

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2025.

Monika Dilber

**UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNOLOGIJA NA
TOKOFEROLE I ANTIOKSIDACIJSKI
KAPACITET HRVATSKIH DJEVIČANSKIH
MASLINOVIH ULJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga 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

Ponajprije želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić, kao i Katarini Filipan, mag. ing. aliment. techn. i tehničarki Melisi Trputec na prenesenom znanju i pomoći u izradi ovog rada.

Neopisivo sam zahvalna na ljudima s kojim sam dijelila studentske klupe i laboratorijsko posuđe. Hvala Marko, Ivona, Petra, Barbara, Martina, Yaseen i Sara što ste mi učinili dane studiranja lakšima i ljepšima!

Posebno sam zahvalna što sam upisom na ovaj fakultet na prvom danu upoznala svoju najbolju prijateljicu Magdalenu Bunić. Zahvalna sam na njenoj ogromnoj potpori tijekom izrade ovog rada, kao i kod učenja i svakog projekta tijekom studiranja te na tome što je dijelila sa mnom suze i smijeh, svaki uspjeh i neuspjeh. Uz nju i njezinog brata Lovru sam naučila što je pravo prijateljstvo i po njima ću uvijek pamtiti svoje studentske dane. Zahvalna sam da sam upoznala tako divne ljude poput njih dvoje koji su mi svaki dan poboljšali i ispunili smijehom te će stoga zauvijek imati posebno mjesto u mom srcu.

Zahvalna sam na prijateljici Mariji Kezele koja mi je uvijek bila potpora i motivacija i navijala je glasno za mene da nikad nisam čula one koji nisu. Posebno cijenim prijateljicu Renatu Mavrić koja mi je ubrzo postala i ostala veliki uzor, a svakom mom uspjehu se radovala jednako kao i svom.

Za kraj, želim zahvaliti svojoj sestri Ivani koja mi je oduvijek bila velika podrška, a najviše od svega, hvala mojim roditeljima, Marku i Mileni Dilber, zbog kojih sam imala privilegiju studiranja koju mnogi nemaju. Zahvalna sam na njihovoj konstantnoj potpori i vjeri u mene.

Iznimno sam zahvalna na stečenom znanju, zvanju i prijateljima koje ću imati uz sebe cijeli život.

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

Sveučilišni diplomski studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNOLOGIJA NA TOKOFEROLE I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET HRVATSKIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

Monika Dilber, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058216966

Sažetak:

Posljednjih godina raste interes za korištenje inovativnih tehnologija (pulsirajuće električno polje - PEP, ultrazvuk - UZV, ubrzani toplinski tretman - UTT) u preradi djevičanskog maslinovog ulja (DMU) u svrhu poboljšanja njegove kvalitete. Antioksidansi prirodno prisutni u maslini, poput fenolnih spojeva i tokoferola, nastoje se očuvati tijekom proizvodnje ulja. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj korištenja inovativnih tehnologija, kao predtretman miješenju, na antioksidacijski kapacitet (AK) i udio tokoferola u DMU hrvatske sorte levantinke. Također, ispitala se mogućnost zamjene faze miješenja kombinacijama inovativnih tehnika. Udio α -tokoferola određen je HPLC metodom, a AK DPPH metodom s pomoću EPR spektroskopije. Utvrđeno je da je miješenje ključno i neizostavno za ekstrakciju α -tokoferola, a od inovativnih tehnika jedino je UZV značajno povećao udio α -tokoferola. Inovativne tehnike kao samostalni tretmani nisu utjecale na AK, dok su kombinacije UTT/PEP, PEP/UZV i UTT/PEP/UZV smanjile AK, a izostavljanje miješenja povećalo je AK. Korelacija između α -tokoferola i AK je dobra, ali negativna.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje, hrvatske autohtone sorte, antioksidacijski kapacitet, tokoferoli, inovativne tehnike

Rad sadrži: 40 stranica, 8 slika, 2 tablice, 63 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. Natka Ćurko (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujna 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Master 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

University graduate study programme: Food Engineering

INFLUENCE OF INNOVATIVE TECHNOLOGIES ON TOCOPHEROLS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF CROATIAN VIRGIN OLIVE OILS

Monika Dilber, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058216966

Abstract:

In recent years, there has been an emerging interest towards the use of innovative technologies (pulsed electric field - PEF, ultrasound - US, flash thermal treatment - FTT) in the processing of virgin olive oil (VOO) in order to improve its quality. Antioxidants naturally present in olives, such as phenolic compounds and tocopherols, are sought to be preserved during oil production. The aim of this work was to determine the influence of innovative technologies, as a pretreatment for malaxation, on the antioxidant capacity (AC) and the tocopherol content in VOO of the Croatian Levantinka variety. Also, the possibility of replacing the malaxation phase with combinations of innovative technologies was examined. HPLC method was used to determine the α -tocopherol content and AC was determined using the DPPH method and EPR spectroscopy. Malaxation was found to be crucial for the extraction of α -tocopherols, and among the innovative technologies, only US significantly increased the α -tocopherol content. Innovative technologies as independent treatments did not affect AC, whereas combinations of US/PEF, PEF/US and FTT/PEF/US reduced AC. Omitting malaxation increased AC. The correlation between α -tocopherol and AC is good, but negative.

Keywords: virgin olive oil, Croatian autochthonous olive varieties, antioxidative capacity, tocopherols, innovative technologies

Thesis contains: 40 pages, 8 figures, 2 tables, 63 references

Original in: Croatian

Master 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. Natka, Čurko, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra, Balbino, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 22nd, 2025

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	2
2.1.1. Antioksidansi	2
2.1.2. Fenolni spojevi	3
2.1.3. Tokoferoli	7
2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	8
2.3. NOVE TEHNIKE U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	10
2.3.1. Ultrazvuk	11
2.3.2. Pulsirajuće električno polje	11
2.3.3. Ubrzani toplinski tretman	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Određivanje tokoferola	15
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH [•] metodom EPR spektroskopijom	17
3.2.3. Obrada podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. UDIO α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HRVATSKIH AUTOHTONIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA	19
4.2. UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNIKA NA UDIO α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA	23
4.3. KORELACIJA UDJELA α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA	31
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA	34

1. UVOD

Antioksidansi su spojevi koji su posljednjih godina centar pozornosti brojnih istraživanja. Spojevi koji posjeduju antioksidacijska svojstva pomažu organizmu da djeluje na oksidativni stres čime se smanjuje rizik od raznih bolesti. Oni se mogu sintetizirati ili biti prirodno prisutni u hrani, kao što je slučaj s plodom masline u kojoj prirodno prisutni spojevi posjeduju antioksidacijska svojstva, poput polifenola i tokoferola.

Polifenoli su hidrofilna skupina spojeva kojima je antioksidacijsko djelovanje primarna funkcija, dok tokoferoli unatoč antioksidacijskoj ulozi, najvažniju ulogu imaju u zaštiti polinezasićenih masnih kiselina od oksidativnog stresa. S obzirom na bitan učinak antioksidansa na zdravlje, nastoji se povećati njihov udio u hrani prilikom njezine proizvodnje. Kako ne bi došlo do gubitka spojeva prilikom rafinacije, najviše ispitivanja provodi se na djevičanskim uljima.

U prehrambenoj industriji, sve je veći interes usmjeren na nove tehnike obrade hrane, kao što su ultrazvuk, pulsirajuće električno polje i ubrzani toplinski tretman. Neke od brojnih prednosti ovih tehnika su manji utjecaj na okoliš, kraće vrijeme tretiranja te ujedno i očuvanje spojeva prisutnih u izvornoj sirovini hrane koja se obrađuje, a koji se nastoje održati i u konačnom proizvodu. U proizvodnji maslinovog ulja, ove tehnike obično se primjenjuju kao predtretman miješenju.

Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj inovativnih tehnologija kao predtretmana miješenju na udjel α -tokoferola i antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja. Miješenje je faza koja je veoma bitna zbog enzimskih reakcija koje se pritom odvijaju i nastaju spojevi koji pridonose nutritivnim i organoleptičkim svojstvima ulja. Unatoč njezinoj važnoj ulozi, riječ je o energetski veoma zahtjevnoj fazi, stoga je jedan od ciljeva ovoga rada bio ispitati može li se implementacijom inovativnih tehnologija i njihovom kombinacijom izostaviti faza miješenja prilikom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

2.1.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje kontroliraju, odgađaju ili inhibiraju oksidaciju, a njihova prisutnost u hrani povećava i njezinu nutritivnu vrijednost i kvalitetu. Prisustvo antioksidansa u tijelu smanjuje rizik od degenerativnih bolesti koje nastaju zbog oksidativnog stresa. Antioksidansi koji su prirodno prisutni u hrani ili se u nju dodaju mogu biti primarne ili sekundarne prirode (Shahidi, 2015). Primarni antioksidansi reagiraju s lipidnim radikalima tako da im doniraju elektron ili atom vodika te stvaraju nereaktivne radikale čime sprječavaju fazu propagacije u lipidnoj oksidaciji (Šarolić i sur., 2015). S druge strane, sekundarni antioksidansi djeluju tako da neutraliziraju prooksidativne katalizatore. Primjerice, antioksidansi poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i limunske kiseline (CA) djeluju na kelatore prooksidativnih metalnih iona kao što su bakar i željezo. Sekundarni antioksidansi mogu djelovati i tako da deaktiviraju reaktivne vrste poput singletnog kisika. Primjer antioksidansa koji tako djeluje je β -karoten (Shahidi, 2015). Osim toga, mogu obnavljati primarne antioksidanse tako da im predaju svoj atom vodika. Prirodno prisutni sekundarni antioksidansi su fosfolipidi i skvalen (Škevin, 2016). Postoje i sintetski antioksidansi poput butiliranog hidroksianizola (BHA), butiliranog hidroksitoluena (BHT), propil galata (PG) i tertbutilhidrokinona (TBHQ). Oni su korišteni kao primarni antioksidansi za zaustavljanje slobodnih radikala te kontrolu oksidacije i razvoja neugodnog okusa. Međutim, sve je veći interes usmjeren na proučavanje prirodnih antioksidansa zbog dokazane toksičnosti i kancerogenih učinaka nekih sintetskih antioksidansa kod životinja pri vrlo visokim koncentracijama (Shahidi, 2015).

Prema epidemiološkim istraživanjima postoje raznoliki izvori antioksidanasa u svakidašnjoj prehrani čovjeka poput vitamina C i E te β -karotena. U posljednje vrijeme su u veći fokus stavljeni antioksidansi koji nisu vitamini, poput fenolnih komponenti, koji također preveniraju oksidativna oštećenja u organizmu. Ovi spojevi se mogu pronaći u maslinovom ulju te osim što sprječavaju autooksidaciju ulja, doprinose i njegovim organoleptičkim karakteristikama (Nakbi i sur., 2010). Oksidacija biljnih ulja prilikom skladištenja negativno utječe na njihov rok trajanja, ali i na organoleptička svojstva. Proces oksidacije ovisi o sastavu masnih kiselina, prisutnosti kisika, temperaturi te količini antioksidansa u samom ulju. Kako bi se smanjila mogućnost oksidacije, ulja se moraju skladištiti u mračnom prostoru, a boce moraju biti dobro zatvorene i gotovo do vrha napunjene i kako bi se osigurala najmanja moguća dodirna površina ulja i kisika te spriječila užeglost (Yalcin i Schreiner, 2017).

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) je biljno ulje koje se proizvodi iz plodova masline (*Olea europaeae* L.). Njegova konzumacija oduvijek je karakteristična za mediteransku prehranu, a posljednjih godina se sve više i više koristi diljem svijeta. Nutritivnoj vrijednosti ovog ulja pridonosi visoki udio oleinske masne kiseline i manjih spojeva poput fitosterola, karotenoida, tokoferola i hidrofilnih fenola. Međutim, njihova koncentracija nije jednaka u svakom ulju već ovisi o raznim čimbenicima poput sorte, agrotehničkih uvjeta tijekom uzgoja, indeksa zrelosti, načina proizvodnje te ostalih postupaka obrade i uvjeta prilikom obrade i skladištenja. Karotenoidi, fenoli i tokoferoli posjeduju sinergističko antioksidativno i antikancerogeno djelovanje te pridonose oksidacijskoj stabilnosti maslinovog ulja (Šarolić i sur., 2015).

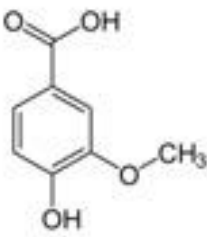
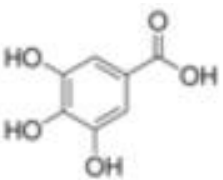
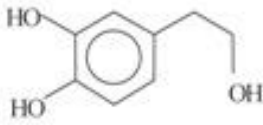
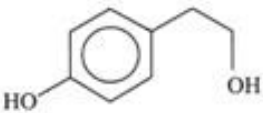
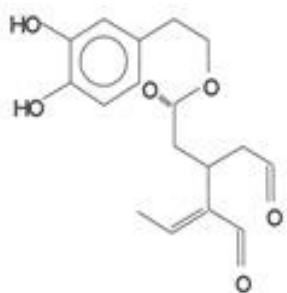
2.1.2. Fenolni spojevi

Prilikom procjene kvalitete DMU treba uzeti u obzir i sadržaj fenolnih spojeva zbog njihovog antioksidativnog djelovanja i doprinosa oksidacijskoj stabilnosti ulja (Šarolić i sur., 2015). Fenolni spojevi sadrže *o*-difenolnu, odnosno kateholnu skupinu, za koju je poznato da je povezana s antioksidativnim djelovanjem (Tuck i Hayball, 2002). U usporedbi s drugim uljima, polifenoli su kao aktivna hidrofilna skupina spojeva prisutni u značajnim količinama samo u djevičanskim uljima jer se praktički gube tijekom rafinacije (Velasco i Dobarganes, 2002). Polarni fenolni spojevi DMU razvrstavaju se u različite skupine; fenolne kiseline, feniletil alkoholi, hidroksiizokromani, flavonoidi, lignani i sekoiridoidi (Šarolić i sur., 2015). Mogu se pronaći u različitim koncentracijama, od 50 do 940 mg/kg, na što uvelike utječu sorta, agronomski čimbenici kao i tehnološki uvjeti prerade ulja (Servili i sur., 2013).

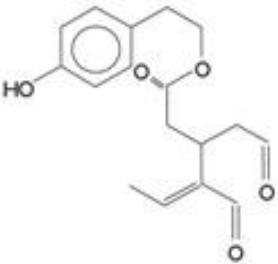
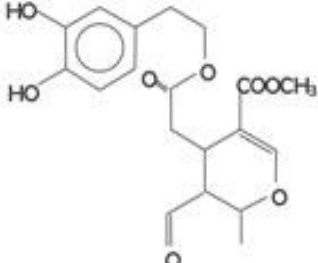
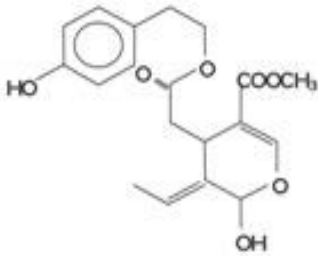
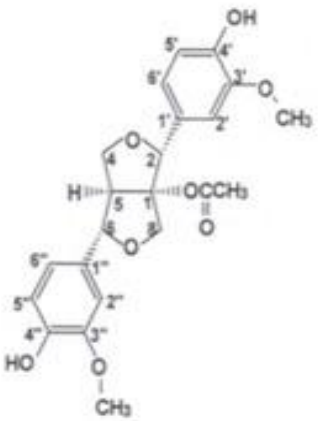
U maslinama je koncentracija fenolnih spojeva značajno viša nego u ulju i kreće se između 1 % i 3 % težine svježje pulpe. Najzastupljeniji su sekoiridoidni glukozidi, a u najmanjim koncentracijama, s rasponom 5–60 µg/kg, mogu se pronaći hidroksiizokromani (Servili i sur., 2013). U DMU su od velike važnosti fenolni alkoholi hidroksitirozol i tirozol te sekoiridoidi oleokantal, oleacein, oleuropein i ligstrozid, kao i njihovi aglikoni i derivati. Sekoiridoidi su skupina spojeva koji se nalaze u svih 500 vrsta biljaka *Oleaceae* i čine većinu polifenola u maslinovom ulju. Većina sekoiridoidnih derivata potječe od oleuropeina i ligstrozida, koji su glavni sekoiridoidi u plodu masline (Emma i sur., 2021). Kemijska struktura sekoiridoida predstavljena je dialdehidnim oblikom dekarboksimetil elenolne kiseline (EDA) vezane za hidroksitirozol ((3,4-dihidroksifenil) etanol (3,4 DHPEA)) - 3,4-DHPEA-EDA ili vezane za tirozol, odnosno ((*p*-hidroksifenil) etanol (*p*-HPEA)) - *p*-HPEA-EDA. U proizvodnji DMU, prilikom procesa mljevenja, miješenja i centrifugiranja, dolazi do hidrolize oleuropeina, dimetiloleuropeina i ligstrozida. Te reakcije kataliziraju endogeni enzimi β-glukozidaze te

pritom nastaju aglikonski derivati sekoiridoidnih glukozida poput izomera oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EA) i ligstrozid aglikona (p-HPEA-EA). U tablici 1 navedeni su i prikazani fenolni spojevi prisutni u DMU (Servili i sur., 2013).

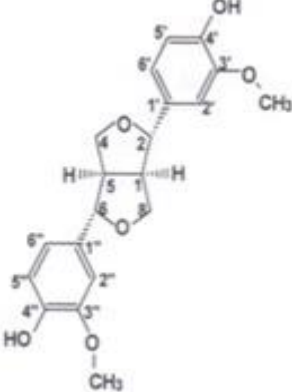
Tablica 1. Kemijska struktura i koncentracija (mg/kg) fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju izračunata na 210 uzoraka ulja (*prema* Servili i sur., 2013)

Skupina	Spoj	Kemijska struktura	Koncentracija (mg/kg)		
			Srednja vrijednost	Donji kvintil	Gornji kvintil
<i>Fenolne kiseline</i>	Vanilinska kiselina		0,2	0	0,3
	Kafeinska kiselina		0,4	0,2	0,7
<i>Fenolni alkoholi</i>	(3,4-dihidroksifenil) etanol (3,4 DHPEA) - hidroksitirosol		1,8	1	3,6
	(p-hidroksifenil) etanol (p-HPEA) - tirosol		1,9	0,6	5
<i>Sekoiridoidi</i>	Dialdehidni oblik dekarboksimetil elenolne kiseline vezane na hidroksitirosol (3,4 DHPEA-EDA)		185,7	48,2	631,1

Tablica 1. Kemijska struktura i koncentracija (mg/kg) fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju izračunata na 210 uzoraka ulja (*prema* Servili i sur., 2013) - nastavak

Skupina	Spoj	Kemijska struktura	Koncentracija (mg/kg)		
			Srednja vrijednost	Donji kvintil	Gornji kvintil
Sekoiridoidi	Dialdehidni oblik dekarboksimetil elenolne kiseline vezane na tirosol (p-HPEA-EDA)		36,1	22,5	78,8
	Oleuropein aglikon (3,4 DHPEA-EA)		126,3	61	231
	Ligstrozid aglikon (p-HPEA-EA)		n.d.	n.d.	n.d.
Lignani	(+)-1-Acetoksipinoresinol		24,6	12,9	30,8

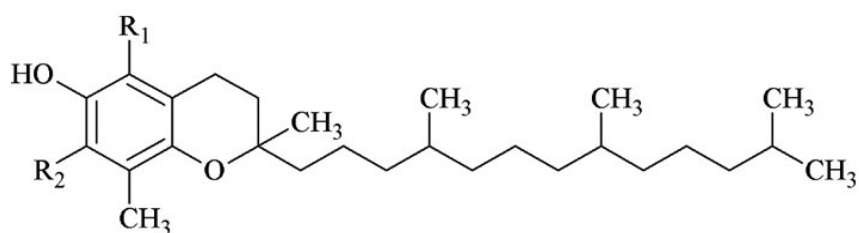
Tablica 1. Kemijska struktura i koncentracija (mg/kg) fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju izračunata na 210 uzoraka ulja (*prema* Servili i sur., 2013) - nastavak

Skupina	Spoj	Kemijska struktura	Koncentracija (mg/kg)		
			Srednja vrijednost	Donji kvintil	Gornji kvintil
Lignani	(+)-1-Pinoresinol		14,4	8,8	47,7

Već dugi niz godina pokazuje se da polifenoli, a posebno *o*-difenoli, najviše doprinose oksidacijskoj stabilnosti DMU (Velasco i Dobarganes, 2002). Prisutni fenolni spojevi posjeduju antioksidativne, protuupalne, kardioprotektivne, neuroprotektivne, antikancerogene, antidiijabetičke, antimikrobne i mnoge druge učinke, *in vitro* i *in vivo*. Brojna istraživanja dokazuju da su za navedene učinke uglavnom zaslužni glavni derivati sekoiridoida poput ligstrozida, oleuropeina, oleokantala i oleaceina te jednostavnih fenola kao što su tirosol i hidroksitirosol (Martins i sur., 2022). Dokazano je da su fenolni spojevi dobri inhibitori LDL oksidacije *in vitro* te da smanjuju rizik od srčanih bolesti i razvoja raka. Također je utvrđeno da hidroksitirosol samostalno smanjuje rizik od koronarne bolesti srca i ateroskleroze (Tuck i Hayball, 2002). EFSA (Europska agencija za sigurnost hrane) (2011) je dopustila korištenje znanstvene tvrdnje „Konzumacija polifenola maslinovog ulja doprinosi zaštiti lipida u krvi od oksidativnog oštećenja.“ Navedena tvrdnja vrijedi ako se dnevno konzumira 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata (npr. oleuropein kompleksa i tirosola) u maslinovom ulju, a potrošaču se mora dati informacija da se učinak postiže dnevnim unosom od 20 g maslinovog ulja.

2.1.3. Tokoferoli

Tokoferoli su prirodni antioksidansi koji se sintetiziraju u svim biljnim tkivima. Riječ je o amfipatskim molekulama koje imaju hidrofojni, zasićeni bočni lanac, te hidrofilni kromanolni prsten (Jukić Špika i sur., 2016). Uz antioksidacijsko, tokoferoli posjeduju i vitaminsko djelovanje. Aktivnost vitamina E posjeduje osam različitih spojeva s tokokromanolnom strukturom koje proizvode isključivo biljke, a to su četiri tokoferola i četiri tokotrienola (Pérez i sur., 2019). Tokoferoli u plodu masline se pojavljuju u četiri lipofilna izomera, α -, β -, γ -, i δ -tokoferol. Dominantan oblik je α -tokoferol koji čini oko 90 % ukupnih tokoferola (Mousavi i sur., 2022). Navedena četiri izomera razlikuju se po broju i položaju metilnih skupina u aromatskom prstenu, što je vidljivo i na slici 1, zbog čega postoje razlike i u njihovim antioksidacijskim svojstvima. Antioksidacijska aktivnost se *in vitro* povećava redoslijedom $\alpha < \beta < \gamma < \delta$, dok je u *in vivo* suprotan redoslijed, tj. najveću aktivnost ima α -tokoferol, što predstavlja aktivnost vitamina E (Jukić Špika i sur., 2016).



Tokoferol	R ₁	R ₂
α -	CH ₃	CH ₃
β -	CH ₃	H
γ -	H	CH ₃
δ -	H	H

Slika 1. Struktura tokoferola (*prema* Jukić Špika i sur., 2016)

Tokoferoli djeluju kao antioksidansi hvatanjem peroksidnih radikala polinezasićenih masnih kiselina ili reakcijom sa singletom kisika i drugim reaktivnim vrstama kisika tako da doniraju atom vodika iz hidroksilne skupine na polarnom kromanolnom prstenu čime se stvara tokoferolni radikal. Tada se unutar kromanolnog prstena postiže rezonanca koja čini molekulu stabilnom. Molekula se vrlo brzo može vratiti u odgovarajući oblik tokoferola čime je omogućeno da svaki tokoferol sudjeluje u više reakcija kojima će se smanjiti oksidativni stres. Primarna zadaća tokoferola je zaštita polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) od oksidacije.

Jedna molekula tokoferola može zaštititi oko 10^3 – 10^8 polinezasićenih masnih kiselina pri niskim peroksidnim vrijednostima (Jukić Špika i sur., 2016). Osim toga, tokoferoli svojim vitaminskim djelovanjem štite tkiva od oksidativnih oštećenja tako da ograničavaju lipidnu peroksidaciju u staničnim membranama i hvataju reaktivne vrste kisika. Brojna istraživanja pokazala su da vitamin E ima pozitivne učinke na kardiovaskularne bolesti, karcinome, kronične upale te Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (Pérez i sur., 2019).

Ukupni sadržaj tokoferola u plodu masline kreće se u rasponu od 135 do 579 mg/kg. Na varijacije velik utjecaj ima genotip, ali i ostali agronomski i geografski čimbenici (Mousavi i sur., 2022). Koncentracija ukupnih tokoferola u DMU-u može se pronaći u rasponu od 97 do 785 mg/kg, a povećanjem indeksa zrelosti ploda masline, smanjuje se ukupan udjel tokoferola u DMU-u (Jukić Špika i sur., 2016). U DMU-u tokoferoli, zajedno s polifenolima, djeluju u ranim fazama oksidacije. Međutim, doprinos tokoferola oksidacijskoj stabilnosti DMU smatra se manje važnim u usporedbi s doprinosom polifenola. S time da je važno spomenuti da osim djelovanja kao hvatača lipidnih radikala, tokoferoli također inhibiraju fotooksidaciju reagirajući sa singletnim kisikom. Tako doprinose povećanju oksidacijske stabilnosti ulja tijekom skladištenja u prisutnosti svjetlosti (Velasco i Dobarganes, 2002).

2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (International Olive Oil Council; IOOC) objavilo je međunarodno priznate definicije maslinovih ulja dostupnih na tržištu: „DMU je ulje dobiveno od ploda masline isključivo mehaničkim ili drugim fizičkim postupcima pod uvjetima, posebno toplinskim uvjetima, koji ne dovode do promjena u ulju, i koje nije prošlo nikakav tretman osim pranja, dekantiranja, centrifugiranja i filtracije. Maslinovo ulje je ulje proizvedeno ekstrakcijom ploda masline (*Olea Europaea* Sativa), isključujući ulja dobivena korištenjem otapala ili postupaka reesterifikacije te bilo kakve mješavine s uljima drugih vrsta.“ (Firestone, 2005).

Berba maslina obično počinje sredinom jeseni i traje do kraja veljače, s time da u nekim regijama počinje ranije, a u drugima traje i do ožujka (Firestone, 2005). Riječ je o delikatnom procesu, a sama kvaliteta DMU-a ovisi o nizu čimbenika od kojih je prvi upravo stupanj zrelosti ploda (Hamm i sur., 2013). Stoga se mogu očekivati razlike u kvaliteti i sastavu ulja, uz varijacije uzrokovane klimatskim i pedološkim uvjetima. Varijacije u kvaliteti uglavnom su povezane s udjelima manje zastupljenih komponenti i aromatskih spojeva, kiselošću i prisutnošću mono- i diglicerida. Način na koji je provedena berba vrlo je važan za proizvodnju visokokvalitetnog ulja. Masline treba brati čim dosegnu optimalnu zrelost. Mogu se koristiti mehanički uređaji, a berba se zna obavljati i ručno zbog konformacije grana stabla, jakog

prianjanje ploda uz stablo i ograničene dostupnosti. Prije samog izdvajanja ulja, potrebno je odvojiti lišće i oprati plodove masline (Firestone, 2005).

Proces izdvajanja DMU uključuje mljevenje plodova, miješenje maslinovog tijesta te naposljetku izdvajanje ulja prešanjem ili centrifugiranjem. Ključni koraci u procesu su mljevenje i miješenje zbog njihovog utjecaja na kemijski sastav ulja. Tijekom mljevenja se stanične strukture ploda razbijaju što omogućuje oslobađanje ulja pohranjenog u vakuolama mezokarpa, a ujedno enzimi i njihovi supstrati, koji su prethodno bili odvojeni u različitim dijelovima stanice, dolaze u kontakt. Time se pokreće niz biokemijskih reakcija, od kojih su neke ključne za stvaranje spojeva bitnih za funkcionalna i organoleptička svojstva DMU, poput fenolnih i hlapljivih spojeva (Navarro i sur., 2022). Pojava hidrofilnih fenola u DMU je povezana s aktivnošću različitih endogenih enzima ploda masline, a na njihovu koncentraciju utječu uvjeti mljevenja i miješenja (Servili i sur., 2004). Prilikom mljevenja dolazi do enzimskog djelovanja kojim se hidroliziraju fenolni glukozidi na manje polarne fenole koji su topljiviji u ulju, a istovremeno se povećava količina tokoferola u ulju (Firestone, 2005). Ključni enzimski sustav koji kontrolira hidrolizu fenolnih glikozida kada su tkiva masline oštećena su endogene β -glukozidaze. Njihova važnost za kvalitetu ulja proizlazi iz njihove sposobnosti hidrolize prekursora okusa, čime se oslobađaju aglikoni koji pružaju poželjna organoleptička svojstva hrani (Romero-Segura i sur, 2009).

Miješenje je potrebno za razgradnju emulzije nastale mljevenjem i pomaže u ujedinenju malih, dispergiranih kapljica ulja, u veće koje pomažu u povećanju iskorištenja procesa proizvodnje. Tijekom miješenja, neki od biokemijskih procesa koji su započeti u fazi mljevenja ostaju aktivni, a nastali spojevi se raspodjeljuju između vodene i uljne faze (Navarro i sur., 2022). Pritom može doći do razgradnje manje polarnih komponenti u spojeve topljive u vodi koji se uklanjaju iz ulja, što uzrokuje gubitak većeg dijela antioksidansa ulja (Firestone, 2005). U fazi miješenja dolazi do kontinuiranog ugrađivanja kisika u tijesto maslina zbog čega su i dominantne reakcije oksidacije. Povećanje vremena miješenja obično daje veći prinos prilikom izdvajanja ulja, ali može imati i negativan utjecaj na organoleptičku kvalitetu ulja. Stoga se provode daljnja istraživanja kako bi se povećala učinkovitost izdvajanja ulja s blagim uvjetima miješenja ili uz izostavljanje miješenja (Navarro i sur., 2022).

Proces izdvajanja ulja može se provoditi prešanjem ili centrifugalnom ekstrakcijom. Prešanje je najstarija metoda. Dobivena pasta se iz mijesilice stavlja u hidrauličnu prešu i raspoređuje u slojevima te sam postupak traje između 1 i 1,5 sati. Preša odvaja tekuću fazu, koju čine voda i ulje, od čvrste faze, tj. komine, koja sadrži koštice i ostatke pulpe. Ulje i voda se zatim odvajaju centrifugiranjem. Prešanje je jednostavan i učinkovit proces, ali istovremeno intenzivan i diskontinuiran te su troškovi rada visoki, kao i rizik od kontaminacije u preši. Prinos ulja je 86-90 % te se danas koristi samo u vrlo malim pogonima. Izdvajanje ulja centrifugalnom

ekstrakcijom omogućuje smanjenje operativnih troškova i povećanje proizvodnog kapaciteta. Odvajanje ulja provodi se u horizontalnim separatorima, koji se nazivaju dekanteri. Dugi niz godina odvajanje se provodilo u trofaznim centrifugama te je bilo potrebno dodati vodu kako bi se dobila tekuća pasta, poboljšalo odvajanje i povećao prinos ulja. Međutim, upravo zato se stvaralo dvostruko više otpadnih voda od tradicionalnog prešanja što je predstavljalo nedostatak procesa, a s otpadnim vodama su se gubili i neki antioksidansi (Hamm i sur., 2013). Razvojem tehnologije počinju se koristiti dvofazne centrifuge gdje je jedna faza DMU, a druga komina i vegetabilna voda. Tako je dodavanje vode minimalno, međutim kao problem se javlja vlažna komina koja se mora dodatno obraditi i zbrinuti. Stoga su se razvile opsijske centrifuge s dvije ili tri faze gdje se DMU izdvaja bez dodatka vode ili uz 10-25 % dodavanja vode (Škevin, 2016). Dobivena je mješavina DMU i vegetabilne vode te je potrebno odvojiti DMU. Taj proces se provodi na vertikalnim centrifugalnim separatorima. Zatim je ulje potrebno izbistriti, što se postiže procesom filtriranja ili pažljivim taloženjem (Hamm i sur., 2013).

DMU je potrebno skladištiti u posebnim spremnicima od nehrđajućeg čelika, a ambalaža u kojoj se čuva ulje izrađena je od tamnog stakla zbog negativnog utjecaja plastične ambalaže na senzorska svojstva ulja. Bitno je da su svi materijali koji se koriste u procesu rukovanja i skladištenja izrađeni od materijala koji je fizikalno i kemijski inertan prema ulju. Kako bi se produžila trajnost ulja, u boce se prije zatvaranja upuhuje inertan plin dušik (Ghanbari Shendi i sur., 2018).

2.3. NOVE TEHNIKE U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Razne inovativne tehnike, koje se istražuju za poboljšanje procesa proizvodnje DMU, za cilj imaju povećanje ekstraktibilnosti ulja te očuvanje ili čak poboljšanje kvalitete DMU. To su primjerice pulsirajuće električno polje, ultrazvuk, mikrovalovi, visoki hidrostatski tlak i slične tehnologije kojima je zajednička modifikacija stanične strukture i oslobađanje unutarstaničnih sadržaja kako bi se povećao prinos ulja. Svaka tehnologija različito utječe na staničnu strukturu masline zbog toplinskih i netoplinskih tretmana koji su povezani s naglim i brzim promjenama temperature, tlaka, energije, električnog potencijala ili neke njihove kombinacije. Novi tretmani se najčešće koriste za poboljšanje faze mljevenja i miješenja. Time se uz povećani prinos ulja može postići i poboljšanje kvalitete DMU zbog povećanja sadržaja α -tokoferola i/ili hidrofilnih fenola u ulju koji su povezani sa zdravstvenim i organoleptičkim svojstvima. Međutim, bitno je uzeti u obzir da se prilikom utjecaja na tijesto maslina mogu osloboditi i spojevi poput voskova, sterola, hlapljivih spojeva i dr. koji negativno utječu na karakteristike DMU-a i njegovu oksidacijsku stabilnost (Taticchi i sur., 2019).

2.3.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk (UZV) je mehanički val koji zahtijeva prisutnost elastičnog medija kroz koji se može širiti. Postoje 2 skupine ultrazvuka i obje se koriste u prehrambenoj industriji, a to su ultrazvuk niske frekvencije, koji koristi frekvencije 20 – 100 kHz, i visoke frekvencije, koji koristi frekvencije 2-10 MHz (Pingret i sur., 2013). Prilikom prolaska ultrazvučnih valova kroz tekući medij, dolazi do pucanja međumolekulskih veza. Kao posljedica dolazi do faza kompresija i širenja u tekućem mediju te se javljaju promjenjivi tlakovi i polako se stvaraju mjehurići. Stvaranje mjehurića je fenomen djelovanja ultrazvuka, poznatiji pod nazivom kavitacija. Kavitacija je postupak stvaranja, rasta i implodiranja mjehurića plina u tekućinu. Prilikom faza kompresije i širenja dolazi do promjene u veličini mjehurića, a kada dosegnu kritičnu veličinu, naglo implodiraju oslobađajući pritom veliku količinu energije. Zbog ovog efekta ultrazvuk ima veliku primjenu u prehrambenoj industriji za ekstrakciju spojeva iz biljnih izvora (Rutkowska i sur., 2017).

U procesu proizvodnje DMU prije i nakon faze miješenja počinje se koristiti ultrazvuk u svrhu efikasnijeg izdvajanja ulja (Taticchi i sur., 2019). Prilikom djelovanja ultrazvuka ako se kavitacija, odnosno implozija mjehurića, dogodi u blizini stanične stijenke paste masline dolazi do njezinog razaranja te se oslobađa unutarstanični sadržaj. Tako se izdvaja ulje iz stanica koje se nisu uspjele razbiti korištenjem mlina, a ujedno se i izdvajaju manje molekule poput fenolnih spojeva (Juliano i sur., 2023). Neki autori koji su koristili UZV velike snage pokazali su ograničen utjecaj na prinos ulja, smanjenje fenolnih spojeva te povećanje α -tokoferola, klorofila i karotenoida. S druge strane, novija istraživanja pokazuju poboljšanu učinkovitost UZV sustava gdje je ustanovljeno povećanje prinosa ulja i udjela fenolnih spojeva. Razlog tomu je vjerojatno bolja kontrola parametara koji utječu na procese oksidacije i enzimatsku aktivnost, što zvuči obećavajuće za daljnja istraživanja primjene ultrazvuka (Taticchi i sur., 2019).

2.3.2. Pulsirajuće električno polje

Pulsirajuće električno polje (PEP) smatra se novijom, netoplinском tehnologijom koja uključuje primjenu vrlo kratkih, visokonaponskih impulsa na tvar koja se nalazi između dvije elektrode ili se pumpa kroz njih. Iako je netoplinска metoda, prilikom primjene PEP-a ipak dolazi do zagrijavanja obrađene tvari zbog disipacije električne energije, što se naziva omsko zagrijavanje. Sustav PEP-a sastoji se od generatora impulsa i komore za obradu. Generator sadrži punjač kojim se izmjenična struja pretvara u istosmjernu i puni se uređaj za pohranu energije te se zatim taj naboj kroz elektrode otpušta u sustav u obliku impulsa s unaprijed

određenim oblikom i trajanjem. PEP djeluje tako da korišteni visoki napon između dvije elektrode stvara električno polje čija jakost ovisi o primijenjenom naponu i razmaku elektroda. Električno polje stvara transmembranski potencijal koji dovodi do elektroporacije, odnosno dolazi do stvaranja rupa u stijenci stanica. S obzirom na to da je PEP netermalne prirode, njegovom primjenom minimizira se pogoršanje kvalitete obrađenih spojeva. Stoga postoje mnoge praktične primjene PEP-a za poboljšanje prijenosa mase prilikom ekstrakcije u prehrambenoj industriji (Juliano i sur., 2023).

U posljednjih nekoliko godina industrija DMU pokazuje velik interes za PEP tehnologiju. Glavne prednosti primjene PEP-a u odnosu na konvencionalnu tehnologiju su smanjeno vrijeme obrade kao i niži intenzitet parametara prilikom izdvajanja ulja (temperatura i vrijeme miješenja), a također je povećan i prinos izdvajanja ulja te je poboljšana i kvaliteta maslinovog ulja. Smatra se da primjena PEP-a doprinosi i smanjenju troškova energije i utjecaja na okoliš (Leone i sur., 2022). Neka istraživanja prikazala su povećan prinos ulja nakon primjene PEP tehnologije, a zabilježena su i povećanja sadržaja bioaktivnih komponenti u ulju. Međutim, javlja se varijacija rezultata ovisno o sorti masline te uvjetima prilikom izdvajanja ulja (Navarro i sur., 2022). Predloženo je da se PEP primjenjuje i nakon mljevenja, za oslobađanje ulja elektroporacijom, i nakon miješenja kako bi se olakšao proces odvajanja ulja i vode i poboljšao prienos mase tijekom naknadnog centrifugiranja (Juliano i sur., 2023). Iako kvaliteta maslinovog ulja ovisi o mnogim čimbenicima prije i poslije berbe, primjena novih tehnologija može pomoći u preradi kako bi se poboljšala količina i kvaliteta ulja. Potencijal za širenje i rast sektora prerade maslina i dalje je velik, a PEP se smatra tehnologijom kojom bi se poboljšali procesi prijenosa mase u prehrambenoj industriji (Leone i sur., 2022).

2.3.3. Ubrzani toplinski tretman

Ubrzani toplinski tretman (UTT) jedna je od inovativnih tehnika koja se u posljednjih nekoliko godina razmatra za predtretman miješenja maslinova tijesta. Ova metoda se primjenjuje odmah nakon mljevenja i uključuje brzo hlađenje ili zagrijavanje paste maslina s ciljem postizanja temperature miješenja, a ujedno potencijalno eliminira potrebu za miješenjem u serijama (Škevin i sur., 2025). Primjenu UTT-a prvi su uveli Amirante i sur., (2006) ugradnjom izmjenjivača topline nakon uklanjanja koštica. Time je omogućeno trenutačno zagrijavanje paste na 27 °C, što je ukazalo značajnim poboljšanjima ukupnog sadržaja fenola, oksidacijske stabilnosti i ukupne senzorne kvalitete ulja. Ova metoda pokazala se uspješnom u daljnjim istraživanjima, osobito jer je dovela do smanjenja vremena miješenja i u daljnjim istraživanjima (Tamborrino i sur., (2021); Guerrini i sur., (2019)).

Dio istraživanja proučavalo je utjecaj ubrzanog zagrijavanja (Kraljić i sur., (2023); Leone i sur., (2016); Veneziani i sur., (2015); Fiori i sur., (2014); Taticchi i sur., (2014); Esposto i sur., (2013)), a dio ubrzanog hlađenja (Veneziani i sur., (2021); Veneziani i sur., (2018); Veneziani i sur., (2017)) maslinova tijesta i njihov utjecaj na skraćivanje faze miješenja te kvalitetu DMU. Iz navedenih istraživanja dolazi se do zaključaka da je UTT efektivan predtretman proizvodnji DMU. Korištenjem UTT-a skraćeno je vrijeme potrebno za toplinsko kondicioniranje prilikom miješenja, povećan je prinos ulja kao i sama kvaliteta ulja zbog povećanja fenolnih spojeva i hlapljivih komponenti, poput C6 aldehida i estera, odgovornih za aromu. UTT nije pokazao utjecaj na osnovne parametre kvalitete, peroksidne brojeve i K-brojeve, čime su doneseni zaključci da UTT ne pokazuje negativan utjecaj na normalnu razgradnju masti. Ipak, treba uzeti u obzir da će utjecaj UTT-a znatno varirati ovisno o sorti masline (Veneziani i sur., (2018); Veneziani i sur., (2017); Veneziani i sur., (2015)).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovome radu korišteno je DMU je proizvedeno 2023./2024. godine iz hrvatske autohtone sorte levantinka. Ulje je proizvedeno laboratorijskim postupkom centrifugalne ekstrakcije prema metodi opisanoj u završnom radu Makovac (2023). Neposredno nakon mljevenja, a kao predtretman fazi miješenja, korištene su inovativne tehnologije; ubrzani toplinski tretman (UTT), ultrazvuk (UZV) te pulsirajuće električno polje (PEP) i njihove kombinacije. U prethodne dvije godine istraživanja (sezona 2021./2022. i 2022./2023) utvrđeni su optimalni parametri za navedene predtretmane za sortu levantinka. Za UTT korištena je temperatura hlađenja od 19.5 °C, za UZV vrijeme tretmana od 5 min i snaga ultrazvučne kupelji od 576 W, a tretman PEP-om trajao je 90 s i korištena je jakost električnog polja od 2 kV/cm.

Ukratko, plodovi maslina su nakon čišćenja i pranja, samljeveni na mlinu čekićaru koji je dio polu-laboratorijske uljare OLEUM 30 COMPACT (Enotecnica Pillan Oleum 30 Compact, Camisano Vicentino, Italija). Dobiveno tijesto tretirano je jednom od inovativnih tehnika (UTT, UZV ili PEP) ili njihovom kombinacijom (UTT+UTV, UTT+PEP, PEP+UZV ili UTT+PEP+UZV) te je nakon tretmana stavljeno u inoks posude za miješenje. Miješenje je provedeno kroz 40 min s pomoću miješalice (VELP Scientifica, Usmate, Italija) pri 27 °C. Održavanje konstantne temperature omogućeno je uranjanjem inoks posuda u vodenu kupelj Stuart SBS40 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD). Kontrolni uzorci proizvedeni su bez predtretmana, a također je dio uzoraka u kojima su korištene kombinacije inovativnih tehnika proizveden i bez faze miješenja. Komina je od tekuće faze odvojena 10 minutnim centrifugiranjem pri 5000 o/min i sobnoj temperaturi na centrifugi Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Uljna faza je nakon kratkog odvajanja od vegetabilne vode dodatno centrifugirana 5 minuta pri 5000 o/min na 18 °C (Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Dobiveno bistro ulje prebačeno je u bočice od tamnog stakla, a prostor iznad ulja u bocama ispunjen je dušikom. Uzorci su do analiza čuvani u mraku na temperaturi 18 - 22 °C. Opis uzoraka prikazan je u tablici 2.

Također, sastav tokoferola i antioksidacijski kapacitet određen je i na uzorcima DMU proizvedenim iz hrvatskih autohtonih sorti maslina konvencionalnom metodom u industrijskim uvjetima prerade. Korištene su dvije autohtone istarske sorte, istarska bjelica i rosulja, te dvije dalmatinske, oblica i levantinka. Nakon proizvodnje, konvencionalni uzorci DMU su do analiza čuvani pod istim uvjetima skladištenja kao i laboratorijski proizvedena ulja.

Tablica 2. Opis uzroka DMU proizvedenih u laboratorijskim uvjetima uz predtretmane inovativnim tehnologijama (UTT - ubrzani toplinski tretman, UZV - ultrazvuk, PEP - pulsirajuće električno polje)

Oznaka uzorka	UTT 19,5 °C	PEP 2 kV/cm / 90 s	UZV 576 W / 5 min	Miješenje 27 °C / 40 min
kontrola	NE	NE	NE	DA
UTT	DA	NE	NE	DA
PEP	NE	DA	NE	DA
UZV	NE	NE	DA	DA
UTT/PEP	DA	DA	NE	DA
UTT/UZV	DA	NE	DA	DA
PEP/UZV	NE	DA	DA	DA
UTT/UZV/PEP	DA	DA	DA	DA
UTT/PEP BM	DA	DA	NE	NE
UTT/UZV BM	DA	NE	DA	NE
PEP/UZV BM	NE	DA	DA	NE
UTT/UZV/PEP BM	DA	DA	DA	NE

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje tokoferola

Udio tokoferola u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja određen je prema standardnoj metodi (HRN EN ISO 9936:2016) primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) uz fluorescentnu detekciju (FD), izokratskom metodom normalnih faza.

3.2.1.1. Priprema matične otopine standarda

Za pripremu matične otopine standarada (α -, β -, γ - i δ -tokoferola) potrebno je izvagati $5 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$, na vagi Kern ABP 200-5DM (KERN & SOHN, Balingen, Njemačka), u odmjernu tikvicu od 25 mL, nakon čega se tikvica do oznake napuni *n*-heptanom. Odmjerna tikvica se potom umota u aluminijsku foliju i skladišti na temperaturi od 4 °C, a može se koristiti do tjedan dana. Matičnoj otopini α -tokoferola se spektrofotometrijski odredi koncentracija kako bi se

omogućilo izražavanje koncentracije detektiranih tokoferola preko α - tokoferola. U tikvicu okruglog dna se otpipetira 5 mL matične otopine α -tokoferola. Zatim se na rotacijskom evaporatoru (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri temperaturi od 35 °C i sniženom tlaku u potpunosti ukloni *n*-heptan. Tikvica se propuše dušikom te se doda 10 mL metanola. Apsorbancija dobivene metanolne otopine mjeri se pri valnoj duljini od 292 nm na spektrofotometru UviLine 9400 (SECOMAM, Ales, Francuska). Točna koncentracija α -tokoferola u metanolu, izražena u $\mu\text{g/mL}$, izračuna se tako da se dobivena apsorbancija podijeli s 0,0076. Dobivena koncentracija se množi s 2 kako bi se dobila koncentracija α -tokoferola u matičnoj otopini standarda.

3.2.1.2. Priprema otopine standarda za injektiranje

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

3.2.1.3. Priprema uzorka

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

3.2.1.4. HPLC analiza

U HPLC (Agilent 1290 Infinity II uparen s 1260 FLD Spectra fluorescentnim detektorom, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) je injektirano 20 μL pripremljenog uzorka. Na koloni LiChroCART, Silica 60 kolonom (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm ; Merck, Darmstadt, Njemačka) je provedeno razdvajanje tokoferola, pri sobnoj temperaturi. Smjesa heksan/izopropanol (99,3/0,7) je korištena kao mobilna faza uz protok od 0,9 mL/min izokratski kroz 25 minuta. Na fluorescentnom detektoru je namještena valna duljina ekscitacije od 295 nm i valna duljina emisije od 330 nm.

Za identifikaciju α -tokoferola, β -tokoferola, γ -tokoferola i δ -tokoferola u uzorku, korištena su retencijska vremena komercijalno dostupnih standarada; α -tokoferol (LGC, DR EHRENSTORFER, Augsburg, Njemačka), β -tokoferol, γ -tokoferol i δ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD). Maseni udio svakog pojedinog tokoferola u uzorku (*w*), izražen

je preko koncentracije α -tokoferola, u mg/kg, a računa se prema formuli:

$$W = \frac{\rho \times \overline{A_t} \times V}{\overline{A_s} \times m} \quad [1]$$

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

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH[•] metodom EPR spektroskopijom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka ulja EPR spektroskopijom provedeno je prema metodi opisanoj u diplomskom radu Pejić (2022). Ulje se dodaje u otopinu slobodnog radikala DPPH, a zatim se prati njegova inaktivacija do koje dolazi zbog djelovanja spojeva u ulju koji imaju ulogu antioksidansa.

3.2.2.1. Priprema reagensa za analizu

Otopina DPPH radikala (tehnička čistoća > 85 % (CHN), Fluka) u etil – acetatu (HPLC čistoća, CARLO ERBA Reagents) mora se pripremiti najmanje 24 h prije provedbe analize. Za 0,15 mM otopine potrebno je izvagati 5,91 mg DPPH radikala u laboratorijsku čašicu od 25 mL na analitičkoj vagi (KERN ABP 200-5DM, KERN & SOHN). Kako bi se uklonio sav kisik koji može uzrokovati interferencije prilikom mjerenja, etil – acetat je potrebno propuhati dušikom u trajanju od 5 minuta. Izvagani DPPH radikal se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etil – acetatom propuham s dušikom do oznake. Odmjerna tikvica se omota u aluminijsku foliju kako bi se otopina zaštitila od svjetlosti nakon čega se miješa na Vortex uređaju 3 minute te skladišti u hladnjaku 24 sata pri temperaturi od +4 °C.

3.2.2.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta provodi se na EPR spektrometru Magnettech MS – 5000 tvrtke Freiburg instruments. Prije rada na uređaju potrebno je pokrenuti inicijalizaciju u trajanju od 15 minuta.

U mikroepruvetu od 2 mL automatskom pipetom se doda 980 μL otopine DPPH[•] i 20 μL uzorka ulja. U trenutku dodatka ulja pokreće se štoperica, a uzorak se miješa na Vortex uređaju u trajanju od 10 sekundi. Reakcijska otopina se stavi u mrak te minutu do dvije prije

isteka vremena od 30 minuta napuni u kapilaru i umetne u cjevčicu uređaja. Nakon točno 30 minuta pokrene se snimanje EPR spektra. Slijepa proba se priprema tako da se u 980 μL otopine DPPH $\cdot$ umjesto uzorka ulja doda 20 μL etil – acetata, a mjerenje slijepe probe se provodi na početku radnog dana te svaka sljedeća 2 sata tijekom provođenja analize. Mjerenje se vrši pri sobnoj temperaturi, jakosti centralnog magnetskog polja 331,00 – 343,00 mT, amplitudi modulacije 0,20 mT, frekvenciji 100 kHz i snazi mikrovalnog zračenja od 10 mW. Postavljanje parametara, snimanje spektra i obrada rezultata se vrši s pomoću ESR Studio programskog paketa. Iz visine intenziteta signala u srednjem piku spektra DPPH $\cdot$ u reakcijskoj smjesi i slijepoj probi računa se postotak redukcije DPPH $\cdot$ koji je proporcionalan antioksidacijskom kapacitetu prema formuli:

$$\% \text{ redukcije DPPH}\cdot = 100 \cdot \frac{\text{visina signala}_{\text{slijepa proba}} - \text{visina signala}_{\text{uzorak}}}{\text{visina signala}_{\text{slijepa proba}}} \quad [2]$$

3.2.2.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti konvencionalnih uzoraka, reakcijska smjesa pripremljena prema metodi opisanoj u potpoglavlju 3.2.3.1. se odmah nakon miješanja na Vortex uređaju napuni u kapilaru, stavlja u cjevčicu uređaja te se pokreće mjerenje u trajanju od 30 minuta pri čemu se intenzitet signala mjeri svaku minutu pod istim uvjetima analize kao i za antioksidacijski kapacitet.

3.2.3. Obrada podataka

Rezultati istraživanja statistički su obrađeni s pomoću programa XLSTAT 2023 (Lumivero, Denver, SAD). Utjecaj sorte na udio tokoferola i antioksidacijsku aktivnost procijenjen je jednofaktorskom analizom varijance (one-way ANOVA), uz primjenu Tukey-evog testa višestruke usporedbe radi identifikacije značajnih razlika između sorata. Ista metodologija primijenjena je i pri procjeni utjecaja inovativnih tehnologija, korištenih kao predtretmani tijekom procesa miješanja, na udio tokoferola i antioksidacijski kapacitet proizvedenih ulja. Dvofaktorska analiza varijance (two-way ANOVA), uz Tukey-ev test, korištena je kako bi se utvrdile razlike u utjecaju procesa miješanja na ispitivane parametre. Također je provedena linearna regresijska analiza radi određivanja koeficijenta korelacije između udjela tokoferola u proizvedenim DMU i antioksidacijskog kapaciteta. Sve statističke analize provedene su uz razinu značajnosti od 95 % ($p \leq 0,05$).

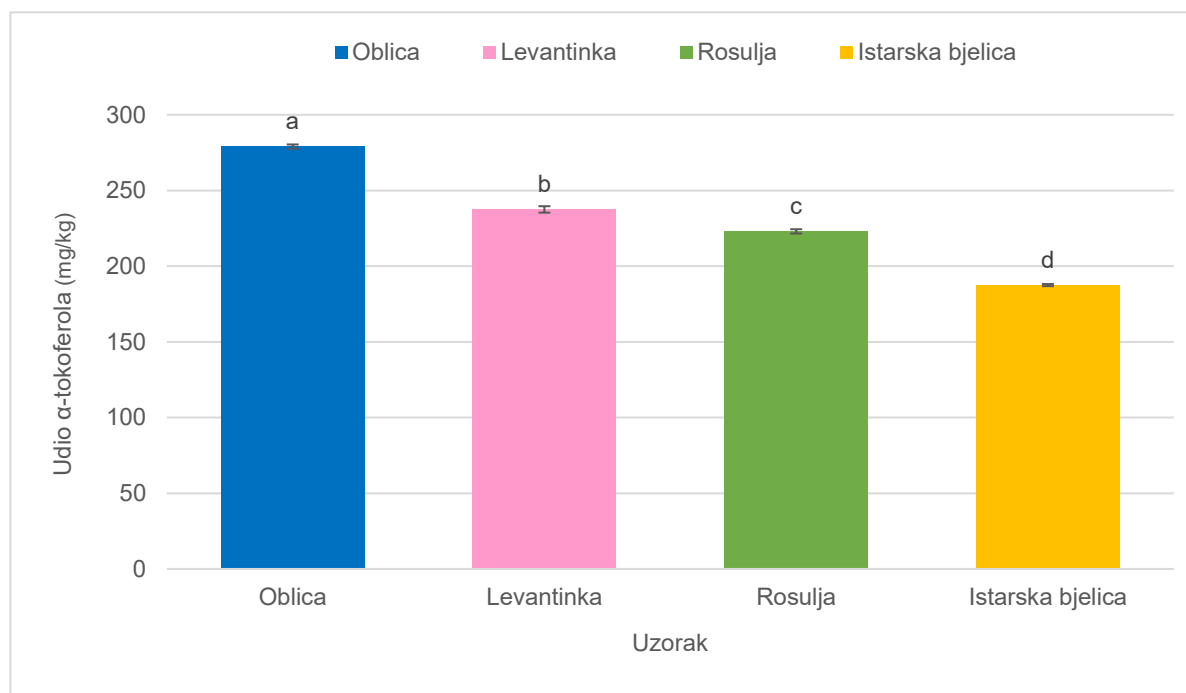
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj upotrebe inovativnih tehnologija i njihovih kombinacija u proizvodnji DMU na udio α -tokoferola i antioksidacijski kapacitet. Stoga je tijesto neposredno nakon mljevenja, a prije faze miješenja, tretirano inovativnim tehnikama – UTT, UZV i PEP. Ove su inovativne tehnike sve više prisutne u prehrambenoj industriji zbog povećanja efikasnosti procesa ekstrakcije, a iz istog se razloga sve više istražuju u tehnologiji proizvodnje DMU. Uvođenjem navedenih tehnika pokušava se riješiti problem lošeg iskorištenja s pozitivnim ili barem neutralnim učinkom na kvalitetu proizvedenog ulja. Promatran je utjecaj svake tehnike zasebno, a zatim i efekt postignut njihovim kombinacijama. Također su neki uzorci proizvedeni bez faze miješenja kako bi se utvrdila mogućnost zamjene faze miješenja s nekom od kombinacija istraživanih inovativnih tehnika, s obzirom na to da je riječ o dugotrajnom i energetski zahtjevnom postupku. Sva su ulja proizvedena iz maslina sorte levantinka za koju su prethodne dvije godine istraživanja utvrđeni optimalni uvjeti za svaku korištenu tehnologiju.

Osim toga, kao nastavak višegodišnjeg istraživanja, provedene su analize DMU proizvedenih konvencionalnom tehnologijom iz četiri hrvatske autohtone sorte maslina: istarska bjelica, rosulja, oblica i levantinka. Ova se istraživanja provode kako bi se bolje okarakterizirale navedene četiri najzastupljenije hrvatske sorte te kako bi se utvrdio utjecaj godine uzgoja na sastav proizvedenih ulja.

4.1. UDIO α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HRVATSKIH AUTOHTONIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

U Hrvatskoj postoji oko 30 autohtonih sorti maslina (Šarolić, 2014), a u ovom radu su promatrane razlike između oblice, levantinke, rosulje i istarske bjelice. Rezultati udjela tokoferola prikazani su na slici 2. U svim je istraživanim sortama u značajnim udjelima detektiran jedino α -tokoferol. To je ujedno i jedini oblik tokoferola detektiran u DMU istarskih sorti dok je kod obje dalmatinske sorte (oblica i levantinka) detektiran i γ -tokoferol, no samo u tragovima (udjelima manjim od 0,5 mg/kg). Rezultati statističke analize (one-way ANOVA) pokazali su da sorta ima značajan utjecaj na udio α -tokoferola ($p \leq 0,05$). Oblica je pokazala najveći udio α -tokoferola s 279 mg/kg, a odmah iza nje levantinka s 238 mg/kg. Rosulja sadrži 223 mg/kg α -tokoferola, a istarska bjelica sa 188 mg/kg pokazuje najmanju količinu α -tokoferola. Rezultati Tukey-evog testa višestruke usporedbe pokazali su da se sve sorte međusobno razlikuju s obzirom na udjel α -tokoferola.



Slika 2. Udjel α -tokoferola u konvencionalnim djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od autohtonih hrvatskih sorata. Uzorci označeni različitim slovima statistički se razlikuju prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe ($p \leq 0,05$)

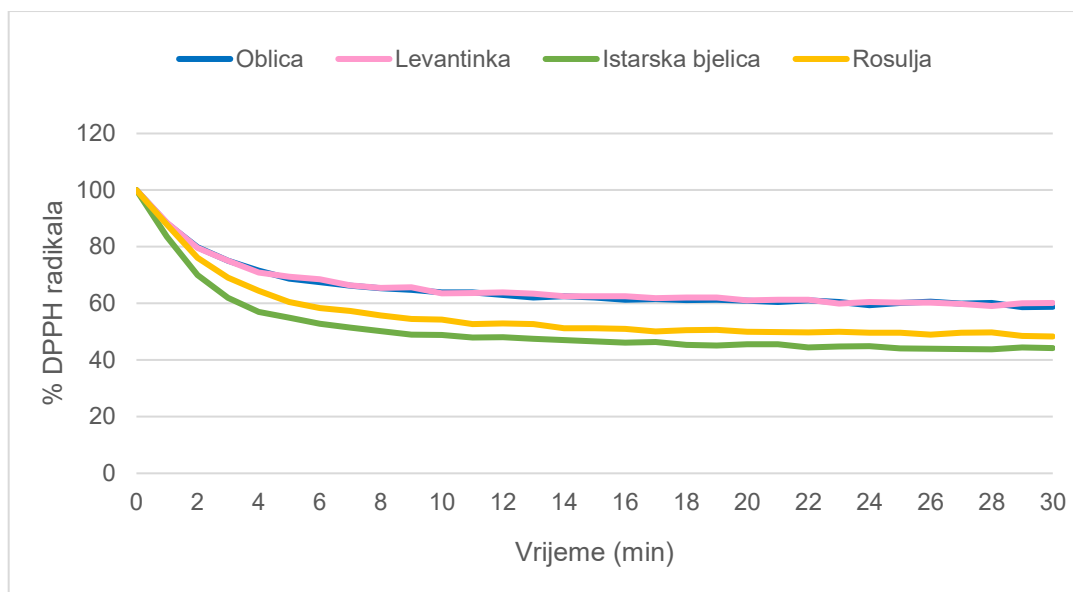
U diplomskom radu Radić (2023) određivan je udio α -tokoferola u konvencionalnim DMU-ima proizvedenim iz istih sorata (maslinarska sezona 2021./2022.). Levantinka i oblica pokazale su najveći udio α -tokoferola (225 mg/kg), zatim rosulja (217 mg/kg) te naposljetku istarska bjelica (95 mg/kg) što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Šarolić i sur. (2015) su proučavali udio α -tokoferola u DMU od sorte oblice i levantinke. Kako bi rad u potpunosti prikazao razlike među sortama, nastojali su smanjiti utjecaj ostalih čimbenika na rezultate. Stoga su masline uzgajane u istom voćnjaku s jednakim agronomskim i pedoklimatskim uvjetima, plodovi su brani u istoj fazi zrelosti te su ulja ekstrahirana istim sustavom obrade. Dobiveni rezultati pokazali su nešto veći udio α -tokoferola kod levantinke (222 mg/kg) nego kod oblice (213,24 mg/kg). Iste godine su Jukić Špika i sur. (2016) proučavali varijabilnost u tokoferolima kod hrvatskih autohtonih sorti. Objašnjeno je kako na kvalitetu DMU-a utječe nekoliko čimbenika, a najvažniji je upravo sorta masline. Međutim, ista sorta može biti uzgajana na različitim regijama tako da veliku važnost imaju i geografsko područje uzgoja, čimbenici tla, nadmorska visina, geografska širina kao i klimatski uvjeti tijekom godine. Svi navedeni čimbenici međusobno djeluju te se stoga sorte ponašaju različito u različitim agroklimatskim uvjetima. U njihovom radu proučavan je udio α -tokoferola DMU

kod sorti oblica i leccino tijekom 3 godine. Sadržaj α -tokoferola kod oblice kretao se u rasponu 186-442 mg/kg, a za leccino 337-784 mg/kg. Time je utvrđeno da je za udio α -tokoferola statistički značajna sorta, ali i godina uzgoja, lokacija te indeks zrelosti ploda.

Istarska bjelica, rosulja te sorte leccino i buža bili su predmet istraživanja Koprivnjak i sur. (2012). Autori su 2010. i 2011. godine analizirali uzorke ulja i došli do zaključka kako je istarska bjelica, za razliku od ostalih analiziranih sorti, siromašnija po udjelu tokoferola. 2010. je njihov udio iznosio oko 101 mg/kg, a godinu dana kasnije 118 mg/kg, dok su ostale sorte pokazale veći porast, primjerice rosulja je 2010. imala 211 mg/kg ukupnih tokoferola, a 2011. godine čak 351 mg/kg ukupnih tokoferola. Stoga se može zaključiti da je niži udjel tokoferola kod istarske bjelice karakteristika sorte.

Već je spomenuto kako je primarna zadaća tokoferola zaštita polinezasićenih masnih kiselina od oksidacije. Ribarova i sur. (2003) utvrdili su da je omjer α -tokoferola i PUFA kod bugarskih sorti DMU 0,937, Andrikopoulos i sur. (1989) su određivali omjer kod pet različitih grčkih sorti DMU koji je varirao 0,97 – 1,89, a Desai i sur. (1988) su u brazilskim sortama dobili omjer 1,57. U pravilu sorte koje imaju više PUFA sadrže i veći udio α -tokoferola kako bi ih zaštitio od oksidacije. Mikrou i sur. (2020) proučavali su razlike u udjelu α -tokoferola među grčkim sortama DMU. Ustanovilo se da osim što različite sorte pokazuju različite udjele α -tokoferola, također se javljaju i razlike unutar iste sorte ovisno o području uzgoja. Također su odredili i sastav masnih kiselina te su sorte s većim udjelom polinezasićenih masnih kiselina, odnosno linolne (C18:2) i α -linolenske (C18:3), pokazale i visok udio α -tokoferola. U svom završnom radu je Soldo (2022) određivala sastav masnih kiselina na istim sortama koje su analizirane i u ovom radu te je ustanovljeno da je najviše PUFA upravo u sorti oblica, a najmanje u istarskoj bjelici.

U ovom radu proučavana je i razlika u antioksidacijskoj aktivnosti među navedenim autohtonim sortama. Na slici 3 je prikazano smanjenje udjela DPPH radikala kroz 30 minuta za sve četiri sorte. Tijekom prvih pet minuta mjerenja može se uočiti najveći pad koncentracije DPPH radikala do kojeg dolazi pri inicijalnom kontaktu ulja, odnosno antioksidansa s radikalima. Tada se velik dio DPPH radikala veže za antioksidanse u nereaktivne spojeve. Nadalje, od 5. do 15. minute je nagib krivulje vidljivo manji, ali i dalje dolazi do smanjenja udjela DPPH radikala. Od 15. do 20. minute nagib već prelazi u gotovo ravni signal, a nakon 20 minuta se signal već u potpunosti ustabilio i zadržava približno jednake vrijednosti do kraja mjerenja. Stoga se iz priloženog može zaključiti da se antioksidansi prisutni u uzorcima potroše unutar prvih 15 minuta reakcije. Iako je taj zaključak jednak za sve analizirane sorte, vidljive su razlike u stupnju inhibicije radikala među sortama.



Slika 3. Antioksidacijska aktivnost konvencionalnih djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih od autohtonih hrvatskih sorata

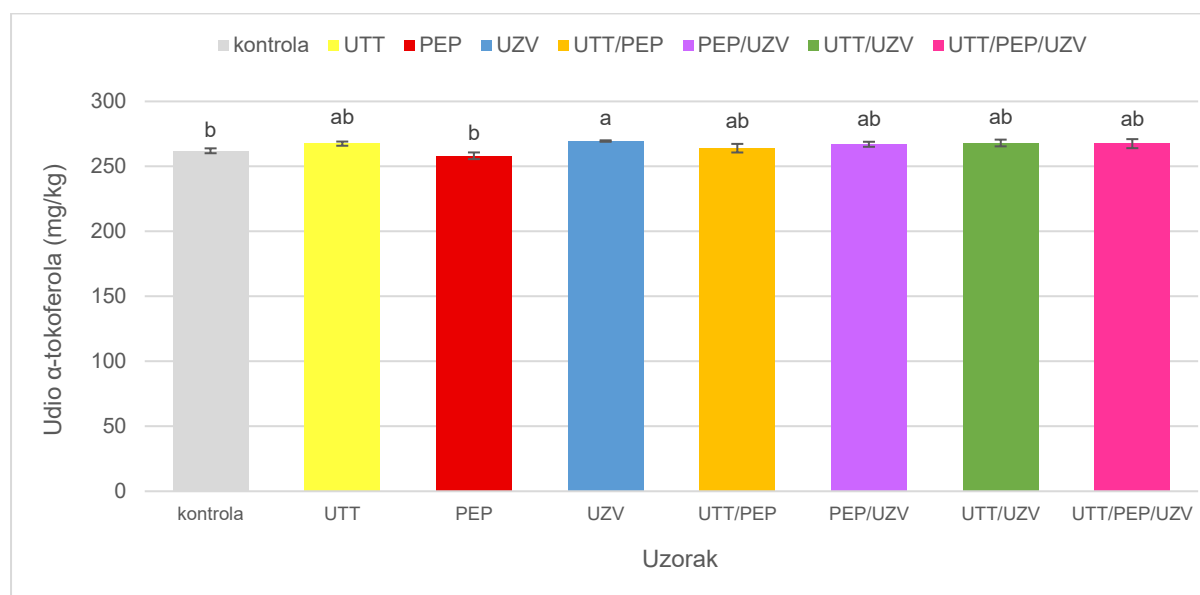
Oblica i levantinka pokazuju gotovo jednaku antioksidacijsku aktivnost. Nakon prve minute reakcije je u oba uzorka bilo prisutno oko 88 % DPPH radikala, dok je nakon 30 minuta reakcije i nakon uspostave ravnoteže u otopini s uljem oblice ostalo 58 %, a u onoj u koju je dodano ulje levantinke 60 % DPPH radikala. Ovi rezultati ukazuju na to da obje dalmatinske sorte sadrže približno jednaku količinu antioksidansa. Kod rosulje je koncentracija DPPH radikala nakon 30 minuta reakcije bila reducirana na 48 % od početne vrijednosti, a u uzorku istarske bjelice na 44 %. Ove dvije sorte su pokazale veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na oblicu i levantinku.

Zanimljivo je uočiti kako oblica i levantinka, koje su imale viši udio α -tokoferola, pokazuju manju antioksidacijsku aktivnost, a istarska bjelica i rosulja, koje sadrže manje α -tokoferola, pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost. Stoga se može zaključiti, da iako tokoferoli posjeduju antioksidacijsko djelovanje, glavni antioksidansi u DMU su fenolni spojevi. Te su rezultate potvrdili i Koprivnjak i sur. (2016) koji su istraživali antioksidacijsku aktivnost i hvatanje radikala 6 istarskih DMU-a, između ostalih i rosulje i istarske bjelice. Antioksidacijski kapacitet mjereno je DPPH te GFR metodom i u obje metode su se upravo ove dvije sorte izdvojile po najvećem kapacitetu hvatanja radikala. Istarska bjelica bila je najsiromašnija tokoferolima, a najbogatija o-difenolima. Maseni udio tokoferola je pokazao slabu korelaciju, a o-difenoli snažnu pozitivnu korelaciju s kapacitetom hvatanja radikala. Stoga se može zaključiti da ispoljavaju jaču antioksidacijsku aktivnost u odnosu na tokoferole. Koprivnjak i sur. (2012) su osim udjela α -tokoferola mjerili i udio fenolnih spojeva kroz dvije godine.

Istarska bjelica pokazala je najveći udio fenolnih spojeva, 580 mg/kg u 2010. godini. Rosulja je također pokazala dosta visok udio koji je 2010. godine iznosio 465 mg/kg, a 2011. godine 310 mg/kg. Ovi zaključci potvrđeni su i u istraživanju koje su proveli Baldioli i sur. (1996) u kojemu je ustanovljeno da su oleuropein i hidroksitirozol učinkovitiji u doniranju vodika u usporedbi s vitaminom E.

4.2. UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNIKA NA UDIO α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

Kako bi se utvrdio utjecaj inovativnih tehnika na udio α -tokoferola i antioksidacijski kapacitet DMU u ovom radu korištena su ulja proizvedena iz autohtone hrvatske sorte levantinka. Na slici 4 prikazan je udjel α -tokoferola u uzorku koji je proizveden bez predtretmana inovativnim tehnikama (kontrola) te u uzorcima tretiranim inovativnim tehnikama i njihovim kombinacijama.



Slika 4. Udjel α -tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima sorte levantinka proizvedenima uz primjenu predtretmana ubrzanim toplinskim tretmanom (UTT), pulsirajućim električnim poljem (PEP) i ultrazvukom (UZV) te njihovim kombinacijama. Uzorci označeni različitim slovima statistički se razlikuju prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe ($p \leq 0,05$)

Udio α -tokoferola u kontrolnom uzorku DMU proizvedenom bez predtretmana inovativnim tehnologijama iznosio je 262 mg/kg. Ti su rezultati u skladu s prijašnjim istraživanjem Šarolić i sur. (2015) u kojem su autori utvrdili da udio α -tokoferola u ulju sorte levantinka iznosi 222 mg/kg. Kao što je već navedeno, udjel α -tokoferola u DMU ovisi o sorti,

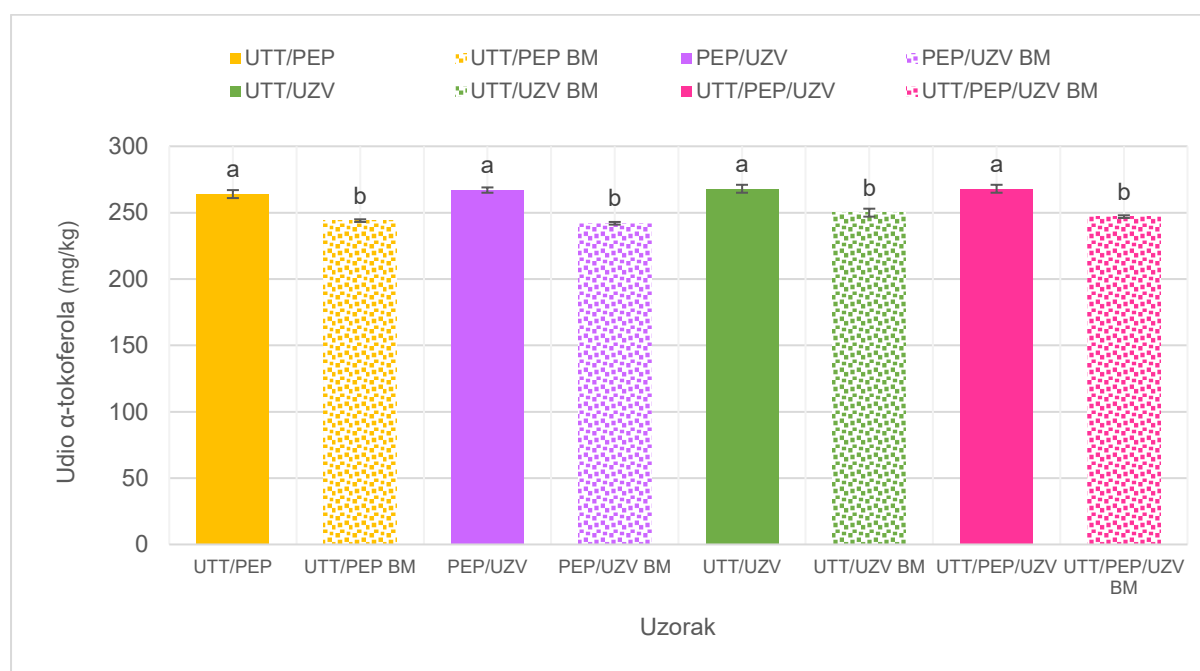
ali i klimatskim, geografskim i agronomskim uvjetima. Statistička analiza rezultata pokazala je da, iako su razlike u udjelima α -tokoferola između proizvedenih uzoraka ulja naizgled male, one su ipak statistički značajne ($p \leq 0,05$). No, Tukey-ev test višestruke usporedbe pokazao je kako nema značajne razlike u udjelu α -tokoferola između kontrole i ulja proizvedenih inovativnim tehnologijama, osim u slučaju korištenja UZV kao jedinog predtretmana.

Predtretman UZV doveo je do blagog povećanja α -tokoferola. Roščić (2024) je u svom završnom radu usporedila sastav masnih kiselina u uzorcima proizvedenim konvencionalnim načinom proizvodnje DMU te upotrebom UZV-a, PEP-a i UTT-a. Iz rezultata je vidljiv porast u koncentraciji linolne masne kiseline nakon tretmana UZV-om što se može povezati s porastom udjela α -tokoferola. U diplomskom radu Grujin (2024) proučavan je utjecaj parametra UZV na udio α -tokoferola. Najveće povećanje dobiveno je primjenom snage UZV kupelji od 320 W i vremenu tretmana od 5 minuta. Statističkom analizom je ustanovljeno da vrijeme trajanja tretmana i amplituda nemaju statistički značajan utjecaj na udio α -tokoferola, međutim, njihova međusobna interakcija je ipak statistički veoma značajna što je vidljivo i iz rezultata dobivenih u ovom radu.

Kao što je već navedeno, tretman PEP-om nije značajno utjecao na udjel α -tokoferola. Leone i sur. (2022) nisu utvrdili značajne razlike u udjelu α -tokoferola između kontrole i uzoraka tretiranih PEP-om. Slične su rezultate dobili i Navarro i sur. (2022). Grujin (2024) je u svom diplomskom radu proučavao utjecaj parametara PEP tretmana na udio tokoferola DMU. Udio α -tokoferola kod levantinke u kontrolnom uzorku iznosio je 126 mg/kg, a nakon tretmana PEP-om varirao je od 110 do 144 mg/kg. Razlog varijacija leži u različitoj jakosti električnog polja te u duljini trajanja samog tretmana. Međutim, u navedenom je radu utvrđeno da ni vrijeme tretmana ni jakost električnog polja nisu statistički značajno utjecali na udio α -tokoferola kao ni njihova međusobna interakcija.

UTT također nije statistički značajno utjecao na udjel α -tokoferola. U diplomskom radu Radić (2023), proučavan je utjecaj različitih temperatura UTT-a na sadržaj α -tokoferola kod autohtonih hrvatskih sorti, a među njima i levantinke. Rezultati nisu pokazali specifičan trend u rastu ili padu udjela α -tokoferola s obzirom na korištene temperature. Soldo (2022) određivala je sastav masnih kiselina u istim uzorcima prije i nakon tretmana UTT-om. Dobivene vrijednosti polinezasićenih masnih kiselina su ostale gotovo nepromijenjene, a slični rezultati dobiveni su i kod Roščić (2024) što dodatno pojašnjava vrlo malu promjenu u sadržaju α -tokoferola nakon UTT tretmana.

Promatrajući kombinacije inovativnih metoda, na slici 4 je vidljivo kako su vrijednosti približno iste. Uočen je blagi porast u koncentraciji α -tokoferola u odnosu na kontrolu, međutim on nije bio statistički značajan. Kombinacija koja je ostvarila najmanji porast u sadržaju α -tokoferola je UTT/PEP. Ovi su rezultati očekivani s obzirom na to da su obje tehnike, primijenjene samostalno, pokazale vrlo mali utjecaj na rezultate, s time da je kod PEP-a došlo do blagog pada u koncentraciji α -tokoferola, a kod UTT-a do blagog porasta. Tretman s UTT-om i UZV-om je postigao drugi najveći udio α -tokoferola, a općenito su kombinacije u kojima je korišten UZV (PEP/UZV, UTT/UZV i UTT/PEP/UZV) pokazale blagi rast. Zasluga za taj porast pridaje se tretmanu UZV, međutim zbog njegove kombinacije s drugim tehnikama njegov utjecaj nije došao do izražaja kao i prilikom njegove samostalne primjene.

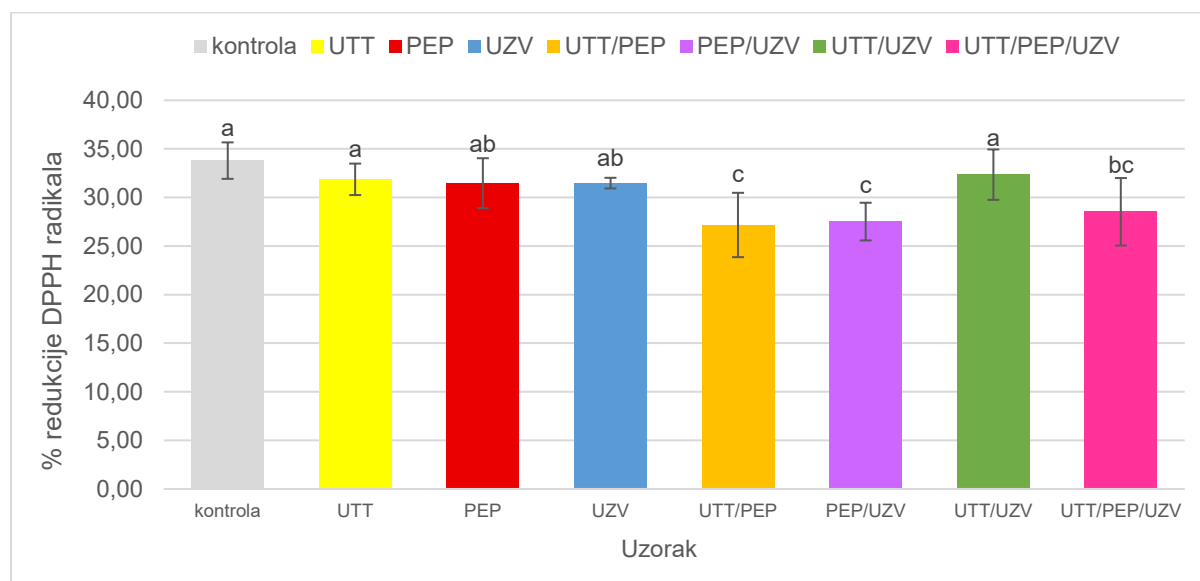


Slika 5. Udjel α -tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima sorte levantinka proizvedenima uz kombinaciju inovativnih tehnologija (ubrzani toplinski tretman - UTT, pulsirajuće električno polje - PEP i ultrazvuk - UZV) s i bez miješenja (BM). Uzorci označeni različitim slovima statistički se razlikuju prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe ($p \leq 0,05$)

Jedan od ciljeva projekta u sklopu kojeg je izrađen ovaj diplomski rad bio je utvrditi mogućnost zamjene faze miješenja kombinacijom inovativnih tehnologija. Na slici 5 prikazani su rezultati udjela α -tokoferola u uljima proizvedenim kombinacijom navedenih tehnologija s i bez faze miješenja (BM). Iz rezultata je vidljivo kako je udio α -tokoferola u svim uzorcima proizvedenim bez miješenja niži u odnosu na ulja koja su proizvedena uz miješenje. Statistička analiza pokazala je kako miješenje ima značajan utjecaj na udio α -tokoferola ($p \leq 0,05$).

Prethodno je spomenuto kako, iako je riječ o energetski zahtjevnom i dugotrajnom procesu, miješenje predstavlja bitnu fazu u proizvodnji DMU. U ovoj fazi, koja je u ovom istraživanju trajala 40 min, dolazi do razvoja hlapljivih spojeva i bolje ekstrakcije α -tokoferola i polifenolnih spojeva što je bitno za kvalitetu i senzorske karakteristike DMU. Roščić (2024) je uspoređivala sastav masnih kiselina kod uzoraka dobivenih kombinacijom inovativnih tehnika s i bez miješenja. Rezultati uzoraka proizvedenih s miješenjem pokazali su nešto više udjele u koncentraciji polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na uzorke bez provedenog miješenja, što dodatno potvrđuje korelaciju α -tokoferola i sastava polinezasićenih masnih kiselina u DMU.

Proizvedenim uzorcima DMU određen je antioksidacijski kapacitet DPPH metodom s pomoću EPR spektroskopije, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 6. Statistička analiza pokazala je da način proizvodnje ulja ima značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet proizvedenih ulja. Najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod kontrolnog uzorka s 33,79 % redukcije DPPH radikala. Tukey-evim testom višestruke usporedbe pokazano je kako između kontrole i uzoraka tretiranih samostalnim inovativnim tehnikama nema značajne razlike u antioksidacijskom kapacitetu.



Slika 6. Antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja sorte levantinka proizvedenih uz primjenu predtretmana ubrzanim toplinskim tretmanom (UTT), pulsirajućim električnim poljem (PEP) i ultrazvukom (UZV) te njihovim kombinacijama. Uzorci označeni različitim slovima statistički se razlikuju prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe ($p \leq 0,05$)

DMU proizvedeno UTT-om pokazao je 31,87 % redukcije DPPH radikala. Slični rezultati dobiveni su i u diplomskom radu Mladina (2023) u kojem je kontrola pokazala viši antioksidacijski kapacitet nego uzorci proizvedeni UTT tretmanom. Škevin i sur. (2025) proučavali su utjecaj UTT tretmana na antioksidacijski kapacitet i fenolni sastav DMU hrvatskih autohtonih sorti. Utvrđeno je da je u uzorcima levantinke pri temperaturama od 20 °C, 30 °C i 40 °C veći antioksidacijski kapacitet nego u kontrolnom uzorku. Najjači antioksidansi u ulju su fenolni spojevi, stoga uzorci koji sadrže više fenolnih spojeva pokazuju viši antioksidacijski kapacitet. Ustanovljeno je da utjecaj na fenolni sastav ima temperatura miješenja, enzimska aktivnost i njihova toplinska stabilnost, ali i raspodjela fenola između uljne i vodene faze. U radu je određivan udio ukupnih fenola te je utvrđen porast udjela nakon tretmana UTT-om na istim temperaturama na kojima je uočen i porast antioksidacijskog kapaciteta, a promatrane su i promjene kod određenih fenolnih spojeva. Time je dobiven uvid u utjecaj UTT-a na pojedine fenolne komponente te je ustanovljeno da pri navedenim temperaturama dolazi do porasta udjela oleaceina, oleokantala te aglikona oleuropeina i ligstrozida. S obzirom na to da antioksidacijski kapacitet uvelike ovisi o udjelu fenolnih spojeva u DMU, potrebno je uzeti u obzir i enzime koji olakšavaju stvaranje fenolnih spojeva ili potiču njihovo oslobađanje razaranjem staničnih struktura. Tijekom miješenja se odvijaju enzimске aktivnosti koje uključuju transformaciju hlapljivih i fenolnih spojeva. Na udio fenola utječe aktivnost hidrolitičkih enzima (β -glukozidaze) i aktivnost oksidativne razgradnje katalizirane polifenol oksidazama (PPO) i peroksidazama (POD) (Taticchi i sur., 2013). Kupfer (2024) je u svom radu proučavala utjecaj inovativnih tehnika (UTT, PEP, UZV) na aktivnost PPO i POD. Navedena dva enzima degradiraju fenolne spojeve te je poželjno smanjiti njihovu aktivnost u DMU. Tretman UTT-om pokazao se najučinkovitijim u inaktivaciji aktivnosti PPO koja nakon tretmana uopće nije bila detektirana. Međutim, nakon tretiranja UTT-om dolazi do povećanja aktivnosti POD.

Kao što je već navedeno, ni predtretman PEP-om ni UZV-om nisu značajno utjecali na antioksidacijski kapacitet proizvedenih DMU. Postotak redukcije DPPH radikala kod oba uzorka iznosi 31,47 %. Makovac (2023) je također na uzorcima levantinke proučavala utjecaj PEP-a na antioksidacijski kapacitet. U navedenom je istraživanju tretman PEP-om doveo je do porasta antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na kontrolu. Mjerenja su provedena pri različitim jakostima električnog polja i uz različito vrijeme tretiranja te se ustanovilo da je pri uvjetima koji su korišteni i u ovom radu (trajanje od 90 sekundi na jakosti od 2 kV/cm) najveći antioksidacijski kapacitet. Veneziani i sur. (2019) zabilježili su porast u udjelu ukupnih fenola u rasponu od 3,2 % do 14,3 % kod tri talijanske sorte ekstra djevičanskog maslinovog ulja nakon tretmana PEP-om. Slične rezultate, porast ukupnog udjela fenola od 7,6 % u usporedbi s kontrolom zabilježili su i Yang i sur. (2024) nakon tretmana s PEP-om. Osim toga utvrdili su

i porast ukupnog udjela flavonoida od 18,3 %. U radu je uočen i značajan porast udjela oleuropeina i to za 76 % više nego u kontrolnom ulju. Fenoli i flavonoidi su prisutni u vezikulama i staničnoj stijenci. Korištenje PEP tretmana inducira elektroporaciju, razara se stanični sadržaj, čime se olakšava ekstrakcija fenola, flavonoida i povećava koncentracija slobodnog oleuropeina. Osim toga, PEP tretman povećava enzimsku aktivnost β -glukozidaze, što dovodi do oslobađanja oleuropeina iz oleuropeinskih glikozida.

Leone i sur. (2022) su utvrdili kako PEP tretman ima značajan utjecaj ($p < 0,05$) na ukupni sadržaj hidrofilnih fenola u DMU sorte Picholine. Utvrđen je veći udio ukupnih fenola kod uzoraka tretiranih PEP-om, 644,4 mg/kg, nego kod kontrolnog uzorka, 583,6 mg/kg. Najznačajnije razlike izmjerene su za derivate oleuropeina, a i udjel derivata ligstrozida i lignana je bio nešto viši nego u kontrolnom uzorku. Abenoza i sur. (2013) tretirali su španjolsku sortu maslinovog ulja i proveli tretman PEP-om uz miješenje na 15 °C u trajanju od 30 minuta te zabilježili da je došlo do smanjenja udjela fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Nadalje, rezultati rada Kupfer (2024) pokazuju kako tretman PEP-om povećava aktivnost POD i smanjuje aktivnost PPO čime se smanjuje degradacija fenolnih spojeva, dok tretman UZV-om povećava aktivnost i jednog i drugog enzima.

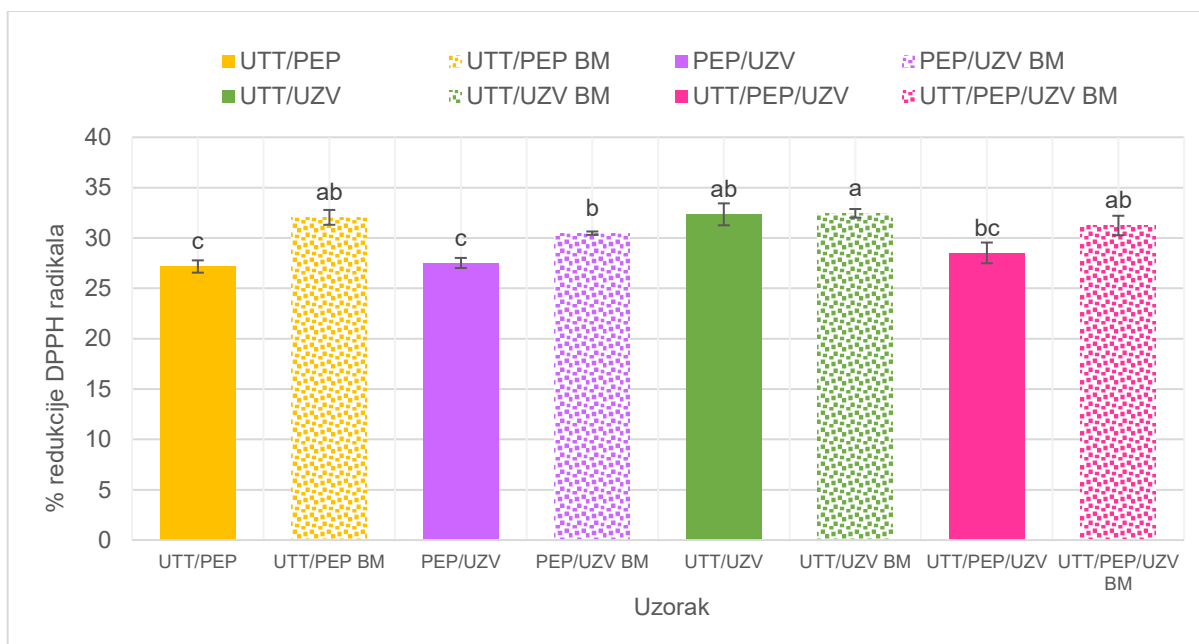
Brezjan (2023) je u svom radu promatrala učinak UZV-a na uzorke levantinke pri različitim parametrima. Pokazalo se da tretman UZV-om dovodi do smanjenja ukupnih fenola, što je posljedično utjecalo i na antioksidacijski kapacitet. Izuzetak je tretman u trajanju 3 minute s korištenom snagom 448 W. Pri istim uvjetima Karamarko (2023) je zabilježila najveću oksidacijsku stabilnost proizvedenih ulja izraženu kao induksijska perioda, odnosno vrijeme kroz koje je moguće očuvati ulje od autooksidacije. Aydar i sur. (2017) promatrali su utjecaj UZV-a na ukupne fenole i na antioksidacijski kapacitet. Udio ukupnih fenola pokazivao je trend smanjivanja s produljenjem trajanja ultrazvučnog tretmana. Razlog tomu može biti prisutnost kisika. Naime, kisik djeluje kao kofaktor u mnogim enzimskim reakcijama, a ujedno je i promotor neenzimskih oksidacija. Prilikom UZV tretmana dolazi do kavitacije i djelovanja na stanične strukture što dovodi do oslobađanja enzima (PPO, POD) i supstrata, odnosno fenola, što bi moglo doprinijeti oksidaciji. Antioksidativna aktivnost maslinovih ulja je varirala, ovisno o različitim parametrima, od 24,25 do 38,72 μ mol ekvivalenta troloksa. Te razlike se javljaju kao posljedica različitih vrsta antioksidansa koji se izdvajaju u određenim fazama ekstrakcije. Bitno je napomenuti kako uzorci podvrgnuti 10-minutnom tretmanu UZV-a na najvišoj temperaturi i uz najduže vrijeme miješenja pokazuju najniži udio fenola i ukupnu antioksidativnu aktivnost, a čak i najviši peroksidni broj i relativno visoku kiselost. Dakle, primjena UZV-a na visokim temperaturama tijekom duljeg razdoblja ima negativan utjecaj na kvalitetu samog ulja.

Rezultati objavljeni u dosadašnjoj literaturi ne daju jednoznačni odgovor na pitanje utjecaja PEP-a i UZV-a na udjel ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet. Stoga se može zaključiti kako djelovanje ovih tehnika ovisi o nizu čimbenika koji utječu na ukupne i pojedinačne fenolne spojeve, kao što su stupanj zrelosti, sorta, klima, metoda ekstrakcije, ali i korišteni parametri tretmana.

Kombinacije inovativnih tehnika pokazale su raznolike utjecaje na antioksidacijski kapacitet. Sa slike 6 se može uočiti kako je kombinacija UTT/UZV s 32,35 % redukcije DPPH radikala gotovo jednaka kao i kod kontrole što potvrđuje i Tukey test. S druge strane, ostalim kombinacijama inovativnih tehnika UZV/PEP, UTT/PEP te kombinacijom sve tri tehnike, značajno se smanjio antioksidacijski kapacitet proizvedenih ulja. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima iz rada Hrboka (2024) u kojem je proučavan utjecaj inovativnih tehnika i njihovih kombinacija na oksidacijsku stabilnost. Postignuti rezultati doveli su do zaključka da je uporaba inovativnih tehnologija u većini slučajeva dovela do smanjenja perioda indukcije odnosno do smanjenja oksidacijske stabilnosti ulja. Jedini uzorak koji je odstupao je onaj tretiran kombinacijom UTT/UZV. Ovim tretmanom došlo je do porasta oksidacijske stabilnosti od 3,59 %. Rezultati rada Kupfer (2024) pokazuju kako tretman kombinacijom inovativnih tehnologija – UTT/UZV, UZV/PEP, UTT/PEP – dovodi do smanjenja aktivnosti PPO, a kombinacija svih tehnologija, UTT/UZV/PEP, je u potpunosti inaktivirala PPO jer aktivnost ovog enzima nakon tretmana uopće nije bila detektirana. Međutim, u svim kombinacijama dolazi do porasta aktivnosti POD, s time da je nakon tretmana kombinacijom svih tehnologija došlo do najmanjeg porasta u aktivnosti, s 0,031 μmol tetragvajakola/mg proteina na 0,085 μmol tetragvajakola/mg proteina.

Promatrajući sliku 6, zanimljivo je kako PEP kao zasebna metoda utječe na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta, a isti učinak postiže i u bilo kojoj kombinaciji s drugim inovativnim tehnikama. Stoga se može zaključiti da PEP nije prikladna tehnika zbog negativnog utjecaja na antioksidacijski kapacitet.

Na slici 7 prikazana je usporedba utjecaja inovativnih tehnika s i bez miješenja na antioksidacijski kapacitet DMU. Provedena je statistička dvofaktorska analiza varijance (two-way ANOVA) kojom je utvrđeno da su način proizvodnje i miješenje statistički značajno utjecali na antioksidacijski kapacitet i zasebno i njihovim međudjelovanjem ($p \leq 0,05$).



Slika 7. Antioksidacijski kapacitet djevičanskih maslinovih ulja sorte levantinka proizvedenima uz kombinaciju inovativnih tehnologija (ubrzani toplinski tretman - UTT, pulsirajuće električno polje - PEP i ultrazvuk -UZV) s i bez miješenja (BM). Uzorci označeni različitim slovima statistički se razlikuju prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe ($p \leq 0,05$)

Usporedbom kombinacija inovativnih tehnika ustanovljeno je da je veći postotak redukcije DPPH radikala kod uzoraka kod kojih nije provedeno miješenje u odnosu na uzorke u kojima je provedeno miješenje. Najbolji rezultat ostvaren je kombinacijom UTT/UZV bez miješenja. Najveći antioksidacijski kapacitet kod kombinacija inovativnih tehnika provedenih uz miješenje je također kod uzoraka tretiranih kombinacijom UTT/UZV. Hrboka (2024) pokazao je nešto drukčije rezultate. U radu su uspoređivani utjecaj kombinacije inovativnih metoda s miješenjem i bez miješenja na oksidacijsku stabilnost. Najveći period indukcije pokazala je upravo kombinacija UTT/UZV i kod uzoraka s miješenjem i kod onih bez miješenja. Usporedbom perioda indukcije uočeno je kako uzorci bez miješenja pokazuju kraći period indukcije, odnosno manju oksidacijsku stabilnost. Kao iznimka se javlja kombinacija UTT/PEP koja pokazuje veću oksidacijsku stabilnost kod uzoraka bez miješenja u odnosu na one s miješenjem. Može se primijetiti kako je najniži period indukcije kod uzorka s kombinacijom UZV/PEP. Kupfer (2024) je u svom radu promatrala i kako miješenje u kombinaciji s inovativnim tehnologijama utječe na aktivnost enzima. Aktivnost PPO i POD bila je manja u svim uzorcima u kojima je primijenjena faza miješenja. Među radovima se javljaju razlike u utjecaju miješenja na antioksidacijski kapacitet. Mogući razlozi su drukčiji parametri pojedinih metoda te vrijeme miješenja.

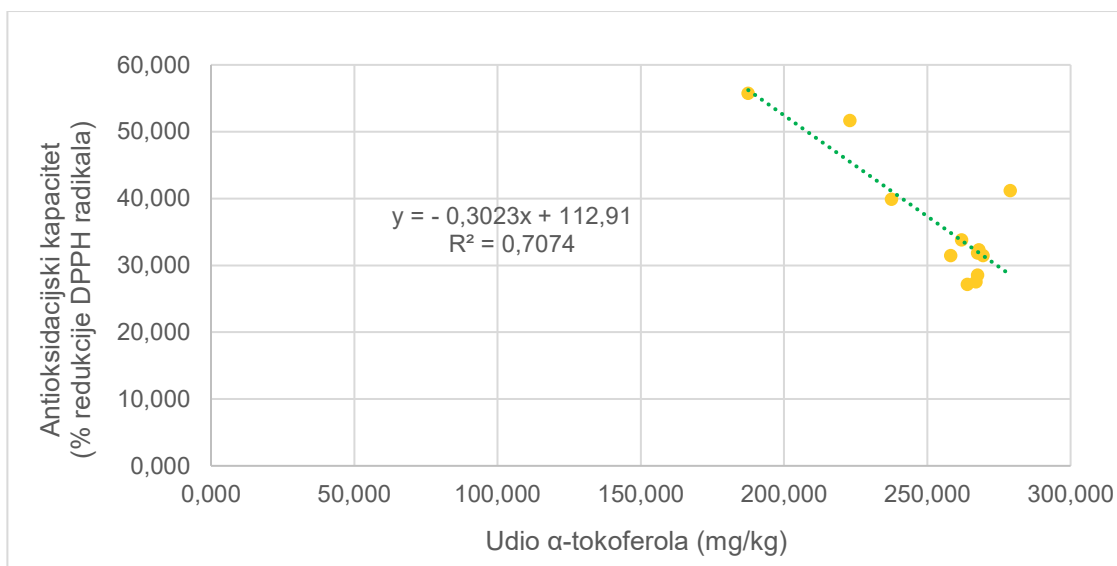
Antioksidacijski kapacitet DMU proizvedenih bez miješenja potvrđuje negativan utjecaj PEP-a na antioksidacijski kapacitet. Sve kombinacije kod kojih je uključen PEP pokazuju niži antioksidacijski kapacitet i kod uzoraka proizvedenih bez faze miješenja, u usporedbi s kontrolom i kombinacijom UTT/UZV.

Rezultati prikazani na slici 7 na temelju kojih je zaključeno da se veći antioksidacijski kapacitet postiže izostavljanjem faze miješenja, veoma su obećavajući za daljnja istraživanja jer se nastoje pronaći tehnike kojima se može zamijeniti postupak miješenja u proizvodnji DMU. Uzrok smanjenju antioksidacijskog kapaciteta prilikom miješenja može biti u aktivnosti enzima PPO i POD, koji se aktiviraju s obzirom na količinu kisika koja se inkorporira u tijesto prilikom miješenja čime se utječe na smanjenje količine fenolnih spojeva. Osim toga, zbog prisutnog kisika prilikom miješenja, može započeti oksidacija masnih kiselina te već prisutni fenoli započinju antioksidacijsko djelovanje i time se smanjuje njihova koncentracija u DMU, a samim time je smanjen antioksidacijski kapacitet ulja. Međutim, odluka o skraćivanju ili izostavljanju faze miješenja nakon implementacije inovativnih tehnologija mora se donijeti na temelju cjelokupne analize ulja, ali i opsežnih kalkulacija temeljenih na iskorištenju procesa i troškova proizvodnje.

4.3. KORELACIJA UDJELA α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

U ovom radu se također nastojala ustanoviti korelacija između udjela α -tokoferola i antioksidacijskog kapaciteta s obzirom na rezultate dobivene konvencionalnom proizvodnjom DMU te korištenjem inovativnih tehnika i njihovih kombinacija s i bez faze miješenja. Rezultati su prikazani na slici 8.

Koeficijent regresije (R^2) iznosi 0,7074 što predstavlja relativno dobru korelaciju između α -tokoferola i antioksidacijskog kapaciteta. Vrijednost koeficijenta determinacije je negativan i iznosi -0,3023. Dakle, riječ je o negativnoj korelaciji, odnosno ako uzorak ima veći udio α -tokoferola, imat će manji antioksidacijski kapacitet. Stoga se može zaključiti da iako α -tokoferoli posjeduju antioksidacijska svojstva, njihova primarna uloga je zaštita PUFA od oksidacije, a spojevi koji najviše pridonose antioksidacijskom kapacitetu su fenolni spojevi.



Slika 8. Korelacija udjela α-tokoferola i antioksidacijskog kapaciteta u konvencionalnim i laboratorijski proizvedenim djevičanskim maslinovim uljima

Baldioli i sur. (1996) proveli su statističku analizu utjecaja α-tokoferola na antioksidacijski kapacitet te utjecaja fenolnih spojeva na antioksidacijski kapacitet. Rezultati su pokazali da je antioksidacijski kapacitet DMU uglavnom korelirao s udjelom hidrofilnih fenola ($r = 0,97$). S druge strane, korelacija između antioksidacijskog kapaciteta DMU i udjela ukupnih tokoferola nije uočena ($r = 0,05$). Međutim, ustanovljeno je da je α-tokoferol pokazao sinergističku aktivnost u smjesama s određenim fenolnim spojevima u pročišćenom maslinovom ulju. Kako bi utvrdili djelovanje pojedinog antioksidansa, Mateos i sur. (2003) uzeli su alikvotne matrice koja sadrži hidroksitirozol (0,7 mmol/kg) i α-tokoferol (0,36 mmol/kg) te su ih analizirali tijekom oksidacije u Rancimat aparatu. Uočeno je kako je na početku procesa koncentracija fenolnog spoja hidroksitirozola opadala, a koncentracija α-tokoferola je ostala konstantna. Međutim, nakon što je koncentracija hidroksitirozola pala na ~0,13 mmol/kg i ostala konstantna, onda je tek započelo smanjivanje koncentracije α-tokoferola. Oba antioksidansa su nestala kada je postignuto vrijeme indukcije. Time je zaključeno da fenolni spojevi sprječavaju oksidaciju, a tek kada se oni potroše, odnosno kada je njihova koncentracija veoma niska, dolazi do iskazivanja antioksidativnog karaktera α-tokoferola.

5. ZAKLJUČCI

1. Udio α -tokoferola i antioksidacijska aktivnost značajno ovise o sorti; oblica sadrži najviše (279 mg/kg), a istarska bjelica najmanje (188 mg/kg). Istarska bjelica pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost, dok oblica i levantinka najmanju.
2. UZV je povećao udio α -tokoferola u uljima sorte levantinka, dok PEP, UTT i njihove kombinacije nisu pokazale učinak u odnosu na kontrolu.
3. Miješenje je ključno za ekstrakciju α -tokoferola; njegovim izostavljanjem udio značajno opada.
4. Samostalni tretmani UTT, PEP i UZV nisu utjecali na antioksidacijski kapacitet, dok su kombinacije UTT/PEP, PEP/UZV te sve tri tehnike dovele do njegova smanjenja.
5. Ulja proizvedena bez miješenja imala su veći antioksidacijski kapacitet, pri čemu je kombinacija UTT/UZV dovela do najvećeg porasta.
6. Utvrđena je dobra, ali negativna korelacija ($R^2 = 0,7074$) između udjela α -tokoferola i antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Abenoza M, Benito M, Saldaña G, Álvarez I, Raso J, Sánchez-Gimeno AC (2013) Effects of Pulsed Electric Field on Yield Extraction and Quality of Olive Oil. *Food Bioproc Tech* **6**, str. 1367–1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>

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

Andrikopoulos NK, Hassapidou MN, Manoukas AG (1989) The tocopherol content of greek olive oils. *J Sci Food Agric* **46**, str. 503–509. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740460412>

Aydar AY, Bagdatlioglu N, Köseoglu O (2017) Effect of ultrasound on olive oil extraction and optimization of ultrasound-assisted extraction of extra virgin olive oil by response surface methodology (RSM). *Grasas y Aceites* **68**. <https://doi.org/10.3989/gya.1057162>

Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF (1996) Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**, str. 1589–1593. <https://doi.org/10.1007/BF02523530>

Brezjan P (2023) Utjecaj ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja na sastav polifenola hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Desai ID, Bhagavan H, Salkeld R, Dutra de Oliveira JE (1988) Vitamin E content of crude and refined vegetable oils in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis* **1**, str. 231–238. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(88\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0889-1575(88)90004-X)

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 2033. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>

Emma MR, Augello G, Di Stefano V, Azzolina A, Giannitrapani L, Montalto G, Cervello M, Cusimano A (2021) Potential Uses of Olive Oil Secoiridoids for the Prevention and Treatment of Cancer: A Narrative Review of Preclinical Studies. *Int J Mol Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms22031234>

Esposito S, Veneziani G, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio I, Sordini B, Minnocci A, Sebastiani L, Servili M (2013) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Olive Oil Mechanical Extraction Process: Impact on the Structural Modifications of Pastes and Oil Quality. *J Agric Food Chem* **61**, str. 4953–4960. <https://doi.org/10.1021/jf400037v>

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

Firestone D (2005) Olive Oil. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. <https://doi.org/10.1002/047167849X.BIO029>

Ghanbari Shendi E, Sivri Ozay D, Ozkaya MT, Ustunel NF (2018) Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *OCL* **25**, A602. <https://doi.org/10.1051/OCL/2018052>

Grujin A (2024) Utjecaj inovativnih tehnologija na sastav i udio tokoferola djevičanskih maslinovih ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Guerrini L, Masella P, Angeloni G, Zanoni B, Breschi C, Calamai L, Parenti A (2019) The effect of an increase in paste temperature between malaxation and centrifugation on olive oil quality and yield: preliminary results. *Ital J Food Sci* **31**. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1393>

Hamm W, Hamilton R, Calliau G (2013) Edible Oil Processing. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, West Sussex, UK. <https://doi.org/10.1002/9781118535202>

Hrboka J (2024) Praćenje oksidacijske stabilnosti djevičanskog maslinovog ulja iz sorte levantinka proizvedenog uz primjenu inovativnih tehnologija (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jukić Špika M, Kraljić K, Škevin D, Špika MJ, Kraljić K, Škevin D (2016) Tocopherols: Chemical Structure, Bioactivity, and Variability in Croatian Virgin Olive Oils. Products from Olive Tree. <https://doi.org/10.5772/64658>

Juliano P, Gaber MAFM, Romaniello R, Tamborrino A, Berardi A, Leone A (2023) Advances in Physical Technologies to Improve Virgin Olive Oil Extraction Efficiency in High-Throughput Production Plants. *Food Engineering Reviews* **15**, str. 625–642. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09347-1>

Karamarko L (2023) Utjecaj ultrazvuka na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Majetić Germek V (2012) Characteristics of Nutritive Value of Virgin Olive Oils from Buža, Istarska bjelica, Leccino and Rosulja Cultivars. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, str. 172-178. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/95033> (Datum pristupa: 18.06.2025.)

Kraljić K, Jukić Špika M, Žanetić M, Filipan K, Trputec M, Obranović M, Balbino S, Herceg Z, Vukušić Pavičić T, Ivanov M, Škevin D (2023) The influence of different thermal treatments on the antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil. *Olive, an Ancient crop for a Sustainable Future, Book of Abstracts of IX International Olive Symposium*. Davis, USA: University of Davis, str. 45-45

Kupfer S (2024) Utjecaj predtretmana inovativnim tehnologijama na aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze u tijestu maslina sorte levantinka (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Leone A, Esposto S, Tamborrino A, Romaniello R, Taticchi A, Urbani S, Servili M (2016) Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* **118**, str. 308–317. <https://doi.org/10.1002/EJLT.201400616>

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* **2022** **11**, str. 2758. <https://doi.org/10.3390/FOODS11182758>

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

- Martins BT, Bronze MR, Ventura MR (2022) Phenolic Compounds from Virgin Olive Oil: Approaches for Their Synthesis and Analogues. *J Agric Food Chem* **70**, 14109–14128. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05349>
- Mateos R, Domínguez MM, Espartero JL, Cert A (2003) Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **51**, 7170–7175 <https://doi.org/10.1021/jf034415q>
- Mikrou T, Pantelidou E, Parasyri N, Papaioannou A, Kapsokefalou M, Gardeli C, Mallouchos A (2020) Varietal and Geographical Discrimination of Greek Monovarietal Extra Virgin Olive Oils Based on Squalene, Tocopherol, and Fatty Acid Composition. *Molecules* **2020** **25**, 3818. <https://doi.org/10.3390/molecules25173818>
- Mladina D (2023) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Mousavi S, Stanzione V, Mariotti R, Mastio V, Azariadis A, Passeri V, Valeri MC, Baldoni L, Bufacchi M (2022) Bioactive Compound Profiling of Olive Fruit: The Contribution of Genotype. *Antioxidants* **11**. <https://doi.org/10.3390/antiox11040672>
- Nakbi A, Issaoui M, Dabbou S, Koubaa N, Echbili A, Hammami M, Attia N (2010) Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**, str. 711–715. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.003>
- Navarro A, Ruiz-Méndez MV, Sanz C, Martínez M, Rego D, Pérez AG (2022) Application of Pulsed Electric Fields to Pilot and Industrial Scale Virgin Olive Oil Extraction: Impact on Organoleptic and Functional Quality. *Foods* **11**, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142022>
- Pejić A (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na antioksidacijski kapacitet i aktivnost djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Pérez AG, León L, Pascual M, de la Rosa R, Belaj A, Sanz C (2019) Analysis of Olive (*Olea Europaea* L.) Genetic Resources in Relation to the Content of Vitamin E in Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **8**, 242. <https://doi.org/10.3390/antiox8080242>
- Pingret D, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F (2013) Ultrasound-assisted Extraction. U: Rostagno MA, Prado JM (ured.) *Natural Product Extraction: Principles and Applications, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK*, str. 89–112. <http://doi.org/10.1039/9781849737579-00089>

Radić M (2023) Sastav tokoferola djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih uz ubrzani toplinski tretman (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Ribarova F, Zanev R, Shishkov S, Rizov N (2003) α -Tocopherol, fatty acids and their correlations in Bulgarian foodstuffs. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**, str. 659–667. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00079-6)

Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG (2009) Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J Agric Food Chem* **57**, str. 7983–7988. <https://doi.org/10.1021/JF901293C>

Rošćić M (2024) Utjecaj inovativnih tehnologija na sastav masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Rutkowska M, Namieśnik J, Konieczka P (2017) Ultrasound-Assisted Extraction. U: PenaPereira F, Tobiszewski M (ured.) *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier, Cambridge, str. 301–324. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3>

Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro GF, Morozzi G (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* **1054**, str. 113–127. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2004.08.070>

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A (2013) Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **3**, str. 1-23. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX3010001>

Shahidi F (2015) Antioxidants: Principles and applications. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* str. 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00001-4>

Soldo A (2022) Sastav masnih kiselina djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih uz ubrzani toplinski tretman (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

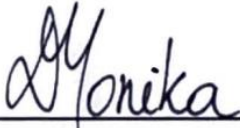
Šarolić, M (2014) Characterisation of Oils Derived from Dalmatian Varieties of Olives. Doctoral Thesis, Faculty of Food Technology, Osijek, Croatia <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:450916>

- 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* 2015 **20**, str. 4395–4409. <https://doi.org/10.3390/molecules20034395>
- Škevin D (2016) Kemija i tehnologija ulja i masti, interna skripta, 1. izdanje, PBF, Zagreb
- Škevin D, Balbino S, Žanetić M, Jukić Špika M, Koprivnjak O, Filipan K, Obranović M, Žanetić K, Smajić E, Radić M, Bunić M, Dilber M, Kraljić K (2025) Improvement of Oxidative Stability and Antioxidative Capacity of Virgin Olive Oil by Flash Thermal Pretreatment—Optimization Process. *Foods* 2025 **14**. <https://doi.org/10.3390/FOODS14152564>
- Tamborrino A, Veneziani G, Romaniello R, Perone C, Urbani S, Leone A, Servili M (2021) Development of an innovative rotating spiral heat exchanger with integrated microwave module for the olive oil industry. *LWT* **147**, 111622. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111622>
- Taticchi A, Esposto S, Veneziani G, Urbani S, Selvaggini R, Servili M (2013) The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chem* **136**, str. 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.071>
- Taticchi A, Selvaggini R, Esposto S, Sordini B, Veneziani G, Servili M (2019) Physicochemical characterization of virgin olive oil obtained using an ultrasound-assisted extraction at an industrial scale: Influence of olive maturity index and malaxation time. *Food Chem* **289**, str. 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.041>
- Taticchi A, Veneziani G, Esposto S, Urbani S, Di Maio I, Selvaggini R, Servili M (2014) Introduction of the flash thermal conditioning of the olive paste in the oil mechanical extraction process: Impact on the virgin oil quality. *Acta Horti* **1057**, str. 725–730. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2014.1057.92>
- Tuck KL, Hayball PJ (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* **13**, 636–644. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00229-2)
- Velasco J, Dobarganes C (2002) Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**, str. 661–676. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-D)

- Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Sordini B, Loreface A, Daidone L, Pagano M, Tomasone R, Servili M (2019) Extra-Virgin Olive Oil Extracted Using Pulsed Electric Field Technology: Cultivar Impact on Oil Yield and Quality. *Front Nutr* **6**. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00134>
- Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio I, Sordini B, Servili M (2015) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Oil Mechanical Extraction Process: Cultivar Impact on the Phenolic and Volatile Composition of Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* **63**, str. 6066–6074. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01666>
- Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Di Maio I, Sordini B, Servili M (2017) Cooling treatment of olive paste during the oil processing: Impact on the yield and extra virgin olive oil quality. *Food Chem* **221**, str. 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.067>
- Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Sordini B, Servili M (2018) Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste. *LWT* **87**, str. 523–528. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.09.034>
- Veneziani G, Nucciarelli D, Taticchi A, Esposto S, Selvaggini R, Tomasone R, Pagano M, Servili M (2021) Application of Low Temperature during the Malaxation Phase of Virgin Olive Oil Mechanical Extraction Processes of Three Different Italian Cultivars. *Foods* **2021** **10**, 1578. <https://doi.org/10.3390/foods10071578>
- Yalcin S, Schreiner M (2017) Stabilities of tocopherols and phenolic compounds in virgin olive oil during thermal oxidation. *J Food Sci Technol* **55**, str. 244–251. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2929-5>
- Yang S, Li S, Li G, Li C, Li W, Bi Y, Wei J (2024) Pulsed electric field treatment improves the oil yield, quality, and antioxidant activity of virgin olive oil. *Food Chem X* **22**, 101372. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2024.101372>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Monika Dilber izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni. Diplomski rad je napisan prema važećim Uputama za izradu i obranu diplomskog rada.



Vlastoručni potpis