

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Petra Brezjan

**UTJECAJ ULTRAZVUKA I
PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG
POLJA NA SASTAV POLIFENOLA
HRVATSKIH DJEVIČANSKIH
MASLINOVIH ULJA**

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



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

ZAHVALA

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić na mentorstvu i stručnim savjetima tijekom izrade mog diplomskog rada. Također se zahvaljujem mag. ing. aliment. techn. Katarini Filipan na pomoći i savjetima koji su izradu učinili lakšom.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci, kako tijekom izrade ovog rada, tako i tijekom cijelog studija.

Posebice hvala mom ocu, hvala ti što nikada nisi odustao.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ ULTRAZVUKA I PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA SASTAV POLIFENOLA HRVATSKIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

Petra Brezjan, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212395

Sažetak: Djevičanska maslinova ulja (DMU) u ovom radu su proizvedena iz hrvatskih sorti maslina, uz ultrazvuk (UZV) i pulsirajuće električno polje (PEP) kao predtretman miješenju, s ciljem utvrđivanja utjecaja navedenih inovativnih tehnologija na sastav polifenola. Predtretman UZV-om je proveden varirajući snagu ultrazvučne kupelji od 256 do 640 W te vrijeme tretmana od 3 do 17 min, dok je za predtretman PEP-em korišteno električno polje jačine od 1 do 8 kV/cm te vrijeme tretmana od 18 do 30 s. Polifenoli su određeni HPLC metodom uz UV detekciju. Rezultati su pokazali kako izbor sorte ima najveći utjecaj na sastav polifenola. DMU-a iz istarskih sorti sadrže viši udio polifenola nego DMU-a iz dalmatinskih sorti. Snage UZV-a i vremena predtretmana negativano su utjecali na sastav polifenola kod svih istraživanih sorti, dok su jakost električnog polja i vremena predtretmana, ovisno o sorti, utjecali ili negativno ili nisu značajno utjecali. Osim toga, negativan utjecaj PEP-a je manje izražen nego utjecaj UZV-a.

Glavne riječi: *djevičansko maslinovo ulje, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, polifenoli, hrvatske autohtone sorte*

Rad sadrži: 57 stranica, 7 slika, 19 tablica, 59 literaturnih 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. aliment. techn.

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. Zoran Herceg (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujan 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

INFLUENCE OF ULTRASOUND AND PULSED ELECTRIC FIELD ON THE POLYPHENOLIC
COMPOSITION OF CROATIAN VIRGIN OLIVE OILS

Petra Brezjan, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212395

Abstract: In this study, virgin olive oils (VOO) from Croatian olive cultivars were produced using ultrasound (US) and pulsed electric field (PEF) as pretreatment to malaxation to determine their influence on polyphenolic composition. For US pretreatment, the power of the ultrasonic bath was varied from 256 to 640 W and the treatment time from 3 to 17 min, whereas for PEF pretreatment, the electric field strength was varied from 1 to 8 kV/cm and the treatment time from 18 to 30 s. Polyphenols were determined by the HPLC method with UV detection. The results showed that the variety had the greatest influence on the composition of polyphenolic compounds in the produced VOO. Oils from Istrian varieties contained higher amounts of polyphenols than oils from Dalmatian varieties. US power and pretreatment time both had a negative effect on phenolic composition, while electric field strength and pretreatment time had either a negative or no significant effect, depending on the variety. In addition, the negative effect of PEF pretreatment is smaller than the effect of US treatment.

Keywords: *Virgin olive oil, ultrasound, pulsed electric field, phenolic compounds, Croatia olive varieties*

Thesis contains: 57 pages, 7 figures, 19 tables, 59 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, mag. ing. aliment. techn.*

Reviewers:

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

Thesis defended: September 25th, 2023

Sadržaj

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Djevičansko maslinovo ulje	2
2.1.1	Sorte maslina.....	3
2.1.2	Proces proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja	4
2.1.3	Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja	5
2.2	Inovativne tehnologije.....	12
2.2.1	Ultrazvuk.....	13
2.2.2	Pulsirajuće električno polje.....	15
3	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1	Materijali.....	17
3.1.1	Kemikalije.....	17
3.1.2	Uzorci djevičanskih maslinovih ulja.....	17
3.1.3	Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman ultrazvukom	17
3.1.4	Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman PEP-em	18
3.2	Metode.....	19
3.2.1	Ekstrakcija fenolnih spojeva iz DMU-a.....	19
3.2.2	Razdvajanje fenolnih spojeva pomoću HPLC-a.....	20
3.3	Obrada podataka	22
4	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1	Ultrazvuk.....	23
4.1.1	ANOVA	28
4.1.2	Korelacije	31
4.1.3	Analiza glavnih komponentata.....	34
4.2	Pulsirajuće električno polje	37
4.2.1	ANOVA	42
4.2.2	Korelacije	44
4.2.3	Analiza glavnih komponentata.....	47
5	ZAKLJUČCI.....	50
6	LITERATURA.....	51

1 UVOD

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) karakteristično po svojim senzorskim i nutritivnim svojstvima, sadrži visok udio mononezasićenih masnih kiselina kao i visok omjer $\omega 6:\omega 3$ masnih kiselina. Bogato je sekundarnim spojevima poput monoacilglicerola, diacilglicerola, ugljikovodika, sterola, alifatskih alkohola, tokoferola, pigmenta i fenolnih spojeva. Fenolni spojevi karakteristični za DMU su flavonoidi, sekoiridoidi, poput oleuropeina i ligstrozida, lignani, fenolne kiseline te fenolni alkoholi poput tirosola i hidroksitirosola. Fenolni spojevi su zaslužni za brojne biološke aktivnosti DMU-a kao što su antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, antitumorsko i antialergijsko djelovanje. Također, iako prisutni u niskim koncentracijama, fenolni spojevi mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju zbog koje dolazi do smanjenja nutritivne vrijednosti i senzorske kvalitete ulja. Udio fenolnih spojeva u DMU-u ovisi o brojnim čimbenicima kao što su udio u plodu te uvjeti tijekom proizvodnje i skladištenja ulja.

S ciljem unaprjeđenja proizvodnje DMU-a sve se više razvija primjena novih inovativnih tehnologija poput ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja (PEP) čijim se blagim uvjetima nastoje smanjiti negativni učinci miješenja maslinova tijesta. Primjena inovativnih tehnologija se temelji na sposobnosti razaranja stanične stijenke i membrane, uslijed čega nastaju pore te se povećava permeabilnost membrane, a u konačnici se postiže učinkovitija ekstrakcija ulja. Uvođenjem predtretmana ultrazvukom ili PEP-em nastoji se povećati prinos ulja, bez utjecaja na glavne komponente i senzorska svojstva uz očuvanje što većeg broja sekundarnih komponenata. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj predtretmana ultrazvukom i PEP-em na maslinovo tijesto tijekom proizvodnje DMU-a na sastav fenolnih spojeva prisutnih u DMU-ima proizvedenima iz hrvatskih autohtonih sorti maslina.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Djevičansko maslinovo ulje

Djevičansko maslinovo ulje je jestivo biljno ulje, žuto-zelene boje, koje se dobiva iz plodova masline (*Olea europaea* L.) te je primarni izvor masnoća u mediteranskoj prehrani. Sve je veća potražnja za vrhunskim DMU-em koje je karakteristično po jedinstvenim senzorskim i nutritivnim svojstvima zahvaljujući visokoj koncentraciji oleinske masne kiseline i prisutnosti sekundarnih metabolita poput fenolnih spojeva, tokoferola i hlapivih organskih spojeva (Tarapoulouzi i sur., 2022; Cecchi i sur., 2021). DMU se proizvodi iz plodova masline mehaničkim putem ili drugim fizičkim sredstvima, pod uvjetima koji ne dovode do promjena u ulju, s posebnim obraćanjem pažnje na toplinske uvjete. Plodovi maslina ne smiju biti podvrgnuti nikakvom tretmanu osim pranja, a proizvedeno ulje ne smije biti podvrgnuto nikakvim tretmanima osim dekantiranja, centrifugiranja i filtracije (Cecchi i sur., 2021).

Prema Uredbi (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća DMU-a se dijele na:

- a) Ekstra DMU; maslinovo ulje visoke kakvoće dobiveno izravno iz plodova maslina isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 0,8 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja;
- b) DMU; maslinovo ulje dobiveno izravno iz plodova maslina isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 2 g na 100 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina;
- c) Maslinovo ulje lampante; DMU koje sadrži više od 2 g na 100 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina.

Kvaliteta DMU-a se određuje na temelju udjela slobodnih masnih kiselina, peroksidnog broja, specifične apsorpcije u spektru ultraljubičastog zračenja, senzorske analize i koncentracije specifičnih spojeva, a ovisi o procesu proizvodnje i uvjetima skladištenja. Udio masnih kiselina te sastav i udio bioaktivnih spojeva ovise o geografskom položaju i klimatskim uvjetima, sezoni berbe, starosti stabla te postupcima i tretmanom tijekom berbe maslina i proizvodnje ulja (Kalogianni i sur., 2019).

2.1.1 Sorte maslina

Republika Hrvatska obiluje autohtonim sortama maslina, a razlikujemo istarske sorte poput rosulje i istarske bjelice te dalmatinske sorte poput oblice i levantinke (Jemrić, 2013). Kemijski sastav pojedinih sorta ovisi o genetskom podrijetlu, geografskim i agronomskim čimbenicima, a sorta utječe na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva ulja (Žanetić i sur., 2021). Razlike između ukupnih fenolnih spojeva između različitih sorta također ovise o prisutnim enzimima u plodovima kao i o njihovoj aktivnosti (Jukić Špika i sur., 2022).

Oblica je najzastupljenija sorta masline u Hrvatskoj koja čini oko 75 % ukupnog broja stabala maslina. Prednost ove sorte je otpornost na sušu i niske temperature tijekom zime, a ulje dobiveno iz ploda se smatra visoko kvalitetnim (Jemrić, 2013; Štrikić i sur., 2009). Oblica ima stablo srednjeg rasta sa zaobljenom krošnjom, plodove okruglog oblika prosječne težine 5 g s udjelom ulja od 18 do 21 %. Tijekom sazrijevanja boja ploda prelazi iz svijetlo zelene, preko ružičaste do tamno ljubičaste. S obzirom da sazrijeva neravnomjerno, tijekom berbe su zastupljeni plodovi od zelene do tamnoljubičaste boje (Žanetić i sur., 2021; Zeiner i sur., 2010). DMU proizvedeno iz sorte oblice ima voćni okus s laganom notom zelene trave i dobro izraženom i uravnoteženom gorčinom i oporosti, dok je trpkost slabo izražena. Smatra se slatkastim uljem sa zadovoljavajućom i zaokruženom gorčinom i pikantnosti (Žanetić i sur., 2021).

Levantinka je dalmatinska sorta, koja ima gustu zaobljenu krošnju, srednje krupne plodove izduženog eliptičnog oblika, koji se formiraju u grozdove. Srednja težina ploda je oko 4,5 g, a sadrži 20 % ulja. DMU proizvedeno iz sorte levantinke ima aromu badema popraćenu notama zelene trave i laganim voćnim okusom. Smatra se da ima dobro izbalansiranu gorčinu i pikantnost, što se povezuje s mirisom na zelenu travu (Žanetić i sur., 2021).

Istarska bjelica je istarska sorta masline koja se odlikuje kvalitetnim uljem, te je otporna na niske temperature (Jemrić, 2013). Karakteristična je po boji plodova koji tijekom zrenja ne mijenjaju boju u tamnu nego zadržavaju zeleno-žute nijanse. Ima visok prinos ulja te podnosi kasniju berbu pri čemu ulje zadržava organoleptička svojstva i stabilnost (Benčić i sur., 2009). Istarska bjelica kasno sazrijeva i karakterizira se dobrom produktivnošću s visokim masenim udjelom ulja (Poljuha i sur., 2008). Ulje iz plodova sorte istarske bjelice karakterizirano je intenzivnom gorčinom i oporosti te slabo izraženim zelenim i voćnim mirisima. Takva senzorska svojstva se pripisuju visokoj koncentraciji fenolnih spojeva koji značajno doprinose nutritivnoj vrijednosti ulja (Lukić i sur., 2017).

Rosulja je istarska sorta masline koja se najviše uzgaja u okolici Rovinja, Vodnjana i Vrsara, a uzgaja se za proizvodnju ulja. Plod je jajolikog oblika srednje težine, zaobljenog vrha. Udio ulja u plodu iznosi 35,29 % (Godena i sur., 2009). Rosulja je pogodna kao sirovina za proizvodnju ulja, otporna je na slanoću i dobro uspijeva na crvenici, karakterističnom tlu Istre (Poljuha i sur., 2008).

2.1.2 Proces proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja

Konvencionalna proizvodnja DMU-a se sastoji od čišćenja, pranja, mljevenja, miješenja i separacije ulja. Nakon branja plodova provodi se čišćenje uklanjanjem lišća i nečistoća, nakon čega se masline peru vodom. Čišćenjem i pranjem se uklanjaju nečistoće i strani materijali poput prašine, lišća, kamenja, a provodi se radi sprječavanja onečišćenja, poboljšanja kvalitete ulja, ali i kako bi se osigurala mehanička sigurnost opreme. S obzirom da se DMU ne rafinira, potrebno je provesti pranje kako bi se uklonile nečistoće i kontaminanti s površine ploda (poput pesticida), koji se kod drugih ulja uklanjaju tijekom rafinacije (Kalogianni i sur., 2019; Kapellakis i sur., 2008).

Mljevenje je mehanički proces usitnjavanja maslina uslijed čega dolazi do oštećenja staničnih stijenki te se iz stanica ispuštaju kapljice ulja. Uz mljevenje pulpe u ovom procesu dolazi i do drobljenja sjemenke. Upotreba odgovarajuće opreme i uvjeta utječu na kvalitetu ulja. Tijekom mljevenja dolazi do zagrijavanja maslinovog tijesta što poboljšava ekstrakciju fenolnih spojeva u ulje (Kalogianni i sur., 2019; Kapellakis i sur., 2008).

Mljevenjem se dobiva maslinovo tijesto koje se potom mijesi s ciljem razbijanja nastale emulzije, odnosno provodi se miješenje. Kapljice ulja se oslobađaju iz uljnih stanica te se spajaju u veće kapi čime se postiže bolje odvajanje uljne od vodene faze. Miješenjem se postiže bolje iskorištenje procesa izdvajanja ulja, bolja kvaliteta i viša nutritivna vrijednost ulja, a obično traje od 30 do 45 minuta. Povećanje temperature rezultira manjom viskoznošću ulja i većim iskorištenjem, no može doći do gubitaka hlapljivih spojeva te promjene boje i povećanja kiselosti. Temperatura, trajanje miješenja, sastav zraka te dodatak vode imaju visoki utjecaj na reološka svojstva maslinovog tijesta, a samim time i na iskorištenje procesa proizvodnje i kvalitetu ulja (Kalogianni i sur., 2019; Veneziani i sur., 2016; Kapellakis i sur., 2008).

Separacija ulja iz tijesta se u prošlosti provodila prešanjem na hidrauličkim prešama dok se danas uglavnom upotrebljavaju centrifugalni sustavi. Odvajanje se temelji na

centrifugalnoj sili koja odvaja ulje od ostatka tijesta s obzirom na različitu gustoću. Tijekom razdvajanja ovisno o vrsti separatora nastaju dvije (komina s vodom i ulje) ili tri faze (komina, vegetabilna voda i ulje) (Kalogianni i sur., 2019; Kapellakis i sur., 2008). Proizvedeno ulje se dodatno čisti filtracijom ili bistri taloženjem čime se uklanja zaostala voda te mehaničke nečistoće, nakon čega se puni u boce (Veneziani i sur., 2016).

2.1.3 Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja

Glavne komponente DMU-a su triacilgliceroli (97 - 99 %), no sadrži i brojne manje zastupljene komponente poput monoacilglicerola, diacilglicerola, ugljikovodika, sterola, alifatskih alkohola, tokoferola, pigmenta i fenolnih spojeva koji ostaju sačuvani tijekom proizvodnje. Navedene komponente doprinose fizikalno-kemijskim svojstvima, aromi, nutritivnoj vrijednosti i zdravstvenim učincima DMU-a (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Uncu i Ozen, 2020).

DMU sadrži visok udio mononezasićenih masnih kiselina (65 – 83 %), posebice oleinske, niže udjele zasićenih masnih kiselina, najviše palmitinske, te neke višestruko nezasićene masne kiseline, poput linolne. Karakterizira ga i visok omjer $\omega 6:\omega 3$ masnih kiselina, te ne sadrži *trans*-masne kiseline (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Foscolou i sur., 2018). Najzastupljenije masne kiseline u DMU-u su oleinska, linolna, palmitinska, stearinska i linolenska masna kiselina (Tarapoulouzi i sur., 2022). Udio masnih kiselina zastupljenih u DMU-u prikazan je u tablici 1. Sastav varira ovisno o geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, sorti, stupnju zrelosti, uvjetima ekstrakcije i uvjetima skladištenja ulja (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Tablica 1. Sastav masnih kiselina u DMU-u (Tarapoulouzi i sur., 2022)

Masna kiselina		Udio (%)
Mirisitnska	C14:0	0,05
Palmitinska	C16:0	9,4 - 19,5
Palmitoleinska	C16:1	0,6 - 3,2
Heptadekanska	C17:0	0,07 - 0,13
Heptadecenska	C17:1	0,17 - 0,24
Stearinska	C18:0	1,4 – 3,0
Oleinska	C18:1	63,1, – 79,7
Linolna	C18:2	6,6 – 14,8
α -linolenska	C18:3	0,46 - 0,69
Arahinska	C20:0	0,3 – 0,4
Gadoleinska	C20:1	0,2 – 0,3
Behenska	C22:0	0,09 – 0,12
Lignocerinska	C24:0	0,04 - 0,05

Koncentracija diacilglicerola iznosi od 1 do 2,8 %, a koncentracija monoacilglicerola iznosi do 0,25 % (Tarapoulouzi i sur., 2022). Dva najzastupljenija ugljikovodika DMU-a su skvalen i β -karoten, a prisutni su i diterpenski i triterpenski ugljikovodici. Upravo se skvalen smatra djelomično odgovornim za pozitivan učinak DMU-a na zdravlje. Udio skvalena u ulju se kreće od 200 do 8260 mg/kg ulja, a ovisi o sorti masline (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Ukupna količina sterola u DMU-u iznosi od 1000 do 2000 mg/kg ulja, a prisutni su uobičajeni steroli (4-desmetilsteroli), 4α -metilsteroli, triterpenski alkoholi i triterpenski dialkoholi. Dominantni steroli su β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol i kampesterol (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Alifatski i aromatski alkoholi u maslinovom ulju se nalaze u slobodnom ili esterificiranom obliku. Najvažniji su masni alkoholi (dokoanol, tetrakoanol, heksakoanol i oktakoanol) i diterpenski alkoholi (fitol i geranilgeraniol) (Boskou i sur., 2006).

Tokoferoli su vitamini topljivi u mastima značajni zbog svojeg antioksidacijskog djelovanja. Utječu na povećanje stabilnosti ulja sprječavajući termooksidaciju tijekom prženja te fotooksidaciju tijekom skladištenja ulja (Ghanbari i sur., 2012). 90 % prisutnih tokoferola

čini α -tokoferol u slobodnom obliku, dok su β -, γ - i δ -tokoferoli zastupljeni u značajno manjim koncentracijama. Razina α -tokoferola je povezana s visokom razinom pigmenta klorofila i antioksidacijskim svojstvima (Jimenez-Lopez i sur., 2020), a zrenjem plodova dolazi do smanjenja koncentracije tokoferola (Boskou i sur., 2006).

Zeleno žuta boja DMU-a je rezultat prisutnosti pigmenata klorofila (feofitin) i karotenoida (lutein i β -karoten). Na razinu prisutnih pigmenata u ulju utječu sorta masline, stupanj zrelosti maslina, način izdvajanja ulja i uvjeti skladištenja (Boskou i sur., 2006).

2.1.3.1 Fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti prisutni u biljkama, topljivi u vodi, čiji je zajednički element aromatski prsten povezan s najmanje jednom hidroksilnom skupinom. Uz fenolne spojeve vežu se brojne biološke aktivnosti kao što su antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, antitumorsko, antialergijsko i antihipertenzivno djelovanje, povećanje aktivnosti vitamina A i β -karotena, prevencija kroničnih bolesti, povećana imunološka aktivnost te smanjenje razine kolesterola u plazmi (Chávez Ramos i sur., 2019; Veneziani i sur., 2016; Ghanbari i sur., 2012). Navedeni pozitivni zdravstveni učinci su usko povezani s njihovom kemijskom strukturom, posebno zbog prisutnosti jedne ili više hidroksilnih skupina (Rodríguez-López i sur., 2020). Prisutni u malim koncentracijama u hrani, fenolni spojevi mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju zbog koje dolazi do smanjenja nutritivne vrijednosti i senzorske kvalitete (Keceli i sur., 2017; Veneziani i sur., 2016).

Fenolni spojevi se mogu klasificirati prema njihovim kemijskim svojstvima: prema broju aromatskih prstena, broju ugljika, broju hidroksilnih skupina, topljivosti, itd (Kolton i sur., 2022). U tablici 2 prikazana je podjela fenolnih spojeva s obzirom na broj aromatskih prstena i broj ugljikovih atoma.

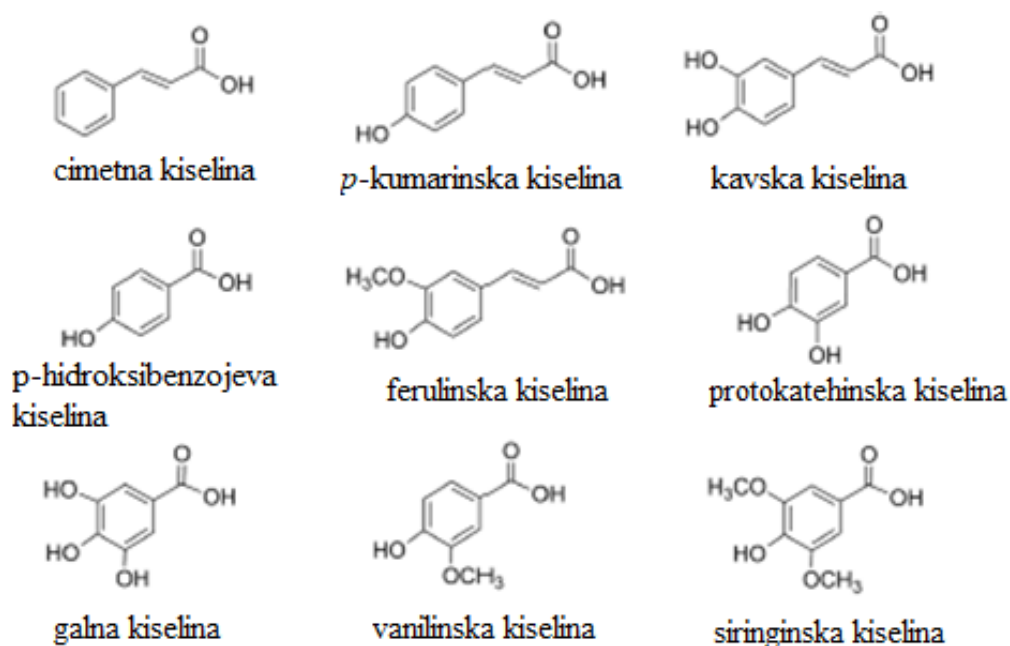
Tablica 2. Klasifikacija fenolnih spojeva (Kolton i sur., 2022)

Broj aromatskih prstena	Broj ugljikovih atoma	Kategorija
Jedan	C6	Jednostavni fenoli, benzokinoni
	C6-C1	Fenolne kiseline i fenolni aldehidi
	C6-C2	Acetofenoni i fenilacetatne kiseline, fenolni alkoholi
	C6-C3	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi
	C6-C4	Naftokinoni
Dva	C6-C1-C6	Ksantoni
	C6-C2-C6	Stilbeni i antrakinoni
	C6-C3-C6	Flavonoidi, izoflavonoidi, neoflavonoidi, hidroksi-izokromani
	C6-C4 -C6	sekoiridoidi
	(C6-C3) ₂	Lignani, neolignani
Tri ili više	(C6) _n	Katehol melanini
	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidi
	(C6-C3) _m	Lignini
	(C6-C3-C6) _n	Kondenzirani tanini

Fenolni spojevi prisutni u DMU-u se prema kemijskoj strukturi klasificiraju u 6 grupa: fenolne kiseline, lignane, flavonoide, fenolne alkohole, sekoiridoide i hidroksi-izokromane (Rodríguez-López i sur., 2020). Sekoiridoidni derivati glikozida, oleuropein i ligstrozid, lignani i drugi složeni flavonoidi su glavni polarni sastojci DMU-a, dok su fenolne kiseline i jednostavni fenoli poput tirozola i hidroksitirozola zastupljeni u manjim koncentracijama (Tarapoulouzi i sur., 2022). Ukupna koncentracija fenola se kreće između 50 i 1000 mg/kg, a najčešće između 100 i 300 mg/kg (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Fenolni spojevi uvelike doprinose senzorskim svojstvima DMU-a, daju gorak i opor te jak, voćni okus (Serreli i sur., 2018; Veneziani i sur., 2016). Oksidacijska stabilnost ulja osim o sastavu masnih kiselina,

značajno ovisi i o navedenim polarnim komponentama zbog čega je maslinovo ulje, s obzirom da sadrži značajno veći udio fenolnih spojeva uspoređujući ga s drugim biljnim uljima, oksidacijski znatno stabilnije (Tarapoulouzi i sur., 2022; Serreli i sur., 2018).

Fenolne kiseline prisutne u DMU-u se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: derivate hidroksibenzojeve kiseline (*p*-hidrokibenzojeva, protokatehinska, vanilinska, siringinska i galna kiselina) i derivate hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, kavaska, sinapinska i cimetna kiselina) (slika 1) (Rodríguez-López i sur., 2020).



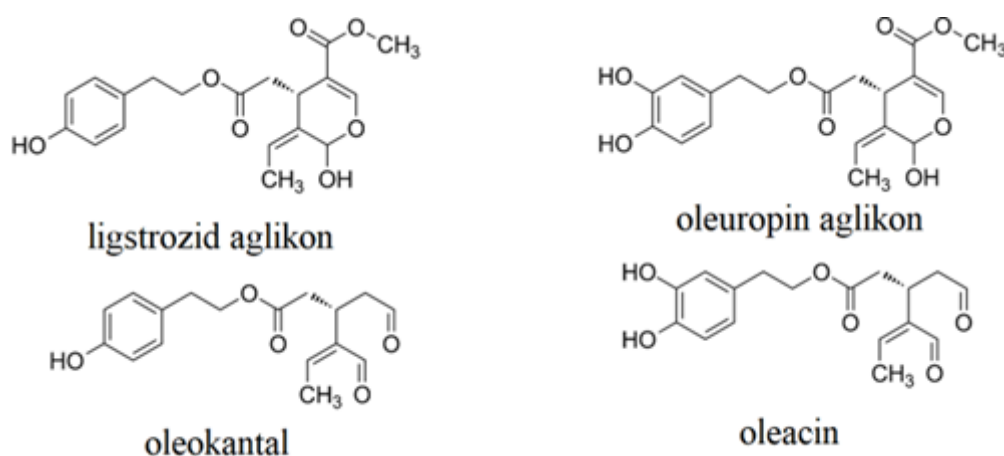
Slika 1. Strukturne formule fenolnih kiselina prisutnih u DMU-u (Bongiorno i sur., 2021)

Flavonoidi su biljni pigmenti koji se sastoje od dva benzenska prstena povezana preko jedinice s tri C atoma kemijske formule C₆-C₃-C₆ (Kaurinović i Vastag, 2019). Flavonoidi se dijele u nekoliko skupina: flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanoli. Najčešće prisutni u DMU-u su apigenin, luteolin i diosmetin, koji pripadaju skupini flavona (Bongiorno i sur., 2021; Rodríguez-López i sur., 2020).

Fenolni alkoholi su karakterizirani hidroksilnom skupinom vezanom na aromatsku ugljikovodičnu skupinu (Rodríguez-López i sur., 2020). Najznačajniji fenolni alkoholi prisutni u DMU-u su hidroksitirosol, tirosol, *p*-hidroksifenil etanol, etanol-glukozid, 2-(3-4-dihidroksi

fenil)-etil acetat i 2-(4-hidroksifenil)-etil acetat (Tarapoulouzi i sur., 2022). Hidroksitirosol i tirosol su u svježem DMU-u prisutni u niskim koncentracijama, ali se tijekom skladištenja, uslijed oksidacije DMU-a, njihova koncentracija povećava (Finicelli i sur., 2021).

Sekoiridoide karakterizira fenil etil alkohol vezan za elenolnu kiselinu ili njene derivate (Rodríguez-López i sur., 2020). Glavni glikozidi prisutni u plodu masline su demetiloleuropein, oleuropein i ligstrozid, no tijekom zrenja ploda i tehnoloških procesa djelovanjem glukozidaze transformiraju se u odgovarajuće oleuropin i ligstrozid aglikone. Navedena dva aglikonska oblika su vrlo nestabilni te se djelovanjem endogenih glikozidaza ili pak kemijski razgrađuju u nekoliko zatvorenih i stabilnih monoaldehidnih oblika ili alternativno u otvoreni prsten dialdehidnih oblika (oleokantal ili oleacin) (slika 2) (Bongiorno i sur., 2021; Ghanbari i sur., 2012). Upravo su sekoiridoidi odgovorni za opor i gorak okus DMU-a (Keceli i sur., 2017).



Slika 2. Strukturne formule sekoiridoida prisutnih u DMU-u (Bongiorno i sur., 2021)

Najzastupljeniji lignani su 1-acetoksipinoresinol i pinoresinol, a karakterizira ih visoki antioksidacijski kapacitet (Bongiorno i sur., 2021). Od hidroksi-izokromana karakteristični su spojevi 1-fenil-6,7-dihidroksi-izokroman i njegov derivat 1-(39-metoksi-49-hidroksi) fenil-6,7-dihidroksi-izokroman (Rodríguez-López i sur., 2020). Oni se tijekom proizvodnje ekstrahiraju u ulje bez biokemijskih promjena (Finicelli i sur., 2021).

Koncentracija i sastav fenolnih spojeva u DMU-u ovisi o nekoliko čimbenika uključujući stupanj zrelosti ploda, sortu masline, klimatske uvjete, tlo, navodnjavanje, uvjete

proizvodnje ulja (temperaturu, postupak mljevenja, sadržaj vode) te vrijeme i uvjete skladištenja ulja (Zeb, 2021; Visioli i sur., 2020; Ghanbari i sur., 2012). Sinteza fenolnih spojeva odvija se u plodu masline kemijskim i enzimskim djelovanjem pomoću oksidoreduktaza te β -glukozidaza, koja hidrolizira fenolne glikozide (Finicelli i sur., 2021). Udio fenolnih spojeva se kvantitativno i kvalitativno mijenja tijekom dozrijevanja ploda, a najviši udio je kada boja pokožice prelazi iz žuto zelene u ljubičastu boju. Daljnjim dozrijevanjem ploda ukupna količina fenolnih spojeva se smanjuje jer je u toj fazi zrenja aktivna esteraza koja razgrađuje oleuropein. Koncentracija ligstrozida je također veća u nezrelim maslinama, a smanjuje se tijekom sazrijevanja. Nadalje, sazrijevanjem plodova dolazi do hidrolize komponenata s višom molekularnom težinom na tirosol i hidroksitirosol pa se njihova koncentracija zrenjem plodova povećava (Finicelli i sur., 2021; Yahyaoui i sur., 2019; Ghanbari i sur., 2012).

Sastav fenolnih spojeva u plodu nije jednak sastavu u ulju jer fenolni spojevi tijekom proizvodnje podliježu kemijskim i biokemijskim promjenama koje utječu na njihovu strukturu i raspodjelu između uljne i vodene faze (Clodoveo i sur., 2015). Prisutnost fenolnih spojeva u DMU-u ovisi o različitim endogenim enzimima plodova masline i uvjetima ekstrakcije (Ghanbari i sur., 2012). Prilikom mljevenja plodova masline dolazi do oslobađanja endogenih enzima masline, celulaze, hemicelulaze, pektinaze, poligalakturonaze (PGAL), lipaze, β -glukozidaze (β -GLU), polifenoloksidaze (PPO), peroksidaze (POD) i lipoksigenaze (LOX). Oni se aktiviraju i sudjeluju u nastajanju i transformiranju fenolnih i hlapljivih spojeva u DMU-u (Veneziani i sur., 2016). β -GLU katalizira hidrolizu oleuropina, ligstrozida i oligosaharida stvarajući aldehidne aglikone koji su topljivi u uljnoj fazi pa se udio fenolnih spojeva u ulju povećava. PPO i POD kataliziraju oksidaciju fenolnih spojeva čime se njihov udio smanjuje, a može doći i do polimerizacije slobodnih fenola (Clodoveo i sur., 2015; Ghanbari i sur., 2012).

Temperatura, vrijeme trajanja i udio kisika tijekom miješenja također utječu na koncentraciju fenolnih spojeva. Produljenjem trajanja miješenja dolazi do povećanja koncentracije fenola do određene točke, a daljnjim produljenjem vremena koncentracija opada (Kalogianni i sur., 2019). Viša temperatura miješenja potiče otpuštanje fenola, katalizirano hemicelulazom i PGAL-om, iz polisaharida stanične stijenke, poboljšavajući njihovu topljivost u uljnoj fazi (Veneziani i sur., 2016). No s druge strane, visoka temperatura tijekom miješenja uzrokuje smanjenje koncentracije tirosola, hidroksitirosola, vanilina i *p*-kumarinske kiseline, dok se koncentracija hidroksitirosol acetata i vanilinske kiseline povećava (Lukić i sur. 2017).

O temperaturi miješenja ovisi i aktivnost enzima pa je tako PPO najaktivnija na 50 °C, POD na 37 °C, LOX na 30 °C, a hiperoksid liaza na 15 °C, dok je na 30 °C djelomično inhibirana. Održavanjem nižih temperatura tijekom miješenja smanjuje se aktivnost POD-e čime se sprječava nepoželjna enzimska oksidacija fenola i smanjenje njihove koncentracije u ulju (Veneziani i sur., 2016). S druge strane, fenolni spojevi su na nižim temperaturama djelomično topljivi u ulju, a povećanjem temperature do određene vrijednosti topljivost se povećava, a posljedično se povećava i njihova koncentracija u DMU-u. S obzirom da aktivnost PPO-e i POD-e ovisi o kisiku i vodi, moguće ih je inhibirati kontroliranjem atmosfere tijekom miješenja te na taj način spriječiti njihovo negativno djelovanje na fenolne spojeve bez intervencija na temperaturu miješenja (Clodoveo i sur., 2015). Prilikom odabira adekvatnih parametara miješenja (vrijeme, temperatura i sastav atmosfere) potrebno je u obzir uzeti zrelost plodova i sortu masline (Kalogianni i sur., 2019).

S obzirom na značajan utjecaj enzima u kvaliteti finalnog proizvoda, tijekom miješenja moguće je dodati komercijalne pripravke enzima kao što su pektolitici, hemicelulolitici i celulolitici čime se pospješuje degradacija stanične stjenke ploda i smanjuje se udio kompleksnijih hidrofilnih fenola, njihovom razgradnjom u slobodne fenole koji se potom ekstrahiraju u ulje, no takav postupak nije dozvoljen u proizvodnji DMU (Ghanbari i sur., 2012). Sastav fenolnih spojeva DMU-a je podložan promjenama i nakon proizvodnje, tijekom skladištenja. Do promjena u sastavu dolazi zbog oksidacije i hidrolitičkih reakcija te razgradnje sekoiridoida zbog čega raste udio jednostavnih fenola poput hidroksitirosola i tirolosa (Finicelli i sur., 2021).

2.2 Inovativne tehnologije

Inovativne tehnologije poput ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja sve se više istražuju s ciljem unapređenja proizvodnih procesa u prehrambenoj industriji. Njihovom upotrebom se nastoji proizvesti hrana poboljšane nutritivne vrijednosti i svojstava te postići održivost procesa. Glavni nedostaci inovativnih tehnologija su im visoka cijena te zabrinutost potrošača o njihovim učincima na zdravlje i okoliš (Pérez i sur., 2021; Clodoveo i sur., 2014). Na njihovu implementaciju u industriji mogu utjecati brojni čimbenici poput tehnološke izvedivosti, tehničke mogućnosti, utjecaja na zdravlje, ekonomske izvedivosti, ekološke prihvatljivosti, prihvatljivosti od strane potrošača i investicijskih mogućnosti (Clodoveo i sur., 2014).

U proizvodnji DMU-a primjena inovativnih tehnologija se temelji na sposobnosti razaranja stanične stijenke i membrane, stvaranju pora i povećanju permeabilnosti membrane ploda masline što dovodi do učinkovitije ekstrakcije i boljeg izdvajanja ulja tijekom miješenja (Pérez i sur., 2021). Miješenje je proizvodni proces u kojem se maslinovo tijesto mijesi pod kontroliranim uvjetima, što omogućuje smanjenje viskoznosti ulja (Nardella i sur., 2021). Kapljice ulja se međusobno povezuju kako bi se pospješila ekstrakcija, no trajanje i temperatura miješenja mogu negativno djelovati na kvalitetu DMU-a. Primjenom blagih inovativnih tehnologija nastoje se smanjiti negativni učinci miješenja. Također, uvođenjem novih tehnologija u proces proizvodnje moguće je reducirati potrošnju energije i količinu otpadne vode čime se nastoji poboljšati održivost proizvodnje (Pérez i sur., 2021; Veneziani i sur., 2016).

2.2.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val frekvencija između 20 kHz i 100 MHz, koji se prema intenzitetu dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta od 1 do 10 MHz i ultrazvuk visokog intenziteta od 20 do 100 kHz. Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje kavitaciju, a posljedično i razaranje stanične membrane u biljnim tkivima (Nardella i sur., 2021). Kavitacija je fizikalni fenomen u kojem dolazi do nastanka, rasta i implodije mjehurića u kratkom vremenu uz otpuštanje velike količine energije (Bejaoui i sur., 2017). Širenjem ultrazvučnih valova u tekućem mediju nastaju longitudinalni valovi, koji uzrokuju izmjene pozitivnih i negativnih tlakova u njoj. Kada vrijednost negativnog tlaka padne ispod tlaka pare te tekućine ona prelazi iz tekućeg u plinovito agregatno stanje, pri čemu se stvaraju kavitacijski mjehurići (Clodoveo, 2019). Veličina kavitacijskih mjehurića oscilira kako oscilira i tlak te se tijekom nekoliko ciklusa mjehurići povećavaju do kritične veličine nakon čega više ne mogu apsorbirati energiju te dolazi do njihove implodije, odnosno urušavanja mjehurića u sebe. U neposrednoj blizini tijekom implodije kavitacijskog mjehurića dolazi do porasta temperature i tlaka, stvaraju se makroturbulencije, sudari između čestica pri visokim brzinama te poremećaji u mikroporama što rezultira razaranjem stanične stijenke i ubrzanom difuzijom staničnog materijala (Nardella i sur., 2021; Clodoveo, 2019; Clodoveo i sur., 2017; Clodoveo i sur., 2014). Ultrazvuk razaranjem stanične stijenke omogućuje poboljšanu ekstrakciju bioaktivnih spojeva i veći prijenos mase, inaktivira patogene i mikroorganizme koji uzrokuju kvarenje te, ovisno o parametrima obrade i vrsti enzima, aktivira ili inhibira enzimsku aktivnost (Nardella i sur.,

2021; Clodoveo i sur., 2017). Ultrazvuk se smatra ekološki prihvatljivom tehnologijom jer ne stvara dodatan otpad te nije toksičan za ljude (Pérez i sur., 2021).

Upotreba ultrazvuka kao predtretmana miješenju u proizvodnji DMU-a može rezultirati skraćivanjem trajanja miješenja, učinkovitijom ekstrakcijom ulja s povećanom koncentracijom poželjnih komponenata poput fenolnih spojeva, karotenoida i tokoferola i povećanjem antioksidacijskog kapaciteta bez utjecaja na senzorska svojstva (Pérez i sur., 2021; Clodoveo, 2019; Clodoveo i sur., 2014). U dosadašnjim istraživanjima, tretman ultrazvukom nije pokazao utjecaj na osnovne parametre kvalitete ulja, dok je zamijećeno različito djelovanje na udio fenolnih spojeva. Koncentracija fenolnih spojeva nakon tretmana ultrazvukom ovisi o mehaničkim, biokemijskim (enzimska aktivnost) i kemijskim reakcijama (ravnoteža između uljne i vodene faze) na koje utječu procesni parametri (snaga ultrazvuka, vrijeme tretiranja i temperatura tijekom tretmana) (Nardella i sur., 2021).

Dva su glavna mehanizma djelovanja ultrazvuka na maslinovo tijesto, mehanički i toplinski učinak. Mehanički učinak nastaje zbog fenomena kavitacije koji rezultira razaranjem stanične stijenke neoštećenih uljnih stanica i većim prijenosom mase. Toplinski učinak nastaje uslijed zagrijavanja materijala zbog apsorpcije ultrazvučne energije tijekom tretiranja (Veneziani i sur., 2016; Clodoveo i sur., 2014). Tijekom porasta temperature tijesta smanjuje se viskoznost ulja i poboljšava njegova ekstrakcija (Nardella i sur., 2021). Do porasta udjela fenolnih spojeva nakon tretiranja ultrazvukom dolazi zbog oštećenja stanične membrane čime se olakšava njihovo otpuštanje iz stanica u ulje, ali i zbog djelovanja ultrazvuka na enzime (Nardella i sur., 2021; Yahyaoui i sur, 2019). S druge strane, do smanjenja udjela fenolnih spojeva nakon tretiranja ultrazvukom dolazi zbog porasta temperature tijesta i sila smicanja koje izazivaju promjene u kemijskoj strukturi fenolnih spojeva (Nardella i sur., 2021).

Ultrazvučni valovi mogu aktivirati ili inhibirati nekoliko procesa kataliziranih enzimima, koji utječu na strukture i funkcije bioloških molekula. Do inaktivacije enzima može doći kroz tri mehanizma, koji mogu djelovati pojedinačno ili kombinirano. Prvi mehanizam je utjecaj porasta temperature tijekom kavitacije, drugi je utjecaj nastalih slobodnih radikala koji nastaju sonolizom vode, a treći je utjecaj sila smicanja koje nastaju tijekom implozije kavitacijskog mjehurića (Yahyaoui i sur., 2019). Dvojaki utjecaj ultrazvuka na primjeru fenolnih spojeva vidljiv je kod utjecaja temperature. Ultrazvuk visokog intenziteta inaktivira PPO-u te tako sprječava oksidaciju fenolnih spojeva tijekom miješenja. Međutim, kod kratkotrajnog tretmana ultrazvukom pri nižoj snazi, početnim zagrijavanjem tijesta može doći

do razgradnje fenolnih spojeva i aktivacije PPO-e koja potom utječe na smanjenje koncentracije fenolnih spojeva. S druge strane, porast temperature može poboljšati difuziju i topljivost fenolnih spojeva što rezultira boljom ekstrakcijom i u konačnici većom koncentracijom fenolnih spojeva u ulju (Nardella i sur., 2021). Yahyaoui i sur. (2019) su proveli istraživanje predtretmana maslinovog tijesta pomoću ultrazvuka te su zabilježili smanjenje aktivnosti POD-e povećanjem duljine trajanja tretmana. S druge strane aktivnost PPO-e je rasla s porastom trajanja tretmana, što se može objasniti postizanjem optimalnih temperatura za aktivnosti navedenih enzima pri različitim duljinama trajanja tretmana.

2.2.2 Pulsirajuće električno polje

Tretman PEP-em uključuje primjenu kratkih impulsa struje visokog napona koji uzrokuju poremećaje u stanicama. Intenzitet tretmana ovisi o jačini električnog polja, broju i trajanju električnih impulsa te veličini stanica, a rezultira stvaranjem trajnih ili privremenih pora u staničnoj stijenci (Clodoveo i sur., 2014; Clodoveo, 2013). Tijekom tretiranja PEP-em može se primijeniti visoka ili umjerena jakost polja. PEP visokog intenziteta smatra se alternativom konvencionalnim tehnikama konzerviranja hrane zbog sposobnosti inaktivacije mikroorganizama, dok PEP niskog intenziteta uzrokuje permeabilizaciju tkiva i rezultira povećanjem propusnosti stanične membrane (Pérez i sur., 2021).

Izlaganje stanica električnom polju u mikrosekundama uzrokuje elektroporaciju, što rezultira povećanjem transmembranskog potencijala i stvaranjem pora u slabim područjima membrane, povećava se njena propusnost, odnosno dolazi do permeabilizacije membrane (Pérez i sur., 2021; Veneziani i sur., 2016). Permeabilizacija omogućava lakše oslobađanje unutarstaničnih tvari iz stanice, dolazi do povećanog prijenosa mase, inaktiviraju se mikroorganizmi i degradativni enzimi čime se poboljšava kvaliteta i produljuje rok trajanja proizvoda (Clodoveo i sur., 2014; Huang i sur., 2012). Iako se PEP smatra ne-termalnom tehnologijom obrade hrane prilikom tretmana može doći do zagrijavanja, no usporedno s konvencionalnom toplinskom obradom, zagrijavanje je prilično nisko te ne utječe na nutritivnu vrijednost hrane, a može utjecati na smanjenje vremena obrade. Također, usporedno s konvencionalnim načinom proizvodnje, osigurava uštedu energije (Clodoveo i sur., 2014; Clodoveo, 2013).

Tretmane PEP-em potrošači prihvaćaju kao sigurne s obzirom da ne uključuju kemijske reakcije. Tretirani proizvodi ne izazivaju alergije te se percipiraju kao prirodniji usporedno s

konvencionalno prerađenom hranom, no postoji strah od negativnih posljedica primjene električne energije (Pérez i sur., 2021).

Tretman maslinovog tijesta PEP pozitivno utječe na prinos ekstrakcije ulja tako da olakšava otpuštanje malih kapljica ulja uslijed dezintegracije stanica te omogućuje kraće vrijeme miješenja tijesta pri nižim temperaturama. Uspoređujući ga s konvencionalnim postupkom, što rezultira uljem bolje kvalitete (Leone i sur., 2022; Clodoveo i sur., 2014). Abenoza i sur. (2013) su proučavali utjecaj tretmana tijesta masline PEP-em na ekstrakciju ulja pri različitim temperaturama i duljinom trajanja miješenja. Tretiranjem PEP-em (2 kV/cm) bez miješenja uočeno je poboljšanje ekstrakcije ulja za 54 %, a tretmanom PEP-em uz miješenje pri 15 °C povećanje ekstrakcije za 14,1 % što ukazuje da primjena tretmana PEP-em na maslinovo tijesto omogućuje smanjenje temperature miješenja bez utjecaja na prinos ekstrakcije.

Primjena PEP-a također ima potencijal povećati sadržaj nutrijenata poput fenolnih spojeva, fitosterola i tokoferola. Promjene u strukturi tkiva tijekom tretmana PEP-em ne utječu na narušavanje kvalitete i senzorskim svojstava ulja niti na oksidacijsku stabilnost s obzirom da ne uzrokuju promjene u udjelu slobodnih masnih kiselina ni peroksidnog broja (Pérez i sur., 2021; Kalogianni i sur., 2019). Tretman PEP-em također utječe na aktivnost enzima prisutnih u maslini kao što su POD, LOX, PGAL, β -GLU i PPO. Utjecaj na aktivnost navedenih enzima ovisi o jačini električnog polja, duljini tretmana te temperaturi koja se postiže tijekom tretiranja (Huang i sur., 2012). Učinak PEP-a varira ovisno o sorti, zemljopisnom podrijetlu, uvjetima uzgoja i procesnim parametrima proizvodnje (Navarro i sur., 2022; Pérez i sur., 2021).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Od komercijalnih kemikalija u ovom su istraživanju korišteni metanol HPLC čistoće (Honeywell, Offenbach, Njemačka), mravlja kiselina HPLC čistoće (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska), 2-(4-hidroksifenol) etanol (tirosol), 3,5 dimetoksi 4-hidroksi benzojeva kiselina (siringinska kiselina) te standardi fenolnih spojeva oleokantala, oleaceina i oleurozida (Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, SAD).

3.1.2 Uzorci djevičanskih maslinovih ulja

Kao materijal u ovom završnom radu korišteni su uzorci monosortnih djevičanskih maslinovih ulja četiriju hrvatskih autohtonih sorti: oblica, rosulja, istarska bjelica i levantinka. Ulja su proizvedena laboratorijskim postupcima koji su uključivali predtretman samljevenog tijesta maslina ultrazvukom (UZV) ili pulsirajućim električnim poljem (PEP) prije faze miješenja. Proizvedena ulja su do analize skladištena u bočicama od tamnog stakla na temperaturi do 20 °C.

3.1.3 Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman ultrazvukom

Za proizvodnju DMU-a uz predtretman ultrazvukom korištena je laboratorijska pilot-uljara Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska). Prije miješenja maslinovo tijesto se tretiralo ultrazvukom pomoću ultrazvučne kupelji Sonorex Digiplus (BANDELIN electronic, Berlin, Njemačka), maksimalne snage od 640 W, napona od 120 do 240 V i frekvencije od 20 kHz.

Plodovi masline (800 g) su nakon čišćenja i pranja samljeveni na mlinu čekićaru te se dobiveno maslinovo tijesto potom tretiralo ultrazvukom prema centralnom kompozitnom planu. Tretman se provodio varirajući snagu ultrazvučne kupelji od 256 do 640 W te vrijeme trajanja tretmana od 3 do 17 min na način prikazan u tablici 3. Nakon tretmana, izmjerila se temperatura tijesta pomoću ubodnog termometra te se tijesto podvrgnulo miješenju i izdvajanju ulja prema metodi opisanoj u diplomskom radu Pejić (2022).

Tablica 3. Uvjeti proizvodnje DMU-a uz tretman ultrazvukom

Uzorak	Paralele	Vrijeme (min)	Snaga ultrazvučne kupelji (W)
1	3	-	-
2	1	10	256
3	1	5	320
4	1	15	320
5	1	3	448
6	5	10	448
7	1	17	448
8	1	5	576
9	1	15	576
10	1	10	640

3.1.4 Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman PEP-em

Za proizvodnju DMU-a koristila se poluindustrijska uljara OLEUM 30 COMPACT (Enotecnica Pillan, Camisano Vicentino, Italija) te vodena kupelj Stuart SBS40 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD) i miješalice (VELP Scientifica, Usmate, Italija). Prije miješenja, maslinovo tijesto se tretiralo PEP-em na uređaju HVG60/1 PEP (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) s cilindričnim reaktorom volumena 1 L prema parametrima definiranim centralnim kompozitnim planom prikazanim u tablici 4. Predtretman i proizvodnja ulja provedeni su prema metodi opisanoj u završnom radu Makovac (2023). Jakost električnog polja se izračunava kao omjer električnog napona struje i udaljenosti između dviju ploča (formula [1]).

$$E \text{ (kV/cm)} = U \text{ (kV)} / d \text{ (cm)} \quad [1]$$

Gdje je:

E – jakost električnog polja (kV/cm)

U – napon električne struje (V)

d – udaljenost između ploča (cm)

Tablica 4. Uvjeti proizvodnje DMU-a uz tretman pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Paralele	Jakost električnog polja (kV/cm)	Vrijeme (s)
1	3	-	-
2	1	1	60
3	1	2	30
4	1	2	90
5	1	4,5	18
6	5	4,5	60
7	1	4,5	102
8	1	7	30
9	1	7	90
10	1	8	60

3.2 Metode

3.2.1 Ekstrakcija fenolnih spojeva iz DMU-a

Za ekstrakciju fenolnih spojeva DMU-a korištena je metoda Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2022) koja se temelji na neposrednoj ekstrakciji polarnih fenolnih spojeva pomoću otopine metanola te njihovoj identifikaciji HPLC-om uz UV detektor na valnoj duljini 280 nm. Kao interni standard koristila se siringinska kiselina ($\gamma = 0,015$ mg/mL), dok je eksterni standard (smjesa 0,030 mg/mL tirosola i 0,015 mg/mL siringinske kiseline) korišten kako bi se koncentracija ukupnih i pojedinačnih fenola izrazila u mg tirosola/kg ulja.

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je na način da se u epruvetu od 10 mL na analitičkoj vagi ABP 200-5DM (KERN & SOHN, Balingen, Njemačka) odvaži 4 g proizvedenog DMU-a te se doda 1 mL otopine internog standarda. Epruveta se zatvori čepom te snažno protrese 30 sekundi pomoću miješalice Vortexer LLG-uni TEXER (LLG-Labware, Meckenheim, Njemačka). U epruvetu se doda 5 mL otopine metanol/voda (80/20) te ponovno protrese 1 min. Fenolni spojevi ekstrahirani su uz pomoć ultrazvučne kupelji Sonorex Digiplus (BANDELIN electronic, Berlin, Njemačka) u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi, a

nakon toga se metanolni sloj odvojio centrifugiranjem na 5000 o/min u trajanju od 25 min na ROTINA 380 centrifugi (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Dobiveni supernatant se pomoću plastične šprice propustio kroz celulozni filter s veličinom pora 0,45 μm . Filtrirani uzorak se prebacio u vijalice za HPLC.

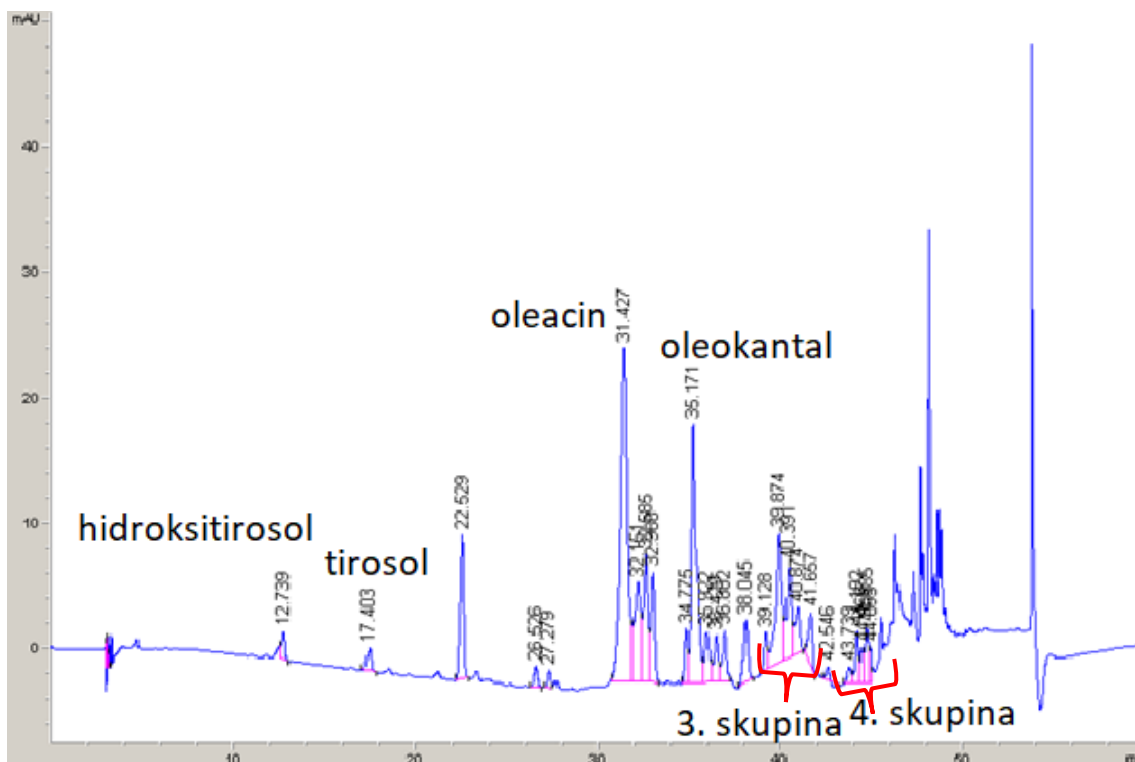
3.2.2 Razdvajanje fenolnih spojeva pomoću HPLC-a

Fenolni spojevi ekstrahirani iz DMU-a odijeljeni su na C18 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm x 4,6 mm, 5 μm , 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na LC 1200 HPLC sustav (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) prema metodi opisanoj u diplomskom radu Velagić (2016). Kao mobilne faze korištene su 0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B), uz gradijentan protok otapala od 1 mL/min. Promjenu gradijenta prikazuje tablica 5. Uz 24 injektirana uzorka fenolnih spojeva za razvoj metode u diplomskom radu Velagić (2016) dodatno su injektirani oleokantal, oleacein i oleurozid, kako bi se odredila njihova retencijska vremena i UV spektri korišteni za identifikaciju.

Tablica 5. Prikaz promjene gradijenta u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine B (%)
0	10
3	10
30	50
40	60
45	100
50	100
50,1	10
60	10

Primjer kromatograma prikazan je na slici 3. Iz površina ispod pikova izračunala se masena koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva (formula [2]) uzimajući u obzir omjer faktora odziva (RRF) siringinske kiseline i tirosola iz eksternog standarda (formule [3] – [5]).



Slika 3. Kromatogram (vlastita fotografija)

$$\gamma \text{ (mg/kg)} = (A \times 1000 \times \text{RRF}_{\text{sir/tir}} \times W_{\text{siringinska kiselina}}) / (A_{\text{siringinska kiselina}} \times W) \quad [2]$$

Gdje je:

A: površina pika pojedinog fenolnog spoja;

$A_{\text{siringinska kiselina}}$: površina pika internog standarda;

1000: faktor koji se koristi za izražavanje rezultata u mg/kg;

W: masa ulja u g;

$W_{\text{siringinska kiselina}}$: masa siringinske kiseline u mg koja se dodaje kao interni standard u uzorak.

$\text{RRF}_{\text{sir/tir}}$: omjer faktora odziva za izražavanje konačnih rezultata pomoću tirosola koji se računa prema formulama [3] – [5];

$$\text{RF}_{\text{siringinska kiselina}} (\mu\text{g}) = A_{\text{siringinske kiseline}} / \mu\text{g injektirane siringinske kiseline} \quad [3]$$

Gdje je:

$A_{\text{siringinske kiseline}}$: površina pika siringinske kiseline u eksternom standardu;

μg injektirane siringinske kiseline: masa siringinske kiseline u μg u eksternom standardu

$$RF_{\text{tirosol } (\mu\text{g})} = A_{\text{tirosola}} / \mu\text{g}_{\text{injektiranog tirosola}} \quad [4]$$

Gdje je:

A_{tirosola} : površina pika tirosola u eksternom standardu;

$\mu\text{g}_{\text{injektiranog tirosola}}$: masa tirosola u μg u eksternom standardu

$$RRF_{\text{sir/tir}} = RF_{\text{siringinska kiselina } \mu\text{g}} / RF_{\text{tirosol } \mu\text{g}} \quad [5]$$

Gdje je:

$RF_{\text{siringinska kiselina } \mu\text{g}}$: faktor odziva siringinske kiseline

$RF_{\text{tirosol } \mu\text{g}}$: faktor odziva tirosola

Vrijednost $RRF_{\text{sir/tir}}$ trebala bi biti konstantna i unutar raspona $5,1 \pm 0,4$, a omogućuje da se konačni rezultat izrazi kao tirosol, koristeći siringinsku kiselinu kao interni standard.

3.3 Obrada podataka

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija najmanje 2 paralelna određivanja. Kako bi se odredio utjecaj snage ultrazvuka i vremena tretiranja, odnosno jakosti električnog polja i vremena tretiranja te njihova interakcija, kao i utjecaj sorte, provedene su analiza varijance (ANOVA) s 95 %-tnom značajnosti te korelacije pojedinih fenola svake sorte s vremenom predtretmana i snagom ultrazvučne kupelji. Također, provedena je analiza glavnih komponenata (PCA) s ciljem uočavanja jačine pojedinog faktora na polifenolne spojeve DMU-a proizvedenog pomoću ultrazvuka i PEP-a. Navedene statističke metode provedene su u programu XLSTAT-u (Lumivero, Denver, SAD).

4 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj inovativnih tehnologija na sastav fenolnih spojeva DMU-a. Tijekom proizvodnje maslinovo tijesto je prije procesa miješenja bilo podvrgnuto predtretmanu ultrazvukom ili pulsirajućim električnim poljem, a sastav fenolnih spojeva tako proizvedenog DMU-a određen je prema metodi IOC (2022).

4.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val koji na biljni materijal može djelovati mehanički i toplinski. Mehaničkim djelovanjem, uslijed pojave kavitacije, dolazi do razaranja staničnih stijenki uljnih stanica čime se oslobađa njihov sadržaj i povećava prijenos mase. Porastom temperature tijekom tretmana ultrazvukom smanjuje se viskoznost ulja i poboljšava se ekstrakcija ulja. Upotrebom ultrazvuka kao predtretmana miješenju, tijekom proizvodnje DMU-a, moguće je skratiti vrijeme trajanje miješenja, a da se pritom omogućuje poboljšana ekstrakcija ulja i bioaktivnih komponenata poput fenolnih spojeva, bez utjecaja na osnovne parametre kvalitete ulja (Pérez i sur., 2021; Clodoveo, 2019; Clodoveo i sur., 2014).

Dobiveni rezultati masenih koncentracija fenolnih spojeva, prisutnih u DMU-u proizvedenom uz tretiranje ultrazvukom, podijeljeni su prema sortama i prikazani u tablicama 6, 7, 8 i 9. Dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija masenih koncentracija izraženih u mg tirosola/kg ulja.

U kontrolnim uzorcima vidljivo je da je najveća ukupna koncentracija fenolnih spojeva prisutna kod sorte istarske bjelice ($448,9 \pm 9,4$ mg/kg), a nešto manja kod rosulje ($421,8 \pm 11,5$ mg/kg). Kod levantinke iznosi $310,5 \pm 11,2$ mg/kg, dok je kod oblice značajno niža ($172,8 \pm 29,4$ mg/kg). Žanetić i sur. (2021) su u svom istraživanju hrvatskih autohtonih sorti maslina u DMU-u proizvedenom iz sorte oblice odredili koncentraciju ukupnih fenola $438,3 \pm 12,4$ mg izraženo kao mg galne kiseline/kg ulja, a u DMU-u proizvedenom iz sorte levantinke odredili koncentraciju ukupnih fenola $302,1 \pm 79,0$ mg izraženo kao mg galne kiseline/kg ulja. Poljuha i sur. (2008) su u DMU-u dobivenom od sorte istarske bjelice odredili ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva $206,9 \pm 63$ mg kavske kiseline/kg ulja, a u DMU-u dobivenom od sorte rosulje su odredili ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva $347,1 \pm 15,2$ mg kavske kiseline/kg ulja.

Tablica 6. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte rosulje (R) proizvedenih uz predtretman ultrazvukom, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)		Uzorak (sorta-vrijeme [min]-snaga ultrazvuka [W])									
		R-0-0	R-10-256	R-5-320	R-15-320	R-3-448	R-10-448	R-17-448	R-5-576	R-15-576	R-10-640
Identificirani spojevi	Hidroksitirosol	8,3 ± 0,8	2,5 ± 0	3,2 ± 1	2,1 ± 0	9,6 ± 0,4	3,3 ± 1,9	2,4 ± 0	2,4 ± 0	2,1 ± 0	2,1 ± 0,3
	Tirosol	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Oleacin	143,8 ± 3,7	128,2 ± 0,6	131,1 ± 0,3	134,8 ± 2,5	143,8 ± 1,8	134 ± 6,4	125,1 ± 2,1	118,5 ± 4	145,2 ± 1,1	128 ± 2,6
	Oleokantal	41,8 ± 0,7	41 ± 0,5	41,4 ± 1	44 ± 1	43,9 ± 0,7	42 ± 1,3	40,4 ± 0,7	40,3 ± 1,5	43,6 ± 0,4	41 ± 0,7
	Ligstrozid	9,6 ± 0,8	8 ± 0,2	8,7 ± 1,5	6,3 ± 0,1	9,8 ± 0,3	7,6 ± 1,2	6,4 ± 0,1	9,2 ± 0,6	6 ± 0,1	6 ± 0,1
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	89 ± 5,2	81,2 ± 1	83,7 ± 0,3	64,7 ± 1,3	86,7 ± 1,4	76,3 ± 3,7	69,9 ± 1	76,6 ± 3	63,8 ± 0,7	65,3 ± 1,6
	oko oleokantala	21,4 ± 0,8	19,8 ± 0,4	20,5 ± 1,5	16,8 ± 0,4	21 ± 0,5	18,7 ± 1,6	17 ± 0,3	20,9 ± 1	16,4 ± 0,3	16,3 ± 0,3
	3. skupina	80,2 ± 2,3	66,4 ± 0,7	67,6 ± 0,7	58,7 ± 2,6	68 ± 1,3	64,5 ± 4,1	59,9 ± 1	64,4 ± 2,5	60,6 ± 0,6	56,9 ± 0,9
	4. skupina	20,3 ± 2,6	16,5 ± 3,3	20,4 ± 0,2	18,1 ± 0,6	21,2 ± 0,2	20,2 ± 2	15,6 ± 2,4	20,2 ± 1,1	19,5 ± 0,5	18,7 ± 0,3
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi		9,7 ± 0,5	9,1 ± 0,2	9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	9,3 ± 0,1	8,7 ± 1,5	7,8 ± 0	7,9 ± 0,3	8,1 ± 0,1	7,9 ± 0,2
UKUPNI FENOLI		421,8 ± 11,5	372,8 ± 0,3	385,6 ± 6,5	349,7 ± 2,3	413,2 ± 6,6	374,6 ± 13	344,5 ± 7,6	360,3 ± 13,9	365,3 ± 2,9	342,2 ± 7,1

ND* – nije detektirano

Tablica 7. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte istarske bjelice (IB) proizvedenih uz predtretman ultrazvukom, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)		Uzorak (sorta-vrijeme [min]-snaga ultrazvuka [W])									
		IB-0-0	IB-10-256	IB-5-320	IB-15-320	IB-3-448	IB-10-448	IB-17-448	IB-5-576	IB-15-576	IB-10-640
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	2,5 ± 0,4	4,4 ± 1,6	2,4 ± 0	2,4 ± 0	2,3 ± 0,1	2 ± 0,2	2,1 ± 0	6,5 ± 1,7	1,6 ± 0	ND*
	Tirozol	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,1	4 ± 0	4,2 ± 0	4 ± 0	4 ± 0,3	4 ± 0	4,3 ± 0,1	3,6 ± 0	4,4 ± 0,1
	Oleacin	136,1 ± 23,1	163,6 ± 3,6	136,4 ± 0,1	146 ± 2,6	136 ± 1,7	140,2 ± 14,8	134 ± 11,1	178,7 ± 1,1	148,9 ± 0,6	118,4 ± 0,3
	Oleokantal	93,6 ± 2,2	106,3 ± 1,7	92,5 ± 0,1	107,2 ± 1	93,1 ± 1,1	100,4 ± 5,3	99,4 ± 18,3	108 ± 1,2	102,1 ± 0,9	104,2 ± 0,7
	Ligstrozid	21,7 ± 3,8	25,5 ± 0,1	19,3 ± 0	21,6 ± 0,2	16,8 ± 0,1	17,8 ± 2,6	17,5 ± 1,1	18,5 ± 0,1	12 ± 0,2	16 ± 1
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	51,1 ± 3,2	64,6 ± 1	49,5 ± 0	50,1 ± 0,7	44,6 ± 0,5	40,9 ± 5	40,7 ± 8,4	48,8 ± 0,3	30 ± 0	35 ± 0
	oko oleokantala	56,1 ± 8,4	64,6 ± 0,7	51,1 ± 0	56,3 ± 0	45,7 ± 0,3	47,3 ± 6,1	46,9 ± 1,3	48,8 ± 0,2	36,3 ± 0,8	46,8 ± 1,3
	3. skupina	56,6 ± 3,9	61,4 ± 1	49,5 ± 0	51,8 ± 0,3	45,7 ± 1,4	57,9 ± 8	65,7 ± 9,7	64,6 ± 15,3	47,5 ± 6,8	51,9 ± 0,4
	4. skupina	15,5 ± 6,3	14,8 ± 10,5	ND	20,2 ± 0,2	5,5 ± 3,6	17,3 ± 8,5	18,5 ± 7,4	14,5 ± 0,1	9,5 ± 0,5	19,4 ± 0
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi		11 ± 1,1	16,3 ± 2,8	11,9 ± 0	11,3 ± 1,2	9,9 ± 1,2	11,7 ± 2,6	12,4 ± 1,1	13,9 ± 0,3	9,7 ± 2	11,2 ± 0,2
UKUPNI FENOLI		448,9 ± 9,4	525,9 ± 16,1	416,7 ± 0,2	471 ± 3,4	403,6 ± 0,2	439,5 ± 23,8	438,2 ± 11,1	504,7 ± 12,4	402,1 ± 5,3	407,2 ± 2,9

ND* – nije detektirano

Tablica 8. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte oblice (O) proizvedenih uz predtretman ultrazvukom, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [min]-snaga ultrazvuka [W])										
	O-0-0	O-10-256	O-5-320	O-15-320	O-3-448	O-10-448	O-17-448	O-5-576	O-15-576	O-10-640	
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	ND*	ND	44,6 ± 0,6	ND	15,4 ± 0,3	24,5 ± 0,4	16,5 ± 0,2	32,8 ± 0,3	16,6 ± 0,6	ND
	Tirosol	4,3 ± 0,2	5,9 ± 0,1	47,3 ± 0,6	5,2 ± 0	20,5 ± 0,4	10,1 ± 11,4	20,9 ± 0,4	32,2 ± 0,2	22,3 ± 0,3	4,5 ± 0
	Oleacin	37,6 ± 8,2	12,4 ± 0,1	ND	8,5 ± 0	7,8 ± 0,2	15,7 ± 5,9	6,3 ± 0	12,5 ± 0,2	7,1 ± 0,1	23,6 ± 0,3
	Oleokantal	46,2 ± 1	40,4 ± 0,4	23,1 ± 0,5	33,9 ± 0,2	32,5 ± 1,6	39,2 ± 5	31,4 ± 1	34 ± 0,2	32,1 ± 0,2	43,3 ± 1,2
	Ligstrozid	10,2 ± 2	3,8 ± 0	4,3 ± 0,1	3,1 ± 0	4,9 ± 1,8	5,7 ± 0,9	4,2 ± 0,9	6,3 ± 0	4,4 ± 0,1	6,2 ± 0
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	18 ± 9,7	ND	5,4 ± 0	6,5 ± 0	ND	5,2 ± 0,4	ND	1,9 ± 0	ND	ND
	oko oleokantala	25 ± 0,9	24,5 ± 0,5	13,2 ± 0,3	23,1 ± 0	21,4 ± 1,9	19,7 ± 3	19,1 ± 3,2	18,8 ± 0,1	16,3 ± 0	26,4 ± 1,2
	3. skupina	13,3 ± 6,7	6,5 ± 0,1	6 ± 0,1	5,7 ± 0	6,2 ± 0,2	5,8 ± 0,4	5,1 ± 0	6,1 ± 0	4,9 ± 0,1	3,6 ± 0
	4. skupina	3,6 ± 1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	14,5 ± 1,2	8,4 ± 1,7	7,1 ± 0,1	7,5 ± 0	7,2 ± 0,2	11,2 ± 1,2	7,4 ± 0,1	10,3 ± 0,2	8,6 ± 0	14,1 ± 0,1	
UKUPNI FENOLI	172,8 ± 29,4	101,8 ± 3	151 ± 2,2	93,4 ± 0,2	115,8 ± 6,5	112,6 ± 11,4	110,9 ± 5,8	154,8 ± 1,1	112,3 ± 1,1	123,6 ± 2,9	

ND* – nije detektirano

Tablica 9. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte levantinke (L) proizvedenih uz predtretman ultrazvukom, izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [min]-snaga ultrazvuka [W])										
	L-0-0	L-10-256	L-5-320	L-15-320	L-3-448	L-10-448	L-17-448	L-5-576	L-15-576	L-10-640	
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	42,2 \pm 0,3	ND*	ND	3,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0	25,1 \pm 13,2	ND	ND	ND	ND
	Tirosol	16,8 \pm 16,1	ND	ND	8,8 \pm 0,3	ND	19,7 \pm 12,9	ND	ND	ND	ND
	Oleacin	70,7 \pm 18,1	49,9 \pm 0,2	60,5 \pm 0	49,5 \pm 0,6	94,3 \pm 0	55 \pm 12,1	64,9 \pm 0,7	61,8 \pm 0,9	77,3 \pm 1,5	72,4 \pm 1,4
	Oleokantal	59,8 \pm 3,6	58,6 \pm 0,4	63,4 \pm 0,4	58,4 \pm 1,2	63 \pm 0,4	59,4 \pm 5,1	65,9 \pm 0,4	64,6 \pm 0,6	66,4 \pm 0,6	70 \pm 1,1
	Ligstrozid	12,9 \pm 1,2	10 \pm 0,1	13 \pm 0,1	9,7 \pm 0,2	15,2 \pm 0,1	10,6 \pm 1,3	9,4 \pm 0	12 \pm 0,1	10,1 \pm 0	12,6 \pm 0,3
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	43,4 \pm 7,1	27,2 \pm 0,1	36 \pm 0,1	27,3 \pm 0,7	54,1 \pm 0,2	30,3 \pm 4,6	25,3 \pm 0,3	35,1 \pm 0,4	33,4 \pm 0,5	34,8 \pm 0,9
	oko oleokantala	28,1 \pm 1,8	24,5 \pm 0,1	29,1 \pm 0,1	23,3 \pm 0,5	33,1 \pm 0,1	23,9 \pm 3,1	21,3 \pm 0,2	26,7 \pm 0,1	23 \pm 0,2	26,1 \pm 0,7
	3. skupina	32,4 \pm 2,9	22,6 \pm 0,1	27,5 \pm 0,8	16,6 \pm 7,4	40,8 \pm 0,2	25 \pm 4,1	23,8 \pm 0,7	30 \pm 0,6	16,1 \pm 0,4	37,3 \pm 0,4
	4. skupina	8,6 \pm 1,5	8,8 \pm 1,2	9 \pm 0	6,4 \pm 2,6	11,1 \pm 0	8,3 \pm 0,6	9,6 \pm 0,2	8,9 \pm 0,2	8,4 \pm 0,1	13,6 \pm 0,1
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	13,9 \pm 2,5	14,6 \pm 0,3	12,1 \pm 0	8 \pm 0,2	11,5 \pm 2,2	12,1 \pm 1,3	11,5 \pm 0,1	11,9 \pm 0,2	12,7 \pm 1,5	14,2 \pm 0	
UKUPNI FENOLI	310,5 \pm 11,2	274,8 \pm 6,1	250,8 \pm 1,5	213,3 \pm 10,5	323,9 \pm 4,5	249 \pm 20,1	231,8 \pm 0,9	251 \pm 3,1	250,5 \pm 4,7	281 \pm 4,8	

ND* – nije detektirano

Prisutnost razlika u koncentracijama fenolnih spojeva u kontrolnim uzorcima pojedinih sorti od godine do godine se podudara s istraživanjem Kulišić-Bilušić i sur. (2017) i Jukić Špika i sur. (2022). Razlog tome je što sastav fenolnih spojeva kao i njihove koncentracije ovise, osim o genetskim predispozicijama sorte i o agronomskim uvjetima tijekom uzgoja te tehnološkim uvjetima proizvodnje ulja. U plodovima različitih sorta izvorno je prisutan različiti sastav i koncentracija fenolnih spojeva, ali i različiti sastav enzima koji dodatno utječu na fenolni sastav ulja. Koncentracija fenolnih spojeva varira i ovisno o temperaturi i količini padalina tijekom dozrijevanja ploda, geografskom položaju te stupnju zrelosti ploda tijekom berbe, ali i temperaturi i trajanju miješenja tijekom proizvodnje DMU-a (Jukić Špika i sur., 2022).

Sorta rosulja je, uspoređujući s ostalim istraživanim sortama, okarakterizirana najvišim koncentracijama oleacina, grupe spojeva oko oleacina te grupa neidentificiranih spojeva, prema retencijskim vremenima svrstanim u 3. i 4. skupinu neidentificiranih spojeva. S druge strane ima najniže koncentracije oleokantala i grupe spojeva oko oleokantala. Tirosol nije detektiran, dok je koncentracija hidroksitirosola i ligstrozida niska. Istarsku bjelicu pak s druge strane karakteriziraju najviše koncentracije oleokantala, ligstrozida i grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala u donosu na ostale tri istraživane sorte. Također, slično kao i rosulja, ima visoke koncentracije oleacina, spojeva oko oleacina i grupe neidentificiranih spojeva, prema retencijskim vremenima svrstanim u 3. skupinu neidentificiranih spojeva, dok je koncentracija hidroksitirosola i tirosola niska.

Sorta oblica, uspoređujući s drugim sortama, ima značajno nižu koncentraciju fenolnih spojeva, no karakterizirana je većim koncentracijama oleokantala i grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala, dok je koncentracija oleacina i grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina niža. Hidroksitirosol nije detektiran, koncentracija tirosola je niska, dok je uspoređujući s drugim sortama, koncentracija ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva najviša. Niska koncentracija hidroksitirosola i tirosola u kontrolnim uzorcima se podudara s istraživanjem koje su proveli Kulišić-Bilušić i sur. (2017). Hidroksitirosol je uglavnom prisutan u obliku oleacina i oleuropeina, a tirosol u obliku oleokantala i ligstrozida. Hidroliza tih složenih oblika fenolnih spojeva tijekom skladištenja rezultira povećanjem koncentracija hidroksitirosola i tirosola (Lukić i sur., 2017). Sorta levantinka je, uspoređujući s preostale tri sorte, karakterizirana najvišim koncentracijama hidroksitirosola i tirosola. Također ima visoke koncentracije oleacina, oleokantala te grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina, dok su koncentracije ostalih spojeva nešto niže.

4.1.1 ANOVA

Rezultati provedene ANOVA statističke analize, sa 95 %-tnom značajnosti, su prikazani u tablici 10. U tablici su prikazane p-vrijednosti za pojedini faktor (sorta, vrijeme predtretmana i snaga ultrazvučne kupelji) kao i za njihove interakcije, a vrijednosti za koje je pokazan statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) su podebljane. Vidljivo je kako sorta ima statistički vrlo visoki utjecaj na sve pojedinačne i na ukupne fenolne spojeve ($p < 0,001$) osim na hidroksitirosol na koje ima statistički visoko značajan utjecaj ($p = 0,004$). Vrijeme tretmana ima statistički vrlo visoko značajan utjecaj na koncentracije oleacina, ligstrozida, grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala i 3. skupine spojeva, ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva i ukupnih fenolnih spojeva. Snaga ultrazvuka također ima značajan utjecaj na koncentracije dominantnih fenolnih spojeva proizvedenih DMU-a (oleacina, oleokantala te grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina i oko oleokantala), ligstrozida, ukupne pojedinačne neidentificirane spojeve te na ukupne fenolne spojeve. Interakcija sorte i vremena predtretmana imaju statistički značajan utjecaj na koncentraciju svih fenolnih spojeva osim na koncentraciju grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina. Na njihove koncentracije značajno utječe interakcija sorte i snage ultrazvučnog predtretmana, kao i na koncentracije oleacina, ligstrozida, grupa spojeva oko oleokantala, 3. skupine spojeva, ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva te ne ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva. Vrijeme i snaga imaju statistički značajan utjecaj na koncentracije oleokantala, grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina, oko oleokantala i 4. skupine spojeva dok interakcija sva tri istraživana faktora ima statistički značajno djelovanje na koncentracije svih fenolnih spojeva osim na koncentraciju hidroksitirosola.

Tablica 10. Rezultati provedene ANOVA analize (p-vrijednosti) kod uzoraka DMU-a proizvedenih uz predtretman ultrazvukom

Fenolni spojevi		SORTA	VRIJEME (min)	SNAGA (W)	SORTA* VRIJEME	SORTA* SNAGA	VRIJEME *SNAGA	SORTA* VRIJEME * SNAGA
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	0,004	0,052	0,283	<0.0001	0,840	0,370	0,128
	Tirosol	<0.0001	0,095	0,246	<0.0001	0,664	0,242	0,018
	Oleacin	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,460	0,008
	Oleokantal	<0.0001	0,073	0,002	<0.0001	0,079	0,016	0,001
	Ligstrozid	<0.0001	<0.0001	0,038	0,019	<0.0001	0,061	0,014
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	<0.0001	1,000	0,004	0,193	0,006	0,018	0,020
	oko oleokantala	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,009	<0.0001	0,002	0,008
	3. skupina spojeva	<0.0001	<0.0001	0,699	<0.0001	0,003	0,147	0,043
	4. skupina spojeva	<0.0001	0,111	0,397	0,002	0,849	0,040	0,000
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi		<0.0001	<0.0001	0,020	<0.0001	<0.0001	0,922	0,017
UKUPNI		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,126	<0.0001

Kod podebljanih vrijednosti prisutan je statistički značajan utjecaj na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti

4.1.2 Korelacije

U tablici 11 prikazane su vrijednosti korelacije snage ultrazvuka i koncentracija fenolnih spojeva prema sortama. Statistički značajna korelacija ($p < 0,05$) je prisutna kod podebljanih vrijednosti. Kod rosulje snaga ultrazvuka je značajno utjecala na koncentracije hidroksitirosola, oleacina, ligstrozida, grupa neidentificiranih spojeva oko oleacina i oko oleokantala, grupe neidentificiranih spojeva u 3. skupini spojeva, neidentificiranih pojedinačnih spojeva i ukupnih fenolnih spojeva, no taj je utjecaj negativan, odnosno, povećanjem snage ultrazvuka dolazi do smanjenja koncentracije fenolnih spojeva. Kao i kod rosulje, i kod oblice je snaga ultrazvuka negativno utjecala na koncentracije fenolnih spojeva i to na koncentraciju svih osim hidroksitirosola i tirosola za koje nije utvrđena korelacija s upotrijebljenom snagom ultrazvučne kupelji.

Tablica 11. Rezultati korelacijske matrice između snage ultrazvuka i fenolnih spojeva DMU- a proizvedenim uz predtretman ultrazvukom kod pojedinih sorti

	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	OBLICA	LEVANTINKA
Varijable	SNAGA (W)			
Hidroksitirosol	-0,634	-0,141	0,303	-0,235
Tirosol	/	-0,189	0,307	-0,218
Oleacin	-0,469	0,088	-0,633	-0,030
Oleokantal	0,007	0,434	-0,448	0,408
Ligstrozid	-0,536	-0,607	-0,601	-0,266
Spojevi oko oleacina	-0,700	-0,608	-0,781	-0,361
Spojevi oko oleokantala	-0,573	-0,577	-0,415	-0,312
3. skupina spojeva	-0,844	-0,045	-0,701	-0,167
4. skupina spojeva	-0,071	0,011	-0,829	0,298
Neidentificirani spojevi	-0,509	0,002	-0,410	-0,233
UKUPNI	-0,734	-0,234	-0,572	-0,509

Podebljane vrijednosti su različite od 0 sa značajnošću $\alpha = 0,05$

Kod ostale dvije sorte, korelacije sa snagom su utvrđene kod manjeg broja spojeva, i to pozitivna korelacija s koncentracijom oleokantala, a negativna s koncentracijama ligstrozida i grupama neidentificiranih spojeva oko oleacina i oleokantala kod istarske bjelice te s grupom spojeva oko oleacina i ukupnim fenolima kod levantinke. Smanjenje koncentracija ukupnih fenolnih spojeva nakon predtretmana ultrazvukom podudara se s istraživanjima koje su proveli Acar i Arslan (2018), Jiménez i sur. (2007) i Clodoveo i sur. (2013a), dok se statistički značajno smanjenje koncentracija pojedinih fenolnih spojeva podudara s istraživanjem koje su proveli Bejaoui i sur. (2016).

U tablici 12 prikazane su vrijednosti korelacije vremena predtretmana ultrazvukom i koncentracija fenolnih spojeva prema sortama. Statistički značajna korelacija ($p < 0,05$) je prisutna kod podebljanih vrijednosti. Kod rosulje je vrijeme predtretmana značajno utjecalo na koncentraciju svih fenolnih spojeva osim na koncentraciju oleokantala za koju nije utvrđena korelacija s vremenom predtretmana. Taj je utjecaj negativan, odnosno povećanjem vremena predtretmana dolazi do smanjenja koncentracije fenolnih spojeva. Kod istarske bjelice je korelacija vremena predtretmana utvrđena kod manjeg broja spojeva i to pozitivna korelacija s koncentracijom oleokantala, a negativna s koncentracijama tirosola i grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina, dok korelacija vremena predtretmana s koncentracijama ostalih fenolnih spojeva nije utvrđena.

Kao i kod rosulje i kod oblice je vrijeme predtretmana negativno utjecalo na koncentraciju fenolnih spojeva i to na koncentracije svih fenolnih spojeva osim hidroksitirosola, tirosola i spojeva oko oleokantala za koje nije utvrđena korelacija s vremenom predtretmana. Također, i kod levantinke je vrijeme predtretmana negativno utjecalo na koncentracije fenolnih spojeva i to na koncentracije ligstrozida, grupa neidentificiranih spojeva oko oleacina, oko oleokantala, 3. skupine spojeva, ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva i ukupnih fenolnih spojeva, dok kod preostalih fenolnih spojeva nije utvrđena korelacija s vremenom predtretmana

Tablica 12. Rezultati korelacijske matrice vremena trajanja predtretmana s fenolnim spojevima DMU-a proizvedenim uz predtretman ultrazvukom kod pojedinih sorti

	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	OBLICA	LEVANTINKA
Varijable	VRIJEME (min)			
Hidroksitirosol	-0,759	-0,321	-0,012	-0,182
Tirosol	/	-0,393	0,027	-0,110
Oleacin	-0,355	0,041	-0,606	-0,313
Oleokantal	0,087	0,487	-0,381	0,158
Ligstrozid	-0,799	-0,332	-0,691	-0,734
Spojevi oko oleacina	-0,840	-0,416	-0,620	-0,729
Spojevi oko oleokantala	-0,799	-0,317	-0,302	-0,711
3. skupina spojeva	-0,830	0,077	-0,590	-0,667
4. skupina spojeva	-0,419	0,221	-0,698	-0,103
Neidentificirani spojevi	-0,508	0,071	-0,520	-0,361
UKUPNI	-0,824	-0,043	-0,762	-0,773

Podobljane vrijednosti su različite od 0 sa značajnošću $\alpha=0,05$

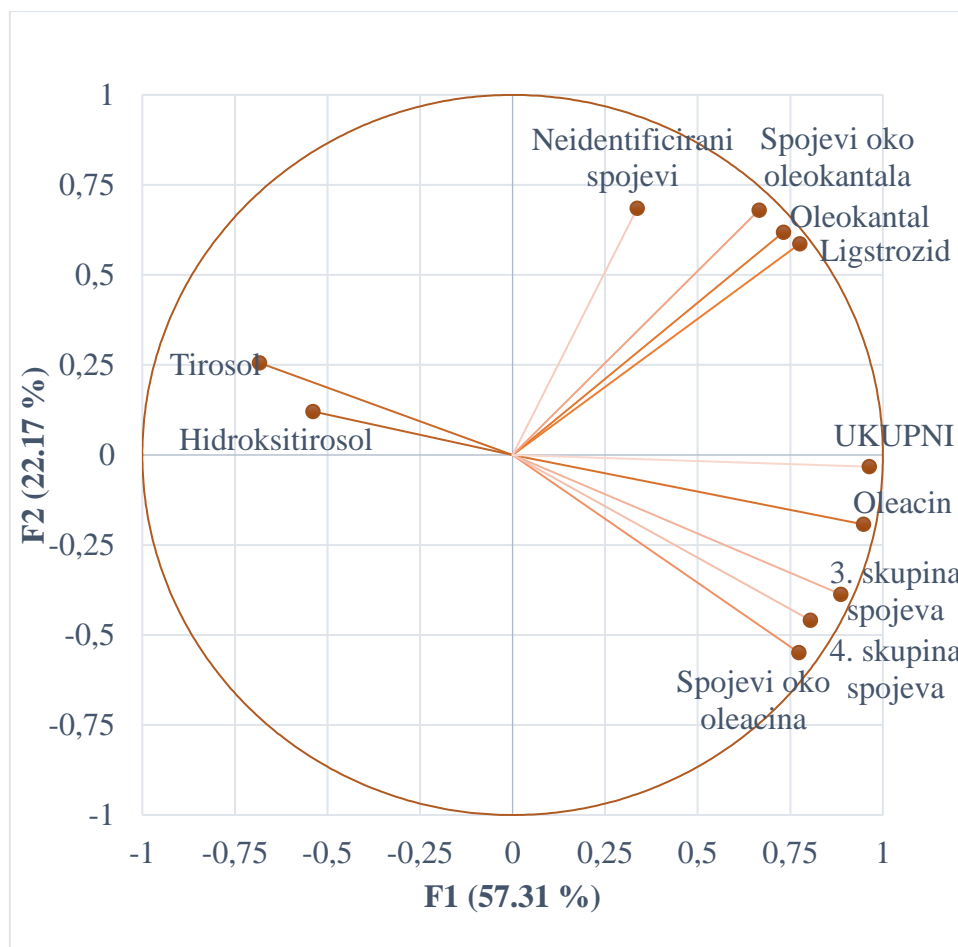
Dobiveni rezultati se podudaraju s istraživanjima koje su proveli Clodoveo i sur. (2013b) te Iqdiam i sur. (2017) koji su zabilježili kako produljenje trajanja tretmana ultrazvukom rezultira smanjenjem koncentracije fenolnih spojeva. Utjecaj snage ultrazvuka i vremena predtretmana na koncentracije fenolnih spojeva u DMU-u se pokazao negativnim s jače izraženim utjecajem na sorte rosulju i oblicu te slabije izraženim utjecajem na sorte istarsku bjelicu i levantinku. Mogući uzroci smanjenja fenola u DMU-u su prvenstveno učinak kisika na enzimske reakcije i neenzimsku oksidaciju koje dovode do oksidacije fenolnih

spojeva, a posljedično i do smanjenja njihove koncentracije. Prisutnost kisika može utjecati na aktivnost endogenih enzima poput PPO-e, POD-e i β -glikozidaze (Clodoveo i sur., 2013a). Kao moguće rješenje smanjenja koncentracija fenolnih spojeva Iqdiam i sur. (2019) su u svom istraživanju opisali kontroliranje ili smanjenje koncentracije kisika tijekom predtretmana ultrazvukom što je rezultiralo povećanjem koncentracije fenolnih spojeva. Također, smanjenje koncentracije fenolnih spojeva može biti rezultat visokih temperatura i tlakova, kao i mehaničkih sila smicanja, koje nastaju tijekom kavitacije, a mogu utjecati na promjenu strukture i funkcije fenolnih spojeva, ali i endogenih enzima (Iqdiam i sur., 2017; Clodoveo i sur., 2013a).

4.1.3 Analiza glavnih komponentata

Kako bi se utvrdio dominantni utjecaj istraživanih faktora (snage ultrazvuka, vremena tretiranja i sorte) na koncentraciju fenolnih spojeva DMU-a proizvedenih uz predtretman ultrazvukom provedena je analiza glavnih komponentata. Analiza glavnih komponentata ili skraćeno PCA (od eng. Principal component analysis) je statistička metoda koja se koristi za analizu međuodnosa između velikog broja varijabli na način da objašnjava te varijable pomoću manjeg broja faktora, koji se nazivaju glavne komponente, a da pritom gubitak informacija bude minimalan (Zaiontz, 2023).

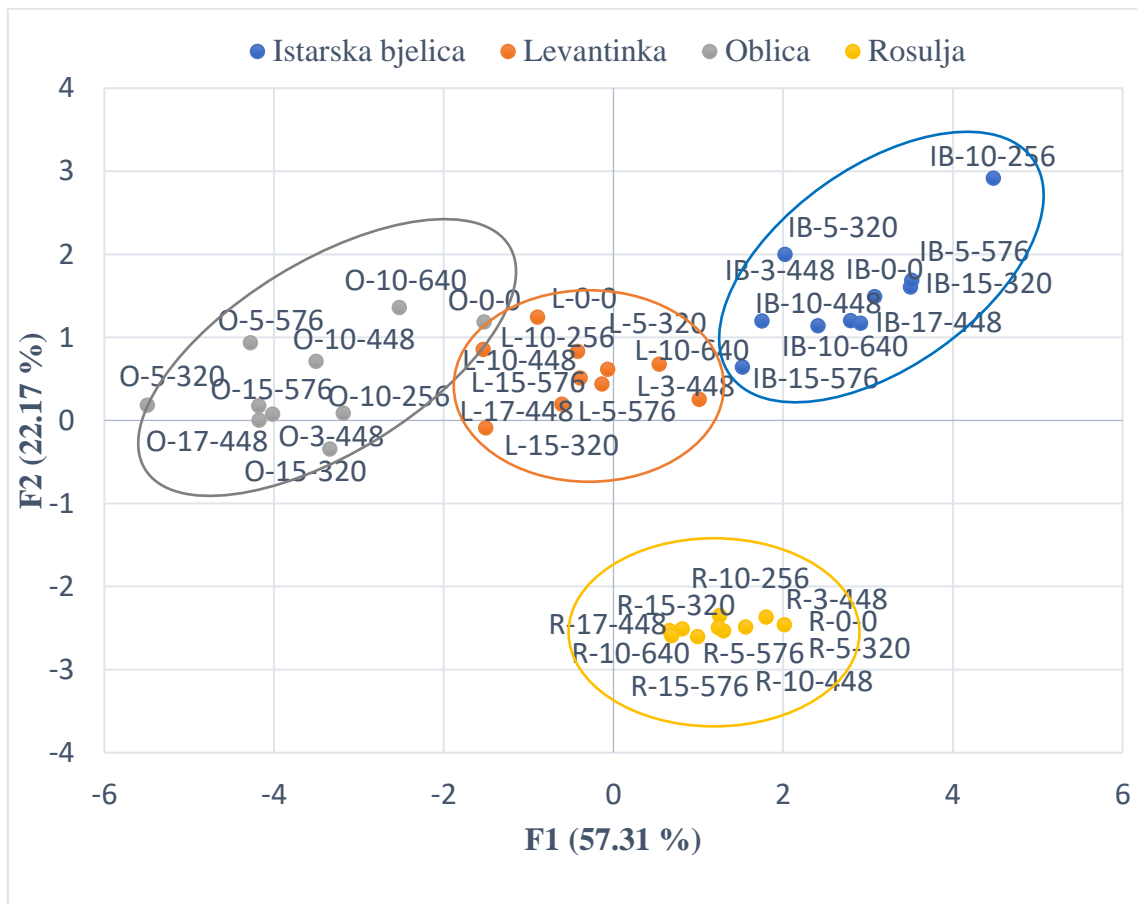
Na slici 4 prikazane su istraživane varijable (fenolni spojevi) u koordinatnom sustavu faktora 1 koji objašnjava 57,31 % varijabilnosti rezultata i faktora 2 koji objašnjava 22,17 % varijabilnosti rezultata. Faktor 1 je značajno pozitivno utjecao na koncentracije oleacina, oleokantala, ligstrozida, neidentificirane spojeve oko oleacina i oko oleokantala, neidentificirane spojeve u 3. i 4. skupini spojeva te ukupnih fenolnih spojeva dok je s druge strane, značajno negativno utjecao na koncentracije tirosola i hidroksitirosola. Faktor 2 je značajno pozitivno utjecao na koncentracije oleokantala, ligstrozida, neidentificiranih spojeva oko oleokantala i pojedinačnih neidentificiranih spojeva, a negativno na koncentracije neidentificiranih spojeva oko oleacina i neidentificiranih spojeva iz 3. i 4. skupine neidentificiranih spojeva.



Slika 4. Projekcija fenolnih spojeva DMU-a proizvedenih uz predtretman ultrazvukom u prostoru prva 2 faktora

Na slici 5 prikazana je distribucija uzoraka u koordinatnom sustavu faktora 1 i 2. Jasno je vidljivo kako su stvorene definirane grupe prema sortama maslina. Uzorci proizvedeni iz sorte istarske bjelice su se smjestili u I. kvadrantu što znači da su karakterizirani visokom koncentracijom oleokantala, ligstrozida, neidentificiranih spojeva oko oleokantala i pojedinačnih fenolnih spojeva, odnosno spojevima koji pozitivno koreliraju s 1. i 2. faktorom. Uzorci proizvedeni iz sorte levantinke su se većim dijelom smjestili u II. kvadrantu, a manjim dijelom u I. kvadrantu te su karakterizirani višim koncentracijama hidroksitirosola i tirosola, odnosno pozitivnim djelovanjem faktora 2, ali negativnim djelovanjem faktora 1. Na uzorke proizvedene iz sorte oblice, također smještene u II. kvadrantu, faktor 1 je utjecao negativno s većom značajnošću nego na uzorke iz sorte levantinke, dok je faktor 2 utjecao jednako pozitivno. Uzorci proizvedeni iz sorte rosulje su se smjestili u IV. kvadrantu što znači da su karakterizirani višom koncentracijom oleacina, neidentificiranih spojeva oko oleacina, spojeva

iz 3. i 4. skupine neidentificiranih spojeva te ukupnih fenolnih spojeva, odnosno spojevima koji pozitivno koreliraju s faktorom 1, a negativno s faktorom 2. PCA je potvrdila rezultate dobivene ANOVA analizom, odnosno kako upravo sorta masline ima najznačajniji utjecaj na sastav fenolnih spojeva u DMU-a proizvedenom uz predtretman ultrazvukom.



Slika 5. Projekcija uzoraka DMU-a proizvedenih uz predtretman ultrazvukom u prostoru prva 2 faktora za fenolne spojeve (R-rosulja; IB-istarska bjelica; O-oblica; L-levantinka)

4.2 Pulsirajuće električno polje

Primjenom pulsirajućeg električnog polja materijal se izlaže kratkim impulsima struje visokog napona uslijed čega dolazi do permeabilizacije stanične membrane. Nastale pore olakšavaju oslobađanje tvari iz stanica i povećavaju prijenos mase, inaktiviraju mikroorganizme i degradativne enzime (Pérez i sur., 2021; Clodoveo i sur., 2014). Upotrebom PEP-a kao predtretmana miješenju u proizvodnji DMU-a skraćuje se vrijeme trajanja i temperatura miješenja, povećava prinos ulja i nutrijenata poput fenolnih spojeva, pri čemu ne dolazi do narušavanja kvalitete i organoleptičkih svojstava ulja (Leone i sur., 2022; Clodoveo i sur., 2014).

Dobiveni rezultati masenih koncentracija fenolnih spojeva, prisutnih u DMU-u proizvedenom uz predtretman PEP-em, podijeljeni su prema sortama i prikazani u tablicama 13, 14, 15 i 16. Dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija masenih koncentracija izraženih u mg tirosola/kg ulja.

U kontrolnim uzorcima vidljivo je da je najveća ukupna koncentracija fenolnih spojeva prisutna kod sorte rosulje ($291,9 \pm 3,3$ mg/kg), a nešto manja kod istarske bjelice ($246,4 \pm 38$ mg/kg) i levantinke ($224 \pm 18,7$ mg/kg), dok je kod oblice značajno manja ($97,1 \pm 4,6$ mg/kg). Ukupna koncentracija fenolnih spojeva kod kontrolnih uzoraka DMU-a proizvedenog uz predtretman PEP-em je niža od kontrolnih uzoraka DMU-a proizvedenog uz predtretman ultrazvukom, no vidljivo je kako su i kod ultrazvuka i kod PEP-a kod istarske bjelice i rosulje koncentracije veće, a najmanje su kod oblice. Do razlika između ultrazvuka i PEP-a došlo je zbog malih razlika u proizvodnji s obzirom da su uzorci tretirani ultrazvukom proizvedeni u institutu u Splitu na Abencor sustavu za laboratorijsku proizvodnju DMU-a, dok su uzorci tretirani PEP-om proizvedeni na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu na sustavu dizajniranom za zamjenu Abencor sustava za laboratorijsku proizvodnju DMU-a.

Sorta rosulja je, uspoređujući s ostalim istraživanim sortama, kao i kod kontrola DMU-a proizvedenog s predtretmanom ultrazvukom, karakterizirana najvišim koncentracijama oleacina, grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina te grupa neidentificiranih spojeva, prema retencijskim vremenima svrstanim u 3. i 4. skupinu neidentificiranih spojeva. Također ima niske koncentracije oleokantala i grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala, hidroksitirosola, tirosola i ligstrozida.

Tablica 13. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte rosulje (R) proizvedenih uz predtretman PEP-em, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [s]-jakost električnog polja [kV/cm])										
	R-0-0	R-60-1	R-30-2	R-90-2	R-18-4,5	R-60-4,5	R-102-4,5	R-30-7	R-90-7	R-60-8	
Identificirani spojevi	Hidroksitirosol	2.1 ± 0.3	1.5 ± 0	61.7 ± 0.8	94.9 ± 1.2	ND*	30.9 ± 0.5	ND	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0	49.6 ± 0.4
	Tirosol	2.8 ± 0	2.7 ± 0	22.9 ± 0.3	26.6 ± 0.3	ND	25.5 ± 2.5	ND	2.6 ± 0	2.4 ± 0	17.8 ± 0.2
	Oleacin	87.1 ± 14.1	87.2 ± 0.6	71.3 ± 1.4	57 ± 0.7	103.8 ± 5.5	48.3 ± 24.6	40.2 ± 8.6	116.5 ± 0.4	119.6 ± 0.9	76.1 ± 0.7
	Oleokantal	41.9 ± 2.5	42.2 ± 0.5	33.9 ± 0.4	33.5 ± 0.3	43.6 ± 2.1	29.9 ± 8.8	45.7 ± 0.1	46.2 ± 0.5	46.9 ± 0.1	36.3 ± 0.3
	Ligstrozid	6.1 ± 0.8	6.5 ± 0.1	5.1 ± 0	3 ± 0.1	4.2 ± 0.2	6 ± 1.5	3.9 ± 0.1	5.5 ± 1.6	3.9 ± 0.5	5.1 ± 0.1
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	44.6 ± 3.3	52.8 ± 0.6	48.7 ± 0.7	37 ± 0.3	37.3 ± 1.5	28.9 ± 21.9	10.1 ± 8.3	40.2 ± 0.2	44 ± 0.2	50.8 ± 0.5
	oko oleokantala	16.5 ± 1.5	17.5 ± 0.2	13.8 ± 0.1	10.7 ± 0	13.6 ± 0.8	12.4 ± 7.2	9.5 ± 1.6	13.9 ± 1.2	12.9 ± 0.1	14.1 ± 0.1
	3. skupina	55.9 ± 2.3	62.4 ± 0.5	59 ± 0.7	57.8 ± 17.7	46.4 ± 2	47.2 ± 14.3	20.9 ± 4.4	51.3 ± 0.3	52.1 ± 0.6	54.2 ± 0.5
	4. skupina	15.8 ± 1.3	15.1 ± 0.8	12.4 ± 0	9.2 ± 2.1	8.6 ± 0.5	10.7 ± 3.8	12.6 ± 3.1	13.9 ± 0.5	14.3 ± 0.1	12.1 ± 0.6
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	10.7 ± 2	8.1 ± 0.1	8 ± 0.1	6.6 ± 0	9.1 ± 0.6	7.6 ± 1.4	6.6 ± 1.9	7.9 ± 1.5	7.6 ± 0.1	8.1 ± 0.1	
UKUPNI FENOLI	280.6 ± 9.5	291.9 ± 3.3	252.2 ± 3.4	336.2 ± 12.6	266.6 ± 11.9	219.9 ± 46.5	126.3 ± 13.6	300.3 ± 5.1	304.5 ± 4.1	324.1 ± 3.5	

ND* – nije detektirano

Tablica 14. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte istarske bjelice (IB) proizvedenih uz predtretman PEP-em, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [s]-jakost električnog polja [kV/cm])										
	IB-0-0	IB-60-1	IB-30-2	IB-90-2	IB-18-4,5	IB-60-4,5	IB-102-4,5	IB-30-7	IB-90-7	IB-60-8	
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	39,8 ± 0,4
	Tirosol	3 ± 0,3	3,7 ± 0	3,7 ± 0	3,7 ± 0,1	4,1 ± 0	5,9 ± 4,3	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	6,6 ± 0,1	43,3 ± 0,4
	Oleacin	82,6 ± 10,1	107,9 ± 0,5	102,1 ± 0,5	104,8 ± 1,2	85,7 ± 0,9	72 ± 17,4	77,8 ± 0,7	82,5 ± 0,3	65,3 ± 1	31,9 ± 0,3
	Oleokantal	69,9 ± 8,3	128,5 ± 0,6	124,5 ± 0,2	127,2 ± 0,1	120,7 ± 0,8	111,7 ± 23,5	75,2 ± 0,9	77,9 ± 0,8	61,8 ± 0,7	38,8 ± 0,6
	Ligstrozid	8,3 ± 1,7	13,3 ± 0,4	14,4 ± 0,3	14,4 ± 0,4	12,9 ± 0,2	9 ± 1,9	9,8 ± 0,3	8,5 ± 0,4	9,4 ± 0	7,1 ± 0,2
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	15,9 ± 3,8	21,6 ± 0	23,7 ± 0,1	23,6 ± 0,1	17 ± 0,2	5,9 ± 5,6	19,7 ± 0,1	16 ± 0	14,2 ± 0,2	3,9 ± 0,1
	oko oleokantala	30,7 ± 3,4	39,7 ± 0	42 ± 0,4	42,4 ± 1	37,8 ± 0,3	31,4 ± 3,4	34,9 ± 0,7	32 ± 0,9	35,7 ± 0,4	27 ± 0,5
	3. skupina	18,8 ± 9,2	32,7 ± 0,4	34,2 ± 1,3	32,6 ± 0,1	31,6 ± 0,7	18,6 ± 5,3	19,3 ± 6,6	9,9 ± 0,2	12,5 ± 0,1	7,7 ± 0
	4. skupina	8,3 ± 2,9	17,7 ± 0,3	17,3 ± 0,1	17,6 ± 0,1	18 ± 0,2	12,5 ± 4,8	6,4 ± 0,1	5,2 ± 1,3	3,2 ± 1,5	ND
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	8,7 ± 0,7	5,8 ± 1,5	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0	4 ± 0	6,3 ± 0,8	10,2 ± 0	8,5 ± 1,5	8,4 ± 0	6,4 ± 0,1	
UKUPNI FENOLI	246,4 ± 38	370,9 ± 0,1	368,9 ± 3,2	373,5 ± 0,2	332 ± 2	271 ± 43,8	256,7 ± 9,4	243,8 ± 5,4	217 ± 3,9	205,8 ± 2,5	

ND* – nije detektirano

Tablica 15. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte oblice (O) proizvedenih uz predtretman PEP-em, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [s]-jakost električnog polja [kV/cm])										
	O-0-0	O-60-1	O-30-2	O-90-2	O-18-4,5	O-60-4,5	O-102-4,5	O-30-7	O-90-7	O-60-8	
Identificirani spojevi	Hidroksitirosol	11,1 ± 3	15,1 ± 0,4	8,9 ± 0,5	3,9 ± 1,3	0 ± 0	8,9 ± 2,6	8,4 ± 0,1	1,7 ± 0	4,9 ± 2,9	2,3 ± 0,2
	Tirosol	24,1 ± 3,8	30,6 ± 0,6	26,3 ± 0,4	24 ± 0,4	18,4 ± 0	20,8 ± 6,5	24,2 ± 0,3	16,8 ± 0,1	23,9 ± 0,5	19,8 ± 0,1
	Oleacin	3,2 ± 0	ND*	ND	ND	ND	4,2 ± 0,1	ND	ND	ND	ND
	Oleokantal	24 ± 3,1	23,8 ± 0,4	23,6 ± 0,4	22,7 ± 0,5	22,9 ± 0,2	23 ± 3,8	22,2 ± 0,4	23,9 ± 0,1	21,2 ± 0,5	20,4 ± 0,3
	Ligstrozid	3,5 ± 0,5	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,1	ND	4,2 ± 0,8	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0	3,5 ± 0	3,6 ± 0,1
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	ND	ND	ND	ND	ND	5,3 ± 0,1	ND	ND	ND	ND
	oko oleokantala	18 ± 1,5	25,5 ± 0,4	26,6 ± 0,5	25,1 ± 0,6	26,3 ± 0,3	20,1 ± 1,8	21,8 ± 0,5	22,9 ± 0,1	21,4 ± 0,5	21,6 ± 0,2
	3. skupina	5,9 ± 0,5	6,8 ± 0,1	6,5 ± 0	5,7 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,4	5,6 ± 0	5,5 ± 0	5,5 ± 0,1	5,2 ± 0,1
	4. skupina	2,3 ± 0,8	2,9 ± 1,7	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0	2 ± 0,6	2,7 ± 0	ND	1,8 ± 0	ND
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	8,9 ± 1,6	6 ± 0	5,3 ± 0,1	4,9 ± 0,1	8,8 ± 0	8,7 ± 2,3	7,1 ± 0,2	6,5 ± 0	7 ± 1,8	5,3 ± 0,1	
UKUPNI FENOLI	97,1 ± 4,6	114,1 ± 1,5	103,1 ± 2,2	92 ± 0,5	81,3 ± 1,4	90,7 ± 11,5	94,4 ± 3,5	80,9 ± 0,4	87,6 ± 8,9	78,3 ± 0,8	

ND* – nije detektirano

Tablica 16. Koncentracije fenolnih spojeva (mg tirosola/kg ulja) DMU-a sorte levantinke (L) proizvedenih uz predtretman PEP-em, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Fenolni spoj (mg tirosola/kg ulja)	Uzorak (sorta-vrijeme [s]-jakost električnog polja [kV/cm])										
	L-0-0	L-60-1	L-30-2	L-90-2	L-18-4,5	L-60-4,5	L-102-4,5	L-30-7	L-90-7	L-60-8	
Identificirani spojevi	Hidroksitirosol	20,9 ± 7,5	17,1 ± 0,7	23,9 ± 0,1	ND*	14,5 ± 0,6	24,7 ± 7,9	37,2 ± 0	40,2 ± 0,8	13 ± 0,7	11,9 ± 0
	Tirosol	13,5 ± 4,2	11,1 ± 0,4	14,9 ± 0,1	2,6 ± 0	10,1 ± 0,1	18,5 ± 6,7	18,5 ± 0,5	19,1 ± 0,2	13,6 ± 0	13,3 ± 0,1
	Oleacin	41 ± 4,1	50,8 ± 1,6	39,4 ± 0,4	84,2 ± 0,6	49,7 ± 0,8	39,3 ± 5,6	38,6 ± 1,7	32,9 ± 0,4	36,4 ± 0,2	55 ± 0
	Oleokantal	62,9 ± 2	63,8 ± 2,4	63,4 ± 0,6	81,4 ± 0,3	65,9 ± 0,7	61,7 ± 2,5	59,7 ± 2,1	57,2 ± 0,7	67 ± 0	68,1 ± 0
	Ligstrozid	10,2 ± 0,5	10,9 ± 0,3	9,5 ± 0	12,6 ± 0,4	9 ± 0,1	10 ± 1,2	10,5 ± 0,6	10,1 ± 0,2	7,9 ± 0	14,2 ± 0,1
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	28,3 ± 3,5	35 ± 1,5	25,8 ± 0,1	35,7 ± 0,3	26,4 ± 0,5	26,2 ± 3,9	34,8 ± 0,1	32,8 ± 0,8	17,9 ± 0	38,8 ± 0,9
	oko oleokantala	21,5 ± 0,8	22,6 ± 0,8	20,3 ± 0,2	25,2 ± 0,2	19,5 ± 0,3	21 ± 1,8	22,4 ± 1,7	75,4 ± 0,8	17,4 ± 0	28,1 ± 0,4
	3. skupina	9,2 ± 2,9	12,2 ± 2,3	8,3 ± 2,2	20,6 ± 5,1	10,3 ± 4,2	8,6 ± 2,7	13,2 ± 0,1	7,6 ± 0,1	6,6 ± 0,1	13,1 ± 3,8
	4. skupina	5 ± 0,8	5,1 ± 0,5	5,9 ± 1,2	8,6 ± 0,3	7 ± 0,9	5,2 ± 1,5	5 ± 0,4	7,2 ± 3,7	7,2 ± 4	7,5 ± 3,3
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi	11,6 ± 0,9	10,7 ± 0,4	9,7 ± 0,2	14,1 ± 0,4	10,2 ± 1,3	13,8 ± 4,1	16,1 ± 0,1	12,3 ± 0,1	8,9 ± 0,1	15,9 ± 0,1	
UKUPNI FENOLI	224 ± 18,7	239,3 ± 10,9	221,1 ± 1,9	285 ± 5,9	222,5 ± 9,5	229,4 ± 19,1	255,9 ± 5,5	242,1 ± 0,3	195,9 ± 3,6	265,9 ± 5,6	

ND* – nije detektirano

Sorta istarska bjelica je kao i kod ultrazvuka karakterizirana najvišim koncentracijama oleokantala i grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala. Također, ima visoke koncentracije oleacina, grupe spojeva oko oleacina i grupe neidentificiranih spojeva, prema retencijskim vremenima svrstanim u 3. skupinu neidentificiranih spojeva, dok su koncentracije hidroksitirosola i tirosola niske.

Sorta oblica sveukupno gledajući ima značajno nižu koncentraciju fenolnih spojeva, dok zasebno gledajući ima veće koncentracije oleokantala i grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala, dok su koncentracije oleacina i grupe neidentificiranih spojeva 3. i 4. skupine spojeva vrlo niske, a grupa neidentificiranih spojeva oko oleacina nije detektirana. Za razliku od kontrole kod DMU-a proizvedenog iz sorte oblice kod predtretmana ultrazvukom, koncentracije hidroksitirosola i tirosola su veće. Sorta levantinka je, kao i kod ultrazvuka, karakterizirana najvišom koncentracijom hidroksitirosola i tirosola. Također ima visoku koncentraciju oleacina, oleokantala te grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina i oleokantala, dok su koncentracije ostalih spojeva nešto niže.

4.2.1 ANOVA

Rezultati provedene ANOVA statističke analize, sa 95 %-tnom značajnosti, su prikazani u tablici 17. U tablici su prikazane p-vrijednosti za pojedini faktor (sorta, jakost električnog polja i vrijeme predtretmana) kao i za njihove interakcije, a vrijednosti za koje je pokazan statistički značajan utjecaj su podebljane. Sorta je, kao i kod ultrazvuka, pokazala statistički vrlo visoki utjecaj na sve pojedinačne i na ukupne fenolne spojeve ($p < 0,001$). Vrijeme predtretmana ima statistički vrlo visoki utjecaj na koncentracije hidroksitirosola, tirosola, oleacina grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala i ukupne koncentracije fenolnih spojeva ($p < 0,001$) te statistički visoko značajan utjecaj na koncentracije oleokantala, grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina, 3. skupinu neidentificiranih spojeva i ukupne pojedinačne neidentificirane spojeve. Jakost električnog polja je pokazala statistički vrlo visoki utjecaj na koncentracije svih pojedinačnih i na ukupne fenolne spojeve ($p < 0,001$) osim na koncentraciju pojedinačnih neidentificiranih spojeva.

Interakcija sorte i vremena predtretmana imaju statistički značajan utjecaj na koncentracije svih fenolnih spojeva. Također, statistički značajan utjecaj na koncentracije svih fenolnih spojeva ima interakcija sorte i jakosti električnog polja, osim na koncentraciju ukupnih

Tablica 17. Rezultati provedene ANOVA analize uz 95 %-tnu značajnost kod uzoraka DMU-a proizvedenih uz predtretman PEP-em

Fenolni spojevi		sorta	vrijeme (s)	jakost električnog polja (kV/cm)	sorta* vrijeme	sorta* jakost električnog polja	vrijeme* jakost električnog polja	sorta * vrijeme *jakost električnog polja
Identificirani spojevi	Hidroksitirozol	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,110	0,007
	Tirosol	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,153	0,047
	Oleacin	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,153	0,047
	Oleokantal	<0.0001	0,002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,251	0,648
	Ligstrozid	<0.0001	0,514	<0.0001	0,001	0,000	0,194	0,202
Grupe neidentificiranih spojeva	oko oleacina	<0.0001	0,037	<0.0001	0,000	0,021	0,609	0,071
	oko oleokantala	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	3. skupina spojeva	<0.0001	0,012	<0.0001	<0.0001	0,001	0,704	0,445
	4. skupina spojeva	<0.0001	0,467	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,893	0,443
Ukupni pojedinačni neidentificirani spojevi		<0.0001	0,003	0,175	0,000	0,083	0,217	0,048
UKUPNI		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,004	0,052

Kod podebljanih vrijednosti prisutan je statistički značajan utjecaj na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti

pojedinačnih spojeva. Vrijeme predtretmana i jakost električnog polja imaju statistički značajan utjecaj samo na koncentracije grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala i ukupnih fenolnih spojeva. Interakcija sva tri istraživana faktora ima statistički značajan utjecaj na koncentracije hidroksitirosola, tirosola, oleacina, grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala i ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva.

4.2.2 Korelacije

U tablici 18 prikazane su vrijednosti korelacije jakosti električnog polja i koncentracija fenolnih spojeva prema sortama. Statistički značajna korelacija ($p < 0,05$) je prisutna kod podebljanih vrijednosti. Kod rosulje je jakost električnog polja negativno korelirala samo s koncentracijom ukupnih pojedinačnih neidentificiranih spojeva odnosno povećanjem jakosti električnog polja dolazi do smanjenja koncentracije fenolnih spojeva, dok kod koncentracija ostalih fenolnih spojeva nije utvrđena korelacija.

Kod istarske bjelice jačina električnog polja značajno je pozitivno utjecala na koncentracije hidroksitirosola i tirosola, a negativno na koncentracije oleacina, grupe neidentificiranih spojeva oko oleacina, grupa neidentificiranih spojeva 3. i 4. skupine i ukupnih fenola, dok kod preostalih fenolnih spojeva nije utvrđena korelacija. Kod oblice je jakost električnog polja negativno statistički značajno utjecala na koncentracije hidroksitirosola, tirosola, grupa neidentificiranih spojeva 3. i 4. skupine i ukupnih fenolnih spojeva, dok kod preostalih fenolnih spojeva nije utvrđena korelacija s jakosti električnog polja. Kao i kod rosulje, kod levantinke jačina električnog polja nije korelirala s koncentracijama fenolnih spojeva, osim pozitivnog utjecaja na koncentraciju grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala.

Tablica 18. Rezultati korelacijske matrice između jakosti električnog polja i fenolnih spojeva DMU-a proizvedenih uz predtretman PEP-em kod pojedinih sorti

	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	OBLICA	LEVANTINKA
Varijable	JAKOST ELEKTRIČNOG POLJA (kV/cm)			
Hidroksitirozol	0,033	0,451	-0,623	0,153
Tirosol	0,130	0,508	-0,422	0,270
Oleacin	0,040	-0,579	-0,171	-0,163
Oleokantal	-0,041	-0,210	-0,276	-0,100
Ligstrozid	-0,258	-0,255	0,110	0,064
Spojevi oko oleacina	-0,170	-0,446	0,088	-0,023
Spojevi oko oleokantala	-0,269	-0,234	0,139	0,351
3. skupina spojeva	-0,277	-0,480	-0,541	-0,126
4. skupina spojeva	-0,310	-0,395	-0,545	0,282
Neidentificirani spojevi	-0,455	-0,190	-0,157	0,216
UKUPNI	-0,061	-0,361	-0,602	0,064

Podebljane vrijednosti su različite od 0 sa značajnošću $\alpha=0,05$

U tablici 19 prikazane su vrijednosti korelacije vremena predtretmana i koncentracija fenolnih spojeva prema sortama. Statistički značajna korelacija ($p<0,05$) je prisutna kod podebljanih vrijednosti. Kod rosulje vrijeme predtretmana je značajno utjecalo na koncentracije oleacina, ligstrozida, grupe neidentificiranih spojeva oko oleokantala i ukupnih neidentificiranih pojedinačnih spojeva, no taj je utjecaj negativan, odnosno povećanjem vremena predtretmana dolazi do smanjenja koncentracija fenolnih spojeva. Kod istarske bjelice kao i kod levantinke nije utvrđena korelacija vremena predtretmana s koncentracijama svih

fenolnih spojeva. Kod oblice je vrijeme tretiranja pozitivno utjecalo samo na koncentraciju ligstrozida, dok na koncentracije preostalih fenolnih spojeva korelacija nije utvrđena.

Tablica 19. Rezultati korelacijske matrice vremena trajanja predtretmana s fenolnim spojevima DMU-a proizvedenih uz predtretman PEP-em kod pojedinih sorti

	ROSULJA	ISTARSKA BJELICA	OBLICA	LEVANTINKA
Varijable	VRIJEME (s)			
Hidroksitirozol	0,305	0,092	-0,208	-0,087
Tirosol	0,279	0,156	0,042	0,013
Oleacin	-0,374	-0,138	-0,180	0,253
Oleokantal	-0,161	0,147	-0,239	0,280
Ligstrozid	-0,366	0,149	0,352	0,149
Spojevi oko oleacina	-0,332	-0,120	0,092	0,110
Spojevi oko oleokantala	-0,362	0,217	0,246	-0,124
3. skupina spojeva	-0,332	-0,034	-0,181	0,315
4. skupina spojeva	-0,324	-0,028	-0,066	0,171
Neidentificirani spojevi	-0,683	-0,015	-0,306	0,303
UKUPNI	-0,248	0,069	-0,083	0,315

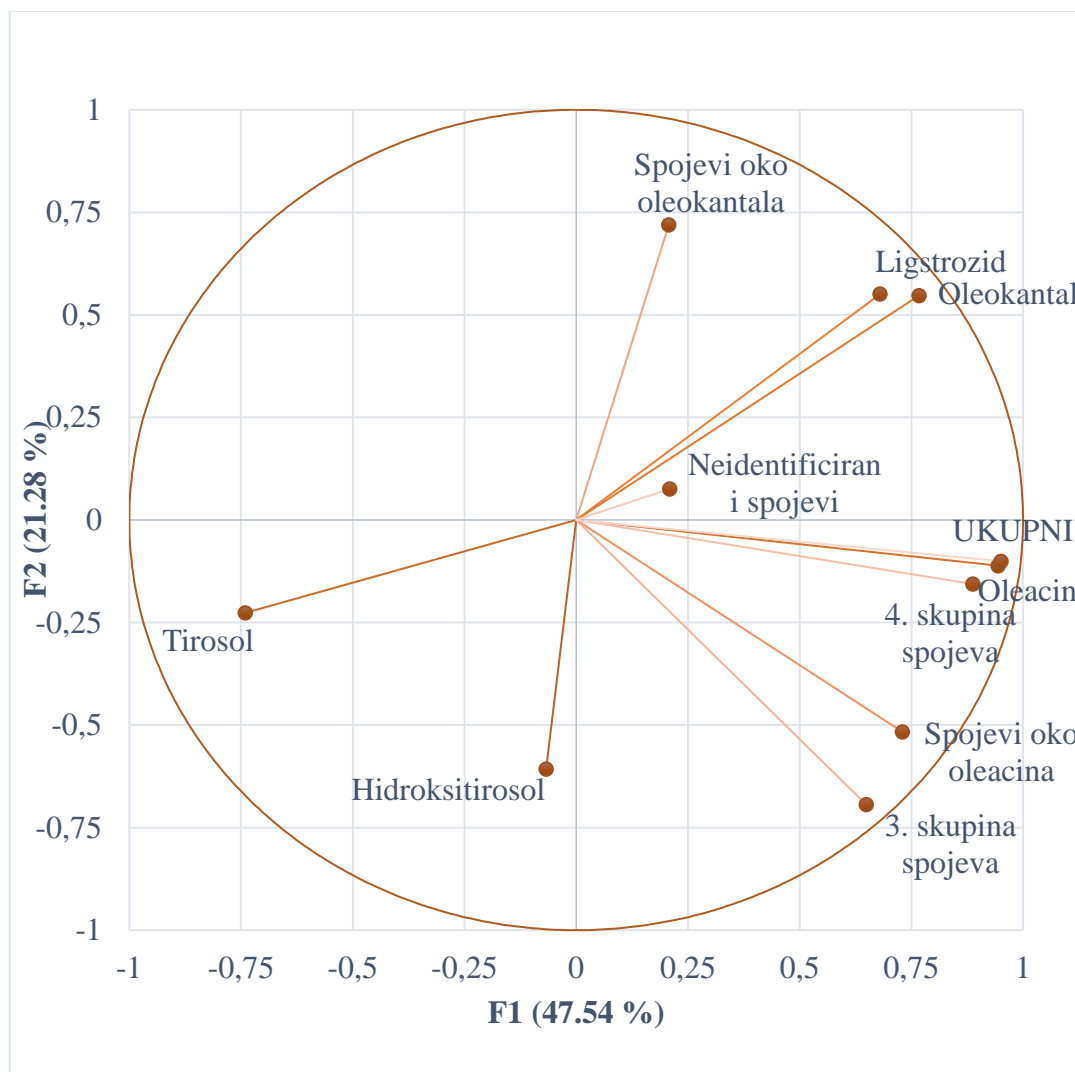
Podebljane vrijednosti su različite od 0 sa značajnošću $\alpha = 0,05$

Utjecaj jačine električnog polja na koncentracije fenolnih spojeva u DMU-u se pokazao negativan na sorte istarsku bjelicu i oblicu, dok je na sorte rosulju i levantinku neznačajan. Utjecaj vremena predtretmana PEP-em na koncentracije fenolnih spojeva u DMU-u se pokazao negativan na sortu rosulju, dok na preostale sorte nije značajan. Različiti utjecaj predtretmana

PEP-em na DMU-a dobivena iz različitih sorti te različit utjecaj na pojedine fenolne spojeve u skladu je s istraživanjem koje su proveli Navarro i sur. (2022). Zabilježili su da tretman nije utjecao na koncentraciju fenola kod sorte hojiblanca, dok je pozitivno utjecao na sortu manzanillu. Smanjena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva kod sorata istarske bjelice i oblice, kao i smanjene koncentracije oleacina i oleokantala u DMU-u proizvedenom uz predtretman PEP-em slaže se s istraživanjem koje su proveli Abenoza i sur. (2013). Uzrok smanjenju ukupne koncentracije fenolnih spojeva uz predtretman PEP-em može biti kraće vrijeme trajanja predtretmana. Porast koncentracija hidroksitirosola i tirosola kod sorte istarske bjelice se podudara sa istraživanjem koje su proveli Andreou i sur. (2022) na sorti *tsounati*. Nadalje, Leone i sur. (2022), Andreou i sur. (2016) te Andreou i sur. (2022) su zabilježili porast u koncentraciji fenolnih spojeva uz primjenu predtretmana PEP-em. Tamborrino i sur. (2019) su u svom istraživanju utjecaja predtretmana PEP-em kod proizvodnje ekstra djevičanskog maslinovog ulja zabilježili porast u koncentracijama oleacina i oleokantala kao i porast u ukupnoj koncentraciji fenolnih spojeva. Do porasta koncentracija fenolnih spojeva dolazi zbog elektroporacije uzrokovane PEP-em što rezultira povećanim prijenosom mase iz stanice kroz nastale pore u otopinu, a samim time omogućuje i veći prijenos fenolnih spojeva (Navarro i sur., 2022). Snaga ultrazvuka i vrijeme predtretmana ultrazvukom su imali veći negativan utjecaj na fenolne spojeve DMU-a, nego jačina električnog polja i vrijeme predtretmana PEP-em. Uzrok toga može biti dulje vrijeme trajanja ili porast temperature kod predtretmana ultrazvukom.

4.2.3 Analiza glavnih komponenata

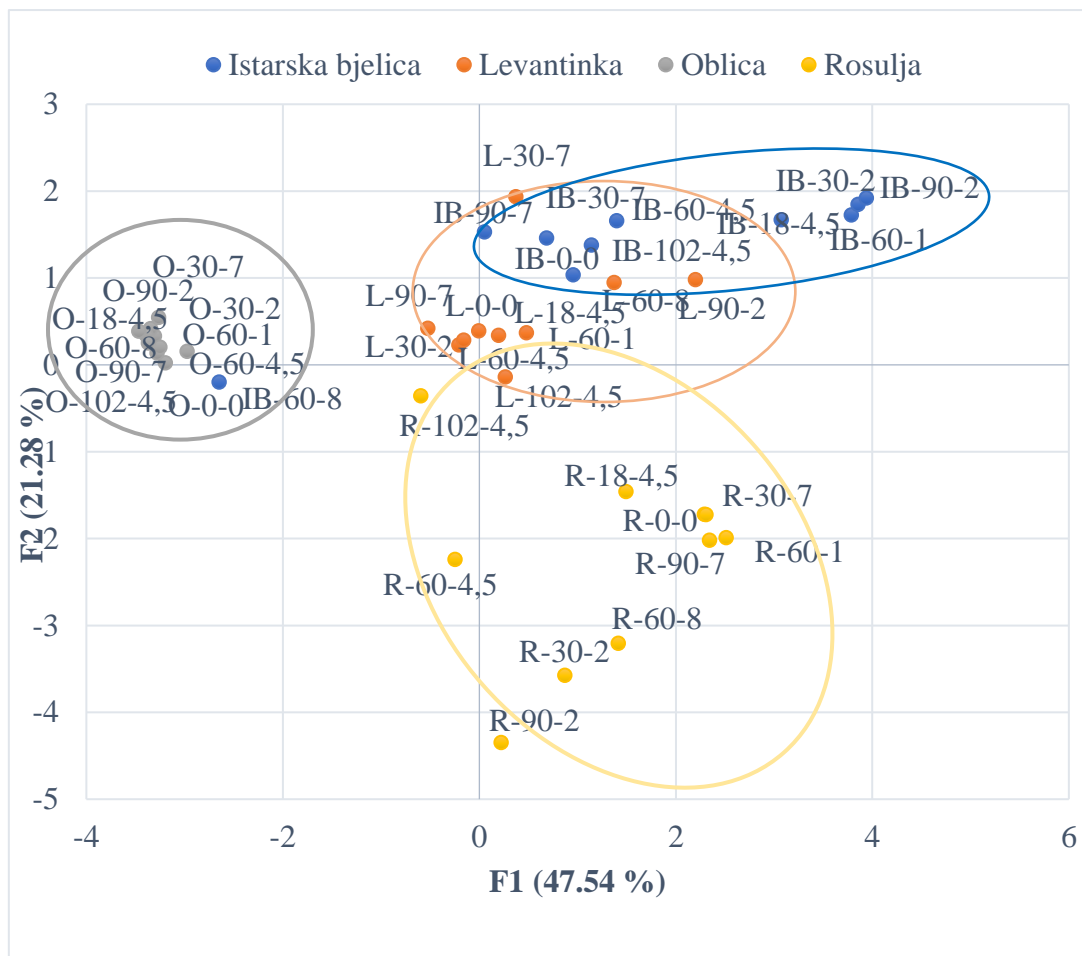
Na slici 6 prikazane su istraživane varijable (fenolni spojevi) u koordinatnom sustavu faktora 1 koji objašnjava 47,54 % varijabilnosti rezultata i faktora 2 koji objašnjava 21,28 % varijabilnosti rezultata. Faktor 1 je značajno pozitivno utjecao na koncentracije oleacina, oleokantala, ligstrozida, neidentificiranih spojeva oko oleacina, neidentificiranih spojeva u 3. i 4. skupini spojeva te na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva, dok je s druge strane, značajno negativno utjecao na koncentraciju tirosola. Faktor 2 je značajno pozitivno utjecao na koncentracije oleokantala, ligstrozida i neidentificirane spojeve oko oleokantala, dok je značajno negativno utjecao na koncentracije hidroksitirosola, neidentificiranih spojeva oko oleacina i neidentificiranih spojeva iz 3.skupine spojeva.



Slika 6. Projekcija fenolnih spojeva DMU-a proizvedenih uz predtretman PEP-em u prostoru prva 2 faktora

Na slici 7 prikazana je distribucija uzoraka u koordinatnom sustavu faktora 1 i 2. Jasno je vidljivo kako su stvorene definirane grupe prema sortama kao što je zamijećeno i kod ultrazvuka. Uzorci proizvedeni iz sorte istarske bjelice su se smjestili u I. kvadrantu što znači da su karakterizirani visokom koncentracijom oleokantala, ligstrozida i neidentificiranih spojeva oko oleokantala, odnosno spojevima koji pozitivno koreliraju s 1. i 2. faktorom. Uzorci proizvedeni iz sorte levantinke su se većim dijelom smjestili u I. kvadrantu, a manjim dijelom u II te su na njih faktori 1 i 2 utjecali pozitivno s manjom značajnošću nego na uzorke istarske bjelice. Uzorci proizvedeni iz sorte oblice su se smjestili u II. kvadrantu te je na njih faktor 1 utjecao negativno, dok je faktor 2 utjecao pozitivno. Uzorci proizvedeni iz sorte rosulje su se većinski smjestili u IV. kvadrantu što znači da su karakterizirani visokim koncentracijama

oleacina, neidentificiranih spojeva oko oleacina, spojeva iz 3. i 4. skupine neidentificiranih spojeva te ukupnih fenolnih spojeva, odnosno spojevima koji pozitivno koreliraju s faktorom 1, a negativno s faktorom 2. Kao i kod ultrazvuka, PCA je potvrdila rezultate dobivene ANOVA analizom, odnosno kako upravo sorta masline ima najznačajniji utjecaj na sastav fenolnih spojeva u DMU-u proizvedenom uz predtretman PEP-em.



Slika 7. Projekcija uzoraka DMU-a proizvedenih uz predtretman PEP-em u prostoru prva 2 faktora za fenolne spojeve (R-rosulja; IB-istarska bjelica; O-oblica; L-levantinka)

5 ZAKLJUČCI

1. DMU-a proizvedena iz istarskih sorti (rosulje i istarske bjelice) sadrže više udjele fenolnih spojeva od ulja proizvedenih iz dalmatinskih sorti (levantinke i oblice).
2. Najznačajniji utjecaj na sastav fenolnih spojeva u DMU-ima proizvedenim uz predtretman ultrazvukom i u DMU-ima proizvedenim uz predtretman PEP-em ima sorta masline.
3. Utjecaj snage ultrazvuka i vremena predtretmana na koncentracije fenolnih spojeva u DMU-u se pokazao negativnim s jače izraženim utjecajem na sorte rosulju i oblicu.
4. Jakost električnog polja pri predtretmanom PEP-om negativno je utjecala na koncentracije fenolnih spojeva u DMU-ima istarske bjelice i oblice. S druge strane, vrijeme predtretmana je imalo negativan utjecaj samo na ulja proizvedena iz sorte rosulja dok na ostale sorte nije značajnije utjecalo.
5. Predtretman ultrazvukom pokazuje veći negativan utjecaj na fenolne spojeve DMU-a, nego jakost električnog polja i vrijeme predtretmana PEP-em.

6 LITERATURA

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 Bioprocess Tech* **6**, 1367-1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>

Acar A, Arslan D (2018) Investigation of combined ultrasound and microwave pretreatments and enzyme addition on the main phenolics and some quality parameters of olive oil. *Acta Alimen Hung* **47**, 402-409. <https://doi.org/10.1556/066.2018.47.4.2>

Andreou V, Dimopoulos G, Alexandrakis Z, Katsaros G, Oikonomou D, Toepfl S i sur. (2016) Shelf-life evaluation of virgin olive oil extracted from olives subjected to nonthermal pretreatments for yield increase. *Innov Food Sci Emerg* **40**, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.009>

Andreou V, Kourmbeti E, Dimopoulos G, Psarianos M, Katsaros G, Taoukis P (2022) Optimization of virgin olive oil yield and quality applying nonthermal processing. *Food Bioprocess Tech* **15**, 891-903. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02788-2>

Bejaoui MA, Beltran G, Sánchez-Ortiz A, Sanchez S, Jimenez A (2016) Continuous high power ultrasound treatment before malaxation, a laboratory scale approach: Effect on virgin olive oil quality criteria and yield. *Eur J Lipid Sci Tech* **118**, 332-336. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500020>

Bejaoui MA, Sánchez-Ortiz A, Sánchez S, Jiménez A, Beltrán G (2017) The high power ultrasound frequency: Effect on the virgin olive oil yield and quality. *J Food Eng* **207**, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.013>

Benčić Đ, Cukom J, Gunjača J (2009) Morfološka različitost fenotipova masline (*Olea europaea* L.) lokalnog naziva „Bjelice“ u Istri. *Sjemenarstvo* **26**, 39-46. <https://hrcak.srce.hr/file/73694>

Bongiorno D, Di Stefano V, Indelicato S, Avellone G, Ceraulo L (2021) Bio-phenols determination in olive oils: Recent mass spectrometry approaches. *Mass Spectrom Rev* **21744**. <https://doi.org/10.1002/mas.21744>

Boskou D, Blekas G, Tsimidou M (2006) Olive oil composition. U: Boskou D (ured.) Olive oil, 2. izd., AOCS press, London, str. 41-72. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50008-0>

Cecchi L, Migliorini M, Mulinacci N (2021) Virgin olive oil volatile compounds: Composition, sensory characteristics, analytical approaches, quality control, and authentication. *J Agr Food Chem* **69**, 2013-2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07744>

Chávez Ramos K, Olguín Contreras LF, del Pilar Cañizares Macías M (2019) Lab-on-a-chip extraction of phenolic compounds from extra virgin olive oil. *Food Anal Method* **13**, 21-34. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01492-w>

Clodoveo ML (2013) An overview of emerging techniques in virgin olive oil extraction process: Strategies in the development of innovative plants. *J Agr Eng* **44**. <https://doi.org/10.4081/jae.2013.302>

Clodoveo ML (2019) Industrial ultrasound applications in the extra-virgin olive oil extraction process: History, approaches, and key questions. *Foods* **8**, 121. <https://doi.org/10.3390/foods8040121>

Clodoveo ML, Camposeo S, Amirante R, Dugo G, Cicero N, Boskou D (2015) Research and innovative approaches to obtain virgin olive oils with a higher level of bioactive constituents. U: Boskou D (ured.) Olive and olive oil bioactive constituents, AOCS Press, London, str. 179-215.

Clodoveo ML, Dipalmo T, Schiano C, La Notte D, Pati S (2014) What's now, what's new and what's next in virgin olive oil elaboration systems? A perspective on current knowledge and future trends. *J Agr Eng* **45**, 49-59. <https://doi.org/10.4081/jae.2014.193>

Clodoveo ML, Durante V, La Notte D (2013b) Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrason Sonochem* **20**, 1261-1270. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.001>

Clodoveo ML, Durante V, La Notte D, Punzi R, Gambacorta G (2013a) Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur J Lipid Sci Tech* **115**, 1062-1069. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200426>

Clodoveo ML, Moramarco V, Paduano A, Sacchi R, Di Palmo T, Crupi P i sur. (2017) Engineering design and prototype development of a full scale ultrasound system for virgin olive oil by means of numerical and experimental analysis. *Ultrason sonochem* **37**, 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.004>

Finicelli M, Squillaro T, Galderisi U, Peluso G (2021) Polyphenols, the healthy brand of olive oil: Insights and perspectives. *Nutrients* **13**, 3831. <https://doi.org/10.3390/nu13113831>

Foscolou A, Critselis E, Panagiotakos D (2018) Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas* **118**, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.10.013>

Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N (2012) Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *Int J Mol Sci* **13**, 3291-3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>

Godena S, Damijanić K, Milotić A (2009) Morfološke karakteristike masline sorte Rosinjola u Istri. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **15**, 27-36. <https://hrcak.srce.hr/50634>

Huang K, Tian H, Gai L, Wang J (2012) A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. *J Food Eng* **111**, 191-207. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.007>

IOC (2022) Determination of Phenolic Compounds. IOC-International Olive Council, <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/>. Pristupljeno 26. travnja 2023.

Iqdiam BM, Abuagela MO, Marshall SM, Yagiz Y, Goodrich-Schneider R, Baker IV i sur. (2019) Combining high power ultrasound pre-treatment with malaxation oxygen control to improve quantity and quality of extra virgin olive oil. *J Food Eng* **244**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.013>

Iqdiam BM, Mostafa H, Goodrich-Schneider R, Baker GL, Welt B, Marshall MR (2017) High power ultrasound: Impact on olive paste temperature, malaxation time, extraction efficiency, and characteristics of extra virgin olive oil. *Food Bioprocess Tech* **11**, 634-644. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2035-8>

Jemrić T (2013) Autohtone sorte i populacije voćaka kao nacionalno bogatstvo Republike Hrvatske. U: Neidhardt V (ured.) Hrvatska prirodna bogatstva, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, str. 203-210.

Jiménez A, Beltrán G, Uceda M (2007) 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>

- Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ i sur. (2020) Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* **9**, 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>
- Jukić Špika M, Liber Z, Montemurro C, Miazzi MM, Ljubenkov I, Soldo B i sur. (2022) Quantitatively unraveling hierarchy of factors impacting virgin olive oil phenolic profile and oxidative stability. *Antioxidants* **11**, 594. <https://doi.org/10.3390/antiox11030594>
- Kalogianni EP, Georgiou D, Hasanov JH (2019) Olive oil processing: Current knowledge, literature gaps, and future perspectives. *J Am Oil Chem Soc* **96**, 481-507. <https://doi.org/10.1002/aocs.12207>
- Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC (2008) Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Bio* **7**, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>
- Kaurinovic B, Vastag D (2019) Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. U: Shalaby E (ured.) *Antioxidants*, IntechOpen, London, str. 127 - 146.
- Keceli TM, Kamiloglu S, Capanoglu E (2017) Phenolic compounds of olives and olive oil and their bioavailability. U: Shahidi F, Kiristakis A (ured.) *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*, John Wiley & Sons, Chichester, str. 457-470.
- Kolton A, Długosz-Grochowska O, Wojciechowska R, Czaja M (2022) Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Sci Hortic–Amsterdam* **291**, 110561. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>
- Kulišić Bilušić T, Melliou E, Giacometti J, Čaušević A, Čorbo S, Landeka M, Magiatis, P (2017) Phenolics, fatty acids, and biological potential of selected Croatian EVOOs. *Eur J Lipid Sci Tech* **119**, 1700108. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700108>
- Leone A, Tamborrino A, Esposto S, Berardi A, Servili M (2022) Investigation on the effects of a pulsed electric field (PEF) continuous system implemented in an industrial olive oil plant. *Foods* **11**, 2758. <https://doi.org/10.3390/foods11182758>
- Lukić I, Krapac M, Horvat I, Godena S, Kosić U, Bubola KB (2017) Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. *Lwt* **87**, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.082>

Makovac E (2023) Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na antioksidacijski kapacitet hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Nardella M, Moschetti R, Nallan Chakravartula SS, Bedini G, Massantini R (2021) A review on high-power ultrasound-assisted extraction of olive oils: effect on oil yield, quality, chemical composition and consumer perception. *Foods* **10**, 2743. <https://doi.org/10.3390/foods10112743>

Navarro A, Ruiz-Méndez MV, Sanz C, Martínez M, Rego D, Pérez AG (2022) Application of pulsed electric fields to pilot and industrial scale virgin olive oil extraction: Impact on organoleptic and functional quality. *Foods* **11**, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142022>

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 M, López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Lamuela-Raventós RM, Martín-Belloso O, Vallverdú-Queralt A (2021) Impact of emerging technologies on virgin olive oil processing, consumer acceptance, and the valorization of olive mill wastes. *Antioxidants* **10**, 417. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>

Poljuha D, Sladonja B, Brkić Bubola K, Radulović M, Bršćić K, Šetić E, Krapac M, Milotić A (2008) A multidisciplinary approach to the characterisation of autochthonous Istrian olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Food Technol Biotech* **46**, 347-354. <https://hrcak.srce.hr/30410>

Rodríguez-López P, Lozano-Sanchez J, Borrás-Linares I, Emanuelli T, Menéndez JA, Segura-Carretero A (2020) Structure–biological activity relationships of extra-virgin olive oil phenolic compounds: Health properties and bioavailability. *Antioxidants* **9**, 685. <https://doi.org/10.3390/antiox9080685>

Serrelì G, Deiana M (2018) Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants* **7**, 170. <https://doi.org/10.3390/antiox7120170>

Štrikić F, Bandelj Mavsar D, Perica S, Cmelik Z, Satovic Z, Javornik B (2009) The main Croatian olive cultivar, 'Oblica', shows high morphological but low molecular diversity. *J Hortic Sci Biotechnol* **84**, 345-349. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512529>

Tamborrino A, Urbani S, Servili M, Romaniello R, Perone C, Leone A (2019) Pulsed electric fields for the treatment of olive pastes in the oil extraction process. *Appl Sci* **10**, 114. <https://doi.org/10.3390/app10010114>

Tarapoulouzi M, Agriopoulou S, Koidis A, Proestos C, Enshasy HAE, Varzakas T (2022) Recent advances in analytical methods for the detection of olive oil oxidation status during storage along with chemometrics, authenticity and fraud studies. *Biomolecules* **12**, 1180. <https://doi.org/10.3390/biom12091180>

Uncu O, Ozen B (2020) Importance of some minor compounds in olive oil authenticity and quality. *Trends Food Sci Tech* **100**, 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.013>

Uredba (2013) 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 1. srpnja 2023.

Velagić D (2016) Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Veneziani G, Sordini B, Taticchi A, Esposito S, Selvaggini R, Urbani S i sur. (2016) Improvement of olive oil mechanical extraction: New technologies, process efficiency, and extra virgin olive oil quality. U: Boskou D, Clodoveo M (ured.) *Products from olive tree*, InTech, Rijeka, str. 21-42.

Visioli F, Davalos A, López de las Hazas MC, Crespo MC, Tomé-Carneiro J (2020) An overview of the pharmacology of olive oil and its active ingredients. *Brit J Pharmacol* **177**, 1316-1330. <https://doi.org/10.1111/bph.14782>

Yahyaoui A, Rigane G, Mnif S, Salem RB, Acar A, Arslan D (2019) Ultrasound technology parameters: effects on phenolics in olive paste and oil in relation to enzymatic activity. *Eur J Lipid Sci Tech* **121**, 1800295. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800295>

Zaiontz C (2023) Principal Component Analysis – Real Statistics. <https://real-statistics.com/multivariate-statistics/factor-analysis/principal-component-analysis/>

Pristupljeno 13. svibnja 2023.

Zeb A (2021) A comprehensive review on different classes of polyphenolic compounds present in edible oils. *Food Res Int* **143**, 110312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110312>

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

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>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Brezjan 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.

Petra Brezjan

Vlastoručni potpis