stara i napuštena. Od ukupnog broja stabala maslina preko 4,5 milijuna je u punoj rodности (Žanetić i sur., 2010). U Hrvatskoj se prvih godina dvadesetog stoljeća proizvodilo oko 2500 tona maslinovog ulja godišnje (Koprivnjak i sur., 2002). Nešto aktualniji podaci iz Državnog zavoda za statistiku govore da je u 2017. godini u Republici Hrvatskoj proizvedeno 28947 tona maslina. Iste godine je proizvedeno 37463 hL maslinovog ulja (Ministarstvo poljoprivrede RH, 2017). Ulja proizvedena od jedne sorte su značajna u očuvanju raznolikosti autohtonih kultivara, imaju povećanu tržišnu vrijednost te predstavljaju značajan doprinos turizmu i lokalnoj gastronomiji (Brkić Bubola i sur., 2012).

Najzastupljenija sorta maslina u hrvatskim maslinicima je Oblica koja čini oko 80 % svih stabala maslina. Ime joj dolazi od okruglog oblika ploda, a listovi su tamnozeleno boje. Boja ploda se mijenja sazrijevanjem od svijetlozelene preko ljubičaste do tamno ljubičaste. Sjeme je izduženo elipsoidnog oblika. Oblica se svrstava u uljarske sorte s udjelom ulja od 21 %. Može se koristiti i kao stolna sorta zbog relativno velikih dimenzija ploda čija je masa oko 5 grama. Oblica je otporna na sušu, vjetrove i niske temperature (Zeiner i sur., 2010).

Levantinku odlikuje bujna, zaobljena krošnja i glatko drvo. Plodovi Levantinke su srednje veličine, eliptičnog oblika i rastu u grozdovima. Masa ploda se kreće oko 4,5 grama i sadrži oko 20 % ulja (Žanetić i sur., 2021).

Na istarskom području u starim nasadima zastupljena je sorta Rosulja s oko 5,7 %. Rosulja ima veliki broj sinonima kao što su: Rosinjola, Rozinjola, Rušinjola, Rovinjka itd. Rosinjola je sorta bujnog rasta i okrugle guste krošnje. Plodovi se pojavljuju u grozdovima na grančicama. Masa ploda Rosulje iznosi oko 2,5 grama (Godena i sur., 2009).

Istarska bjelica je porijeklom talijanska sorta masline koja se od 1929. do danas proširila po cijeloj Istri (Šindrak i sur., 2007). Ona je otporna na vjetar i niske temperature, te dozrijeva sredinom ili krajem studenoga. Randman ulja Istarske bjelice je oko 24 %, a ulje je prepoznatljivo po istančanoj gorčini i pikantnosti (Puljić, 2022).

2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Postupak obrade masline kao primarne uljarice uključuje dobivanje dviju faza, a to su kruta faza (komina) i tekuća faza koju čine vegetabilna voda i ulje. Ovaj proces započinje s cijelim, zdravim i čistim plodovima masline čija se struktura mljevenjem i drobljenjem narušava te se u postupku miješenja maslinovo tijesto priprema za izdvajanje optimalnog volumena ulja. Mljevenje, drobljenje i miješenje su važne faze proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja kojima je glavni cilj omogućiti lakše oslobađanje ulja iz stanica. Iz dobivenog tijesta se prešanjem, centrifugalnom ekstrakcijom ili procjeđivanjem odvajaju tekuća i kruta faza. Na kraju se tekuća faza razdvaja na vegetabilnu vodu i ulje dekantiranjem ili centrifugalnom separacijom (vertikalni centrifugalni separator). Postupak proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja završava pravilnim i adekvatnim skladištenjem konačnog proizvoda (Petrakis, 2006).

Zrelost plodova je važan faktor koji treba uzeti u obzir kod branja maslina za proizvodnju ulja. Jedan od pokazatelja zrelosti je udio nakupljenog ulja u plodovima maslina. Sazrijevanjem masline raste postotak ulja u plodu, ali udio ulja u suhoj tvari doseže maksimalnu vrijednost i ostaje konstantan jer biosinteza triglicerida prestaje u određenom trenutku procesa zrenja. Masline se tradicionalno beru kada su plodovi zeleno-žute ili crno-ljubičaste boje. Budući da svi plodovi ne sazrijevaju istodobno, berbu je potrebno provesti kada je većina plodova u

optimalnoj zrelosti. Čimbenici kao što su vremenski uvjeti, dostupnost radne snage i dostupnost pogona za obradu mogu utjecati na vrijeme berbe. Optimalno vrijeme berbe maslina je prije prirodnog opadanja plodova, kada je udio ulja u maslinama visok. Vrijeme početka berbe se može procijeniti prema boji kožice ploda kod sorti s normalnim dozrijevanjem. Metoda berbe se odabire ovisno o veličini i obliku stabla, terenu i tehnikama uzgoja, no većina maslina se bere ručno ili uz pomoć uređaja koji tresu stablo masline. Transport i skladištenje maslina su kritične faze za kontrolu temperature i oštećenja plodova. Nepravilnosti u ovim fazama mogu dovesti do nepoželjnih enzimskih reakcija te razvoja plijesni i kvasaca. Poželjno je da se plodovi maslina odmah nakon berbe transportiraju u pogon za preradu kako bi se očuvale sve karakteristike kvalitete plodova koje su imale za vrijeme berbe (Petraakis, 2006; Uceda i sur., 2006).

Tijekom berbe se masline često uprljaju prirodnim nečistoćama kao što su prašina i zemlja. Uz masline u pogon dolaze i lišće, grančice i kamenčići koji mogu negativno utjecati na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja i sigurnost opreme koja se koristi za izdvajanje. Postupak pripreme ploda za izdvajanje započinje odstranjivanjem lišća i pranjem plodova kako bi se uklonile navedene nečistoće. Kada se masline zdrobe s lišćem dolazi do povećanja intenziteta zelene boje ulja, te do pojave senzorskog osjeta karakterističnog za lišće koji nije poželjan, pa je zbog toga ključna faza odstranjivanja lišća (Di Giovacchino i sur., 2002).

Prije procesa izdvajanja ulja potrebno je provesti drobljenje kako bi se razbile stanične strukture koje sadrže ulje. Mljevenje i drobljenje plodova maslina se može provesti u metalnim mlinovima kao što su mlin čekićar, mlin s diskovima i mlin s konusima, ili na kamenim mlinovima. Metalni mlinovi su strojevi koji se sastoje od metalnog dijela koji se okreće velikom brzinom i baca plodove maslina na nepokretnu ili mobilnu metalnu rešetku kako bi se dobilo tijesto masline. Vrsta mlina koji se koristi kao i snaga drobljenja imaju značajan utjecaj na veličinu fragmenata sjemenke, prinos i senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja. Najčešće korišteni mlinovi su mlinovi s fiksnim čekićima i diskovima jer su kompaktni, pristupačni i imaju visok kapacitet. Mlin čekićar se uglavnom koristi u većim pogonima za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja. Ovi mlinovi međutim mogu stvoriti emulziju zbog svog brzog i snažnog djelovanja, također mogu povećati trpkost i gorčinu ulja te uzrokovati trošenje i habanje metalnih komponenata stroja. Pojedini pogoni upravo zbog navedenih nedostataka koriste kamene mlinove kako bi održali tradiciju i poboljšali senzorske kvalitete ulja. No korištenje kamenih mlinova može smanjiti prinos ekstrakcije u usporedbi s metalnim mlinovima. Kamene mlinovi se sastoje od kamene baze s uspravnim mlinskim kamenjem

zatvorenim u metalnom spremniku koji sadrži strugalice i lopatice. Kameni mlinovi su sporiji i njihovom upotrebom manja je mogućnost zagrijavanja tijesta i pojave emulzija, a ekstrakcija ulja je lakša. Ovakvi strojevi su međutim glomazni, skupi, spori i ne mogu kontinuirano raditi. Unatoč činjenici da kamenim mlinovima treba više vremena za mljevenje plodova maslina od modernijih mlinova, oni se još uvijek koriste u južnim dijelovima Francuske, osobito u manjim pogonima (Di Giovacchino, 2013; Veillet i sur., 2009; Vossen, 2007).

Faza miješanja zdrobljenog maslinovog tijesta pri adekvatnim uvjetima zove se miješenje, a predstavlja ključnu fazu u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja. U ovoj fazi se odvija složen biološki proces, pri optimalnim uvjetima, koji je vrlo bitan za kvalitetu i sastav konačnog proizvoda (Gómez-Rico i sur., 2009). Ovaj proces povećava udio slobodnog ulja i pomaže malim kapljicama da se spoje u veće čime se olakšava odvajanje uljne i vodene faze (Leone i sur., 2014). Tijesto masline se tijekom miješenja neprestano i lagano miješa oko 30 minuta, dok je za zrele plodove dovoljno i 20 minuta. Malaksatori su cilindrične bačve od metala s dvostrukim stijenkama i rotirajućim lopaticama u kojima se tijesto maslina miješa 19-20 okretaja u minuti. Kroz dvostruke stijenke cirkulira topla voda. Temperatura tijesta ne bi trebala biti viša od 27 °C kako bi se osigurali optimalni uvjeti za sintezu poželjnih hlapljivih komponenata ulja. Za regulaciju temperature se koriste automatski termostati. Tijekom miješenja mogu se stvoriti lipoproteinske membrane na površini uljnih kapi, a ako je proces miješenja spor mogu se stvoriti veće uljne kapi čime se olakšava odvajanje uljne faze i inhibira stvaranje emulzije. Produljeno miješenje može dovesti do formiranja emulzija koje otežavaju odvajanje ulja. U slučaju da dio ulja ostaje u stanicama ili u koloidnom sustavu maslinovog tijesta, dok je dio vezan u emulziji s vegetabilnom vodom, potrebno je dodati tvari za razbijanje emulzije i omogućiti oslobađanje ulja (Kiritsakis i Sakellaropoulos, 2017). Cilj miješenja u konačnici je olakšati izdvajanje kapljica ulja te smanjiti viskoznosti maslinovog tijesta (Clodoveo i Hbaieb, 2013).

Prešanje je jedna od najstarijih metoda ekstrakcije maslinovog ulja i znatno se razvijala tijekom dugog vremenskog perioda njezine primjene. Na hidrauličkim prešama otvorenog tipa, koje su u primjeni, odvaja se tekuća od krute faze tijesta masline. Preše zatvorenog tipa se više ne koriste zbog visoke otkupne cijene i troškova održavanja. Maslinovo tijesto se nakon miješenja nanosi na naslagane filtarske podloge (filtrirajuće slojnice). Svaki sloj maslinovog tijesta bi trebao biti približno nanesen u sloju debljine 1,25 cm. Ova operacija se provodi zahvaljujući dozatoru koji tijesto iz malaksatora prenosi u adekvatnim količinama na filtrirajuće slojnice. Filtrirajuće slojnice imaju rupu u sredini koja omogućava slaganje slojnica na osovinu

i omogućava izlazak djevičanskog maslinovog ulja i vegetabilne vode. Ovaj sustav jamči očuvanu kvalitetu ulja. Nizak radni satni kapacitet i održavanje filtrirajućih slojnica su osnovni nedostaci prešanja koji dovode do produljenog skladištenja plodova čime se smanjuje kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja. Ključni aspekti prešanja koji utječu na svojstva djevičanskog maslinovog ulja tiču se pravilnog korištenja filtrirajućih slojnica i upotrebe opreme od nehrđajućeg čelika. Slojnice predstavljaju potencijalni izvor kontaminacije jer mogu prenijeti u ulje nepoželjne produkte fermentacijskih i oksidacijskih promjena koji nastaju u maslinovom tijestu koje zaostaje u njima. Kako bi se smanjio rizik od kontaminacije ulja navedenim produktima, filtracijske slojnice se moraju često mijenjati, također je potrebno raditi u kontinuiranom ciklusu i skladištiti filtrirajuće slojnice na niskoj temperaturi kako bi se inhibirali fermentacijski procesi. Svi metalni dijelovi preše koji dolaze u kontakt s tijestom masline moraju biti izrađeni od nehrđajućeg čelika kako bi se izbjegao prijenos metala u ulje, osobito onih metala koji djeluju kao katalizatori u reakcijama oksidacije ulja (Servili i sur., 2012).

Izdvajanje ulja centrifugiranjem je noviji postupak od prešanja. Centrifugalna ekstrakcija omogućuje smanjenje operativnih troškova i povećanje proizvodnog kapaciteta. Odvajanje ulja vrši se u horizontalnim separatorima ili dekanterima. Separacija se dugi niz godina provodila u trofaznim centrifugalnim separatorima. Za primjenu trofaznog centrifugalnog separatora potrebno je dodati vodu kako bi se dobilo tekuće tijesto masline, te na taj način poboljšalo odvajanje ulja i povećao prinos. Nakon ekstrakcije na trofaznom centrifugalnom separatoru dobije se mješavina ulja i vegetabilne vode, vegetabilna voda (pomiješana s dodanom vodom) i kruti otpad koji se zove komina. Glavni nedostaci primjene trofaznog centrifugalnog separatora su nastajanje velike količine otpadne vode (skoro dvostruko više od primjene tradicionalnog prešanja) i gubitak u vodi otopivih antioksidansa koji se gube s otpadnom vodom. Dvofazni centrifugalni separatori predstavljaju rješenje za velike količine otpadnih voda. Primjenom dvofaznog centrifugalnog separatora dobiva se ulje pomiješano s vegetabilnom vodom i komina s visokim udjelom vode. U Španjolskoj se ovakva komina naziva *alpeorujo* i sadrži oko 60 % vode u usporedbi s kominom dobivenom trofaznim centrifugiranjem (50 %) i kominom dobivenom prešanjem (35 %). Prinosi ulja su slični kod ova dva postupka centrifugalne separacije, a nešto je veći kod prešanja (Doosselaere, 2013).

Uljni mošt (djevičansko maslinovo ulje s vegetabilnom vodom) koji se može dobiti različitim metodama izdvajanja mora proći završnu fazu koja uključuje postupak kojim se odvaja ulje od suspendiranih krutih tvari i vegetabilne vode. U prošlosti su u primjeni bili tankovi za taloženje u kojima su se prirodno taložile faze uljnog mošta tijekom dužeg

vremenskog perioda. Moderni industrijski pogoni za preradu maslina koriste centrifugalne separatore. Vertikalni centrifugalni pročišćivači se koriste za odvajanje dviju tekućina koje se ne miješaju (ulje i voda) uključujući istovremeno odvajanje zaostalih krutih suspendiranih tvari. Princip djelovanja ovakvog uređaja se temelji na djelovanju centrifugalne sile na faze uljnog mošta koje imaju različitu gustoću. Uljni mošt dobiven ekstrakcijom se dovodi uz dodatak male količine vode u centrifugu u kojoj se dobije čisto ulje i vegetabilna voda dok se krute tvari ispuštaju iz diskova centrifuge (Petrakis, 2006).

Industrija proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja suočena je sa značajnim izazovima koji se odnose na pravilno zbrinjavanje otpada. Pulpa masline i sjemenke čine 80 % ukupne mase plodova maslina, što znači da u procesu proizvodnje nastaje 4 puta više nusproizvoda nego ulja. Tijekom izdvajanja ulja kao nusproizvod dobiju se vegetabilna voda i komina, no vrsta nusproizvoda koji nastaju ovisi o načinu ekstrakcije (Espadas-Aldana i sur., 2019). Vegetabilna voda se mora pročistiti primjenom bioloških i fizikalnih tretmana prije ispuštanja u kanalizaciju kako bi se smanjio njezin negativan učinak na okoliš. Otpadna voda iz proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja može se koristiti za uzgoj kvasaca, za proizvodnju butanola pomoću mikroorganizama, za izolaciju antocijana i proizvodnju vodene pare. Postoje brojne metode za pročišćavanje otpadnih voda, no one su skupe i komplicirane za primjenu (Firestone, 2005). Pravilno zbrinjavanje i obrada komine su dosta skupi postupci. Zbrinjavanje velike količine komine je problematično zbog izrazite fitotoksičnosti. Preostali kruti nusproizvod (komina) može se koristiti kao gnojivo, za proizvodnju aromatskih spojeva, za ekstrakciju bioaktivnih peptida, za proizvodnju biomase, kao gorivo, kao stočna hrana (Medouni-Haroune i sur., 2018) itd.

Skladištenje je kritična faza za kontrolu očuvanja funkcionalnih komponenti djevičanskog maslinovog ulja. Ulje se mora skladištiti u hladnom (minimalne temperature 10 °C), tamnom, suhom i prozračnom prostoru. Maslinovo ulje lako apsorbira tvari topljive u mastima i hlapive tvari, te zbog toga skladišni prostor mora biti prozračan. Kako bi se smanjio kontakt djevičanskog maslinovog ulja sa zrakom potrebno je spremnike što više napuniti (Žanetić i Gugić, 2005). Tijekom skladištenja ulja u polupraznim bocama prvo dolazi do sniženja koncentracije prisutnih antioksidanasa, a tek u kasnijim stadijima skladištenja (kada je se udio antioksidacijskih spojeva smanjio) dolazi do oksidacije nezasićenih masnih kiselina (Rastrelli i sur., 2002). Djevičansko maslinovo ulje se treba čuvati u ambalaži i spremnicima izrađenim od materijala koji su fizikalno i kemijski inertni prema ulju. Poželjno je da su spremnici izrađeni od nehrđajućeg čelika. Boce u kojima se čuva ulje trebaju biti od tamnog stakla jer je plastična

ambalaža neprikladna zbog negativnog utjecaja na senzorska svojstva. Trajnost djevičanskog maslinovog ulja se može produljiti skladištenjem ulja u atmosferi inertnog plina kao što je dušik (Žanetić i Gugić, 2005). Prisutni antioksidansi, poput fenolnih tvari i tokoferola, doprinose duljem vijeku trajanja djevičanskog maslinovog ulja u usporedbi s drugim jestivim uljima. Negativan učinak na oksidacijsku stabilnost ulja mogu imati slobodne masne kiseline, nezasićeni ugljikovodici, tragovi metala, pigmenti pod određenim uvjetima i enzimi. Udio slobodnih masnih kiselina i peroksidni broj povećavaju se s vremenom dok koncentracija fenolnih tvari opada. Kod dužeg skladištenja djevičanskog maslinovog ulja dolazi do gubitaka karotenoida, klorofila i fenolnih tvari. Dobro rukovanje s djevičanskim maslinovim uljem i skladištenje je jako važno za očuvanje prisutnog α -tokoferola (Shendi i sur., 2018). Pravilnim skladištenjem djevičanskog maslinovog ulja osigurava se održavanje kvalitete. Usljed neprikladnog skladištenja, transporta, distribucije dolazi do kvarenja djevičanskog maslinovog ulja. Kvarjenje djevičanskog maslinovog ulja nije mikrobiološkog karaktera, pa se zbog toga može podcijeniti važnost adekvatnog skladištenja. Razina kvalitete djevičanskog maslinovog ulja koje dolazi do potrošača uvelike ovisi o uvjetima skladištenja, kao i rukovanja tijekom distribucije, transporta, prodaje i uporabe. Čimbenici koji utječu na kvalitetu ulja su: izloženost neadekvatnoj temperaturi, izloženost kisiku iz zraka i svjetlu, prisutnost organskih ostataka i vode u ulju, mehanički stres tijekom prijenosa i transporta i nedostatak higijene koji dovodi do kontaminacije ulja (Peri, 2014).

2.3. KEMIJSKI SASTAV I STABILNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Djevičansko maslinovo ulje je proizvod čiji sastav može kvantitativno i kvalitativno varirati. U djevičanskom maslinovom ulju se nalaze gliceridne i negliceridne komponente. Koncentracije i strukture pojedinih negliceridnih sastojaka ulja su karakteristične za određena ulja (Firestone, 2005). Glavni spojevi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su triacilgliceroli koji čine oko 96 % lipidne frakcije. Osim triacilglicerola u gliceridnoj frakciji se mogu naći monoacilgliceroli, diacilgliceroli, slobodne masne kiseline i fosfolipidi. Negliceridni i neosapunjivi spojevi djevičanskog maslinovog ulja su: steroli, vitamini, ugljikovodici, alifatski alkoholi, triterpenski alkoholi, pigmenti, tragovi metala, fenolne tvari i dr. Djevičansko maslinovo ulje ima jedinstvena senzorska svojstva koja ga izdvajaju od drugih jestivih ulja. Za aromu djevičanskog maslinovog ulja su, između ostalih, odgovorni aldehidni spojevi i seskviterpeni koji su prisutni u vrlo malim količinama (Sakouhi i sur., 2010).

Čimbenici, kao što su sorta masline, način uzgoja, zrelost plodova, specifičnosti metoda prerade, imaju utjecaj na sastav djevičanskog maslinovog ulja. Navedeni čimbenici mogu utjecati i na okus ulja (Caporaso, 2016). Poljoprivrednici kontrolom određenih agronomskih parametara mogu dobiti plodove optimalne za proizvodnju ulja (Aparicio i Luna, 2002). Kvaliteta ulja je reprezentativna za pojedinu sortu masline tek kada su agrotehnički čimbenici optimizirani (Klepo i Benčić, 2014). Pojedine faze proizvodnje, kao što su izdvajanje ulja, drobljenje, miješenje i skladištenje, mogu dovesti do razvoja nepoželjnih aroma. Uvjeti izdvajanja ulja na industrijskoj razini mogu značajno utjecati na sastav fenolnih i hlapljivih spojeva (Mousavi i sur., 2022; Baccouri i sur., 2008).

Masne kiseline prisutne u djevičanskom maslinovom ulju su: pamtinska, palmitoleinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska. Miristinska, margarinska i arahinska kiselina su prisutne u tragovima. Talijanska, grčka i španjolska maslinova ulja imaju visok udio oleinske kiseline, a nizak udio linolne i palmitinske. Sastav i koncentracija masnih kiselina prisutnih u maslinovom ulju ovise o zrelosti ploda, klimi, geografskoj širini i sorti. Maslinova ulja iz Tunisa imaju visok udio linolne i palmitinske kiseline, a nizak udio oleinske kiseline. Triacilgliceroli prisutni u djevičanskom maslinovom ulju sadrže većinski oleinsku masnu kiselinu. Koncentracija triacilglicerola ovisi o klimi, zrelosti plodova, sorti i geografskoj širini. Sastav masnih kiselina u maslinovom ulju je važan čimbenik autentičnosti ulja. Monoacilgliceroli i diacilgliceroli prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su posljedica nepotpune biosinteze triacilglicerola ili hidrolitičkih reakcija. U djevičanskom maslinovom ulju udio diacilglicerola se kreće od 1 do 2,8 %, a udio monoacilglicerola je manji od 0,25 % (Milinovic i sur., 2019; Boskou i sur., 2006).

Polifenoli prisutni u djevičanskom maslinovom ulju se konvencionalno karakteriziraju kao "polifenoli" iako nisu svi polihidroksi aromatski spojevi. U maslinovom ulju su prisutne različite vrste polifenola, uključujući fenolne alkohole hidroksitirozol i tirozol. Udio polifenola u djevičanskom maslinovom ulju varira ovisno o nizu čimbenika kao što su sorta, načini uzgoja i uvjeti prerade. Koncentracija polifenola se generalno kreće u rasponu od 50 do 1000 mg/kg ulja, ali se vrijednosti obično kreću između 100 i 300 mg/kg ulja. Polifenoli su jako važni za okus i stabilnost maslinovog ulja. Ulje može imati gorak okus kada je udio polifenola viši od 300 mg/kg. Visok udio polifenola je međutim važan za stabilnost ulja, pa samim time i produljenje roka trajanja ulja. Polifenoli također imaju i pozitivan učinak na zdravlje (Castelli i sur., 2018; Boskou, 2011; Boskou, 2008).

Najznačajniji ugljikovodici prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su skvalen i β -karoten. Koncentracija skvalena u djevičanskom maslinovom ulju iznosi od 700 do 1200 mg/kg. Skvalen je nezasićeni alifatski ugljikovodik koji ima značajna biološka i umjerena antioksidativna svojstva. Važan je njegov pozitivan učinak na zdravlje jer skvalen djeluje inhibirajuće na neke oblike raka (Murkovic i sur., 2004; Boskou, 2002; Psomiadou i Tsimidou, 1999).

Steroli prisutni u djevičanskom maslinovom ulju mogu se podijeliti na 4 grupe: obični steroli (4- α -dezmetilsteroli), 4- α -metilsteroli, 4,4-dimetilsteroli (triterpenski alkoholi) i triterpenski dialkoholi. Najvažniji steroli prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su 4- α -dezmetilsteroli. β -sitosterol čini 75-90 % ukupnog sastava sterola. Ostali steroli prisutni u značajnijim količinama su delta-5-avenasterol (5-36 %) i kampesterol (oko 3 % ukupnog sastava sterola). Koncentracija sterola u djevičanskom maslinovom ulju je obično u rasponu od 1000-2000 mg/kg ulja. Prisutnost Δ 5-avenasterola u djevičanskom maslinovom ulju važna jer djeluje inhibitorno na reakcije oksidativne polimerizacije (Kycyk i sur., 2016; Boskou, 2002).

Fosfolipidi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su: fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i fosfatilinositol. Koncentracije fosfolipida u maslinovom ulju mogu se kretati u rasponu od 20 do 156 mg/kg ulja. Udio fosfolipida može utjecati na antioksidativnu aktivnost i stabilnost ulja (Jiménez i sur., 2007b; Boskou i sur., 2006).

Pigmenti prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su klorofili i karotenoidi. Udio karotenoida u maslinovom ulju se kreće od 1 do 20 mg/kg, no vrijednosti obično ne prelaze 10 mg/kg. Karotenoidi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su lutein (0,2-3,4 mg/kg) i β -karoten (0,4-5,1 mg/kg). Koncentracija klorofila u maslinovom ulju se kreće u rasponu od 10 do 30 mg/kg. Klorofil u djevičanskom maslinovom ulju je prisutan u obliku feofitina *a*. Karotenoidi inhibiraju fotooksidaciju ulja. Klorofili mogu djelovati kao slabi antioksidansi u tamnom okruženju, dok u prisutnosti svjetla kataliziraju reakcije oksidacije. Pigmenti imaju važnu ulogu u oksidativnoj stabilnosti djevičanskog maslinovog ulja (Boskou, 2011; Márquez, 2003; Minguez-Mosquera i sur., 1990).

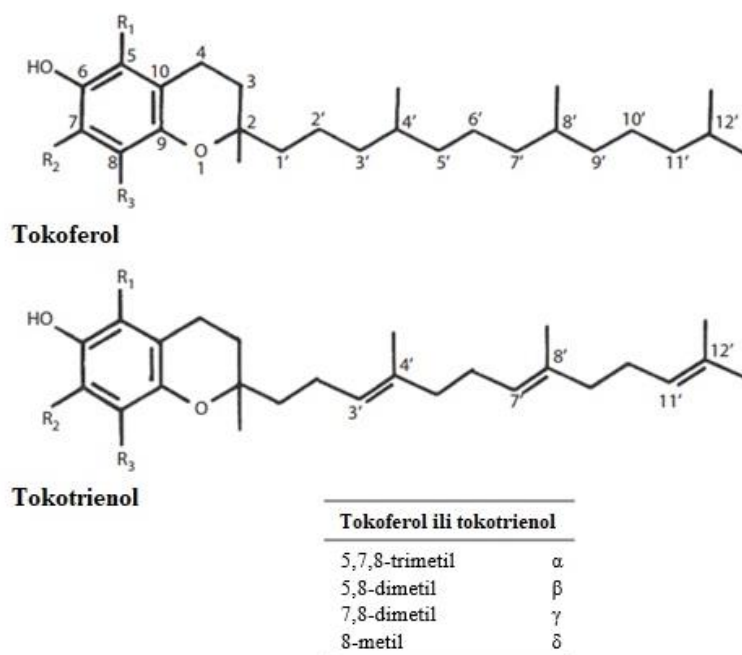
U djevičanskom maslinovom ulju je identificirano oko 280 hlapljivih spojeva. Hlapljivi spojevi maslinovog ulja su: ugljikovodici, aldehidi, esteri, derivati furana, kiseline, ketoni, alkoholi i dr. Smatra se da samo 67 hlapljivih spojeva značajno pridonosi aromi djevičanskog maslinovog ulja. Koncentracije hlapljivih komponenata su jako važne za određivanje mirisa i okusa maslinovog ulja. Na sastav hlapljivih spojeva utječu kvaliteta plodova, način berbe i

prerade. Najzastupljeniji hlapljivi spojevi u maslinovom ulju su: heksanal, (E)-2-heksenal, (Z)-3-heksenal, heksan-1-ol, (Z)-3-heksen-1-ol, heksil acetat i (Z)-3-heksenil acetat, koji su odgovorni za zelenu i voćnu aromu djevičanskog maslinovog ulja (Kaftan i Elmaci, 2011; Boskou i sur., 2006).

Voskovi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju su esteri alkohola s masnim kiselinama. Koncentracija voskova je vrlo niska i ne prelazi 350 mg/kg. Udio voskova može varirati ovisno o nizu čimbenika. Oni potpomažu stabilnost i trajnost ulja te imaju učinak na senzorska svojstva ulja (Samaniego-Sánchez i sur., 2010; Boskou, 2002).

Tragovi metala prisutni u djevičanskom maslinovom ulju mogu potjecati iz gnojiva, tla ili su migrirali iz opreme i spremnika. Važno je koristiti opremu i spremnike od nehrđajućeg čelika kako bi se izbjegla kontaminacija maslinovog ulja metalima. Metali prisutni u maslinovom ulju su obično željezo i bakar. Koncentracija metala u djevičanskom maslinovom ulju se kreće između 0,5 i 3 mg/kg, dok koncentracija bakra obično iznosi od 0,001 do 0,2 mg/kg. Ostali metali poput kroma, mangana, kositra, nikla i olova također mogu biti prisutni u djevičanskom maslinovom ulju, ali u izrazito niskim koncentracijama. Metali djeluju kao prooksidansi, odnosno imaju katalitički učinak na autooksidaciju (Llorent-Martínez i sur., 2014; Boskou, 2011).

Biljna ulja i masti sadrže važnu skupinu antioksidansa koji se zovu tokoferoli. α -tokoferol čini oko 95 % ukupnog sastava tokoferola prisutnih u djevičanskom maslinovom ulju (Cunha i sur., 2006). Najznačajniji antioksidacijski učinak ima δ -tokoferol, a slijede ga γ -, β - i α -tokoferol. α -tokoferol zato ima najizraženije biološko djelovanje koje opada prema β - i γ -tokoferolu, a najslabije je kod δ -tokoferola (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Blekas i sur., 1995). Tokoferoli i tokotrienoli, koji se još nazivaju vitaminom E, su skupine antioksidansa topljivih u mastima s kromanolnim prstenom i hidrofobnim bočnim lancem (u slučaju tokoferola fitil, u slučaju tokotrienola izoprenil). Tokoferoli (α , β , γ i δ) i tokotrienoli (slika 1) se razlikuju po položaju i broju metilnih supstituenata na fenolnom dijelu prstena (Schwartz i sur., 2008).



Slika 1. Struktura tokokromanola, tablica predstavlja broj i položaj metilnih grupa na aromatskom prstenu (Nollet, 2012).

Sinteza tokoferola i tokotrienola uključuje primarno nastanak tokokromanolne strukture. Tokokromanoli se sintetiziraju kondenzacijom homogentizata (HGA), koji nastaje iz tirozina i fitila ili geranilgeranil difosfata uz pomoć homogentizata fitiltransferaze odnosno homogentizata geranilgeraniltransferaze kako bi se formirao 2-metil-6-fitil-1,4-benzokinol odnosno 2-metil-6-geranilgeranil-1,4-benzokinol. Ovi međuprodukti uslijed djelovanja tokoferol-ciklaze, prije ili nakon metilacije MPBQ metiltransferazom, daju γ - i δ -tokokromanol. Metilacijom γ - i δ -tokokromanola pomoću γ -tokoferol metiltransferaze nastaju α - i β -tokokromanol (Pérez i sur., 2019; DellaPenna i Pogson, 2006).

α -tokoferol čini 90 % ukupnog udjela prisutnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju. Koncentracija α -tokoferola u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja iz Portugala, Španjolske, Grčke i Italije se kreće između 50 i 380 mg/kg. Maslinovo ulje sadrži znatno niže koncentracije ostalih tokoferola, a najviše γ -tokoferola, oko 20 mg/kg (Paiva-Martins i Kiritsakis, 2017). Koncentracija tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju ovisi o: uvjetima uzgoja, sorti, klimi, geografskim čimbenicima, tipu tla, vremenu berbe i načinu prerade (Özcan i sur., 2019). Na koncentraciju α -tokoferola može značajno utjecati skladištenje djevičanskog maslinovog ulja, odnosno izloženost svjetlu i neadekvatnoj temperaturi (Deiana i sur., 2002). Udio tokoferola također ovisi i o nadmorskoj visini na kojoj se maslina uzgaja, utvrđeno je da

masline uzgajane na nižim nadmorskim visinama imaju veći udio ukupnih tokoferola (Mousa i sur., 1996).

Oksidacija lipida predstavlja značajan problem u prehrambenoj industriji. Kvarenje ulja može dovesti do promjena u senzorskim svojstvima, promjena nutritivnog sastava i nastanka nepoželjnih spojeva. Antioksidansi otopivi u uljima su važni za inhibiciju oksidacijski promjena (Barouh i sur., 2021). α -tokoferol je važan liposolubilni antioksidans koji se nalazi u membranama i lipoproteinima sisavaca. Vitamin E ima pozitivan učinak na zdravlje tako što minimizira procese koji dovode do degenerativnih bolesti, te djeluje protuupalno (Saldeen i Saldeen, 2005; Burton i Traber, 1990). Također, smanjuje agregaciju trombocita i uključen je u konverziju arahidonske kiseline u prostagladin (Rizvi i sur., 2014). Tokoferoli su važni za stabilizaciju pojedinih hormona i enzimske aktivnosti, te štite biološke membrane od lipidne peroksidacije (Liao i sur., 2022; Karanth i sur., 2003; Wang i Quinn, 2000). Pretpostavlja se da tokoferoli djeluju kao antioksidansi kroz dva različita mehanizma. Prvi mehanizam uključuje doniranje elektrona, zapravo tokoferol donira atom vodika iz svoje fenolne skupine lipidnim radikalima. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje singletnog kisika te na taj način dolazi do inhibicije oksidacijskih reakcija koje su izazvane pobuđenim singletnim kisikom (Boskou, 2008; Brigelius-Flohé, 2006; Burton, 1994).

Bioaktivne komponente djevičanskog maslinovog ulja osiguravaju snažan antioksidativni učinak. U bioaktivne komponente se ubrajaju steroli, tokoferoli, karotenoidi, klorofili, ugljikovodici i fenolne tvari. Djevičansko maslinovo ulje je poznato po tome što je bogato fenolnim spojevima i α -tokoferolom. Koncentracije antioksidacijskih spojeva u maslinovom ulju variraju ovisno o velikom broju čimbenika (sorta, klima, agronomski uvjeti, vrijeme skladištenja prije prerade...). Korištene metode ekstrakcije i parametri skladištenja mogu imati učinak na sastav fenolnih tvari i koncentraciju tokoferola (Ninfali i sur., 2001). *o*-difenoli su najučinkovitiji antioksidansi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju. Učinak α -tokoferola na stabilnost ulja uvelike ovisi o koncentraciji *o*-difenola. Ostale antioksidacijske komponente također imaju mali doprinos stabilnosti djevičanskog maslinovog ulja (Mateos i sur., 2003). Tijekom prve faze autooksidacije tokoferoli inhibiraju nastanak slobodnih radikala, te se zbog toga koncentracija tokoferola smanjuje u odnosu na ostale antioksidacijske spojeve prisutne u djevičanskom maslinovom ulju koji djeluju nakon učinka tokoferola (Dimić i sur., 2016).

2.4. HPLC

Analiza hrane je važna zbog provjere kvalitete i autentičnosti prehrambenih proizvoda. Određivanje kvalitete uključuje procjenu prehrambene vrijednosti i karakterističnih svojstava hrane. Analitička kemija koristi razne tehnike i metode za utvrđivanje sastava prehrambenih proizvoda. Često se primjenjuju kromatografske tehnike. Nedostaci plinske kromatografije doveli su do razvoja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography* ili *High Pressure Liquid Chromatography*; HPLC) koja je omogućila razdvajanje najsloženijih smjesa te poboljšala selektivnost i osjetljivost analiza hrane (Conte i sur., 2010). HPLC se primjerice koristi za analizu antioksidansa otopivih u lipidima zato jer zahtjeva manje pročišćavanje uzorka, a blaži temperaturni uvjeti kolone sprječavaju gubitak termolabilnih analita (Abidi, 2000).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti razdvaja sastojke uzorka na temelju njihove raspodjele između mobilne i stacionarne faze. Svaka komponenta uzorka eluira u različito vrijeme, što je određeno međumolekularnim interakcijama. Međumolekularne interakcije, odnosno priroda tvari, određuju vrijeme zadržavanja na koloni (Giri i sur., 2022).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se koristi zbog značajne mogućnosti odvajanja širokog raspona tvari i izražene selektivnosti. Većina mjerenja provodi se na normalnim ili obrnutim fazama na silikatnim kolonama. Aparatura HPLC-a uključuje: injektor, kolonu, pumpu, spremnik mobilne faze i detektor. Izokratsko eluiranje se koristi kada se tijekom procesa odvajanja mobilna faza ne mijenja. Gradijentno eluiranje se koristi kada se sastav mobilne faze mijenja (Vitha, 2017; Nollet, 2012; Cserhati i Forgacs, 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Uzorci djevičanskog maslinovog ulja 4 autohtone hrvatske sorte (Oblica, Istarska bjelica, Rosulja i Levatinka) korišteni su kao materijal u ovom diplomskom radu. Djevičansko maslinovo ulje proizvedeno je laboratorijskim postupkom uz ubrzani toplinski tretman te u poluindustrijskom postrojenju kako je opisano u diplomskom radu Pejić (2022). Uzorci djevičanskog maslinovog ulja su nakon proizvodnje do analiza skladišteni u bocama od tamnog stakla pod strujom dušika na temperaturi od 15 do 20 °C. U svim uzorcima djevičanskog maslinovog ulja određeni su sastav i koncentracija tokoferola.

Tijekom analize sastava tokoferola u uzorcima korišteni su slijedeći reagensi:

- Metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Engleska)
- Heptan (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Heksan (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Izopropanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- α -tokoferol (LGC, DR EHRENSTORFER, Augsburg, Njemačka)
- β -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)
- γ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)
- δ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman

Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja provedena je na laboratorijskoj pilot-uljari Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska) koja se sastoji od mlina čekićara (MM-100), termomiješalice s vodenom kupelji (TM-100) i centrifuge (CF-100). Plodovi maslina su prvo očišćeni i oprani, te nakon toga samljeveni. Nakon mljevenja plodova maslina, tijesto je odmah podvrgnuto ubrzanom toplinskom tretmanu pri: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C. Hlađenje do željene temperature od 15 °C i 20 °C provedeno je u uređaju

za ubrzano hlađenje (Blast chiller TECNODOM ATT05 ATTILA ABB) na temperaturi -18 °C. Maslinovo tijesto se u sloju visine 1-1,5 cm (približne mase od 800 g) nanese na pladnjeve od inoksa. Tijekom hlađenja temperatura tijesta kontrolira se ubodnim termometrom (Quartz). Toplinska energija se odvodi konvekcijom. Tijesto maslina je ohlađeno do željene temperature koja bi se trebala postići u vremenskom periodu od 1 do 3 minute. S druge strane, maslinovo tijesto je zagrijano na temperature 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C na dva načina. Grijanje je provedeno u termostatu prijenosom topline konvekcijom na temperaturi od 45 °C (gdje je tijesto nanoseno na pladnjeve od inoksa) te u termostatu s vodenom kupelji (GRANT, SUB Aqua Pro, model: SAP12). Gornju stranu posude u kojoj se tijesto zagrijavalo bilo je potrebno obložiti aluminijskom folijom kako bi se toplina ravnomjerno rasporedila. Temperatura tijesta je praćena ubodnim termometrom (Quartz). Toplina se prenosi kondukcijski preko vode zagrijane na 52 °C (za temperaturu tijesta 40 °C) i 50 °C (za temperaturu tijesta 25 -35 °C). Grijanje tijesta do željene temperature trajalo je, kao i kod hlađenja tijesta, od 1 do 3 minute.

Na laboratorijskoj pilot-uljari Abencor je provedeno miješenje i centrifugiranje pretretiranog maslinovog tijesta. Postupak miješenja je proveden na temperaturi od 27 °C kroz 40 minuta. Centrifugiranjem je provedeno izdvajanje ulja kroz 90 sekundi uz 3500 okr/min. Dobiveno ulje je dodatno izbistreno na centrifugi Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka), sa sustavom hlađenja, finim centrifugiranjem pri 18 °C. Fino centrifugiranje je provedeno pri brzini vrtnje od 5000 okr/min kroz 4 minute (Pejić, 2022).

3.2.2. Određivanje tokoferola

Sastav i koncentracije tokoferola u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja određeni su prema standardnoj metodi (HRN EN ISO 9936, 2016) primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) uz fluorescentnu detekciju (FD), izokratskom metodom normalnih faza.

Priprema matične otopine standarda

Za pripremu matične otopine standarda (α -, β -, γ - i δ -tokoferola) izvagano je $5 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$, na vagi Kern ABP 200-5DM (KERN & SOHN, Balingen, Njemačka), u odmjernu tikvicu od 25 mL, te se tikvica do oznake napunila n-heptanom. Odmjerna tikvica s matičnom otopinom

standarda je umotana u aluminijsku foliju i skladištena pri temperaturi od 4 °C, a može se koristiti do tjedan dana. Matičnoj otopini α -tokoferola dodatno je spektrofotometrijski određena koncentracija kako bi se omogućilo izražavanje koncentracije detektiranih tokoferola preko α -tokoferola. Ukratko, u tikvicu okruglog dna se odpipetira 5 mL matične otopine α -tokoferola, te se na rotacijskom evaporatoru (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri temperaturi od 35 °C i sniženom tlaku u cijelosti ukloni n-heptan. Tikvica se propuhuje dušikom i u tikvicu se pipetira 10 mL metanola. Pri valnoj duljini od 292 nm mjeri se apsorbancija dobivene otopine u metanolu na spektrofotometru UviLine 9400 (SECOMAM, Ales, Francuska). Točna koncentracija α -tokoferola u metanolu, izražena u $\mu\text{g/mL}$, se računa tako da se dobivena apsorbancija podijeli s 0,0076. Dobivena koncentracija se množi s 2 kako bi se dobila koncentracija α -tokoferola u matičnoj otopini standarda.

Priprema otopine standarda za injektiranje

Otopina standarda koji se injektiraju u HPLC se priprema svaki dan i skladišti se pri temperaturi od 0 °C do 4 °C. Za pripremu otopine standarda potrebno je odpipetirati 100 μL matične otopine standarda u odmjernu tikvicu od 5 mL i tikvicu do oznake napuniti n-heptanom.

Priprema uzorka

Otopina uzorka se pripremala tako da se u odmjernu tikvicu od 10 mL izvaže $0,1 \text{ g} \pm 1 \text{ mg}$ uzorka, te se otopi u n-heptanu do oznake. Otopina uzorka mora biti zaštićena od svjetla i analiza se mora provesti na dan pripreme otopine uzorka.

HPLC analiza

U HPLC (Varian ProStar, Middelburg, Nizozemska) je injektirano 20 μL pripremljenog uzorka. Na koloni LiChroCART, Silica 60 kolonom (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm ; Merck, Darmstadt, Njemačka) je provedeno razdvajanje tokoferola, pri sobnoj temperaturi. Smjesa heksan/izopropanol (99,3/0,7) je upotrijebljena kao mobilna faza uz protok od 0,9 mL/min u vremenskom trajanju analize od 25 minuta. Na fluorescentnom detektoru je namještena valna duljina eksitacije od 295 nm i valna duljina emisije od 330 nm, a osjetljivost detektora je podešena na medium.

Za identifikaciju α -tokoferola, β -tokoferola, γ -tokoferola i δ -tokoferola u uzorku, korištena su retencijska vremena ranije navedenih komercijalno dostupnih standarada. Otopina

standarda je injektirana na isti način kao i uzorci. Otopina α -tokoferola svježe je pripravljena svaki dan i injektirana u HPLC. Koncentracija svakog pojedinog tokoferola u uzorku (w), izražena je preko koncentracije α -tokoferola, u mg/kg, a računa se prema formuli [1]:

$$w = \frac{\rho \cdot \bar{A}_t \cdot V}{\bar{A}_s \cdot m} \quad [1]$$

gdje je: ρ koncentracija u $\mu\text{g/mL}$ α -tokoferola u otopini standarda, \bar{A}_s očitana površina pika α -tokoferola u otopini standarda, \bar{A}_t je očitana površina pika pojedinog tokoferola u otopine uzorka, m masa u gramima testnog uzorka, V volumen pripremljene otopine uzorka koji iznosi 10 mL.

3.3. OBRADA PODATAKA

Statistička analiza je provedena kako bi se utvrdio utjecaj sorte i načina proizvodnje (predtretmana) na sastav tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju. Provedena je ANOVA tj, analiza varijance u programu Excel. Za svaki način proizvodnje je izmjereno šest vrijednosti koncentracije tokoferola. Analiza tokoferola je provedena u dva ponavljanja za svaku od tri paralelne proizvodnje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Danas je općepriznato da djevičansko maslinovo ulje ima važnu biološku i nutritivnu vrijednost koja ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. No, postoji još prostora za optimiranje pojedinih parametara proizvodnje kako bi se poboljšala svojstva ulja (Ranalli i sur., 2003). Djevičansko maslinovo ulje se proizvodi iz plodova isključivo primjenom mehaničkih tehnika koje uključuju mljevenje, drobljenje, miješenje i izdvajanje ulja. Svaka od navedenih faza proizvodnje ima značajan utjecaj na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja (Clodoveo, 2012). Djevičansko maslinovo ulje sadrži širok raspon spojeva, od kojih su pojedini funkcionalne komponente. Prema kemijskom sastavu spojevi djevičanskog maslinovog ulja se mogu podijeliti u dvije grupe, a to su osapunjive i neosapunjive komponente. Osapunjivu frakciju ulja čine: triacilgliceroli, monoacilgliceroli, diacilgliceroli, slobodne masne kiseline, esteri masnih kiselina i terpenški alkoholi. Neosapunjiva frakcija ulja se sastoji od: ugljikovodika, fitosterola, flavonoida, pigmenta, sterola, tokoferola, terpenških dialkohola i hlapljivih tvari. Sastav masnih kiselina i udio antioksidansa (poput polifenola i tokoferola) imaju značajan utjecaj na brzinu oksidacije biljnih ulja, tj. na njihovu oksidacijsku stabilnost. U djevičanskom maslinovom ulju se, ovisno o uvjetima skladištenja, mogu odvijati procesi autooksidacije i fotooksidacije (Yalcin i Schreiner, 2018; Chen i sur., 2011).

Tokoferoli (α , β , γ , i δ) su prirodni antioksidansi topljivi u uljima i mastima. Nalaze se u biljnim uljima, pa tako i u djevičanskom maslinovom ulju (Martakos i sur., 2020; Bakre i sur., 2015). U djevičanskom maslinovom najveći udio u ukupnom sastavu tokoferola čini α -tokoferol. β -tokoferol i γ -tokoferol su prisutni u djevičanskim maslinovim uljima u manjim koncentracijama dok se δ -tokoferol pojavljuje samo u tragovima. Tokoferoli imaju važnu ulogu u utvrđivanju kvalitete i autentičnosti djevičanskog maslinovog ulja. Prisutni tokoferoli su važni antioksidansi koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. α -tokoferol, osim toga, može djelovati sinergistički s drugim antioksidacijskim spojevima prisutnim u djevičanskom maslinovom ulju (Krichene i sur., 2010; Escuderos i sur., 2009).

Cilj diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana i sorte na sastav tokoferola djevičanskih maslinovih ulja. Ispitivanje je provedeno na uzorcima ulja proizvedenim iz četiri različite autohtone hrvatske sorte maslina (Oblica, Rosulja, Istarska bjelica i Levantinka). Postupak proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja uključivao je ubrzani toplinski tretman tjestu masline. Tjesto masline je brzo ohlađeno ili zagrijano između faza

mljevenja (drobljenja) i miješenja na temperaturu od 15, 20, 25, 30, 35 ili 40 °C. Koncentracija tokoferola u uzorcima određena je standardnom metodom pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Istraživanje Tamborrino i sur. (2019) pokazalo je da brzim zagrijavanjem tijesta maslina (3,61 min do temperature tijesta 23 °C) u kombinaciji s procesom miješenja dolazi do smanjenja koncentracija α -, β - i γ - tokoferola u odnosu na primjenu standardnog procesa miješenja. U stručnoj literaturi nije pronađeno više istraživanja u kojima je praćen utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na sastav tokoferola. Međutim, postoje istraživanja u kojima je utvrđen utjecaj termičkog tretiranja tijesta maslina na druge parametre kao što su: iskorištenje procesa proizvodnje, sastav fenolnih tvari, oksidacijska stabilnost, potrebna duljina miješenja, efikasnost miješenja, senzorska svojstva i sastav hlapljivih tvari (Acar i Arslan, 2017; Leone i sur., 2015; Fiori i sur., 2014; Esposito i sur., 2013; Amirante i sur., 2006).

Provedena su brojna istraživanja koja su se bavila utjecajem raznih čimbenika (zrelost plodova, primjena pulsirajućeg električnog polja, mikrovalova i ultrazvuka, uvjeti miješenja, metoda ekstrakcije, primjena različitih mlinova, duljina skladištenja plodova) na udio tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima. U istraživanjima Jiménez i sur. (2014) i Bengana i sur. (2013) primijećeno je snižavanje razine ukupnih tokoferola tijekom procesa dozrijevanja. Dok su istraživanja Dağdelen i sur. (2012) i Gutiérrez i sur. (1999) pokazala da pojedine sorte imaju karakterističan trend u kretanju udjela α -tokoferola tijekom zrenja. Tretman tijesta mikrovalovima uz dodatak natrij-citrata je uzrokovao sniženje koncentracije α -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju u odnosu na primjenu tradicionalne metode prema radu Chira i sur. (2020). Brojna istraživanja su pokazala da ultrazvučni tretman tijesta masline, dobivenog drobljenjem i mljevenjem, dovodi do porasta ukupnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju (Iqdiam i sur., 2018; Bejaoui i sur., 2015; Clodoveo i sur., 2013; Jiménez i sur., 2007a). Utvrđeno je također da je udio α -tokoferola u maslinovom ulju, čije je tijesto tretirano pulsirajućim električnim poljem, bio malo viši od kontrole (Abenoza i sur., 2013). U proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja je od velikog značaja zrelost i zdravstveno stanje plodova, ali i primijenjene tehnike izdvajanja ulja koje imaju utjecaj na kvalitetu ulja (Jolayemi i sur., 2016). Inarejos-García i sur. (2009) su utvrdili da je porast temperature miješenja bio popraćen blagim porastom koncentracije α -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju. Korištenje atmosfere dušika u procesu miješenja također je imalo pozitivan učinak na sastav tokoferola (Yorulmaz i sur., 2011). Osim toga, i metoda izdvajanja ulja utječe na sastav tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju (Abd El-Hamied i sur., 2019; Stefanoudaki i sur.,

2011). Primjenom mlina čekićara proizvedeno je maslinovo ulje s neznatno višim udjelom α -tokoferola prema istraživanju Inarejos-García i sur. (2011). Istraživanje Rotondi i sur. (2021) pokazalo je da vrijeme skladištenje maslina utječe na koncentraciju α -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju te da je optimalno masline preraditi u prvom danu nakon berbe.

Rezultati istraživanja ovog rada prikazani su u tablicama (tablice 1-4). Vrijednosti u tablicama su izražene u cijelim brojevima kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Srednja vrijednost i standardna devijacija izračunati su na osnovu šest izmjerenih vrijednosti za svaki način proizvodnje (tri paralelne proizvodnje dok je sama analiza tokoferola provedena u minimalno dva ponavljanja). Prikazane vrijednosti su masene koncentracije pojedinih tokoferola izraženih u miligramu po kilogramu djevičanskog maslinovog ulja.

α -tokoferol dominantni je tokoferol djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih iz sorte Oblica (tablica 1). Najviša koncentracija α -tokoferola primijećena je u uzorku kojem je maslinovo tijesto sorte Oblica hlađeno na 15 °C, dok je najniža koncentracija α -tokoferola izmjerena za uzorak čije je tijesto prije miješenja zagrijano na 35 °C. Ostali tokoferoli u prikazanim uzorcima su bili prisutni u značajno nižim koncentracijama. Optimalni uvjeti proizvodnje u kojima je očuvana maksimalna koncentracija β -tokoferola uključuju hlađenje maslinovog tijesta na temperaturu od 20 °C. γ -tokoferola je bilo najviše u uzorku kontrole.

Tablica 1. Koncentracije tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte Oblice

Oblica	mg/kg			
Uzorak	α-tokoferol	β-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol
Konvencionalni postupak	225 \pm 3	3 \pm 0	8 \pm 0	nd*
Kontrola	244 \pm 7	2 \pm 1	11 \pm 0	nd
15 °C	261 \pm 9	1 \pm 1	8 \pm 1	nd
20 °C	213 \pm 32	5 \pm 4	7 \pm 1	2 \pm 4
25 °C	221 \pm 9	3 \pm 0	8 \pm 0	nd
30 °C	212 \pm 3	nd	7 \pm 1	nd
35 °C	185 \pm 1	nd	6 \pm 0	nd
40 °C	187 \pm 1	nd	6 \pm 0	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija;
*nije detektirano

Šarolić i sur. (2015) su utvrdili da djevičansko maslinovo ulje Oblice sadrži oko 213 mg/kg α -tokoferola, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, utvrđene koncentracije

γ -tokoferola (oko 33 mg/kg) su značajno više od koncentracija γ -tokoferola određenih u ovom diplomskom radu. Jukić Špika i sur. (2015) su utvrdili koncentraciju ukupnih tokoferola 269-443 mg/kg u djevičanskom maslinovom ulju Oblice, dok je analiza uzoraka ovog rada pokazala niže vrijednosti. Utvrđena koncentracija ukupnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju sorte Oblice u istraživanju istih autora, ali iz različite maslinarske godine je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu, te iznosi 186-442 mg/kg (Jukić Špika i sur., 2016).

Maksimalna koncentracija α -tokoferola kao dominantnog izomera, kao i ukupnih tokoferola, utvrđena je u uzorku djevičanskog maslinovog ulja Rosulje dobivenog primjenom konvencionalnog postupka proizvodnje (tablica 2). Djevičansko maslinovo ulje Rosulje, čije je maslinovo tijesto tretirano ubrzanim toplinskim tretmanom, je pokazalo nešto više koncentracije tokoferola u odnosu na uzorke kontrole. Očekivano, β -tokoferol i γ -tokoferol su detektirani u značajno nižim koncentracijama od α -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju Rosulje. Maslinovo tijesto Rosulje je zagrijavano konvekcijom duži vremenski period, što je moglo uzrokovati bolju ekstrakciju tokoferola u ulje, za uzorke čije je tijesto zagrijavano na više temperature.

Tablica 2. Koncentracije tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte Rosulje

Rosulja	mg/kg			
Uzorak	α-tokoferol	β-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol
Konvencionalni postupak	217±1	nd*	14±1	nd
Kontrola	188±13	4±2	10±1	nd
15 °C	197±5	4±1	10±1	nd
20 °C	195±15	4±1	10±2	nd
25 °C	197±6	3±2	12±1	1±2
30 °C	210±8	4±0	14±1	2±2
35 °C	204±9	3±2	13±1	nd
40 °C	201±3	4±0	11±1	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

*nije detektirano

Prema dostupnoj literaturi koncentracija ukupnih tokoferola djevičanskog maslinovog ulja Rosulje iznosi oko 211 mg/kg za 2010. godinu što je u skladu s istraživanjem ovog rada, dok su za uzorke ulja Rosulje iz 2011. zabilježene više koncentracije ukupnih tokoferola (351 mg/kg). Dostupna literatura također potvrđuje da se u djevičanskom maslinovom ulju Rosulje

nalazi većinski α -tokoferol dok su β - i γ - tokoferol prisutni u nižim koncentracijama (Koprivnjak i sur., 2012).

U uzorcima djevičanskog maslinovog ulja Istarske bjelice nije utvrđena prisutnost β -, γ - i δ -tokoferola. Najviša koncentracija α -tokoferola zabilježena je u uzorku djevičanskog maslinovog ulja Istarske bjelice dobivenog primjenom konvencionalnih postupaka u proizvodnji. Uzorci djevičanskog maslinovog ulja Istarske bjelice čije je tijesto bilo podvrgnuto ubrzanom toplinskom tretmanu pokazali su nešto više koncentracije prisutnih α -tokoferola u usporedbi s uzorcima kontrole, osim uzorka čije je tijesto hlađeno na 15 °C gdje je primijećena neznatno niža vrijednost (tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarske bjelice

Istarska bjelica	mg/kg			
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Uzorak				
Konvencionalni postupak	95±0	nd*	nd	nd
Kontrola	75±3	nd	nd	nd
15 °C	73±6	nd	nd	nd
20 °C	83±1	nd	nd	nd
25 °C	78±3	nd	nd	nd
30 °C	76±6	nd	nd	nd
35 °C	85±4	nd	nd	nd
40 °C	82±3	nd	nd	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;
*nije detektirano

Rezultati prikazani u tablici 3 se podudaraju s rezultatima istraživanja Koprivnjak i sur. (2012), prema kojima koncentracija ukupnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju Istarske bjelice iznosi oko 101 mg/kg. Isto istraživanje također pokazuje da djevičansko maslinovo ulje Istarske bjelice sadrži neznatne količine β -tokoferola i γ -tokoferola.

Djevičansko maslinovo ulje Levantinke sadrži značajne količine tokoferola, osobito α -tokoferola. Najveća koncentracija ukupnih tokoferola, kao i α -tokoferola, zamijećena je u uzorcima kontrole. Uzorak djevičanskog maslinovog ulja Levantinke čije je tijesto podvrgnuto toplinskom tretmanu do temperature 25 °C sadrži nešto više α -tokoferola u odnosu na preostale uzorke čije je maslinovo tijesto tretirano ubrzanim toplinskim tretmanom. Koncentracija γ -

tokoferola se kretala u rasponu od 8 do 12 mg/kg u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja Levantinke ovisno o tehnikama proizvodnje (tablica 4).

Tablica 4. Koncentracije tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte Levantinke

Levantinka	mg/kg			
	α - tokoferol	β - tokoferol	γ - tokoferol	δ - tokoferol
Konvencionalni postupak	225±3	3±0	8±0	nd*
Kontrola	273±8	1±1	12±1	nd
15 °C	237±3	1±2	11±2	nd
20 °C	232±11	nd	11±1	nd
25 °C	264±8	nd	10±1	nd
30 °C	258±7	nd	11±0	nd
35 °C	248±7	nd	11±0	nd
40 °C	232±6	nd	11±0	1±2

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija;

*nije detektirano

Koncentracija α -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju Levantinke iznosi oko 222 mg/kg (Šarolić i sur., 2015) što je u skladu s rezultatima navedenim u tablici 4. Koncentracija γ -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju Levantinke utvrđenom u ovom radu je znatno niži od onog utvrđenog u literaturi koji iznosi 31 mg/kg (Šarolić i sur., 2015) .

Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na koncentraciju tokoferola nije posve jasan, svaka sorta je pokazala specifičan trend u kretanju udjela tokoferola ovisno o primijenjenoj temperaturi ubrzanog toplinskog tretmana. Međutim, rezultati istraživanja ukazuju na to da više tokoferola imaju uzorci dalmatinskih sorti (Oblica i Levantinka) kontrole i onih čije je maslinovo tijesto tretirano ubrzanim toplinskim tretmanom na 25 °C. Dok, su više koncentracije tokoferola istarskih sorti (Istarska bjelica i Rosulja) određene u uzorcima čije je tijesto tretirano pri višim temperaturama. Sastav tokoferola značajno ovisi o sorti što je vidljivo usporedbom rezultata pojedinih sorti (tablice 1-4). Značajan utjecaj sorte na sastav tokoferola su utvrdili i drugi autori (Mikrou i sur., 2020; Jukić Špika i sur., 2016; Jukić Špika i sur., 2015; Najafi i sur., 2015; Beltrán i sur., 2010; Dabbou i sur., 2009; Tura i sur., 2007).

Provedena je analiza varijance (ANOVA) s razinom vjerojatnosti od 95 % ($p \leq 0,05$). Tablice 5-8 prikazuju rezultate statističke obrade podataka. F-vrijednost i p-vrijednost (razina

značajnosti) se koriste za testiranje hipoteza o glavnim učincima i interakciji (Moore i sur., 2014).

Obje nezavisne varijable su pokazale visoki statistički značaj utjecaja na koncentraciju α -, β - i γ -tokoferola. Rezultati ukazuju na to kako su način proizvodnje i sorta faktori koji imaju značajan utjecaj na koncentraciju α -, β - i γ -tokoferola. Interakcija načina proizvodnje i sorte je također pokazala statistički visoko značajan utjecaj na koncentraciju α -, β - i γ -tokoferola (tablice 5-7).

Tablica 5. Rezultati statističke obrade za α -tokoferol

Izvor varijabilnosti	<i>F-vrijednost</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F-kritična vrijednost</i>
Način proizvodnje	22,05	$\leq 0,001$	2,16
Sorta	2822,73	$\leq 0,001$	2,67
Interakcija	33,41	$\leq 0,001$	1,68

Tablica 6. Rezultati statističke obrade za β -tokoferol

Izvor varijabilnosti	<i>F-vrijednost</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F-kritična vrijednost</i>
Način proizvodnje	5,32	$\leq 0,001$	2,16
Sorta	96,48	$\leq 0,001$	2,67
Interakcija	5,09	$\leq 0,001$	1,68

Tablica 7. Rezultati statističke obrade za γ -tokoferol

Izvor varijabilnosti	<i>F-vrijednost</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F-kritična vrijednost</i>
Način proizvodnje	10,91	$\leq 0,001$	2,16
Sorta	2321,85	$\leq 0,001$	2,67
Interakcija	24,81	$\leq 0,001$	1,68

Tablica 8. Rezultati statističke obrade za δ -tokoferol

Izvor varijabilnosti	<i>F-vrijednost</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F-kritična vrijednost</i>
Način proizvodnje	1,05	0,394	2,16
Sorta	2,23	0,088	2,67
Interakcija	2,63	$\leq 0,001$	1,68

Utjecaj načina proizvodnje i sorte na koncentraciju δ -tokoferola nije statistički značajan (tablica 8). Ti su rezultati očekivani budući se δ -tokoferol nasumično pojavljivao u pojedinim uzorcima u izrazito niskim koncentracijama.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivana djevičanska maslinova ulja autohtonih sorti maslina sadrže 73-273 mg/kg α -tokoferola, ovisno o sorti i načinu proizvodnje ulja.
2. U svim uzorcima je α -tokoferol bio najzastupljeniji. Sljedeći najzastupljeniji tokoferol bio je γ -tokoferol, a prati ga β -tokoferol. δ -tokoferol je bio prisutan u niskim koncentracijama samo u pojedinim uzorcima.
3. Sastav i koncentracija tokoferola u uzorcima značajno ovisi o sorti. Ulja proizvedena iz sorti Rosulje, Oblice i Levantinke su imale značajno više koncentracije tokoferola u odnosu na djevičansko maslinovo ulje Istarske bjelice.
4. Koncentracija tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima značajno ovisi i o načinu proizvodnje, odnosno primijenjenim temperaturama ubrzanog toplinskog tretmana. Ovisno o temperaturi ubrzanog toplinskog tretmana tijesta masline prije miješenja, djevičansko maslinovo ulje svake sorte pokazalo je specifičan fenomen u promjeni koncentracije tokoferola.

6. LITERATURA

Abd El-Hamied WA, Girgis AY, Allam MH (2019) Effect of extraction systems on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Arab Univ J Agric Sci* **27**, 2167-2176. <https://doi.org/10.21608/ajs.2019.16556.1080>

Abenoza M, Benito M, Saldaña G, Álvarez I, Raso J, Sánchez-Gimeno AC (2013) Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. *Food Bioproc Tech* **6**, 1367-1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>

Abidi SL (2000) Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J Chromatogr A* **881**, 197-216. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00131-X)

Acar A, Arslan D (2017) Some technological pretreatments applied during olive oil extraction: impacts on quality parameters and minor constituents. *Glob J Agric Innov Res Dev* **4**, 47-57. <https://doi.org/10.15377/2409-9813.2017.04.6>

Amirante P, Clodoveo ML, Dugo G, Leone A, Tamborrino A (2006) Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: Influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality. *Food Chem* **98**, 797-805. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.040>

Aparicio R, Luna G (2002) Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 614-627. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L)

Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G i sur. (2008) Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem* **109**, 743-754. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.034>

Bakre SM, Gadmale DK, Toche RB, Gaikwad VB (2015) Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography. *J Food Sci Technol* **52**, 3093-3098. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1309-7>

Barouh N, Bourlieu-Lacanal C, Figueroa-Espinoza MC, Durand E, Villeneuve P (2021) Tocopherols as antioxidants in lipid-based systems: The combination of chemical and

physicochemical interactions determines their efficiency. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **21**, 642-688. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12867>

Bejaoui MA, Beltrán G, Sánchez-Ortiz A, Sánchez S, Jiménez A (2015) Continuous high power ultrasound treatment before malaxation, a laboratory scale approach: Effect on virgin olive oil quality criteria and yield. *Eur J Lipid Sci Technol* **118**, 332-336. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500020>

Beltrán G, Jiménez A, del Rio C, Sánchez S, Martínez L, Uceda M i sur. (2010) Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *J Food Compost Anal* **23**, 633-639. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.003>

Bengana M, Bakhouché A, Lozano-Sánchez J, Amir Y, Youyou A, Segura-Carretero A i sur. (2013) Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Res Int* **54**, 1868-1875. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.037>

Blekas G, Tsimidou M, Boskou D (1995) Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chem* **52**, 289-294. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)92826-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)92826-6)

Boskou D (2002) Olive oil. U: Gunstone FD (ured.) Vegetable oils in food technology: Composition properties and uses, Blackwell Publishing, Oxford/Copenhagen/Victoria/Berlin/Paris, str. 244-277.

Boskou D (2008) Phenolic compounds in olives and olive oil. U: Boskou D (ured.) Olive oil: Minor constituents and health, CRC Press, Boca Raton, str. 12-36.

Boskou D (2011) Olive oil. U: Gunstone FD (ured.) Vegetable oils in food technology Composition, properties and uses, 2 izd., Blackwell Publishing, Chichester/Oxford/Ames, str. 243-272.

Boskou D, Blekas G, Tsimidou M (2006) Olive oil composition. U: Boskou D (ured.) Olive oil chemistry and technology, 2 izd., AOCS Publishing, New York, str. 41-72.

Brigelius-Flohé R (2006) Bioactivity of vitamin E. *Nutr Res Rev* **19**, 174-186. <https://doi.org/10.1017/S0954422407202938>

- Brkić Bubola K, Koprivnjak O, Sladonja B, Škevin D, Belobrajčić I (2012) Chemical and sensorial changes of Croatian monovarietal olive oils during ripening. *Eur J Lipid Sci Technol* **114**, 1400-1408. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200121>
- Burton GW (1994) Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* **53**, 251-262. <https://doi.org/10.1079/pns19940030>
- Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* **10**, 357-382. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.10.070190.002041>
- Caporaso N (2016) Virgin olive oils: Environmental conditions, agronomical factors and processing technology affecting the chemistry of flavor profile. *J Food Chem Nanotechnol* **2**, 21-31. <http://dx.doi.org/10.17756/jfcn.2016-007>
- Castelli G, Bianco ID, Mizutamari RK (2018) Polyphenol content in argentinean commercial extra virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **120**, 1800124. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800124>
- Chen H, Angiuli M, Ferrari C, Tombari E, Salvetti G, Bramanti E (2011) Tocopherol speciation as first screening for the assessment of extra virgin olive oil quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography/fluorescence detector. *Food Chem* **125**, 1423-1429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.026>
- Chira M, Ghayth R, Calas-Blanchard C, Rouillon R, Ben Salem R (2020) Phenolic, tocopherols and squalene profiles (HPLC-UV) of Chemlali-Sfax olive oil according to extraction procedure. *Rev Roum Chim* **65**, 179-190. <https://doi.org/10.33224/rrch/2020.65.2.07>
- Clodoveo ML (2012) Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview. *Trends Food Sci Technol* **25**, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.004>
- Clodoveo ML, Durante V, La Notte D, Punzi R, Gambacorta G (2013) Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur J Lipid Sci Technol* **115**, 1062-1069. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200426>
- Clodoveo ML, Hbaieb RH (2013) Beyond the traditional virgin olive oil extraction systems: Searching innovative and sustainable plant engineering solutions. *Food Res Int* **54**, 1926-1933. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.014>

Conte LS, Moret S, Purcaro G (2010) HPLC in food analysis. U: Corradini D, Phillips TM (ured.) Handbook of HPLC, 2 izd., CRC Press, Boca Raton, str. 562-660.

Cserhati T, Forgacs E (1999) Chromatography in food science and technology, CRC Press, Boca Raton/New York/Oxon.

Cunha SC, Amaral JS, Fernandes JO, Oliveira MBPP (2006) Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *J Agric Food Chem* **54**, 3351-3356. <https://doi.org/10.1021/jf053102n>

CX 210-1999 Standard for Named Vegetable Oils.

Dabbou S, Issaoui M, Esposto S, Sifi S, Taticchi A, Servili M i sur. (2009) Cultivar and growing area effects on minor compounds of olive oil from autochthonous and European introduced cultivars in Tunisia. *J Sci Food Agric* **89**, 1314-1325. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3588>

Dağdelen A, Tümen G, Özcan MM, Dündar E (2012) Determination of tocopherol contents of some olive varieties harvested at different ripening periods. *Nat Prod Res* **26**, 1454-1457. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.605364>

Deiana M, Rosa A, Cao CF, Pirisi FM, Bandino G, Dessi MA (2002) Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of α -tocopherol concentration. *J Agric Food Chem* **50**, 4342-4346. <https://doi.org/10.1021/jf020033t>

Delegirana uredba Komisije (EU) 2022/2104 od 29. srpnja 2022. o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje i o stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EEZ) br. 2568/91 i Provedbene uredbe Komisije (EU) br. 29/2012. *Službeni list Europske unije* **284**, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32022R2104> Pristupljeno 8. svibnja 2023.

DellaPenna D, Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 711-738. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>

Di Giovacchino L (2013) Technological aspects. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of olive oil: Analysis and properties, 2 izd., New York, str. 57-96.

Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 587-601. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M)

Dimić E, Lužaić T, Vujašinović V, Esalami S, Rabrenović B, Fijat A (2016) Antioksidativni kapacitet devičanskih maslinovih ulja različitih maslinarskih regija Libije pri umerenim temperaturama. *Uljarstvo* **47**, 31-37.

Doosselaere P (2013) Production of oils. U: Hamm W, Hamilton RJ, Calliauw G (ured.) Edible oil processing, 2 izd., John Wiley & Sons, Oxford/Chichester/Hoboken, str. 55-96.

Escuderos ME, Sayago A, Morales MT, Aparicio R (2009) Evaluation of α -tocopherol in virgin olive oil by a luminiscent method. *Grasas y Aceites* **60**, 336-342.
<https://doi.org/10.3989/gya.108308>

Espadas-Aldana G, Vialle C, Belaud JP, Vaca-Garcia C, Sablayrolles C (2019) Analysis and trends for Life Cycle Assessment of olive oil production. *Sustain Prod Consum* **19**, 216-230.
<https://doi.org/10.1016/j.spc.2019.04.003>

Esposito S, Veneziani G, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio I i sur. (2013) Flash thermal conditioning of olive pastes during the olive oil mechanical extraction process: Impact on the structural modifications of pastes and oil quality. *J Agric Food Chem* **61**, 4953-4960.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf400037v>

Fiori F, Di Lecce G, Boselli E, Pieralisi G, Frega NG (2014) Effects of olive paste fast preheating on the quality of extra virgin olive oil during storage. *LWT* **58**, 511-518.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.021>

Firestone D (2005) Olive oil. U: Shahidi F (ured.) Bailey's industrial oil and fat products, 6 izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 2:303-332.

Giri D, Kothai E, Chowhan DA, Hayat F (2022) High performance liquid chromatography (HPLC) : Principle, types, instrumentation and applications. [High Performance Liquid Chromatography \(HPLC\) : Principle, Types, Instrumentation and Applications - Laboratoryinfo.com](https://www.laboratoryinfo.com) Pristupljeno 23. travnja 2023.

Godena S, Damijanić K, Milotić A (2009) Morfološke karakteristike masline sorte Rosinjola u Istri. *Pomol Croat* **15**, 27-36.

Gómez-Rico A, Inarejos-Garcia AM, Salvador MD, Fregapane G (2009) Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils

(*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *J Agric Food Chem* **57**, 3587-3595.
<https://doi.org/10.1021/jf803505w>

Gutiérrez F, Jiménez B, Ruíz A, Albi MA (1999) Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *J Agric Food Chem* **47**, 121-127.
<https://doi.org/10.1021/jf980684i>

HRN EN ISO 9936:2016 Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherol and tocotrienol contents by highperformance liquid chromatography.

Inarejos-García AM, Fregapane G, Salvador MD (2011) Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur Food Res Technol* **232**, 441-451.
<https://doi.org/10.1007/s00217-010-1406-4>

Inarejos-García AM, Gómez-Rico A, Salvador MD, Fregapane G (2009) Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *Eur Food Res Technol* **228**, 671-677. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0977-9>

Iqdiam BM, Mostafa H, Goodrich-Schneider R, Baker GL, Welt B, Marshall MR (2018) High power ultrasound: Impact on olive paste temperature, malaxation time, extraction efficiency, and characteristics of extra virgin olive oil. *Food Bioproc Tech* **11**, 634-644. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2035-8>

Jiménez A, Beltrán G, Uceda M (2007a) High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrason Sonochem* **14**, 725-731.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.006>

Jiménez B, Sánchez-Ortiz A, Rivas A (2014) Influence of the malaxation time and olive ripening stage on oil quality and phenolic compounds of virgin olive oils. *Int J Food Sci Technol* **49**, 2521-2527. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12592>

Jiménez MS, Velarte R, Castillo JR (2007b) Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food Chem* **100**, 8-14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.003>

Jolayemi OS, Tokatli F, Ozen B (2016) Effects of malaxation temperature and harvest time on the chemical characteristics of olive oils. *Food Chem* **211**, 776-783. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.134>

Jukić Špika M, Kraljić K, Koprivnjak O, Škevin D, Žanetić M, Katalinić M (2015) Effect of agronomical factors and storage conditions on the tocopherol content of Oblica and Leccino virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc* **92**, 1293-1301. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2688-2>

Jukić Špika M, Kraljić K, Škevin D (2016) Tocopherols: Chemical structure, bioactivity, and variability in Croatian virgin olive oils. U: Boskou D, Clodoveo M (ured.) *Products from olive tree*, InTech, Rijeka, str. 317-329.

Kaftan A, Elmaci Y (2011) Aroma characterization of virgin olive oil from two Turkish olive varieties by SPME/GC/MS. *Int J Food Prop* **14**, 1160-1169. <https://doi.org/10.1080/10942910903453371>

Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>

Karant S, Yu WH, Mastronardi CA, McCann SM (2003) Vitamin E stimulates luteinizing hormone-releasing hormone and ascorbic acid release from medial basal hypothalamus of adult male rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 779-785. <https://doi.org/10.1177/15353702-0322807-02>

Kiritsakis A, Sakellaropoulos N (2017) Olive fruit harvest and processing and their effects on oil functional compounds. U: Kiritsakis A, Shahidi F (ured.) *Olives and olive oil as functional foods: Bioactivity, chemistry and processing*, John Wiley & Sons, Chichester/ Hoboken, str. 127-146.

Klepo T, Benčić Đ (2014) Utjecaj genotipa na kemijski sastav maslinovog ulja. *Glasnik zaštite bilja* **5**, 44-53.

Koprivnjak O, Šetić E, Lušić D, Perušić Đ (2002) Autochthonous olive cultivars in Istria (Croatia) - morphological characteristics and oil quality. U: *Proceedings of ECOLIVA - 1st International IFOAM Conference on Organic Olive Production*, Jaén, str. 599-605.

Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Matejić 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.

Krichene D, Allalout A, Mancebo-Campos V, Salvador MD, Zarrouk M, Fregapane G (2010) Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chem* **121**, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.026>

Kyçyk O, Aguilera MP, Gaforio JJ, Jiménez A, Beltrán G (2016) Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba. *J Sci Food Agric* **96**, 4143-4150. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7616>

Leone A, Esposto S, Tamborrino A, Romaniello R, Taticchi A, Urbani S i sur. (2015) Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **118**, 308-317. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400616>

Leone A, Tamborrino A, Romaniello R, Zagaria R, Sabella E (2014) Specification and implementation of a continuous microwave-assisted system for paste malaxation in an olive oil extraction plant. *Biosyst Eng* **125**, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.06.017>

Liao S, Omay SO, Börmel L, Kluge S, Schubert M, Wallert M i sur. (2022) Vitamin E and metabolic health: Relevance of interactions with other micronutrients. *Antioxidants* **11**, 1785. <https://doi.org/10.3390/antiox11091785>

Llorent-Martínez EJ, Fernández-de Córdoba ML, Ortega-Barrales P, Ruiz-Medina A (2014) Quantitation of metals during the extraction of virgin olive oil from olives using ICP-MS after microwave-assisted acid digestion. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 1823-1830. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2511-5>

Márquez AJ (2003) Monitoring carotenoid and chlorophyll pigments in virgin olive oil by visible-near infrared transmittance spectroscopy. On-line application. *J Near Infrared Spectrosc* **11**, 219-226. <https://doi.org/10.1255/jnirs.368>

Martakos I, Kostakis M, Dasenaki M, Pentogennis M, Thomaidis N (2020) Simultaneous determination of pigments, tocopherols, and squalene in Greek olive oils: A study of the

influence of cultivation and oil-production parameters. *Foods* **9**, 31. <https://doi.org/doi:10.3390/foods9010031>

Mateos R, Dominguez MM, Espartero JL, Cert A (2003) Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **51**, 7170-7175. <https://doi.org/10.1021/jf034415q>

Medouni-Haroune L, Zaidi F, Medouni-Adrar S, Kecha M (2018) Olive pomace: From an olive mill waste to a resource, an overview of the new treatments. *J Crit Rev* **5**, 1-6. <http://dx.doi.org/10.22159/jcr.2018v5i5.28840>

Mikrou T, Pantelidou E, Parasyri N, Papaioannou A, Kapsokafalou M, Gardeli C i sur. (2020) Varietal and geographical discrimination of Greek monovarietal extra virgin olive oils based on squalene, tocopherol, and fatty acid composition. *Molecules* **25**, 3818. <https://doi.org/10.3390/molecules25173818>

Milinovic J, Garcia R, Rato AE, Cabrita MJ (2019) Rapid assessment of monovarietal Portuguese extra virgin olive oil's (EVOO's) fatty acids by Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy (FT-NIRS). *Eur J Lipid Sci Technol* **121**, 1800392. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800392>

Minguez-Mosquera IM, Gandul-Rojas B, Garrido-Fernandez J, Gallardo-Guerrero L (1990) Pigments present in virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* **67**, 192-196. <https://doi.org/10.1007/BF02539624>

Ministarstvo poljoprivrede RH (2017) Maslinarstvo. <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute teme/poljoprivreda-173/poljoprivreda-175/maslinarstvo/194>. Pristupljeno 12. travnja 2023.

Moore DS, McCabe GP, Craig BA (2014) Introduction to the practice of statistics, 8 izd., W.H. Freeman, New York, str. 1211.

Mousa YM, Gerasopoulos D, Metzidakis I, Kiritsakis A (1996) Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *J Sci Food Agric* **71**, 345-350. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199607\)71:3<345::AID-JSFA590>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199607)71:3<345::AID-JSFA590>3.0.CO;2-T)

Mousavi S, Stanzione V, Mariotti R, Mastio V, Azariadis A, Passeri V i sur. (2022) Bioactive compound profiling of olive fruit: The contribution of genotype. *Antioxidants* **11**, 672. <https://doi.org/10.3390/antiox11040672>

- Murkovic M, Lechner S, Pietzka A, Bratacos M, Katzogiannos E (2004) Analysis of minor components in olive oil. *J Biochem Biophys Methods* **61**, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.002>
- Najafi V, Barzegar M, Sahari MA (2015) Physicochemical properties and oxidative stability of some virgin and processed olive oils. *J Agr Sci Tech* **17**, 847-858.
- Ninfali P, Aluigi G, Bacchiocca M, Magnani M (2001) Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *J Amer Oil Chem Soc* **78**, 243-247. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0252-9>
- Nollet LML (2012) Fat-soluble vitamins. U: Nollet LML, Toldra F (ured.) Food analysis by HPLC, 3 izd., CRC Press, Boca Raton, str. 271-324.
- Özcan MM, Al Juhaimi F, Uslu N, Ghafoor K, Ahmed IAM, Babiker EE (2019) The effect of olive varieties on fatty acid composition and tocopherol contents of cold pressed virgin olive oils. *J Oleo Sci* **68**, 307-310. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18251>
- Paiva-Martins F, Kiritsakis A (2017) Olive fruit and olive oil composition and their functional compounds. U: Kiritsakis A, Shahidi F (ured.) Olives and olive oil as functional foods: Bioactivity, chemistry and processing, John Wiley & Sons, Chichester/ Hoboken, str. 81-116.
- Pejić A (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na antioksidacijski kapacitet i aktivnost djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Pérez AG, León L, Pascual M, De la Rosa R, Belaj A, Sanz C (2019) Analysis of olive (*Olea Europaea* L.) genetic resources in relation to the content of vitamin E in virgin olive oil. *Antioxidants* **8**, 242. <https://doi.org/10.3390/antiox8080242>
- Peri C (2014) Extra-virgin olive oil storage and handling. U: Peri C (ured.) The extra-virgin olive oil handbook, John Wiley & Sons, Oxford/Chichester/Hoboken, str. 165-178.
- Petrakis C (2006) Olive oil extraction. U: Boskou D (ured.) Olive oil chemistry and technology, 2 izd., AOCS Publishing, New York, str. 191-225.
- Psomiadou E, Tsimidou M (1999) On the role of squalene in olive oil stability. *J Agric Food Chem* **47**, 4025-4032. <https://doi.org/10.1021/jf990173b>
- Puljić I (2022) Maslina. *Trut(h)* **1**, 58-60.

- Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Iannucci E, Lucera L (2003) Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 57-67. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390018>
- Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, Vacca G, De Simone F (2002) Rate of degradation of α - tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *J Agric Food Chem* **50**, 5566-5570. <https://doi.org/10.1021/jf011063j>
- Rizvi S, Raza SZ, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F (2014) The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* **14**, 157-165.
- Rotondi A, Morrone L, Bertazza G, Neri L (2021) Effect of duration of olive storage on chemical and sensory quality of extra virgin olive oils. *Foods* **10**, 2296. <https://doi.org/10.3390/foods10102296>
- Sakouhi F, Absalon C, Flamini G, Cioni PL, Kallel H, Boukhchina S (2010) Lipid components of olive oil from Tunisian Cv. Sayali: Characterization and authenticity. *C R Biol* **333**, 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.05.001>
- Saldeen K, Saldeen T (2005) Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr Res* **25**, 877-889. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.019>
- Samaniego-Sánchez C, Quesada-Granados JJ, López-García de la Serrana H, López-Martínez MC (2010) β -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *J Food Compost Anal* **23**, 671-676. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.010>
- Schwartz H, Ollilainen V, Piironen V, Lampi A (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J Food Compost Anal* **21**, 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.07.012>
- Serra-Majem LI, Ngo de la Cruz J, Ribas L, Tur JA (2003) Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* **57**, S2-7. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601801>
- Servili M, Taticchi A, Esposto S, Sordini B, Urbani S (2012) Technological aspects of olive oil production. U: Muzzalupo I (ured.) Olive germplasm - The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy, InTechOpen, Rijeka, str. 151-172.

Shendi EG, Ozay DS, Ozkaya MT, Ustunel NF (2018) Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *OCL - Oilseeds fats Crops Lipids* **25**, 602. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018052>

Stark AH, Madar Z (2002) Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev* **60**, 170-176. <https://doi.org/10.1301/002966402320243250>

Stefanoudaki E, Koutsaftakis A, Harwood JL (2011) Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chem* **127**, 1481-1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.120>

Suvarna V, Sharma D (2021) Overview of olive oil in vascular dysfunction. U: Preedy VR, Watson RR (ured.) *Olives and olive oil in health and disease prevention*, 2 izd., Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Kidlington, str. 165-174.

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>

Šarolić M, Gugić M, Marijanović Z, Šuste M (2014) Virgin olive oil and nutrition. *Journal FOOD IN HEALTH AND DISEASE* **3**, 38-43.

Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A (2007) Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. *Pomol Croat* **13**, 17-29.

Tamborrino A, Romaniello R, Caponio F, Squeo G, Leone A (2019) Combined industrial olive oil extraction plant using ultrasounds, microwave, and heat exchange: Impact on olive oil quality and yield. *J Food Eng* **245**, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.019>

Tura D, Gigliotti C, Pedò S, Failla O, Bassi D, Serraiocco A (2007) Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea* L.) and correlations with oxidative stability. *Sci Hort* **112**, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.036>

Uceda M, Jiménez A, Beltrán G (2006) Olive oil extraction and quality. *Grasas y Aceites* **57**, 25-31. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.19>

Uredba (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan

snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007. *Službeni list Europske unije* **347**, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32013R1308> Pristupljeno 8. svibnja 2023.

Veillet S, Tomao V, Bornard I, Ruiz K, Chemat F (2009) Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. *C R Chim* **12**, 895-904. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.01.003>

Vitha MF (2017) *Chromatography principles and instrumentation*, John Wiley & Sons, Hoboken.

Vossen P (2007) Olive oil: History, production, and characteristics of the World's classic oils. *HortScience* **42**, 1093-1110. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1093>

Wang X, Quinn PJ (2000) The location and function of vitamin E in membranes (Review). *Mol Membr Biol* **17**, 143-156. <https://doi.org/10.1080/09687680010000311>

Yalcin S, Schreiner M (2018) 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/s13197-017-2929-5>

Yorulmaz A, Tekin A, Turan S (2011) Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *Eur J Lipid Sci Technol* **113**, 637-643. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000481>

Zeiner M, Juranovic-Cindric I, Škevin D (2010) Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 1248-1252. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000006>

Žanetić M, Gugić M (2005) Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. *Pomol Croat* **11**, 31-41.

Žanetić M, Gugić M (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomol Croat* **12**, 159-173.

Žanetić M, Jukić Špika M, Ožić MM, Brkić Bubola K (2021) Comparative study of volatile compounds and sensory characteristics of Dalmatian monovarietal virgin olive oils. *Plants* **10**, 1995. <https://doi.org/10.3390/plants10101995>

Žanetić M, Štruelj D, Perica S, Rade D, Škevin D, Serraiocco A i sur. (2010) Chemical composition of Dalmatian virgin olive oils from autochthonous olive cultivars Oblica, Lastovka and Levantinka. *Riv Ital Sostanze Grasse* **86**, 24-33.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Mateo Radić, 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