

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

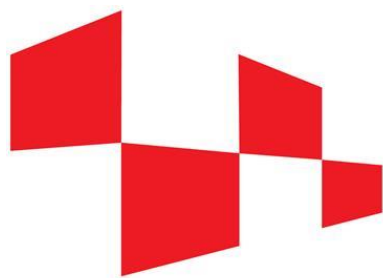
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Dora Mladina

**UTJECAJ UBRZANOG
TOPLINSKOG TRETMANA NA
OKSIDACIJSKU STABILNOST
DJEVIČANSKOG MASLINOVOG
ULJA**

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



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

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

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. sc. Dubravki Škevin na prenesenom znanju, zlatnim savjetima te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljicama koje su uvijek bile tu da mi vrate pouzdanje i nadu.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i partneru na neograničenoj ljubavi i neiscrpnjoj podršci kada je bilo najpotrebnije.

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: Upravljanje sigurnošću hrane

UTJECAJ UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Dora Mladina, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211218

Sažetak: Djevičansko maslinovo ulje (DMU) ima visoku nutritivnu vrijednost jer obiluje, između ostaloga, nezasićenim masnim kiselinama i fenolnim tvarima te predstavlja vrijedan izvor masti u prehrani. Kako bi DMU kroz što dulji period održalo tu kvalitetu, potrebno je posvetiti pažnju održavanju njegove oksidacijske stabilnosti odnosno trajnosti. U posljednje vrijeme razvijaju se inovativne metode koje će unaprijediti konvencionalni način proizvodnje DMU i time poboljšati trajnost. Primjer takve metode jest ubrzani toplinski tretman (UTT) hlađenjem ili zagrijavanjem maslinova tijesta prije miješenja. Cilj rada bio je ispitati utjecaj UTT-a na oksidacijsku stabilnost DMU sorti oblica, istarska bjelica, levantinka i rosulja određivanjem osnovnih parametara kvalitete te antioksidacijskog kapaciteta. Antioksidacijski kapacitet mjeren je pomoću elektronske paramagnetske rezonancije (EPR) DPPH metodom. Najbolju oksidacijsku stabilnost pokazuju DMU istarske bjelice proizvedena UTT-om, dok je najjači antioksidacijski kapacitet uočen kod DMU rosulje proizvedenih TT-om. Utjecaj postupka proizvodnje, sorte i perioda skladištenja na oksidacijsku stabilnost pokazao se statistički značajan.

Ključne riječi: oksidacijska stabilnost, ubrzani toplinski tretman, djevičansko maslinovo ulje, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 42 stranica, 15 slika, 4 tablica, 50 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Škevin

Pomoć pri izradi: Katarina Filipan, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Marković (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 20. prosinca 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 Safety Management

INFLUENCE OF FLASH THERMAL TREATMENT ON OXIDATIVE STABILITY OF VIRGIN OLIVE OIL

Dora Mladina, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211218

Abstract: Virgin olive oil (VOO) has high nutritional value due to its chemical composition and is valuable source of fat. To maintain its quality, it is necessary to pay attention in maintaining its oxidative stability. Recently, innovative methods have been developed that improve the conventional method of VOO production (for example flash thermal treatment (FTT) by cooling or heating the olive paste before malaxation) thus improving shelf life. The aim of this study was to examine the influence of FTT on the oxidative stability of VOO of cultivars oblica, istarska bjelica, levantinka and rosulja by determining the basic quality parameters and antioxidant capacity. The antioxidant capacity was measured using the electron paramagnetic resonance (EPR) and DPPH[•] method. VOO of istarska bjelica produced by FTT show greatest oxidative stability, while VOO of rosulja produced by TT show the best antioxidant capacity. Statistical analysis confirms the significant impact of production process, cultivar and storage duration on oxidative stability.

Keywords: oxidative stability, flash thermal treatment, virgin olive oil, antioxidant capacity

Thesis contains: 42 pages, 15 figures, 4 tables, 50 references, 2 supplements

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: Dubravka Škevin, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Katarina Filipan, MSc

Reviewers:

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

Thesis defended: December 20th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TRAJNOST HRANE	2
2.1.1. Oksidacijska stabilnost (trajnost) djevičanskog maslinovog ulja	5
2.1.1.1. Enzimaska oksidacija.....	6
2.1.1.2. Lipidna autooksidacija	7
2.1.1.3. Fotooksidacija.....	9
2.1.1.4. Primarni i sekundarni produkti oksidacije.....	9
2.2. SUVREMENA PROIZVODNJA DMU I PRISUTNI PROBLEMI	10
2.2.1. Priprema plodova	10
2.2.2. Mljevenje/drobljenje	10
2.2.3. Miješenje.....	11
2.2.4. Ekstrakcija.....	12
2.2.5. Završne operacije i skladištenje DMU	12
2.2.6. Inovativne tehnologije u obradi maslinova tijesta	13
2.2.6.1. Ubrzani toplinski tretman (UTT).....	13
2.3. METODE ODREĐIVANJA ODRŽIVOSTI DMU	14
2.3.1. Oven test.....	14
2.3.2. Active oxygen method (AOM) ili Swift test	15
2.3.3. Indeks održivosti ulja (Oil Stability Indeks; OSI)	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman i toplinski tretman.....	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete	17
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH [•] metodom pomoću elektronske paramagnetske rezonancije (EPR).....	17
3.2.2.1. Priprema otopine slobodnog radikala.....	17
3.2.2.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta	18
3.3. OBRADA PODATAKA	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ODREĐIVANJE OSNOVNIH PARAMETARA KVALITETE	21
4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH[•] METODOM	30
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36
7. PRILOZI	

1. UVOD

Ubrzani način života posljednjih godina učinio je da prehrana ljudi postane bogata prerađenom hranom, što ima nepovoljan utjecaj na zdravlje. Zbog toga se među potrošačima počela javljati težnja prema minimalno procesiranoj i nutritivno bogatoj hrani vrlo visoke kvalitete koja ima povoljan utjecaj na zdravlje. Također, kako je Hrvatska zemlja Mediterana, teži se i mediteranskom načinu prehrane koji dokazano blagotvorno utječe na ljudski organizam.

Kako bi se ispunili zahtjevi potrošača, prehrambena industrija veliku pažnju posvećuje trajnosti hrane koja se minimalno obrađuje. Prilikom takve obrade javljaju se mnogi rizici vezani uz sigurnost namirnica, stoga je potrebno dobro poznavanje kemijskih, mikrobioloških i fizikalnih svojstava sirovina kako bi se proizvela hrana u skladu sa zakonskim regulativama i propisima, a da udovolji zahtjevima i očekivanjima potrošača.

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) primjer je namirnice visokih nutritivnih svojstava zbog svog kemijskog sastava koji obiluje nezasićenim masnim kiselinama i fenolnim tvarima, te je glavni izvor masti mediteranske prehrane. Uz to, DMU proizvodi se isključivo mehaničkim postupcima, bez ikakve dodatne kemijske obrade, pa time zadovoljava želju potrošača za minimalnim procesiranjem. Zbog svega navedenoga, cilj je održati njegovu izvornu kvalitetu i senzorska svojstva kroz što dulji period.

Kako bi se što preciznije odredio rok trajnosti DMU potrebno je provesti ispitivanja utjecaja različitih čimbenika na njegovu oksidacijsku stabilnost. Svakodnevno se razvijaju inovativne metode procesiranja plodova masline kako bi se proizvelo više ulja što bolje kvalitete, oksidacijske stabilnosti i senzorskih svojstava. Također, koriste se različiti modeli i ubrzani testovi kvarenja koji procjenjuju rokove trajnosti na temelju različitih parametara.

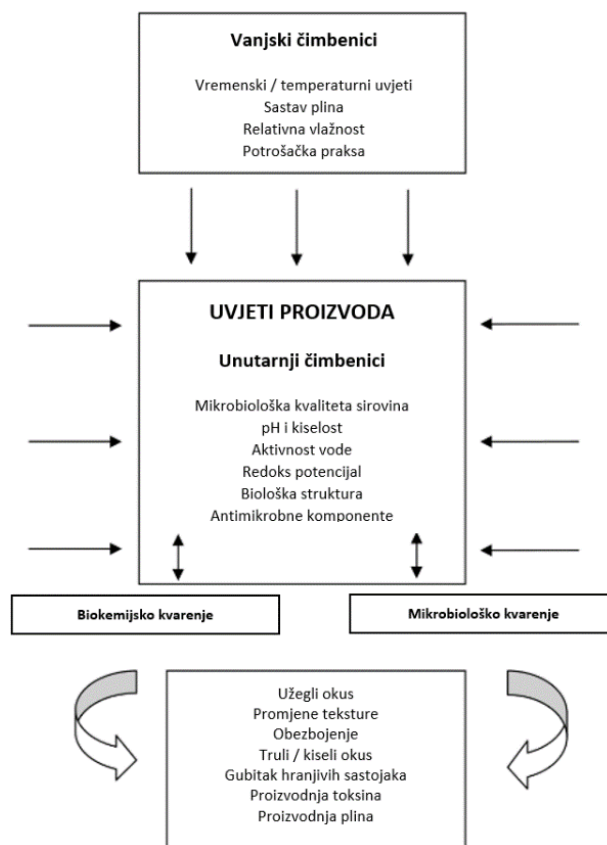
Cilj ovog rada bio je utvrditi kako ubrzani toplinski tretman (UTT) samljevenog maslinova tijesta prije miješenja djeluje na oksidacijsku stabilnost odnosno trajnost DMU.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRAJNOST HRANE

Trajnost hrane i prehrambenih proizvoda podrazumijeva rok valjanosti hrane i prehrambenih proizvoda, tj. vrijeme tijekom kojeg se hrana i prehrambeni proizvodi mogu čuvati pod određenim uvjetima uz zadržavanje visoke razine izvorne kvalitete i organoleptičkih svojstava (Kilcast i Subramaniam, 2000). Prema Uredbi 1169/2011 (Uredba, 2011) trajnost proizvoda se označava datumom minimalne trajnosti što podrazumijeva „datum do kojeg hrana zadržava svoja posebna svojstva ako se čuva na pravilan način“. Ukoliko se radi o vrlo kvarljivoj hrani u vidu mikrobiološkog kvarenja, onda se datum minimalne trajnosti zamjenjuje datumom „upotrijebiti do“ (članak 24., EU 1169/2011). Trajnost je vrlo važan segment koji se uzima u obzir pri razvoju novih proizvoda, ali i prilikom poboljšanja postojećih. Razlog tome je sve veći interes potrošača za hranom i prehrambenim proizvodima koje odlikuje stabilnost prilikom skladištenja pa sve do konzumacije (Kilcast i Subramaniam, 2000). Trajnost proizvoda predstavlja sve veći izazov zbog povećanja proizvodnje hrane uzrokovanog porastom stanovništva, kao i povećanom potražnjom za minimalno obrađenim prehrambenim proizvodima koji su zbog toga i vrlo kvarljivi (Corradini, 2018). Također, treba naglasiti kako se rok trajanja odnosi primarno na kvalitetu samih proizvoda te nije povezan sa sigurnosnim rizikom za potrošače (Calligaris i sur., 2019).

Na trajnost hrane utječe niz čimbenika, no najvažnija podjela je ona na unutarnje i vanjske. Unutarnji čimbenici su primjerice pH vrijednost i ukupna kiselost, prirodna mikroflora proizvoda, biokemijski spojevi poput enzima i sl. Vanjski čimbenici uključuju uvjete u kojima se proizvod nalazi nakon proizvodnje poput temperature, izloženosti svjetlu, relativne vlažnosti, rukovanja proizvodom tijekom skladištenja i distribucije. Interakcija svih tih čimbenika (Slika 1) utječe na trajnost i kvalitetu hrane i prehrambenih proizvoda, stoga je važno dobro poznavanje karakteristika proizvoda kako bi se spriječile neželjene promjene. Procesi nastali interakcijom čimbenika koji ograničavaju trajnost hrane i prehrambenih proizvoda mogu se podijeliti na mikrobiološke, kemijske, fizičke i one nastale uslijed temperaturnih promjena (Kilcast i Subramaniam, 2000).



Slika 1. Procesi kvarenja tijekom skladištenja hrane (prema Eissa, 2012)

Kod namirnica koje imaju srednji ili dugi rok trajanja dolazi do razgradnje nekih bioaktivnih spojeva ispod vrijednosti navedenih na deklaraciji proizvoda, stoga se takve promjene prije uzimaju u obzir kod određivanja roka trajnosti proizvoda u odnosu na nedostatke u senzorskoj kvaliteti. S druge strane, kod visoko kvarljivih namirnica naglasak je na organoleptičkim promjenama, poput promjene mirisa ili boje, kada se određuje rok trajnosti (Corradini, 2018).

Postoji nekoliko metoda za mjerenje trajnosti, uključujući senzorsku procjenu, instrumentalna mjerenja, kemijsku analizu i mikrobiološku analizu. Senzorska procjena uključuje obučene paneliste koji procjenjuju senzorska svojstva proizvoda tijekom vremena kako bi se utvrdile promjene u kvaliteti i prihvatljivosti. Iako je senzorska procjena od velike važnosti prilikom određivanja kvalitete proizvoda, skupa je i dugotrajna te donosi sigurnosne rizike. Ukoliko se proizvod procjenjuje senzorski, potrebno je prije provesti mikrobiološko ispitivanje radi sigurnosti panelista, a ukoliko postoji sumnja da proizvod nije siguran za konzumaciju, senzorska procjena se ograničava na procjenu izgleda i mirisa. Instrumentalna mjerenja odlično nadopunjuju senzorsku procjenu. Koriste se različiti uređaji poput analizatora teksture, reometara i elektroničkih nosova kako bi se, uz senzorsku procjenu, otkrili neugodni

okusi i odredila trajnost proizvoda. Također, koriste se instrumenti poput mjerača vlage i vodljivosti te kromatografske i spektroskopske tehnike. Kemijske analize uključuju analizu promjena pH vrijednosti, sadržaja vlage, oksidacije lipida i stvaranja neugodnih okusa ili neugodnih mirisa. Iako se tijekom skladištenja proizvoda odvijaju brojne kemijske reakcije, samo će se ispitivati one reakcije koje su ključne u određivanju roka trajnosti za određeni proizvod. Mikrobiološka analiza se provodi kako bi se pratio rast mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje proizvoda tijekom njihova skladištenja te rast patogena koji su prijetnja sigurnosti proizvoda (Kilcast i Subramaniam, 2000). Ove se metode mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji za procjenu roka trajanja prehrambenih proizvoda. Primjerice, rok trajnosti namirnica utvrđen mikrobiološki te izražen u vidu maksimalnog broja mikroorganizama od strane regulatornih tijela često će biti kraći od roka trajnosti utvrđenog senzorskim procjenama (Corradini, 2018). Stoga je nužno poznavati karakteristike sirovine i/ili proizvoda te odabrati odgovarajuću metodu ili kombinaciju metoda kako bi trajnost proizvoda bila maksimalna, ali da je pri tome proizvod apsolutno siguran za konzumaciju.

Nadalje, za određivanje trajnosti neke namirnice ili proizvoda koriste se i različiti modeli temeljeni na matematičkim i statističkim odnosima između unutarnjih čimbenika, vanjskih čimbenika te karakteristikama mikroorganizama u prisutnosti tih čimbenika. Modeli se izrađuju prema dobrim eksperimentalnim podacima dobivenim praćenjem promjena prilikom kombinacije različitih čimbenika (Kilcast i Subramaniam, 2000).

Uz modele koji predviđaju rok trajanja, koriste se i testovi ubrzanog kvarenja kako bi se u kratkom roku utvrdila trajnost nekog proizvoda. Kako bi rezultati takvih testova bili pouzdani, potrebno je poznavati karakteristike skladištenja proizvoda u uobičajenim i ubrzanim uvjetima te njihov odnos (Kilcast i Subramaniam, 2000). Prilikom provođenja takvih testova uzima se više čimbenika u obzir, no najviše se provode testovi pod utjecajem temperature ili kombinacije temperature i svjetlosti kao najkritičnijih utjecaja na prehrambene proizvode. Važno je testirati utemeljenost ubrzanih uvjeta usporedbom s poznatim karakteristikama kvarenja pri određenim skladišnim uvjetima (Calligaris i sur., 2019; Kilcast i Subramaniam, 2000). Više o testovima ubrzanog kvarenja bit će govora u narednim poglavljima.

2.1.1. Oksidacijska stabilnost (trajnost) djevičanskog maslinovog ulja

Trajnost DMU očituje se u visokoj oksidacijskoj stabilnosti proizašloj iz njegova kemijskog sastava, stoga se često pojmovi „trajnost“ i „oksidacijska stabilnost“ DMU smatraju sinonimima. Prema delegiranoj uredbi Komisije (EU) 2022/2104, DMU se definira kao „maslinovo ulje dobiveno izravno iz ploda maslina isključivo mehaničkim postupcima“ (Uredba, 2022). Većina DMU dostupnih na tržištu ima rok trajnosti oko 18 mjeseci što ukazuje na problematiku trenutnog sustava određivanja roka trajnosti. Ovakav sustav ne uzima u obzir rukovanje i skladištenje nakon distribucije i prodaje, što za posljedicu može imati konzumaciju DMU koje nije više sigurno, tj. zdravstveno ispravno. S druge strane, može doći do nepotrebnog bacanja i dalje kvalitetnog DMU nakon definiranog isteka roka trajnosti.

Prema Morales i Przybylskom (2013) konačni kemijski sastav DMU, a time i oksidacijska stabilnost, ovise o mnogo različitih čimbenika koji se mogu svrstati u tri skupine: čimbenici koji djeluju prije, tijekom i nakon ekstrakcije DMU. Čimbenici koji djeluju prije ekstrakcije DMU su primjerice sorta masline, klima, tlo, itd. Tijekom same ekstrakcije DMU svaka od faza će imati određeni utjecaj na njegov konačni kemijski sastav i oksidacijsku stabilnost. Čimbenici nakon ekstrakcije imat će možda i najznačajniji utjecaj na samu trajnost obzirom da obuhvaćaju skladištenje i transport DMU, pri čemu veliku ulogu imaju dostupnost zraka, svjetla i mogućnost kontaminacije.

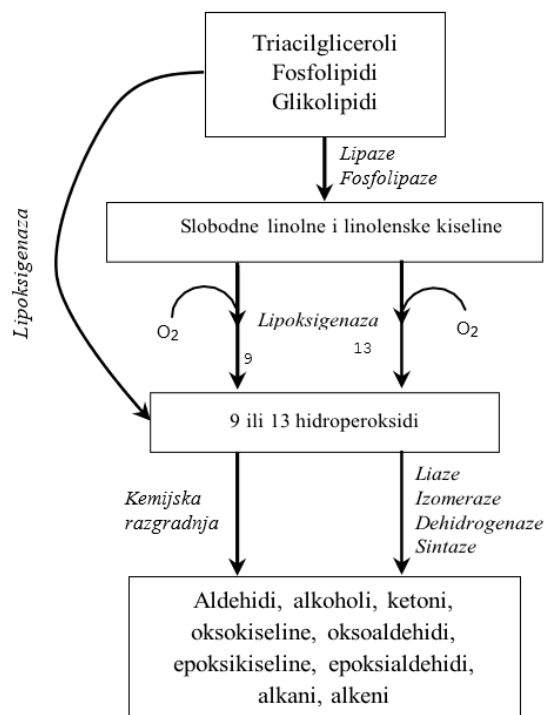
Obzirom na isključivo mehaničku obradu, DMU zadržava niz manjih komponenti koje pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Među tim komponentama posebno se ističu polifenoli i tokoferoli koji se ponašaju kao primarni antioksidansi DMU. Navedene komponente doniranjem vodikovog atoma stabiliziraju slobodne radikale nastale u procesu lipidne oksidacije. Obzirom na hidrofilni karakter, polarni polifenoli su smješteni na granici zrak/ulje (mala količina zraka se uvijek nalazi „zarobljena“ u ulju) što ih čini učinkovitijim antioksidansima u odnosu na tokoferole. Fosfolipidi također pokazuju blago antioksidativno djelovanje koje se može pripisati njihovoj sposobnosti keliranja metala koje za posljedicu ima deaktivaciju prooksidativnog učinka metala. Također, djeluju i sinergistički (sekundarni antioksidansi) s fenolnim komponentama te na taj način poboljšavaju njihov antioksidativni učinak. Osim spojeva koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost, za oksidacijsku stabilnost zaslužan je i sastav masnih kiselina DMU obzirom da je visok omjer mononezasićenih (npr. oleinska masna kiselina) prema polinezasićenim masnim kiselinama (npr. linolna i linolenska masna kiselina) (Morales i Przybylski, 2013).

S druge strane, DMU sadrži spojeve koji se ponašaju kao prooksidansi te mogu narušiti oksidacijsku stabilnost ulja. Takvi se spojevi mogu ukloniti rafinacijom, no to kod DMU nije dozvoljeno, stoga se prilikom proizvodnje, distribucije i skladištenja DMU treba voditi računa o uvjetima kako se oksidacija ne bi dodatno ubrzala. Spojevi koji djeluju kao prooksidansi su u prvom redu slobodne masne kiseline (SMK) i metali u tragovima. Za prooksidativni učinak SMK zaslužna je njihova karboksilna skupina koja katalizira reakciju razgradnje hidroperoksida nastalih u ranim fazama autooksidacije. Metali djeluju na više različitih i složenih načina, no svi mehanizmi u konačnici pospješuju autooksidaciju DMU i na taj način smanjuju njegovu trajnost. Željezo, bakar i nikal pokazuju najveći oksidacijski potencijal te ubrzavaju razvoj užeglosti u jestivim uljima. Komponente poput klorofila, karotenoida i sterola ponašaju se također kao prooksidansi pri određenim uvjetima (Morales i Przybylski, 2013).

Najveći utjecaj na trajnost DMU ima proces oksidacije koji se počinje odvijati već tijekom mljevenja ploda masline. Oksidacija se ne može spriječiti, obzirom da se radi o reakcijama uvjetovanim kemijskim sastavom DMU, no svakako se može usporiti odgovarajućim postupanjem u skladu s važećom zakonskom regulativom i propisima tijekom proizvodnje, skladištenja i distribucije DMU. Oksidacija DMU uzrokovana je kisikom prisutnim u zraku i smatra se glavnim uzrokom negativnih promjena te kvarenja DMU. Reakcije oksidacije odvijaju se različitim mehanizmima, a Morales i Przybylski (2013) su ih podijelili u tri skupine: enzimaska oksidacija, lipidna autooksidacija i fotooksidacija.

2.1.1.1. Enzimaska oksidacija

Enzimaska oksidacija odvija se kaskadnim mehanizmom (Slika 2), tj. dolazi do razgradnje nezasićenih i polizasićenih masnih kiselina preko nestabilnih izomera hidroperoksida do niza hlapljivih i nehlapljivih produkata poput aldehida, ketona i alkohola odgovornih za neugodan okus ulja.



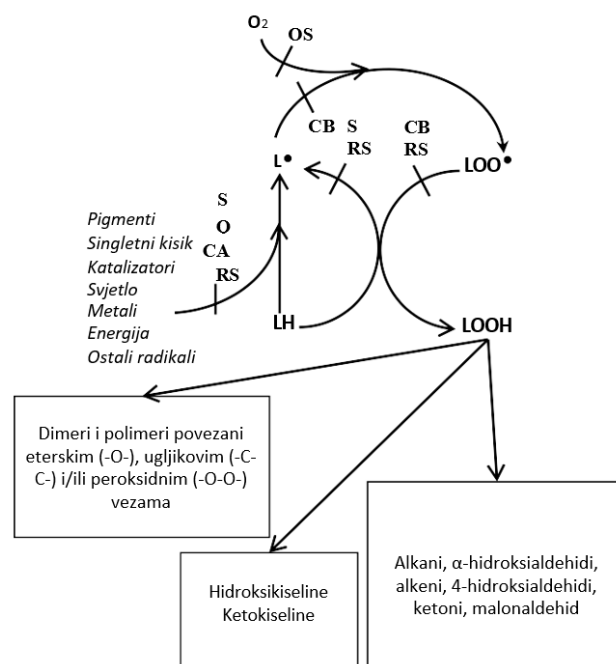
Slika 2. Mehanizam kaskadnih reakcija enzimske oksidacije u djevičanskom maslinovom ulju (prema Morales i Przybylski, 2013)

Svaka reakcija unutar kaskade katalizirana je enzimima poput lipaza, lipoksigenaza, izmoeraza, dehidrogenaza itd. Zanimljivo je kako su iste te enzimske reakcije odgovorne za specifičan okus DMU što ga čini jedinstvenim među ostalim biljnim uljima. Kako bi se enzimska oksidacija odvijala brže i efikasnije, potrebna je konstantna prisutnost kisika. U slučaju anaerobnih uvjeta, enzimska oksidacija se neće prekinuti obzirom da neki enzimi i u tim uvjetima kataliziraju reakcije, no produkti takvih reakcija neće biti hidroperoksidi nego slobodni radikali. Posljedično, može doći do ranijeg kvarenja ulja nego je očekivano tijekom skladištenja jer slobodni radikali potiču oksidaciju (Morales i Przybylski, 2013).

2.1.1.2. Lipidna autooksidacija

Lipidna autooksidacija kao supstrate koristi nezasićene masne kiseline i kisik, a katalizirana je svjetlošću, temperaturom, metalima, pigmentima, itd. Proces lipidne autooksidacije (Slika 3) odvija se kroz tri faze - inicijacija, propagacija i terminacija - prilikom kojih nastaju slobodni radikali ili reaktivne vrste kisika. Prva faza (inicijacija) obuhvaća nastanak slobodnih radikala izravno iz nezasićenih masnih kiselina uz neki od ranije spomenutih katalizatora. Nakon toga slijedi druga faza (propagacija) tijekom koje nastali lipidni

radikali reagiraju s kisikom te nastaju peroksilni radikali koji potom reagiraju s drugom molekulom lipida stvarajući lipidni radikal i hidroperoksid. Zbog visoke nestabilnosti, hidroperoksidi se lako razgrađuju u hlapljive i nehlapljive komponente koje onda dalje oksidiraju u niz sekundarnih produkata. Stvaranje lipidnog radikala i hidroperoksida je autokatalitička reakcija, stoga se i najbrže odvija u odnosu na ostale reakcije lipidne autooksidacije. Nastali produkti u fazama inicijacije i propagacije negativno utječu na kvalitetu DMU, u prvom redu uzrokuju neugodne promjene okusa. Međutim, antioksidansi poput fenolnih spojeva imaju ključnu ulogu tijekom faze propagacije jer će reagirati s lipidnim radikalima i tako stvoriti nereaktivne radikale čime znatno usporavaju proces autooksidacije. Posljednja faza (terminacija) također ima veliku ulogu obzirom da dolazi do međusobnih reakcija radikala čime nastaju neradikalni produkti, što također usporava proces autooksidacije. Mehanizam odvijanja reakcija lipidne autooksidacije prikazan je na Slici 3 (Morales i Przybylski, 2013).

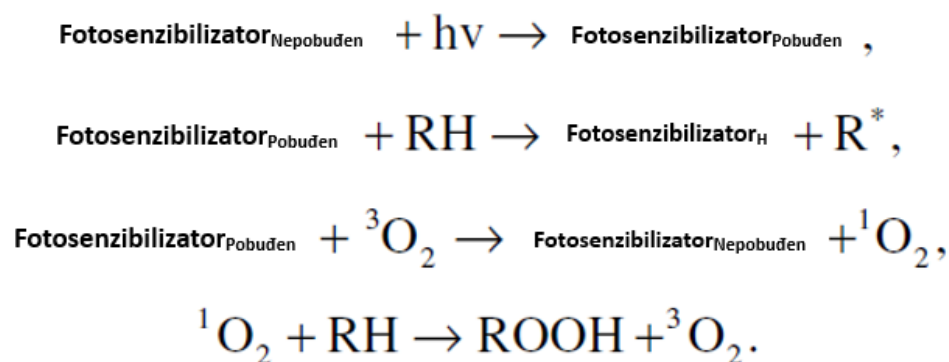


Slika 3. Mehanizam lipidne autooksidacije u djevičanskom maslinovom ulju (prema Morales i Przybylski, 2013)

Legenda: Lipidni spojevi: *LH*, lipid; *L•*, lipidni radikal; *LOO•*, peroksi radikal; *LOOH*, hidroperoksid. Antioksidansi: *OS*, hvatač kisika; *CB*, razbijač lančane reakcije; *S*, synergist; *Q*, prigušivač; *CA*, kelatni agensi; *RS*, hvatač/blokator radikala.

2.1.1.3. Fotooksidacija

Fotooksidacija se smatra najštetnijom kada se govori o oksidacijskoj stabilnosti DMU. Naime DMU sadrži spojeve koji su fotosenzibilni pa pri izlaganju svjetlu i uz prisutnost kisika stvaraju hidroperokside i slobodne radikale (Slika 4) koji dalje potiču autooksidaciju. Nakon što se energija iz svjetla prenese na fotosenzibilizator (primjerice klorofil), on prelazi u pobuđeno stanje te kao takav može reagirati s lipidima i stvarati slobodne radikale. Pobuđeni fotosenzibilizator može reagirati i s kisikom stvarajući singletni kisik koji potom, u reakciji s nezasićenom masnom kiselinom, stvara hidroperokside. Reakcija nezasićenih masnih kiselina sa singletnim kisikom može se inhibirati spojevima poput α -tokoferola, β -karotena, aminokiselina, proteina i ostalih spojeva koji će djelovati kao „prigušivači“, tj. inaktivirat će singletni kisik koji će se vratiti u standardno stanje (Morales i Przybylski, 2013).



Slika 4. Mehanizam fotooksidacije u djevičanskom maslinovom ulju (prema Morales i Przybylski, 2013)

Legenda: $h\nu$, energija; RH , lipid/nezasićena masna kiselina; R^* , slobodni radikal; ${}^3\text{O}_2$, standardni kisik; ${}^1\text{O}_2$, singletni kisik; ROOH , hidroperoksid.

2.1.1.4. Primarni i sekundarni produkti oksidacije

Oksidacijom DMU nastaju različiti produkti koji se dijele na primarne i sekundarne. Primarni produkti oksidacije su različiti hidroperoksidi, peroksidi i slobodni radikali koji nastaju vezanjem kisika na dvostruke veze masnih kiselina i vrlo su nestabilni. Najviše izomera u DMU potječe od linolenske kiseline, a zatim iz linolne i oleinske kiseline. Također, DMU sadrži i negliceridne komponente koje su podložne oksidaciji poput klorofila i fitosterola. Degradacijom klorofila u prisutnosti kisika nastaju hidroperoksidi i slobodni radikali koji će utjecati na promjenu boje i okusa DMU. Sekundarni produkti oksidacije nastaju degradacijom iz primarnih produkata i to su aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline, esteri i sl. Navedeni

sekundarni produkti oksidacije su uglavnom hlapljivi spojevi te su odgovorni za nepoželjne okuse i mirise u DMU te uglavnom nastaju kemijskom oksidacijom. Hlapljivi spojevi nastali enzimskom oksidacijom odgovorni su za voćni i zeleni okus DMU. S druge strane, dio sekundarnih produkata obuhvaća nehlapljive spojeve koji su se pokazali štetnima za ljudsko zdravlje (Morales i Przybylski, 2013).

2.2. SUVREMENA PROIZVODNJA DMU I PRISUTNI PROBLEMI

Proizvodnja DMU je tehnološki postupak sastavljen iz nekoliko koraka od kojih svaki ima određeni utjecaj na konačnu kvalitetu ulja. Suvremena proizvodnja DMU kontinuirano se unapređuje i optimira kako bi se dobilo ulje visoke kvalitete uz maksimalno iskorištenje sirovine, no svaki od koraka procesa i dalje ima određene prepreke koje stručnjaci pokušavaju svesti na minimum.

2.2.1. Priprema plodova

Prije same obrade plodova masline, prvo se odstranjuje lišće i grančice, a zatim plodovi idu na pranje kako bi se uklonili ostaci zemlje, kamenčići i sve ostale nečistoće. Također, ispiranjem se smanjuje razina pesticida/herbicida koji su topljivi u ulju i kao takvi predstavljaju prijetnju zdravstvenoj ispravnosti DMU. Vrlo je važno temeljito očistiti i oprati plodove jer ostaci nečistoća mogu oštetiti dijelove opreme, ali i negativno utjecati na kvalitetu i senzorska svojstva ulja (Kalogianni i sur., 2019; Di Giovacchino, 2013).

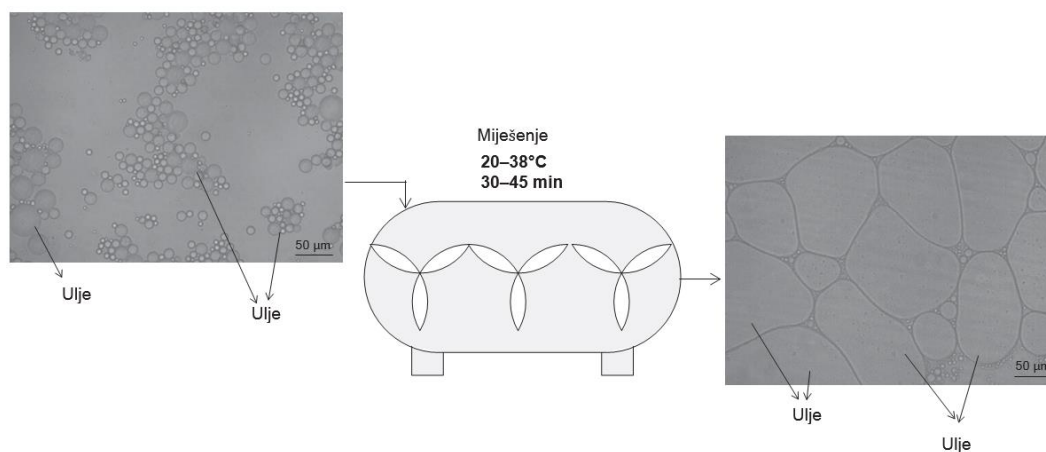
2.2.2. Mljevenje/drobljenje

Očišćeni plodovi se melju/drobe, pri čemu se razara tkivo ploda masline i dolazi do oslobađanja ulja iz vakuola. Postoje različite izvedbe opreme za mljevenje/drobljenje maslina, no svaka od njih ima pozitivne i negativne utjecaje na DMU. Primjerice, ulje dobiveno mljevenjem maslina u metalnim mlinovima čekićarima imat će više koncentracije fenola i bolju oksidacijsku stabilnost, ali s druge strane, tijekom procesa mljevenja na takvim mlinovima dolazi do povećanja temperature maslinovog tijesta što za posljedicu ima povećanje stupnja oksidacije. Uz opremu, na kvalitetu dobivenog maslinovog tijesta će utjecati i količina kisika tijekom mljevenja/drobljenja te temperatura plodova maslina koji se obrađuju. Primjerice, hlađenje maslina na temperaturu od 6 °C pridonijelo je višoj koncentraciji fenola u ulju što je

jedan od načina optimizacije procesa (Kalogianni i sur., 2019).

2.2.3. Miješenje

Najvažnija operacija procesa je miješenje obzirom da se smatra najkritičnijom točkom prerade maslina. Tijekom ove operacije dolazi do polaganog miješanja tijesta na blago povišenim temperaturama kako bi kapljice ulja međusobno došle u kontakt i spojile se u veće kapi (Slika 5), ali i kako bi se razbile emulzije nastale prilikom mljevenja/drobljenja, što će kasnije olakšati fizičko izdvajanje ulja. Uz to, miješenjem dolazi do prijenosa kemijskih tvari između čvrste, uljne i vodene faze te do odvijanja kemijskih i enzimskih reakcija što utječe na nutritivna i senzorska svojstva, kao i količinu dobivenog ulja na kraju procesa. Na proces miješenja veliki utjecaj imaju vrijeme (trajanje) i temperatura, no potrebno je još istraživanja kako bi se definirali konkretni kinetički modeli utjecaja tih varijabli na kvalitetu ulja te kako bi se optimirala učinkovitost procesa. Prije je velik utjecaj imala i atmosfera, međutim suvremeni uređaji za miješenje su zatvoreni kako bi tijesto bilo u što manjem doticaju sa zrakom, ali i zbog zakona o industrijskoj sigurnosti te HACCP (engl. *Hazard Analysis Critical Control Point*) propisa za tvornice maslinovog ulja. Tijekom miješenja je ulje u pravilu zaštićeno od oksidacije jer fenoli reagiraju s kisikom iz zraka te smanjuju njegovu količinu, no time se oni troše.



Slika 5. Shematski prikaz procesa miješenja. Mikroskopske slike prikazuju veličinu kapljica ulja prije (gore lijevo) i nakon miješenja (dolje desno) (prema Kalogianni i sur., 2019)

Iz tog razloga mnogi uređaji u današnje vrijeme, osim što su zatvoreni, imaju i modificiranu atmosferu (npr. inertni plin dušik) (Kalogianni i sur., 2019; Di Giovacchino, 2013).

2.2.4. Ekstrakcija

Sljedeća operacija je separacija kako bi se iz maslinova tijesta izdvojilo ulje. Separacija se može vršiti na 3 načina: prešanjem, kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom i procjeđivanjem. U današnje vrijeme, posebice industrijski pogoni, najčešće koriste kontinuiranu centrifugalnu ekstrakciju jer su prešanje i procjeđivanje šaržni procesi. S druge strane, nedostatak kontinuirane centrifugalne ekstrakcije je u tome što proizvedena komina ima veći sadržaj vode koji otežava njezinu preradu. Kontinuirana centrifugalna ekstrakcija provodi se u uređajima s dvije ili tri faze, a razlika je što kod dvofaznog uređaja postoje dva izlaza - za ulje i kominu s većim sadržajem vode, dok kod trofaznog uređaja postoje tri izlaza - za ulje, otpadnu vodu i kominu. Razdvajanje faza vrši centrifugalna sila na temelju gustoće, tj. specifične težine sastojaka tijesta. Nadalje, dvofazni uređaj radi bez ili s minimalnim dodatkom vode, a u trofazni uređaj se dodaje veća količina vode što za posljedicu ima i velike količine otpadne vode. Prema nekim istraživanjima oba uređaja imaju isti prinos ulja, no dvofazni nema veliku količinu otpadne vode što mu daje prednost. Istraživanjima je potvrđena korelacija između izvorne kakvoće maslina i sustava koji se koristio za ekstrakciju te je utvrđeno kako je ulje kvalitetnijih plodova masline imalo manji udio fenola nakon prerade na trofaznom uređaju u odnosu na dvofazni. U svakom slučaju, vrlo je važno provesti ekstrakciju na odgovarajući način jer taj proces izravno utječe na sadržaj fenola, a time i oksidacijsku stabilnost ulja tijekom skladištenja. Nakon ekstrakcije DMU se centrifugira jer sadrži malu količinu vegetabilne vode, a zatim se može filtrirati ili ostaviti u spremnicima kako bi se istaložile tvari koje ga čine mutnim (npr. enzimi koji potiču hidrolizu i oksidaciju fenola). Ukoliko se ne filtrira odmah, vrlo je važno da se nakon sedimentacije ulje što prije prelije u drugi spremnik kako bi se spriječilo kvarenje ulja uzrokovano predugim kontaktom sa zaostalim vodenim slojem nakon ekstrakcije (Kalogianni i sur., 2019; Di Giovacchino, 2013).

2.2.5. Završne operacije i skladištenje DMU

Proizvedeno DMU je potrebno skladištiti na odgovarajući način obzirom da upravo parametri skladištenja imaju veliki utjecaj na njegovu oksidacijsku stabilnost. Štoviše, ukoliko se ne puni odmah u boce i dalje distribuira, potrebno ga je skladištiti u poklopljenim spremnicima od nehrđajućeg čelika jer je to inertan materijal koji neće stupati u reakcije s spojevima u ulju. Međutim, bilo bi dobro da se skladišti na tamnom mjestu, bez obzira na neprozirne spremnike, jer je DMU podložno fotooksidaciji. Volumen zraka iznad ulja u spremniku ne bi trebao biti veći od 3-4 % ukupnog volumena jer se zrak smatra najrizičnijim

čimbenikom kada se govori o oksidacijskoj stabilnosti DMU obzirom da prisutnost kisika iz zraka može potaknuti reakcije oksidacije koje su opisane u prethodnom poglavlju. U slučaju da se količina ulja u spremniku smanji (primjerice zbog punjena u boce), potrebno je zrak u spremniku zamijeniti inertnim plinom poput dušika. Temperatura skladištenja je također rizičan čimbenik i trebala bi biti između 13 °C i 18 °C. Na temperaturama oko 7-8 °C ulje će biti kruto te se neće moći pravilno filtrirati niti puniti u boce, dok se na temperaturama iznad 20-22 °C povećava mogućnost autooksidacije (Di Giovacchino, 2013).

2.2.6. Inovativne tehnologije u obradi maslinova tijesta

Obzirom na sve navedene probleme tijekom proizvodnje i skladištenja DMU sve se više pridaje značaj optimiranju svake operacije unutar procesa, kao i razvoju novih tehnologija za preradu maslina do ulja, kako bi se dobilo što stabilnije DMU koje će imati veću trajnost i izvornu kvalitetu kroz što duži period skladištenja. Kako je već spomenuto, miješenje je najvažniji dio procesa proizvodnje DMU, stoga se brojni autori (Nardella i sur., 2021; Pérez i sur., 2021; Tamborrino i sur., 2020; Rigane i sur., 2020; Iqdiam i sur., 2019; Leone i sur., 2016; Clodoveo, 2013; Clodoveo i sur., 2013) usredotočuju na optimiranje te operacije prethodnim tretiranjem maslinova tijesta inovativnim tehnologijama poput obrade mikrovalovima, ultrazvukom, pulsirajućim električnim poljem (PEP) ili UTT-om. Tako tretirano maslinovo tijesto prije miješenja imalo je veći prinos ulja, a i uočeno je poboljšanje kvalitete DMU s aspekta kemijskog sastava.

2.2.6.1. Ubrzani toplinski tretman (UTT)

UTT predstavlja jednu od inovativnih metoda obrade maslinova tijesta prije miješenja. Do sada je istraživana utjecaj ubrzanog zagrijavanja (Leone i sur., 2016; Veneziani i sur., 2015; Taticchi i sur., 2014; Fiori i sur., 2014; Esposto i sur., 2013) i ubrzanog hlađenja (Veneziani i sur., 2018; Veneziani i sur., 2017) maslinova tijesta kako bi se skratilo vrijeme miješenja i poboljšala kvaliteta DMU. Prethodna obrada maslinova tijesta UTT-om ima povoljan utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva u DMU jer se njihov udio znatno povećava u odnosu na DMU proizvedeno tradicionalnim postupkom. Također, hlapljive komponente odgovorne za aromu DMU (poput C6 aldehida i estera) prisutne su u većoj koncentraciji ukoliko je tijesto prethodno tretirano UTT-om, što u konačnici poboljšava senzorska svojstva DMU. No utjecaj UTT-a na hlapljive komponente će varirati ovisno o sorti masline jer se pokazalo kako upravo sorta ima najveći značaj u ovom kontekstu (Veneziani i sur., 2018; Veneziani i sur., 2017; Veneziani i

sur., 2015; Leone i sur., 2016). Nadalje, nije zabilježen utjecaj UTT-a na osnovne parametre kvalitete (peroksidni broj i K-brojevi) što ukazuje kako prethodna obrada tijesta UTT-om ne utječe negativno na normalnu razgradnju masti DMU (Veneziani i sur., 2018; Veneziani i sur., 2017; Veneziani i sur., 2015). Osim utjecaja na spojeve u DMU, UTT skraćuje vrijeme miješenja čime se svakako doprinosi kvaliteti i oksidacijskoj stabilnosti ulja obzirom da povećava temperaturu tijesta prije miješenja, što pogoduje geografskim područjima gdje je niža temperatura prilikom berbe i skladištenja plodova. Sukladno tome, ubrzano zagrijavanje će imati veću prednost ukoliko se tretira maslinovo tijesto niže temperature (Leone i sur., 2016).

2.3. METODE ODREĐIVANJA ODRŽIVOSTI DMU

Održivost, odnosno oksidacijska stabilnost DMU vrlo je važna s aspekta skladištenja ulja u realnim uvjetima jer govori o periodu u kojem će DMU zadržati očekivanu kvalitetu, senzorska svojstva i zdravstvenu ispravnost. Kako bi se odredila održivost DMU, potrebno je pratiti određene parametre kvalitete poput peroksidnog broja, K-brojeva pri valnoj duljini od 232 nm i 270 nm te polifenola kroz dulji period. Zbog potrebe tržišta da se održivost ulja odredi u što kraćem roku kako bi se što preciznije odredio rok trajnosti DMU, razvile su se metode brzih testova kvarenja koje predviđaju oksidativne promjene DMU tijekom skladištenja.

Najpoznatiji testovi koji se koriste za određivanje održivosti DMU su test stabilnosti pri 60 °C (engl. *oven test*), engl. *active oxygen method* (AOM) ili Swift test te indeks održivosti ulja (engl. *Oil Stability Index*; OSI) koji se najčešće provodi u rancimat uređaju. Iako se svi testovi koriste za određivanje održivosti ulja, utvrđeno je kako rezultati dobiveni oven testom nisu u skladu s rezultatima AOM testa ili rancimat uređaja. Oven test, iako jedan od najstarijih, i dalje se smatra vrlo pouzdanim obzirom da se uočavaju slične oksidativne promjene kao i prilikom skladištenja DMU u realnim uvjetima (Morales i Przybylski, 2013).

2.3.1. Oven test

Oven test je ubrzani test skladištenja pri čemu se ulje skladišti u tami i na temperaturama u rasponu 60-65 °C kako bi se ubrzala oksidacija. Uzorcima se periodično mjeri stupanj oksidacije kako bi se utvrdila oksidacijska stabilnost ulja. Ovaj test varira ovisno o nekim drugim uvjetima prilikom izvođenja poput količine ulja koja se skladišti, veličine spremnika te je li spremnik otvoren ili zatvoren. Također, omjer volumena i površine ulja će imati značajan utjecaj na brzinu oksidacije. Oksidativne promjene koje se dogode u ulju tijekom 1 dana

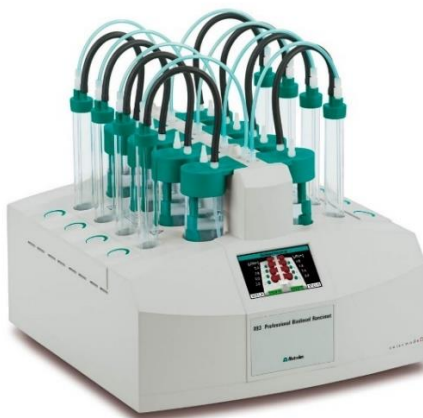
izvođenja oven testa odgovaraju skladištenju ulja mjesec dana pri sobnoj temperaturi, stoga se iz te korelacije može procijeniti oksidacijska stabilnost ulja kroz dulji period. Osim u tami, oven test se izvodi i na svjetlu kako bi se utvrdio utjecaj fotooksidacije na održivost ulja (Morales i Przybylski, 2013).

2.3.2. Active oxygen method (AOM) ili Swift test

AOM ili Swift test mjeri vrijeme potrebno da ispitivano ulje postigne unaprijed određenu vrijednost peroksidnog broja (PB). Test se provodi na način da se uzorak određene mase stavi u staklenu epruvetu na temperaturu od 98 °C, prilikom čega se kontinuirano prozračuje, i periodično se uzimaju manje mase uzorka za određivanje PB (Velasco i Dobarganes, 2002).

2.3.3. Indeks održivosti ulja (Oil Stability Index; OSI)

Indeks održivosti ulja definira se kao interval, tj. vrijeme potrebno za postizanje maksimalne promjene vodljivosti. To je metoda prilikom koje pročišćeni zrak prolazi kroz uzorak ulja određene mase koji se održava pri konstantnoj temperaturi i protoku. Zatim se zrak iz uzorka ulja preusmjerava kroz spremnik s deioniziranom vodom, pri čemu se neprestano prati vodljivost vode. Taj zrak sadrži hlapljive organske kiseline isprane iz oksidirajućeg ulja, što dovodi do povećanja vodljivosti vode tijekom odvijanja oksidacije. Iako se postupak može provoditi pri raznim temperaturama, pokazalo se da je raspon od 100 do 140 °C optimalan za većinu vrsta ulja. Najčešće se za ovu analizu koristi Rancimat uređaj (Slika 6) koji može ispitivati više uzoraka odjednom (Velasco i Dobarganes, 2002).



Slika 6. Primjer rancimat uređaja (893 Professional Biodiesel Rancimat, Metrohm) (prema Anonymous, 2018)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za izradu ovog rada korišteni su uzorci DMU proizvedenog iz četiri hrvatske autohtone sorte masline – dvije dalmatinske, oblice i levantinke, te dvije istarske, rosulje i istarske bjelice. Uzorci su proizvedeni na laboratorijskoj uljari bez tretmana i uz UTT pri 6 različitih temperatura (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C). Također, korištena su i četiri uzorka DMU proizvedena konvencionalnom tehnologijom u poluindustrijskom pogonu iz prethodno navedenih sorti. Sva ulja proizvedena su 2021. godine, a nakon proizvodnje uzorci su čuvani u bočicama od tamnog stakla volumena 15 mL pri temperaturi 15 – 20 °C, pri čemu je prostor iznad ulja bio ispunjen dušikom. Proizvedeni uzorci su analizirani odmah nakon proizvodnje (0 mjeseci) te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja.

3.1.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman i toplinski tretman

DMU proizvedeno je na laboratorijskoj pilot – uljari Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas, Sevilla, Španjolska) koja se sastoji od mlina čekićara (MM-100), termomiješalice s vodenom kupelji (TM-100) i centrifuge (CF-100) prema metodi opisanoj u diplomskom radu Pejić (2022). Plodovi su prvo očišćeni i oprani, a zatim samljeveni na mlinu čekićaru. UTT tijesta istarske bjelice, levantinke i oblice je proveden zagrijavanjem u vodenoj kupelji i hlađenjem u uređaju za ubrzano hlađenje. Oko 800 g tijesta je presipano u plastične posudice obložene aluminijskom folijom s gornje strane radi ravnomjerne raspodjele topline. Posudica je uronjena u vodenu kupelj (SUB Aqua Pro SAP12, GRANT, Cambridgeshire, Velika Britanija) gdje se toplina prenosi kondukcijom. Voda u kupelji je bila zagrijana na 50 °C (za temperature tijesta 25 °C, 30 °C i 35 °C) odnosno na 52 °C (za temperaturu tijesta 40 °C). Temperature tijesta od 15 °C i 20 °C postignute su hlađenjem. Oko 800 g maslinova tijesta nanoseno je na pladnjeve od inoksa u sloju debljine 1 – 1,5 cm koji su u uređaju Blastchiller (ATT05 ATTILA ABB, TECNODOM, Padova, Italija) podvrgnuti hlađenju pri -18 °C. Toplinska energija odvodila se konvekcijom. Temperatura je provjeravana ubodnim termometrom i prilikom grijanja i pri hlađenju, a niti jedan od opisanih postupaka nije trajao dulje od 10 minuta.

Toplinski tretman (TT) tijesta maslina iz rosulje i oblice proveden je grijanjem maslinova tijesta na temperature od 30 °C, 35 °C i 40 °C u termostatu zagrijanom na 45 °C

pomoću prijenosa topline konvekcijom. Zagrijavanje se provodilo, ovisno o završnoj temperaturi tijesta, i do 60 min. Hlađenje tijesta uz TT provedeno je jednako kao i kod UTT-a.

Na laboratorijskoj uljari je potom prvo provedeno miješenje tretiranog tijesta pri 27 °C kroz 40 min, a zatim je provedeno centrifugiranje uz 3500 o/min kroz 90 sekundi. Na kraju je ulje još izbistreno finim centrifugiranjem pri 18 °C i 5000 o/min kroz 4 minute na centrifugi Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka).

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete

U ovom radu od osnovnih parametara kvalitete određene su vrijednosti peroksidnog broja te vrijednosti specifične ekstinkcije na 232 i 268 nm (K_{232} , K_{268} i ΔK). Peroksidni broj određen je prema standardnoj HR EN ISO 3960:2017 normi, dok su K-brojevi određeni prema metodi COI/T.20/dok. br. 19 (2019).

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH[•] metodom pomoću elektronske paramagnetske rezonancije (EPR)

Antioksidacijski kapacitet uzoraka ulja određen je prema metodi objavljenom u diplomskom radu Pejić (2022) EPR spektroskopijom. Prema navedenoj metodi uzorak ulja dodaje se u otopinu slobodnog radikala DPPH te se prati njegova inaktivacija koja je posljedica djelovanja spojeva ulja koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost.

3.2.2.1. Priprema otopine slobodnog radikala

Otopina DPPH radikala (tehnička čistoća > 85 % (CHN), Fluka, Buchs, Švicarska) u etil-acetatu (HPLC čistoća, CARLO ERBA Reagents, Cornaredo, Italija) priprema se 24 sata prije provedbe analize. Etil-acetat je potrebno prethodno propuhati dušikom u trajanju od 5 minuta kako bi se uklonio kisik koji može interferirati prilikom analize. U laboratorijsku čašu od 25 mL odvaži se 5,93 mg DPPH radikala na analitičkoj vagi (KERN ABP 200-5DM, KERN & SOHN, Balingen, Njemačka) te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se zatim nadopuni propuhanim etil-acetatom do oznake i omota u aluminijsku foliju kako bi se spriječio kontakt sa svjetlom. Tako pripremljena otopina miješa se na Vortex uređaju 3 minute, a zatim skladišti u hladnjaku na temperaturi 4 °C kroz 24 sata.

3.2.2.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet uzoraka ulja mjereno je na EPR spektrometru Magnetech MS – 5000 X (Slika 7).



Slika 7. Magnetech MS – 5000 X (Freiburg instruments) EPR spektrometar (*vlastita fotografija*)

Prije početka analize uređaj se mora inicijalizirati u trajanju od 15 minuta. U mikroepruvetu od 2 mL prvo se doda 980 μL otopine DPPH \cdot , pa 20 μL uzorka ulja uz istovremeno pokretanje štoperice. Mikroepruveta se zatvori i miješa na Vortex uređaju 10 sekundi, a zatim se reakcijska otopina stavlja u mrak na 27 min. Nakon toga, reakcijska otopina napuni se u kapilaru te stavi u uređaj. Nakon točno 30 minuta od kontakta ulja i otopine slobodnog radikala pokreće se snimanje EPR spektra. Slijepa proba priprema se kao i reakcijska otopina, a umjesto uzorka dodaje se 20 μL etil-acetata. Mjerenje slijepa probe potrebno je provesti na početku analize te svaka sljedeća 2 sata tijekom analize.

Snimanje EPR spektara se vrši pri sobnoj temperaturi i sljedećim parametrima: jakost centralnog magnetskog polja 331,00 – 343,00 mT; amplituda modulacije 0,20 mT; frekvencija 100 kHz i snaga mikrovalnog zračenja 10 mW. Postavljanje parametara, snimanje spektara i obrada rezultata vrši se pomoću ESR Studio programskog paketa. Iz intenziteta signala srednjeg pika spektra DPPH \cdot u reakcijskoj smjesi i slijepoj probi računa se postotak redukcije DPPH \cdot koji je proporcionalan antioksidacijskom kapacitetu prema formuli [1]:

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

3.3. OBRADA PODATAKA

Rezultati istraživanja su statistički obrađeni pomoću dvofaktorske analize varijance s replikacijom – two way ANOVA u programu Microsoft Excel 365.

4. REZULTATI I RASPRAVA

DMU glavni je izvor masti mediteranske prehrane, a sastoji se od gliceridnog dijela i negliceridnog dijela. Gliceridni dio (~98 %) uglavnom sadrži mononezasićene i polinezasićene masne kiseline, dok je negliceridni dio (~2 %) sastavljen od mnogo različitih komponenti poput alkohola, sterola, hlapljivih spojeva i antioksidansa (Servili i sur., 2014). Takav raznolik kemijski sastav utječe na oksidacijsku stabilnost, tj. trajnost DMU.

Primarno se visoke nutritivne vrijednosti DMU pripisuju mononezasićenim masnim kiselinama, ali i činjenici da sadrži esencijalnu linolnu masnu kiselinu. No nezasićene masne kiseline, posebice polinezasićene, podložne su oksidaciji u prisutnosti kisika, što može imati negativan utjecaj na oksidacijsku stabilnost DMU. S druge strane fenolni spojevi odgovorni su za karakterističan okus DMU te poboljšavaju oksidacijsku stabilnost čime produljuju rok trajnosti ulja (Servili i sur., 2014).

Miho i sur. (2018) zaključili su kako velik utjecaj na kemijski sastav i oksidacijsku stabilnost DMU ima sorta masline iz koje je proizvedeno, kao i klimatski i geografski uvjeti rasta. Također, prema istim autorima (Miho i sur., 2020), osim kemijskog sastava i sorte, na oksidacijsku stabilnost DMU utječe i proces miješenja jer su aktivne mnoge enzimske i kemijske reakcije. Tijekom miješenja se aktiviraju enzimi koji doprinose senzorskim svojstvima DMU, ali i oni koji potiču oksidaciju fenolnih spojeva, stoga se smatra kako predugo vrijeme miješenja ima negativan utjecaj na konačnu koncentraciju fenolnih spojeva u DMU. Iz tog razloga proizvođači konstantno usavršavaju proces proizvodnje DMU kako bi potrošačima omogućili što kvalitetnije ulje kroz što dulji period. Neki od primjera su uvođenje tretmana maslinova tijesta prije miješenja inovativnim tehnologijama poput ultrazvuka, ubrzanog toplinskog tretmana, pulsirajućeg električnog polja i dr.

Cilj rada bio je utvrditi kako UTT i TT samljevenog maslinova tijesta prije miješenja djeluje na oksidacijsku stabilnost odnosno trajnost DMU dobivenih iz 4 hrvatske autohtone sorte masline (oblica, istarska bjelica, levantinka i rosulja). Maslinovo tijesto prije miješenja je zagrijavano ili hladeno na temperature od 15 °C do 40 °C. Važno je istaknuti kako je zagrijavanje tijesta sorte rosulja na temperature 30 °C, 35 °C i 40 °C provedeno u termostatu (konvekcijski), a DMU sorti istarska bjelica i levantinka zagrijavana su na iste temperature u vodenoj kupelji (kondukcijski). Tijesto sorte oblica zagrijavano je na oba načina kako bi se mogao usporediti utjecaj načina zagrijavanja na oksidacijsku stabilnost DMU.

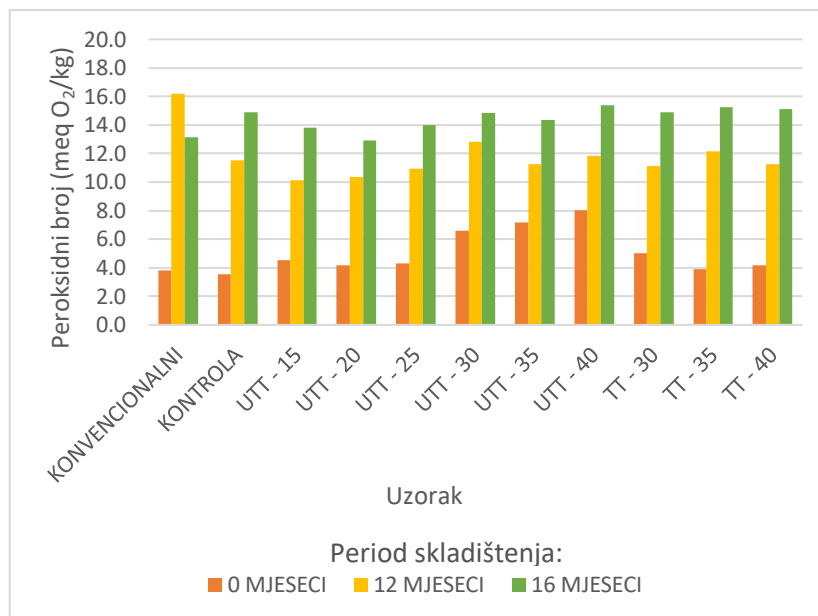
Određivani su osnovni parametri kvalitete, peroksidni broj (PB) i vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi) pri valnim duljinama od 232nm i 268 nm, prema standardnim metodama

te antioksidacijski kapacitet DPPH` metodom pomoću EPR spektrometra. Osim za uzorke proizvedene uz prethodni tretman UTT-om prije miješenja, ovi parametri su određivani i za 4 uzorka (po 1 za svaku sortu) proizvedena konvencionalnim načinom proizvodnje DMU. Vrijednosti su mjerene odmah nakon proizvodnje ulja (0 mjeseci), te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja. Navedene vrijednosti nisu mjerene između 0 i 12 mjeseci zbog prethodnih istraživanja (Conte i sur., 2020; Stefanoudaki i sur., 2010; Brenes i sur., 2001; Cinquanta i sur., 2001) u kojima nisu uočene značajne promjene PB, K_{232} i K_{268} vrijednosti tijekom tog perioda, a DMU je bilo skladišteno pri sličnim uvjetima kao i u ovom ispitivanju (u tami, anaerobno, na temperaturi do 30 °C). Najvažniji čimbenik prilikom skladištenja, koji navode autori, jest izostanak kisika unutar spremnika s uljem, što je slučaj i kod uzoraka DMU ispitivanih u ovom radu. Naime, nakon punjena uzoraka u boce, prostor iznad ulja ispunjen je inertnim plinom (dušikom) koji zamjenjuje zrak i ne potiče oksidativne promjene.

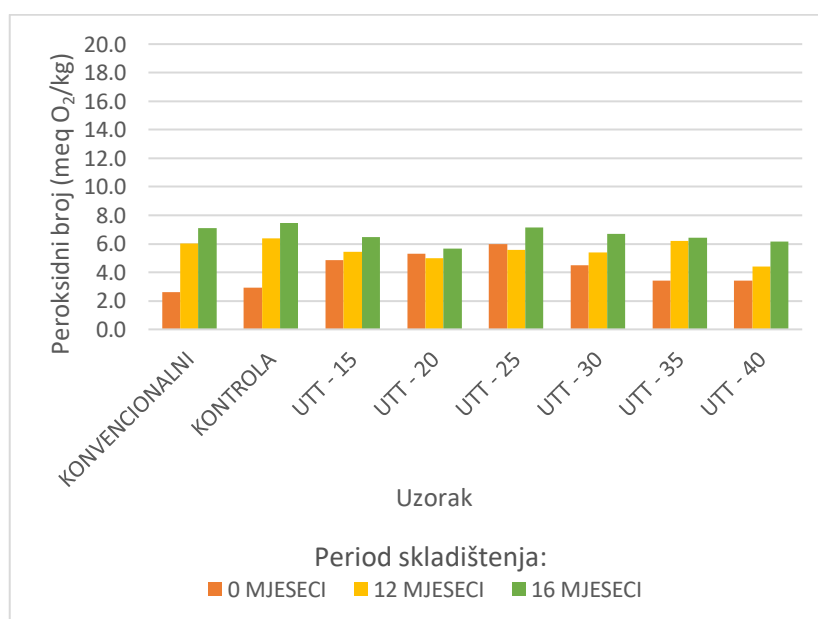
Rezultati određivanja vrijednosti PB i redukcije DPPH radikala prikazane su grafički, dok su vrijednosti specifične ekstinkcije (K_{232} , K_{268} , ΔK) prikazane tablično kao srednja vrijednost provedenih mjerenja \pm standardna devijacija. Rezultati statističke obrade podataka također su prikazani tablično u prilogu 2 ovog diplomskog rada.

4.1. ODREĐIVANJE OSNOVNIH PARAMETARA KVALITETE

Na slikama 8 – 11 grafički su prikazane vrijednosti PB ispitivanih uzoraka DMU sorti oblica, istarska bjelica, levantinka i rosulja odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja. Iz prikaza se može uočiti kako uzorci DMU istarske bjelice pokazuju znatno manji ukupni porast vrijednosti peroksidnog broja tijekom vremena skladištenja u odnosu na ostale 3 sorte. Također, vidljiv je i trend rasta vrijednosti PB između perioda odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja uzoraka DMU kod sve 4 sorte, uz iznimku konvencionalnog uzorka sorte oblica i uzoraka UTT-20 i UTT-25 sorte istarska bjelica.

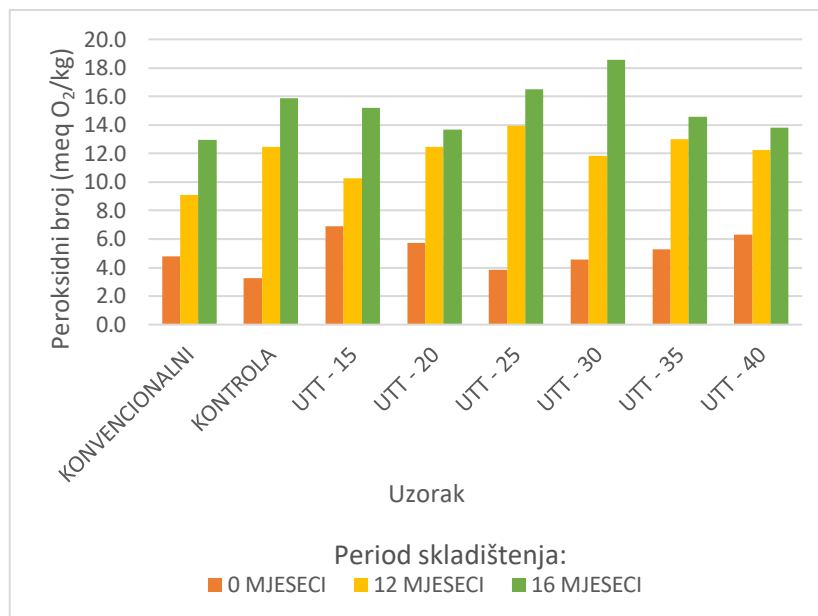


Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti peroksidnog broja ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja
 *UTT – ubrzani toplinski tretman; TT – toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C);
 **postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT, uz TT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na peroksidni broj



Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti peroksidnog broja ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

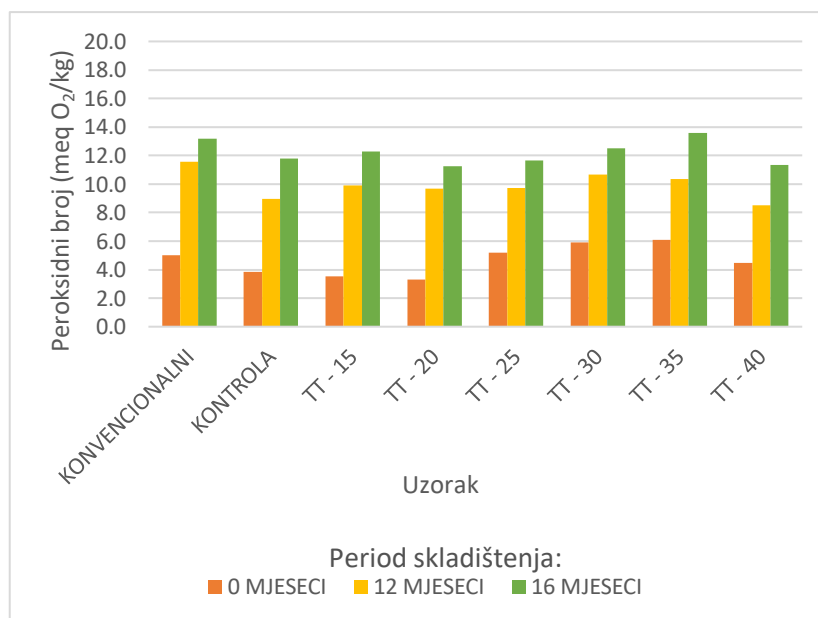
* UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C);
 **postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT) je imao statistički značajan ($p \leq 0,05$), a period skladištenja vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na peroksidni broj



Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti peroksidnog broja ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

* UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na peroksidni broj



Slika 11. Grafički prikaz vrijednosti peroksidnog broja ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

*TT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz TT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na peroksidni broj

Vrijednosti PB ukazuju na prisutnost primarnih produkata oksidacije u DMU, stoga se očekuje njihov porast tijekom duljeg perioda skladištenja ulja (Stefanoudaki i sur., 2010; Gomez-Alonso i sur., 2007; Cinquanta i sur., 2001) zbog procesa oksidacije koji se prirodno odvija u DMU. To je u skladu i s rezultatima zabilježenim u ovom istraživanju. Prema delegiranoj Uredbi Komisije (EU) 2022/2104, kako bi se maslinovo ulje kategoriziralo kao djevičansko, PB vrijednosti moraju biti 20 meq O₂/kg ili manje (Uredba, 2022), što zadovoljavaju svi ispitivani uzorci DMU i nakon 16 mjeseci skladištenja.

Prema dosadašnjim istraživanjima (Ghanbari i sur., 2012; Stefanoudaki i sur., 2010; Gomez-Alonso i sur., 2007) poznato je kako su fenolni spojevi u velikoj mjeri odgovorni za oksidacijsku stabilnost, tj. trajnost DMU zbog visoke antioksidacijske aktivnosti. Zbog toga se koncentracija fenola vremenom smanjuje i procesi oksidacije se mogu neometano odvijati, što će za posljedicu imati porast PB. Uz fenolne spojeve, vrlo dobri antioksidansi su i tokoferoli te sinergisti fosfolipidi i skvalen. Osim toga, ne smije se izostaviti ni omjer mononezasićenih (engl. *monounsaturated fatty acids*; MUFA) i polinezasićenih (engl. *polyunsaturated fatty acids*; PUFA) masnih kiselina kao ključni čimbenik, jer procesi oksidacije počinju upravo na nezasićenim vezama (Ghanbari i sur., 2012; Cinquanta i sur., 2001). Ukoliko se usporede dalmatinske sorte (Slike 8 i 10) vidi se kako su DMU levantinke i oblice kroz svih 16 mjeseci skladištenja zadržala slične vrijednosti PB, no kod DMU oblice mogu se uočiti nešto više vrijednosti u odnosu na DMU levantinke, što ukazuje kako DMU levantinke ima bolju oksidacijsku stabilnost. To je u skladu s rezultatima Šarolić i sur. (2015) te Žanetić i sur. (2012) gdje je prikazano kako DMU levantinke ima znatno bolji MUFA/PUFA omjer, ali i nešto veći sadržaj tokoferola u odnosu na DMU oblice. Što se tiče DMU istarskih sorti (Slike 9 i 11), DMU istarske bjelice imaju znatno manje vrijednosti PB u odnosu na DMU rosulje što znači bolju oksidacijsku stabilnost, odnosno trajnost DMU istarske bjelice. To podupiru i rezultati istraživanja Koprivnjak i sur. (2016; 2012). Naime, oni su zaključili kako DMU istarske bjelice ima veći udio ukupnih fenola u odnosu na DMU rosulje, dok je u slučaju tokoferola situacija obrnuta. Također, zaključili su da DMU istarske bjelice ima znatno veći MUFA/PUFA omjer u odnosu na DMU rosulje, a kako je već spomenuto to je jedan od ključnih čimbenika prilikom određivanja trajnosti DMU. Stoga je očekivano kako će DMU istarske bjelice imati bolju oksidacijsku stabilnost i u skladu je s dobivenim rezultatima. Ukoliko se međusobno usporede DMU oblice i istarske bjelice, kao poznatijih hrvatskih sorti koje su više istraživane, DMU istarske bjelice pokazuju generalno niže vrijednosti PB u odnosu na DMU oblice tijekom vremena skladištenja, a to ukazuje na bolju trajnost DMU ove istarske sorte. Lukić i sur. (2019) su zaključili kako DMU istarske bjelice ima znatno viši udio ukupnih fenola u odnosu na DMU

oblice što potvrđuje navedene rezultate. Topić (2022) i Demo (2022) su u završnim radovima ispitivali oksidacijsku stabilnost istih uzoraka DMU odmah nakon proizvodnje (0 mjeseci) DSC metodom. Zaključili su kako DMU levantinke imaju bolju oksidacijsku stabilnost u odnosu na DMU oblice, kao i da DMU istarske bjelice imaju bolju oksidacijsku stabilnost u odnosu na DMU rosulje. Iz svega navedenoga može se zaključiti kako sorta ima vrlo značajan utjecaj na oksidacijsku stabilnost, odnosno trajnost DMU, zbog specifičnosti kemijskog sastava na koji utječe geografsko područje i klimatski uvjeti tijekom rasta. Statističkom obradom svih vrijednosti PB pokazalo se kako je utjecaj postupka proizvodnje DMU (konvencionalni, UTT i TT postupak) na početku pokusa (0 mjeseci) i nakon 16 mjeseci bio vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$), a nakon 12 mjeseci visoko statistički značajan ($p \leq 0,01$). Utjecaj sorte kao i interakcije postupka proizvodnje DMU i sorte je kroz sva tri perioda mjerenja bio vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$) na promjenu PB uzoraka ulja. Interakcija postupka proizvodnje i sorte znači da je svaka sorta različito reagirala na primijenjene postupke proizvodnje, odnosno uvjete proizvodnje (uključuje temperature u UTT i TT) ulja kroz formiranje primarnih produkata oksidacije (PB) (Tablice P1-P3).

Ukoliko se usporede postupci proizvodnje na primjeru DMU oblice (slika 8), može se uočiti kako su uzorci DMU nakon proizvodnje (0 mjeseci), čije je tijesto tretirano toplinskim tretmanom (TT) pri 30 °C, 35 °C i 40 °C, imali znatno niže vrijednosti PB u odnosu na uzorke tretirane ubrzanim toplinskim tretmanom (UTT) pri istim temperaturama. Iz toga se zaključuje kako TT, koji se provodi dulje vrijeme i toplina se prenosi konvekcijom u odnosu na UTT, ima bolji utjecaj na oksidacijsku stabilnost DMU oblice. Nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja svi uzorci DMU oblice imaju slične vrijednosti PB što upućuje na činjenicu kako se tijekom skladištenja ubrzavaju procesi oksidacije pa temperatura i način tretmana tijekom proizvodnje imaju sve manji utjecaj na vrijednosti PB, a posljedično i trajnost DMU oblice. Ako se usporede uzorci TT – 30, TT – 35 i TT – 40 DMU oblice s uzorcima TT – 30, TT – 35 i TT – 40 DMU rosulje, zapaža se jednak trend. Naime, kod obje sorte dolazi do porasta PB tijekom 16 mjeseci skladištenja, no kod DMU rosulje su nešto niže vrijednosti nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja u odnosu na DMU oblice. Međutim, iako su vrijednosti PB kod DMU rosulje niže u odnosu na DMU oblice, kod obje sorte se uočava otprilike jednak porast vrijednosti PB između 12 i 16 mjeseci skladištenja. Te razlike među vrijednostima PB među sortama mogu se pripisati njihovom kemijskom sastavu (sadržaju fenola i tokoferola).

Statistička obrada podataka pokazala je kako period skladištenja ima vrlo visok statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,001$) na PB kod svakog od 4 ispitanih sortnih ulja. Postupak proizvodnje i interakcija postupak proizvodnje*period skladištenja (što znači da svaki od

postupaka proizvodnje drugačije djeluje na PB u 0., 12. i 16. mjesecu skladištenja) imaju vrlo visok statistički značaj na formiranje primarnih produkata oksidacije za sorte oblica, levantinka i rosulja, a kod istarske bjelice su ti utjecaji također statistički značajni ali na najnižem stupnju značajnosti ($p \leq 0,05$) (Tablice P4-P7).

Vrijednosti specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) ukazuju na prisutnost primarnih produkata oksidacije te konjugiranih diena (Stefanoudaki i sur., 2010). Konjugirani dieni također nastaju procesom oksidacije pri čemu dolazi do premještanja nezasićene dvostruke veze unutar polinezasićenih masnih kiselina s dvije nezasićene veze poput linolne. Konjugirane masne kiseline, za razliku od izoliranih, apsorbiraju energiju UV zračenja što se koristi pri ovoj analizi. Obzirom da vrijednosti K_{232} upućuju i na prisutnost primarnih produkata oksidacije, očekuje se njihov porast kroz vrijeme, kao što je bio slučaj i kod PB vrijednosti. Promotre li se tablice 1-4, jasno se može zaključiti kako je kod DMU dobivenih iz sve 4 sorte maslina došlo do porasta K_{232} vrijednosti mjerenih odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja i ti su rezultati u skladu s rezultatima drugih autora (Gomez-Alonso i sur., 2007; Méndez i Falque, 2007; Cinquanta i sur., 2001). DMU istarske bjelice (tablica 2) pokazuju najmanji porast K_{232} vrijednosti kroz cijeli period skladištenja, što dodatno potvrđuje rezultate PB vrijednosti kako ta sorta ima najbolju oksidacijsku stabilnost, tj. trajnost.

Vrijednosti specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) ukazuju pak na prisutnost konjugiranih triena (primjerice produkata oksidacija linolenske masne kiseline) i sekundarnih produkata oksidacije. Njihov se porast očekuje tek nakon duljeg vremena skladištenja, što su zabilježili Stefanoudaki i sur. (2010) te Gomez-Alonso i sur. (2007). Isto je zabilježeno i u ovom istraživanju gdje su K_{268} vrijednosti dobivene odmah nakon proizvodnje i nakon 12 mjeseci relativno slične, dok se malo veći porast bilježi usporedbom vrijednosti dobivenih nakon 12 i 16 mjeseci. Nadalje, ukoliko se promotre vrijednosti K_{232} i K_{268} za svaki period posebno, može se uočiti kako temperatura tretmana tijesta prije miješenja, kao parametar proizvodnje DMU, nije imala poseban utjecaj na spomenute vrijednosti jer su sve slične, kako međusobno, tako i s vrijednostima konvencionalno proizvedenog uzorka. Ovaj trend uočava se kod sve 4 sorte maslina i kroz sva tri mjerena perioda, a rezultati su u skladu s istraživanjima nekoliko autora (Veneziani i sur., 2018; Veneziani i sur., 2017; Veneziani i sur., 2015; Esposto i sur., 2013) koji su potvrdili kako ubrzani toplinski tretman prije miješenja nije imao značajan utjecaj na vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi). Ipak, promotre li se načini proizvodnje odnosno zagrijavanja tijesta, uzorci DMU oblice čije je tijesto bilo tretirano TT-om pokazuju blago niže vrijednosti u odnosu na uzroke DMU oblice čije je tijesto tretirano UTT-om (tablica 1), ali i dalje nije neko značajno odstupanje što potvrđuje prethodne navode kako tretman

maslinova tijesta prije miješenja nema neki značajniji utjecaj na vrijednosti K-brojeva.

Tablica 1. Vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi) pri valnim duljinama od 232 nm i 268 nm ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja, izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

SORTA	TEMPERATURA PROIZVODNJE (°C)	SPECIFIČNA EKSTINKCIJA								
		0 MJESECI			12 MJESECI			16 MJESECI		
		K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK
OBLICA	KONVENCIONALNI	2,05 \pm 0,00	0,21 \pm 0,00	-0,01 \pm 0,00	2,66 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,57 \pm 0,04	0,26 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00
	KONTROLA	2,04 \pm 0,02	0,21 \pm 0,05	-0,01 \pm 0,00	2,54 \pm 0,01	0,21 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,87 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00
	UTT - 15	1,90 \pm 0,12	0,20 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	2,35 \pm 0,11	0,17 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,54 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	-0,01 \pm 0,01
	UTT - 20	1,86 \pm 0,07	0,21 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00	2,50 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	2,66 \pm 1,88	0,11 \pm 0,16	0,00 \pm 0,00
	UTT - 25	1,83 \pm 0,14	0,18 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	2,48 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,49 \pm 0,05	0,22 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00
	UTT - 30	2,10 \pm 0,08	0,19 \pm 0,03	-0,01 \pm 0,00	2,58 \pm 0,06	0,20 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,71 \pm 0,13	0,26 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00
	UTT - 35	2,07 \pm 0,10	0,17 \pm 0,01	-0,01 \pm 0,00	2,48 \pm 0,13	0,23 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,60 \pm 0,03	0,24 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00
	UTT - 40	2,09 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,00	2,57 \pm 0,03	0,23 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	2,78 \pm 0,06	0,25 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	TT - 30	1,99 \pm 0,04	0,19 \pm 0,05	-0,01 \pm 0,00	2,40 \pm 0,04	0,18 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,52 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00
	TT - 35	1,93 \pm 0,05	0,22 \pm 0,01	-0,01 \pm 0,00	2,38 \pm 0,09	0,18 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	2,58 \pm 0,16	0,23 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00
	TT - 40	2,01 \pm 0,02	0,22 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	2,58 \pm 0,05	0,23 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	2,69 \pm 0,25	0,26 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00

*UTT – ubrzani toplinski tretman; TT – toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

** postupak proizvodnje ima visoko statistički značajan ($p \leq 0,01$) utjecaj na K₂₃₂

Tablica 2. Vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi) pri valnim duljinama od 232 nm i 268 nm ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja, izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

SORTA	TEMPERATURA PROIZVODNJE (°C)	SPECIFIČNA EKSTINKCIJA								
		0 MJESECI			12 MJESECI			16 MJESECI		
		K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK
ISTARSKA BJELICA	KONVENCIONALNI	1,79 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00	-0,01 \pm 0,00	1,79 \pm 0,04	0,16 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	1,93 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
	KONTROLA	1,88 \pm 0,13	0,24 \pm 0,04	0,00 \pm 0,00	1,97 \pm 0,09	0,18 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,16 \pm 0,00	0,21 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
	UTT - 15	1,91 \pm 0,07	0,18 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,00	1,96 \pm 0,01	0,18 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,15 \pm 0,08	0,21 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00
	UTT - 20	2,02 \pm 0,00	0,23 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,00	2,12 \pm 0,06	0,24 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,16 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
	UTT - 25	2,01 \pm 0,04	0,20 \pm 0,01	-0,01 \pm 0,00	2,05 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	2,14 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	UTT - 30	2,02 \pm 0,16	0,21 \pm 0,09	-0,01 \pm 0,00	2,08 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,11 \pm 0,04	0,19 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
	UTT - 35	2,08 \pm 0,07	0,26 \pm 0,03	-0,01 \pm 0,00	2,07 \pm 0,01	0,20 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	2,14 \pm 0,10	0,21 \pm 0,04	0,00 \pm 0,00
	UTT - 40	2,08 \pm 0,08	0,21 \pm 0,04	-0,01 \pm 0,00	2,02 \pm 0,11	0,19 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	2,21 \pm 0,17	0,27 \pm 0,10	0,00 \pm 0,00

*UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

** postupak proizvodnje i period skladištenja imaju vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na K₂₃₂

Tablica 3. Vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi) pri valnim duljinama od 232 nm i 268 nm ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

SORTA	TEMPERATURA PROIZVODNJE (°C)	SPECIFIČNA EKSTINKCIJA								
		0 MJESECI			12 MJESECI			16 MJESECI		
		K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK
LEVANTINKA	KONVENCIONALNI	1,88 ± 0,00	0,19 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	2,05 ± 0,17	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,34 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	KONTROLA	1,68 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,34 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,00 ± 0,00	2,44 ± 0,07	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	UTT - 15	1,69 ± 0,10	0,16 ± 0,05	0,00 ± 0,00	2,23 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,00 ± 0,00	2,56 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	UTT - 20	1,61 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,38 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,33 ± 0,11	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	UTT - 25	1,70 ± 0,07	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,48 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,58 ± 0,10	0,21 ± 0,03	0,00 ± 0,00
	UTT - 30	1,71 ± 0,11	0,12 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,24 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0,00 ± 0,00	2,69 ± 0,22	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	UTT - 35	1,65 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,33 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,38 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	UTT - 40	1,70 ± 0,03	0,12 ± 0,01	-0,01 ± 0,00	2,44 ± 0,02	0,22 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,39 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,00

*UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

** postupak proizvodnje ima statistički značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj na K_{232} i K_{268} , period skladištenja ima vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na K_{232} i K_{268}

Tablica 4. Vrijednosti specifične ekstinkcije (K-brojevi) pri valnim duljinama od 232 nm i 268 nm ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja, izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

SORTA	TEMPERATURA PROIZVODNJE (°C)	SPECIFIČNA EKSTINKCIJA								
		0 MJESECI			12 MJESECI			16 MJESECI		
		K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK
ROSULJA	KONVENCIONALNI	1,98 ± 0,00	0,16 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	2,43 ± 0,11	0,17 ± 0,01	-0,01 ± 0,00	2,39 ± 0,12	0,19 ± 0,02	0,00 ± 0,00
	KONTROLA	1,97 ± 0,05	0,17 ± 0,02	-0,01 ± 0,00	2,47 ± 0,03	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,63 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	TT - 15	1,98 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,00 ± 0,00	2,46 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,00 ± 0,00	2,60 ± 0,18	0,20 ± 0,02	0,00 ± 0,00
	TT - 20	1,90 ± 0,08	0,17 ± 0,02	-0,01 ± 0,01	2,43 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,49 ± 0,16	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	TT - 25	1,99 ± 0,03	0,15 ± 0,05	-0,01 ± 0,00	2,46 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,00 ± 0,00	2,67 ± 0,08	0,24 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	TT - 30	1,95 ± 0,03	0,15 ± 0,03	-0,01 ± 0,00	2,40 ± 0,03	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,38 ± 0,07	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	TT - 35	1,87 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,00 ± 0,00	2,35 ± 0,08	0,20 ± 0,05	0,00 ± 0,00	2,62 ± 0,16	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	TT - 40	1,91 ± 0,18	0,18 ± 0,05	-0,01 ± 0,00	2,39 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,46 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,00 ± 0,00

*TT – toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

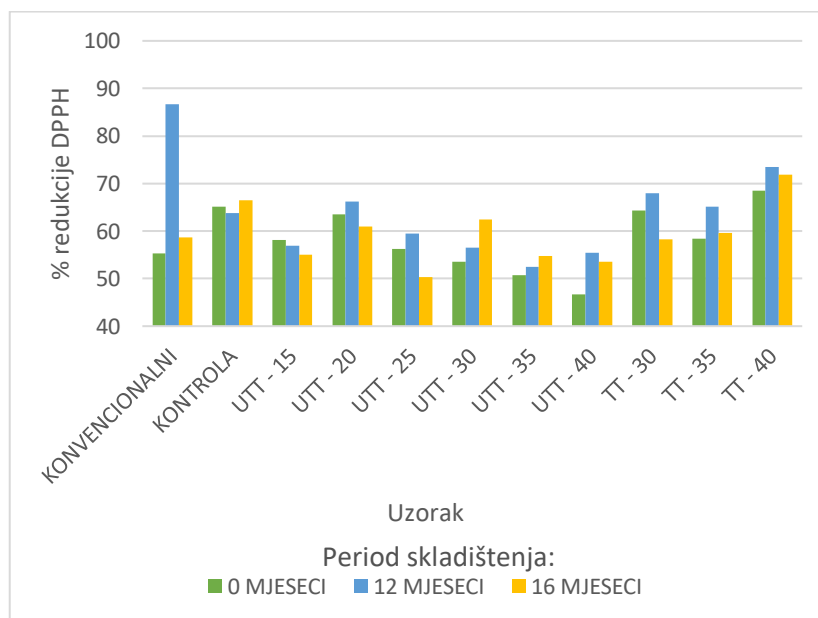
**period skladištenja ima vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na K_{232} i visoko statistički značajan ($p \leq 0,01$) utjecaj na K_{268}

Rezultati statističke obrade ukazuju kako je jedino sorta imala značajan utjecaj na primarne produkte oksidacije i konjugirane diene (apsorbancije izmjerene pri 232 nm) i to vrlo visoko statistički značajne na početku pokusa i nakon 12 mjeseci ($p \leq 0,001$) i visoko značajne ($p \leq 0,01$) nakon 16 mjeseci skladištenja. Postupak proizvodnje bio je značajan samo nakon 12 mjeseci ($p \leq 0,001$), a interakcija postupak proizvodnje*sorta na početku ($p \leq 0,01$) i nakon 12 mjeseci ($p \leq 0,001$). Na formiranje konjugiranih triena i sekundarnih produkata oksidacije (apsorbancije izmjerene pri 268 nm) statistički je značajna jedino sorta i to na početku pokusa ($p \leq 0,001$) i nakon 12 mjeseci skladištenja ($p \leq 0,05$). Postupak proizvodnje je bio značajan za konjugirane diene istarske bjelice ($p \leq 0,001$) i levantinke ($p \leq 0,05$) te za konjugirane triene samo kod levantinke ($p \leq 0,05$) (Tablice P8-P16). Period skladištenja bio je značajan za formiranje konjugiranih diena kod svih ulja, dok je samo kod levantinke i rosulje utjecao na konjugirane triene. Značajna interakcija postupak proizvodnje*period skladištenja je zamijećena samo kod levantinke, no i na formiranje konjugiranih diena i triena (Tablice P17-P28).

Prema delegiranoj uredbi Komisije (EU) 2022/2104, kako bi se maslinovo ulje kategoriziralo kao djevičansko vrijednost K_{232} mora biti 2,60 ili manja, vrijednost K_{268} mora biti 0,25 ili manja, a vrijednost ΔK 0,01 ili manja (Uredba, 2022). Sve vrijednosti ΔK ispitivanih uzoraka DMU su bile manje od 0,01 te su svi ispitivani uzorci DMU prema tom parametru odgovarali kategoriji djevičanskih maslinovih ulja. Usporedimo li granice za K_{232} i K_{268} s dobivenim rezultatima može se zaključiti kako bi većina ispitivanih DMU i dalje pripadala kategoriji djevičanskih maslinovih ulja, iznimka su uzorci DMU oblice i rosulje nakon 16 mjeseci skladištenja gdje ih većina ima K_{232} vrijednosti iznad dopuštene granice za danu kategoriju, te uzorci DMU oblice kod kojih se uočava i porast K_{268} vrijednosti. Iako je navedeno kako su sve PB i ΔK vrijednosti u dozvoljenim granicama, ulje se smatra pokvarenim obzirom na vrijednosti K_{232} i K_{268} iznad dozvoljenih granica. To potvrđuje kako se DMU ne mogu univerzalno označavati s rokom trajanja od 18 mjeseci, nego je potrebno provesti istraživanja ovisno o sorti.

4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM

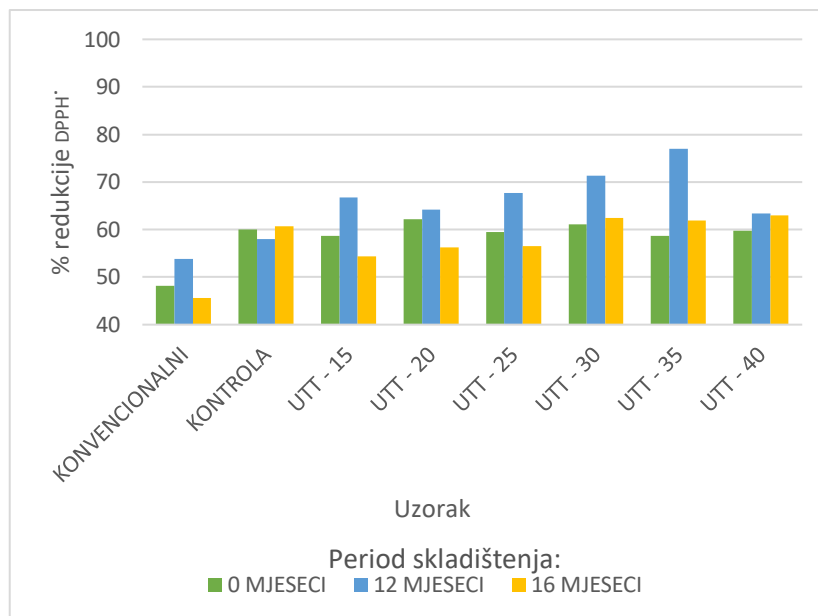
Određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedeno je pomoću spektrometra elektronske paramagnetske rezonancije (EPR). Na slikama 12-15 grafički su prikazane vrijednosti % redukcije DPPH radikala ispitivanih uzoraka DMU sorti oblica, istarska bjelica, levantinka i rosulja odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja. Iz rezultata se može uočiti kako su DMU rosulje pokazala najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, dok su DMU levantinke pokazala značajno manje vrijednosti u odnosu na DMU ostalih sorti. Također, može se primijetiti kako je kod uzoraka DMU oblice i istarske bjelice nakon 12 mjeseci skladištenja došlo do porasta antioksidacijskog kapaciteta, a zatim do pada nakon 16 mjeseci skladištenja. Taj trend se može pripisati pogreškama prilikom mjerenja obzirom da je EPR spektrometar visoko osjetljiv uređaj te promjena klimatskih uvjeta (temperatura, strujanje zraka) prostorije u kojoj se mjeri može utjecati na rezultate analize. Ukoliko se usporede rezultati odmah nakon proizvodnje te nakon 16 mjeseci skladištenja, ispitivani uzorci DMU istarske bjelice pokazuju pad antioksidacijskog kapaciteta ili slične vrijednosti nakon 16 mjeseci, što je u skladu s istraživanjima drugih autora (Navajas-Porras i sur., 2020; Samaniego-Sánchez i sur., 2012).



Slika 12. Grafički prikaz vrijednosti % redukcije DPPH ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

* UTT – ubrzani toplinski tretman; TT – toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

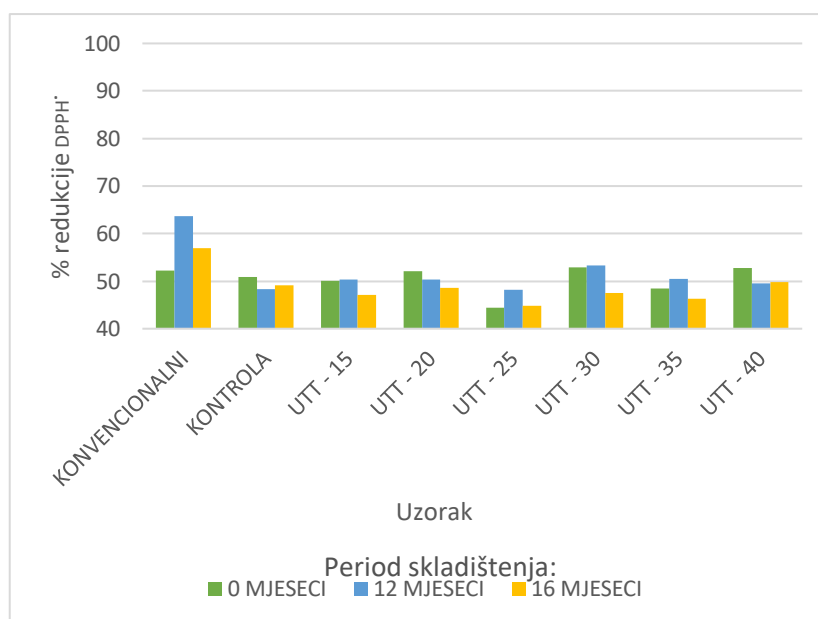
**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT, uz TT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na % redukcije DPPH



Slika 13. Grafički prikaz vrijednosti % redukcije DPPH[•] ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

* UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

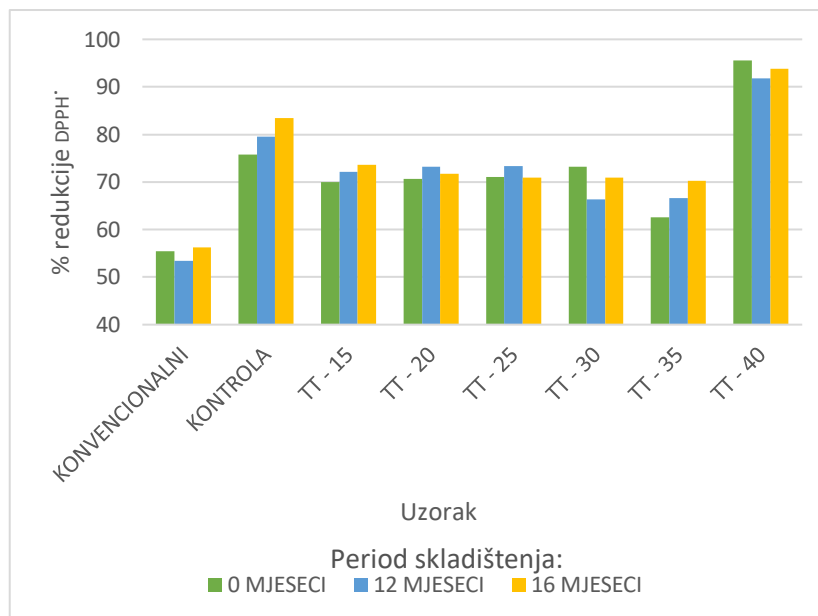
**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na % redukcije DPPH[•]



Slika 14. Grafički prikaz vrijednosti % redukcije DPPH[•] ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

* UTT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz UTT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na % redukcije DPPH[•]



Slika 15. Grafički prikaz vrijednosti % redukcije DPPH^{*} ispitivanih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja

*TT – ubrzani toplinski tretman; 15, 20, 25, 30, 35, 40 – oznake temperature tretmana (°C)

**postupak proizvodnje (konvencionalno, uz TT) i period skladištenja imali su vrlo visok statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj na % redukcije DPPH^{*}

Antioksidacijski kapacitet DMU vrlo je važan parametar prilikom određivanja oksidacijske stabilnosti, odnosno trajnosti.. Primjeri grafičkih prikaza DMU levantinke odmah nakon proizvodnje te nakon 12 i 16 mjeseci skladištenja dobiveni na EPR spektrometru prikazani su na Slikama P1, P2 i P3 (Prilog 1). Antioksidacijski kapacitet je direktno povezan sa sadržajem antioksidanasa u DMU. Već je spomenuto kako su koncentracije tih spojeva, zajedno s MUFA/PUFA omjerom, najvažniji čimbenici trajnosti DMU. No kada se govori o antioksidacijskom kapacitetu DMU, najjači utjecaj će imati koncentracija prisutnih fenola i tokoferola kao jakih antioksidanasa. Usporedbom DMU dalmatinskih sorti (Slika 12 i 14) može se uočiti kako DMU oblice imaju veću sposobnost redukcije DPPH^{*} u odnosu na DMU levantinke, odnosno DMU oblice pokazuju viši antioksidacijski kapacitet. Prema istraživanjima (Šarolić i sur., 2015; Žanetić i sur., 2012) DMU oblice imaju značajno veći udio ukupnih fenola u odnosu na DMU levantinke što potvrđuje dobivene rezultate. Već je prethodno navedeno kako prema istraživanjima Koprivnjak i sur. (2016; 2012) DMU istarske bjelice ima veći udio ukupnih fenola od DMU rosulje, no s druge strane DMU rosulje ima značajno više vrijednosti ukupnih tokoferola u odnosu na DMU istarske bjelice, što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju gdje DMU rosulje (Slika 15) pokazuje bolji antioksidacijski kapacitet u odnosu na DMU istarske bjelice (Slika 13). Statistička obrada pokazala je kako i sorta i

postupak proizvodnje značajno utječu na antioksidacijski kapacitet DMU sve 4 sorte (Tablice P29-P31).

Vrlo važan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost imat će postupak proizvodnje ulja, odnosno, temperatura tretmana tijesta prije miješenja. Poznato je kako maslina ima nekoliko endogenih enzima koji se aktiviraju pri različitim uvjetima. U doprinosu antioksidacijskoj aktivnosti najbitniji su oni enzimi koji utječu na fenolne komponente, a to su β -glukozidaza (β -GLU) i oksidoreduktaze. β -GLU je enzim odgovoran za reakciju hidrolize fenolnih glikozida čiji produkti, aglikoni, će imati najjaču antioksidacijsku aktivnost. S druge strane, oksidoreduktaze, posebice polifenol oksidaza (PPO) i peroksidaza (POX), su enzimi odgovorni za oksidaciju fenolnih spojeva (Hachicha Hbaieb i sur., 2015). Prema Kraljić i sur. (2023) β -GLU najveću aktivnost pokazuje 1 minutu nakon zagrijavanja na temperaturu od 40 °C, no aktivnost enzima izmjerena nakon miješenja koje je uslijedilo po zagrijavanju na 30 °C i 35 °C nije bila drugačija od one izmjerene nakon miješenja po zagrijavanju na 40 °C. Sličan trend može se uočiti i u rezultatima dobivenim prilikom ovog istraživanja gdje se kod DMU oblice, istarske bjelice i levantinke (Slike 12, 13 i 14) uočavaju slične vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pri 30 °C i 40 °C, dok su vrijednosti pri 35 °C nešto niže. Kod DMU rosulje (Slika 15) zapažanja su nešto drugačija. Iako je pri 35 °C zabilježen niži antioksidacijski kapacitet u odnosu na temperature 30 °C i 40 °C, DMU rosulje pokazuju puno više vrijednosti pri 40 °C, ali i generalno. Prema Pejić (2022) razlog tome može biti drugačiji način zagrijavanja (dulje vrijeme, prijenos topline konvekcijom) tijesta rosulje prije miješenja, u odnosu na ostale 3 sorte, jer dolazi do povećanja aktivnosti β -GLU. Utjecaj postupka proizvodnje ulja, odnosno, načina zagrijavanja tijesta prije miješenja potvrđuju i uzorci DMU oblice. Kod njih je jasno vidljivo kako uzorci DMU pri temperaturama 30 °C, 35 °C i 40 °C čije je tijesto prethodno tretirano TT-om pokazuju značajno više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kroz svih 16 mjeseci skladištenja, u odnosu na uzorke čije je tijesto prethodno tretirano UTT-om pri istim temperaturama. Što se tiče nižih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pri 35 °C, pa ponovnog porasta pri 40 °C, mogu se objasniti činjenicom kako POX ima najveću aktivnost oko 37 °C, dok je pri 40 °C aktivnost manja (Taticchi i sur., 2013). Konvencionalni uzorci DMU istarske bjelice i rosulje imaju niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na DMU tretirana UTT-om prije miješenja, što se može pripisati pojačanoj aktivnosti endogenih enzima. Naime, prilikom zagrijavanja UTT-om enzimi kataliziraju reakcije razbijanja stanične stijenke i boljeg oslobađanja fenolnih spojeva (Veneziani i sur., 2015), dok prilikom hlađenja UTT-om dolazi do djelomične ili potpune inhibicije PPO i porasta fenolnih spojeva (Veneziani i sur., 2018). DMU oblice pokazuju bolji antioksidacijski kapacitet pri temperaturama hlađenja

(15 °C i 20 °C), DMU sorte istarska bjelica najbolji antioksidacijski kapacitet pokazuju također pri temperaturi hlađenja (20 °C), dok DMU sorti levantinka i rosulja najjači antioksidacijski kapacitet pokazuju na temperaturama zagrijavanja (30 °C i 40 °C).

Statistička obrada dobivenih rezultata pokazala je vrlo visoko statistički značajan ($p \leq 0,001$) utjecaj i načina proizvodnje i perioda skladištenja na antioksidacijski kapacitet DMU iz sve četiri sorte (Tablice P32-P35).

Utjecaj vrste toplinskog tretmana primijenjenog pri proizvodnji DMU sorte oblica statistički je obrađen i prikazan u tablicama priloga 2 P36-P40. Pokazalo se kako način zagrijavanja ima vrlo visok statistički značajan utjecaj na peroksidni broj i na antioksidacijski kapacitet ($p \leq 0,001$), period skladištenja ima isto takav utjecaj na sve analizirane parametre (PB, K_{232} , K_{268} , ΔK i % redukcije DPPH \cdot), a interakcija tretman*period skladištenja ima značajan utjecaj kao i sam tretman – na peroksidni broj i na antioksidacijski kapacitet ($p \leq 0,001$).

5. ZAKLJUČCI

1. Utjecaj postupka proizvodnje (konvencionalan, uz UTT, uz TT), sorte (oblica, istarska bjelica, levantinka i rosulja) i perioda skladištenja (0, 12 i 16 mjeseci) na oksidacijsku stabilnost (izraženu peroksidnim brojem i K brojevima) i antioksidacijski kapacitet (izražen % redukcije DPPH radikala) bio je statistički značajan.
2. Od svih konvencionalno proizvedenih DMU, ulje sorte istarska bjelica imalo je najbolju oksidacijsku stabilnost, odnosno trajnost, dok je najviši antioksidacijski kapacitet u toj grupi pokazalo ulje sorte oblica.
3. Djevičanska maslinova ulja sorte istarska bjelica proizvedena UTT-om pokazuju najbolju oksidacijsku stabilnost, odnosno trajnost, prema analizama osnovnih parametara kvalitete. S druge strane, djevičanska maslinova ulja sorte oblica proizvedena UTT-om i TT-om pokazuju najmanju oksidacijsku stabilnost, odnosno trajnost jer su se nakon 16 mjeseci prema vrijednostima K_{232} i K_{268} pokvarila.
4. Najjači antioksidacijski kapacitet pokazuju djevičanska maslinova ulja sorte rosulja proizvedena TT-om, dok najslabiji antioksidacijski kapacitet pokazuju djevičanska maslinova ulja sorte levantinka proizvedena UTT-om.
5. Djevičanska maslinova ulja sorti oblica i istarska bjelica najbolji antioksidacijski kapacitet pokazuju pri temperaturi od 20 °C (hlađenje UTT-om), dok djevičanska maslinova ulja sorti levantinka i rosulja pokazuju najbolji antioksidacijski kapacitet pri temperaturi od 40 °C (zagrijavanje UTT-om i TT-om).
6. Utjecaj načina zagrijavanja najbolje se vidi kod rezultata analiza DMU sorte oblica pri čemu su uzorci DMU proizvedeni TT-om nakon proizvodnje (0 mjeseci) imali znatno niže vrijednosti peroksidnog broja u odnosu na uzorke tretirane UTT-om.

6. LITERATURA

Anonymous <<https://scancotec.com/en/products/biodiesel-rancimat/>> Pristupljeno 21. studenoga 2023.

Brenes M, García A, García P, Garrido A (2001) Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **49**, 5609–5614. <https://doi.org/10.1021/jf0107860>

Calligaris S, Manzocco L, Anese M, Nicoli MC (2019) Accelerated shelf life testing. U: Galanakis MG (ured.) *Food Quality and Shelf Life*, London/San Diego/Cambridge, Massachusetts/Kidlington, str. 359–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00012-4>

Cinquanta L, Esti M, Di Matteo M (2001) Oxidative Stability of Virgin Olive Oils. *J Am Oil Chem Soc* **78**, 1197–1202.

Clodoveo ML, Durante V, la Notte D (2013) 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 (2013) An overview of emerging techniques in virgin olive oil extraction process: strategies in the development of innovative plants. *J Agric Eng* **44**. <https://doi.org/10.4081/jae.2013.s2.e60>

Conte L, Milani A, Calligaris S, Rovellini P, Lucci P, Nicoli MC (2020) Temperature dependence of oxidation kinetics of extra virgin olive oil (EVOO) and shelf-life prediction. *Foods* **9**. <https://doi.org/10.3390/foods9030295>

Corradini MG (2018) The Annual Review of Food Science and Technology is online at food. *Annu Rev Food Sci Technol* **9**, 12–13. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117>

Demo L (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja iz sorte istarska bjelica i rosulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Di Giovacchino L (2013) Technological Aspects. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties, 2. izd., Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 57-96.

Eissa AHA (2012) Trends in Vital Food and Control Engineering, InTech, Rijeka, str. 5.

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

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

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>

Gómez-Alonso S, Mancebo-Campos V, Salvador MD, Fregapane G (2007) Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chem* **100**, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.006>

Hachicha Hbaieb R, Kotti F, García-Rodríguez R, Gargouri M, Sanz C, Pérez AG (2015) Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chem* **174**, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.033>

HRN EN ISO 3960:2017, Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje peroksidnog broja -- Jodometrijsko određivanje točke završetka.

International Olive Council COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 5:2019 Method of analysis spectrophotometric investigation in the ultraviolet

Iqdiam BM, Abuagela MO, Marshall SM, Yagiz Y, Goodrich-Schneider R, Baker GL 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>

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>

Kilcast D, Subramaniam P (2000) The stability and shelf-life of food, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 1-4.

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

Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Majetić Germek V (2012) Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža, Istarska bjelica, Leccino i Rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, 172-178. <https://hrcak.srce.hr/95033>

Kraljić K, Balbino S, Filipan K, Herceg Z, Ivanov M, Vukušić Pavičić T i sur. (2023) Innovative Approaches to Enhance Activity of Endogenous Olive Enzymes—A Model System Experiment: Part I—Thermal Techniques. *Processes* **11**. <https://doi.org/10.3390/pr11041194>

Leone A, Esposto S, Tamborrino A, Romaniello R, Taticchi A, Urbani S i sur. (2016) Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **118**, 308–317. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400616>

Lukić I, Lukić M, Žanetić M, Krapac M, Godena S, Bubola KB (2019) Inter-varietal diversity of typical volatile and phenolic profiles of Croatian extra virgin olive oils as revealed by GC-IT-MS and UPLC-DAD analysis. *Foods* **8**. <https://doi.org/10.3390/foods8110565>

Méndez AI, Falqué E (2007) Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control* **18**, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.12.012>

Miho H, Díez CM, Mena-Bravo A, Sánchez de Medina V, Moral J, Melliou E i sur. (2018) Cultivar influence on variability in olive oil phenolic profiles determined through an extensive germplasm survey. *Food Chem* **266**, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.002>

Miho H, Moral J, López-González MA, Díez CM, Priego-Capote F (2020) The phenolic profile of virgin olive oil is influenced by malaxation conditions and determines the oxidative stability. *Food Chem* **314**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126183>

Morales MT, Przybylski R (2013) Olive oil oxidation. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, 2. izd., Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 479–522.

Nardella M, Moscetti R, Chakravartula SSN, 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. *Food* **10**. <https://doi.org/10.3390/foods10112743>

Navajas-Porras B, Pérez-Burillo S, Morales-Pérez J, Rufián-Henares JA, Pastoriza S (2020) Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety. *Food Chem* **325**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126926>

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 i sur. (2021) Impact of novel technologies on virgin olive oil processing, consumer acceptance, and the valorization of olive mill wastes. *Antioxidants* **10**, 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>

Rigane G, Yahyaoui A, Acar A, Mnif S, Ben Salem R, Arslan D (2020) Change in some quality parameters and oxidative stability of olive oils with regard to ultrasound pretreatment, depitting and water addition. *Biotechnol Rep* **26**. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00442>

Samaniego-Sánchez C, Oliveras-López MJ, Quesada-Granados JJ, Villalón-Mir M, Serrana H LG (2012) Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Technol* **114**, 194–204. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100191>

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, di Maio I i sur. (2014) Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* **3**. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>

Stefanouadaki E, Williams M, Harwood J (2010) Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 906–914. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000066>

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

Tamborrino A, Urbani S, Servili M, Romaniello R, Perone C, Leone A (2020) Pulsed electric fields for the treatment of olive pastes in the oil extraction process. *Appl Sci (Switzerland)* **10**. <https://doi.org/10.3390/app10010114>

Taticchi A, Esposto S, Veneziani G, Urbani S, Selvaggini R, Servili M (2013) The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chem* **136**, 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.071>

Taticchi A, Veneziani G, Esposto S, Urbani S, Di Maio I, Selvaggini R i sur. (2014) Introduction of the Flash Thermal Conditioning of the Olive Paste in the Oil Mechanical Extraction Process: Impact on the Virgin Oil Quality. *Acta Horti* **1057**, 725-730. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.92>

Topić M (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja iz sorte oblica i levantinka (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Uredba (2011) Uredba komisije (EEZ) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani, izmjeni uredbi (EZ) br. 1924/2006 i (EZ) br. 1925/2006 Europskog parlamenta i Vijeća te o stavljanju izvan snage Direktive Komisije 87/250/EEZ, Direktive Vijeća 90/496/EEZ, Direktive Komisije 1999/10/EZ, Direktive 2000/13/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, direktiva Komisije 2002/67/EZ i 2008/5/EZ i Uredbe Komisije (EZ) br. 608/2004 (2011) Službeni list Europske unije 304, Strasbourg.

Uredba (2022) Uredba komisije (EEZ) br. 2022/2104 o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje i o stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EEZ) br. 2568/91 i Provedbene uredbe Komisije (EU) br. 29/2012 (2022) Službeni list Europske unije 248, Bruxelles.

Velasco J, Dobarganes C (2002) Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 661–676. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10%3C661::AID-EJLT661%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10%3C661::AID-EJLT661%3E3.0.CO;2-D)

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio 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>

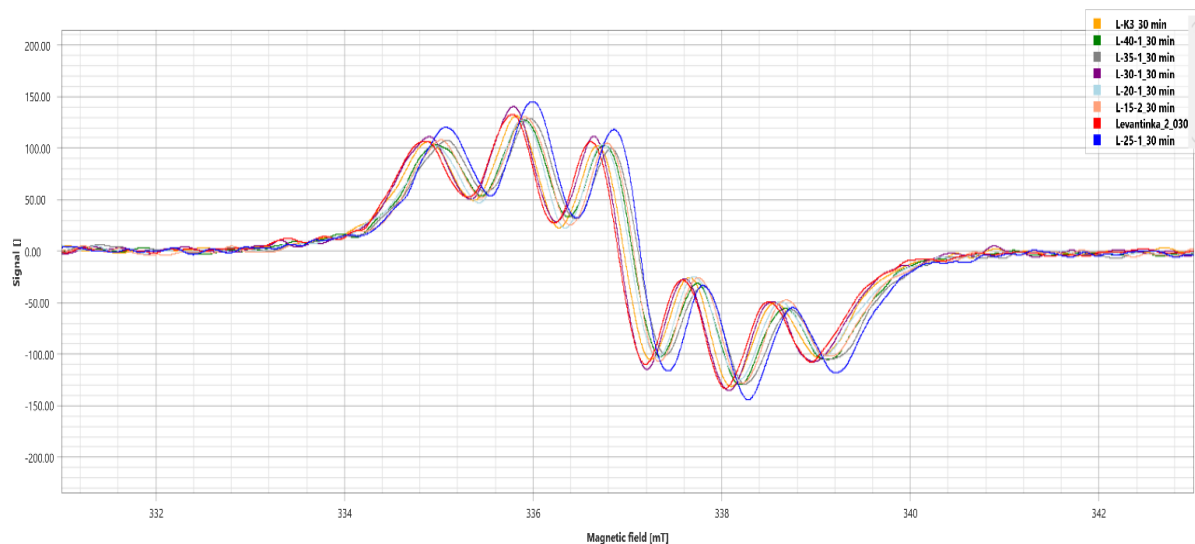
Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Di Maio I i sur. (2017) Cooling treatment of olive paste during the oil processing: Impact on the yield and extra virgin olive oil quality. *Food Chem* **221**, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.067>

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Sordini B i sur. (2018) Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste. *LWT-Food Sci Technol* **87**, 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.034>

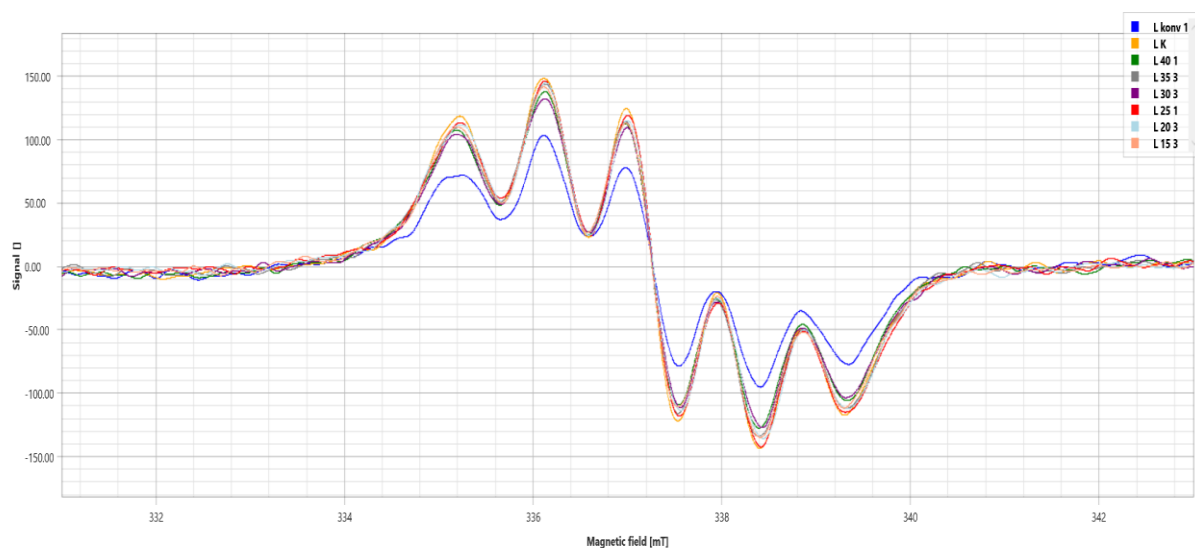
Žanetić M, Cerretani L, Škevin D, Perica S, Vitanović E, Jukić Špika M (2012) Relationship between phenolic content and oxidative stability in dalmatian virgin olive oils. U: 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, str. 74-79. <https://www.researchgate.net/publication/316787499>

7. PRILOZI

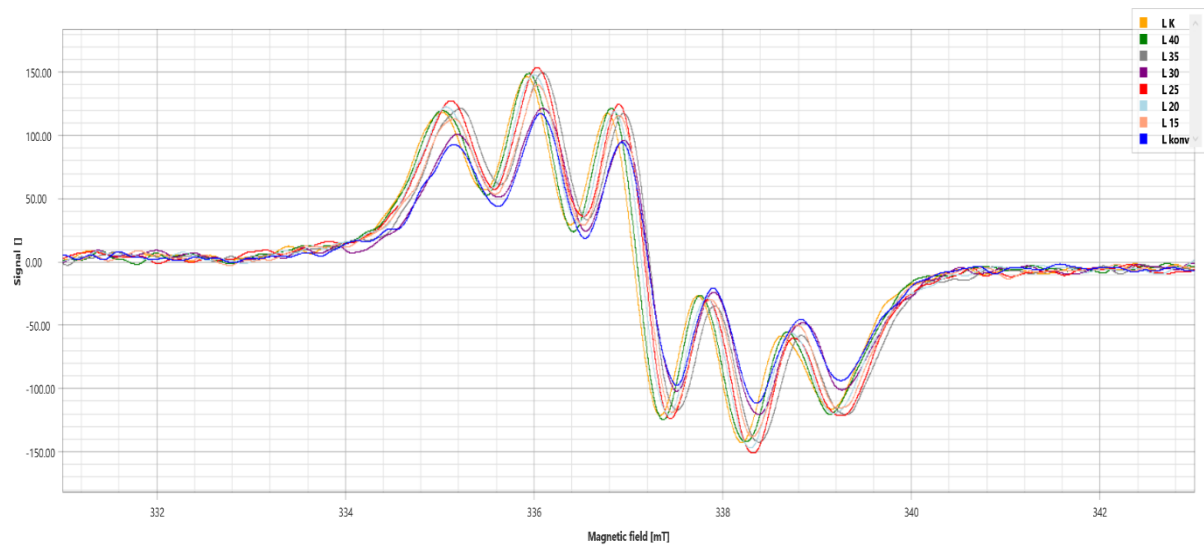
Prilog 1 - Grafički prikazi ovisnosti signala o jakosti magnetskog polja mjereni pomoću EPR spektrometra



Slika P1. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU levantinke o jakosti magnetskog polja nakon proizvodnje (0 mjeseci) mjereno pomoću EPR spektrometra



Slika P2. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU levantinke o jakosti magnetskog polja nakon 12 mjeseci skladištenja mjereno pomoću EPR spektrometra



Slika P3. Grafički prikaz ovisnosti signala DMU levantinke o jakosti magnetskog polja nakon 16 mjeseci skladištenja mjeren pomoću EPR spektrometra

Prilog 2 - Tablični prikazi statističke obrade podataka

Tablica P1. Tablični prikaz statističke značajnosti sorte i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje (0 mjeseci)

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	814,58	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	729,64	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	561,60	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P2. Tablični prikaz statističke značajnosti sorte i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja nakon 12 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	4,19	$\leq 0,01$	2,31
Sorta	249,61	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	6,97	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno, $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P3. Tablični prikaz statističke značajnosti sorte i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja nakon 16 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	73,50	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	4567,44	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	42,84	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P4. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	186,35	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	11420,77	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	157,15	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P5. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,56	$\leq 0,05$	2,42
Period skladištenja	30,62	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	2,18	$\leq 0,05$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno, $p \leq 0,05$ – statistički značajno

Tablica P6. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	82,97	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	8796,56	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	108,11	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P7. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na peroksidni broj djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	130,60	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	7582,27	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	22,56	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P8. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje (0 mjeseci)

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,65	≤ 1	2,31
Sorta	45,91	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	2,79	$\leq 0,01$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P9. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja nakon 12 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	5,22	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	206,95	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	5,09	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P10. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja nakon 16 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,42	≤ 1	2,31
Sorta	4,67	$\leq 0,01$	2,90
Interakcija	1,06	≤ 1	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P11. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje (0 mjeseci)

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	0,23	≤ 1	2,31
Sorta	16,02	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	0,99	≤ 1	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P12. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja nakon 12 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,30	$\leq 0,1$	2,31
Sorta	4,36	$\leq 0,05$	2,90
Interakcija	1,39	≤ 1	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 0,05$ – statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P13. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja nakon 16 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,94	$\leq 0,1$	2,31
Sorta	2,57	$\leq 0,1$	2,90
Interakcija	1,35	≤ 1	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P14. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje (0 mjeseci)

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	5,42	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	20,15	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	7,93	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P15. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja nakon 12 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,40	$\leq 0,05$	2,31
Sorta	2,71	$\leq 0,1$	2,90
Interakcija	2,92	$\leq 0,01$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno, $p \leq 0,05$ – statistički značajno; $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno

Tablica P16. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja nakon 16 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,64	≤ 1	2,31
Sorta	1,48	≤ 1	2,90
Interakcija	1,53	≤ 1	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P17. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	186,35	≤ 1	2,42
Period skladištenja	11420,77	$\leq 0,01$	3,40
Interakcija	157,15	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P18. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	8,67	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	17,93	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	0,76	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P19. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,93	$\leq 0,05$	2,42
Period skladištenja	420,39	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	5,30	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,05$ – statistički značajno

Tablica P20. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,01	$\leq 0,1$	2,42
Period skladištenja	197,59	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	1,12	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P21. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,25	≤ 1	2,42
Period skladištenja	2,61	$\leq 0,1$	3,40
Interakcija	1,05	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P22. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,00	$\leq 0,1$	2,42
Period skladištenja	2,17	≤ 1	3,40
Interakcija	0,82	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P23. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,75	$\leq 0,05$	2,42
Period skladištenja	51,30	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	3,75	$\leq 0,01$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 0,05$ – statistički značajno

Tablica P24. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	0,90	≤ 1	2,42
Period skladištenja	8,95	$\leq 0,01$	3,40
Interakcija	0,58	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,01$ – visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P25. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,39	≤ 1	2,42
Period skladištenja	23,39	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	2,66	$\leq 0,05$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,05$ – statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P26. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	10,43	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	337,69	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	17,39	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P27. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,86	≤ 1	2,42
Period skladištenja	25,09	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	5,66	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P28. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	2,00	$\leq 0,1$	2,42
Period skladištenja	31,20	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	1,76	≤ 1	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P29. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje (0 mjeseci)

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	71,05	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	781,94	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	56,09	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P30. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja nakon 12 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	15,83	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	1278,89	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	233,09	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P31. Statistička značajnost sorte i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja nakon 16 mjeseci skladištenja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1595,99	$\leq 0,001$	2,31
Sorta	22583,20	$\leq 0,001$	2,90
Interakcija	1146,05	$\leq 0,001$	1,90

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P32. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	159,63	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	124,01	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	68,69	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P33. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja sorte istarska bjelica

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	P-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	160,39	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	293,46	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	29,29	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P34. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	100,12	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	52,54	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	18,75	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P35. Statistička značajnost perioda skladištenja i postupka proizvodnje na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1169,64	$\leq 0,001$	2,42
Period skladištenja	33,61	$\leq 0,001$	3,40
Interakcija	19,87	$\leq 0,001$	2,13

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P36. Statistička značajnost postupka proizvodnje i perioda skladištenja na vrijednosti peroksidnog broja djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica proizvedenog ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	51,00	$\leq 0,001$	2,77
Period skladištenja	5453,38	$\leq 0,001$	3,55
Interakcija	47,22	$\leq 0,001$	2,41

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

Tablica P37. Statistička značajnost postupka proizvodnje i perioda skladištenja na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 232 nm (K_{232}) djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica proizvedenog ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	4,02	$\leq 0,1$	2,77
Period skladištenja	138,09	$\leq 0,001$	3,55
Interakcija	0,39	≤ 1	2,41

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P38. Statistička značajnost postupka proizvodnje i perioda skladištenja na vrijednost specifične ekstinkcije pri valnoj duljini od 268 nm (K_{268}) djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica proizvedenog ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	1,00	≤ 1	2,77
Period skladištenja	13,43	$\leq 0,001$	3,55
Interakcija	1,22	≤ 1	2,41

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.
 $p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P39. Statistička značajnost postupka proizvodnje i perioda skladištenja na ΔK vrijednost djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica proizvedenog ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	3,11	$\leq 0,1$	2,77
Period skladištenja	83,76	$\leq 0,001$	3,55
Interakcija	1,77	≤ 1	2,41

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno; $p \leq 0,1$ – nije statistički značajno; $p \leq 1$ – nije statistički značajno

Tablica P40. Statistička značajnost postupka proizvodnje i perioda skladištenja na antioksidacijski kapacitet djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica proizvedenog ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom

Izvor varijabilnosti	F-vrijednost	p-vrijednost	F-kritična vrijednost
Postupak proizvodnje	396,84	$\leq 0,001$	2,77
Period skladištenja	88,46	$\leq 0,001$	3,55
Interakcija	26,89	$\leq 0,001$	2,41

Kako bi utjecaj bio statistički značajan moraju biti ispunjeni uvjeti $F > F_{\text{kritično}}$ te $p \leq 0,05$.

$p \leq 0,001$ – vrlo visoko statistički značajno

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis