

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak, 2025.

Marko Belavić

**UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG
POLJA NA FORMIRANJE HLAPLJIVIH
SPOJEVA HRVATSKIH DJEVIČANSKIH
MASLINOVIH ULJA**

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



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

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić, na izuzetnoj susretljivosti, strpljivosti i iznimnoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada te na svakom savjetu i prenesenom znanju tijekom studiranja.

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Dubravki Škevin za nesebičnu predanost, trud i neizmjernu podršku koju mi je uvijek spremno pružala.

Hvala Katarini Filipan, mag. ing. techn. aliment. i Melisi Trputec, tehničkoj suradnici, na svakoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji na beskrajnoj strpljivosti, bezuvjetnoj ljubavi, vjeri u mene i mudrim savjetima kojima su olakšali i obogatili moje obrazovanje.

Svim mojim prijateljima, kolegicama i kolegama hvala za sve zajedničke trenutke koje ću uvijek nositi u srcu kao najljepšu uspomenu na studentske dane.

Povrh svega, hvala svetom Josipu i svetom Antunu koji su me svojim zagovorima neprestano pratili tijekom studiranja, a najveća hvala Presvetom Srcu Isusovu na obilju udijeljenih milosti.

(Fil 4,13)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA FORMIRANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA HRVATSKIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

Marko Belavić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058217092

Sažetak:

Hlapljivi spojevi prisutni u djevičanskom maslinovom ulju (DMU) od iznimne su važnosti u definiranju senzorskih svojstava i kvalitete DMU. Njihovo nastajanje pod izravnim je utjecajem enzima među kojima se ističu enzimi lipoksigenaznog (LOX) puta koji su odgovorni za pozitivnu percepciju arome DMU. Dosad provedena istraživanja dokazuju kako primjena inovativnih tehnologija može utjecati na iskorištenje proizvodnje i kvalitetu DMU. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj pulsirajućeg električnog polja (PEP) na formiranje hlapljivih komponenti DMU hrvatskih autohtonih sorti maslina: istarske bjelice, rosulje, oblice i levantinke. Rezultati istraživanja pokazali su kako PEP utječe na stvaranje spojeva LOX puta, odnosno na aktivnost enzima lipoksigenaze. Najveći porast udjela ovih spojeva postignut je primjenom najblažih vrijednosti procesnih parametara. Nadalje, PEP uvjetuje i promjenu udjela spojeva koji nastaju oksidacijskim procesima i djelovanjem mikroorganizama. Utjecaj PEP ovisi o uvjetima tretmana te o sorti masline, zbog čega je za svaku sortu potrebno odrediti optimalne vrijednosti procesnih parametara.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje, hlapljive komponente, pulsirajuće električno polje, hrvatske autohtone sorte

Rad sadrži: 41 stranica, 5 slika, 7 tablica, 80 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Pomoć pri izradi: Katarina Filipan, mag. ing. aliment. techn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: ožujak 2025

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

INFLUENCE OF THE PULSED ELECTRIC FIELD ON THE FORMATION OF VOLATILE COMPONENTS IN CROATIAN VIRGIN OLIVE OILS

Marko Belavić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058217092

Abstract:

The volatile compounds present in virgin olive oil (VOO) play a crucial role in determining its sensory properties and overall quality. Their formation is directly influenced by enzymes, especially enzymes of the lipoxygenase pathway (LOX), which contribute significantly to the positive perception of the aroma of VOO. Previous research has shown that the application of innovative technologies can increase production efficiency and improve the quality of VOO. The aim of this study was to evaluate the effects of pulsed electric field (PEF) on the formation of volatiles in Croatian autochthonous olive varieties: Istarska bjelica, Rosulja, Oblica and Levantinka. The results show that PEF affects the formation of compounds of the LOX pathway. The highest increase of these compounds was observed when the mildest process parameters were applied. In addition, PEF leads to changes in the proportions of compounds resulting from oxidative processes and microbial activity. The effect of PEF depends on the treatment conditions and the olive variety, which emphasizes the need to determine the optimal process parameter values for each individual variety.

Keywords: virgin olive oil, volatile components, pulsed electric field, Croatian autochthonous olive varieties

Thesis contains: 41 pages, 5 figures, 7 tables, 80 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Klara, Kraljić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Katarina, Filipan, mag. ing. aliment. techn.

Reviewers:

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

Thesis defended: March 2025.

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA | 2 |
| 2.2. LIPOKSIGENAZNI PUT..... | 3 |
| 2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV HLAPLJIVIH KOMPONENTI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA | 5 |
| 2.3.1. Sorta i zemljopisno podrijetlo | 6 |
| 2.3.2. Indeks zrelosti..... | 6 |
| 2.3.3. Proces prerade maslina | 7 |
| 2.3.4. Vrijeme skladištenja ulja..... | 7 |
| 2.4. UTJECAJ HLAPLJIVIH KOMPONENTI NA SENZORSKA SVOJSTVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA | 8 |
| 2.5. TEHNOLOGIJA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA | 11 |
| 2.5.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 14 |
| 3.1. MATERIJALI | 14 |
| 3.1.1. Kemikalije | 14 |
| 3.1.2. Uzorci djevičanskog maslinovog ulja | 14 |
| 3.2. METODE | 15 |
| 3.2.1. Određivanje hlapljivih komponenti u DMU | 15 |
| 3.3. OBRADA PODATAKA | 16 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 4.1. UTJECAJ SORTE MASLINE NA HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA | 17 |
| 4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 32 |
| 6. LITERATURA..... | 33 |

1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) vrlo je stara biljna vrsta o čijoj važnosti kroz ljudsku povijest nije potrebno puno govoriti. Dovoljno je spomenuti kako su prva stabla masline kultivirana i posađena prije 5 do 6 tisuća godina, a njen spomen pronalazimo u brojnim povijesnim tekstovima filozofa, botaničara, agronoma, povjesničara i liječnika (Kantoci, 2006). Spominje se i u Bibliji, primjerice u priči o Noinoj arci gdje predstavlja Božji znak rađanja novoga života i prvo drvo izniklo iz poplave (Miljković i sur., 2011). Dakako, naširoko su poznati i pozitivni učinci djevičanskog maslinovog ulja (DMU) na zdravlje ljudi. Od sredine dvadesetog stoljeća bilježi se trend rasta potrošnje DMU-a u svakodnevnoj prehrani u europskim zemljama izvan mediteranskog bazena, kao i u zemljama Sjeverne i Južne Amerike i u Australiji (Žanetić i Gugić, 2006). Smanjenje troškova proizvodnje DMU-a važan je izazov s kojim se susreću proizvođači diljem svijeta. U novije vrijeme provedena su istraživanja kojima se istraživao učinak primjene novih tehnologija (poput pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka) na iskorištenje proizvodnje i kvalitetu ulja. Što se tiče primjene pulsirajućeg električnog polja, dokazano je kako korištenje ove tehnologije, prije faze miješenja, može povećati ekstraktibilnost ulja te skratiti vrijeme i smanjiti temperaturu miješenja, što posljedično dovodi i do smanjenja ukupnih troškova proizvodnje (Martinez-Beamonte i sur., 2022).

No osim na iskorištenje procesa, primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji DMU može utjecati na njegov kemijski sastav (Bejaoui i sur. 2016, Abenoza i sur., 2013). U novije vrijeme brojna istraživanja bavila su se ispitivanjem kemijskog sastava hlapljive frakcije DMU, odnosno detekcijom spojeva koji doprinose aromi ulja. Ovim istraživanjima je, između ostalog, dokazano kako hlapljivi spojevi u ulju uglavnom nastaju na tri načina: u lipoksigenaznom putu, tijekom oksidacije ulja te mikrobiološkom aktivnošću (Cecchi i sur., 2021). Primjena pulsirajućeg električnog polja može utjecati na svaki od spomenutih puteva sinteze hlapljivih spojeva; od utjecaja na aktivnost enzima lipoksigenaze (Tamborrino i sur., 2019) preko inaktivacije mikroorganizama (Toepfl i sur., 2014) sve do stvaranja slobodnih radikala (Zhao i sur., 2011). Nastali učinak ovisi o primijenjenim uvjetima tretmana kao i o karakteristikama sorti maslina iz kojih se ulje proizvodi.

Stoga je cilj ovog rada bio istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja korištenog kao predtretman miješenju na sastav i koncentraciju hlapljivih komponenti DMU autohtonih hrvatskih sorti maslina – istarske bjelice, rosulje, levantinke i oblice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Važna zajednička svojstva tvari koje izazivaju mirisni doživljaj su: mala molekulska masa (<300 Da), hlapljivost, dobra topljivost u vodi, topljivost u mastima te određena kemijska svojstva poput specifične prostorne građe. Ova svojstva su važna kako bi te tvari mogle doći do receptora u našem organizmu i vezati se na njih. Mirisne tvari mogu izazivati različite mirisne doživljaje, ugodne i neugodne, ovisno o njihovoj koncentraciji i o činjenici jesu li prisutne samostalno ili u kombinaciji s drugim mirisnim tvarima. Također valja napomenuti kako sama hlapljivost nije dovoljan preduvjet za izazivanje doživljaja mirisa, kao što ni visoka koncentracija ne garantira visok utjecaj određene tvari na aromu ulja. Hoće li neka tvar izazvati mirisni doživljaj može se odrediti pomoću omjera masenog udjela tvari u uzorku i masenog udjela njenog praga detekcije. Taj omjer naziva se vrijednost mirisne aktivnosti u ulju (engl. odour activity value, OAV) i ukoliko je njegova vrijednost veća od 1 tvar će izazvati mirisni doživljaj (Koprivnjak, 2006).

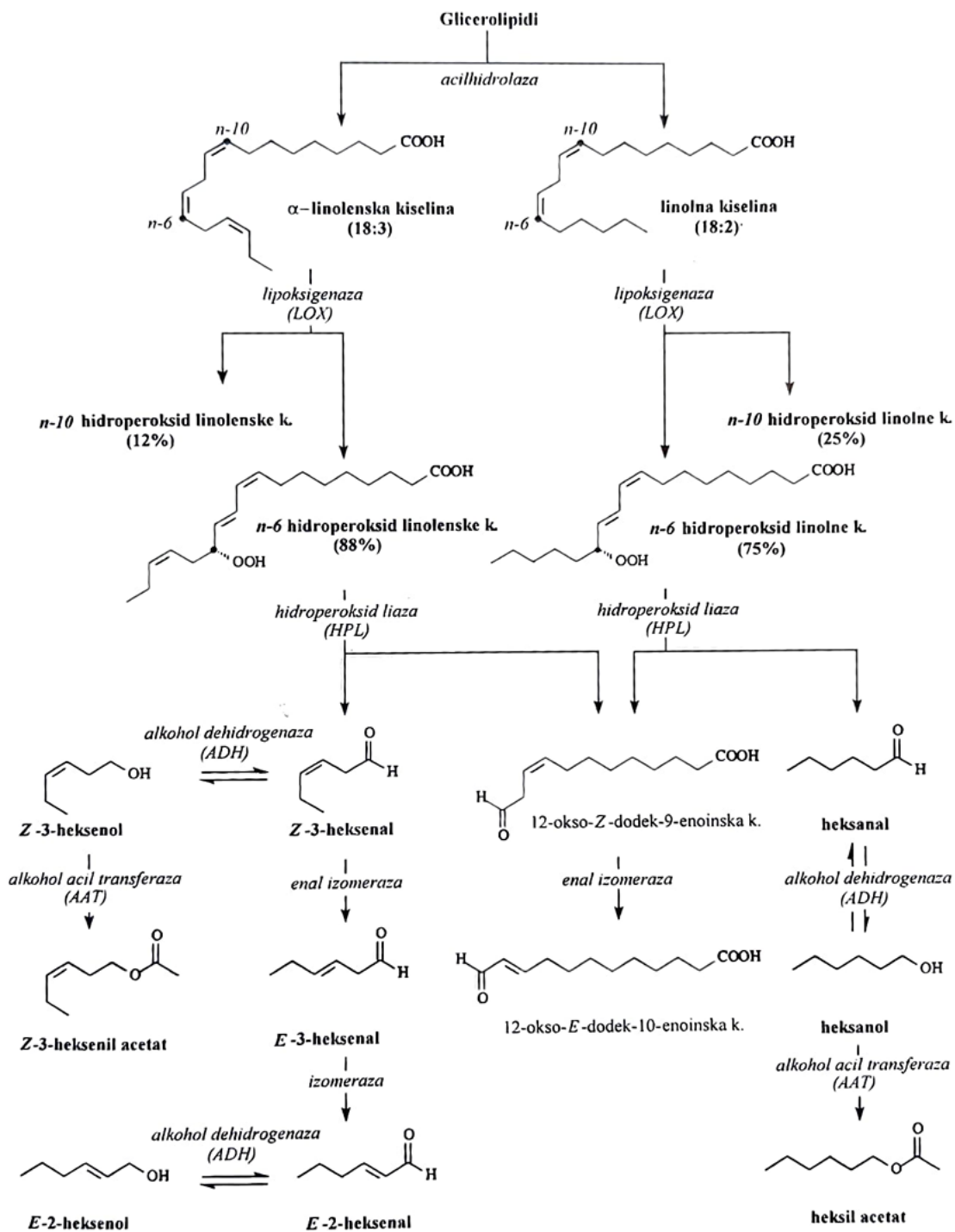
Hlapljivi spojevi djevičanskog maslinovog ulja (DMU) pripadaju različitim vrstama kemijskih spojeva koji uglavnom nastaju na tri načina: u reakcijama lipoksigenaznog (LOX) puta, tijekom auto-, odnosno fotooksidacije masnih kiselina ili djelovanjem mikroorganizama tijekom proizvodnje i skladištenja. Aldehidi su najzastupljeniji hlapljivi organski spojevi u DMU. C5 i C6 nezasićeni aldehidi (poput (Z)-3-heksenala i (E)-2-heksenala) uglavnom potječu iz LOX puta i povezani su s pozitivnim senzorskim svojstvima, dok su kratkolančani razgranati aldehidi, nastali neadekvatnim rukovanjem sirovinom, odgovorni za negativne senzorske značajke. Uz njih, za negativna senzorska svojstva odgovorni su i C7 — C11 aldehidi te pentanali i heksanali koji potječu iz oksidacijskih procesa. Što se tiče alkohola, nerazgranati C5 i C6 alkoholi također nastaju tijekom reakcija lipoksigenaznog puta, dok su za prisutnost nekih alkohola (poput 1-butanola i 3-heksen-1-ola) odgovorne bakterije i plijesni. U lipoksigenaznom putu nastaju i esteri (npr. heksil acetat i (Z)-3-heksenil acetat) koji su odgovorni za voćne note. Međutim dio estera nastaje i mikrobiološkom aktivnošću, poput butanoata koji nastaje maslačnom fermentacijom u nefiltriranim uljima i koji se povezuje s negativnom senzorskom karakteristikom koja podsjeća na talog. Među hlapljivim tvarima u ulju nalaze se i masne kiseline čiji se nastanak povezuje s mikrobiološkom aktivnošću i oksidativnim promjenama, dok oksidacijom masnih kiselina mogu nastati ketoni. Ketoni nastaju i u reakcijama lipoksigenaznog puta, primjer čega je nastanak 1-penten-3-ona koji doprinosi pozitivnim svojstvima ekstra DMU-a. U LOX putu nastaje i niz dvostruko nezasićenih C10 ugljikovodika. Ovi spojevi, poznati i kao penten dimeri, slabo doprinose aromi DMU-a. No u pojedinim uzorcima otkriveni su u prilično visokim udjelima te se pretpostavlja kako bi njihov sinergijski učinak mogao utjecati na aromu ulja. I druge vrste

kemijskih spojeva moguće je pronaći u hlapljivoj frakciji DMU-a, poput laktona, terpena ali i nekoliko sumpornih spojeva koji se, unatoč svojim niskim koncentracijama, smatraju aromatično aktivnim spojevima zbog niske vrijednosti praga mirisa (engl. odor threshold value, OTV) (Cecchi i sur., 2021).

2.2. LIPOKSIKENAZNI PUT

LOX put predstavlja niz biokemijskih reakcija do kojih dolazi tijekom prerade plodova u ulje kada se oštećivanjem tkiva masline oslobađaju enzimi odgovorni za njihovo provođenje. Najprije dolazi do oslobađanja kiselina iz glicerolipida što je katalizirano enzimom acilhidrolazom (Kalua i sur, 2007; Koprivnjak, 2006). Najčešće su to linolna i linolenska masna kiselina, na koje potom, u aerobnim uvjetima, djeluje enzim lipoksigenaza. Lipoksigenaza ugrađuje -OOH skupinu na n-6 i n-10 položaje. Lipoksigenaza iz maslina je dvostruko aktivnija prema linolenskoj kiselini i preferira n-6 položaj u odnosu na n-10. Oksidacijom masne kiseline dolazi do promjene konfiguracije iz izoliranog u konjugirani položaj. Uz ovo glavno djelovanje, lipoksigenaza može cijepati nastale hidroperoksida pri čemu nastaju alkoksi radikali iz kojih, u daljnjim reakcijama, nastaju hlapljive tvari s 5 C atoma. Tako nastaju primjerice 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, (Z)-2-penten-1-ol, (E)-2-penten-1-ol i (E)-2-pentenal, od kojih samo 1-penten-3-on samostalno djeluje na aromu DMU-a dok ostali spojevi doprinose aromi sinergističkim djelovanjem (Koprivnjak 2006).

U idućem koraku LOX puta dolazi do nastajanja hlapljivih aldehida iz hidroperoksida nastalih djelovanjem lipoksigenaze. Ovaj korak cijepanja nastalog hidroperoksida katalizira enzim hidroperoksid liaza (HPL) (Salas i sur., 2000). Cijepanje se odvija između ugljikovog atoma s vezanom -OOH skupinom i susjedne konjugirane dvostruke veze. Ovaj enzim također pokazuje veći afinitet prema linolenskoj kiselini i n-6 položaju. Na taj način iz hidroperoksida linolne kiseline nastaje heksanal, a iz hidroperoksida linolenske kiseline Z-3-heksenal koji potom izomerizira u (E)-2-heksenal (Koprivnjak, 2006). Oslobođeni aldehidi se dalje reduciraju do alkohola pomoću enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) koji potom, u posljednjem koraku lipoksigenaznog puta, prelaze u estere djelovanjem alkohol acil transferaze (AAT) (Kalua i sur., 2007). Na slici 1 prikazane su biokemijske reakcije lipoksigenaznog puta.



Slika 1. Biokemijske reakcije lipoksigenaznog puta (Koprivnjak, 2006)

S obzirom na to da je LOX put odgovoran za nastajanje hlapljivih tvari u DMU-u, poznavanje aktivnosti enzima koji u njemu sudjeluju od velike je važnosti za poboljšanje senzorskih karakteristika ulja (Kotti i sur., 2010; Salas, 2004). Na aktivnost spomenutih enzima utječe više čimbenika, poput temperature (Perez i sur., 2003), pH vrijednosti (Soldo, 2016) te sorte i indeksa zrelosti maslina (Nieves Criado i sur., 2006). Uz samu aktivnost enzima, moguće je djelovati i na njegovu koncentraciju. Naime, koncentracija enzima određena je genetičkim kodom te stupnjem zrelosti plodova zbog čega je moguće na nju utjecati odabirom sorte i provođenjem određenih agrotehničkih mjera (Koprivnjak, 2006).

Aktivnost enzima lipoksigenaze raste s porastom stupnja zrelosti ploda, a najveću vrijednost pokazuje u fazi tamnjenja ploda. U završnoj fazi zrenja (kod prezrelih plodova) aktivnost LOX se smanjuje (Panzanaro i sur., 2010; Olias i sur., 1993). S obzirom na pH vrijednost, ovaj enzim aktivan je u rasponu vrijednosti od 4,5 - 8,5, a većina autora ističe kako je najaktivniji pri pH 6 (Ridolfi i sur., 2002; Olias i sur., 1993).

HPL pokazuje visoku aktivnost tijekom ranog stupnja razvoja maslina, zatim blago pada tijekom daljnjeg razvoja ploda te ponovno raste tijekom zriobe. Poput LOX, ovaj enzim pokazuje najveću aktivnost pri pH 6 (Salas i Sanchez, 1999), a što se temperature tiče maksimalnu aktivnost pokazuje pri 15 °C dok se povećanjem temperature iznad 35 °C njegova aktivnost smanjuje (Perez i sur., 2003).

ADH je najaktivnija u zelenim plodovima maslina u razdoblju kada se u njima akumulira više od polovice ulja, a njena aktivnost pada tijekom zriobe kada se boja ploda mijenja u ljubičastu (Salas i Sanches, 1998). Optimalna vrijednost pH za djelovanje ovog enzima je 6,8 no aktivan je u rasponu pH od 5,0 do 8,5 (Olias i sur., 1993).

ATT djeluje u neutralnom i blago lužnatom pH području (pH 7,5) (Salas, 2004), a optimalna vrijednost temperature za njeno djelovanje je 35 °C (Olias i sur., 1993). Poželjno je da je aktivnost ATT što veća jer esteri koji nastaju njenim djelovanjem daju poželjne slatke i voćne mirise (Soldo 2016).

2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV HLAPLJIVIH KOMPONENTI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Stvaranje hlapljivih spojeva, osim aktivnošću enzima lipoksigenaznog puta, uvjetovano je i sortom masline, njezinim zemljopisnim podrijetlom, indeksom zrelosti, utjecajima tla i klime odnosno pedoklimatskim uvjetima, načinom berbe i procesom prerade maslina u ulje, skladišnim uvjetima kao i mogućim napadom maslinove muhe (Cecchi i sur., 2021). Neki od navedenih čimbenika bit će opisani u idućim poglavljima.

2.3.1. Sorta i zemljopisno podrijetlo

Sorta maslina, zbog svojih genetskih značajki koje utječu na njezino enzimsko naslijeđe, ima određen utjecaj na sastav hlapljivih spojeva. Uzorak ulja pojedine sorte smatra se autentičnim ukoliko najviše zajedničkih karakteristika ima s drugim uzorcima iste sorte, odnosno samo nekoliko zajedničkih svojstava s uzorcima drugih sorti. Međutim, utjecaj sorte i zemljopisnog podrijetla teško je utvrditi s obzirom na to da diljem svijeta postoji mnogo sorti, a neke od njih su poznate pod različitim nazivima. Uz to, studije kojima bi se utvrdio utjecaj spomenutih čimbenika na sastav hlapljivih komponenti trebaju uključivati vrlo velik broj uzoraka, imajući na umu interferirajuće čimbenike kao što su godina uzgoja i stupanj zrelosti maslina (Cecchi i sur., 2021).

Kao primjer utjecaja sorte masline na sastav hlapljivih spojeva u ulju moguće je istaknuti rezultat istraživanja kojeg je provela Soldo (2016) na autohtonim dalmatinskim sortama: oblici, levantinki i lastovki. Ovo istraživanje pokazalo je kako lastovka ima niže vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima od ostalih sorti, međutim tijekom perioda zrenja bilježi se linearan rast aktivnosti ovog enzima što kod drugih sorti nije bio slučaj. Nadalje, iz navedenih podataka zaključeno je kako je vrijednost specifične aktivnosti LOX enzima karakteristično svojstvo sorte.

Isto istraživanje pokazalo je još jednu zanimljivost, odnosno značajan utjecaj roka berbe i godine uzgoja na maseni udjel hlapljivih komponenti unutar pojedine sorte. Potvrda ove tvrdnje vidljiva je u masenom udjelu (E)-2-heksenala koji se značajno mijenjao u svim proučavanim sortama ovisno o godini istraživanja i roku berbe.

2.3.2. Indeks zrelosti

Najčešća metoda koju maslinari koriste za određivanje početka berbe je određivanje indeksa zrelosti. Međutim, ova metoda temelji se samo na boji kožice i mesa ploda, što nije uvijek u korelaciji s kemijskim sastavom ploda. Također, određivanje indeksa zrelosti je ponekad pod utjecajem subjektivnosti i razlika u sorti.

Udjeli hlapljivih spojeva DMU-a mijenjaju se u ovisnosti o stupnju zrelosti maslina. Primjerice, maseni udjel (E)-2-heksenala proporcionalan je povećanju indeksa zrelosti ploda sve dok masline ne postanu potpuno obojane nakon čega dolazi do njegovog smanjenja uslijed djelovanja ADH. Sukladno smanjenju udjela spomenutog aldehida dolazi do povećanja masenih udjela alkohola poput 1-heksanola i (E)-2-heksen-1-ola. S druge strane, maseni udjeli 1-penten-3-ola i (Z)-2-penten-1-ola se smanjuju zrenjem maslina (Tura i sur., 2013). U prezrelim maslinama dolazi do degradacije staničnog tkiva zbog čega su plodovi izloženiji napadima mikroorganizama i podložniji autooksidaciji. U takvim uvjetima mogu nastati hlapljivi

spojevi koji će loše utjecati na senzorske karakteristike ulja.

Kako bi se bolje razumio učinak stupnja zrelosti maslina na sastav hlapljivih komponenti potrebno je obratiti pozornost i na parametre koji utječu na zrenje plodova, odnosno potrebno je uzeti u obzir sortu i geografsko podrijetlo masline te provesti višegodišnje studije (Cecchi i sur., 2021).

2.3.3. Proces prerade maslina

Uvjeti procesa prerade maslina utječu na sastav hlapljivih tvari djelujući najčešće na aktivnost enzima. Mljevenjem maslina dolazi do aktivacije LOX puta, međutim pri intenzivnom mljevenju dolazi do povećanja temperature i smanjenja aktivnosti HPL što rezultira smanjenjem udjela hlapljivih spojeva LOX puta. Na sastav hlapljivih komponenti utječe i veličina sita mlina čekićara dok sama brzina rotora nema utjecaja.

Povećanje temperature tijesta tijekom procesa miješenja loše utječe na aromatski profil ulja i uzrokuje povećanje koncentracija razgranatih kratkolančanih alkohola i aldehida. Dokazano je kako korištenje inovativnih tehnologija (ultrazvuk i mikrovalovi) tijekom miješenja nema značajan utjecaj na maseni udjel hlapljivih komponenti (Cecchi i sur., 2019). Pretpostavka je da učinak vremena i temperature miješenja na sastav hlapljivih komponenti iz LOX puta ovisi o sorti masline (Peres i sur., 2017).

Što se tiče izdvajanja ulja, zabilježeno je kako korištenje dvofaznog umjesto trofaznog dekantera rezultira uljem s većom koncentracijom hlapljivih komponenti LOX puta (Kalogeropoulos i sur., 2014). Proces filtracije pozitivno utječe na smanjenje razvoja neugodnih okusa koji nastaju zbog prisutnosti vode, šećera, enzima i drugih supstrata koji se nalaze u talogu.

Upotrebom tehnologije uklanjanja koštica postiže se viši maseni udjel C6 aldehida i ukupnih hlapljivih organskih spojeva te niži maseni udjel C6 alkohola nego u uljima dobivenim od cijelih maslina. Pretpostavlja se da je uzrok tome uklanjanje ADH prisutnog u sjemenkama, a nedostatak ove metode je blago smanjenje iskorištenja, odnosno količine dobivenog ulja (Restuccia i sur., 2018).

2.3.4. Vrijeme skladištenja ulja

Udio pojedinih hlapljivih spojeva mijenja se ovisno o vremenu skladištenja ulja. Pitarević (2023) je proučavala utjecaj vremena skladištenja na kvalitetu i aromatski profil DMU-a proizvedenog od sorti oblica i leccino te u višesortnom ulju. Rezultati istraživanja pokazali su

kako se skladištenjem ukupni udjel aldehida u uljima smanjuje. U svim uzorcima smanjio se udio (E)-2-heksenala i (Z)-3-heksen-1-ola, dok se udio heksanala i nonanala povećao. U uzorcima ulja oblice i višesortnog ulja povećao se i udio 3-metilbutanala. 4-oksoheks-2-enal zabilježen je samo u uzorku ulja oblice pri čemu se njegov udio skladištenjem smanjio. Za razliku od udjela aldehida, udio ukupnih alkohola rastao je skladištenjem u svim uzorcima. Zanimljivo je primijetiti kako se udio ketona 1-penten-3-ona smanjivao u monosortnim uljima a u višesortnom ulju povećavao, dok je oprečan slučaj zabilježen praćenjem udjela 3-pentanona. Praćenje alifatskih ugljikovodika pokazalo je kako se njihov udio smanjuje u ulju oblice i u višesortnom ulju, a u ulju sorte Leccino raste.

2.4. UTJECAJ HLAPLJIVIH KOMPONENTI NA SENZORSKA SVOJSTVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Općenito je prihvaćeno mišljenje kako su enzimi koji sudjeluju u LOX putu odgovorni za pozitivnu percepciju arome DMU-a (Angerosa, 2002). Ravnolančani C6 aldehidi i alkoholi te njihovi esteri, kvantitativno i kvalitativno, najvažniji su spojevi arome DMU-a (Morales i sur., 1999; Morales i sur., 1994). Ovi spojevi su, uz C5 spojeve koji također nastaju tijekom LOX puta (Luaces i sur., 2007), uglavnom odgovorni za zelene aromatske karakteristike ulja (Angerosa, 2002).

Tako primjerice 2-pentenal daje zelenu, ugodnu aromu, 3-heksenal aromu koja se opisuje kao aroma zelenog lišća dok se doprinos (E)-2-penten-1-ol-a aromi također opisuje atributom „zeleno“, ali i „maslačno“, „gljivasto“ i „oporo“ (Cecchi i sur., 2021, Kiritsakis, 1998). Osim zelenih nota, spojevi koji nastaju LOX putem zaslužni su i za druge aromatske karakteristike ulja. Kao primjer mogu se izdvojiti 1-penten-3-on koji je zaslužan za slatku, jagodastu aromu, (Z)-2-penten-1-ol kojemu se pripisuje aroma banane te 1-heksanol uz kojeg se vežu voćne, aromatične i nježne karakteristike (Kiritsakis, 1998). Pregled mirisnih svojstava za koja su zaslužni hlapljivi spojevi u maslinovom ulju prikazan je u tablici 1.

Na aromatski profil DMU-a djeluju i spojevi čiji nastanak nije vezan uz LOX put. Oksidacijom nastaju spojevi koji su odgovorni za nepoželjne senzorske karakteristike koje zajedno daju percepciju užglosti ulja (Angerosa, 2002). Proces oksidacije započinje već tijekom proizvodnje DMU ali postaje značajnijim tek tijekom skladištenja ulja. Na početku procesa oksidacije ulja lipidi, pomoću slobodnih radikala, oksidiraju u hidroperoksidi. Nastali hidroperoksidi su bez okusa i mirisa a njihovim homolitičkim cijepanjem nastaju različiti spojevi poput aldehida, ketona, alkohola, estera i laktone koji su odgovorni za neugodnu aromu ulja (Angerosa, 2002; Frankel, 1985; Frankel, 1983).

Tablica 1. Mirisna svojstva hlapljivih spojeva djevičanskog maslinovog ulja

| Spoj | Mirisna svojstva |
|-------------------|---|
| 3-metilbutanal | Slatko, voćno (Kiritsakis, 1998) |
| 2-metilbutanal | Sladno (Kiritsakis, 1998) |
| 1-penten-3-ol | Zemljano (Kiritsakis, 1998) |
| 1-penten-3-on | Slatko, jagoda (Kiritsakis, 1998) |
| 3-pentanon | Slatko (Kiritsakis, 1998) |
| pentanal | Drvenasto, gorko, voštano (Kalua i sur., 2007) |
| 2-pentenal | Zeleno, ugodno (Kiritsakis, 1998) |
| (E)-2-pentenal | Jagoda, voćno, rajčica, oporo, trava, jabuka, gorko, zeleno, badem, cvjetno (Cecchi i sur., 2021) |
| 1-pentanol | Oporo (Kiritsakis, 1998) |
| (E)-2-penten-1-ol | Zeleno, maslac, oporo, gljivasto (Cecchi i sur., 2021) |
| (Z)-2-penten-1-ol | Banana (Kiritsakis, 1998) |
| 3-heksenal | Zeleno, zeleno lišće (Kiritsakis, 1998) |
| heksanal | Zeleno, jabuka (Kiritsakis, 1998) |
| 2-heksenal | Voćno, bademasto (Kiritsakis, 1998) |
| 3-heksen-1-ol | Banana (Kiritsakis, 1998) |
| (Z)-2-heksen-1-ol | Zeleno voće (Salivaras, 2017) |
| (E)-2-heksen-1-ol | Zeleno, voćno (Pitarević, 2023) |
| 1-heksanol | Voćno, aromatično, nježno (Kiritsakis, 1998) |
| 2,4-heksadienal | Pokošena trava (Šarolić i sur., 2024) |
| 3-heksenil acetat | Zelena banana, zeleno lišće (Kiritsakis, 1998) |
| heksil acetat | Slatko, voćno (Kiritsakis, 1998) |
| nonanal | Masno, citrus, zeleno (Romero i sur., 2015) |

Aldehidi i ketoni utječu na percepciju neugodnih okusa i mirisa koji se potom definiraju kao užegli, riblji, miris i okus po boji itd. Ovi spojevi mogu dodatno oksidirati pri čemu nastaju novi spojevi bez arome (Morales i Przybylski, 2013). Na proces oksidacije djeluju različiti čimbenici

poput svjetlosti, temperature te koncentracije i vrste prirodno prisutnih antioksidansa (Morales i Tsimidou, 2000; Frankel, 1985).

Za praćenje oksidacije DMU, Morales i sur. (1997) predložili su određivanje koncentracije nonanala koji se u svježem DMU-u dobre kvalitete ne nalazi ili je prisutan u tragovima. Istraživanjem su utvrdili kako za otkrivanje početka i praćenje tijeka oksidacije može poslužiti omjer heksanala i nonanala. Nonanal daje ulju senzorsko svojstvo koje se opisuje kao „masno“ (Romero i sur., 2015), a od ostalih produkata oksidacije mogu se izdvojiti 2,6-nonadienal, čija aroma podsjeća na aromu krastavca (IOOC, 1996), te (E)-2-heptenal koji se povezuje s percepcijom užglosti ulja (Solinas i sur., 1987).

Tablica 2. Podrijetlo hlapljivih spojeva djevičanskih maslinovih ulja

| Grupa spojeva | Komponenta arome DMU-a | Način nastajanja |
|--------------------|------------------------|---|
| C5 aldehidi | 3-metilbutanal | Produkt MBA* (Cecchi i sur., 2021) |
| | 2-metilbutanal | Produkt MBA (Cecchi i sur., 2021) |
| | Pentanal | Produkt oksidacije (Tanouti i sur., 2012) |
| | (E)-2-pental | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | (Z)-2-pental | Produkt LOX puta (Cecchi i sur., 2021) |
| C6 aldehidi | 2-heksenal | Produkt LOX puta (Mansouri i sur., 2017) |
| | 2,4-heksadienal | Produkt oksidacije (CSCP, 2020) |
| | 4-Oksoheks-2-enal | Produkt LOX puta (Smajić, 2023) |
| | 3-heksenal | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| C9 aldehid | Nonanal | Produkt oksidacije (Koprivnjak, 2006) |
| C5 alkoholi | 1-penten-3-ol | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | 1-pentanol | Produkt MBA (Cecchi i sur., 2021) |
| | (E)-2-penten-1-ol | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | (Z)-2-penten-1-ol | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| C6 alkoholi | E-3-heksen-1-ol | Produkt LOX puta (Mansouri i sur., 2017) |
| | Z-3-heksen-1-ol | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | 2-heksen-1-ol | Produkt LOX puta (Smajić, 2023) |
| | 1-heksanol | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| Ketoni | 1-penten-3-on | Produkt LOX puta (Cecchi i sur., 2021) |
| Esteri | 3-heksenil acetat | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | heksil acetat | Produkt LOX puta (Koprivnjak, 2006) |
| | 2-heksenil acetat | Produkt LOX puta (Cecchi i sur., 2021) |

* mikrobiološka aktivnost

Mikroorganizmi su odgovorni za stvaranje određenih hlapljivih spojeva koji negativno utječu na aromu DMU. Ti spojevi mogu nastati prije faze drobljenja maslina (ukoliko su masline bile nepravilno skladištene) ili tijekom skladištenja nefiltriranih ulja (IOC, 2018). Primjerice, fermentacijom šećera kvasci stvaraju alkohol kojeg potom bakterije octenog vrenja oksidiraju u octenu kiselinu. 2-metilbutanal i 3-metilbutanal primjer su spojeva koji se povezuju sa pljesnivom aromom a nastaju mikrobiološkom pretvorbom aminokiselina izoleucina i leucina (Angerosa i sur., 1996). U maslinama koje se čuvaju u različitim uvjetima vlažnosti i temperature dokazana je prisutnost plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus* te je zabilježeno smanjenje ukupne koncentracije hlapljivih spojeva LOX puta. Pretpostavlja se da je uzrok tome inhibicija LOX puta do koje dolazi zbog povećanja kiselosti, te konkurencija enzima plijesni i enzima prisutnih u LOX putu (Zhu i sur., 2016; Biasone i sur., 2012; Angerosa, 2002).

Ukoliko je DMU proizvedeno prema pravilima struke od zdravog i optimalno zrelog ploda masline, 60 do 80% koncentracije hlapljivih komponenti u njegovom nadprostoru činit će C6 aldehidi, C6 alkoholi i C6 esteri nastali tijekom LOX puta (Koprivnjak, 2006). U tablici 2 prikazani su spojevi koji su analizirani u ovom istraživanju kao i podrijetlo njihova nastajanja.

2.5. TEHNOLOGIJA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA

Primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEP) proučavana je u raznim područjima prehrambene tehnologije u svrhu postizanja različitih ciljeva. Tako se primjerice u mljekarskoj industriji ovom tehnologijom nastojala postići inaktivacija mikroorganizama u mlijeku, u proizvodnji krumpirića za prženje ispitivana je mogućnost primjene u fazi rezanja krumpira, a u industriji ulja i masti proučavana je primjena PEP tijekom procesa ekstrakcije ulja radi povećanja iskorištenja proizvodnje.

Ova tehnologija temelji se na primjeni električnog polja visokog intenziteta reda veličine 10-80 kV/cm u trajanju od nekoliko mikrosekundi do milisekundi. Prilikom tretiranja organskog materijala dolazi do povećanja transmembranskog potencijala stanične membrane i posljedično njenog razaranja, odnosno nastanka pora. Ova pojava nazvana je elektroporacija, a s obzirom na intenzitet jakosti polja može biti reverzibilna i ireverzibilna. Jakost 0,5-1,5 kV/cm koristi se za reverzibilnu, a od 1,0-1,5 kV/cm za ireverzibilnu permeabilizaciju, dok se jakost polja iznad 15 kV/cm koristi za mikrobnu inaktivaciju (Tamborrino i sur., 2019).

2.5.1. Primjena pulsirajućeg električnog polja u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja

Kao što je spomenuto u uvodu, korištenje PEP-a u proizvodnji DMU-a istražuje se u svrhu povećanja iskorištenja procesa proizvodnje i konačne kvalitete i nutritivne vrijednosti ulja. Stvaranjem pora u staničnoj membrani omogućava lakše izlaženje malih kapljica ulja iz stanice u okolinu, a u usporedbi s konvencionalnim načinima toplinske obrade, upotreba PEP-a uzrokuje manje povećanje temperature i uglavnom ne utječe na nutritivnu vrijednost hrane (Clodoveo i sur., 2014). Primjenom PEP-a omogućuje se kraće vrijeme miješenja maslinovog tijesta pri nižim temperaturama (Leone i sur., 2022).

Abenoza i sur. (2013) postigli su povećanje ekstrakcije ulja za 18 % kada su koristili PEP jačine 1,6-70,0 kJ/kg, 30 min pri 30 °C prije procesa miješanja. Puertolas i Martinez De Maranon (2015) tretirali su tijesto maslina PEP jačine 2 kV/cm i uočili povećanje iskorištenja procesa ekstrakcije za 13,3 % uz značajno viši maseni udjel fitosterola i tokoferola u ulju na kraju procesa u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Osim toga, sam tretman nema značajan utjecaj na hidrolitičko kvarenje ulja (udjela slobodnih masnih kiselina) ni na pokazatelje oksidacijskog kvarenja (peroksidnog broja, K_{232} i K_{270}) (Kalogianni i sur., 2019; Puertolas i Martinez De Maranon, 2015).

Leone i sur. (2022) ističu kako je primjena PEP-a tijekom proizvodnje ulja značajno povećala prijenos fenolnih spojeva u uljnu fazu, posebice 3,4-DHPEA-EDA, ukupnih hidrofilnih fenola i derivata oleuropeina. Nadalje, nije zabilježen negativan utjecaj na senzorske karakteristike ulja, što su u svom istraživanju dokazali i Abenoza i sur. (2013) senzorskom analizom.

Međutim, tretman PEP-em utječe na aktivnost enzima u maslinama, a taj utjecaj ovisi o vrsti enzima, jačini primijenjenog električnog polja, vremenu tretiranja te temperaturi koja se pri tome postiže (Huang i sur., 2012). Također, učinak PEP-a ovisi i o sorti masline iz koje se proizvodi ulje, zemljopisnom podrijetlu i uvjetima njezina uzgoja te parametrima proizvodnje ulja (Navarro i sur., 2022; Perez i sur., 2021).

Što se tiče utjecaja PEP-a na aktivnost lipoksigenaze, Kraljić i sur. (2023) proveli su istraživanje pomoću modelnih otopina pri čemu su koristili električno polje jakosti 2.67 kV/cm i 13.33 kV/cm. U oba slučaja zabilježen je blag porast aktivnosti lipoksigenaze koji je uglavnom ovisio o vremenu trajanja tretmana. Ovi podaci daju naslutiti kako primjena PEP-a prije miješenja može rezultirati većom koncentracijom poželjnih hlapljivih spojeva u ulju, međutim potrebno je uračunati i učinak PEP-a na druge enzime koji su zaslužni za senzorski profil ulja.

Martinez-Beamonte i sur. (2022) su utvrdili kako implementacija PEP sustava u pogon za industrijsku proizvodnju DMU može smanjiti troškove proizvodnje jer njegovom ugradnjom moguće je u kraćem vremenu i pri nižim temperaturama miješenja proizvesti veće količine ulja. Dias i sur. (2024) proučavali su utjecaj PEP-a u proizvodnji ulja na poluindustrijskoj razini i zaključili kako je ostvarenje viših prihoda zbog povećanja ekstraktabilnosti ulja ostvarivo,

međutim ono ovisi o kapacitetu uljare. Iz navedenog razloga malim proizvodnim linijama preporučuju najam opreme PEP-a umjesto kupovine iste. No uz prednosti koje se pripisuju tretmanu PEP-em, neka istraživanja ukazuju i na negativne strane njegove primjene u pogledu stvaranja slobodnih radikala i oksidacije masnih kiselina.

Zhao i sur. (2011) istraživali su utjecaj PEP-a na oksidaciju oleinske masne kiseline. U ovu svrhu pratili su vrijednost peroksidnog broja (PB), jednog od najčešće korištenih parametara za praćenje kvalitete ulja. PB mjeri količinu ukupnih peroksida kao primarnih produkata oksidacije, odnosno pokazuje razinu oksidacije ulja. Vrijednost peroksidnog broja povećavala se povećanjem jakosti električnog polja tijekom istog vremena skladištenja, što je ukazalo na induciranje oksidacije upotrebom PEP-a. Nadalje, u istoj je studiji, pomoću elektronske spinske rezonancije (ESR), dokazano stvaranje vodikovih radikala tijekom tretmana PEP što ukazuje na moguću povezanost stvaranja slobodnih radikala i induciranja oksidacije upotrebom PEP-a. Stvaranje vodikovih radikala zabilježeno je u istraživanju Zhang i sur. (2011) koji su PEP-em tretirali emulzije masnih kiselina. No oni su dokazali kako su nastali radikali poticali od vodikovog iona vode, a ne iz β -vodikovog atoma oleinske masne kiseline.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

U ovom istraživanju od komercijalnih kemikalija korišten je 4-metil-2-pentanol kao interni standard (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka).

3.1.2. Uzorci djevičanskog maslinovog ulja

Istraživanje se provodilo na uzorcima DMU-a proizvedenih 2022./2023. godine iz hrvatskih autohtonih sorti maslina: istarske bjelice, oblice, levantinke i rosulje. Indeks zrelosti maslina u trenutku berbe iznosio je: 0,82 (istarska bjelica), 2,11 (oblica), 2,01 (levantinka) te 2,19 (rosulja). PEP tretman provodio se pomoću uređaja HVG60/1 PEP (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) prema metodi opisanoj u završnom radu Makovac (2023). Ukratko, odmah nakon mljevenja maslina na mlinu čekićaru, tijesto je tretirano varirajući vrijeme tretmana od 18 do 102 s i jakost električnog polja od 1 do 8 kV/cm prema centralnom kompozitnom planu (parametri prikazani u tablici 3). Nakon PEP tretmana provedeno je miješenje maslinovog tijesta u trajanju od 40 minuta pri temperaturi od 27 °C. Zatim je provedeno odvajanja komine i uljnog mošta pri 5000 o/min kroz 10 min pomoću centrifuge Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Nakon toga, uljna faza je od vegetabilne vode iz uljnog mošta izdvojena centrifugiranjem 5 min pri 5000 o/min i temperaturi od 18 °C.

Tablica 3. Parametri predtretmana PEP-om (jakost električnog polja i vrijeme)

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

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje hlapljivih komponenti u DMU

U vijalu od 20 mL odvagano je 0,015 g prethodno pripremljene otopine internog standarda (0,15 %-tna otopina 4-metil-2-pentanola u rafiniranom suncokretovom ulju) i 10 g DMU-a. Dodan je magnet a vijala je zatvorena čepom sa silikonskom septom. Tako pripremljen uzorak termostatiran je na 40 °C u trajanju od 10 minuta u magnets koj miješalici s grijačem. Zatim je kroz silikonsku septu na čepu postavljeno vlakno za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME) na kojeg su se adsorbirale hlapljive komponente ulja smještene u prostoru iznad uzorka. Korišteno je divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksansko (DVB/CAR/PDMS) vlakno debljine omotača polimera 50/30 µm i duljine 2 cm (Supelco, Bellfonte, SAD). Adsorpcija je trajala 30 min pri temperaturi od 40 °C, nakon čega je odmah provedena desorpcija spojeva s vlakna u injektoru plinskog kromatografa u „splitless“ načinu rada. Desorpcija je trajala 1 min, pri temperaturi injektora od 260 °C. Korišten je Agilent Technologies 6890N Network GC System (Agilent, Santa Clara, SAD) plinski kromatograf s masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector.

Za razdvajanje spojeva korištena je HP-5 kapilarna kolona (30 m x 0,25 mm x 0.25 µm) s 5 %-tnim fenilmetilpolisiloksanom kao stacionarnom fazom (Phenomenex, Torrance, SAD). Početna temperatura pećnice kromatografa bila je 30 °C, a nakon 3 min zadržavanja pri početnoj temperaturi povišena je na 150 °C brzinom od 5 °C/min. Zatim je brzinom od 20 °C/min povišena do 250 °C i pri toj temperaturi zadržana je 5 minuta. Ukupno trajanje analize iznosilo je 37 minuta, a kao plin nosioc korišten je helij s brzinom protoka od 1,5 mL/min.

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom masenih spektara detektiranih spojeva sa spektrima masa dostupnima u NIST bazi podataka (engl. National Institute of Standards and Technology). Maseni udjel pojedinog spoja izračunat je pomoću vrijednosti površine pika na kromatogramu, podatka o masi uzorka te podatka o masi i masenom udjelu internog standarda prema sljedećoj formuli:

$$\gamma(x) = \frac{A(x) * m(is) * \gamma(is) * 1000}{A(is) * m(uz)}$$

gdje je:

$\gamma(x)$ – maseni udjel spoja (mg/kg)

$A(x)$ – površina pika spoja

$m(is)$ – masa internog standarda (g)

γ (is) – maseni udjel internog standarda (mg/g)

A (is) – površina pika internog standarda

m (uz) – masa uzorka (g)

1000 – faktor korekcije za izračun u mg/kg

3.3. OBRADA PODATAKA

Statistička analiza provedena je kako bi se istražio utjecaj sorte i PEP-a na sastav hlapljivih komponenti djevičanskih maslinovih ulja. Za dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD) primjenom centralnog kompozitnog plana. Kao nezavisne varijable varirani su jakost električnog polja i vrijeme. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz najmanje tri analitička određivanja za svaku točku iz eksperimentalnog plana. Rezultati modeliranja prikazani su zasebno za svaku sortu putem dijagrama koji prikazuju utjecaj dvaju ispitivanih nezavisnih faktora. Za ocjenu značajnosti modela i utjecaja pojedinih faktora provedena je analiza varijance (ANOVA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sastav hlapljivih komponenti važan je čimbenik kvalitete i senzorskih svojstava DMU-a. Primjenom inovativnih tehnologija tijekom proizvodnje DMU nastoji se povećati iskorištenje proizvodnog procesa, odnosno povećati količina proizvedenog ulja ali i utjecati na konačnu kvalitetu DMU. Jedna od spomenutih inovativnih tehnologija koja se istražuje u proizvodnji DMU je i pulsirajuće električno polje (PEP) čija primjena uzrokuje stvaranje pora u staničnoj membrani što olakšava izlaženje ulja iz stanice. Osim poboljšanja ekstrakcije ulja, Parniakov i sur. (2024) zaključuju kako upotreba PEP-a dovodi i do povećanja ekstrakcije spojeva koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, kao što su tokoferoli i fenoli. Povećanje masenog udjela fenolnih spojeva upotrebom PEP-a tijekom proizvodnje DMU-a primijetili su i Veneziani i sur. (2019).

Osim djelovanja na staničnu membranu, PEP utječe i na aktivnost različitih enzima koji se nalaze u maslini kao i na samu molekulsku strukturu pojedinih spojeva. Uz navedena djelovanja, primjena PEP-a utječe i na stvaranje slobodnih radikala te oksidaciju masnih kiselina što je također potrebno uzeti u obzir prilikom istraživanja utjecaja ove tehnologije na kvalitetu proizvedenog DMU-a.

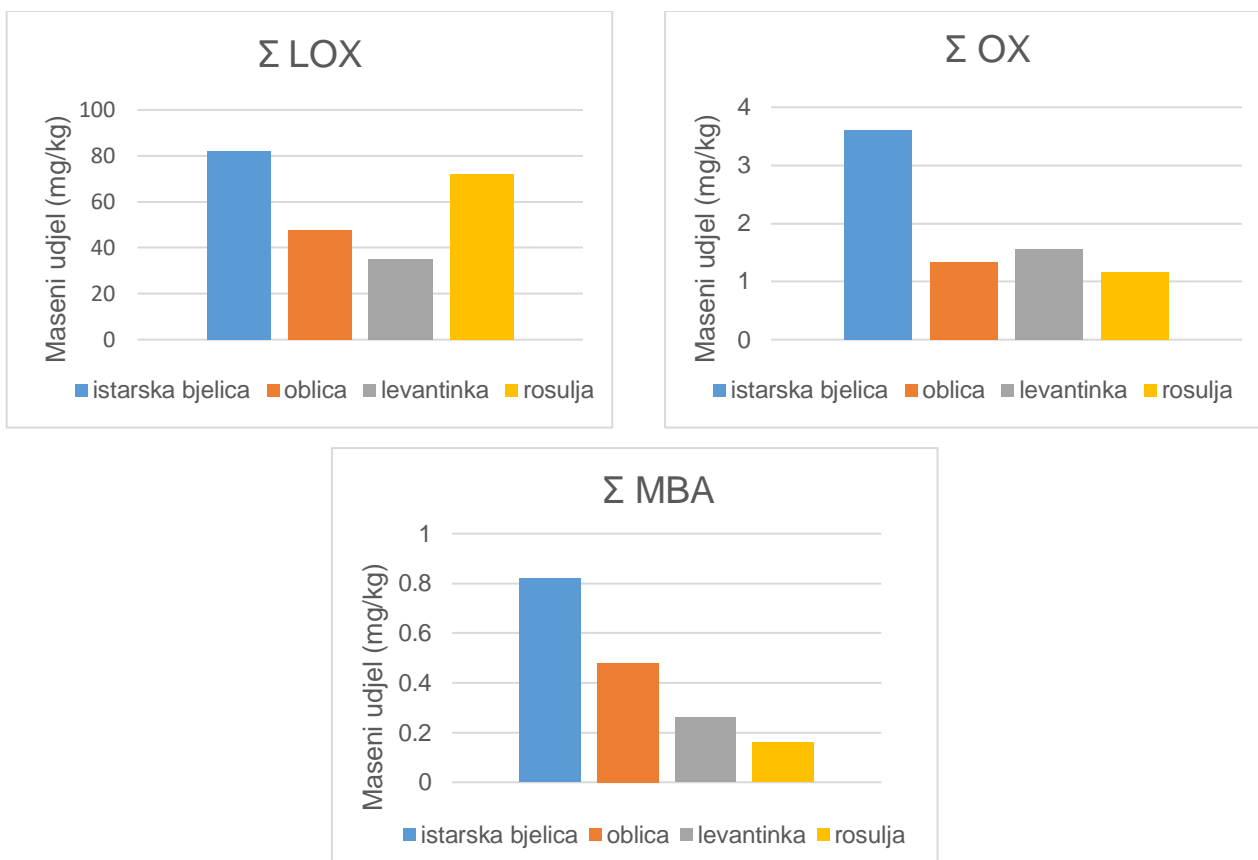
Cilj ovog istraživanja bio je ispitati način na koji pulsirajuće električno polje djeluje na sastav hlapljivih komponenti DMU-a, odnosno na njegovu aromu i kvalitetu. Analiziran je utjecaj PEP-a na sastav poželjnih komponenti arome koje nastaju u lipoksigenaznom putu, ali i na produkte oksidacije i produkte mikrobiološke aktivnosti koji negativno utječu na aromu DMU-a.

Istraživanje je provedeno na DMU autohtonih hrvatskih sorti maslina (istarske bjelice, oblice, levantinke i rosulje) proizvedenim uz predtretman PEP-om. Hlapljivi spojevi analizirani su plinskom kromatografijom (GC) nakon mikro ekstrakcije na čvrstu fazu (SPME) iz nadprostora ulja, a identifikacija i kvantifikacija hlapljivih komponenti prisutnih u analiziranim uzorcima ulja provedena je pomoću spektrometra masa (MS).

4.1. UTJECAJ SORTE MASLINE NA HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Na slici 2 prikazani su ukupni maseni udjeli produkata LOX puta, oksidacije i mikrobiološke aktivnosti u sva četiri sortna ulja. Za izračunavanje ukupnog udjela produkata LOX puta uzeti su u obzir 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, (E)-2-penten-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol, (Z)-3-heksenal, 3-heksen-1-ol, 2-heksen-1-ol, 1-heksanol, 4-oksoheks-2-enal, 3-heksenil acetate, heksil acetate, 2-heksenil acetate, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, pentanal, 2-pentenal, 2-metil-4-pentenal i 2-heksenal. Ukupni udjel produkata oksidacije čini zbroj masenih udjela pentanala,

2,4-heksadienala, nonanala a mikrobiološke aktivnosti 3-metilbutanala, 2-metilbutanala. S obzirom na to da heksanal može nastati i u LOX putu i u procesu oksidacije, njegov maseni udjel nije uzet u obzir pri formiranju grupa hlapljivih spojeva.



Slika 2. Grafički prikaz ukupnog masenog udjela produkata LOX puta, oksidacije (OX) i mikrobiološke aktivnosti (MBA) u DMU istarske bjelice, oblice, levantinke i rosulje

Iz rezultata prikazanih na slici 2 vidljivo je kako ulja istarskih sorti (istarske bjelice i rosulje) maslina imaju veći ukupni maseni udjel spojeva LOX puta od ulja dalmatinskih sorti (oblice i levantinke). S obzirom na činjenicu da su za dalmatinsko područje karakteristične više prosječne dnevne temperature nego za područje Istre (DHMZ, 2023a; DHMZ, 2023b), ovi rezultati u skladu su s nekim ranijim istraživanjima u kojima je utvrđeno da je koncentracija spojeva LOX puta manja ukoliko je temperatura okoliša tijekom razvoja ploda viša (Romero i sur., 2016; Inglese i sur., 2010). Više koncentracije mnogih hlapljivih produkata LOX puta u uljima istarskih sorti u odnosu na ulja dalmatinskih sorti maslina zabilježili su i Lukić i sur. u svom istraživanju iz 2019. godine. Smajić (2023) je provela istraživanje o utjecaju ubrzanog toplinskog tretmana na sastav hlapljivih spojeva DMU-a. U istraživanju su korištene iste sorte maslina s istog područja uzgoja kao i u ovom istraživanju. Usporedbom dobivenih rezultata o masenim udjelima spojeva LOX puta u kontrolnim uzorcima pojedinih sorti maslina s podacima

dobivenim u ovom istraživanju vidljivo je kako je ukupni maseni udjel spojeva LOX puta viši u svim sortama u 2022. godini osim kod levantinke gdje je bio veći u 2021. godini. Razlika u udjelu spojeva LOX puta među godinama najviše je bila izražena kod sorti istarske bjelice i rosulje. Iz ovih rezultata vidljiv je utjecaj sorte i klimatskih uvjeta koji vladaju tijekom godine na maseni udjel spojeva LOX puta.

Ukupni udjel spojeva oksidacije (slika 2) u uljima levantinke, oblice i rosulje nije se značajno razlikovao, dok je u ulju istarske bjelice ovaj udjel bio znatno viši, više od 2 puta veći nego u ostalim sortama. Škevin i sur. (2003) proveli su istraživanje na uljima istarskih sorti maslina buže i istarske bjelice te talijanske sorte leccino i zaključili kako vremenske prilike tijekom godine, sorta masline i zrelost ploda utječu na sastav fenola u maslini. S obzirom na antioksidacijsku aktivnost fenola, razlog većeg udjela produkata oksidacije u ulju istarske bjelice u odnosu na druga ulja ovog istraživanja moguće je potražiti u njegovom fenolnom sastavu. Nadalje, Soldo (2016) ističe kako porastom stupnja zrelosti maslina pada maseni udjel ukupnih fenolnih spojeva a specifična aktivnost enzima LOX raste. Ovdje je moguće naći obrazloženje činjenice kako ulje istarske bjelice u ovom istraživanju karakterizira najveći udjel produkata LOX puta, ali istovremeno i najveći udjel produkata oksidacije. Usporedbom podataka dobivenih ovim istraživanjem s podacima istraživanja Smajić (2023) vidljivo je kako je udjel produkata oksidacije kod svih promatranih sorti bio viši u 2021. godini nego u 2022., osim kod ulja istarske bjelice gdje je situacija bila suprotna. Ovi podaci potvrđuju ovisnost udjela hlapljivih spojeva o klimatskim uvjetima koji vladaju tijekom uzgoja maslina.

Što se tiče udjela produkata MBA, ulje istarske bjelice ponovno se ističe višim udjelima navedenih spojeva u usporedbi s uljima ostalih istraživanih sorti. Ne može se naći poveznica među uljima istarskih, odnosno dalmatinskih sorti jer je najmanji udjel produkata MBA prisutan u ulju rosulje, dok su se dva dalmatinska ulja prema ovom udjelu smjestila između istarskih ulja. Prema Zullo i Ciafardini (2020) bakterije i plijesni prisutne u svježe proizvedenom DMU često vrlo brzo ugibaju, stoga kvasci čine mikrobiotu DMU. Njihova koncentracija ovisi o nekoliko čimbenika poput procesa filtracije i sedimentacije ulja te koncentraciji vode i kemijskom sastavu DMU. Nadalje, usporedbom podataka iz istraživanja Smajić (2023) s podacima ovog istraživanja o ukupnom masenom udjelu spojeva koji nastaju mikrobiološkom aktivnošću može se zaključiti kako ovaj udjel također ovisi i o godišnjim klimatskim uvjetima te o sorti masline. U 2022. godini udjel je bio viši kod svih sorti nego u 2021., a posebno se ističe udjel MBA spojeva u ulju dobivenom iz istarske bjelice 2022. godine koji je bio znatno viši u usporedbi sa svim ostalim uljima dobivenim u obje istraživačke godine.

S obzirom na ukupne udjele svih triju analiziranih kemijskih skupina, ulje rosulje se izdvaja kao ulje s najnižim udjelom produkata oksidacije i MBA, a vrlo visokim udjelom produkata LOX puta (odmah nakon ulja istarske bjelice) što ga čini posebno zanimljivim.

Tablica 4. Maseni udjeli pojedinačnih hlapljivih komponenti iskazani u mg/kg u uzorcima DMU sorte istarska bjelica (IB)

| Spoj | Oznaka uzorka (sorta - vrijeme tretmana (s) - snaga el. polja (kV/cm)) | | | | | | | | | |
|---|---|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| | IB - kont | IB - 60 - 1 | IB - 30 - 2 | IB - 90 - 2 | IB - 18 - 4,5 | IB - 60 - 4,5 | IB -102 - 4,5 | IB - 30 - 7 | IB - 90 - 7 | IB - 60 - 8 |
| Aldehidi | | | | | | | | | | |
| 3-metilbutanal [£] | 0,33 ± 0,11 | 0,33 ± 0,06 | 0,32 ± 0,01 | 0,37 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 | 0,39 ± 0,11 | 0,33 ± 0,08 | 0,28 ± 0,10 | 0,16 ± 0,01 | N.D.* |
| 2-metilbutanal | 0,49 ± 0,20 | 0,55 ± 0,07 | 0,60 ± 0,04 | 0,66 ± 0,07 | 0,31 ± 0,04 | 0,67 ± 0,19 | 0,56 ± 0,13 | 0,50 ± 0,19 | 0,25 ± 0,00 | 0,11 ± 0,01 |
| pentanal ^{£§} | 0,45 ± 0,13 | 0,34 ± 0,13 | 0,35 ± 0,02 | 0,35 ± 0,01 | 0,32 ± 0,04 | 0,37 ± 0,13 | 0,31 ± 0,01 | 0,28 ± 0,14 | 1,35 ± 0,05 | 1,56 ± 0,05 |
| 2-pentenal ^{§§} | 0,68 ± 0,11 | 0,45 ± 0,10 | 0,45 ± 0,07 | 0,42 ± 0,04 | 0,41 ± 0,07 | 0,49 ± 0,08 | 0,49 ± 0,12 | 0,42 ± 0,14 | n.d.* | n.d.* |
| heksanal | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,81 ± 1,61 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* |
| 3-heksenal + 2-metil-4-pentenal [§] | 17,20 ± 1,12 | 9,37 ± 0,85 | 10,67 ± 0,71 | 10,75 ± 0,78 | 7,76 ± 1,17 | 7,28 ± 5,05 | 14,80 ± 4,08 | 12,03 ± 3,94 | 8,58 ± 0,23 | 2,40 ± 0,09 |
| 2-heksenal [£] | 40,85 ± 6,31 | 85,21 ± 5,33 | 86,83 ± 7,31 | 84,61 ± 6,20 | 78,47 ± 11,11 | 64,16 ± 12,32 | 36,75 ± 9,54 | 33,81 ± 11,11 | 13,47 ± 0,31 | 1,78 ± 0,41 |
| 2,4-heksadienal | 3,01 ± 0,75 | 1,89 ± 0,96 | 2,87 ± 0,26 | 2,89 ± 0,27 | 1,40 ± 0,82 | 2,12 ± 0,81 | 2,04 ± 0,47 | 1,29 ± 0,27 | 1,14 ± 0,65 | 0,22 ± 0,03 |
| 4-oksoheks-2-enal | 5,03 ± 0,66 | 3,19 ± 0,85 | 3,76 ± 0,07 | 3,48 ± 0,38 | 3,53 ± 0,72 | 2,45 ± 1,48 | 4,42 ± 1,43 | 4,01 ± 1,34 | 1,36 ± 0,18 | 0,34 ± 0,05 |
| nonanal | 0,16 ± 0,11 | 0,13 ± 0,12 | 0,21 ± 0,01 | n.d. | 0,24 ± 0,03 | 0,11 ± 0,11 | n.d. | 0,05 ± 0,07 | n.d. | 0,09 ± 0,12 |
| Alkoholi | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-ol | 0,85 ± 0,11 | 0,80 ± 0,04 | 0,80 ± 0,07 | 0,85 ± 0,08 | 0,69 ± 0,07 | 0,84 ± 0,15 | 0,83 ± 0,23 | 0,75 ± 0,24 | 1,13 ± 0,05 | 1,26 ± 0,02 |
| (Z)-2-penten-1-ol | 2,24 ± 0,30 | 2,09 ± 0,09 | 2,07 ± 0,23 | 2,11 ± 0,17 | 1,72 ± 0,30 | 2,11 ± 0,35 | 2,02 ± 0,57 | 1,80 ± 0,56 | 2,22 ± 0,05 | 2,52 ± 0,12 |
| (Z)-3-heksen-1-ol ^{£§} | 9,50 ± 1,42 | 8,31 ± 0,75 | 8,72 ± 0,72 | 8,76 ± 0,49 | 7,46 ± 1,18 | 8,47 ± 1,36 | 7,82 ± 1,96 | 7,13 ± 2,36 | 30,22 ± 0,94 | 35,94 ± 4,21 |
| 2-heksen-1-ol ^{£§} | 0,73 ± 0,35 | 1,37 ± 0,12 | 1,25 ± 0,11 | 1,16 ± 0,11 | 0,98 ± 0,14 | 1,00 ± 0,28 | 0,31 ± 0,08 | 0,37 ± 0,12 | 21,81 ± 0,92 | 19,60 ± 0,23 |
| 1-heksanol ^{£§} | 0,36 ± 0,14 | 0,51 ± 0,13 | 0,39 ± 0,02 | 0,36 ± 0,01 | 0,29 ± 0,05 | 0,37 ± 0,12 | 0,16 ± 0,03 | 0,17 ± 0,05 | 3,24 ± 0,39 | 5,89 ± 0,09 |
| Ketoni | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-on [£] | 4,37 ± 0,50 | 3,10 ± 0,18 | 3,34 ± 0,21 | 3,35 ± 0,17 | 2,81 ± 0,30 | 2,93 ± 0,46 | 3,71 ± 0,86 | 2,96 ± 1,05 | 1,35 ± 0,09 | 5,44 ± 0,03 |

* nije detektirano; [§] vrijeme tretmana ima značajan utjecaj (p≤0,05); [£] jakost električnog polja ima značajan utjecaj (p≤0,05); [§] interakcija vremena tretmana i jakosti električnog polja ima značajan utjecaj (p≤0,05)

Tablica 5. Maseni udjeli pojedinačnih hlapljivih komponenti iskazani u mg/kg u uzorcima DMU sorte rosulja (R)

| Spoj | Oznaka uzorka (sorta - vrijeme (s) - snaga el. polja (kV/cm)) | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--|
| | R - kont | R - 60 - 1 | R - 30 - 2 | R - 90 - 2 | R - 18 - 4,5 | R - 60 - 4,5 | R - 102 - 4,5 | R - 30 - 7 | R - 90 - 7 | R - 60 - 8 | |
| Aldehidi | | | | | | | | | | | |
| 3-metilbutanal | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,12 ± 0,00 | 0,09 ± 0,02 | n.d.* | n.d.* | |
| 2-metilbutanal | 0,06 ± 0,04 | 0,08 ± 0,00 | n.d.* | 0,06 ± 0,01 | 0,22 ± 0,03 | 0,06 ± 0,05 | 0,22 ± 0,00 | 0,15 ± 0,03 | 0,03 ± 0,04 | 0,08 ± 0,00 | |
| pentanal | 0,16 ± 0,20 | 0,19 ± 0,27 | n.d.* | n.d.* | 0,30 ± 0,31 | 0,06 ± 0,13 | 0,36 ± 0,01 | 0,37 ± 0,06 | n.d.* | n.d.* | |
| 2-pentenal | 0,08 ± 0,09 | 0,17 ± 0,06 | n.d.* | 0,09 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 | 0,08 ± 0,05 | 0,24 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,06 ± 0,08 | 0,11 ± 0,00 | |
| 3-heksenal + 2-metil-4-pentenal | 4,34 ± 0,80 | 4,98 ± 0,25 | 3,25 ± 0,25 | 1,47 ± 0,18 | 4,97 ± 0,84 | 2,68 ± 2,46 | 2,11 ± 0,06 | 4,80 ± 0,86 | 1,30 ± 0,02 | 3,23 ± 0,15 | |
| 2-heksenal | 39,62 ± 2,70 | 60,43 ± 2,19 | 17,53 ± 2,18 | 10,96 ± 1,29 | 57,74 ± 6,26 | 25,49 ± 23,63 | 62,41 ± 1,4 | 58,70 ± 12,51 | 11,75 ± 0,10 | 21,64 ± 1,62 | |
| 2,4-heksadienal | 0,72 ± 0,21 | 1,23 ± 0,26 | 0,68 ± 0,27 | 0,41 ± 0,24 | 0,86 ± 0,22 | 0,56 ± 0,59 | 0,80 ± 0,08 | 0,96 ± 0,32 | 0,28 ± 0,01 | 0,48 ± 0,06 | |
| 4-oksoheks-2-enal | 0,84 ± 0,32 | 1,43 ± 0,20 | 0,37 ± 0,17 | 0,12 ± 0,00 | 0,76 ± 0,14 | 0,41 ± 0,46 | 0,13 ± 0,00 | 0,83 ± 0,32 | 0,15 ± 0,06 | 0,24 ± 0,03 | |
| nonanal [§] | 0,29 ± 0,07 | 0,38 ± 0,01 | 0,35 ± 0,05 | 0,28 ± 0,03 | 0,29 ± 0,02 | 0,16 ± 0,04 | 0,25 ± 0,02 | 0,23 ± 0,07 | 0,26 ± 0,02 | 0,31 ± 0,03 | |
| Alkoholi | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-ol | 0,67 ± 0,14 | 0,60 ± 0,02 | 0,85 ± 0,03 | 0,93 ± 0,15 | 0,75 ± 0,05 | 0,84 ± 0,21 | 0,81 ± 0,03 | 0,66 ± 0,10 | 0,88 ± 0,00 | 0,87 ± 0,06 | |
| 1-pentanol | 0,09 ± 0,11 | n.d. | 0,49 ± 0,04 | 0,60 ± 0,08 | n.d.* | 0,30 ± 0,32 | n.d.* | n.d.* | 0,57 ± 0,01 | 0,46 ± 0,04 | |
| (Z)-2-penten-1-ol | 1,17 ± 0,18 | 1,22 ± 0,05 | 1,31 ± 0,12 | 1,44 ± 0,23 | 1,32 ± 0,16 | 1,23 ± 0,15 | 1,39 ± 0,04 | 1,32 ± 0,21 | 1,49 ± 0,02 | 1,49 ± 0,09 | |
| (Z)-3-heksen-1-ol | 7,58 ± 2,62 | 6,75 ± 0,74 | 15,63 ± 1,52 | 14,59 ± 1,57 | 5,75 ± 0,45 | 8,22 ± 3,51 | 5,42 ± 0,14 | 5,66 ± 1,22 | 10,56 ± 0,16 | 12,03 ± 0,75 | |
| 2-heksen-1-ol | 14,84 ± 16,09 | 0,77 ± 0,03 | 30,20 ± 2,85 | 37,96 ± 4,97 | 1,09 ± 0,07 | 18,07 ± 16,68 | 1,29 ± 0,19 | 1,13 ± 0,24 | 41,39 ± 11,4 | 25,56 ± 1,72 | |
| 1-heksanol [§] | 1,36 ± 1,26 | 0,35 ± 0,01 | 8,18 ± 0,67 | 8,66 ± 1,13 | 0,32 ± 0,00 | 1,27 ± 1,34 | 0,36 ± 0,07 | 0,32 ± 0,06 | 1,09 ± 1,37 | 7,24 ± 0,36 | |
| Ketoni | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-on | 0,93 ± 0,56 | 1,51 ± 0,08 | 1,04 ± 0,17 | 1,19 ± 0,16 | 1,42 ± 0,06 | 0,56 ± 0,64 | 1,39 ± 0,08 | 1,25 ± 0,21 | 0,64 ± 0,00 | 1,32 ± 0,02 | |
| 3-pentanon | 0,37 ± 0,43 | 0,17 ± 0,24 | 0,92 ± 0,01 | 1,18 ± 0,18 | n.d.* | 0,53 ± 0,34 | n.d.* | n.d.* | 1,17 ± 0,04 | 1,19 ± 0,19 | |
| Esteri | | | | | | | | | | | |
| 3-heksenil acetat [§] | 0,36 ± 0,11 | 0,90 ± 0,15 | 0,70 ± 0,14 | 0,26 ± 0,06 | 0,12 ± 0,01 | 0,11 ± 0,13 | 0,12 ± 0,01 | 0,25 ± 0,07 | 0,27 ± 0,02 | 0,57 ± 0,03 | |
| heksil acetat [§] | n.d.* | 0,12 ± 0,01 | 0,04 ± 0,06 | n.d.* | n.d.* | 0,01 ± 0,03 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | |

* nije detektirano; [§] vrijeme tretmana ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); [£] jakost električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); [§] interakcija vremena tretmana i jakosti električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Tablica 6. Maseni udjeli pojedinačnih hlapljivih komponenti iskazani u mg/kg u uzorcima DMU sorte oblica(O)

| Spoj | Oznaka uzorka (sorta - vrijeme (s) - snaga el. polja (kV/cm)) | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | O - kont | O - 60 - 1 | O - 30 - 2 | O - 90 - 2 | O - 18 -4,5 | O - 60 - 4,5 | O - 102 - 4,5 | O - 30 - 7 | O - 90 - 7 | O - 60 - 8 | |
| Aldehidi | | | | | | | | | | | |
| 2-metilbutanal | 0,01 ± 0,03 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* |
| pentanal | 1,09 ± 0,13 | 1,20 ± 0,07 | 1,19 ± 0,04 | 0,98 ± 0,06 | 1,08 ± 0,34 | 0,95 ± 0,18 | 1,07 ± 0,07 | 0,93 ± 0,05 | 1,04 ± 0,12 | 1,15 ± 0,04 | |
| heksanal [§] | 1,20 ± 1,06 | 1,72 ± 0,16 | 0,80 ± 0,01 | 1,16 ± 0,09 | 1,36 ± 0,40 | 0,68 ± 0,40 | 0,87 ± 0,03 | 0,84 ± 0,06 | 0,73 ± 0,11 | 0,29 ± 0,01 | |
| 3-heksenal + 2-metil-4-pentenal | 4,44 ± 0,72 | 4,30 ± 1,23 | 2,21 ± 1,23 | 2,99 ± 1,97 | 6,09 ± 0,76 | 2,50 ± 2,14 | 1,11 ± 1,34 | 3,17 ± 1,45 | 3,35 ± 2,92 | 2,32 ± 1,43 | |
| 2-heksenal | 1,41 ± 0,46 | 1,54 ± 0,04 | 0,98 ± 0,00 | 1,58 ± 0,20 | 3,86 ± 0,14 | 1,49 ± 0,31 | 1,25 ± 0,10 | 1,47 ± 0,11 | 1,02 ± 0,15 | 0,56 ± 0,01 | |
| 2,4-heksadienal [§] | 0,09 ± 0,09 | 0,09 ± 0,01 | n.d.* | n.d.* | 0,05 ± 0,02 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | |
| 4-oksoheks-2-enal | 0,02 ± 0,04 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | |
| nonanal | 0,15 ± 0,03 | 0,17 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 | 0,15 ± 0,04 | 0,13 ± 0,06 | 0,13 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,15 ± 0,02 | 0,12 ± 0,00 | |
| Alkoholi | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-ol | 0,61 ± 0,07 | 0,60 ± 0,06 | 0,61 ± 0,01 | 0,54 ± 0,06 | 0,51 ± 0,16 | 0,53 ± 0,08 | 0,57 ± 0,05 | 0,49 ± 0,03 | 0,59 ± 0,07 | 0,59 ± 0,04 | |
| 1-pentanol | 0,47 ± 0,23 | 0,28 ± 0,04 | 0,41 ± 0,02 | 0,32 ± 0,08 | 0,18 ± 0,10 | 0,24 ± 0,07 | 0,18 ± 0,03 | 0,22 ± 0,03 | 0,25 ± 0,02 | 0,09 ± 0,00 | |
| (E)-2-penten-1-ol | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,08 ± 0,11 | 0,02 ± 0,04 | 0,08 ± 0,11 | 0,06 ± 0,08 | 0,05 ± 0,07 | 0,07 ± 0,09 | |
| (Z)-2-penten-1-ol | 0,78 ± 0,10 | 0,79 ± 0,05 | 0,83 ± 0,05 | 0,72 ± 0,12 | 0,66 ± 0,18 | 0,70 ± 0,16 | 0,61 ± 0,15 | 0,62 ± 0,04 | 0,74 ± 0,10 | 0,54 ± 0,01 | |
| (E)-3-heksen-1-ol | 1,29 ± 0,36 | 0,36 ± 0,18 | 1,32 ± 0,01 | 1,42 ± 0,00 | 0,98 ± 1,39 | 1,01 ± 0,60 | 1,46 ± 0,13 | 1,14 ± 0,12 | 1,53 ± 0,20 | 1,19 ± 0,03 | |
| (Z)-3-heksen-1-ol | 19,53 ± 2,61 | 21,00 ± 0,53 | 18,96 ± 0,37 | 19,28 ± 1,59 | 16,57 ± 4,98 | 22,80 ± 5,37 | 14,88 ± 1,00 | 12,50 ± 1,04 | 17,94 ± 2,61 | 11,75 ± 0,37 | |
| 2-heksen-1-ol | 8,88 ± 2,21 | 14,87 ± 0,31 | 16,61 ± 0,20 | 12,03 ± 0,96 | 15,07 ± 4,80 | 16,15 ± 10,65 | 18,6 ± 1,60 | 16,23 ± 1,48 | 14,63 ± 2,40 | 14,38 ± 0,43 | |
| 1-heksanol | 10,14 ± 1,38 | 13,81 ± 0,84 | 13,7 ± 0,12 | 14,47 ± 1,07 | 13,8 ± 4,34 | 8,40 ± 7,33 | 11,47 ± 1,19 | 12,22 ± 1,17 | 15,02 ± 2,18 | 7,52 ± 0,46 | |
| Ketoni | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-on | 0,53 ± 0,09 | 0,99 ± 0,09 | 0,99 ± 0,02 | 0,96 ± 0,04 | 0,76 ± 0,24 | 0,86 ± 0,36 | 0,62 ± 0,02 | 0,64 ± 0,01 | 1,18 ± 0,16 | 0,41 ± 0,06 | |

* nije detektirano; [§] vrijeme tretmana ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); [£] jakost električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); [§] interakcija vremena tretmana i jakosti električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Tablica 7 . Maseni udjeli pojedinačnih hlapljivih komponenti iskazani u mg/kg u uzorcima DMU sorte levantinka (L)

| Spoj | Oznaka uzorka (sorta - vrijeme (s) - snaga el. polja (kV/cm)) | | | | | | | | | | |
|--|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | L - kont | L - 60 - 1 | L - 30 - 2 | L - 90 - 2 | L - 18 - 4,5 | L - 60 - 4,5 | L - 102 - 4,5 | L - 30 - 7 | L - 90 - 7 | L - 60 - 8 | |
| Aldehidi | | | | | | | | | | | |
| 2-metilbutanal | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,09 ± 0,00 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,06 ± 0 | n.d.* | |
| pentanal ^{£§} | 1,30 ± 0,10 | 1,22 ± 0,12 | 1,15 ± 0,13 | 0,41 ± 0,03 | 1,04 ± 0,03 | 1,10 ± 0,09 | 1,29 ± 0,04 | 1,31 ± 0,09 | 1,25 ± 0,14 | 0,97 ± 0,13 | |
| 2-pentalen | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,21 ± 0,02 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | |
| heksanal ^{£§} | 0,47 ± 0,19 | 0,55 ± 0,08 | n.d.* | 2,13 ± 0,15 | 0,53 ± 0,01 | 0,49 ± 0,34 | 0,30 ± 0,03 | 0,23 ± 0,04 | 0,74 ± 0,07 | 1,45 ± 0,17 | |
| 3-heksenal + 2-metil-4-pentalen ^{£§} | 0,39 ± 0,19 | 0,41 ± 0,01 | 0,57 ± 0,07 | 2,48 ± 0,21 | 0,39 ± 0,01 | 0,54 ± 0,34 | 0,21 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,42 ± 0,04 | 1,84 ± 0,15 | |
| 2-heksenal ^{£§} | 3,02 ± 2,53 | 0,97 ± 0,19 | 0,48 ± 0,07 | 22,57 ± 2,10 | 2,12 ± 0,45 | 3,70 ± 2,64 | 0,31 ± 0,02 | 0,11 ± 0,01 | 2,72 ± 0,29 | 15,92 ± 0,95 | |
| 2,4-heksadienal ^{§§} | 0,12 ± 0,04 | n.d.* | n.d.* | 0,35 ± 0,11 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,15 ± 0,00 | |
| 4-oksoheks-2-enal | 0,19 ± 0,16 | n.d.* | n.d.* | 0,44 ± 0,14 | n.d.* | 0,01 ± 0,03 | n.d.* | n.d.* | n.d.* | 0,23 ± 0,01 | |
| nonanal | 0,14 ± 0,02 | 0,16 ± 0,06 | 0,16 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,18 ± 0,03 | 0,16 ± 0,02 | 0,18 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 | 0,19 ± 0,04 | |
| Alkoholi | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-ol | 0,97 ± 0,10 | 1,01 ± 0,11 | 0,97 ± 0,12 | 0,88 ± 0,07 | 0,88 ± 0,01 | 1,07 ± 0,17 | 1,17 ± 0,06 | 1,22 ± 0,09 | 1,17 ± 0,13 | 0,97 ± 0,06 | |
| 1-pentanol | 0,26 ± 0,07 | 0,21 ± 0,03 | 0,26 ± 0,04 | n.d.* | 0,17 ± 0,00 | 0,27 ± 0,08 | 0,20 ± 0,01 | 0,25 ± 0,02 | 0,14 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | |
| (E)-2-penten-1-ol | 0,05 ± 0,11 | 0,26 ± 0,05 | 0,17 ± 0,00 | n.d.* | 0,08 ± 0,11 | 0,04 ± 0,08 | 0,10 ± 0,09 | 0,23 ± 0,02 | 0,23 ± 0,03 | 0,08 ± 0,11 | |
| (Z)-2-penten-1-ol | 1,26 ± 0,13 | 1,43 ± 0,21 | 1,24 ± 0,07 | 1,40 ± 0,11 | 1,19 ± 0,03 | 1,25 ± 0,09 | 1,15 ± 0,05 | 1,26 ± 0,07 | 1,27 ± 0,16 | 1,34 ± 0,04 | |
| (E)-3-heksen-1-ol | 0,37 ± 0,44 | 0,77 ± 0,08 | 0,61 ± 0,09 | n.d.* | 0,34 ± 0,49 | 0,30 ± 0,34 | 0,69 ± 0,07 | 0,59 ± 0,04 | n.d.* | n.d.* | |
| (Z)-3-heksen-1-ol [§] | 7,87 ± 1,21 | 8,96 ± 1,47 | 7,74 ± 1,05 | 3,50 ± 0,28 | 6,15 ± 0,05 | 8,36 ± 0,82 | 8,75 ± 0,65 | 8,40 ± 0,41 | 5,09 ± 0,67 | 7,89 ± 0,44 | |
| 2-heksen-1-ol | 12,10 ± 1,76 | 16,4 ± 2,80 | 12,32 ± 1,47 | 0,85 ± 0,01 | 9,94 ± 0,02 | 10,89 ± 2,80 | 15,58 ± 1,29 | 13,41 ± 0,76 | 11,55 ± 1,31 | 9,73 ± 0,67 | |
| 1-heksanol | 4,13 ± 2,55 | 2,29 ± 0,61 | 3,25 ± 0,59 | 0,48 ± 0,04 | 1,81 ± 0,00 | 5,30 ± 2,24 | 2,21 ± 0,19 | 2,36 ± 0,10 | 1,52 ± 0,26 | 4,52 ± 0,33 | |
| Ketoni | | | | | | | | | | | |
| 1-penten-3-on | 1,23 ± 0,61 | 0,43 ± 0,01 | 1,14 ± 0,11 | 2,07 ± 0,14 | 1,37 ± 0,05 | 1,76 ± 0,88 | 0,42 ± 0,01 | 0,31 ± 0,04 | 0,37 ± 0,07 | 1,69 ± 0,07 | |
| Esteri | | | | | | | | | | | |
| 3-heksenil acetat | 2,11 ± 0,32 | 3,13 ± 0,58 | 2,63 ± 0,27 | 3,99 ± 0,44 | 2,58 ± 0,04 | 2,19 ± 0,59 | 3,30 ± 0,28 | 2,88 ± 0,13 | 2,95 ± 0,32 | 2,36 ± 0,16 | |
| heksil acetat | 1,48 ± 0,17 | 1,73 ± 0,37 | 1,46 ± 0,16 | 1,96 ± 0,18 | 1,35 ± 0,08 | 1,49 ± 0,24 | 1,92 ± 0,19 | 1,73 ± 0,16 | 1,63 ± 0,13 | 1,77 ± 0,15 | |

* nije detektirano; § vrijeme tretmana ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); £ jakost električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); § interakcija vremena tretmana i jakosti električnog polja ima značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Osim različitog udjela produkata LOX puta, iz tablica 4 - 7 vidljivo je kako ulja istarskih i dalmatinskih sorti karakterizira i različit sastav ovih spojeva. Naime, u uljima istarskih sorti dominiraju aldehidi dok su u onima dalmatinskim sorti najzastupljeniji alkoholi. Razlog tomu bi mogao biti različit indeks zrelosti maslina. Naime, Salas i Sanchez (1998) ističu kako enzim alkohol-dehidrogenaza najveću aktivnost bilježi u zelenim plodovima maslina, odnosno dozrijevanjem ploda aktivnost ovog enzima pada čime pada i razina C6 alkohola u DMU. S druge strane, povećanje koncentracije C6 alkohola u čileanskom DMU-u, Romero i sur. (2016) pripisuju većoj aktivnosti ADH u zrelijim plodovima maslina. Iz navedenog bi se moglo zaključiti kako je aktivnost enzima ADH ovisna o indeksu zrelosti maslina ali i o samoj sorti masline. Razlog dominacije aldehida u istarskim sortama nalazi se prvenstveno u visokom masenom udjelu 2-heksenala koji iznosi više od polovice ukupnog udjela aldehida i koji je najzastupljeniji hlapljivi spoj ovih dviju sorti. U istraživanju koje je provela Smajić (2023) vidljiva je sličnost s ovim istraživanjem kod ulja rosulje, u čijem je ulju također dominantan spoj 2-heksenal, iako u značajno manjoj mjeri u odnosu na ostale spojeve nego što je to u ovom istraživanju. U istraživanju Brkić Bubola i sur. (2012) u ulju rosulje prevladava (E)-2-heksenal, dok u istraživanju Lukić i sur. (2019) ovaj aldehyd, usprkos visokom udjelu, nije dominantan spoj. Soldo i sur. (2024) ističu kako u dalmatinskim sortama oblice, levantinke i lastovke koncentracija (E)-2-heksenala ovisi o datumu berbe i godini istraživanja te da će se najveća koncentracija u ulju postići ukoliko se prerađuju plodovi niske do srednje zrelosti (indeks zrelosti 1,6-3,6). Usporedbom ostalih aldehida može se primijetiti kako heksenal nije detektiran u istarskim sortama dok 2-pentenal nije detektiran u istraživanim dalmatinskim sortama.

Dominacija alkohola kod dalmatinskih sorti posebno je izražena kod ulja oblice gdje oni čine preko 80% svih hlapljivih spojeva. Među njima ističe se (Z)-3-heksen-1-ol koji čini gotovo polovicu ukupnog udjela aldehida. Dominacija (Z)-3-heksen-1-ola u DMU oblice slaže se s rezultatima istraživanja Lukić i sur. (2019), dok Soldo (2016) kao dominantnu komponentu istog ulja ističe aldehyd heksenal, a Šarolić i sur. (2015) (E)-2-heksenal. Manji udjel (Z)-3-heksen-1-ola u ulju levantinke u ovom istraživanju djelomično se može pripisati nastanku 3-heksenil acetata koji u ulju oblice nije detektiran. Ovaj podatak pretpostavlja mogućnost veće aktivnosti enzima AAT u levantinki u odnosu na oblicu. Osim 3-heksenil acetata, u ulju levantinke detektiran je još jedan ester. Radi se o heksil acetatu koji niti u jednom drugom sortnom ulju nije bio pronađen, što također postavlja pretpostavku o mogućoj većoj aktivnosti AAT kod levantinke u odnosu na druge istraživane sorte. Istraživanje Soldo (2016) pokazuje kako detekcija i maseni udjel ovog estera u ulju levantinke ovisi o godini berbe i stupnju zrelosti maslina. Osim levantinke, u ovom diplomskom radu je još jedino rosulja pokazala prisutnost estera (3-heksenil acetata).

Što se ketona tiče, u svim je sortnim uljima detektiran 1-penten-3-on, dok je samo u ulju

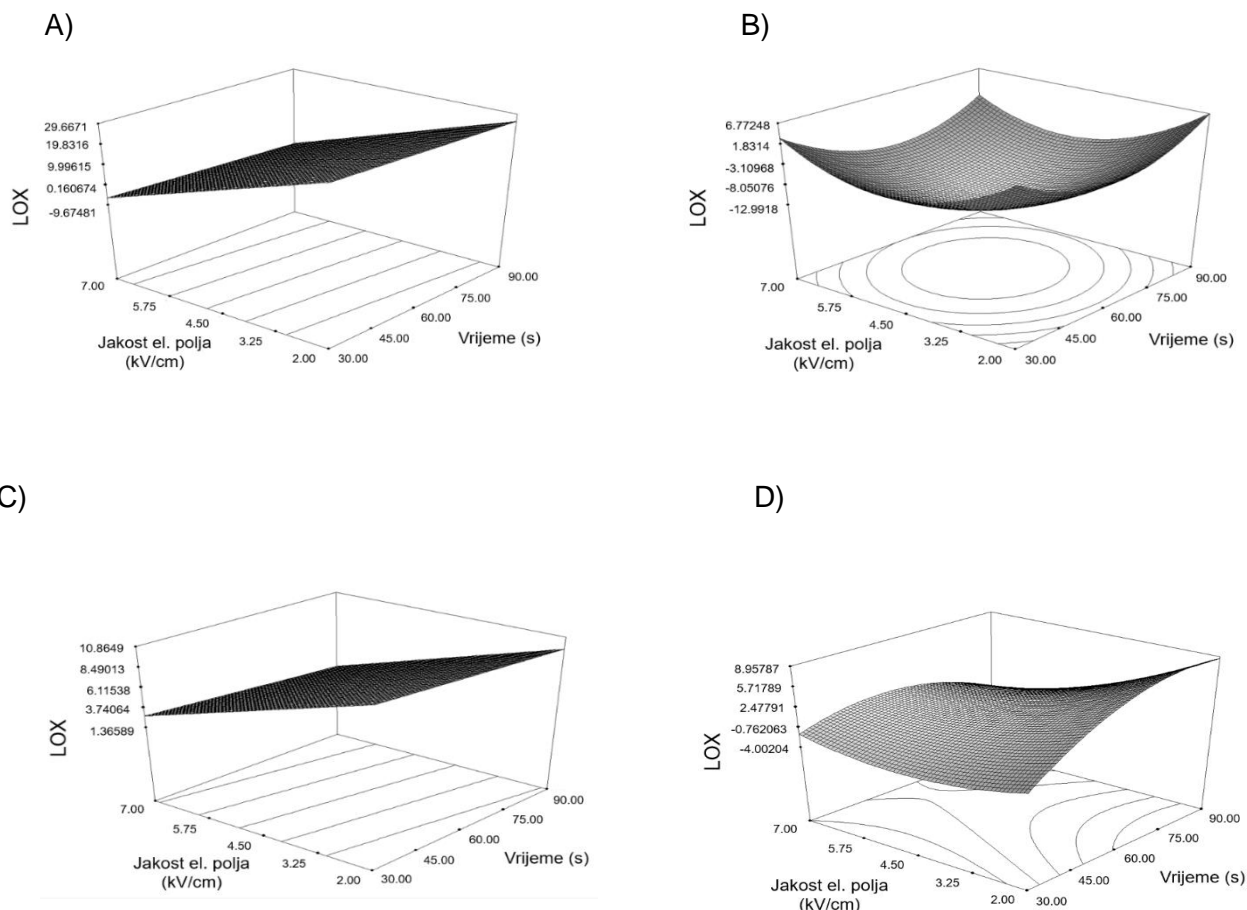
rosulje detektiran i 3-pentanon što se ne slaže s istraživanjem Lukić i sur. (2019) koji su ovaj keton detektirali i u uljima istarske bjelice, oblice i ostalih analiziranih sorti maslina.

Usporedbom pojedinačnih hlapljivih spojeva LOX puta u uljima iz različitih godina uzgoja istih sorti maslina s istog geografskog područja (rezultata ovog diplomskog rada s rezultatima diplomskog rada Smajić (2023)), vidljivo je kako neki od tih spojeva imaju približno iste masene udjele u analiziranim DMU, dok se udjeli drugih znatno razlikuju. Tako je primjerice udio (Z)-2-penten-1-ola podjednak u svim sortama i u različitim godinama uzgoja, dok se udio 2-heksen-1-ola u različitim godinama podudara jedino kod ulja istarske bjelice, dok je kod ostalih sorti udjel ovog alkohola viši u 2022. godini u odnosu na 2021. Također, udio 2-heksen-1-ola je u 2021. godini gotovo isti u svim sortama maslina, dok je u 2022. godini različit u svakoj sorti. Zanimljivo je uočiti kako je maseni udjel 2-heksenala 2021. godine bio znatno viši u ulju levantinke u odnosu na sve ostale sorte, dok je 2022. godine taj udjel bio najviši u uljima istarske bjelice i rosulje (čak do 10 puta viši nego u ulju levantinke). Iz navedenih podataka također se može zaključiti kako udjel pojedinačnih spojeva LOX puta značajno ovisi o sorti maslina iz koje se ulje proizvodi, ali ovisi i o godini uzgoja ploda.

4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA HLAPLJIVE KOMPONENTE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Na temelju analitičkih podataka dobivenih ovim istraživanjem uz pomoć metodologije odzivnih površina (eng. response surface methodology - RSM) koristeći program Design-expert konstruirani su 3D modeli prikazani na slikama 3 - 5. Pomoću ovih modela prikazana su predviđanja o kretanju ukupnog masenog udjela spojeva LOX puta, produkata oksidacije te produkata mikrobiološke aktivnosti u ovisnosti o vrijednosti jakosti PEP-a i duljini trajanja tretmana. Raspon vrijednosti jakosti polja je od 2 do 7 kV/cm, a vrijeme trajanja tretmana iznosi od 30 do 90 sekundi.

Svim sortnim uljima zajedničko je svojstvo da se najveći udjeli produkata LOX puta postižu pri najmanjim vrijednostima PEP-a (slika 3). Kod istarske bjelice i oblice puno značajniji utjecaj na spomenuti udjel ima promjena jakosti električnog polja nego promjena duljine trajanja tretmana. Pri određenim uvjetima tretmana zabilježeno je smanjenje udjela spojeva LOX puta u odnosu na kontrolni uzorak kod svih sortnih ulja izuzev ulja oblice.



Slika 3. Prikaz promjene masenih udjela hlapljivih spojeva LOX puta (u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o vremenu tretmana (s) i jakosti el. polja (kV/cm) za sorte: A) istarska bjelica; B) rosulja; C) oblica; D) levantinka

Ukoliko se pobliže razmotri ulje istarske bjelice, vidljivo je kako porastom jakosti električnog polja dolazi do pada udjela produkata LOX puta. Rezultati prikazani u tablici 4 pokazuju kako je najzastupljeniji spoj među produktima LOX puta u uljima sorte istarska bjelica 2-heksenal koji, pri određenim uvjetima PEP tretmana, čini i više od polovice ukupnog udjela produkata LOX puta. Iz tablice 4 također je vidljivo kako je upravo pri nižim vrijednostima jakosti polja njegov udjel viši, što je u skladu i s ukupnim udjelom aldehida, koji je pri manjim vrijednostima jakosti polja veći u odnosu na kontrolu dok je pri većim vrijednostima manji. S druge strane alkoholi pokazuju porast udjela u najekstremnijim uvjetima tretmana dok se pri ostalim uvjetima njihov udio blago smanjio u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenih podataka može se zaključiti kako trend promjene ukupnog udjela spojeva LOX puta promjenom jakosti električnog polja ovisi o promjeni udjela aldehida koji čine većinu ovih spojeva, među kojima se ističe 2-heksenal kao dominantan spoj. Analizom je dokazano da značajan utjecaj na udjel 2-heksenala ima parametar jakosti električnog polja, što samo potvrđuje ovisnost kretanja ukupnog udjela

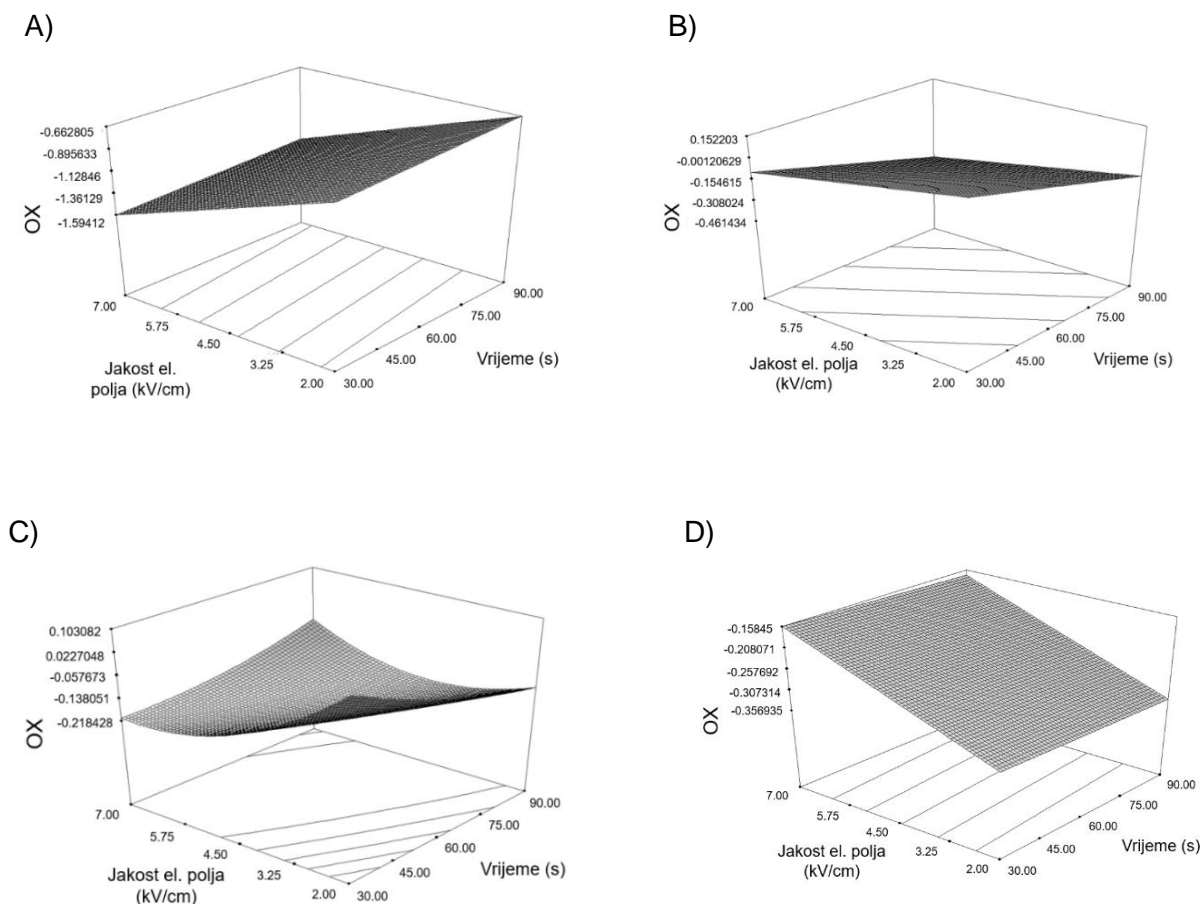
produkata LOX puta o udjelu ovog aldehida. Nadalje se može zaključiti kako pri nižim jakostima električnog polja dolazi do porasta aktivnosti enzima LOX što je vidljivo u povećanju ukupnog udjela spojeva LOX puta. Pri višim vrijednostima jakosti električnog polja aktivnost ovog enzima pada, a aktivnost enzima ADH raste zbog čega dolazi do značajnog porasta udjela alkohola, odnosno promjene omjera udjela aldehida i alkohola u korist alkohola.

Kod druge istarske sorte, rosulje, istovjetna promjena jednog od parametara neće uvijek istoznačno djelovati na povećanje odnosno smanjenje ukupnog udjela spojeva LOX puta, kao što je to slučaj kod istarske bjelice. Udjeli produkata LOX puta rastu pri kombinaciji niskih ili visokih vrijednosti vremena tretmana i jakosti električnog polja, što upućuje na povećanje aktivnosti enzima LOX. S druge strane, kombinacijom srednjih vrijednosti ovih parametara ukupni udjel se smanjuje u odnosu na kontrolni uzorak. Iz tablice 5 vidljivo je kako većinu ovog udjela čine aldehidi i alkoholi. Upravo o promjeni njihovog udjela ovisi opisani trend promjene ukupnog udjela spojeva nastalih u LOX putu. Zanimljivo je primijetiti kako se ukupni udjeli aldehida i alkohola u odnosu na kontrolni uzorak suprotno ponašaju u svim korištenim kombinacijama vrijednosti jakosti električnog polja i vremena tretmana PEP-em, odnosno ukoliko udjel aldehida raste, udjel alkohola se smanjuje i obrnuto. Ovaj trend ukazuje na djelovanje PEP na aktivnost enzima ADH, međutim povećanje ili smanjenje nekog od parametara procesa neće uvijek izazvati istovjetnu promjenu njegove aktivnosti. Navedene promjene udjela aldehida i alkohola prvenstveno ovise o promjenama udjela 2-heksenala, odnosno (Z)-3-heksen-1-ola i 2-heksen-1-ola koji čine većinu ukupnog udjela svih spojeva LOX puta u ovom ulju.

Iako promjena ukupnog udjela produkata LOX puta djelovanjem PEP-a u uljima sorte oblica prati sličan trend kao i kod ulja istarske bjelice, trend smanjenja ukupnog udjela spojeva LOX puta povećanjem jakosti električnog polja u ulju oblice najbolje se može pratiti praćenjem udjela alkohola koji čine oko 90 % svih hlapljivih spojeva tog ulja (tablica 6). S druge strane, ukupni udjel aldehida ne prati ovaj trend, odnosno povećanjem jakosti polja dolazi i do povećanja i do smanjenja njihovog udjela, ovisno o vremenu trajanja procesa.

U ulju druge dalmatinske sorte, levantinke, situacija je specifičnija. Ukupni udjel LOX puta raste povećanjem duljine trajanja procesa pri niskim vrijednostima jakosti polja. Zanimljivo je da većinu ukupnog udjela hlapljivih spojeva ovog ulja čine alkoholi u svim uvjetima tretmana PEP-em, osim pri uvjetima kada je zabilježen najveći ukupni udjel spojeva LOX puta, odnosno trajanju procesa od 90 s i jakosti polja od 2 kV/cm (Tablica 7). U tom slučaju se njihov udjel znatno smanjio a udjel aldehida povećao. Iz tablice 7 možemo vidjeti da je razlog tome povećanje udjela 2-heksenala za više od 3 puta u odnosu na kontrolu. Analizom varijance je otkriveno da na udjel 2-heksenala značajan utjecaj ima jakost polja kao i interakcija vremena i jakosti polja. Paralelno s povećanjem udjela 2-heksenala, udjel najzastupljenijeg alkohola, 2-

heksen-1-ola, smanjio se preko 12 puta u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenog se može zaključiti kako je aktivnost enzima ADH znatno smanjena upotrebom polja niske jakosti uz duže vrijeme tretmana. Pri navedenim uvjetima i ukupni udjel estera je postigao najvišu vrijednost. Uspoređujući udjele heksil acetata i heksanola može se zaključiti kako je aktivnost enzima ATT-e uglavnom bila veća u tretiranim uzorcima nego u kontrolnom uzorku (jedino je pri srednjim vrijednostima jakosti polja i vremena aktivnost ovog enzima bila manja nego u kontrolnom uzorku).



Slika 4. Prikaz promjene masenih udjela hlapljivih spojeva produkata oksidacije (u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o vremenu tretmana (s) i jakosti el. polja (kV/cm) za sorte: A) istarska bjelica; B) rosulja; C) oblica; D) levantinka

Niti u jednom sortnom ulju istraživani procesni parametri PEP-a nisu na istovjetan način djelovali na ukupni udjel produkata oksidacije (slika 4). Povećanjem jakosti električnog polja u istarskim sortama došlo je do smanjenja udjela produkata oksidacije, dok je kod dalmatinskih sorti uglavnom došlo do njihovog povećanja. U ulju oblice najveći utjecaj pokazala je interakcija

dvaju istraživanih parametara; porastom jakosti električnog polja uz kratko vrijeme trajanja procesa ukupni udjel produkata oksidacije se smanjuje, a ukoliko je vrijeme trajanja tretmana dulje ovaj udjel raste. Zanimljivo je kako u uljima istarske bjelice i levantinke niti u jednom slučaju nije zabilježen porast analiziranog udjela iznad vrijednosti prisutnih u kontrolnom uzorku. Također, sve zabilježene promjene ukupnog udjela spojeva oksidacije u svim sortnim uljima nisu se značajno razlikovale od udjela u kontrolnim uzorcima ulja.

Makovac (2023) u svom istraživanju zaključuje kako primjena PEP dovodi do povećanja koncentracije antioksidanasa u DMU, čime je moguće objasniti smanjenje udjela produkata oksidacije u istarskim sortama. U ulju istarske bjelice povećanje jakosti polja imalo je nešto značajniji utjecaj na smanjenje ovog udjela od smanjenja vremena trajanja tretmana. Pad ukupnog udjela produkata oksidacije uvjetovan je padom udjela 2,4-heksadienala i nonanala. Udjel pentanala se pri većim vrijednostima jakosti polja nije značajno smanjivao, dapače, čak je zabilježen i njegov rast pri određenim vrijednostima vremena trajanja tretmana (tablica 4). Etil-linoleat prisutan u djevičanskom maslinovom ulju (Magdalenčić, 2020) može oksidacijom tvoriti alkoksi radikal koji potom β -cijepanjem tvori pentanal (Oyman i sur., 2004). Postoji mogućnost da je intenzivan tretman PEP-em potaknuo ove kemijske reakcije što bi objasnilo porast pentanala pri navedenim uvjetima. Pentanal je jedini produkt oksidacije ovog ulja na promjenu čijeg udjela je PEP imalo značajan utjecaj (tablica 4).

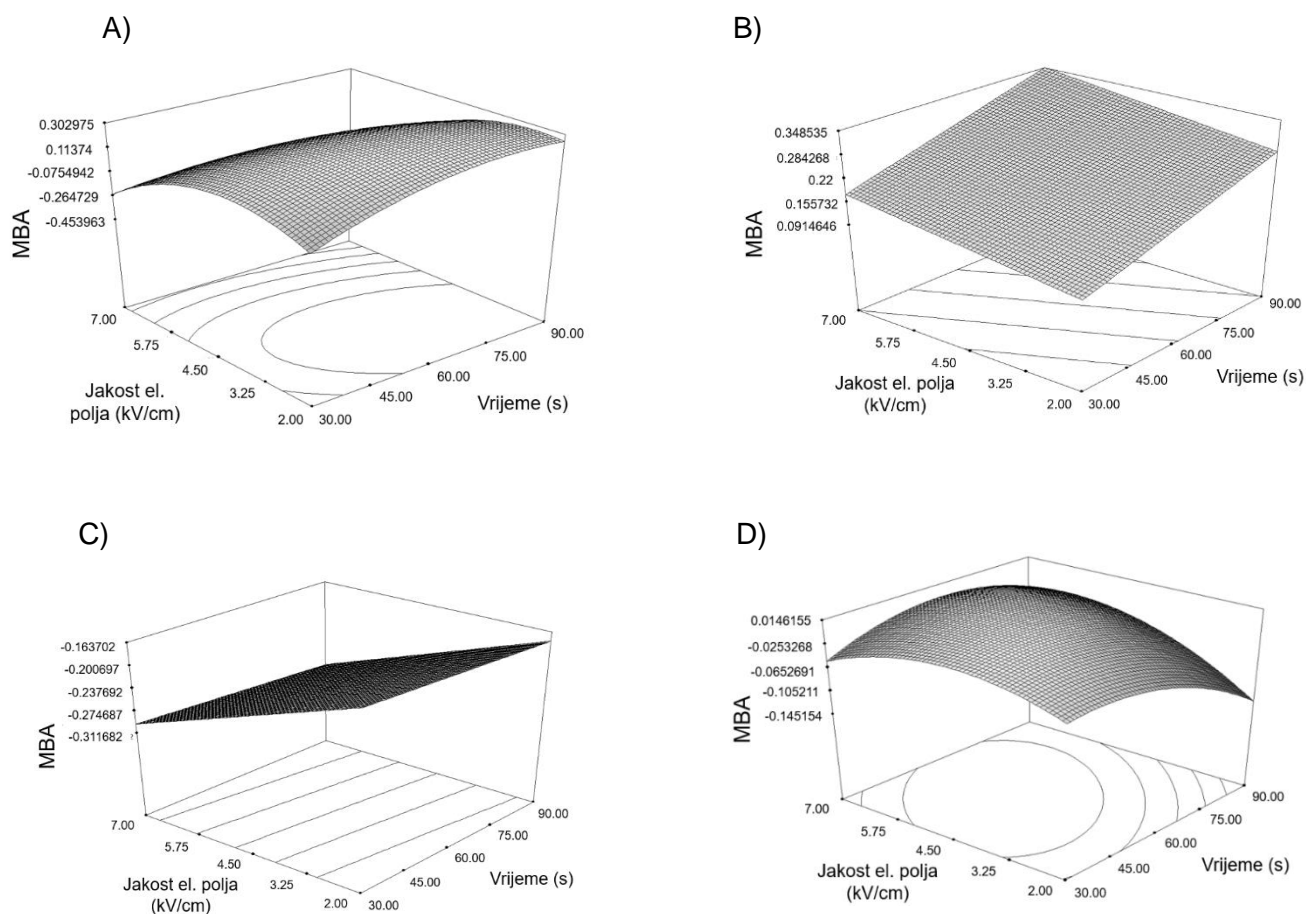
Kod ulja rosulje se, za razliku od istarske bjelice, produljenjem vremena tretmana udjel produkata oksidacije smanjuje. Trajanje tretmana ima značajniji utjecaj na promjenu udjela produkata od promjene jakosti polja. Praćenjem udjela 1-pentanola (produkt MBA) i pentanala (produkt oksidacije) zapaža se kako se u uzorcima u kojima je došlo do povećanja udjela aldehida u odnosu na kontrolni uzorak, udjel alkohola smanjio ili uopće nije bio detektiran i obrnuto. Iz toga je moguće pretpostaviti kako je u uzorcima u kojima se udjel 1-pentanola smanjio došlo do njegove oksidacije u pentanal. U ulju rosulje, kao i u ulju istarske bjelice, među produktima oksidacije dominira 2,4-heksadienal, dok u dalmatinskim sortama prevladava pentanal (tablice 4 - 7).

U uljima dalmatinskih sorti uglavnom dolazi do pada udjela produkata oksidacije u odnosu na kontrolni uzorak. Iznimka je jedino prisutna kod ulja oblice ukoliko se koristi polje niske jakosti uz kratko ili srednje vrijeme trajanja procesa. Za razliku od istarskih sorti, 2,4-heksadienal u većini tretiranih uzoraka dalmatinskih ulja nije niti detektiran (tablica 6 i 7). U ulju levantinke najviše je izražen porast udjela produkata oksidacije povećanjem jakosti električnog polja, dok promjena vremena nema značajan utjecaj.

Makovac (2023) zaključuje kako sorta masline ima najznačajniji utjecaj na antioksidacijski kapacitet proizvedenog DMU, a značajan utjecaj imaju i vrijeme trajanja tretmana PEP-em i jakost električnog polja te njihova interakcija sa sortom. Iz toga je moguće zaključiti kako

istarske sorte imaju veći antioksidacijski kapacitet od dalmatinskih sorti maslina. Uz to, sukladno cilju smanjenja udjela produkata oksidacije u ulju, uvjeti tretmana korišteni u ovom istraživanju pogodniji su za istarska nego za dalmatinska sortna ulja.

Utjecaj PEP na udjel produkata mikrobiološke aktivnosti također se razlikovao među sortnim uljima (slika 5). Najveća sličnost vidljiva je kod ulja istarske bjelice i oblice gdje je pri niskim vrijednostima jakosti polja postignuta najveća vrijednost ovog udjela dok je pri najvećim vrijednostima jakosti polja ovaj udjel bio najmanji. Ovakav trend moguće je obrazložiti činjenicom da primjena PEP dovodi do smanjenja broja mikroorganizama, a porastom jakosti polja ovaj učinak raste (Yan i sur., 2021). Može se pretpostaviti kako će na taj način doći do smanjenja proizvodnje produkata mikrobne aktivnosti, odnosno smanjenja njihovog masenog udjela u ulju.



Slika 5. Prikaz promjene masenih udjela hlapljivih spojeva produkata mikrobiološke aktivnosti (u odnosu na kontrolu) u ovisnosti o vremenu tretmana (s) i jakosti el. polja (kV/cm) za sorte: A) istarska bjelica; B) rosulja; C) oblica; D) levantinka

Međutim ulja istarske bjelice i oblice se razlikuju u sastavu analiziranih produkata, odnosno u ulju istarske bjelice detektirani su 3-metilbutanal i 2-metilbutanal dok je u ulju bjelice prisutan 1-pentanol (tablica 4 i 6). Razlog tomu mogao bi biti prisutnost različitih vrsta mikroorganizama u ovim uljima (Sansone, 2011).

Analizom varijance je dokazano kako na maseni udjel 3-metilbutanala u ulju istarske bjelice značajan utjecaj ima parametar jakosti električnog polja, što je u skladu s opisanim trendom pada ukupnog udjela produkata mikrobiološke aktivnosti povećanjem jakosti električnog polja. Zanimljivo je primijetiti kako se u kontrolnom uzorku ulja oblice nalazio 2-metilbutanal, međutim njegov je maseni udjel bio iznimno nizak zbog čega već nakon najblažeg tretmana PEP-em ovaj spoj više nije bio detektiran (tablica 6). Ulje oblice jedino je sortno ulje u kojemu nije došlo do porasta ukupnog udjela produkata mikrobiološke aktivnosti iznad vrijednosti zabilježenih u kontrolnom uzorku.

Za razliku od ulja istarske bjelice i oblice, u ulju rosulje zabilježen je upravo suprotan slučaj. Ondje porastom jakosti polja ukupni udjel produkata mikrobiološke aktivnosti u ulju raste. Osim toga, ovaj udjel raste i produljenjem samog tretmana. Ovaj fenomen moguće je objasniti pretpostavkom da su u ovom ulju bile prisutne drugačije vrste mikroorganizama koje su otpornije na zadane uvjete tretmana PEP-om. Također, prilikom inaktivacije mikroorganizama i permeabilizacije stanica, može doći do prijelaza tvari iz stanica mikroorganizama u okolinu (Yan i sur., 2021) pa na taj način u okolni medij mogu dospjeti i metaboliti mikroorganizama (Martinez i sur., 2020) te tako dovesti do povećanja njihovog masenog udjela. S obzirom na podatke iz tablice 5 ovaj rast može se pripisati povećanju udjela 1-pentanola koji bilježi najznačajniji rast među svim produktima mikrobiološke aktivnosti. Među ostalim produktima ističe se 3-metilbutanal koji je detektiran u samo dva tretirana uzorka (nije bio detektiran niti u kontrolnom uzorku). S obzirom na činjenicu da 3-metilbutanal nastaje iz aminokiseline leucin (Angerosa i su., 1996), postoji mogućnost kako su uvjeti tretmana u slučaju dva spomenuta uzorka uzrokovali oslobađanje veće količine leucina iz proteinskog dijela mikroorganizama.

U ulju levantinke je povećanje vrijednosti jakosti polja i duljine trajanja tretmana najprije dovelo do blagog rasta ukupnog udjela produkata mikrobiološke aktivnosti, nakon čega je daljnje povećanje uvjeta tretmana uzrokovalo pad promatranog udjela. Najveće postignute vrijednosti tog udjela nisu znatno prelazile vrijednosti zabilježene u kontrolnom uzorku. Glavninu svih produkata mikrobiološke aktivnosti čini alkohol 1-pentanol (tablica 7).

5. ZAKLJUČCI

1. Sorta masline i geografsko područje uzgoja važni su čimbenici koji utječu na maseni udjel i sastav hlapljivih spojeva DMU. Istarske sorte karakterizira veći maseni udjel produkata LOX puta nego dalmatinske sorte maslina. U dalmatinskim sortama većinu masenog udjela svih hlapljivih spojeva čine alkoholi a u istarskim sortama aldehidi među kojima se posebno izdvaja 2-heksenal koji čini oko polovice udjela svih hlapljivih spojeva. Istarska bjelica izdvaja se kao sorta s najvećim udjelom produkata LOX puta, oksidacije i mikrobiološke aktivnosti.
2. Tretman PEP-em utječe na ukupni udjel hlapljivih spojeva u DMU. Može uzrokovati povećanje i smanjenje ovog udjela, ovisno o vrijednosti primijenjenih parametara jakosti električnog polja i duljine trajanja tretmana. Osim o navedenim parametrima, utjecaj PEP ovisi i o sorti masline iz koje je DMU proizvedeno.
3. PEP djeluje na promjenu udjela spojeva koji nastaju u LOX putu, čime je dokazano njegovo djelovanje na aktivnost enzima LOX puta. Osim na produkte LOX puta, PEP djeluje i na spojeve nastale oksidacijom te mikrobiološkom aktivnošću.
4. Iako PEP djeluje specifično na svako sortno ulje, moguće je uočiti neke zajedničke trendove među sortama. Tako je u svim sortnim uljima najveći udjel produkata LOX puta postignut upotrebom najnižih vrijednosti jakosti PEP. Udjel produkata oksidacije u tretiranim uzorcima nije prelazio vrijednosti detektirane u kontrolnim uzorcima, osim u slučaju ulja oblice kada su korišteni blagi uvjeti tretmana.
5. Za svaku sortu potrebno je odrediti optimalne uvjete tretmana PEP-em. Pri tome je potrebno obratiti pozornost na spojeve na čiji udjel jedan/oba primijenjena parametra i/ili njihova interakcija imaju značajan utjecaj.

6. LITERATURA

Abenzoza M, Benito M, Saldana G, Alvarez I, Raso J, Sanchez-Gimeno AC (2013) Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. *Food Bioprocess Technol* **6**, 1367-1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>

Angerosa F (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 639–660. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/103.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/103.0.CO;2-U)

Angerosa F, Lanza B, Marsilio V (1996) Biogenesis of „fusty“ defect in virgin olive oils. *Grasas y aceites* **47**, 142-150. <https://doi.org/10.3989/gya.1996.v47.i3.854>

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

Biasone A, Di Loreto G, Preziuso SM, Serraiocco A, Di Giacinto L (2012) Changes in the volatile and sensory profile of virgin olive oil as a function of olive fruits mould process. *Riv. Ital. Sostanze Grass* **89**, 117-125.

Brkić Bubola K, Koprivnjak O, Sladonja B, Lukić I (2012) Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buža, Črna and Rosinjola cultivars in Istria (Croatia). *Food Technology and Biotechnology* **50**, 192-198.

Cecchi L, Bellumori M, Corbo F, Milani G, Clodoveo ML, Mulinacci N (2019) Implementation of the sono-heat-exchanger in the extra virgin olive oil extraction process: End-user validation and analytical evaluation. *Molecules* **24**, 2379. <https://doi.org/10.3390/molecules24132379>

Cecchi L, Migliorini M, Mulinacci N (2021) Virgin Olive Oil Volatile Compounds: Composition, Sensory Characteristics, Analytical Approaches, Quality Control, and Authentication. *J Agric Food Chem* **69**, 2013–2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07744>

Clodoveo ML, Dipalmo T, Schiano C, La Notte D, Pati S (2014) What's now, what's new

and what's next in virgin olive oil elaboration systems? A perspective on current knowledge and future trends. *J Agric Eng* **45**, 49. <https://doi.org/10.4081/jae.2014.193>

CSCP (2020) 2,4-Hexadienal. CSCP- California Safe Cosmetics Program - Product database, <https://cscptest.cdpd.ca.gov/search/detailresult/754>. Pristupljeno 12. studenog 2024.

DHMZ (2023a) Klimatološki podaci: Srednje mjesečne vrijednosti i ekstremi, podaci za Split Marjan. DHMZ-Državni hidrometeorološki zavod, https://meteo.hr/klima.php?section=klima_podaci¶m=k1&Grad=split_marjan. Pristupljeno 14. veljače 2025.

DHMZ (2023b) Klimatološki podaci: Srednje mjesečne vrijednosti i ekstremi, podaci za Pazin. DHMZ-Državni hidrometeorološki zavod, https://meteo.hr/klima.php?section=klima_podaci¶m=k1&Grad=pazin. Pristupljeno 14. veljače 2025.

Dias S, Pino-Hernandez E, Gonçalves D, Rego D, Redondo L, Alves, M. (2024) Challenges and Opportunities for Pilot Scaling-Up Extraction of Olive Oil Assisted by Pulsed Electric Fields: Process, Product, and Economic Evaluation. *Appl Sci* **14**, 3638. <https://doi.org/10.3390/app14093638>

Frankel EN (1983) Volatile lipid oxidation products. *Prog Lipid Res* **22**, 1-33. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(83\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0163-7827(83)90002-4)

Frankel EN (1985) Chemistry of autoxidation: Mechanism, products and flavor significance. U: Min DB, Smouse TH (ured.) Flavor Chemistry of Fats and Oils, 1. izd., The American Oil Chemists Society, Champaign, IL, str. 1-37.

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

Inglese P, Famiani F, Galvano F, Servili M, Esposito S, Urbani S (2010) Factors affecting extravirgin olive oil composition. U: Janick J (ured.) Horticultural Reviews, JohnWiley & Sons Inc. New Jersey, str. 83–147.

IOC (2018) Best practice guidelines for the storage of olive oils and olive-pomace oils for human consumption. IOC-International Olive Council, <https://www.internationaloliveoil.org>

[/wp-content/uploads/2019/11/COI-BPS-Doc.-No-1-2018-Eng.pdf](#) . Pristupljeno 15. veljače 2025.

IOOC (1996) International Olive Oil Council, Doc T.20/n. 15/Rev.1, Madrid November 20th.

Kalogeropoulos N, Kaliora AC, Artemiou A, Giogios I (2014) Composition, volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters. *LWT - Food Sci Technol* **58**, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.052>

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>

Kalua CM, Allen MS, Bedgood Jr DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem* **100**, 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>

Kantoci D (2006) Maslina. *Glasnik Zaštite Bilja* **29**, 4-14.

Kiritsakis AK (1998) Flavor components of olive oil—A review. *J Am Oil Chem Soc* **75**, 673-681. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0205-6>

Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH, Poreč, str. 34-38.

Kotti F, Jaziri K, Arab F, Mater Y, Sifi S, Fares N i sur. (2010) Lipoxygenase: Optimization of extraction and evaluation of its contribution to virgin olive oil aroma. *Food Biotechnol* **24**, 95-105. <https://doi.org/10.1080/08905430903562658>

Kraljić K, Balbino S, Filipan K, Herceg Z, Stuparević I, Ivanov M i sur. (2023) Innovative Approaches to Enhance Activity of Endogenous Olive Enzymes—A Model System Experiment: Part II—Non-Thermal Technique. *Processes* **11**, 3283. <https://doi.org/10.3390/pr11123283>

Leone A, Tamborrino A, Esposto S, Berardi A, Servili M (2022) Investigation on the effects of a pulsed electric field (PEF) continuous system implemented in an industrial olive oil

plant. *Foods* **11**, 2758. <https://doi.org/10.3390/foods11182758>

Luaces P, Sanz C, Perez AG (2007) Thermal stability of lipoxygenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and reperussion on olive oil biosynthesis. *J Agric Food Chem* **55**, 6309-6313. <https://doi.org/10.1021/jf070326s>

Lukić I, Lukić M, Žanetić M, Krapac M, Godena S, Brkić Bubola K (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**, 565. <https://doi.org/10.3390/foods8110565>

Magdalenić K (2020) Analiza hlapljivih spojeva iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja (diplomski rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

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

Mansouri F, Ben Moumen A, Richard G, Fauconnier ML, Sindic M, Serghini-Caid H i sur. (2017) Flavor profiles of monovarietal virgin olive oils produced in the Oriental region of Morocco. *OCL Oils fat Crop Lipid* **24**, 9. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017012>

Martinez JM, Delso C, Alvarez I, Raso J (2020) Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 530-552. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12512>

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

Miljković IVO, Gašparec Skočić L, Milat V, Strikić F, Oplanić M, Bjeliš M i sur. (2011) Maslina i maslinovo ulje Božji dar u Hrvata, Mavi, Zagreb.

Morales MT, Angerosa F, Aparicio R (1999) Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites* **50**, 114-121. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i2.645>

Morales MT, Aparicio R, Rios JJ (1994) Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J Chromatogr A* **668**, 455-462. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80139-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80139-8)

Morales MT, Przybylski R (2013) Olive Oil Oxidation. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of Olive Oil, 2. izd., Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 479-522.

Morales MT, Rios JJ, Aparicio R (1997) Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J Agric Food Chem* **45**, 2666-2673. <https://doi.org/10.1021/jf960585>

Morales MT, Tsimidou M (2000) The Role of Volatile Compounds and Polyphenols in Olive Oil Sensory Quality. U: Harwood J, Aparicio R (ured.) Handbook of Olive Oil, 1. izd., Springer, New York, str. 393-458.

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

Nieves Criado M, Motilva MJ, Ramo T, Romero MP (2006) Chlorophyll and carotenoid profile and enzymatic activities (chlorophyllase and lipoxygenase) in olive drupes from the fruit-setting period to harvest time. *J Am Soc Hortic Sci* **131**, 593-600. Dostupo na: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073032770>

Olias JM, Perez AG, Rios JJ, Sanz LC (1993) Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odor notes. *J Agric Food Chem* **41**, 2368–2373. <https://doi.org/10.1021/jf00036a029>

Oyman ZO, Ming W, Van der Linde R, Van Gorkum R, Bouwman E (2005) Effect of [Mn(acac)₃] and its combination with 2, 2'-bipyridine on the autoxidation and oligomerisation of ethyl linoleate. *Polymer* **46**, 1731-1738. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.12.045>

Panzanaro S, Nutricati E, Miceli A, De Bellis L (2010) Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Biochem* **48**, 741-745. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.004>

Parniakov O, David Hopper S, Toepfl S (2024) Impact of PEF (Pulsed Electric Fields) on

Olive Oil Yield and Quality. *Food Science and Nutrition*. IntechOpen. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.112685>

Peres F, Martins LL, Ferreira-Dias S (2017) Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 3104-3126. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1092107>

Perez AG, Luaces P, Ríos JJ, García JM, Sanz C (2003) Modification of volatile compound profile of virgin olive oil due to hot-water treatment of olive fruit. *Jf AgricFood Chem* **51**, 6544-6549. <https://doi.org/10.1021/jf0346253>

Perez M, Lopez-Yerena A, Lozano-Castellon J, Olmo-Cunillera A, Lamuela-Raventos RM, Martin-Belloso O i sur. (2021) Impact of emerging technologies on virgin olive oil processing, consumer acceptance, and the valorization of olive mill wastes. *Antioxidants* **10**, 417. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>

Pitarević A (2023) Utjecaj vremena skladištenja na kvalitetu i aromatični profil djevičanskih maslinovih ulja (diplomski rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Puertolas E, Martinez De Maranon I (2015) Olive oil pilotproduction assisted by pulsed electric field: Impact on extraction yield, chemical parameters and sensory properties. *Food Chem* **167**, 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.029>

Restuccia D, Clodoveo ML, Corbo F, Loizzo MR (2018) De-stoning technology for improving olive oil nutritional and sensory features: The right idea at the wrong time. *Food Res Int* **106**, 636-646. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.043>

Ridolfi M, Terenziani S, Patumi M, Fontanazza G (2002) Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J Agric Food Chem* **50**, 835-839. <https://doi.org/10.1021/jf0109118>

Romero I, García-Gonzalez DL, Aparicio-Ruiz R, Morales MT (2015) Validation of SPME–GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta* **134**, 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.032>

Romero N, Saavedra J, Tapia F, Sepúlveda B, Aparicio R (2016) Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and

characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage, *J Sci Food Agric* **96**, 583–592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7127>

Salas JJ (2004) Characterization of alcohol acyltransferase from olive fruit. *J Agric Food Chem* **52**, 3155-3158. <https://doi.org/10.1021/jf035433a>

Salas JJ, Sanchez J (1998). Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochem* **48**, 35-40. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01097-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01097-2)

Salas JJ, Sanchez J (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Sci* **143**, 19-26. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00027-8)

Salas JJ, Sanchez J, Ramli US, Manaf AM, Williams M, Harwood JL (2000) Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress Lipid Res* **39**, 151-180. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00003-5)

Salivaras E (2017) Sensory Properties and Evaluation of Virgin Olive Oils. U: Shahidi F, Kiritsakis A (ured.) *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd, Hoboken/West Sussex, str. 603-627.

Sansone A (2011) Volatile Composition of Imported and Domestic Black-Ripe Table Olives (diplomski rad), University of California, Davis.

Smajić E (2023) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na sastav hlapljivih spojeva djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Soldo B (2016) Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Soldo B, Jukić Špika M, Pasković I, Vuko E, Polić Pasković M, Ljubenković I (2024) The Composition of Volatiles and the Role of Non-Traditional LOX on Target Metabolites in Virgin Olive Oil from Autochthonous Dalmatian Cultivars. *Molecules* **29**, 1696. <https://doi.org/10.3390/molecules29081696>

Solinas M, Angerosa F, Cucurachi A (1987) Connessione tra prodotti di neoformazione

ossidativa delle sostanze grasse e insorgenza del difetto di rancidità all'esame organolettico. Nota 2. Determinazione quantitativa. *Riv Ital Sostanze Grasse* **64**, 137-145.

Šarolić M, Gugić M, Friganović E, Tuberoso CIG, Jerković I (2015) Phytochemicals and Other Characteristics of Croatian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils from Oblica, Lastovka and Levantinka Varieties. *Molecules* **20**, 4395-4409. <https://doi.org/10.3390/molecules20034395>

Šarolić M, Pitarević A, Marijanović Z, Knezović Z (2024) Utjecaj vremena skladištenja na aromatični profil djevičanskih maslinovih ulja. *Glasilo Future* **7**, 13–27.

Škevin D, Rade D, Štrucelj D, Mokrovšak Ž, Neđeral S, Benčić Đ (2003) The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 536-541. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300782>

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

Tanouti K, Serghini-Caid H, Sindic M, Wathelet JP, Elamrani A (2012) Volatile compounds, profiles of virgin olive oils produced in the eastern Morocco: oxidative stability and sensory defects. *J Food Res* **1**, 194. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n4p194>

Toepfl S, Siemer C, Saldana-Navarro G, Heinz V (2014) Overview of pulsed electric fields processing for food. U: Da-Wen S (ured.) *Emerging technologies for food processing*, 2. izd., Academic Press, San Diego, str. 93-114.

Tura D, Failla O, Bassi D, Attilio C, Serraiocco A (2013) Regional and cultivar comparison of Italian single cultivar olive oils according to flavor profiling. *Eur J Lipid Sci Technol* **115**, 196-210. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200104>

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Sordini B, Loreface, A i sur. (2019) Extra-virgin olive oil extracted using pulsed electric field technology: Cultivar impact on oil yield and quality. *Front Nutr* **6**, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00134>

Yan Z, Yin L, Hao C, Liu K, Qiu J (2021) Synergistic effect of pulsed electric fields and temperature on the inactivation of microorganisms. *AMB Express* **11**, 1-16.

<https://doi.org/10.1186/s13568-021-01206-8>

Zhang S, Yang R, Zhao W, Liang Q, Zhang Z (2011) The first ESR observation of radical species generated under pulsed electric fields processing. *LWT - Food Sci Technol* **44**, 1233-1235. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.016>

Zhao W, Yang R, Shi X, Pan K, Zhang S, Zhang W i sur. (2011) Oxidation of oleic acid under pulsed electric field processing. *Food Res Int* **44**, 1463-1467. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.022>

Zhu H, Wang SC, Shoemaker CF (2016) Volatile constituents in sensory defective virgin olive oils. *Flavour Fragr J* **31**, 22-30. <https://doi.org/10.1002/ffj.3264>

Zullo BA, Ciafardini G (2020) Virgin Olive Oil Quality Is Affected by the Microbiota that Comprise the Biotic Fraction of the Oil. *Microorganisms*, **8**, 663. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050663>

Žanetić M, Gugić M (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica: glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **12**, 159-173. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/4509>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis