

# Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na sastav fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja

---

Žanetić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:165166>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Karla Žanetić

**UTJECAJ UBRZANOG  
TOPLINSKOG TRETMANA NA  
SASTAV FENOLNIH SPOJEVA  
DJEVIČANSKOG MASLINOVOG  
ULJA**

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



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) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dubravke Škevin.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr.sc. Dubravki Škevin na stručnim savjetima i prenesenom znanju, uloženom vremenu i posvećenosti tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem i izv.prof.dr.sc. Klari Kraljić za pomoć tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada u laboratoriju.*

*Hvala mojoj obitelji na potpori tijekom cijelog studiranja pa tako i za vrijeme izrade diplomskog rada. Posebno hvala mojoj kumi Miji za pomoć u svakom trenutku.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

## UTJECAJ UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA NA SASTAV FENOLNIH SPOJEVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

*Karla Žanetić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058214795*

**Sažetak:** Djevičansko maslinovo ulje (DMU) obiluje bioaktivnim fitokemikalijama koje utječu na nutritivnu vrijednost, oksidacijsku stabilnost i karakteristična mirisno-okusna svojstva. Osobito se ističu fenolni spojevi čiji konačni sastav ovisi o nizu kemijskih i biokemijskih reakcija tijekom ključnih faza proizvodnje DMU, mljevenja i miješenja maslinovog tijesta. Cilj ovog rada bio je ispitati fenolni profil konvencionalno proizvedenih DMU autohtonih hrvatskih sorti istarska bjelica, oblica, levantinka i rosulja te utvrditi utjecaj inovativnih tehnologija ubrzanog toplinskog tretmana (UTT) i toplinskog tretmana (TT) kao predtretmana miješenju, na fenole u DMU. Sastav i koncentracija fenola određena je HPLC metodom uz DAD detektor. Rezultati su pokazali da sorta ima statistički značajan utjecaj na sastav fenola u svim ispitanim uzorcima DMU. Temperatura UTT imala je utjecaj na sve fenole osim na fenolne alkohole, oleokantal i N.I., a temperatura TT na sve osim na tirosol i oleuropein. Najznačajnije promjene na fenolima odvijale su se pri temperaturi UTT i TT od 35 °C.

**Ključne riječi:** *djevičansko maslinovo ulje, ubrzani toplinski tretman, polifenoli, hrvatske autohtone sorte*

**Rad sadrži:** 43 stranica, 4 slika, 5 tablica, 61 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Dubravka Škevin

**Pomoć pri izradi:** izv.prof.dr.sc. Klara Kraljić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 18.prosinca 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

EFFECT OF FLASH THERMAL TREATMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS OF VIRGIN OLIVE OIL

*Karla Žanetić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058214795*

**Abstract:** Virgin olive oil (VOO) is rich in bioactive phytochemicals. Particularly noteworthy are the phenolic compounds, whose final composition depends on a series of chemical and biochemical reactions during crushing and malaxation of the olive paste. The aim of this work was to investigate the phenolic profile of conventionally produced VOO of the four autochthonous Croatian varieties and to determine the influence of flash thermal treatment (FTT) and thermal treatment (TT) on the phenols in VOO. The composition and concentration of phenols were determined using the HPLC method with a DAD detector. The results showed that the cultivar has a statistically significant influence on the phenolic composition in all VOO samples analyzed. The UTT temperature affected all phenols except phenolic alcohols, oleocanthal and N.I., and the TT temperature affected all except tyrosol and oleuropein. The most significant changes in the phenols occurred at a UTT and TT temperature of 35 °C.

**Keywords:** *virgin olive oil, flash thermal treatment, phenols, Croatian olive varieties*

**Thesis contains:** 43 pages, 4 figures, 5 tables, 61 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Dubravka Škevin, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Klara Kraljić, PhD, Associate professor

### Reviewers:

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

**Thesis defended:** December 18<sup>th</sup>, 2023



# Sadržaj

Sadržaj .....	3
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KEMIJSKI SASTAV DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	2
2.1.1. Sastav polifenola u djevičanskom maslinovom ulju.....	4
2.2. INOVATIVNE TEHNOLOGIJE U PROIZVODNJI DMU .....	8
2.2.1. Faza mljevenja i miješenja u proizvodnji DMU .....	8
2.2.2. Utjecaj parametara miješenja .....	9
2.2.3. Ubrzani toplinski tretman kao predtretman miješenju.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja .....	13
3.2. Reagensi.....	14
3.3. METODE .....	14
3.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	14
3.3.2. Separacija fenolnih spojeva na HPLC-u .....	15
3.3.3. Kvantifikacija fenolnih spojeva.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
4.1. ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA PROIZVEDENIM KONVENCIONALNOM METODOM .....	18
4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA TRETIRANIM UTT-om .....	21
4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA TRETIRANIM TT-om .....	27
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA.....	37

# 1. UVOD

Maslina (*Olea europeae* L.) predstavlja simbol mediteranskih zemalja i daje djevičansko maslinovo ulje (DMU) kao prirodni sok svog ploda koje je sastavni dio uravnotežene mediteranske prehrane. DMU predstavlja izvor zdravih masnoća jer obiluje bioaktivnim fitokemikalijama koje, osim na nutritivnu vrijednost, djeluju na zaštitu organizma od raznih bolesti. Zahvaljujući negliceridnoj frakciji koja čini mali udio u sastavu DMU, ono ima protuupalno, antioksidativno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Izolirani sastojci negliceridne faze zaslužni za navedene osobine su fenolni spojevi, steroli, tokoferoli, ugljikovodici, triterpentski i alifatski alkoholi, vitamini i tvari arome. U njegovom sastavu se ističu polifenolni spojevi koji sudjeluju u brojnim kemijskim i biokemijskim reakcijama koje su katalizirane endogenim enzimima te rezultiraju velikim brojem sekundarnih spojeva koji oblikuju konačna mirisno-okusna svojstva DMU-a i uvelike utječu na oksidacijsku stabilnost ulja. Ključni procesi se počinju odvijati u fazi prerade tijekom mljevenja ploda masline i miješenja maslinovog tijesta gdje procesni parametri imaju veliku ulogu u aktivaciji enzima i preraspodjeli polifenola između uljne i vodene faze, što utječe na konačni kemijski sastav DMU. U ovim kritičnim fazama proizvodnje može doći do gubitka velikog broja vrijednih bioaktivnih tvari i fenolnih spojeva u vodenoj fazi, a posljedično i do smanjene kvalitete DMU. U posljednje vrijeme istražuju se inovativne tehnologije proizvodnje koje bi riješile problem preraspodjele tvari između uljne i vodene faze te slabo iskorištenje procesa, a istovremeno ne bi negativno utjecale na senzorske karakteristike i održivost DMU. Kao obećavajuće rješenje predlaže se korištenje nove tehnologije ubrzanog toplinskog tretmana (UTT) kao predtretmana konvencionalnom miješenju. Primjenom zagrijavanja ili hlađenja regulirala bi se aktivnost kompleksnog enzimskog sustava koji u konačnici određuje nutritivni i senzorski profil DMU.

Cilj ovog rada bio je ispitati stvarni profil fenola u DMU četiri odabrane autohtone sorte maslina (istarska bjelica, oblica, rosulja i levantinka) proizvedenih konvencionalnom metodom. Zatim, ispitati djelovanje UTT-a na fenolni sastav sorti istarska bjelica, oblica i levantinka te djelovanje toplinskog tretmana (TT) na sastav fenola sorti oblica i rosulja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KEMIJSKI SASTAV DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Po standardima Međunarodnog vijeća za masline (IOC) definicija djevičanskog maslinovog ulja podrazumijeva ulje ploda masline *Olea europae* L. dobiveno isključivo mehaničkim putem ili drugim fizikalnim postupcima koji ne dovode do promjena u sastavu maslinovog ulja. U najvišu kategoriju ekstra djevičansko maslinovo ulje (EDMU) pripada ulje koje udovoljava svim propisanim graničnim vrijednostima parametara kvalitete i autentičnosti, a uz to ima izražena senzorska svojstva voćno, gorko i pikantno, bez prisutnih negativnih senzorskih osobina (Uredba (EU) br. 2104/2022).

Zahtjevi za korištenjem isključivo fizikalnih tehnika prerade maslina omogućuju dobivanje ulja s maksimalno očuvanim kemijskim karakteristikama zbog čega su jedinstvena u usporedbi s ostalim biljnim uljima. U njima su očuvane masne kiseline, polinezasićene (PUFA) i mononezasićene (MUFA), a uz to i bioaktivne komponente kao što su fenoli, fitosteroli, tokoferoli i karotenoidi.

Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja uključuje osapunjivu (98 %) i neosapunjivu (1-2 %) frakciju. U prvu skupinu pripadaju većinski triacilgliceroli, slobodne masne kiseline i fosfolipidi, dok u neosapunjive spojeve ubrajamo fenole, ugljikovodike, sterole, tokoferole, triterpenske i alifatske alkohole.

Glavne masne kiseline prisutne u maslinovom ulju sadrže 16 do 18 ugljikovih atoma, to su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3). U tragovima se mogu naći i miristinjska (C14:0), margarinska (C17:0) i gadoleinska (C20:1) masna kiselina. Najzastupljeniji triacilglicerol ujedno je sastavljen od najzastupljenije oleinske masne kiseline, OOO (40-59 %), a zatim slijede triacilgliceroli POO (12-20 %), OOL (12,5-20 %), POL (5,5-7 %) i SOO (3-7 %) (P-palmitinska; O-oleinska; S-stearinska; L-linolna). Triacilgliceroli građeni isključivo od zasićenih masnih kiselina nisu u sastavu DMU, a moguće je pronaći diacilglicerole i monoacilglicerole te slobodne masne kiseline koji su nastali uslijed nepotpune biosinteze i reakcija hidrolize estera triglicerola. Na koncentraciju mono i diacilglicerola utječu uvjeti čuvanja ulja te određuju starost ulja zbog čega su korisni za određivanje kvalitete (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Ghanbari i sur., 2012; Boskou i sur., 2006). Polinezasićene masne kiseline linolna (18:2,  $\omega$ -6) i linolenska (18:3,  $\omega$ -3) se nalaze u sastavu

masnih kiselina u DMU i nazivaju se esencijalne masne kiseline. Kao takve neophodne su za normalan rast i razvoj ljudskog organizma koji ih sam ne može sintetizirati pa se unose isključivo upotrebom masti u prehrani (Žanetić i Gugić, 2006).

Ugljikovodici su dio neosapunjive frakcije djevičanskog maslinovog ulja, a najzastupljeniji su skvalen i pigment  $\beta$ -karoten. Skvalen je molekula triterpentskog alkohola koja je preteča u sintezi biljnih sterola u maslinovom ulju. Zbog svojih antioksidacijskih sposobnosti koristi se u terapiji s lijekovima za snižavanje kolesterola, kod različitih oboljenja od raka i za zaštitu kože (Jagić, 2015).

U sastavu tokoferola najveća je koncentracija  $\alpha$ -tokoferola (90 %) u slobodnom obliku, a osim njega nalazimo  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol. Sama koncentracija ovisi o sorti i tehnološkim čimbenicima u proizvodnji pa tako rafinacija uzrokuje gubitak tokoferola. Ovi spojevi pridonose antioksidativnom kapacitetu djevičanskog maslinovog ulja, povećaju mu stabilnost tijekom skladištenja i pružaju zaštitu od termo i fotooksidacije (Ghanbari i sur. 2012; Boskou i sur., 2006).

Zelene i žute nijanse djevičanskog maslinovog ulja potječu od pigmenata klorofila i karotenoida. Sorta masline, indeks zrenja, način proizvodnje i same ekstrakcije te uvjeti skladištenja utječu na njihovu koncentraciju stoga se smatra mjerilom kvalitete iako nema standardizirane metode za mjerenje boje. Klorofil se pronalazi u obliku klorofila *a* i *b* te feofitina *a* i *b* ovisno o stupnju razgradnje. Karotenoidi koji su zastupljeni su  $\beta$ -karoten i lutein dok se u manjim količinama nalaze i ksantofili kao što su violaksantin i neoksantin (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Jagić, 2015).

Alifatski i aromatski alkoholi mogu biti u slobodnom ili esterificiranom obliku, a građeni su od zasićenih ugljikovih lanaca. Razlikujemo masne alkohole i diterpentske alkohole. Njihova koncentracija se smanjuje tijekom dozrijevanja do trenutka kada je koncentracija ulja u plodu najveća. Uz njih su prisutni i triterpentski alkoholi koji su intermedijari u transformacijama koje prethode nastajanju sterola. Najzastupljeniji su eritrodol i uvaol koji se nalaze u kožici masline te se ekstrahiraju organskim otapalima u maslinovo ulje. Njihova koncentracija pomaže u određivanju kvalitete maslinovog ulja jer se u ulju dobivenom ekstrakcijskim otapalom nalazi povišena koncentracija ovih triterpentskih alkohola dok je u ulju prerađenom isključivo mehaničkim putem koncentracija niža (Boskou i sur., 2006).

Bitni spojevi koji se koriste za provjeru izvornosti maslinovog ulja su steroli. To su lipidne molekule građene od 3 prstena cikloheksana i prstena ciklopentana. Glavne frakcije sterola su  $\beta$ -

sitosterol,  $\Delta 5$ -avenasterol i kampesterol, dok se u manjim količinama nalaze stigmasterol, kolesterol, brasikasterol, klerosterol, ergosterol, sitostanol, kampestanol,  $\Delta 7$ -avenasterol,  $\Delta 7$ -kolestenol,  $\Delta 7$ -kampestenol,  $\Delta 7$ -stigmastenol,  $\Delta 5,23$ -stigmastadienol,  $\Delta 5,24$ -stigmastadienol,  $\Delta 7,22$ -ergostadienol,  $\Delta 7,24$ -ergostadienol, 24-metilen-kolesterol i 22,23-dihidrobrasikasterol. Koncentracija sterola varira u uljima ovisno o njihovoj kategoriji pa tako djevičanska maslinova ulja lampante imaju veću količinu sterola dok rafinirana ulja imaju smanjen udio ukupnih sterola zbog procesa rafinacije. Također, ukupni steroli su i do tri puta viši u maslinovim uljima dobivenim ekstrakcijom otapalom nego kod djevičanskih maslinovih ulja (Boskou i sur., 2006).

### 2.1.1. Sastav polifenola u djevičanskom maslinovom ulju

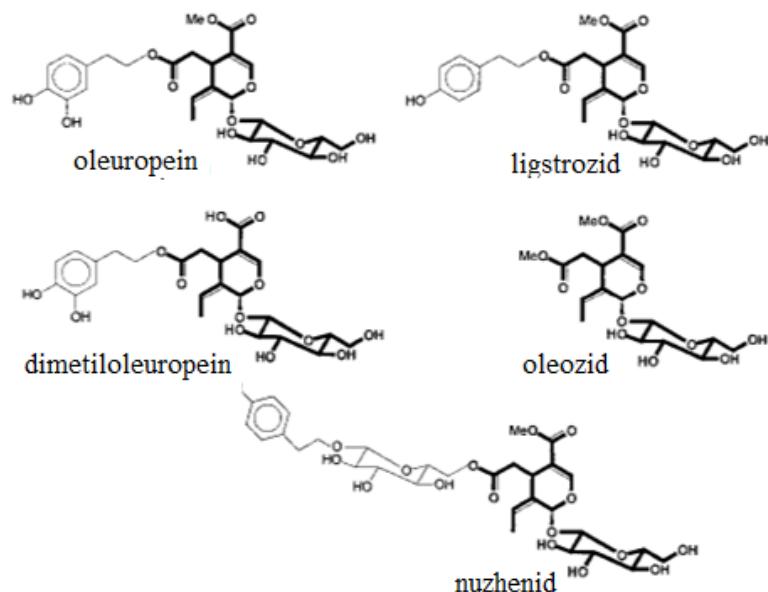
Djevičansko maslinovo ulje karakterizirano je sastavom polifenolnih spojeva koji oblikuju senzorske karakteristike ulja kao što su pikantnost i gorčina te mirisno-okusna svojstva pojedinog ulja. Također, sastav ovih spojeva uvelike utječe i na njegovu oksidacijsku stabilnost. Na sastav utječe velik niz čimbenika, od stupnja zrelosti, sezone i klimatskih uvjeta, do sorte i samog dijela ploda te tehnologije prerade maslina i uvjeta skladištenja ulja. Koncentracije polifenolnih spojeva se kreću između 50 i 1000 mg/kg ulja, a razlikuje se više od 30 identificiranih spojeva. Mogu se podijeliti u grupe koje nalazimo u tragovima kao što su fenolne kiseline, fenolni alkoholi, hidroksizokromani i flavonoidi dok su najzastupljenije grupe fenolnih spojeva sekoiridoidi i lignani (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Ghanbari i sur., 2012).

Fenolne kiseline koje nalazimo u sastavu djevičanskog maslinovog ulja zauzimanju manje od 1 mg/kg ulja, a glavne kiseline su hidroksibenzojeva, *p*-kumarinska, ferulinska, galna, siringinska, vanilinska, kavaska, *o*-kumarinska i sinapinska kiselina. Esterificirani oblici fenolnih kiselina su fenolni alkoholi koje karakterizira prisustvo hidroksilne grupe vezane na aromatsku hidroksilnu grupu. To su hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol) (3,4- DHPEA) i tirozol (*p*-hidroksifeniletanol) (*p*-HPEA) čija koncentracija raste za vrijeme skladištenja ulja zbog hidrolize sekoiridoida (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Fenolni alkoholi smatraju se pokazateljima sazrijevanja ploda jer povećanje njihove koncentracija korelira s hidrolizom komponenata veće molekulske mase (Omar, 2010). Smatra se da hidroksitirozol i njegovi derivati u maslinovom ulju pridonose zaštiti krvnih lipida od oksidativnog stresa, u slučaju kada sadrži najmanje 5 mg hidroksitirosola i/ili njegovih derivata po 20 g maslinovog ulja (Picchieri i sur., 2021; EC, 2012). Hidroksitirozol je pored ostalih polifenola (kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, 1-acetopinoresinol i

pinoresinol) pokazao antitumorsku aktivnost protiv stanica raka dojke (Menedez, i sur., 2008). Osim toga, proučavana je i njegova antimikrobna sposobnost te uz oleuropein djeluje protiv gljiva i pojedinih sojeva bakterija i virusa, uključujući viruse humane imunodeficijencije (HIV) i parazite (Bertelli i sur., 2020; Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

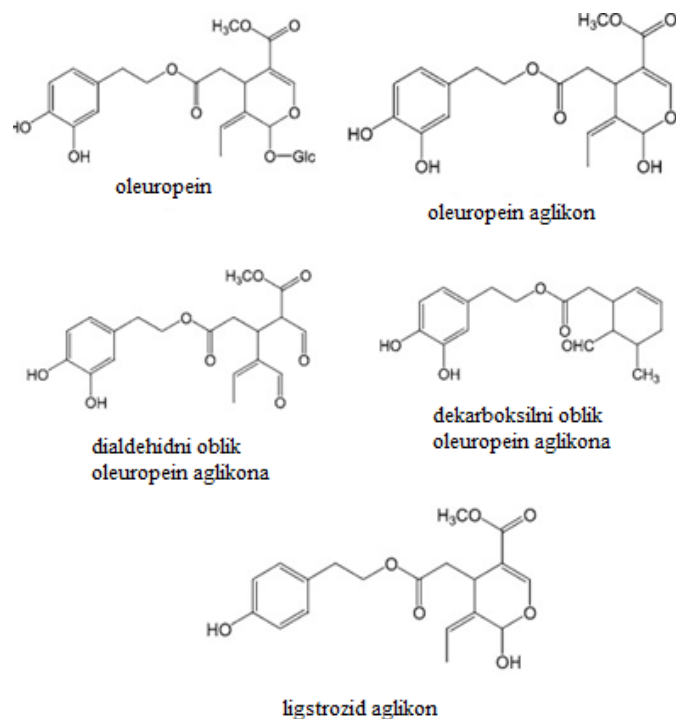
Hidroksi-izokromani su pronađeni u niskim koncentracijama u DMU, a ističu se glavni 1-fenil-6,7-dihidroksi-izokroman i 1-(3'-metoksi-4'-hidroksi)fenil-6,7-dihidroksi-izokroman. Uslijed hidrolitičkih procesa djelovanjem glukozidaza i esteraza njihova koncentracija raste i rezultira derivatima izokromana, a to su karbonilni spojevi i hidroksitirosol (Bendini i sur., 2007; Bianco i sur., 2002).

Sekoiridoidi, odnosno fenolni oleozidi, se inače rijetko nalaze u sastavu biljnih vrsta za razliku od vrste *Oleaceae* koja obiluje sekoiridoidima u listu i plodu. Karakterizira ih prisutnost elenolne kiseline ili njenih derivata poput dialdehidnog oblika elenolne kiseline koji su vezani na molekulu tirosole ili hidroksitirosole. Najvažniji sekoiridoidi pronađeni u maslinama su oleuropein, dimetiloleuropein, oleurozid, ligstrozid, nuzhenid i njihovi aglikoni koji čine oko 90 % ukupnih fenolnih spojeva (slika 1). Još jedan sekoiridoidni spoj, oleokantal, detektiran je u ekstra djevičanskom maslinovom ulju, dok nije pronađen u samom plodu masline, vjerojatno jer je nastao kao posljedica enzimskih aktivnosti tijekom prerade. Sekoiridoidi su hidrofilni spojevi netopljivi u ulju pa velikim dijelom zaostaju u vegetabilnoj vodi prilikom prerade. Mehaničkim postupcima mljevenja/drobljenja i miješenja dolazi do enzimskih reakcija kataliziranih endogenim enzimima koje rezultiraju aglikonima sekoiridoida. To pridonosi gorčini djevičanskog maslinovog ulja, a glavni spoj odgovoran za to je dialdehidni oblik oleuropein aglikona (Jimenez-Lopez, i sur., 2020; Alagna i sur., 2012).



Slika 1. Strukture glavnih fenolnih oleozida u porodici *Oleaceae* (Soler-Rivas i sur., 2000)

Oleuropein, kao glavni predstavnik skupine sekoiridoida, jest ester 2-(3,4-dihidroksifenil) etanola (hidroksitirosola) i glukozida elenolne kiseline (Soler-Rivas i sur., 2000). Ovisno o sorti masline može biti zastupljen u koncentraciji od 140 mg/g suhe tvari u mladim maslinama i 60-90 mg/g suhe tvari u lišću. Oleuropein je pokazao nekoliko zdravstvenih učinaka: antioksidativno, protuupalno, antikancerogeno, antiaterogeno, antimikrobno i antivirusno zbog čega se koristi i kao dodatak prehrani. Biosinteza oleuropeina je rezultat sekundarnog metabolizma iz puta mevalonske kiseline do formiranja oleozida. Koncentracija oleuropeina prati stadij razvoja ploda masline. Tijekom faze rasta dolazi do nakupljanja oleuropeina da bi u zelenoj fazi uz smanjenja razine klorofila došlo do smanjenja razine oleuropeina te u crnoj fazi koncentracija nastavlja padati kako se pojavljuju tamni antocijani. Zbog navedenog je važno odabrati optimalno vrijeme branja maslina. Kako razina oleuropeina opada uslijed djelovanja esteraza, raste razina glukozida elenolne kiseline i dimetiloleuropeina (Omar, 2010). Oleuropein i ligstrozid kao glavni fenolni oleozidi u plodu masline podliježu enzimskoj hidrolizi pri čemu nastaju njihovi dialdehidni oblici dekarboksimetil oleuropeina i ligstrozid aglikona te aldehidni oblici oleuropeina i ligstrozid aglikona (slika 2). Ovakvi aglikonski oblici nastaju djelovanjem endogenog enzima  $\beta$ -glukozidaze i čine najznačajnije fenolne komponente u djevičanskom maslinovom ulju. Zahvaljujući djelovanju  $\beta$ -glukozidaze prevedeni su u formu aglikona i kao takvi su topljivi u ulju (Romero-Segura i sur., 2009).



Slika 2. Kemijska struktura oleuropeina i srodnih aglikona (Boskou i sur., 2005)

Nuzhenid se kao prevladavajući sekoiridoidni spoj nalazi u sjemenki masline te je utvrđeno da se nalazi u višim koncentracijama u početnoj fazi zrenja u usporedbi s visokim stupnjem zrelosti maslina. Isti fenomen slijede i oleuropein te verbaskozid u sjemenki masline, a to u konačnici utječe na metabolizam oleozida i njihovu raspodjelu (Obied, 2008).

Dva sekoiridoida se u posljednje vrijeme istražuju zbog svojih zdravstvenih učinaka. To su oleokantal i oleacein koji se ističu svojim djelovanjima na zdravlje organizma. Oleokantalu se pripisuju biološka djelovanja poput protuupalne aktivnosti, antikancerogenih i antialzheimerovih učinaka u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima. Također, ima zaštitnu ulogu protiv artropatije *in vitro* i protiv kardiovaskularnih bolesti *in vivo* i u ispitivanjima na ljudima. Oleacein se poput oleokantala veže za smanjenje upala te se smatra glavnom komponentom zaslužnom za antisklerotični učinak DMU i pokazuje zaštitno djelovanje protiv raka. Za bolje razumijevanje bioloških svojstava oleokantala i oleaceina potrebno je dodatno proučiti njihovu apsorpciju i metabolizam djelovanja kako bi se odredila bioraspodjivost ovih spojeva. Na taj način bi se mogao odrediti minimalni dnevni unos oleokantala i oleaceina kako bi se djevičansko maslinovo ulje bogato ovim sekoiridoidima moglo preventivno koristiti protiv navedenih bolesti (Lozano-Castellón i sur.,



2020).

Još jedna skupina koja se može naći u DMU su flavonoidi primjerice luteolin, apigenin i njihovi derivati. Flavonoidi su polifenolne komponente koje se sastoje od dva benzenska prstena povezana s lancem od tri linearna ugljikova atoma, a razlikujemo flavone i flavonole. Jedna od najzastupljenijih grupa fenolnih spojeva su lignani koji se prepoznaju po dvjema jedinicama fenilpropana. Detektirani su u koncentracijama od 1 do 100 mg/kg ulja, a najpoznatiji su pinoresinol i 1-acetopinoresinol (Alu'datt i sur., 2017).

## **2.2. INOVATIVNE TEHNOLOGIJE U PROIZVODNJI DMU**

### **2.2.1. Faza mljevenja i miješenja u proizvodnji DMU**

Prema Uredbi (EU) br.1308/2013 definicija „Djevičanska maslinova ulja” znači ulja dobivena od ploda masline isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima pod uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja, koja nisu drugačije obrađena osim pranjem, dekantacijom, centrifugiranjem ili filtriranjem, isključujući ulja dobivena upotrebom otapala ili dodavanjem pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja ili ulja dobivena reesterifikacijom i miješanjem s uljima drugih vrsta. Cilj je dobiti što bolje iskorištenje procesa te što kvalitetnije ulje koje ima sačuvane izvorne sastojke iz ploda važne za senzorske karakteristike i nutritivnu vrijednost ulja.

Kritične točke u procesu proizvodnje su mljevenje i miješenje pri čemu se razara stanična struktura perikarpa i endokarpa ploda te dolazi do kontakta endogenih enzima sa specifičnim tvarima iz različitih dijelova ploda. Mljevenjem se oslobađa ulje iz vakuola i djelomično iz citoplazme te ostaje dispergirano u sitnim kapljicama emulzije (Abenoza i sur., 2013). Tradicionalne kamene mlinove danas su zamijenili metalni mlinovi, bilo čekićari ili mlinovi s diskovima različitih izvedbi koji imaju svoje prednosti i nedostatke. U ovoj fazi započinju brojni kemijski i biokemijski putevi koji u konačnici oblikuju profil djevičanskog maslinovog ulja, zbog čega je važno da sve oslobođene tvari dođu u međusobni kontakt. Miješenjem maslinovog tijesta povezuju se manje kapljice ulja u lipidnu fazu koja se kasnije lakše izdvaja iz maslinove paste (Kalogianni i sur., 2019). Raspodjela tvari i enzima između vodene i uljne faze ima direktan utjecaj na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja i zbog toga je faza miješenja nezaobilazna u proizvodnji

DMU. Dolazi do promjena pod utjecajem endogenih enzima ploda masline kao što su  $\beta$ -glukozidaza, esteraza, polifenoloksidaza (PPO) i peroksidaza (POX). Fenolni glukozidi prelaze u lipofilnije aglikone, složeni fenoli razgrađuju se na fenolne alkohole i fenolne kiseline koje su također lipofilnije, a dolazi i do oksidacije i degradacije fenola. Stanične stijenke razgrađuju se pektolitičkim i hemicelulolitičkim enzimima masline što poboljšava izdvajanje ulja i drugih tvari stanice. Lipaze, fosfolipaze i galaktolipaze oslobađaju slobodne masne kiseline iz triglicerida, fosfolipida i galaktolipida, a enzimi lipoksigenaznog (LOX) puta odgovorni su za nastajanje poželjnih hlapljivih tvari ulja, tj. C5 i C6 hlapljivih spojeva (Kalogianni i sur., 2019; Sanchez-Ortiz i sur., 2012; Garcia-Rodriguez i sur., 2011; Kalua i sur., 2006). Sastav endogenih enzima masline ovisi o sorti i njenim genskim karakteristikama, a uz to su pod utjecajem procesnih parametara miješenja. Velika je pozornost usmjerena na istraživanje tih parametara koji posljedično oblikuju nutritivnu i senzorsku vrijednost te oksidacijsku stabilnost DMU (Kalogianni i sur., 2019; Clodoveo, 2012).

### 2.2.2. Utjecaj parametara miješenja

U procesu miješenja najveću pozornost ima parametar temperature i trajanje miješenja maslinovog tijesta. Brojna istraživanja su pokazala da viša temperatura miješenja pridonosi manjoj viskoznosti tijesta i u konačnici većem iskorištenju procesa proizvodnje, dok s druge strane visoke temperature negativno utječu na kvalitetu dobivenog ulja (Abenoza i sur., 2013; Kuala i sur., 2006). Prema istraživanju Aguilera i sur. (2010) povećana temperatura miješenja dovodi do bolje ekstrakcije ulja i nema utjecaja na slobodne masne kiseline u većini slučajeva, a negativno utječe na oksidacijsku stabilnost ulja zbog porasta peroksidnog broja ili nastanka hlapljivih tvari uslijed oksidacijskih procesa (Abenoza i sur., 2013; Parenti i sur., 2008; Angerosa i sur., 2001). No povećanjem temperature miješenja iznad 45°C mijenjaju se reološke karakteristike maslinovog tijesta uslijed interakcije lipida, proteina i ugljikohidrata pa se time iskorištenje smanjuje (Kalua i sur., 2007). Nadalje, povećanje vremena miješenja dovodi do povećanja prinosa sve do maksimalnog trajanja miješenja od 60-75 minuta (Ranalli i sur., 2003). Utjecaj vremena miješenja nije se pokazao značajnim za razine slobodnih masnih kiselina, peroksidnog broja i za sastav masnih kiselina (Gomez-Rico i sur. 2009; Kuala i sur., 2006).

U pogledu na fenolni sastav, pokazalo se da vrijeme miješenja nema značajan utjecaj. Međutim, iz istraživanja Gomez-Rico i sur. (2009), Ranalli i sur. (2003) povećanje trajanja

miješenja pridonijelo je povišenju ukupnih fenola sve do kritične točke od 60 minuta nakon čega je zabilježen pad ukupnih fenola. S druge strane brojni autori (Lukić i sur., 2017; Aguilera i sur., 2015; Gomez-Rico i sur., 2009) su izvijestili da porastom temperature miješenja raste udio ukupnih fenola, dok su pojedini autori dokazali suprotno (Amirante i sur., 2001). Parenti i sur. (2008) povezali su porast temperature iznad 35°C i pad razine polifenola s aktivacijom endogenih enzima PPO i POX.

Sastav i ukupna koncentracija fenolnih spojeva u konačnici ovisi o njihovim interakcijama s enzimima, njihovoj aktivnosti i termalnoj stabilnosti. Vjerojatnost reakcije polifenola s enzimima ovisi o njihovoj preraspodjeli između uljne i vodene faze, a to je pod izravnim utjecajem temperature procesa miješenja. Veliki dio polifenola gubi se s vegetabilnom vodom ili ostaje zarobljen u nerazorenim stanicama mezokarpa pa se gubi s kominom. Zbog toga je važno odabrati optimalne parametre mljevenja i miješenja kako bi se povećala efikasnost procesa i povećala vrijednost djevičanskog maslinovog ulja.

### 2.2.3. Ubrzani toplinski tretman kao predtretman miješenju

Kako bi se unaprijedili postupci proizvodnje maslinovog ulja sve se više istražuju inovativne metode procesiranja koje bi pospješile iskorištenje procesa, poboljšale sastav DMU, a time i senzorski profil, nutritivnu vrijednost i oksidacijsku stabilnost DMU. Tehnologija ubranog toplinskog tretmana (UTT) kao predtretmana miješenju usmjerena je na nutritivni i senzorski profil djevičanskog maslinovog ulja. Manipulacijom temperaturom, bilo zagrijavanjem ili hlađenjem maslinovog tijesta, djeluje se na kompleksne enzimske puteve koji započinju u ovoj fazi proizvodnje i u konačnici oblikuju kvalitetu DMU (Koprivnjak, 2006). Istraživači su koristili različite izmjenjivače topline kako bi postigli brzo i kontinuirano povećanje ili smanjenje temperature maslinovog tijesta prije miješenja. Predložili su korištenje cjevastih izmjenjivača za zagrijavanje tijesta kako bi u konačnici smanjili vrijeme miješenja i djelovali na kemijski sastav fenolnih i hlapljivih spojeva. Zagrijavanje na ovaj način bilo bi značajno u slučajevima u kojima se berba odvija pri niskim temperaturama (Veneziani i sur., 2017; Leone i sur., 2015; Veneziani i sur., 2015; Esposto i sur., 2013).

Istraživanje Esposto i sur. iz 2013. donijelo je zaključke da UTT djeluje na strukturalne modifikacije maslinove paste na mikroskopskoj razini u smislu razaranja stanica parenhima i agregacije kapljica ulja u usporedbi sa samljevenom pastom. UTT proveden je na EVO-liniji Alfa

Lavala gdje je odmah nakon mljevenja tijesto maslina Peranzana i Gentile zagrijano na 25 i na 30 °C. Nisu opazili značajne utjecaje na parametre kvalitete kao što su slobodne masne kiseline i peroksidni broj, dok se pokazalo da u usporedbi s uljem proizvedenim bez UTT, negativno utječe na koncentraciju fenolnih komponenti. Pretpostavljaju da je razlog to što je UTT smanjio aktivnost depolimerizirajućih enzima (pektolitički, celulolitički i hemicelulolitički) čime se smanjila propusnost stanične stijenke te se manje fenolnog sadržaja našlo u ulju. Pozitivan utjecaj UTT-a pokazao se u porastu hlapljivih tvari koje su se razlikovale za pojedine sorte, a ovisi o aktivnosti enzima LOX puta.

Leone i sur (2015) istraživali su utjecaj UTT na tijesto maslina Peranzana. Tijesto je mljeveno na dva različita tipa mlinova, toplinski tretirano u cijevnom izmjenjivaču topline i miješeno pri 28 °C kroz 10, 20 i 30 minuta. Zagrijavanje nakon mljevenja na metalnim diskovima reducira vrijeme miješenja za 10 minuta i utječe na kvalitetu DMU u pogledu fenolnog sastava i hlapljivih spojeva nastalih LOX putem. Sastav fenolnih spojeva poboljšan je u ulju dobivenom brzim zagrijavanjem maslinove paste, a razine hlapljivih spojeva poput C6 aldehida i estera, koji su nositelji osjetilnih nota pokošene trave i cvjetnih nota, veći su u svim uljima dobivenim inovativnim procesom brzog zagrijavanja. Prijavili su da bi UTT zagrijavanjem koristio u slučaju gdje su temperature maslina u trenutku branja blizu 0°C te da se prednosti koje donosi ubrzano zagrijavanje paste prije miješenja proporcionalno smanjuju s porastom temperature maslina.

Veneziani i sur. (2015) proveli su istraživanje na pet talijanskih sorti (Ottobratica, Cellina di Nardo, Peranzana, Coratina i Moraiolo) gdje su analizirali utjecaje UTT-a na EVO-liniji, na prinose ekstrakcije i tržišne parametre kvalitete. Tretiranje UTT-om i kombinacija s miješenjem kroz 15 i 20 minuta pokazali su slična iskorištenja procesa. Tržišni parametri slobodne masne kiseline i peroksidni broj nisu promijenjeni i pokazuju da primijenjena toplinska modifikacija ne djeluje na uobičajene kemijske i biokemijske procese degradacije masti, posebno u pogledu aktivnosti rezidualnih lipaza. Podaci o sastavu fenolnih spojeva pokazuju velike varijacije ovisno o kultivaru, a u svim slučajevima koncentracija fenola je bila viša u uljima dobivenim UTT tretmanom. Pokazalo se da povećanje vremena miješenja nakon tretmana UTT-om odgovara povećanju oslobođenih fenola u djevičanskom maslinovom ulju to jest zabilježeni su pozitivni trendovi nakon 15 minuta i još bolje vrijednosti nakon 20 minuta miješenja. U usporedbi sa studijom iz 2013., Esposto i sur. (2013) su donijeli zaključak da 10 minuta miješenja nakon tretmana UTT-om nije dovoljno za povećanje koncentracije fenola u sorti Peranzana. Predložili su

minimalno vrijeme miješenja od 15 minuta koje je potrebno za poboljšanje razgradnje stanične stijenke endogenim depolimerizirajućim enzimima i oslobađanje fenolnih spojeva. Ubrzana toplinska obrada utječe na aktivnost enzima lipoksigenaznog puta koji su ovisni o genskim karakteristikama sorte, a koje utječu i na sam raspored enzima u dijelovima ploda.

S druge strane, potrebno je prilagoditi uvjete proizvodnje današnjoj praksi sve ranijeg branja maslina te problemima globalnog zagrijavanja zbog kojih se tijesto nakon meljave nerijetko pregrijava na temperature više od 30°C (Veneziani i sur., 2017). Visoke temperature negativno utječu na senzorske karakteristike i mogu smanjiti koncentraciju fenolnih spojeva (Salas i Sanchez, 1999). Veneziani i sur. (2017) koristili su izmjenjivače topline i suhi led za hlađenje maslinovog tijesta na 15°C. Rezultati istraživanja pokazali su da hlađenje nije utjecalo na parametre kvalitete (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, K-brojevi) niti iskorištenje. Hlađenje tijesta na 15°C pokazalo je značajan porast fenola za sve tri proučavane talijanske sorte, što povezuju s inhibicijom polifenol oksidaze (PPO) koja pokazuje najbolju aktivnost pri 50°C (Taticchi i sur., 2013). Osim polifenola proučavano je i djelovanje na hlapljive komponente koje se oslobađaju djelovanjem enzima lipoksigenaznog puta, gdje su se pokazale kvantitativne i kvalitativne promjene u sastavu ovisno o razini aktivnosti različitih enzima LOX puta. Sve značajne promjene udjela polifenola i hlapljivih tvari ovisile su o sorti. U sličnom istraživanju kojeg su također proveli Veneziani i sur. (2018), ali na drugim talijanskim sortama, rezultati su potvrdili da hlađenje ne djeluje na osnovne parametre kvalitete te da različite promjene polifenola i hlapljivih spojeva ovise o sorti što je povezano s razlikama u aktivnosti enzima. Hlađenje maslinovog tijesta na 15°C jamči značajno povećanje udjela fenola u konačnom proizvodu i opći porast ukupnih aldehida, a time daje i pozitivan učinak na zdravlje i senzorska svojstva DMU. Prema regulativi EFSE iz 2012. prijavljeno je da povećane koncentracije fenola u djevičanskom maslinovom ulju pružaju povoljan učinak za zaštitu krvnih lipida od oksidativnog stresa, a to bi se moglo postići ovom metodom prerade i time smanjiti dnevnu potrebu za unos DMU-a (Reboredo-Rodríguez i sur., 2017).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

Ovo je istraživanje provedeno na uzorcima djevičanskog maslinovog ulja (DMU) četiriju hrvatskih autohtonih sorti; oblica, rosulja, istarska bjelica i levantinka. DMU su proizvedena na laboratorijskoj uljari uz predtretman samljevenog tijesta maslina ubrzanim toplinskim tretmanom (UTT) ili toplinskim tretmanom (TT) prije faze miješenja. Osim toga, kao materijal korištena su i ulja proizvedena od navedenih sorti maslina konvencionalnom metodom u poluindustrijskom postrojenju. Sva ulja su proizvedena 2021. godine te su do analiza čuvana u tamnim staklenim bocama pri temperaturi 15-20 °C, a prazni prostor u boci bio je ispunjen dušikom.

#### 3.1.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja

Proizvodnja DMU provedena je prema metodi opisanoj u diplomskom radu Pejić (2022). Očišćeni i oprani plodovi maslina samljeveni su na mlinu čekićaru, koji je, uz termomješalice s vodenom kupelji i centrifugom, dio laboratorijske pilot-uljare Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas). Samljeveno maslinovo tijesto toplinski je tretirano pri 6 različitih temperatura: 15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C. Za potrebe hlađenja maslinovog tijesta korišten je uređaj za ubrzano hlađenje (Blastchiller ATT05 ATILA ABB, TECNODOM), a toplina je odvođena konvekcijom pri temperaturi od -18 °C. Grijanje maslinova tijesta na željene temperature (25-40 °C) za UTT provedeno je zagrijavanjem pomoću kondukcije u vodenoj kupelji (SUB Aqua Pro SAP12, GRANT) s temperaturom vode 50-52 °C. S druge strane, zagrijavanje za TT provedeno je u termostatu dovođenjem topline konvekcijom pri temperaturi od 45 °C. Temperatura tijesta tijekom svih predtretmana je kontrolirana ubodnim termometrom.

Nakon provedenog predtretmana, tijesto je podvrgnuto miješenju pri temperaturi od 27 °C u trajanju od 40 minuta a ulje je izdvojeno centrifugiranjem na 3500 o/min kroz 90 sekundi. Bistrenje proizvedenog ulja provedeno je finim centrifugiranjem na centrifugi Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG) na 18 °C u trajanju od 4 minute pri 5000 o/min.

## 3.2. Reagensi

Korišteni reagensi za ekstrakciju i separaciju fenolnih spojeva moraju biti HPLC stupnja čistoće. Reagensi korišteni prilikom izrade ovog diplomskog rada bili su voda, metanol (Honeywell, Offenbach, Njemačka) i mravlja kiselina (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska). Također, korišteni su komercijalno dostupni standardi fenolnih spojeva: hidroksitirosol, tirosol, oleacin, oleokantal, oleuropein, oleurozid, 4-hidroksibenzojeva kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, galna kiselina, kavaska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, protokatehinska kiselina, sinapinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina i siringaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je prema standardnoj metodi Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2022). Korištena metoda temelji se na ekstrakciji polarnih fenolnih spojeva otopinom metanola i kvantifikaciju na HPLC-u uz UV detektor pri 280 nm. Pri tome se koristi otopina siringinske kiseline ( $\gamma=0,015$  mg/L) u 80% metanolu kao interni standard, a kao eksterni standard korištena je smjesa otopina tirosola ( $\gamma=0,030$  mg/L) i siringinske kiseline ( $\gamma=0,015$  mg/L) u istom otapalu. Koncentracija ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva iskazana je kao mg tirosola kg/ulja (IOC, 2022).

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je u plastičnim epruветama s čepom od 15 mL. Odvaž se 4 g maslinovog ulja i doda 1 mL otopine internog standarda te se epruвета zatvori i protrese na vortexu 30 sekundi. U epruветu se doda 5 mL 80 %-tne otopine metanola i ponovo se promiješa na vortexu 1 minutu. Ekstrakcija fenolnih spojeva provodi se u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta na sobnoj temperaturi. Odvajanje metalnog sloja provodi se centrifugiranjem na 5000 o/min kroz 25 minuta pri sobnoj temperaturi, a izdvojeni supernatant se pomoću plastične šprice profiltrira kroz celuloza acetatnim filter veličina pora 0,45  $\mu$ m u vialice od 2 mL. Tako pripremljeni ekstrakt fenola analizira se HPLC-om.

### 3.3.2. Separacija fenolnih spojeva na HPLC-u

Analiza fenolnih spojeva provedena je na C18 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na Agilent Technologies (LC 1200) HPLC sustav zagrijanoj na 30 °C prema metodi opisanoj u diplomskom radu Brezjan (2023). Ukratko, injektirano je 20 µL pripremljenog ekstrakta, a za razdvajanje je korištena gradijentna kromatografija (tablica 1) ukupnog protoka 1 mL/min kroz čitavo vrijeme trajanja analize. Mobilne faze bile su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B).

Tablica 1. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

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

Za detekciju i identifikaciju polifenola korišten je DAD (eng. diode array detector) detektor pri valnoj duljini od 280 nm, bendwith (širina pojasa) 8 nm, bez referentne valne duljine. Za vrijeme trajanja analize snimani su UV spektri od 190-400 nm. Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena i UV spektra željenog pika s retencijskim vremenima i UV spektrima ranije navedenih injektiranih standarada u koncentracijama 0,015-0,050 mg/mL.



### 3.3.3. Kvantifikacija fenolnih spojeva

Kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom odziva internog standarda s odzivom svakog pojedinog pika (formula [1]). Da bi se rezultati izrazili kao koncentracija tirosola, svaki je dan injektiran eksterni standard, tj. smjesa tirosola i siringinske kiseline. Iz dobivene površine pikova izračunat je faktor odziva (RF) i omjer faktora odziva (RRF) tirosola i siringinske kiseline prema formulama [2]-[4].

$$\text{koncentracija fenolnog spoja (mg/kg)} = \frac{A \times 1000 \times RRF_{\text{sir/tir}} \times w_{\text{sir}}}{A_{\text{sir}} \times w} \quad [1]$$

gdje je:

A - površina ispod pika pojedinog fenolnog spoja

$A_{\text{sir}}$  - površina ispod pika siringinske kiseline

$w_{\text{sir}}$  - masena koncentracija siringinske kiseline (mg) dodane uzorke u 1 mL otopine internog standarda

w - masa ulja korištenog za analizu (g)

$RRF_{\text{sir/tir}}$  – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko tirosola (formula [2])

$$RRF_{\text{syr/tyr}} = \frac{RF_{1\mu\text{g}}(\text{siringinska kiselina})}{RF_{1\mu\text{g}}(\text{tirosol})} \quad [2]$$

gdje je

$RF_{1\mu\text{g}}$  (siringinska kiselina) – faktor odziva siringinske kiseline koji se računa po formuli [3]

$$RF_{1\mu\text{g}}(\text{siringinska kiselina}) = \frac{\text{površina pika siringinske kiseline}}{\mu\text{g injektirane siringinske kiseline}} \quad [3]$$

$RF_{1\mu\text{g}}$  (tirosol) - faktor odziva tirosola koji se računa po formuli [4]

$$RF_{1\mu\text{g}}(\text{tirosol}) = \frac{\text{površina pika tirosola}}{\mu\text{g injektiranog tirosola}} \quad [4]$$

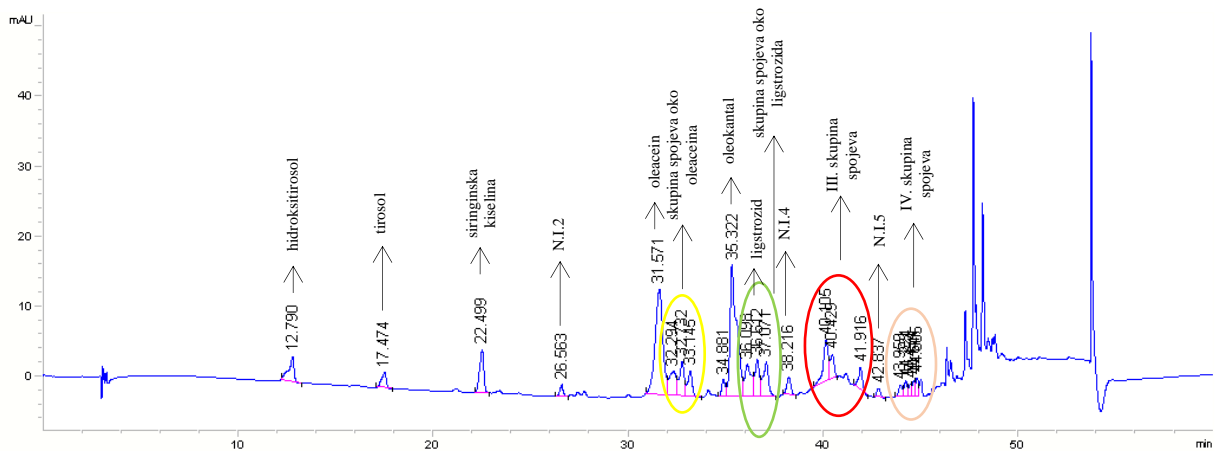
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) je prirodno ulje ploda masline (*Olea europea L.*), proizvedeno isključivo mehaničkim postupcima, bez kemijskog tretmana pri čemu bi nakon procesa proizvodnje u njemu trebali biti sačuvani svi izvorno prisutni sastojci zaslužni za njegova specifična kemijska, senzorska i prehrambena svojstva (Žanetić i sur., 2011). Udio fenolnih spojeva ima značajnu ulogu za oksidacijsku stabilnost, nutritivnu vrijednosti i senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Cerretani i sur. (2005) ističu kako je sastav fenolnih spojeva i njihov udio u djevičanskom maslinovom ulju uvjetovan agronomskim, klimatskopedološkim i tehnološkim čimbenicima, kao što su sorta masline, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti ploda i proizvodni proces. Stoga je prvi cilj ovog istraživanja bio analizirati sastav i koncentraciju fenola u djevičanskim maslinovim uljima iz 4 autohtone sorte maslina proizvedenih konvencionalnim postupkom proizvodnje.

Suvremena proizvodnja DMU nailazi na probleme poput slabog iskorištenja procesa te često neodgovarajuće preraspodjele bioaktivnih komponenti ovog ulja, posebice fenolnih spojeva, između uljne i vodene faze tijekom pripreme ploda za separaciju ulja. Kao rješenje ovog problema, istraživačke grupe predlažu inovativne metode primjerice ubrzani toplinski tretman (UTT). UTT podrazumijeva hlađenje ili grijanje maslinova tijesta prije miješenja, što bi moglo dodatno aktivirati endogene enzime ploda masline te tako povećati udjel fenola u DMU. Drugi cilj rada bio je ispitati utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana tijesta maslina iz istarske bjelice, oblice i levantinke na koncentraciju i sastav fenolnih spojeva. Nakon mljevenja tijesta su hlađena na 15 i 20 °C i zagrijavana na 25, 30, 35 i 40 °C. Prijenos topline odvijao se konvekcijom u šokeru i kondukcijom u vodenoj kupelji. Nakon toplinskog tretiranja, tijesto je podvrgnuto miješenju i dalje izdvajanju ulja centrifugalnom ekstrakcijom. S obzirom na to da prijenos topline može značajno utjecati na svojstva maslinovog tijesta, treći cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje toplinskog tretmana tijesta oblice i rosulje (TT) konvekcijom i u šokeru i u termostatu, također kao predtretmana miješenju.

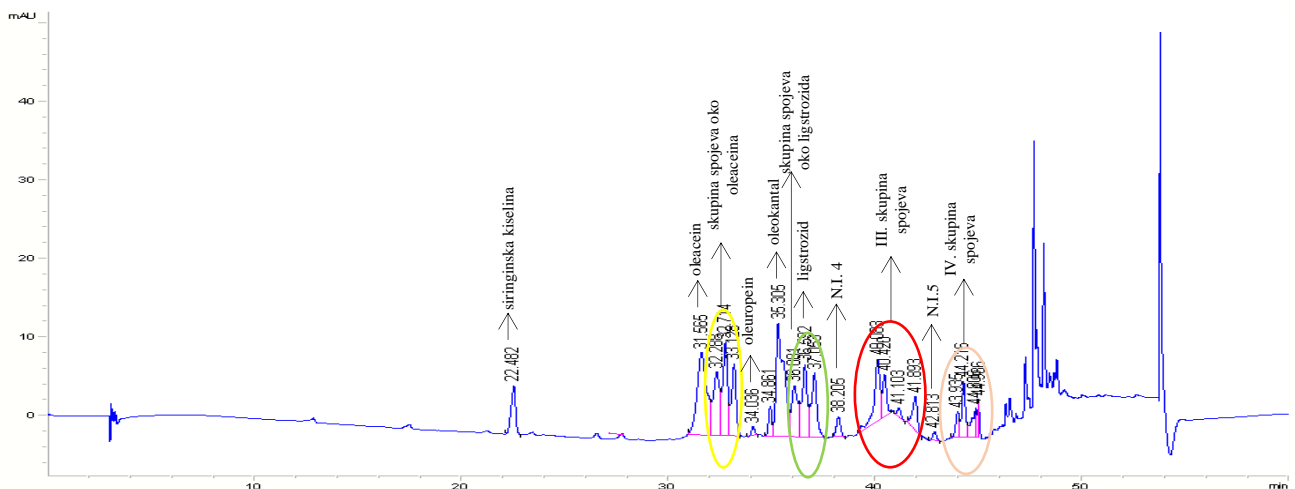
#### 4.1. ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA PROIZVEDENIM KONVENCIONALNOM METODOM

Fenolni spojevi su identificirani i kvantificirani pomoću DAD detektora, detektora s nizom dioda, pri valnoj duljini od 280 nm. Na slici 3. i slici 4. vidimo primjer kromatograma fenolnih spojeva DMU sorte levantinka i istarska bjelica gdje su pojedini fenolni spojevi identificirani po njihovom retencijskom vremenu pika, usporedbom s retencijskim vremenima standarda. Kvantificirani su iz dobivenih površina pikova.



N.I.-neidentificirani spoj; III. i IV. skupina spojeva - grupirani su prema sličnim retencijskim vremenima ( $R_t$  ~40.8 min za III.skupinu i  $R_t$  ~44.5 min za IV.skupinu) te sličnosti spektara

Slika 3. Kromatogram fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja sorte Levantinka



N.I.-neidentificirani spoj; III. i IV. skupina spojeva - grupirani su prema sličnim retencijskim vremenima ( $R_t$  ~40.8 min za III.skupinu i  $R_t$  ~44.5 min za IV.skupinu) te sličnosti spektara

Slika 4. Kromatogram fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja sorte Istarska bjelica

Tijekom prerade ploda masline, najviše pri mljevenju i miješenju, aktiviraju se endogeni enzimi ploda masline koji značajno utječu na kemijski sastav DMU. Esteraze djeluju na *p*-hidroksifeniletanol (*p*-HPEA) i 3,4-dihidroksifeniletanol (3,4-DHPEA), te ih prevode u lipofilne tirosol i hidroksitirosol (slika 3). To su fenolni alkoholi djevičanskog maslinovog ulja kojima se pripisuje kardioprotektivno djelovanje (Mair i sur., 2023).

Glukozidaze hidroliziraju sekoiridoide ploda, oleuropein i ligstrozid, pri čemu se formiraju njihovi lipofilni aglikoni. Aglikoni ligstrozida se vrlo vjerojatno nalaze u skupini spojeva oko ligstrozida. Aglikon oleuropeina nije identificiran u ovom radu no pretpostavljamo da se nalazi u III ili u IV skupini spojeva. Brojni autori objavili su pozitivan utjecaj oleuropeina (slika 4) na zdravlje zbog njegovog antivirusnog, antioksidacijskog i kardioprotektivnog djelovanja (Klimova i sur., 2019).

Na kromatogramima u radu (slika 3 i 4) identificiran je i ligstrozid, koji i u glukozidnoj i u formi aglikona ima snažno antioksidacijsko djelovanje jer, između ostalog, reducira reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *Reactive oxygen species*) (Presti i sur., 2017).

Na kromatogramu su zabilježeni i spojevi oleacein i oleokantal (slika 3 i 4) sa značajnim utjecajem na zdravlje. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju visok terapijski potencijal oleaceina kod krvožilnih bolesti, Alzheimerove bolesti, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa i raka, te oleokantala također kod raka i kod ateroskleroze (Lozano-Castellón i sur., 2020).

Specifičan sastav fenolnih spojeva DMU izaziva određene probleme pri njihovoj analizi, konkretno, pri identifikaciji. Na tržištu nisu dostupni standardi baš svih sekoiridoida, tako da nije bilo moguće identificirati sve detektirane spojeve. Stoga su osim označenih spojeva na slici 3. i slici 4., prikazane i grupe neidentificiranih spojeva (N.I.) te skupine spojeva III. i IV. koji su grupirani prema sličnim retencijskim vremenima ( $R_t$  ~40.8 min za III.skupinu i  $R_t$  ~44.5 min za IV.skupinu) i sličnostima spektra.

Rezultati ovog dijela istraživanja prikazani su u tablici 2 te predstavljaju sastav i koncentracije fenolnih spojeva u komercijalno proizvedenim DMU iz 4 hrvatske sorte. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za konvencionalno proizvedene uzorke za svaku sortu u dva ponavljanja. Prikazane vrijednosti su masene koncentracije pojedinih fenola izraženih u miligramu po kilogramu DMU.

Tablica 2. Sastav i koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih konvencionalnom metodom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)						
Sorta	hidroksitirozol	tirosol	oleacein	skupina spojeva oko oleaceina	oleuropein	oleokantal
ISTARSKA BJELICA	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	66,07±0,87 c	98,12±1,23 a	2,49±0,04 a	72,42±1,14 b
OBLICA	18,54±0,31 a	9,19±0,08 a	53,69±0,65 d	54,40±0,74 b	0,00±0,00 c	56,40±0,36 c
LEVANTINKA	12,68±0,15 b	7,07±0,05 b	78,10±0,18 b	42,23±0,05 d	0,00±0,00 c	85,01±0,06 a
ROSULJA	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	92,58±0,32 a	49,88±0,07 c	2,36±0,04 b	51,58±0,14 d
Značajnost (p)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)						
Sorta	ligstrozid	skupina spojeva oko ligstrozida	III skupina spojeva	IV skupina spojeva	ukupno N.I.	ukupno fenoli
ISTARSKA BJELICA	29,64±0,33 a	65,31±2,85 a	58,14±1,32 a	46,54±1,20 a	9,63±0,06 c	448,33±8,30 a
OBLICA	24,46±0,16 b	53,09±0,09 b	43,61±0,33 b	27,39±0,01 b	22,66±1,49 a	363,41±1,21 b
LEVANTINKA	15,76±0,17 c	43,59±0,59 c	39,20±0,21 c	24,54±0,71 c	14,63±0,07 b	353,49±14,93 bc
ROSULJA	7,52±0,04 d	34,65±0,21 a	55,27±0,6 d	20,49±0,09 d	9,14±0,04 c	323,45±1,24 c
Značajnost (p)	<0,0001	0,000	<0,0001	<0,0001	0,000	0,001

\*Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0,05$ ) prema Tukeyjevom testu višestruke usporedbe ( $p \leq 0,05$ ) – statistički značajni rezultati (ANOVA)

Statistička obrada rezultata pokazala je kako je utjecaj sorte na svaki identificirani fenolni spoj kao i na ukupne fenole, visoko statistički signifikantan. Tukeyev test višestruke usporedbe potvrdio je kako su DMU iz 4 hrvatske sorte različita po sastavu pojedinih fenola, no ipak postoje neke sličnosti s obzirom na podneblje. U istarskim sortama nisu identificirani fenolni alkoholi, a u dalmatinskim sortama nije identificiran oleuropein. U istarskim sortama možda nisu postignuti odgovarajući uvjeti za aktivnost endogenih enzima esteraza koje hidroliziraju hidrofilne sekoiridoide i to dialdehidni oblik elenolne kiseline povezan sa *p*-HPEA i dialdehidni oblik elenolne kiseline povezan sa 3,4-DHPEA, i prevode ih u lipofilnije fenolne alkohole tirosol (*p*-hidroksifeniletilalkohol) i hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletilalkohol) (Servili i Montedoro, 2002). Oleuropein u DMU iz dalmatinskih sorti se vjerojatno razgradio na druge produkte primjerice dimetiloleuropein i hidroksitirozol (Soler-Rivas i sur., 2000).

Ulje iz istarske bjelice odlikuje najveća koncentracija većine identificiranih spojeva, osobito spojeva oko oleaceina, oleuropeina, ligstrozida i spojeva oko ligstrozida, III i IV skupine spojeva te ukupnih fenola. DMU sorte rosulja značajno nadmašuje ostale sorte koncentracijom oleaceina. Najveću koncentraciju hidroksitirosola, tirosola te ukupnih neidentificiranih fenolnih spojeva (N.I.) sadrži DMU oblice. DMU sorte levantinka ističe se većom koncentracijom oleokantala. I Žanetić i sur. (2011) pokazali su da DMU iz oblice ima veći udjel tirosola i hidroksitirosola u odnosu na ulje iz levantinke. Istraživanje Koprivnjak i sur. (2012) istaklo je istarsku bjelicu kao najbogatiju fenolima (426-882 mg/kg) u odnosu na preostale istarske sorte analizirane u tom radu (buža, rosinjola i leccino). U istraživanjima Šarolić i sur. (2015) i Torić i sur. (2020) prikazani su rezultati sadržaja fenola u sorti rosulja koji su se pokazali najnižima u odnosu na druge uspoređivane sorte. Činjenicu da sorta masline ima najveći utjecaj na fenolni profil djevičanskog maslinovog ulja, potvrdili su i drugi autori (Jukić-Špika i sur., 2021; Negro i sur., 2019; del Monaco i sur., 2015).

#### **4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA TRETIRANIM UTT-om**

U cilju utvrđivanja utjecaja primjene ubrzanog toplinskog tretmana maslinova tijesta prije miješenja na fenolne profile DMU iz istarske bjelice, levantinke i oblice, analitički rezultati su statistički obrađeni korištenjem analize varijance two-way ANOVA s 95%-tnom vjerojatnošću uz Tukey post hoc test. Podaci se nalaze u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta	hidroksitirozol <sup>§</sup>	tirozol <sup>§</sup>	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
ISTARSKA BJELICA	39,31 ± 2,36 a	18,45 ± 1,36 a	70,97 ± 2,31 a	69,81 ± 1,25 a
OBLICA	28,62 ± 2,36 b	14,31 ± 1,36 a	54,59 ± 2,31 b	52,08 ± 1,25 b
LEVANTINKA	18,25 ± 2,36 c	8,93 ± 1,36 b	68,70 ± 2,31 a	36,03 ± 1,25 c
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	hidroksitirozol	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
15	24,48 ± 3,60 a	11,43 ± 2,08 a	62,02 ± 3,53 a	50,27 ± 1,91 bc
20	28,36 ± 3,60 a	13,78 ± 2,08 a	59,59 ± 3,53 a	55,80 ± 1,91 ab
25	30,11 ± 3,60 a	17,96 ± 2,08 a	60,74 ± 3,53 a	45,85 ± 1,91 c
30	25,69 ± 3,60 a	11,49 ± 2,08 a	73,31 ± 3,53 a	53,27 ± 1,91 bc
35	29,47 ± 3,60 a	14,41 ± 2,08 a	58,31 ± 3,53 a	51,49 ± 1,91 bc
40	38,31 ± 3,60 a	17,43 ± 2,08 a	67,37 ± 3,53 a	50,30 ± 1,91 bc
KONTROLA	24,68 ± 3,60 a	10,84 ± 2,08 a	71,94 ± 3,53 a	61,49 ± 1,91 a
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura (°C)	hidroksitirozol	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
ISTARSKA BJELICA * 15	38,98 ± 6,24 ab	17,60 ± 3,60 ab	69,95 ± 6,11 abc	66,96 ± 3,30 b
ISTARSKA BJELICA * 20	40,61 ± 6,24 ab	19,78 ± 3,60 ab	56,80 ± 6,11 abc	60,13 ± 3,30 bcd
ISTARSKA BJELICA * 25	42,31 ± 6,24 ab	21,34 ± 3,60 ab	67,42 ± 6,11 abc	70,42 ± 3,30 b
ISTARSKA BJELICA * 30	37,52 ± 6,24 ab	17,86 ± 3,60 ab	78,40 ± 6,11 ab	64,74 ± 3,30 bc
ISTARSKA BJELICA * 35	40,20 ± 6,24 ab	18,76 ± 3,60 ab	71,13 ± 6,11 abc	68,37 ± 3,30 b
ISTARSKA BJELICA * 40	39,66 ± 6,24 ab	18,00 ± 3,60 ab	75,83 ± 6,11 ab	68,00 ± 3,30 b
ISTARSKA BJELICA * KONTROLA	35,90 ± 6,24 ab	15,80 ± 3,60 ab	77,25 ± 6,11 ab	90,04 ± 3,30 a
LEVANTINKA * 15	15,77 ± 6,24 b	8,48 ± 3,60 b	59,50 ± 6,11 abc	28,67 ± 3,30 g
LEVANTINKA * 20	23,50 ± 6,24 b	12,24 ± 3,60 ab	60,11 ± 6,11 abc	46,39 ± 3,30 def
LEVANTINKA * 25	15,80 ± 6,24 b	10,41 ± 3,60 ab	62,63 ± 6,11 abc	31,74 ± 3,30 fg
LEVANTINKA * 30	14,15 ± 6,24 b	5,14 ± 3,60 b	80,25 ± 6,11 ab	37,87 ± 3,30 efg
LEVANTINKA * 35	26,75 ± 6,24 ab	14,23 ± 3,60 ab	53,40 ± 6,11 abc	36,33 ± 3,30 efg
LEVANTINKA * 40	16,81 ± 6,24 b	6,94 ± 3,60 b	82,28 ± 6,11 a	36,46 ± 3,30 efg
LEVANTINKA * KONTROLA	14,99 ± 6,24 b	5,10 ± 3,60 b	82,77 ± 6,11 a	34,74 ± 3,30 efg
OBLICA * 15	18,71 ± 6,24 b	8,20 ± 3,60 b	56,62 ± 6,11 abc	55,19 ± 3,30 bcd
OBLICA * 20	20,96 ± 6,24 b	9,14 ± 3,60 ab	61,85 ± 6,11 abc	60,89 ± 3,30 bcd
OBLICA * 25	32,21 ± 6,24 ab	22,13 ± 3,60 ab	52,17 ± 6,11 abc	35,40 ± 3,30 efg
OBLICA * 30	25,40 ± 6,24 b	11,47 ± 3,60 ab	61,27 ± 6,11 abc	57,20 ± 3,30 bcd
OBLICA * 35	21,47 ± 6,24 b	10,24 ± 3,60 ab	50,42 ± 6,11 bc	49,77 ± 3,30 cde
OBLICA * 40	58,47 ± 6,24 a	27,36 ± 3,60 a	44,01 ± 6,11 c	46,46 ± 3,30 def
OBLICA * KONTROLA	23,15 ± 6,24 b	11,63 ± 3,60 ab	55,80 ± 6,11 abc	59,69 ± 3,30 bcd

Tablica 3. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška - Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta	oleuropein <sup>§</sup>	oleokantal <sup>§</sup>	ligstrozid <sup>§</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>§</sup>
ISTARSKA BJELICA	3,40 ± 0,20 a	108,27 ± 1,24 a	55,86 ± 0,51 a	107,67 ± 0,87 a
OBLICA	2,44 ± 0,20 b	59,61 ± 1,24 c	26,836 ± 0,51 b	37,25 ± 0,87 b
LEVANTINKA	2,67 ± 0,20 b	80,72 ± 1,24 b	13,15 ± 0,51 c	59,34 ± 0,87 c
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	oleuropein <sup>§</sup>	oleokantal	ligstrozid <sup>§</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>§</sup>
15	2,74 ± 0,30 a	83,06 ± 1,89 a	33,81 ± 0,78 ab	66,10 ± 1,33 b
20	3,14 ± 0,30 a	82,12 ± 1,89 a	35,69 ± 0,78 a	71,18 ± 1,33 ab
25	2,84 ± 0,30 a	82,69 ± 1,89 a	27,02 ± 0,78 d	59,05 ± 1,33 c
30	3,43 ± 0,30 a	85,71 ± 1,89 a	31,19 ± 0,78 bc	69,16 ± 1,33 ab
35	3,56 ± 0,30 a	79,13 ± 1,89 a	30,86 ± 0,78 bc	69,61 ± 1,33 ab
40	2,72 ± 0,30 a	83,81 ± 1,89 a	29,12 ± 0,78 cd	67,65 ± 1,33 b
KONTROLA	1,44 ± 0,30 b	83,55 ± 1,89 a	35,97 ± 0,78 a	73,86 ± 1,33 a
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura (°C)	oleuropein <sup>§</sup>	oleokantal	ligstrozid <sup>§</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>§</sup>
ISTARSKA BJELICA * 15	2,77 ± 0,52 bcd	107,37 ± 3,28 ab	55,53 ± 1,36 a	107,85 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * 20	6,02 ± 0,52 a	102,43 ± 3,28 ab	56,18 ± 1,36 a	111,70 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * 25	3,76 ± 0,52 ab	111,90 ± 3,28 a	53,36 ± 1,36 a	103,04 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * 30	3,82 ± 0,52 ab	110,53 ± 3,28 a	53,31 ± 1,36 a	103,01 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * 35	3,74 ± 0,52 ab	107,93 ± 3,28 ab	57,72 ± 1,36 a	108,94 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * 40	2,76 ± 10,52 bcd	111,23 ± 3,28 a	56,61 ± 1,36 a	108,28 ± 2,31 a
ISTARSKA BJELICA * KONTROLA	0,95 ± 0,52 cd	106,48 ± 3,28 ab	58,34 ± 1,36 a	110,87 ± 2,31 a
LEVANTINKA * 15	2,07 ± 0,52 bcd	79,20 ± 3,28 cde	15,35 ± 1,36 fg	24,73 ± 2,31 h
LEVANTINKA * 20	2,99 ± 0,52 bcd	81,65 ± 3,28 cd	16,19 ± 1,36 efg	33,42 ± 2,31 gh
LEVANTINKA * 25	2,58 ± 0,52 bcd	71,67 ± 3,28 defg	6,56 ± 1,36 h	25,16 ± 2,31 h
LEVANTINKA * 30	2,26 ± 0,52 bcd	84,67 ± 3,28 cd	14,37 ± 1,36 fg	43,83 ± 2,31 efg
LEVANTINKA * 35	2,89 ± 0,52 bcd	73,90 ± 3,28 def	11,89 ± 1,36 gh	44,47 ± 2,31 efg
LEVANTINKA * 40	3,00 ± 0,52 bcd	91,17 ± 3,28 bc	15,42 ± 1,36 fg	47,03 ± 2,31 ef
LEVANTINKA * KONTROLA	2,93 ± 0,52 bcd	82,81 ± 3,28 cd	12,23 ± 1,36 gh	42,10 ± 2,31 fg
OBLICA * 15	3,37 ± 0,52 abc	62,60 ± 3,28 efgh	30,55 ± 1,36 bc	65,72 ± 2,31 bc
OBLICA * 20	0,40 ± 0,52 d	62,28 ± 3,28 efgh	34,72 ± 1,36 b	68,42 ± 2,31 b
OBLICA * 25	2,17 ± 0,52 bcd	64,50 ± 3,28 efgh	21,14 ± 1,36 def	48,96 ± 12,31 def
OBLICA * 30	4,22 ± 0,52 ab	61,94 ± 3,28 fgh	25,88 ± 1,36 cd	60,63 ± 2,31 bcd
OBLICA * 35	4,05 ± 0,52 ab	55,56 ± 3,28 gh	22,87 ± 1,36 de	55,41 ± 2,31 cde
OBLICA * 40	2,39 ± 0,52 bcd	49,02 ± 3,28 h	15,32 ± 1,36 fg	47,65 ± 2,31 ef
OBLICA * KONTROLA	0,45 ± 0,52 d	61,35 ± 3,28 fgh	37,33 ± 1,36 b	68,61 ± 2,31 b



Tablica 3. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška - Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I. <sup>s</sup>	ukupno fenoli <sup>s</sup>
ISTARSKA BJELICA	295,05 ± 2,43 a	97,07 ± 0,77 a	19,57 ± 0,48 b	885,42 ± 6,84 a
OBLICA	65,32 ± 2,43 b	31,14 ± 0,77 b	23,82 ± 0,48 a	421,34 ± 6,84 b
LEVANTINKA	39,04 ± 2,43 c	22,26 ± 0,77 c	17,11 ± 0,48 c	344,42 ± 6,84 c
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I.	ukupno fenoli <sup>s</sup>
15	141,72 ± 3,71 a	52,93 ± 1,19 ab	20,01 ± 0,74 ab	540,18 ± 10,45 ab
20	139,31 ± 3,71 ab	54,56 ± 1,19 a	22,28 ± 0,74 a	572,24 ± 10,45 a
25	124,70 ± 3,71 b	43,95 ± 1,19 d	19,97 ± 0,74 ab	519,17 ± 10,45 b
30	129,97 ± 3,71 ab	50,83 ± 1,19 abc	19,26 ± 0,74 ab	553,29 ± 10,45 ab
35	130,46 ± 3,71 ab	49,14 ± 1,19 bc	20,46 ± 0,74 ab	538,71 ± 10,45 ab
40	136,60 ± 3,71 ab	52,17 ± 1,19 abc	19,01 ± 0,74 b	568,51 ± 10,45 a
KONTROLA	129,20 ± 3,71 ab	47,48 ± 1,19 cd	20,19 ± 0,74 ab	560,67 ± 10,45 ab
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura (°C)	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I.	ukupno fenoli <sup>s</sup>
ISTARSKA BJELICA * 15	313,38 ± 6,42 a	102,94 ± 2,10 a	19,89 ± 1,28 abcdefg	903,22 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * 20	310,57 ± 16,42 a	107,69 ± 2,10 a	19,56 ± 1,28 bcdefg	891,46 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * 25	273,62 ± 6,42 bc	88,47 ± 2,10 bc	21,15 ± 1,28 abcdef	856,79 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * 30	291,29 ± 6,42 abc	98,35 ± 2,10 ab	18,69 ± 1,28 cdefg	877,52 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * 35	305,17 ± 6,42 ab	99,21 ± 2,10 a	19,08 ± 1,28 cdefg	900,22 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * 40	311,65 ± 6,42 a	101,53 ± 2,10 a	19,73 ± 1,28 bcdefg	913,25 ± 18,11 a
ISTARSKA BJELICA * KONTROLA	259,68 ± 36,42 c	81,27 ± 2,10 c	18,90 ± 1,28 cdefg	855,48 ± 18,11 a
LEVANTINKA * 15	38,08 ± 6,42 fg	25,05 ± 2,10 efg	13,63 ± 1,28 g	285,39 ± 18,11 e
LEVANTINKA * 20	43,17 ± 6,42 efg	23,25 ± 2,10 efg	23,01 ± 1,28 abcd	385,39 ± 18,11 bcd
LEVANTINKA * 25	30,60 ± 6,42 g	15,69 ± 2,10 g	15,45 ± 1,28 fg	294,90 ± 18,11 de
LEVANTINKA * 30	39,75 ± 6,42 fg	22,18 ± 2,10 efg	15,42 ± 1,28 fg	359,88 ± 18,11 cde
LEVANTINKA * 35	39,30 ± 6,42 fg	21,85 ± 2,10 fg	19,93 ± 1,28 abcdefg	346,11 ± 18,11 cde
LEVANTINKA * 40	41,83 ± 6,42 efg	25,20 ± 2,10 efg	16,39 ± 1,28 defg	382,54 ± 18,11 bcd
LEVANTINKA * KONTROLA	40,57 ± 6,42 efg	22,54 ± 2,10 efg	15,94 ± 1,28 efg	356,74 ± 18,11 cde
OBLICA * 15	73,69 ± 6,42 de	30,79 ± 2,10 def	26,50 ± 1,28 a	431,93 ± 18,11 bc
OBLICA * 20	64,20 ± 6,42 def	32,75 ± 2,10 de	24,27 ± 1,28 abc	439,88 ± 18,11 bc
OBLICA * 25	69,90 ± 6,42 def	27,67 ± 2,10 ef	23,31 ± 1,28 abc	405,81 ± 18,11 bc
OBLICA * 30	58,89 ± 6,42 defg	31,95 ± 2,10 def	23,66 ± 1,28 abc	422,47 ± 18,11 bc
OBLICA * 35	46,91 ± 6,42 efg	26,36 ± 2,10 ef	22,37 ± 1,28 abcde	369,78 ± 18,11 cde
OBLICA * 40	56,32 ± 6,42 defg	29,80 ± 2,10 def	20,93 ± 1,28 abcdef	409,75 ± 18,11 bc
OBLICA * KONTROLA	87,34 ± 6,42 d	38,62 ± 2,10 d	25,73 ± 1,28 ab	469,79 ± 18,11 b

\*Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0,05$ ) prema Tukeyjevom testu višestruke usporedbe

U tablici 3 vidi se da se koncentracije većine identificiranih fenolnih spojeva značajno razlikuju između sorti. Iznimka je tirosol prema čijim koncentracijama su slična ulja iz istarske bjelice i oblice, a izdvaja se ulje iz levantinke, oleacein gdje se ističe ulje iz oblice i oleuropein koji izdvaja ulje iz istarske bjelice. Istarska bjelica ima najveću koncentraciju svih identificiranih fenola, njihovih grupa kao i ukupnih fenola. I u ovom dijelu istraživanja se pokazalo da sorta masline ima statistički signifikantan utjecaj na kompletni fenolni profil ulja. Do istog zaključka došli su Veneziani i sur. (2015) ispitujući utjecaj UTT na koncentracije fenola u DMU iz pet talijanskih sorti.

Temperatura kojoj je tijesto podvrgnuto tijekom ubrzanog toplinskog tretmana prije miješenja, ima statistički značajan utjecaj na koncentracije oleaceina, skupine spojeva oko oleaceina, oleuropeina, oleokantala, ligstrozida, skupine spojeva oko ligstrozida, koncentracije III i IV skupine spojeva, neidentificirane grupe spojeva te na ukupne fenole (tablica 3 - temperatura). Iako je UTT povećao koncentracije hidroksitirosola, tirosola i oleaceina, između uzoraka nema statistički značajne razlike. Te su razlike značajne između kontrolnog (proizvodnja DMU iz iste sorte bez UTT) i svih ostalih uzoraka kod oleuropeina čija se koncentracija uz UTT povećala. Statistički je značajan i utjecaj UTT pri 15 i 20 °C na povećanje koncentracije IV grupe spojeva. Koncentracija ukupnih fenola tek se neznatno povećala pri 20 °C (za 2,1%) i pri 40 °C (za 1,4%). Statistički je značajna razlika između kontrolnog uzorka i DMU proizvedenih uz 25, 30, 35 i 40 °C glede koncentracije ligstrozida i grupe spojeva oko oleaceina, te između kontrolnog uzorka i DMU proizvedenih pri 15, 25 i 40 °C glede grupe spojeva oko ligstrozida. Ligstrozidu i grupama spojeva oko ligstrozida i oleaceina ne odgovara niti jedna temperatura UTT-a jer su kontrolni uzorci pri sobnoj temperaturi dali najviše koncentracije ovih spojeva.

Što se tiče biosinteze fenolnih spojeva, svaka od tri ispitane sorte različito je reagirala na utjecaj različitih temperatura tijekom ubrzanog toplinskog tretmana tijesta (tablica 3 – sorta\*temperatura). Njihova interakcija imala je statistički značajan utjecaj na iste fenolne spojeve i grupe spojeva kao što je imala temperatura. Ulja iz istarske bjelice proizvedena uz UTT u odnosu na kontrolni uzorak imala su povećane koncentracije većine fenolnih spojeva, a statistički je značajno povećanje oleuropeina (pri 20, 25, 30 i 35 °C), III skupine spojeva (pri 15, 20, 35 i 40 °C) i IV skupine spojeva (pri 15, 20, 30, 35 i 40 °C). Povećanje koncentracije ukupnih fenola zabilježeno je pri svim primijenjenim temperaturama UTT, no između uzoraka nema statistički značajne razlike. Statistički značajna razlika između uzoraka prisutna je kod skupine spojeva oko

oleaceina čija se koncentracija smanjila primjenom UTT. Kod DMU iz levantinke proizvedenih uz UTT u odnosu na kontrolni uzorak, statistički je značajna razlika između uzoraka prisutna samo kod skupine spojeva oko ligstrozida i to pri 15 i 25 °C, gdje je zabilježena niža koncentracija. DMU iz oblice pokazala su da UTT kao predtretman miješenju ima statistički značajan utjecaj na povećanje koncentracija oleuropeina (pri 15, 30 i 35 °C), te na smanjenje koncentracija ligstrozida (pri 25, 30, 35 i 40 °C), skupine spojeva oko ligstrozida (pri 25, 35 i 40 °C), skupine spojeva oko oleaceina (pri 25 °C), III skupine (pri 35 °C), IV skupine (pri 25 i 35 °C) te ukupnih fenola pri 35 °C.

Detaljna analiza rezultata iz tablice 3 pokazala je da genetske karakteristike sorte masline određuju različitu osjetljivost endogenih enzima ploda masline prema temperaturi UTT na koje je bilo grijano/hlađeno tijesto maslina sorte istarska bjelica, levantinka i oblica prije miješenja. Specifičan odgovor svake od ispitivanih sorti na temperature UTT vidi se po koncentracijama oleokantala, ligstrozida i skupine spojeva oko ligstrozida. Pokazalo se da se pri uvjetima UTT slično ponašaju sorte istarska bjelica i oblica s obzirom na skupinu spojeva oko oleaceina. Dalmatinske sorte levantinka i oblica pokazuju slično ponašanje u uvjetima UTT glede biosinteze III i IV grupe fenolnih spojeva, te u koncentracijama ukupnih fenola.

U svom istraživanju Veneziani i sur. (2015) promatrali su utjecaj UTT na sastav DMU iz talijanskih sorti Ottobratica, Cellina di Nardo, Peranzana, Coratina i Moraiolo. Koncentracije fenola povećale su se uz UTT i pri 25 °C i pri 30 °C u odnosu na konvencionalno proizvedena DMU. Povećanje fenola u tim uvjetima pripisali su boljoj aktivnosti endogenih enzima depolimerizacije koji razgrađuju staničnu stijenkku. U našem radu pokazalo se da svaka sorta ima drugačiji odgovor prema povećanju koncentracije ukupnih i pojedinačnih fenola. Istarska bjelica je odlično reagirala na sve primijenjene temperature, no statistička obrada podataka pokazala je da su za nju najznačajnije temperature UTT na povećanje fenola bile 20 i 35 °C. Oblica je za razliku od nje imala najmanje fenola kojima je značajan porast koncentracije uz UTT (oleuropein), no to se ipak dogodilo pri 15, 30 i 35 °C. Levantinka nije pokazala statistički značajan porast niti jednog fenola u opisanim uvjetima.

Već spomenuta grupa autora iz Perugie je 2018. godine (Veneziani i sur., 2018) izvjestila kako je brzo ohlađenje tijesta na 15 °C kao predtretman miješenju talijanskih sorti Frantoio, Leccino, Gentile, Ogliarola garganica, Moraiolo i San Felice, značajno doprinijelo povećanju fenola u proizvedenim DMU. Više autora (Hbaieb i sur. 2016; Taticchi i sur. 2013; Garcia-

Rodriguez i sur. 2011) ističu kako niža temperatura tijesta prije miješenja utječe na potpunu ili djelomičnu inhibiciju aktivnosti polifenoloksidaze (PPO), endogenog enzima koji potiče razgradnju fenolnih spojeva tijekom oksidacije ulja, a njegova smanjena aktivnost može rezultirati povećanom koncentracijom fenola. U našem je radu statistički značajan utjecaj temperature od 15 °C na porast koncentracije oleuropeina kod istarske bjelice i oblice te III i IV skupine spojeva kod istarske bjelice.

Radi potpunog razumijevanja specifičnosti ispitivanih sorti, utjecaja UTT na fenole DMU, potrebno je unaprijediti analitičku metodu u cilju identifikacije pojedinačnih fenola koji se nalaze u grupama spojeva oko oleaceina, oko ligstrozida te u III i IV grupi fenolnih spojeva.

### **4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FENOLNIH SPOJEVA U UZORCIMA TRETIRANIM TT-om**

Pored ispitivanja utjecaja inovativne tehnologije UTT-a na fenolne profile DMU, ispitano je i djelovanje toplinskog predtretmanom (TT) na maslinovo tijesto te njegov utjecaj na fenolni sastav DMU sorti rosulja i oblica. Toplinski tretman proveden je na prethodno samljevenom maslinovom tijestu sorti rosulja i oblica zagrijavanjem konvekcijom na 30, 35 i 40°C. Paste su zagrijavane u plitkim posudama od inoxa u termostatu kroz maksimalno vrijeme od 1 sata. Na sorti oblica provedena su oba predtretmana kako bi se mogle usporediti prednosti ili mane u djelovanju inovativnog ubrzanog toplinskog tretmana. Prikazani su rezultati tretiranja tijesta konvekcijom kroz svih šest temperatura, bilo hlađenjem u šokeru ili zagrijavanjem u termostatu, radi praćenja trenda promjena vrijednosti.

Analitički rezultati su statistički obrađeni korištenjem dvofaktorske analize varijance ANOVA s 95%-tnom vjerojatnošću uz Tukey post hoc test napravljenom u programu XLSTAT, kako bi se utvrdio utjecaj sorte i temperature toplinskog tretmana na sastav fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz TT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
Sorta	hidroksitirozol <sup>§</sup>	tirozol <sup>§</sup>	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
ROSULJA	33,87 ± 1,38 a	1,06 ± 0,93 b	181,40 ± 2,32 a	66,56 ± 1,21 a
OBLICA	19,37 ± 1,38 b	10,56 ± 0,93 a	85,75 ± 2,33 b	45,34 ± 1,21 b
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	hidroksitirozol <sup>§</sup>	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
15	25,97 ± 2,57 bc	4,35 ± 1,75 ab	103,52 ± 4,35 d	66,08 ± 2,25 b
20	30,18 ± 2,57 ab	5,53 ± 1,75 ab	110,74 ± 4,35 d	72,84 ± 2,25 a
25	32,17 ± 2,57 ab	11,66 ± 1,75 a	100,42 ± 4,35 d	55,46 ± 2,25 bc
30	16,21 ± 2,57 cd	3,10 ± 1,75 b	148,75 ± 4,35 b	51,52 ± 2,25 c
35	13,97 ± 2,57 d	3,22 ± 1,75 b	164,12 ± 4,35 ab	27,91 ± 2,25 e
40	37,35 ± 2,57 a	6,98 ± 1,75 ab	176,52 ± 4,35 a	40,64 ± 2,25 d
KONTROLA	30,48 ± 2,57 ab	5,81 ± 1,75 ab	130,96 ± 4,35 c	77,19 ± 2,25 a
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura	hidroksitirozol	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
OBLICA * 15	18,71 ± 3,64 de	8,20 ± 2,47 b	56,62 ± 6,15 f	55,19 ± 3,19 de
OBLICA * 20	20,96 ± 3,64 cde	9,14 ± 2,47 b	61,85 ± 6,15 f	60,89 ± 3,19 cd
OBLICA * 25	32,21 ± 3,64 bcd	22,13 ± 2,47 a	52,17 ± 6,15 f	35,40 ± 3,19 fg
OBLICA * 30	9,59 ± 3,64 e	6,20 ± 2,47 b	113,45 ± 6,15 e	44,65 ± 3,19 ef
OBLICA * 35	9,83 ± 3,64 e	6,43 ± 2,47 b	106,15 ± 6,15 e	38,84 ± 3,19 fg
OBLICA * 40	21,12 ± 3,64 cde	10,18 ± 2,47 ab	154,23 ± 6,15 cd	22,69 ± 3,19 gh
OBLICA * KONTROLA	23,15 ± 3,64 bcde	11,63 ± 2,47 ab	55,8 ± 6,15 f	59,69 ± 3,19 cde
ROSULJA * 15	33,23 ± 3,64 bcd	0,51 ± 2,47 b	150,42 ± 6,15 d	76,97 ± 3,19 b
ROSULJA * 20	39,41 ± 3,64 ab	1,93 ± 2,47 b	159,64 ± 6,15 cd	84,79 ± 3,19 ab
ROSULJA * 25	32,13 ± 3,64 bcd	1,19 ± 2,47 b	148,67 ± 6,15 d	75,51 ± 3,19 bc
ROSULJA * 30	22,82 ± 3,64 bcde	0,00 ± 2,47 b	184,04 ± 6,15 bc	58,38 ± 3,19 de
ROSULJA * 35	18,11 ± 3,64 de	0,00 ± 2,47 b	222,09 ± 6,15 a	16,99 ± 3,19 h
ROSULJA * 40	53,58 ± 3,64 a	3,78 ± 2,47 b	198,81 ± 6,15 ab	58,59 ± 3,19 de
ROSULJA * KONTROLA	37,8 ± 3,64 abc	0,00 ± 2,47 b	206,11 ± 6,15 ab	94,69 ± 3,19 ab

Tablica 4. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz TT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška -

Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta	oleuropein <sup>s</sup>	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid <sup>s</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
ROSULJA	2,76 $\pm$ 0,21 a	36,18 $\pm$ 0,93 b	4,55 $\pm$ 0,41 b	26,42 $\pm$ 0,86 b
OBLICA	1,26 $\pm$ 0,21 b	83,14 $\pm$ 0,93 a	24,39 $\pm$ 0,41 a	53,60 $\pm$ 0,86 a
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	oleuropein	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid <sup>s</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
15	2,73 $\pm$ 0,40 a	47,32 $\pm$ 1,74 c	18,61 $\pm$ 0,77 b	50,61 $\pm$ 1,62 a
20	1,69 $\pm$ 0,40 a	48,60 $\pm$ 1,74 c	20,64 $\pm$ 0,77 a	52,02 $\pm$ 1,62 a
25	2,58 $\pm$ 0,40 a	49,48 $\pm$ 1,74 c	13,82 $\pm$ 0,77 c	40,2 $\pm$ 1,62 b
30	1,72 $\pm$ 0,40 a	68,83 $\pm$ 1,74 b	12,31 $\pm$ 0,77 cd	38,7 $\pm$ 1,62 b
35	1,75 $\pm$ 0,40 a	70,73 $\pm$ 1,74 ab	9,29 $\pm$ 0,77 d	28,06 $\pm$ 1,62 c
40	2,21 $\pm$ 0,40 a	80,49 $\pm$ 1,74 a	4,21 $\pm$ 0,77 e	17,74 $\pm$ 1,62 d
KONTROLA	1,39 $\pm$ 0,40 a	48,68 $\pm$ 1,74 c	22,42 $\pm$ 0,77 a	52,73 $\pm$ 1,62 a
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura	oleuropein	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid <sup>s</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
OBLICA * 15	3,37 $\pm$ 0,56 a	62,60 $\pm$ 2,45 c	30,55 $\pm$ 1,09 b	65,72 $\pm$ 2,28 a
OBLICA * 20	0,40 $\pm$ 0,56 b	62,28 $\pm$ 2,45 c	34,72 $\pm$ 1,09 ab	68,42 $\pm$ 2,28 a
OBLICA * 25	2,17 $\pm$ 0,56 ab	64,50 $\pm$ 2,45 c	21,14 $\pm$ 1,09 c	48,96 $\pm$ 2,28 b
OBLICA * 30	0,96 $\pm$ 0,56 ab	97,23 $\pm$ 2,45 b	21,14 $\pm$ 1,09 c	52,92 $\pm$ 2,28 b
OBLICA * 35	0,42 $\pm$ 0,56 b	96,56 $\pm$ 2,45 b	18,59 $\pm$ 1,09 c	49,22 $\pm$ 2,28 b
OBLICA * 40	1,08 $\pm$ 0,56 ab	131,49 $\pm$ 2,45 a	7,26 $\pm$ 1,09 d	21,37 $\pm$ 2,28 ef
OBLICA * KONTROLA	0,45 $\pm$ 0,56 b	61,35 $\pm$ 2,45 c	37,33 $\pm$ 1,09 ab	68,61 $\pm$ 2,28 a
ROSULJA * 15	2,10 $\pm$ 0,56 ab	32,04 $\pm$ 2,45 f	6,67 $\pm$ 1,09 d	35,51 $\pm$ 2,28 cd
ROSULJA * 20	2,97 $\pm$ 0,56 a	34,92 $\pm$ 2,45 e	6,55 $\pm$ 1,09 de	35,62 $\pm$ 2,28 cd
ROSULJA * 25	2,99 $\pm$ 0,56 ab	34,46 $\pm$ 2,45 ef	6,50 $\pm$ 1,09 de	31,43 $\pm$ 2,28 cde
ROSULJA * 30	2,49 $\pm$ 0,56 ab	40,42 $\pm$ 2,45 d	3,47 $\pm$ 1,09 def	24,49 $\pm$ 2,28 def
ROSULJA * 35	3,07 $\pm$ 0,56 a	45,90 $\pm$ 2,45 d	0,00 $\pm$ 1,09 f	6,91 $\pm$ 2,28 g
ROSULJA * 40	3,35 $\pm$ 0,56 a	29,50 $\pm$ 2,45 f	1,16 $\pm$ 1,09 ef	14,12 $\pm$ 2,28 eg
ROSULJA * KONTROLA	2,33 $\pm$ 0,56 ab	36,01 $\pm$ 2,45 e	7,52 $\pm$ 1,09 d	36,85 $\pm$ 2,28 c

Tablica 4. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU proizvedenih uz TT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška -

Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I. <sup>s</sup>	ukupno fenoli <sup>s</sup>
ROSULJA	122,81 $\pm$ 5,11 a	17,72 $\pm$ 0,66 b	27,82 $\pm$ 0,35 a	522,01 $\pm$ 7,08 a
OBLICA	72,97 $\pm$ 5,11 b	33,91 $\pm$ 0,66 a	24,74 $\pm$ 0,35 b	456,10 $\pm$ 7,08 b
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
temperatura (°C)	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I. <sup>s</sup>	ukupno fenoli <sup>s</sup>
15	97,77 $\pm$ 9,56 ab	23,62 $\pm$ 1,24 cd	24,84 $\pm$ 0,65 bc	465,43 $\pm$ 13,24 cde
20	95,00 $\pm$ 9,56 b	26,4 $\pm$ 1,24 bc	24,57 $\pm$ 0,65 c	488,25 $\pm$ 13,24 bc
25	78,86 $\pm$ 9,56 bc	20,69 $\pm$ 1,24 d	22,80 $\pm$ 0,65 c	431,00 $\pm$ 13,24 de
30	76,19 $\pm$ 9,56 c	22,96 $\pm$ 1,24 cd	26,79 $\pm$ 0,65 b	468,52 $\pm$ 13,24 cd
35	62,80 $\pm$ 9,56 c	23,6 $\pm$ 1,24 cd	23,55 $\pm$ 0,65 c	430,45 $\pm$ 13,24 e
40	176,50 $\pm$ 9,56 a	34,08 $\pm$ 1,24 a	34,02 $\pm$ 0,65 a	615,15 $\pm$ 13,24 a
KONTROLA	98,13 $\pm$ 9,56 ab	29,35 $\pm$ 1,24 ab	27,38 $\pm$ 0,65 b	524,57 $\pm$ 13,24 ab
FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
sorta * temperatura	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva	ukupno N.I. <sup>s</sup>	ukupno fenoli <sup>s</sup>
OBLICA * 15	73,69 $\pm$ 13,52 bc	30,79 $\pm$ 1,75 bc	26,50 $\pm$ 0,91 bc	431,93 $\pm$ 18,73 d
OBLICA * 20	64,20 $\pm$ 13,52 bc	32,75 $\pm$ 1,75 bc	24,27 $\pm$ 0,91 c	439,88 $\pm$ 18,73 d
OBLICA * 25	69,90 $\pm$ 13,52 bc	27,67 $\pm$ 1,75 cd	23,31 $\pm$ 0,91 c	405,81 $\pm$ 18,73 d
OBLICA * 30	62,62 $\pm$ 13,52 bc	32,94 $\pm$ 1,75 bc	24,63 $\pm$ 0,91 bc	466,34 $\pm$ 18,73 cd
OBLICA * 35	53,94 $\pm$ 13,52 c	31,63 $\pm$ 1,75 bc	24,24 $\pm$ 0,91 c	437,75 $\pm$ 18,73 d
OBLICA * 40	99,13 $\pm$ 13,52 bc	42,97 $\pm$ 1,75 a	24,52 $\pm$ 0,91 bc	541,19 $\pm$ 18,73 bc
OBLICA * KONTROLA	87,34 $\pm$ 13,52 bc	38,62 $\pm$ 1,75 ab	25,73 $\pm$ 0,91 bc	469,79 $\pm$ 18,73 cd
ROSULJA * 15	121,85 $\pm$ 13,52 b	16,45 $\pm$ 1,75 e	23,18 $\pm$ 0,91 c	498,93 $\pm$ 18,73 bcd
ROSULJA * 20	125,80 $\pm$ 13,52 b	20,05 $\pm$ 1,75 de	24,88 $\pm$ 0,91 bc	536,62 $\pm$ 18,73 bc
ROSULJA * 25	87,82 $\pm$ 13,52 bc	13,70 $\pm$ 1,75 e	22,30 $\pm$ 0,91 c	456,2 $\pm$ 18,73 cd
ROSULJA * 30	89,77 $\pm$ 13,52 bc	12,98 $\pm$ 1,75 e	28,94 $\pm$ 0,91 bc	470,69 $\pm$ 18,73 cd
ROSULJA * 35	71,67 $\pm$ 13,52 bc	15,57 $\pm$ 1,75 e	22,87 $\pm$ 0,91 c	423,16 $\pm$ 18,73 d
ROSULJA * 40	253,86 $\pm$ 13,52 a	25,19 $\pm$ 1,75 cd	43,52 $\pm$ 0,91 a	689,11 $\pm$ 18,73 a
ROSULJA * KONTROLA	108,92 $\pm$ 13,52 bc	20,09 $\pm$ 1,75 de	29,03 $\pm$ 0,91 bc	579,36 $\pm$ 18,73 b

\*Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0,05$ ) prema Tukeyjevom testu višestruke usporedbe

Kao i u tablici 3 i u tablici 4 se vidi da sorta ima visoko statistički značajan utjecaj na sve identificirane fenole i grupe fenola, te da se koncentracije svih identificiranih fenolnih spojeva značajno razlikuju između sorti.

Temperatura (tablica 4– temperatura) pri kojoj je proveden predtretman miješenju ima statistički značajan utjecaj na koncentracije hidroksitirosole, oleaceina, skupine spojeva oko oleaceina, oleokantala, ligstrozida, skupine spojeva oko ligstrozida, III i IV skupine spojeva, neidentificirane spojeve i ukupne fenole. Statistički značajan utjecaj temperature TT vidi se kod oleaceina čije su koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak veće u uzorcima proizvedenim pri svim ispitanim temperaturama, a oleokantala u uzorcima proizvedenima pri 30, 35 i 40 °C. Povećanje ukupnih fenola (za 17,3%) prisutno je samo u uzorku tretiranom pri 40 °C, iako za tu vrijednost ne postoji statistički značajna razlika između kontrole i tog ulja. Kao i kod proizvodnje uz UTT, pokazalo se da ligstrozidu te grupama spojeva oko oleaceina i ligstrozida ne odgovara TT tijesta prije miješenja. Na smanjenje koncentracije ligstrozida i grupu spojeva oko oleaceina statistički značajno utječe TT pri 15, 25, 30, 35 i 40 °C, a koncentracije grupe spojeva oko ligstrozida smanjuju se pri 25, 30, 35 i 40 °C.

Kao i kod UTT, primjena TT pokazala je značajnu interakciju sorte i temperature tretmana (tablica 4–sorta\*temperatura). To se pokazalo statistički signifikantnim za koncentracije oleaceina, oleokantala, ligstrozida, grupa spojeva oko oleaceina i ligstrozida, III grupe spojeva, neidentificiranih i ukupnih fenola. Kod ulja iz sorte oblica statistički je značajan porast koncentracije oleaceina i oleokantala pri 30, 35 i 40 °C, te pad koncentracija ligstrozida i spojeva oko ligstrozida pri 25, 30, 35 i 40 °C, a spojeva oko oleaceina pri 25, 35 i 40 °C. Kod rosulje je statistički značajan porast koncentracije samo III skupine spojeva, N.I. i ukupnih fenola pri 40 °C, dok je značajan pad koncentracije oleaceina pri 15, 20 i 25 °C, oleokantala pri 15 i 40 °C, ligstrozida pri 35 i 40 °C, skupine spojeva oko oleaceina i ligstrozida pri 30, 35 i 40 °C te ukupnih fenola pri 25, 30 i 35 °C.

Specifičan odgovor svake od sorti u ovom dijelu istraživanja na temperaturu TT evidentan je za biosintezu oleaceina, oleokantala i ligstrozida. Najznačajnije promjene glede koncentracije fenola sorte oblica u uvjetima TT dogodile su se pri temperaturama 35 i 40 °C, a sorte rosulja pri 40 °C.

Usporedba načina prijenosa topline i trajanja toplinskog tretmana na fenolne spojeve DMU iz oblice prikazana je u tablici 5.



Tablica 5. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU iz oblice proizvedenih uz TT i uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
način zagrijavanja	hidroksitirozol <sup>§</sup>	tirozol <sup>§</sup>	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
UTT	35,11 $\pm$ 8,72 a	16,35 $\pm$ 4,16 a	51,9 $\pm$ 4,23 b	51,14 $\pm$ 1,23 a
TT	13,51 $\pm$ 1,72 b	7,61 $\pm$ 0,37 b	124,61 $\pm$ 3,77 a	35,39 $\pm$ 2,15 b
fenolni spojevi (mg/kg)				
temperatura (°C)	hidroksitirozol <sup>§</sup>	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina <sup>§</sup>
30	17,50 $\pm$ 1,08 a	8,83 $\pm$ 0,23 a	87,36 $\pm$ 3,22 ab	50,93 $\pm$ 1,69 a
35	15,65 $\pm$ 0,96 a	8,33 $\pm$ 0,14 a	78,28 $\pm$ 3,89 b	44,3 $\pm$ 1,41 b
40	39,80 $\pm$ 13,26 a	18,77 $\pm$ 6,26 a	99,12 $\pm$ 6,83 a	34,58 $\pm$ 2,99 c
fenolni spojevi (mg/kg)				
način zagrijavanja * temperatura (°C)	hidroksitirozol	tirozol	oleacein <sup>§</sup>	skupina spojeva oko oleaceina
UTT * 30	25,4 $\pm$ 0,81 ab	11,47 $\pm$ 0,37 ab	61,27 $\pm$ 2,05 c	57,2 $\pm$ 2,07 a
UTT * 35	21,47 $\pm$ 0,08 ab	10,24 $\pm$ 0,09 ab	50,42 $\pm$ 2,25 c	49,77 $\pm$ 1,06 ab
UTT * 40	58,47 $\pm$ 26,16 a	27,36 $\pm$ 12,47 a	44,01 $\pm$ 12,31 c	46,46 $\pm$ 2,87 ab
TT * 30	9,59 $\pm$ 2,01 b	6,2 $\pm$ 0,28 b	113,45 $\pm$ 6,11 b	44,65 $\pm$ 2,67 b
TT * 35	9,83 $\pm$ 1,92 b	6,43 $\pm$ 0,26 b	106,15 $\pm$ 7,45 b	38,84 $\pm$ 2,62 b
TT * 40	21,12 $\pm$ 4,36 ab	10,18 $\pm$ 1,03 ab	154,23 $\pm$ 5,92 a	22,69 $\pm$ 5,25 c

Tablica 5. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU iz oblice proizvedenih uz TT i uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška - Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
način zagrijavanja	oleuropein <sup>s</sup>	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid <sup>s</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
UTT	3,55 $\pm$ 0,31 a	55,51 $\pm$ 2,78 b	21,36 $\pm$ 1,3 a	54,56 $\pm$ 1,75 a
TT	0,82 $\pm$ 0,37 b	108,09 $\pm$ 2,67 a	15,66 $\pm$ 1,15 b	41,17 $\pm$ 2,01 b
fenolni spojevi (mg/kg)				
temperatura (°C)	oleuropein	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid <sup>s</sup>	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
30	2,59 $\pm$ 0,37 a	79,58 $\pm$ 2,16 ab	23,51 $\pm$ 0,9 a	56,77 $\pm$ 1,63 a
35	2,24 $\pm$ 0,23 a	75,56 $\pm$ 2,6 b	20,73 $\pm$ 0,85 a	52,31 $\pm$ 1,34 a
40	1,73 $\pm$ 0,58 a	90,26 $\pm$ 4,69 a	11,29 $\pm$ 2,29 b	34,51 $\pm$ 3,4 b
fenolni spojevi (mg/kg)				
način zagrijavanja * temperatura (°C)	oleuropein	oleokantal <sup>s</sup>	ligstrozid	skupina spojeva oko ligstrozida <sup>s</sup>
UTT * 30	4,22 $\pm$ 0,32 a	61,94 $\pm$ 2,04 c	25,88 $\pm$ 0,79 a	60,63 $\pm$ 1,8 a
UTT * 35	4,05 $\pm$ 0,06 a	55,56 $\pm$ 0,59 c	22,87 $\pm$ 0,17 ab	55,41 $\pm$ 0,8 ab
UTT * 40	2,39 $\pm$ 0,86 ab	49,02 $\pm$ 8,06 c	15,32 $\pm$ 3,81 bc	47,65 $\pm$ 4,87 b
TT * 30	0,96 $\pm$ 0,66 b	97,23 $\pm$ 3,82 b	21,14 $\pm$ 1,62 ab	52,92 $\pm$ 2,73 ab
TT * 35	0,42 $\pm$ 0,46 b	95,56 $\pm$ 5,17 b	18,59 $\pm$ 1,68 ab	49,22 $\pm$ 2,55 ab
TT * 40	1,08 $\pm$ 0,78 b	131,49 $\pm$ 4,8 a	7,26 $\pm$ 2,55 c	21,37 $\pm$ 4,75 c

Tablica 5. Koncentracija fenolnih spojeva (mg/kg) u uzorcima DMU iz oblice proizvedenih uz TT i uz UTT kao predtretman miješenju. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška - Nastavak

FENOLNI SPOJEVI (mg/kg)				
način zagrijavanja	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I. <sup>s</sup>	ukupno fenoli <sup>s</sup>
UTT	54,04 $\pm$ 1,65 b	29,37 $\pm$ 0,54 b	22,32 $\pm$ 0,57 b	400,67 $\pm$ 8,5 b
TT	71,9 $\pm$ 7,98 a	35,85 $\pm$ 1,86 a	24,46 $\pm$ 0,55 a	481,76 $\pm$ 15,61 a
fenolni spojevi (mg/kg)				
temperatura (°C)	III skupina spojeva <sup>s</sup>	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I.	ukupno fenoli <sup>s</sup>
30	60,75 $\pm$ 4,13 a	32,45 $\pm$ 1,11 ab	24,15 $\pm$ 0,56 a	444,41 $\pm$ 9,1 a
35	50,42 $\pm$ 0,79 a	28,99 $\pm$ 1,31 b	23,3 $\pm$ 0,42 a	403,77 $\pm$ 5,97 b
40	77,72 $\pm$ 11,48 a	36,39 $\pm$ 2,35 a	22,72 $\pm$ 0,96 a	475,47 $\pm$ 24,33 a
fenolni spojevi (mg/kg)				
način zagrijavanja * temperatura (°C)	III skupina spojeva	IV skupina spojeva <sup>s</sup>	ukupno N.I.	ukupno fenoli
UTT * 30	58,89 $\pm$ 2,42 b	31,95 $\pm$ 0,97 a	23,66 $\pm$ 0,81 a	422,47 $\pm$ 12,8 a
UTT * 35	46,91 $\pm$ 1,04 b	26,36 $\pm$ 0,7 b	22,37 $\pm$ 0,61 a	369,78 $\pm$ 4,66 b
UTT * 40	56,32 $\pm$ 4,21 b	29,8 $\pm$ 1,11 ab	20,93 $\pm$ 1,38 a	409,75 $\pm$ 21,54 ab
TT * 30	62,62 $\pm$ 7,9 ab	32,94 $\pm$ 2 a	24,63 $\pm$ 0,78 a	466,34 $\pm$ 12,94 a
TT * 35	53,94 $\pm$ 1,18 b	31,63 $\pm$ 2,53 ab	24,24 $\pm$ 0,59 a	437,75 $\pm$ 11 a
TT * 40	99,13 $\pm$ 22,57 a	42,97 $\pm$ 4,56 a	24,52 $\pm$ 1,33 a	541,19 $\pm$ 43,64 a

Način zagrijavanja tijekom toplinskog tretmana tijesta ima visoko statistički značajan utjecaj na sve identificirane fenole i grupe fenola, a koncentracije svih identificiranih fenolnih spojeva značajno se razlikuju između tretmana (tablica 5 – način zagrijavanja).

Temperatura pri kojoj je toplinski predtretman provedena ima statistički značajan utjecaj na koncentracije hidroksitirosola, oleaceina, skupine spojeva oko oleaceina, oleokantala, ligstrozida, skupine spojeva oko ligstrozida, III i IV skupine spojeva, i ukupnih fenola (tablica 5 – temperatura). Statistički je značajan utjecaj temperature na povećanje koncentracije skupine spojeva oko oleaceina (pri 30 °C) te na smanjenje koncentracija ligstrozida i spojeva oko ligstrozida (pri 40 °C) i ukupnih fenola (pri 35 °C). U tablici 5 evidentna je i interakcija načina zagrijavanja i primijenjene temperature (tablica 5 – način zagrijavanja\*temperatura), što znači da je pri svakoj temperaturi tretmana različita biosinteza fenola. Statistički je značajna za koncentracije, oleaceina, oleokantala, skupine spojeva oko ligstrozida i IV skupine spojeva.

Značajan je utjecaj TT pri 40 °C na povećanje koncentracije oleaceina i oleokantala, te smanjenje koncentracije skupine spojeva oko ligstrozida. Značajne razlike između uzoraka s obzirom na vrstu tretmana i primijenjene temperature vide se kod koncentracija oleaceina i oleokantala. Oba spoja pokazuju dobru stabilnost pri povećanju temperature i u UTT i u TT. Najveći utjecaj na promjenu koncentracije fenola kod oba primijenjena tretmana odvio se pri temperaturi od 40 °C.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Utjecaj sorte na fenolni profil konvencionalno proizvedenog DMU je visoko statistički značajan. Ulje iz istarske bjelice odlikuje najveća koncentracija većine identificiranih fenola. DMU sorte rosulja značajno nadmašuje ostale sorte koncentracijom oleaceina, dok najveću koncentraciju fenolnih alkohola te neidentificiranih fenolnih spojeva sadrži DMU oblice. DMU sorte levantinka ističe se najvećom koncentracijom oleokantala.
2. Kod primjene UTT pri proizvodnji DMU iz istarske bjelice, oblice i levantinke, zaključuje se da sorta masline ima statistički signifikantan utjecaj na ukupni fenolni profil ulja, a temperatura na sve osim na koncentracije fenolnih alkohola, oleokantal i neidentificirane spojeve. Najznačajnije temperature UTT za povećanje koncentracija fenola istarske bjelice bile su 20 i 35 °C, a kod ulja oblice značajan je porast koncentracije oleuropeina i to pri 15, 30 i 35 °C.
3. Sorta je pokazala visoko statistički značajan utjecaj na sve fenole u DMU proizvedenima uz TT, dok temperatura TT nema značaj za tirosol i oleuropein. Najznačajnije promjene glede koncentracije fenola sorte oblica u uvjetima TT dogodile su se pri temperaturama 35 i 40 °C, a sorte rosulja pri 40 °C.
4. Način zagrijavanja tijesta tijekom toplinskog tretmana ima visok statistički značaj za sve identificirane fenole ulja iz oblice. Temperatura toplinskog predtretmana značajna je za sve spojeve osim tirosola, oleuropeina i neidentificiranih spojeva. Najveći utjecaj na promjenu koncentracije fenola kod oba primijenjena tretmana uočen je pri temperaturi od 40 °C.
5. Za potpuno razumijevanje specifičnosti ispitivanih sorti, utjecaja UTT i TT na fenole DMU, potrebno je unaprijediti analitičku metodu u cilju identifikacije pojedinačnih fenola koji se nalaze u grupama spojeva oko oleaceina, oko ligstrozida te u III i IV grupi fenolnih spojeva.

## 6. LITERATURA

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

Aguilera MP, Beltran G, Sanchez-Villasclaras S, Uceda M, Jimenez A (2010) Kneading olive paste from unripe ‘Picual’ fruits: I. Effect on oil process yield. *J Food Eng*, **97**:533-538. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.013>

Aguilera MP, Jimenez A, Sanchez-Villasclaras S, Uceda M, Beltran G (2015) Modulation of bitterness and pungency in virgin olive oil from unripe “Picual” fruits. *Eur J lipid Sci Technol* **117**, 1463–1472. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400432>

Alagna F, Mariotti R, Panara F, i sur. (2012) Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol* **12**, 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-162>

Alu’datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Gammoh S, Ereifej K, Al-Mahasneh MA, i sur. (2017) Application of Olive Oil as Nutraceutical and Pharmaceutical Food: Composition and Biofunctional Constituents and Their Roles in Functionality, Therapeutic, and Nutraceutical Properties. ured: Mihai Grumezescu A, Holban AM (ured.) *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 265–298. doi:10.1016/b978-0-12-811412-4.00010-2

Amirante R, Cini E, Montel GL, Pasqualone A (2001) Influence of mixing and extraction parameters on virgin olive oil quality. *Grasas y Aceites* **52**, 198–201. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.357>

Angerosa F, Mostallino R, Basti C, Vito, R (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem.* **72**, 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1)

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca A.M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* , **12**, 1679. <https://doi.org/10.3390/12081679>

Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara, Kurti D, Dhuli K, Bushati V, Miertus J, Pangallo D, Baglivo M, i sur. (2020) Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J Biotechnol* **309**, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.016>

Bianco A, Coccioli F, Guiso M, Marra C (2002) The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: Hydroxy-isochromans. *Food Chem.* **77**, 405–411. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00366-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00366-1)

Boskou D, Blekas G, Tsimidou M (2006) Olive Oil Composition. Olive Oil 2.izd, AOCS press, str. 41-72.

Boskou D, Tsimidou M, Blekas G (2005) Polar phenolic compounds, *Curr Top Nutraceutical Res* **3**, 125-136.

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.

Cerretani L, Bendini A, Rotondi A, Lercker G, Gallinatoschi T (2005) Analytical comparison of monovarietal olive oils obtained both a continuous industrial plant and a low-scale mill, *Eur J Lipid sci Technol* **107**: 93-100. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401027>

Clodoveo ML (2012) Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview. *Trends Food Sci Technol* **25**, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.004>

del Monaco G, Officioso A, D'Angelo S, La Cara F, Ionata E, Marcolongo L, i sur. (2015) Characterization of extra virgin olive oils produced with typical Italian varieties by their phenolic profile. *Food Chem* **184**, 220-228, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.071>.

Delegirana uredba Komisije (EU) 2022/2104 od 29. srpnja 2022. o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje i o stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EEZ) br. 2568/91 i Provedbene uredbe Komisije (EU) br. 29/2012

Esposito S, Veneziani G, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio I, i sur. (2013) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Olive Oil Mechanical Extraction Process: Impact on the Structural Modifications of Pastes and Oil Quality. *J Agr Food Chem*, **61**(20), 4953–4960. doi:10.1021/jf400037v .

European Commission (2012) Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Off J Eur Union*, **136**, 1-40.

García-Rodríguez R, Romero-Segura C, Sanz C, Sánchez-Ortiz A, Pérez AG (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* **44**, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.023>

Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani A, Saar N (2012) Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) A review, *Int J Mo Sci*, **13**, 3291-3340; doi:10.3390/ijms13033291.

Gómez-Alonso S, Salvador MD, Fregapane G (2002) Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **50**, 6812–6817. <https://doi.org/10.1021/jf0205211>

Gomez-Rico A, Inarejos-Garci AM, Salvador D, Fregapane G (2009) Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *J Agric Food Chem* **57**, 3587–3595. <https://doi.org/10.1021/jf803505w>

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M (2018) Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci* **19**, 686. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>

Hbaieb RH, Kotti F, Cortes-Francisco, N, Caixach J, Gargouri M, Vichi S (2016) Ripening and storage conditions of Chétoui and Arbequina olives: Part II. Effect on olive endogenous enzymes and virgin olive oil secoiridoid profile determined by high resolution mass spectrometry. *Food Chem*, **210**, 631-639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.026>

IOC (2022) Determination of Phenolic Compounds. IOC-International Olive Council, <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/>. Pristupljeno 18. listopada 2023.

Jagić M (2015) Autentičnost maslinovog ulja na hrvatskom tržištu, (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ, i sur. (2020) Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods* **9**(8):1014. doi:



10.3390/foods9081014.

Jukić Špika M, Perica S, Žanetić M, Škevin D (2021) Virgin Olive Oil Phenols, Fatty Acid Composition and Sensory Profile: Can Cultivar Overpower Environmental and Ripening Effect? *Antioxidants* **10**, 689-710. <https://doi.org/10.3390/antiox10050689>

Kalogianni EP, Georgiou D, Hasanov JH (2019) Olive Oil Processing: Current Knowledge, Literature Gaps, and Future Perspectives. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc* **96**, 481–507. <https://doi.org/10.1002/aocs.12207>

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

Kalua CM, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD (2006) Changes in Volatile and Phenolic Compounds with Malaxation Time and Temperature during Virgin Olive Oil Production. *J Agric Food Chem* **54**(20), 7641-7651. doi:10.1021/jf061122z.

Klimova B, Novotný M, Kuca K, Valis M (2019) Effect Of An Extra-Virgin Olive Oil Intake On The Delay Of Cognitive Decline: Role Of Secoiridoid Oleuropein? *Neuropsych Dis Treat*, **15**., 3033-3040, DOI: [10.2147/NDT.S218238](https://doi.org/10.2147/NDT.S218238)

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

Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Majetić Germek V (2012) Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža, Istarska bjelica, Leccino i Rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7** (3-4), 172-178. <https://hrcak.srce.hr/95033>.

Leone A, Esposto S, Tamborrino A, Romaniello R, Taticchi A, Urbani S, i sur. (2015) Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech*, **118**(2), 308–317. doi:10.1002/ejlt.201400616.

Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Rinaldi de Alvarenga JF, Romero del Castillo-Alba J, Anna Vallverdú-Queralt, Escribano-Ferrer E, Lamuela-Raventós RM (2020) Health-promoting properties of oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **60**, 2532-2548, DOI: [10.1080/10408398.2019.1650715](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650715)

- Lukić I, Žanetić M, Jukić Špika M, Lukić M, Koprivnjak O, Brkić Bubola K (2017) Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality. *Food Chem.* **232**, 610–620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.047>
- Mair A, Fischnaller M, Lutz OMD, Corradini D, Skaltsounis A-L, Stathopoulos P i sur. (2023) Quantification of Health Claim-Relevant Tyrosol and Hydroxytyrosol after Direct Hydrolysis Improves Customer Understanding and Mitigates Market Distortion. *Separations* **10**, 268-282. <https://doi.org/10.3390/separations10040268>
- Negro C, Aprile A, Luvisi A, Nicolì F, Nutricati E, Vergine M, i sur. (2019) Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Italian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. *Antioxidants* **8**, 161-175, <https://doi.org/10.3390/antiox8060161>
- Obied HK, Prenzler DP, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposto S, i sur. (2008) Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L., *Nat Prod Rep*, **25**, 1167–1179. DOI: 10.1039/b719736e.
- Omar SH (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* **78**(2):133-54. doi: 10.3797/scipharm.0912-18.
- Parenti A, Spugnoli P, Masella P, Calamai L (2008) The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur J Lipid Sci Technol* **110**, 735–741. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700307>
- Pejić A (2022) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na antioksidacijski kapacitet i aktivnost djevičanskog maslinovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Pichierri M, Peluso AM, Pino G, Guido G (2021) Communicating the health value of extra-virgin olive oil: An investigation of consumers' responses to health claims. *Brit Food J* **123**, 492–508. <https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2020-0198>
- Presti G, Guarrasi V, Gulotta E, Provenzano F, Provenzano A, Giuliano S, i sur. (2017) Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. *Biophys Chem*, **230**, 109-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2017.09.002>
- Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Lucera L, Del Re P (2003) Enhancing the quality of virgin

olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing. *Eur Food Res Technol*, **216**,109–115. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0618-7>

Reboredo-Rodríguez P., Figueiredo-Gonzalez M., Gonzalez-Barreiro C., Simal-Gandara J., Desamparados Salvador M., Cancho-Grande B., i sur. (2017) State of the art on functional virgin olive oils enriched with bioactive compounds and their properties. *Int J Mol Sci* **18**, 668. <https://doi.org/10.3390/ijms18030668>

Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG (2009) Purification and Characterization of an Olive Fruit  $\beta$ -Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *J Agr Food Chem*. **57**(17), 7983–7988. doi:10.1021/jf901293c.

Salas JJ i Sánchez J (1999) The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *J Agr Food Chem* **47**, 809–81. <https://doi.org/10.1021/jf981261j>

Sánchez-Ortiz A, Romero-Segura C, Sanz C, Pérez AG (2012) Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipoxygenase activity load during the oil extraction process. *J. Agric. Food Chem*. **60**, 812–822. <https://doi.org/10.1021/jf204241e>

Servili M, Montedoro G (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech* **104**, 602-613. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X)

Soler-Rivas C, Epsin JC, Wichers HJ (2000) Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agr*, **80**, 1013-1023. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C)

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

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

Torić J, Brozovic A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ, i sur. (2020) Biological activity of phenolic compounds in extra virgin olive oils through their phenolic profile and their combination of anticancer drugs observed in human cervical 25 carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Antioxidants* **9**, 1-15. <https://doi.org/10.3390/antiox9050453>

Uredba (2013) Uredba (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 Službeni list Europske unije 347, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32013R1308>. Pristupljeno 23. studenog 2023.

Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, Di Maio I, i sur. (2015) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Oil Mechanical Extraction Process: Cultivar Impact on the Phenolic and Volatile Composition of Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* **63**, 6066-6074. doi:[10.1021/acs.jafc.5b01666](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01666).

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

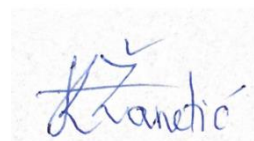
Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Sordini B, i sur. (2018) Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste. *LWT* **87**, 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.034>

Žanetić M, Gugić M (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja, *Pomol Croat*, **12**, 159-173. <https://doi.org/10.33128/pc>

Žanetić M, Škevin D, Vitanović E, Jukić Špika M, Perica S (2011) Ispitivanje fenolnih spojeva i senzorski profil dalmatinskih djevičanskih maslinovih ulja, *Pomol Croat*, **17**, 19-30. <https://doi.org/10.33128/pc>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink, reading 'K. Žanetić', is centered on a light gray rectangular background.

---

Vlastoručni potpis