

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

Emili Makovac
0058216389

**UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA
NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET HRVATSKIH
DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: 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)

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

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na antioksidacijski kapacitet hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja

Emili Makovac, 0058213689

Sažetak:

Jedan od izazova s kojima se susreće industrija proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja je nisko iskorištenje procesa izdvajanja ulja korištenjem postojećih tehnologija. Osim toga, konvencionalnim tehnologijama proizvodnje ulja značajan udio bioaktivnih spojeva, poput polifenola, fitosterola i tokoferola zaostaje u nusproizvodima. Primjena pulsirajućeg električnog polja tijekom procesa ekstrakcije djevičanskog maslinovog ulja može povećati iskorištenje procesa ali može utjecati i na kvalitetu ulja. U ovom radu ispitan je utjecaj pulsirajućeg električnog polja na antioksidacijski kapacitet hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja sorti rosulja, istarska bjelica, oblica i levantinka. Antioksidacijski kapacitet određivan je DPPH metodom pomoću EPR spektroskopije. Rezultati su pokazali da sorta masline u najvećoj mjeri utječe na antioksidacijski kapacitet proizvedenih ulja. Primjenom pulsirajućeg električnog polja kao predtretmana procesu miješenja došlo je do značajnog povećanja antioksidacijskog kapaciteta u uljima sorti rosulje i levantinke, dok je to povećanje bilo značajno niže kod ulja proizvedenih iz sorti istarska bjelica i oblica. Vrijeme trajanja PEP tretmana i jakost električnog polja imaju značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet proizvedenih djevičanskih maslinovih ulja, ali bez jedinstvenog trenda za istraživane sorte.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, pulsirajuće električno polje, djevičansko maslinovo ulje, elektronska paramagnetska rezonancija

Rad sadrži: 25 stranica, 5 slika, 3 tablice, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv.prof.dr.sc. Klara Kraljić

Datum obrane: 14 srpnja, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Technology and Biotechnology
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

The effect of a pulsed electric field on the antioxidant capacity of Croatian virgin olive oils

Emili Makovac, 0058216389

Abstract:

One of the challenges for virgin olive oil producers is the low extraction yield of existing technologies. In addition, conventional technology leaves a significant amount of bioactive compounds such as polyphenols, phytosterols and tocopherols in the by-products. The introduction of a pulsed electric field into the extraction process of virgin olive oil can increase the yield but also affect the quality of the oil. In the present study, the effect of a pulsed electric field on the antioxidant capacity of Croatian virgin olive oils of the Rosulja, Istarska Bjelica, Oblica and Levantinka varieties was investigated. Antioxidant capacity was determined by DPPH method using EPR spectroscopy. The results showed that the olive variety has the greatest influence on the antioxidant capacity of the produced oils. Pretreatment of olive paste before malaxation with a pulsed electric field resulted in a significant increase in antioxidant capacity in the oils of Rosulja and Levantinka varieties, while this increase was significantly lower in the oils of Istarska Bjelica and Oblica varieties. The duration of PEF treatment and the strength of the electric field have a significant influence on the antioxidant capacity of the virgin olive oils produced, but without a unique trend for the investigated varieties.

Key words: antioxidant capacity, pulsating electric field, virgin olive oil, phenolic compounds, electron paramagnetic resonance

Thesis contains: 25 pages, 5 figures, 3 tables, 32 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Klara Kraljić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: July, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1.OKSIDACIJA	2
2.2.ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET.....	3
2.3.PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA.....	6
2.4.NOVE METODE U PROIZVODNJI MASLINOVOG ULJA.....	9
2.4.1. Pulsirajuće električno polje.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1.MATERIJAL.....	12
3.2.METODE.....	12
3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman pulsirajućim električnim poljem (PEP)	12
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta EPR spektroskopijom	13
3.2.3. Statistička obrada.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
5. ZAKLJUČCI.....	21
6. POPIS LITERATURE.....	22

1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) ima dugu povijest kao ključni sastojak u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva. Uz prepoznavanje njegove iznimne prehrambene, preventivne i terapijske vrijednosti, maslinovo ulje danas predstavlja simbol zdravog načina prehrane i suvremenog načina života.

U procesu prerade maslina u ulje, tradicija i iskustveni pristup postupno ustupaju mjesto suvremenom načinu prerade. Sve više se istražuju nove i inovativne tehnologije poput ultrazvuka, toplinskih tretmana, mikrovalova i pulsirajućeg električnog polja kako bi se povećala učinkovitost proizvodnje i proizvelo djevičansko maslinovo ulje više nutritivne vrijednosti i bolje održivosti (Svirčević, 2021). Jedan od glavnih problema u industriji proizvodnje je nisko iskorištenje procesa izdvajanja ulja pomoću postojećih tehnologija. Također je važno napomenuti da značajan udio bioaktivnih spojeva, kao što su polifenoli, fitosteroli i tokoferoli, ostaje zarobljen u nusproizvodima proizvodnje DMU, komini i vegetabilnoj vodi (Butković, 2018). Jedna od ključnih faza u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja je miješenje maslinovog tijesta. U ovoj fazi dolazi do izdvajanja ulja i bioaktivnih spojeva koji su prisutni u plodu masline. Kako bi se poboljšala učinkovitost ove faze uvode se nove tehnologije. Ove tehnologije se primjenjuju prije miješenja kako bi se poboljšala ekstrakcija ulja i povećala koncentracija bioaktivnih spojeva (Martinez-Beamonte i sur., 2022). Cilj je iskoristiti prednosti ovih tehnologija kako bi se postigao bolji rezultat u proizvodnji maslinovog ulja.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja kao predtretmana procesa miješenja na antioksidacijski kapacitet autohtonih hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ulja korištena je tehnika spektroskopije elektronske paramagnetske rezonancije (EPR).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OKSIDACIJA

Oksidacijske promjene u hrani dovode do razvoja neugodnih okusa i mirisa. Reakcije oksidacije lipida s drugim molekulama hrane, posebno proteinima, dovodi do degradacije struktura hrane, funkcionalnih svojstava i nutritivne vrijednosti (Schaich, 2005). Djevičansko maslinovo ulje, poput ostalih ulja i masti, podložno je procesu oksidacijskog kvarenja. Izlaganje svjetlosti, zraku i previsokoj temperaturi, kao i prisutnost tragova teških metala potiču oksidacijske promjene. One nastaju djelovanjem kisika na nezasićene masne kiseline i stvaranjem hidroperoksidnih radikala (Bakarić i sur., 2008). Ti procesi započinju već u plodu, a nastavljaju se u razdoblju čuvanja plodova do prerade i također u izdvojenom ulju. Oksidacija je glavni uzrok smanjenja kvalitete djevičanskog maslinovog ulja, a brzina same reakcije određuje trajnost proizvoda (Škarica i sur., 1996).

Autooksidacija se obično opisuje kao lančana reakcija koja se odvija u nekoliko faza. U prvoj fazi, nezasićene masne kiseline reagiraju s kisikom iz zraka, formirajući slobodne radikale. U drugoj fazi reakcije, slobodni radikali formiraju hidroperokside i peroksidne radikale, koji se dalje razgrađuju na sekundarne produkte poput aldehida, ketona, alkohola, masnih kiselina i drugih spojeva (Žanetić i Gugić, 2005). Peroksilni radikali djeluju kao lanci nositelji ili propagatori u početnoj fazi oksidacije, ali ne djeluju isključivo putem apstrakcije vodikovih atoma. Peroksilni radikali koji se prvobitno formiraju na bilo kojem mjestu u masnoj kiselini prenose nespareni elektron na susjedne molekule lipida, oduzimajući atom vodika iz alilne pozicije ili hidroperoksida. Taj proces se ponavlja iznova i iznova dok se lanac ne prekine. Peroksilni radikali mogu se rekombinirati i formirati intermedijarni tetroksid koji se dalje razgrađuje na tri moguća načina, što omogućuje širenje lančane reakcije. Dominantni put uključuje formiranje alkoksilnih radikala. Način prekida lanca je stvaranje relativno stabilnih peroksida ili ketona i alkohola. Produkti autooksidacije uzrokuju promjenu senzorskih svojstava i smanjenje nutritivne vrijednosti ulja (Schaich, 2005).

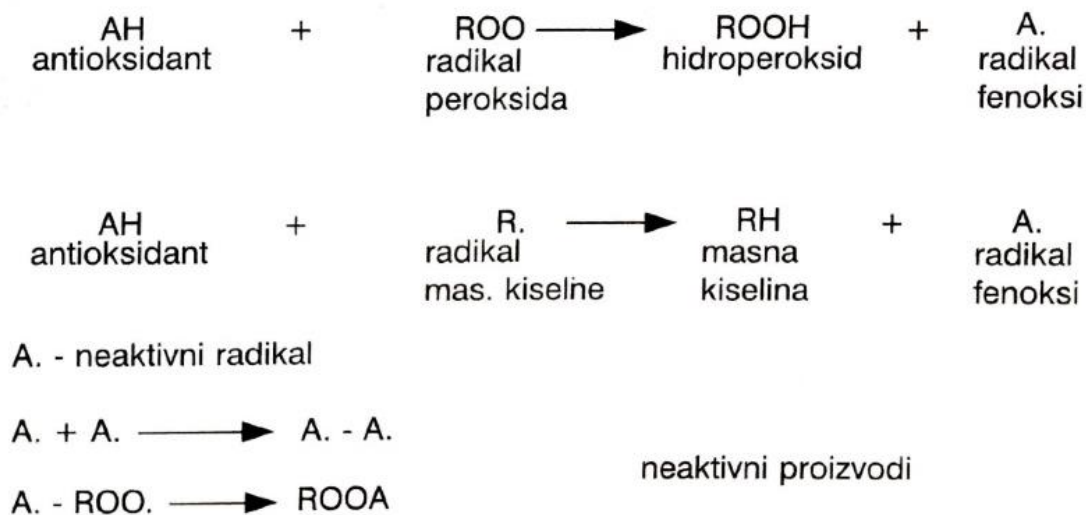
Klorofilni pigmenti i feofitini u ulju apsorbiraju svjetlosnu energiju te je prenose na druge spojeve. To može rezultirati stvaranjem aktivirane molekule kisika koja pokreće niz reakcija fotooksidacijskog kvarenja DMU. Singletne molekule kisika mogu izravno reagirati s dijelovima dvostruke veze nezasićenih lipida (Senanayake i sur., 2005). Klorofil i njegovi derivati imaju svojstvo ubrzavanja oksidacije ulja na svjetlu, dok u mraku djeluju kao antioksidansi (Škarica i sur. 1996).

Prilikom zagrijavanja DMU, bilo da se radi o prženju u kuhinjama ili industrijskim postrojenjima, dolazi do ubrzanog procesa oksidacije ulja. Visoka temperatura, prisutnost vodene pare i zraka potiču složene kemijske reakcije termooksidacije. Stupanj termooksidacijskih promjena ovisi o vrsti ulja, temperaturi i trajanju zagrijavanja. Djevičanska maslinova ulja, u čijem sastavu dominira jednostruko nezasićena oleinska masna kiselina, manje su podložna oksidaciji i pogodna su za prženje (Bakarić i sur., 2008).

Enzimaska oksidacija također utječe na nutritivne i senzorske parametre DMU. Lipoksigenaze, enzimi koji sadrže željezo u aktivnom mjestu, kataliziraju oksidacijske reakcije između kisika i nezasićenih lipida koji sadrže cis,cis-1,4-pentadienske sustave. Hidroperoksidi koji se stvaraju djelovanjem lipoksigenaze na višestruko nezasićene masne kiseline i triacilglicerole mogu se razgraditi u sekundarne oksidacijske proizvode kao što su aldehidi, ketoni, kiseline ili druge tvari koje uzrokuju nepoželjne okuse i neugodne mirise, što dovodi do oksidativne užeglosti (Wanasundara i Shahidi, 2005).

2.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Interes za hranom bogatom prirodnim antioksidansima raste zbog njihovih očitih prednosti poput antikarcinogenih sredstava i inhibitora biološki štetnih oksidacijskih reakcija u tijelu. Antioksidansi su spojevi, najčešće fenolne strukture, koji usporavaju proces oksidacijskog kvarenja ulja i produljuju njegovu trajnost. Oni reagiraju sa slobodnim radikalima, koji su nastali oksidacijom nezasićenih masnih kiselina otpuštajući vodik, pri čemu nastaju stabilni spojevi (Bakarić i sur., 2008). Postoje primarni i sekundarni antioksidansi koji se razlikuju prema mehanizmu djelovanja. Primarni antioksidansi direktno inhibiraju lančanu reakciju oksidacije. Oni djeluju kao donori vodika ili akceptori slobodnih radikala, stvarajući pri tome stabilnije radikale. Sekundarni antioksidansi ili sinergisti djeluju na način da vežu tragove metala čime ih inaktiviraju i isključuju njihovo prooksidacijsko djelovanje, te također obnavljaju i produljuju djelovanje antioksidansa davanjem vodikova atoma ili sprječavaju djelovanje antioksidanasa na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006). Mehanizam djelovanja antioksidansa prikazan je na slici 1.



Slika1. mehanizam djelovanja antioksidanasa (Škarica i sur. 1996)

Fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju imaju veliku važnost jer djeluju kao prirodni antioksidansi koji štite ulje od oksidacijskih promjena ali utječu i na senzorska svojstva DMU, što uključuje gorčinu, pikantnost i oporost. Posebno se ističe hidroksitirozol, fenolni alkohol, zbog svoje značajne uloge u poboljšanju stabilnosti prirodnog djevičanskog maslinovog ulja. Zahvaljujući prisutnosti fenolnog prstena u molekularnoj strukturi i bočnih lanaca, fenolne kiseline imaju sposobnost prihvaćanja slobodnih radikala (Wanasundara i Shahidi, 2005).

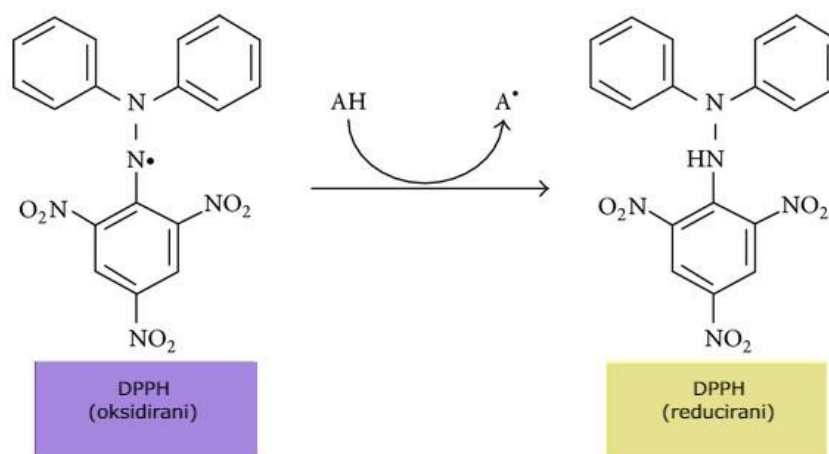
Tokoferoli su neosapunjivi, negliceridni spojevi s izuzetno snažnim antioksidativnim svojstvima. Oni imaju sposobnost stabiliziranja stanične stijenke, ali također pridonose stabilizaciji drugih spojeva poput enzima, hormona, vitamina A i ubikinona. Tokoferoli pokazuju najraznovrsnije antioksidacijsko djelovanje: djeluju kao inaktivatori slobodnih radikala, hvatači slobodnih radikala te kao gasitelji singlet kisika (Bakarić i sur., 2008). Najsnažnije antioksidacijsko djelovanje ima δ -tokoferol, a zatim γ -tokoferol.

Pigmenti u djevičanskom maslinovom ulju mogu se podijeliti u dvije skupine: karotenoide i klorofile. Udio i sastav ovih pigmenata ovise o sorti maslina, stupnju zrelosti ploda i načinu prerade. Najčešće prisutni karotenoidi u djevičanskom maslinovom ulju su β -karoten i ksantofil, dok je klorofilni pigment poznat kao feofitin. Klorofili i karotenoidi utječu i na autooksidacijske i fotooksidacijske procese u ulju (kao prooksidansi ili kao antioksidansi) (Škevin, 2016). Kao što je već ranije spomenuto, upravo su klorofili ti koji u djevičanskim

maslinovim uljima imaju dvojnu ulogu. Dok pod utjecajem svjetla djeluju kao inicijatori fotooksidacijskih reakcija, u mraku imaju antioksidacijsko djelovanje. Određeni karotenoidi, kao što je β -karoten, posjeduju biološku aktivnost sličnu vitaminu A, stoga se smatraju provitaminom A. Osim toga, karotenoidi mogu imati antioksidativno djelovanje na dva načina. Prvo, djeluju kao primarni antioksidansi hvatanjem slobodnih radikala. Drugo, mogu djelovati kao sekundarni antioksidansi gašenjem singletnog kisika (Wanasundara i Shahidi, 2005).

Antioksidacijski kapacitet daje informaciju o sposobnosti nekog spoja ili uzorka da u zadanom vremenu ukloni određenu količinu reaktivnih spojeva, ali ne daje informaciju o samoj brzini reakcija (Laguerre i sur., 2007).

Metoda gašenja 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikala, obzirom na mehanizam (slika 2), pripada SET metodi (eng. Slowelectron transport). SET metode temelje se na određivanju antioksidansa pomoću transporta elektrona koji ima mogućnost redukcije oksidativne tvari. Antioksidansi reduciraju DPPH radikal, rezultirajući stvaranjem DPPH spoja blijedožute boje. Postotak smanjenja koncentracije slobodnog DPPH radikala ekvivalentan je koncentraciji antioksidansa (Previšić, 2019).



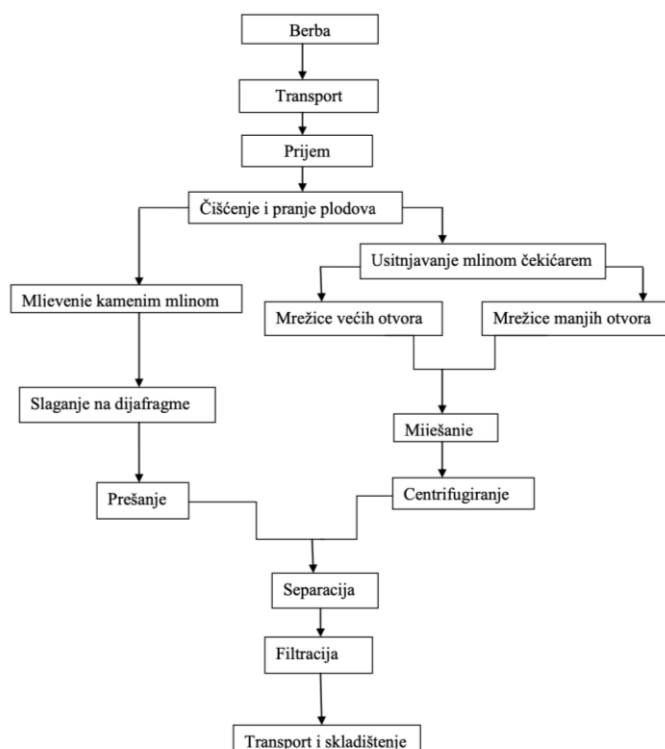
Slika 2. Reakcija redukcije DPPH radikala (Teixeira i sur., 2013)

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) spektroskopija predstavlja jednu od metoda koja se koristi za procjenu antioksidacijskog kapaciteta, odnosno omogućuje izravno kvantitativno određivanje slobodnih radikala u uzorku te mjerenje njihove koncentracije. Ova se spektroskopska metoda temelji na interakciji elektromagnetskog zračenja, posebno zračenja mikrovalova, s paramagnetskim sustavom u prisutnosti magnetskog polja (Cammack, 2017).

Uzorak se stavlja u homogenu vanjsko magnetsko polje. Paramagnetski sustav, poput iona ili slobodnog radikala s nesparenom elektronom ($S = 1/2$), ima različite energetske orijentacije elektronskog spina u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja. Te orijentacije su paralelne (α -elektroni) ili antiparalelne (β -elektroni) magnetskom polju (Brückner, 2007). Energije α -elektrona i β -elektrona nisu jednake, što rezultira Zeemanovim efektom, odnosno razdvajanjem energijskih razina α - i β -elektrona u paramagnetskom sustavu (Pirker i sur., 2008). Razlika u energiji između tih razina proporcionalna magnetskom polju što je i temelj elektronske paramagnetske rezonancije. Metoda je praktična, precizna i efikasna, iako zahtjeva opremu koja može biti skupa, a mjerenja su neinvazivna i lako ponovljiva (Maltar Strmečki i Rakvin, 2004).

2.3. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Djevičansko maslinovo ulje proizvodi se isključivo mehaničkim postupcima te u njegovoj proizvodnji izričito je zabranjeno koristiti sredstva s kemijskim ili biokemijskim djelovanjem (Bakarić i sur. 2008). Suvremena se prerada maslina sastoji od čišćenja i pranja plodova, mljevenja, miješenja tijesta, odvajanje čvrstog od tekućeg dijela, separacije uljnog mošta na ulje i vodu (Škarica i sur., 1996) (slika 3).



Slika 3. Tehnološki proces proizvodnje maslinovog ulja (Marić, 2019)

Promjena kemijskog sastava DMU moguća je tijekom prerade maslina, zbog mehaničkih postupaka koji izazivaju niz unutrašnjih reakcija između vode-ulja i čvrstih sastojaka, a ponajviše promjena sastojaka negliceridnog dijela koji su vrlo značajni za kvalitetu ulja. Jedan od osnovnih preduvjeta proizvodnje kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja je svjež i zdrav plod masline (Škarica i sur., 1996).

Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja započinje pripremom ploda za proces separacije ulja, odstranjivanjem lišća i grančica te pranjem. Krupnije grane uklanjaju se usipavanjem u koš kroz rešetku, dok se sitnije grančice i lišće uklanjaju strujom zraka. Ostale površinske nečistoće uklanjaju se vodom. Nečistoće je važno ukloniti kako bi se izbjegle promjene organoleptičkih svojstva ulja, "zemljani okus", "okus po listu", a mogu dovesti i do mehaničkih oštećenja strojeva. Za neke sorte maslina poželjno je izdvajanja koštice prije mljevenja ploda. Izdvajanjem koštice izbjegava se nepoželjno djelovanje enzima sadržanih u sjemenci na formiranje okusno- mirisnih svojstava te na otapanje fenolnih tvari u ulju tijekom miješenja tijesta (Koprivnjak, 2006).

Masline se zatim drobe i usitnjavaju različitim vrstama kamenih i metalnih mlinova, tako da se dobije homogena smjesa – maslinovo tijesto, koje se sastoji od vode, ulja i komine. U tom trenutku ulje koje je do tada bilo nakupljeno u vakuolama dolazi u kontakt s kisikom, enzimima, tvarima iz kožice ili sjemenke. Zapčinje niz fizikalnih, kemijskih i biokemijskih reakcija koje određuju sastav i senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Kameni mlinovi predstavljaju početak tradicionalnog postupka prerade. Masline se drobe između velikih granitnih valjaka s nazubljenom površinom. Prednost kamenih mlinova je to što dolazi do manje raspršenosti kapljica ulja, stvaranja emulzija te manjeg oslobađanja topline. S druge strane, metalni mlinovi imaju veći kapacitet, zauzimaju manje prostora i dolazi do većeg izdvajanja fenolnih spojeva. U novijim postrojenjima češća je upotreba mlinova čekićara, naspram mlinova s diskovima. Usavršavanjem mlina čekićara nedostaci metalnih mlinova su znatno smanjeni.

Nakon mljevenja dobiva se maslinovo tijesto, koje se u metalnim koritima mijesi neprekidnim i sporim miješanjem. Svrha mu je da poveća količinu „slobodnog ulja“ pospješujući spajanje sitnih kapljica ulja u veće kapi, tako da se mogu lakše odvajati te da smanji stanje emulzije ulje i voda. Miješenjem maslinovog tijesta u trajanju do 60 minuta i temperaturi do 20 °C, postiže se visoka kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja. U postupku

miješenja dolazi do ekstrakcije fenola i hlapljivih aromatskih sastojaka u ulje (Škarica i sur., 1996). Brojne promjene koje reguliraju endogeni enzimi ploda masline odvijaju se tijekom mljevenja i miješenja. Stanične stijenke i ovojnice vakuola razgrađuju pektolitički i hemicelulolitički enzimi, što olakšava oslobađanje ulja i drugih tvari iz stanice. Iz triacilglicerola su, djelovanjem lipaza, hidrolizom oslobođene slobodne masne kiseline. Djelovanjem glukozidaze fenolni glukozidi (oleuropein i ligstrozid) gube molekulu glukoze i prelaze u fenolne aglikone koji su topiviji u ulju. Enzimska aktivnost ima ključnu ulogu ne samo u iskorištenju procesa proizvodnje ulja, već i u formiranju poželjnih senzorskih svojstava. U tom procesu, lipoksigenaza i hidroperoksid liaza, potiču stvaranje poželjnih aroma tvari u djevičanskom maslinovom ulju (Škevin, 2016).

Nakon miješenja slijedi postupak separacije ulja iz maslinovog tijesta, koja se vrši postupcima prešanja, kontinuirane centrifugalne ekstrakcije i procjeđivanja. 'Tradicionalni postupak' odnosno prešanje, obavlja se pomoću hidrauličnih preša visokog pritiska (Škarica i sur., 1996). Potrebno je ravnomjerno rasporediti maslinovo tijesto na filtrirajuće slojnice; nakon punjenja 4-5 slojnica jedne na drugu, ulaže se metalni disk koji pospješuje ravnomjerno raspoređivanje tlaka tijekom prešanja. 'Tradicionalni postupak' je jednostavan, pouzdan i ekonomičan način proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja, dok su mu najveći nedostaci začepljenje i habanje filtrirajućih slojnica. Princip separacije djevičanskog maslinovog ulja iz tijesta kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom je razlika u gustoći ulja, vegetabilne vode i komine. Ovaj postupak odvija se u dekanterima (horizontalnim separatorima) (Škevin, 2016). Dodavanjem odgovarajuće količine tople vode smjesa se u dekanteru razdvaja na tri spomenuta dijela. Veliki nedostatak ovog načina separacije djevičanskog maslinovog ulja je velika količina otpadne vode u kojoj zaostaju fenolni spojevi. Uz prešanje i centrifugiranje, moguće je ulje izdvojiti i procjeđivanjem. Provodi se koristeći razlike u površinskoj napetosti ulja i vegetabilne vode, ali ulje proizvedeno ovim postupkom je vrlo izloženo zraku te time i osjetljivije na oksidaciju. Glavni je problem što visok udjel ulja zaostaje u komini koja onda mora na centrifugalnu ekstrakciju. Ovakav pogon je vrlo skup jer se sastoji od dijela za procjeđivanje uz dio za centrifugalnu ekstrakciju DMU

Smjesa ulja i vegetabilne vode čine uljani mošt, a završni korak u preradi maslina u djevičansko maslinovo ulje je odvajanje biljne vode i čvrstih čestica iz uljnog mošta. Postupak se vrši uporabom vertikalne centrifuge ili dekantacijom. Vrlo često, mlada djevičanska maslinova ulja zadržavaju mutnoću čak i nakon centrifugiranja zbog prisutnosti vrlo sitnih čestica biljnog tkiva i kapljica biljne vode koje se raspršuju u ulju. Bistrenje DMU može se

provesti taloženjem prirodnim putem ili filtracijom na filterskim prešama (Bakarić i sur., 2008). Tako pripremljeno djevičansko malinovo ulje čuva se u spremnicima zaštićeno od utjecaja svjetla, visoke temperature i teških metala (Škarica i sur., 1996).

2.4. NOVE METODE U PROIZVODNJI MASLINOVOG ULJA

Tehnološki napredak omogućio je razvoj novih metoda u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja. Primjenom ultrazvuka, mikrovalova, ubrzanog toplinskog tretmana (UTT) i pulsirajućeg električnog polja (PEP) moguće je ostvariti učinkovitije i ekološki prihvatljivije ekstrakcije. Zajedničko je svim ovim tehnikama da se obrada materijala odvija na sobnoj temperaturi, odnosno da dolazi do neznatnog povišenja temperature kao posljedice same obrade te da sam proces traje kratko, od jedne do deset minuta (Brnčić i sur., 2009). U samom postupku proizvodnje DMU, nove tehnologije se kombiniraju s miješenjem ili ga čak potpuno zamjenjuju (Svirčević, 2021).

Ekstrakcija maslinovog ulja uz pomoć ultrazvuka je postupak koji efikasno koristi zvučne valove za ekstrakciju uzorka. Ultrazvučna ekstrakcija koristi kavitacijski učinak koji rezultira povišenjem temperature otapala i poticanjem strujanja čestica iz biljnih stanica putem disrupcije stanične stijenke. Vibracije ultrazvuka slabe staničnu stijenu i membranu te povećavaju pore u stanicama, što rezultira većom difuzijom i osmozom biološki aktivnih spojeva. Kavitacijski učinak ovisi o frekvenciji i intenzitetu ekstrakcije, svojstvima medija/otapala (viskozitet i površinska napetost) te o uvjetima u sustavu (temperatura i tlak) (Han, 2020). Prednosti ovog postupka su relativna brzina, jednostavnost, smanjenje veličine čestica analita, ubrzani prijenos mase tvari i dostupnost prikladnih instrumenata. Upotreba ultrazvuka u postupku proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja omogućuje skraćivanje vremena miješenja i povećanje učinkovitosti proizvodnog procesa (Svirčević, 2021).

Ekstrakcija pomoću mikrovalova temelji se na zagrijavanju polarnih otapala u kontaktu s krutim uzorcima te razdjeljivanju željenih komponenti između uzorka i otapala pomoću energije mikrovalova. Mikrovalovi uzrokuju zagrijavanje materijala kroz procese ionske kondukcije i rotacije dipola. Ionska kondukcija se odnosi na kretanje iona, dok se rotacija dipola odnosi na zakretanje polarnih molekula s dielektričnim svojstvima pod utjecajem promjenjivog elektromagnetskog polja (Svirčević, 2021). Kao posljedica toga, dolazi do razaranja staničnih stijenki u biljnom materijalu te izlaska staničnog sadržaja iz stanice. Zagrijavanje mikrovalovima koristi elektromagnetske valove vrlo visoke frekvencije, najčešće

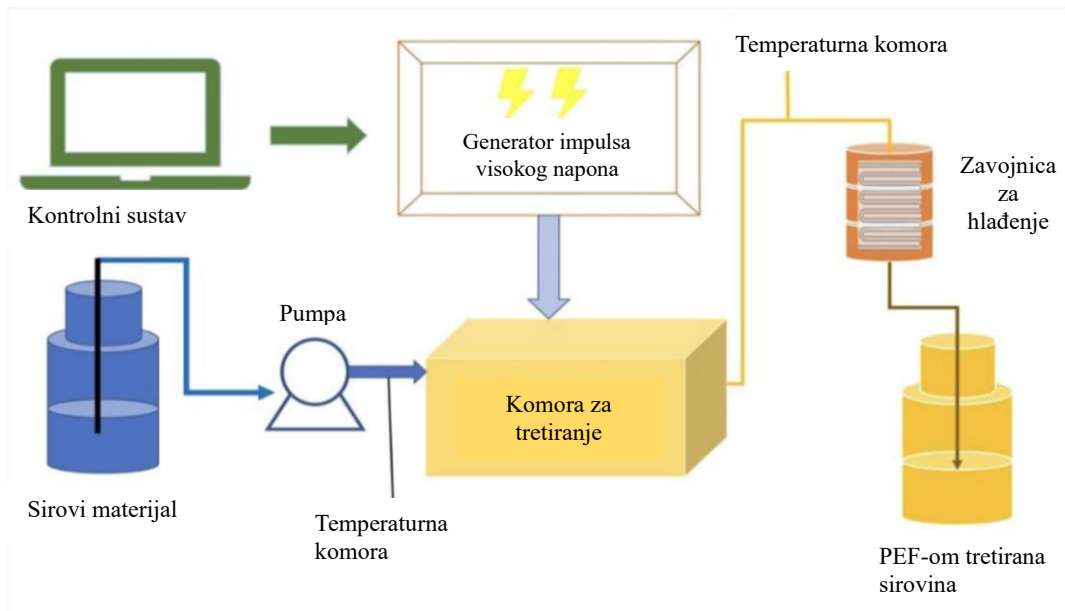
između 915 MHz i 2450 MHz (Lovrić, 2003). Primjena mikrovalova u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja povećava oksidacijsku stabilnost ulja i udio hlapljivih spojeva, dok ne utječe na iskorištenje proizvodnog procesa (Svirčević, 2021).

Uvođenje tehnologije ubrzanog toplinskog tretmana u proces toplinskog kondicioniranja maslinovog tijesta prije miješenja predstavlja inovativan pristup izdvajanju ulja, koji može promijeniti dosadašnje metode toplinskog kondicioniranja. Primjena ubrzanog toplinskog tretmana omogućuje smanjenje vremena potrebnog za toplinsko kondicioniranje tijekom faze miješenja. Također, njegova primjena ima značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja. Istraživanje provedeno od strane Veneziani i sur. (2015) pokazalo je da toplinska modifikacija prilikom izdvajanja ulja ne utječe na osnovne kemijske i biokemijske procese, a koncentracija fenolnih spojeva u uljima dobivenim ubrzanim toplinskim tretmanom je bila uvijek veća nego u uljima izdvojenih tradicionalnim postupkom.

2.4.1. Pulsirajuće električno polje

Procesiranje pulsirajućim električnim poljem (eng. *Pulsed electric field*) visokog intenziteta zasniva se na primjeni pulseva visokog napona (obično 20-80 kV/cm) na prehrambeni proizvod smješten između dviju elektroda. Proces se provodi na približno sobnoj temperaturi u trajanju manje od jedne sekunde. Gubici energije zbog zagrijavanja proizvoda su minimalni, dok je kvaliteta proizvoda znatno očuvanija u usporedbi s konvencionalnom toplinskom obradom (Lovrić, 2003). PEP tretman uzrokuje razvoj pora u staničnim membranama, koje mogu biti trajne ili privremene, ovisno o intenzitetu i uvjetima tretmana. Stvaranje pora povećava propusnost membrane, što rezultira gubitkom sadržaja stanice ili prodorom okolnog medija. Ovisno o jakosti električnog polja, primjena PEP tretmana može inducirati stres u tkivu, poboljšati prijenos mase ili inaktivirati mikroorganizme (Abenoza i sur., 2013).

PEP omogućuje kontinuirani rad s vrlo kratkim vremenima obrade, što olakšava integraciju u postojeće proizvodne linije (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz mogućeg kontinuiranog PEP uređaja koji se koristi za obradu uzoraka hrane (Taha i sur., 2022)

U istraživanju Abenoza i suradnika (2013), primjena PEP tretmana nije utjecala na senzorska svojstva maslinovog ulja niti na sastav masnih kiselina. Analize su pokazale da nema značajnih razlika u sadržaju zasićenih, nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Slični rezultati su dobiveni i za oleinsku masnu kiselinu, koja je najvažnija masna kiselina u maslinovom ulju s nutritivnog gledišta. Međutim, primjena PEP tretmana je rezultirala značajnim povećanjem sadržaja fenolnih spojeva, fitosterola i tokoferola (Martinez-Beamonte i sur., 2022; Veneziani i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Kao materijal u ovom završnom radu korišteni su uzorci monosortnih djevičanskih maslinovih ulja četiriju hrvatskih autohtonih sorti: oblica, rosulja, istarska bjelica i levantinka. DMU su proizvedena laboratorijskim postupkom koji je uključivao predtretman samljevenog tijesta maslina pulsirajućim električnim poljem (PEP) prije faze miješenja. Uzorci ulja su do analiza čuvani u malim bočicama od 2 mL na temperaturi od -18 °C.

3.2. METODE

3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz tretman pulsirajućim električnim poljem (PEP)

Plodovi maslina se očiste i operu te zatim samelju na mlinu čekićaru koji je dio polulaboratorijske uljare OLEUM 30 COMPACT (Enotecnica Pillan Oleum 30 Compact, Camisano Vicentino, Italija). Maslinovo tijesto (1 kg), se odmah nakon mljevenja tretira pulsirajućim električnim poljem koristeći HVG60/1 PEP (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska). PEP tretman provodi se u posebno dizajniranom reaktoru promjera 23 cm, a udaljenost visokonaponskih elektroda od nehrđajućeg čelika iznosi 2,5 cm. Prilikom punjenja reaktora potrebno je istisnuti višak zaostalog zraka kako bi se spriječio nastanak plazma izboja. Eksperiment je proveden prema centralnom kompozitnom planu kako bi se ispitaio utjecaj različitih snaga električnog polja (1 - 8 kV/cm) i vremena trajanja tretmana (18 - 102 s), a smanjio broj potrebnih eksperimenata (tablica 1.).

Nakon tretmana, tijesto se prebaci u inoks posude koje se stave u vodenu kupelji Stuart SBS40 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD) na 27 °C, te se miješenje u trajanju od 40 minuta provodi pomoću miješalice (VELP Scientifica, Usmate, Italija). Temperatura tijesta provjerava se ubodnim termometrom. Nakon provedenog miješenja tijesta, tijesto se centrifugira pri 5000 o/min i sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta na centrifugi Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka) s ciljem odvajanja komine i uljnog mošta. Uljni mošt se ulije u menzuru, i nakon kratkog odvajanja vodene i uljne faze, uljna faza se prebaci u kivete za centrifugu i dodatno centrifugira pri 5000 o/min u trajanju od 5 minuta na 18 °C.

Tablica 1. Uvjeti proizvodnje DMU uz tretman PEP-om prema centralnom kompozitnom planu

Uzorak	Broj paralelnih eksperimenata	Jakost električnog polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (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

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta EPR spektroskopijom

Za procjenu antioksidacijskog kapaciteta uzoraka ulja, koristila se metoda objavljena u diplomskom radu Pejić (2022) koja uključuje EPR spektroskopiju. U ovoj metodi, ulje se dodaje u otopinu slobodnog radikala DPPH, a zatim se prati inaktivacija DPPH radikala pod utjecajem antioksidativnih spojeva prisutnih u ulju.

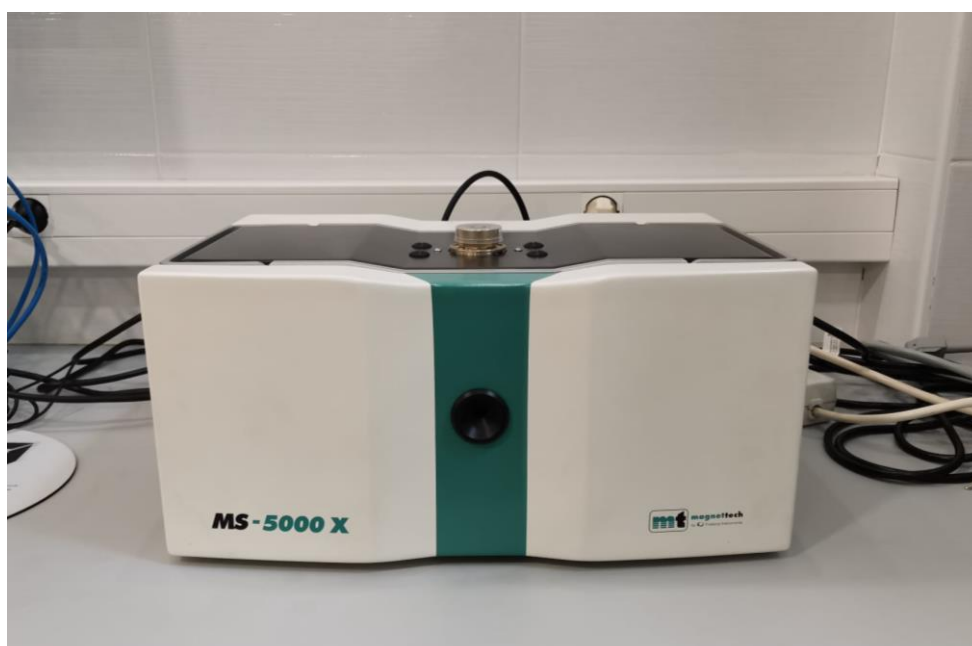
Priprema reagensa za analizu

Otopina DPPH radikala u etil-acetatu priprema se 24 sata prije analize. Za pripremu 100 mL 0,15 mM otopine, izvaže se 5,91 mg DPPH[•] na analitičkoj vagi (KERN ABP 200-5DM, KERN & SOHN) u laboratorijsku čašicu od 25 mL. Etil-acetat koji se koristi za pripremu otopine mora biti slobodan od oksidirajućih tvari što se osigurava propuhivanjem otapala dušikom tijekom 5 minuta. U odmjernu tikvicu od 100 mL kvantitativno se prenese izvagani DPPH[•] te se nadopuni propuhanim etil-acetatom do oznake. Odmjerna tikvica se potpuno

zamota aluminijskom folijom kako bi se otopina zaštitila od svjetlosti i promiješa na Vortex uređaju tijekom 3 minute. Da bi se osigurala stabilnost, otopina se do provođenja analize (24 sata) čuva u hladnjaku na temperaturi od +4 °C.

Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koristi se EPR spektrometar Magnostech MS-5000, tvrtke Freiburg Instruments, kao što je prikazano na slici 5. Prije početka rada s uređajem, potrebno je izvršiti inicijalizaciju i zagrijavanje instrumenta.



Slika 5. Magnostech MS – 5000 (Freiburg instruments) EPR spektrometar (vlastita fotografija)

Za provedbu analize antioksidacijskog kapaciteta u mikropruvetu od 2 mL, automatskom pipetom dodaje se 980 μ L otopine DPPH \cdot i 20 μ L uzorka ulja. Trenutkom dodavanja ulja, pokreće se štoperica i uzorak se miješa na Vortex uređaju 10 sekundi. Nakon miješanja, reakcijska smjesa čuva se u mraku na sobnoj temperaturi 27 minuta. U slijedeće 3 minute, reakcijska otopina napuni se u kapilaru i umetne u uređaj. Točno nakon 30 minuta od dodavanja ulja u otopinu DPPH \cdot , pokreće se snimanje EPR spektra.

Slijepa proba priprema se dodavanjem 20 μL propuhanog etil-acetata, umjesto uzorka ulja, u 980 μL otopine DPPH \cdot , promiješa na vorteksu 10 sekundi i odmah puni u kapilaru i mjeri pod istim uvjetima kao i uzorci. Na početku radnog dana provodi se mjerenje slijepe probe kao i svaka 2 sata tijekom provođenja analize. Pomoću ESR Studio programskog paketa postavljaju se parametri, snima spektar i obrađuju se rezultati. Mjerenje se obavlja pri sobnoj temperaturi, s jakosti centralnog magnetskog polja u rasponu od 331,00 do 343,00 mT, snagom mikrovalnog zračenja od 10 mW, amplitudom modulacije od 0,20 mT i frekvencijom od 100 kHz. Određivanjem visine intenziteta signala srednjeg pika spektra DPPH \cdot u reakcijskoj smjesi i slijepe probe računa se postotak redukcije DPPH \cdot . Postotak redukcije proporcionalan je antioksidacijskom kapacitetu prema formuli [1]:

$$\% \text{ redukcije DPPH} \cdot = 100 \cdot \frac{\text{visina signala}_{\text{slijepa proba}} - \text{visina signala}_{\text{uzorak}}}{\text{visina signala}_{\text{slijepa proba}}} [1]$$

3.2.3. Statistička obrada

Statistička obrada rezultata provedena je pomoću analize varijance s ponavljanjima (ANOVA) s razinom vjerojatnosti od 95% ($p \leq 0.05$) u programu Microsoft Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prema važećoj zakonskoj regulativi (Uredba (EU) 1308/2013 (prilog VII, dio VIII)), djevičanska maslinova ulja su definirana kao ulja dobivena od ploda masline isključivo mehaničkim postupcima ili drugim fizikalnim postupcima pod uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja, koja nisu drugačije obrađena osim pranjem, dekantacijom, centrifugiranjem ili filtriranjem. Takav način prerade maslina uzrokuje nisko iskorištenje procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Kako bi se poboljšala učinkovitost uvode se nove tehnologije poput pulsirajućeg električnog polja. PEP tretman uzrokuje razvoj mikroporacija u staničnim membranama, koje povećavaju propusnost membrane, što rezultira gubitkom sadržaja stanice ili prodorom okolnog medija. No s obzirom na to da sam proces može uzrokovati i druge promjene u stanici te djelovati na sastav i koncentraciju negliceridnih sastojaka ulja, ispitan je utjecaj pulsirajućeg električnog polja kao predtretmana procesu miješenja na antioksidacijski kapacitet autohtonih hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ulja korištena je tehnika spektroskopije elektronske paramagnetske rezonancije (EPR).

U tablici 2 su prikazani podaci o antioksidacijskom kapacitetu djevičanskog maslinovog ulja koji su izmjereni pomoću EPR spektrometra. Antioksidacijski kapacitet iskazan je kao postotak redukcije DPPH radikala. Metoda je razvijena s ciljem postizanja vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kontrolnih uzoraka od oko 50 %, kako bi se jasnije uočila razlika u među tretiranim uzorcima. To je postignuto prilagođavanjem volumena otopine DPPH i količine ulja u reakcijskoj smjesi.

Tablica 2. Antioksidacijski kapacitet DMU-a tretiranih različitim jakostima eklektičnog polja u različitim vremenskim intervalima, kao predtretmana miješenja, mjereno pomoću EPR spektrometra

Parametri PEP tretmana		Sorta			
Vrijeme (s)	Jakost električnog polja (kV/cm)	Rosulja	Istarska bjelica	Oblica	Levantinka
Kontrola		54,57 ± 1,51	45,87 ± 2,92	21,35 ± 1,32	45,48 ± 2,40
60	1	55,13 ± 0,78	41,98 ± 0,07	23,77 ± 0,60	47,62 ± 0,39
30	2	62,40 ± 0,10	42,10 ± 0,51	20,80 ± 0,67	44,51 ± 0,42
90	2	57,77 ± 0,60	44,00 ± 0,31	16,19 ± 0,53	52,42 ± 0,08
18	4,5	58,14 ± 0,66	42,52 ± 1,33	21,52 ± 0,31	46,19 ± 0,00
60	4,5	50,46 ± 7,14	38,74 ± 2,21	22,61 ± 2,92	45,57 ± 3,30
102	4,5	39,34 ± 0,19	45,58 ± 0,72	23,29 ± 0,42	49,64 ± 0,27
30	7	56,12 ± 0,55	47,79 ± 0,66	21,63 ± 0,39	49,24 ± 0,45
90	7	58,60 ± 0,33	46,41 ± 0,70	22,39 ± 0,49	37,76 ± 0,07
60	8	57,66 ± 0,60	43,82 ± 0,16	22,23 ± 0,14	47,22 ± 1,43

Promatrajući rezultate svih uzoraka, antioksidacijski kapacitet se proteže u rasponu od 16,19 % do 62,40 %. Uspoređujući kontrolne uzorke istraživanih monosortnih ulja, mogu se uočiti značajne razlike u njihovim antioksidacijskim kapacitetima (tablica 2). Najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pokazuje djevičansko maslinovo ulje rosulje (54,57 %), nakon nje slijede ulja levantinke (45,48 %) i istarske bjelice (45,87 %) koje pokazuju gotovo jednake vrijednosti, dok je najmanji antioksidacijski kapacitet zabilježen kod djevičanskog maslinovog ulja oblice (21,35 %). Rezultati statističke obrade prikazani u tablici 3 pokazuju kako najveći utjecaj na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ima upravo sorta.

Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s rezultatima objavljenim u diplomskom radu Pejić (2022) u kojem su korištene iste sorte uzgojene 2021. godine, vidljivo je kako svi analizirani uzorci u ovom radu imaju niži antioksidacijski kapacitet. U navedenom diplomskom radu rosulja je također bila sorta s najvišim antioksidacijskim kapacitetom, ali ju je slijedila

oblica pa istarska bjelica dok je levantinka bila sorta s najnižim kapacitetom. Ranija istraživanja su pokazala da sastav i koncentracija polifenola u DMU-u imaju značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet ulja. Poznato je da će sastav i koncentracija fenola varirati u velikoj mjeri zbog različitih faktora, uključujući sortu masline ali i geografsku regiju u kojoj masline rastu, primijenjene poljoprivredne tehnike za uzgoj maslina, stupanj zrelosti maslina te proces prerade maslina u ulje (Torić i sur., 2020). Usporedbom s rezultatima prijašnjih istraživanja (Koprivnjak i sur., 2012; Šarolić i sur., 2015; Torić i sur. 2020) najvišu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje dalmatinska sorta oblica. Zatim slijede istarska bjelica i levantinka, a najmanju koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva ima rosulja. S druge strane, DMU rosulje ima najveći udio ukupnih tokoferola koji također značajno utječu na antioksidacijski kapacitet ulja. Fratianni i sur. (2019) te Gouvinhas i sur. (2014) u svojim su istraživanjima zaključili kako su udio ukupnih fenola u DMU-u i antioksidacijski kapacitet u proporcionalnom odnosu. Sukladno tim rezultatima, izdvajanjem veće količine polifenola, povećat će se antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati u ovom završnom radu ne poklapaju se s prethodno navedenim tvrdnjama. Razlog tome vjerojatno se može pripisati odstupanjima u sastavu proizvedenih DMU. Kako bi se potvrdila ta hipoteza, neophodno je odrediti sastav i koncentracije antioksidanasa, prvenstveno polifenola i tokoferola, u ovim analiziranim uljima.

Tablica 3. Statistička značajnost varijabli na antioksidacijski kapacitet DMU-a mjeren pomoću EPR spektrometra

Izvor varijabilnosti	F	P-vrijednosti
SORTA	677,577	<0.0001
VRIJEME (s)	3,559	0,006
JAKOST ELE. POLJA kV/cm	4,157	0,008
SORTA*VRIJEME (s)	6,339	<0.0001
SORTA*JAKOST ELE. POLJA kV/cm	2,309	0,022
VRIJEME (s)*JAKOST ELE. POLJA kV/cm	1,467	0,229
SORTA*VRIJEME (s)*JAKOST ELE. POLJA kV/cm	8,273	<0.0001

Uspoređujući kontrolne uzorke s uzorcima tretiranima PEF-om, kod DMU-a rosulje, oblice i levantinke u većem broju uzoraka došlo je do povećanja antioksidacijskog kapaciteta. Najveći porast antioksidacijskog kapaciteta pokazala su djevičanska maslinova ulja rosulje i levantinke pri jakosti električnog polja 2 kV/cm. Antioksidacijski kapacitet rosulje povećao se za 7,83 % u odnosu na kontrolni uzorak, a levantinke za 6,94 %. Kod rosulje antioksidacijski kapacitet povećava se kraćim vremenom tretiranja. Duže izlaganje tretmanu (60s, 102s) pri srednjoj jakosti električnog polja (4,5 kV/cm) dovelo je do pada antioksidacijskog kapaciteta. Smanjenjem vremena tretiranja, a istovremenim povećanjem jakosti električnog polja antioksidacijski kapacitet je ponovno počeo rasti. Kod levantinke se primjećuje kako produženje vremena tretiranja kod svih jakosti električnog polja dolazi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta. Iznimno, pri vremenu tretiranja od 90 s i jakosti električnog polja 7 kV/cm došlo je do značajnog smanjenja antioksidacijskog kapaciteta.

DMU oblice koje je prema nekim ranijim istraživanjima trebalo imati najviši antioksidacijski kapacitet (Pejić, 2022), pokazalo je porast od svega 2,42 %. Najvišu vrijednost prikazalo je pri najnižoj jakosti električnog polja 1 kV/cm i vremenu tretiranja od 60 sekundi. Povećanjem jakosti električnog polja (2 kV/cm) dolazi do pada kapaciteta no daljnjim povećanjem električnog polja ponovno je došlo do porasta antioksidacijskog kapaciteta te je, kao i kod levantinke, više vrijednosti prokazala kod duljeg vremena tretiranja.

U DMU istarske bjelice u većem broju uzoraka zabilježeno je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta. Istarska bjelica je pri nižim jakostima i kraćem vremenu tretiranja pokazala pad antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na kontrolu. Povećanjem parametara došlo je i do rasta kapaciteta, sve do jakosti električnog polja od 4,5 kV/cm i vremenu tretiranja od 60 s gdje je došlo do naglog pada antioksidacijskog kapaciteta. Najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta zabilježene su u uljima koja su bila tretirana visokim jakostima električnog polja (7 kV/cm) u vremenu od 30 i 90 s no to povećanje iznosilo je svega do 1,92 % u odnosu na kontrolu.

Možemo zaključiti da je povećanje antioksidacijskog kapaciteta rezultat povećanja sadržaja fenolnih spojeva, fitosterola i tokoferola. Navedeni rezultati poklapaju se s rezultatima istraživanja Martinez-Beamonte i sur. (2022) te Veneziani i sur. (2019) koji su zaključili da primjena PEP-a dovodi do povećane propusnosti i disrupcije staničnih membrana, što pozitivno utječe na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja i rezultira povećanjem fenolnih spojeva u rasponu od 3,2% do 14,3% u DMU. Sposobnost ekstrakcije ulja i sadržaj antioksidansa u DMU

su poboljšani, pri čemu se ne mijenjaju glavne kvalitativne i organoleptičke karakteristike proizvoda. Osim toga, uspoređujući PEP kao predtretman miješenju u proizvodnji DMU s UTT-om koji je bio istraživani u diplomskom radu Pejić (2022) na istim sortama, može se zaključiti kako PEP kao inovativna tehnika značajno više utječe na povećanje antioksidacijskog kapaciteta istraživanih hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja. Maksimalni porast antioksidacijskog kapaciteta DMU proizvedenih uz UTT iznosio je 2,5 % dok je s PEP-om ostvaren porast od 7.84%. No kako taj porast nije jednak kod svih sorti, potrebno je optimirati parametre PEP predtretmana za svaku pojedinu sortu.

5. ZAKLJUČCI

1. Izbor sorte ima najznačajniji utjecaj na antioksidacijski kapacitet proizvedenog djevičanskog maslinovog ulja. Najviši antioksidacijski kapacitet imala su ulja proizvedena iz sorte rosulja, slijede ih ulja sorti istarska bjelica i levantinka, dok su ulja sorte oblica imala značajno manji antioksidacijski kapacitet.
2. Primjena pulsirajućeg električnog polja, kao predtretman miješenju, dovodi do povećanja koncentracije antioksidansa u djevičanskom maslinovom ulju.
3. Vrijeme tretiranja i jakost električnog polja, kao i njihova pojedinačna interakcija sa sortom imaju značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet proizvedenog ulja pa je stoga potrebno definirati optimalne parametre za pojedinu sortu.

6. POPIS LITERATURE

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

Bakarić P, Bjeliš M, Brekalo B, Bulimbašić-Botteri M, Duić-Pribičević V, Džidić L, i sur. (2008) Maslina i maslinovo ulje od A do Ž, Naklada Zadro, Zagreb, str. 51, 189-191, 199, 216

Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karolović D, Ježek D, Vikić Topić D, i sur. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 32-37.

Brückner A (2007) Electron paramagnetic resonance: a powerful tool for monitoring working catalysts. *Adv Catal* **51**, 265–308.

Butković D (2018) Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti hrvatskih maslinovih ulja (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Cammack R (2017) EPR Methods. U: Lindon JC, Tranter GE, Koppenaal DW (ured.). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2. izd., Academic Press, Oxford, str. 457-469

Fратиани F, Cozzolino R, Martignetti A, Malorni L, d'Acierno A, De Feo V, i sur. (2019) Biochemical composition and antioxidant activity of three extra virgin olive oils from the Irpinia Province, Southern Italy. *Food Sci Nutr* **7**, 3233-3243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1180>

Gouvinhas I, Machado J, Gomes S, Lopes J, Martins-Lopes P, Barros A.I.R.N.A. (2014), Phenolic composition and antioxidant activity of monovarietal and commercial portuguese olive oils. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 1197-1203. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2462-x>

Han L (2020) Optimizacija ekstrakcije polifenola iz lista masline i procjena antimikrobne aktivnosti (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH d.o.o., Poreč, str. 18-27.

Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Majetić Germek V (2012) Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti buža, istarska bjelica, leccino i rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 7, 172-178.

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

Lovrić T (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Prehrambeno-bioetnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 262-282.

Maltar Strmečki N, Rakvin B (2004) Primjena EPR spektroskopije pri konzerviranju namirnica ionizacijskim zračenjem II dio. Provjera ispravnosti doze u raznim namirnicama životinjskog porijekla konzerviranih ionizacijskim zračenjem. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* 6, 50-54. <https://hrcak.srce.hr/25906>

Marić A (2019) Jedinične operacije u proizvodnji maslinovog ulja (završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Martínez-Beamonte R, Ripalda1 M, Herrero-Continentel T, Barranquero1 C, Dávalos A, López de las Hazas MC., i sur. (2022) Pulsed electric field increases the extraction yield of extra virgin olive oil without loss of its biological properties. *Front Nutr* 9, 1065543. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1065543>

Pejić A (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na antioksidacijski kapacitet i aktivnost djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Pirker KF, Severino JF, Reichenauer TG, Goodman BA (2008) Free radical processes in green tea polyphenols (GTP) investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biotechnol Annu Rev* 14, 349-401

Previšić I (2019) Utjecaj temperature pripreme na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća autohtonih sorti (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

Schaich KM (2005). Lipid oxidation: New perspectives on an old reaction. U: Shahidi F (ured) Bailey's industrial oil and fat products, Vol. 1: Edible oil and fat products: Chemistry, properties and health effects, 6. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 1-72.

Senanayake SPJN, Wanasundara PKJPD, Shahidi F (2005) Antioxidants: science, technology, and applications. U: Shahidi F (ured) Bailey's industrial oil and fat products, Vol. 1: Edible oil and fat products: Chemistry, properties and health effects, 6. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 1-61.

Svirčević A (2021) Primjena novih tehnologija u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

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

Škarica B, Žužić I, Bonifačić M (1996) Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj, 1. izd., Punat, str. 46-75, 137-158.

Škevin D (2016) Interna skripta iz Procesa prerade i maslina i kontrola kvalitete proizvoda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Taha A, Casanova F, Šimonis P, Stankevič V, Gomaa MAE, Stirkè A. (2022) Pulsed electric field: fundamentals and effects on the structural and techno-functional properties of dairy and plant proteins. *Foods* **11**, 1556. <https://doi.org/10.3390/foods11111556>

Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F (2013) Hydroxy cinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int* **13**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/251754>

Torić J, Brozovic A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ, i sur. (2020) Biological activity of phenolic compounds in extra virgin olive oils through their phenolic profile and their combination of anticancer drugs observed in human cervical

carcinoma and colonad enocarcionoma cells. *Antioxidants* **9**, 1-15.
<https://doi.org/10.3390/antiox9050453>

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 9. srpnja 2023.

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Sordini B, Lorefice A, i sur. (2019) Extra-virgin olive oil extracted using pulsed electric field technology: cultivar impact on oily ield and quality. *Front Nutr* **6**, 134. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00134>

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, DiMaio I, i sur. (2015) Flash thermal conditioning of olive pastes during the oil mechanical extraction process: cultivar impact on the phenolic and volatile composition of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **63**, 6066-6074. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01666>

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

Izjava o izvornosti

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

Vlastoručni potpis