Utjecaj ambalaže na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja

Brajković, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:422718

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Antonija Brajković

6856/BT

UTJECAJ AMBALAŽE NA OKSIDACIJSKU STABILNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Procesi prerade maslina i kontrola kvalitete proizvoda

Mentor: Doc.dr.sc. Klara Kraljić

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj ambalaže na oksidacijsku stabilnost djevičanskog maslinovog ulja

Antonija Brajković, 0058204589

Sažetak: Kao i bilo koji proizvod koji sadrži masnoće, trajnost djevičanskog maslinovog ulja je zbog oksidacijske degradacije ograničena. Tehnike ekstrakcije ulja, stupanj izloženosti kisiku, svjetlu, povišenoj temperaturi te način skladištenja, bitno utječu na način oksidacije ulja. Kako bi se utvrdio utjecaj ambalaže na kratkotrajno skladištenje djevičanskog maslinovog ulja, u ovom istraživanju ulje je skladišteno u trima različitim ambalažama (u ambalaži od zelenog stakla, prozirnog stakla i PET ambalaži) u periodu od tri mjeseca. U svim uzorcima određeni su osnovni pokazatelji kakvoće djevičanskog maslinovog ulja, određen je sastav polifenola i utvrđena je antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Kao rezultat oksidacije, najveći gubitak antioksidacijske aktivnosti djevičanskog maslinovog ulja uočava se u uzorku skladištenom u PET ambalaži, dok se najstabilnije pokazalo ulje skladišteno u zelenom staklu iako razlika nakon tromjesečnog skladištenja nije značajna.

Ključne riječi: ambalaža, djevičansko maslinovo ulje, oksidacijska stabilnost, polifenoli
Rad sadrži: 34 stranice, 5 slika, 4 tablice, 55 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb
Mentor: Doc.dr.sc. Klara Kraljić

Datum obrane: 7. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Influence of packaging on the oxidative stability of virgin olive oil

Antonija Brajković, 0058204589

Abstract: Like any fat-containing product, the shelf life of virgin olive oil is limited due to oxidative degradation. Oil extraction techniques, degree of oxygen exposure, light, elevated temperature, and storage method significantly affect to oil oxidation. In order to determine the impact of packaging on short-term storage of virgin olive oil, oil was stored in three different packaging (in green glass, transparent glass and PET packaging) for three months. In all samples, basic quality indicators of virgin olive oil and the composition of polyphenols wrere determined. Also, the antioxidant activity was determined using the DPPH method. As a result of oxidation, the greatest loss of antioxidant activity of virgin olive oil was found in the sample stored in PET packaging, while the oil stored in green glass was found to be the most stable, although the difference between the samples after three months of storage was not significant.

Keywords: oxidation stability, packaging, polyphenols, virgin olive oil
Thesis contains: 34 pages, 5 figures, 4 tables, 55 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Klara Kraljić, PhD, Assistant professor

Defence date: July 7th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Građa i sastav ploda masline 2

2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja 3

2.2.1. Osapunjivi dio 3

2.2.2. Neosapunjivi dio 4

2.3. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja 10

2.4. Skladištenje ulja i utjecaj skladištenja na kvarenje 12

2.4.1. Hidroliza 13

2.4.2. Oksidacija 14

2.4.3. Utjecaj ambalaže na kvalitetu ulja 15

3.MATERIJALI I METODE 17

3.1. Materijali 17

3.2. Metode 17

3.2.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda 17

3.2.2. Određivanje peroksidnog broja 18

3.2.3. Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području 18

3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju 19

3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH$^{\bullet}$ metodom 21

4.REZULTATI I RASPRAVA 22

5. ZAKLJUČAK 28

6. LITERATURA 29

1. UVOD

Arheološka nalazišta s područja Krete potvrđuju proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja još u davnoj prošlosti. Takvo su djevičansko maslinovo ulje grčki filozofi nazvali "tekućim zlatom" i ono danas ima veliki značaj na gastronomskom, prehrambenom, terapeutskom i ekonomskom polju. Djevičanska maslinova ulja, uz samu maslinu, postala su simbolom mediteranskog podneblja i sinonim zdravog načina prehrane.

Djevičansko maslinovo ulje poznato je po visokoj nutritivnoj vrijednosti i dobroj oksidacijskoj stabilnosti. Sadrži umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina a najzastupljenija jednostruko nezasićena masna kiselina je oleinska. Stabilnost ulja, odnosno sposobnost ulja da se odupre oksidacijskom kvarenju ovisi o stupanju nezasićenosti masnih kiselina, ali i koncentraciji i vrsti antioksidanasa koje ulje sadrži.

Slobodni radikali su kemijski nestabilni i vrlo reaktivni spojevi koji uzrokuju lančane reakcije oksidacije i time stvaraju velik broj radikala koji napadaju naše stanice. Organizam se može zaštititi od radikala uz pomoć antioksidacijskih tvari koje, u određenim granicama, održavaju ravnotežno stanje. Maslinovo ulje sadrži značajan udio prirodnih antioksidanasa koji ometaju proces oksidacijskog kvarenja i produžuju trajnost ulja. Osim toga, konzumiranjem djevičanskog maslinovog ulja, unosimo i prisutne antioksidanse koji pozitivno utječu i na naše zdravlje, jer se u našim organizmima primjenjuju isti mehanizmi smanjenja utjecaja štetnih radikala.

Međutim, dobar sastav maslinovog ulja ne osigurava bezuvjetno pozitivno djelovanje na zdravlje. Za kvalitetu djevičanskih maslinovih ulja značajne su promjene koje nastaju već tijekom dozrijevanja ploda, berbe i prerade maslina, te naročito tijekom čuvanja. Iako je neke od tih promjena nemoguće izbjeći, uz pravilno skladištenje moguće je umanjiti njihovo štetno djelovanje. Tako je cilj ovoga rada bio ispitati utjecaj vrste ambalaže na oksidacijsku stabilnost i udio bioaktivnih komponenti djevičanskog maslinovog ulja tijekom kratkotrajnog skladištenja ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Građa i sastav ploda masline

Plod masline je koštunica, duguljastog ili okruglastog oblika. Osnovni dijelovi ploda masline su kožica (1,5-3,5%), pulpa, koja čini najveći dio ploda (71-80%) i koštica (11-24,5%) unutar koje se nalazi sjemenka. Plod može sadržavati od 40-70% vode, 6-25% ulja te 24-35% ostalih sastojaka.

Kožica masline se sastoji od sloja epidermalnih stanica iznad kojih se nalazi masno voštano tkivo. Sadrži i značajne udjele pigmenata kao što su klorofili, karotenoidi, ksantofili te hidrofilni antocijani. U nezrelom plodu klorofili čine više od 80 % ukupne količine tvari boje. Na osnovu boje mogu se odrediti zrelost, čistoća, svježina kao i zdravstvena ispravnost proizvoda. Koncentracija obojenih tvari se smanjuje tijekom dozrijevanja, kako plod postepeno mijenja boju iz intenzivno zelene prema tamnijoj boji što ukazuje na pojavu sinteze antocijana, ali i oksidacije fenolnih sastojaka.

Pulpa je dio ploda masline u kojem se nalazi najveći dio ulja, točnije unutar vakuola stanica pulpe. U zrelom plodu vakuole ispunjavaju preko 80% volumena stanice. Udjel ulja u plodu uvjetovan je sortnim osobinama kao i vanjskim čimbenicima uzgoja. Najveći dio sadržaja vakuola u uljnim stanicama ploda masline čine trigliceroli, a ostali sastojci kao ugljikovodici, alkoholi, voskovi i steroli prisutni su u manjim udjelima. U vodenom djelu citoplazme sadržani su šećeri, organske kiseline, enzimi, fenoli i druge tvari koje su topljive u vodi. Od šećera su najprisutniji glukoza i fruktoza, dok su od kiselina najzastupljenije limunska, jabučna i oksalna kiselina koje su najbitnije za održavanje kiselog pH u pulpi masline. Hitin ima građevnu ulogu u održavanju čvrstoće ploda. Unutar pulpe, također se nalazi najveći udio enzima koji su bitni za izdvajanje ulja iz stanice i za nastajanje arome ulja. Neki od tih enzima su lipaze, glikozidaze, celulaze, poligalakturonaze, polifenoloksidaze i dr.

Sjemenka masline sadrži veliki udio ulja, ali to ulje predstavlja tek mali postotak od ukupne količine ulja u plodu. Osim toga, ono je većinom raspršeno u sitnim kapljicama zbog čega je otežano njegovo izdvajanje. Osim ulja, za sjemenku ploda karakteristična je prisutnost tokoferola, linolne kiseline, sterola ali i enzima lipoksigenaza i peroksidaza čija je aktivnost veća nego u kožici ili pulpi ploda masline (Koprivnjak, 2006).

2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja

Djevičansko maslinovo ulje sastavljeno je od osapunjivog i neosapunjivog djela. Iako neosapunjivi dio čini manje od 1% djevičanskog maslinovog ulja, čine ga različiti spojevi a njihova uloga vrlo je važna u definiranju senzorskog profila ulja. To su u pravilu sekundarni produkti metabolizma ploda koji su, osim za aromu, bitni i za stabilnost te kvalitetu ulja (Žanetić i Gugić, 2006).

2.2.1. Osapunjivi dio

Osapunjivi dio ulja uglavnom čine triacilgliceroli, te manji dio mono- i diacilcliceroli te slobodne masne kisleine. Više od 99 % djevičanskog maslinovog ulja čine triacilgliceroli koji se sastoje od alkohola glicerola i masnih kiselina. Najzastupljenije masne kiseline u djevičanskom maslinovom ulju su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1) i linolenska (C18:3). Oleinska masna kiselina dominira s visokim udjelom od 55 do 83% (Tablica 1), dok izuzetno mali udio linolne i linolenske čini maslinovo ulje otpornijim na oksidacijske procese od ostalih biljnih ulja.

Udio masnih kiselina varira u pojedinim uzorcima maslinovog ulja i ovisi o brojnim faktorima kao što su sorta maslina, klima, geografski položaj i zrelost ploda. Tako su npr. grčka, talijanska i španjolska maslinova ulja izuzetno bogata oleinskom kiselinom, a sadrže manje linolne i palmitinske kiseline, dok ulja proizvedena na području Tunisa sadrže mnogo više linolne i palmitinske, a manje oleinske kiseline (Boskou, 2006).

Slobodne masne kiseline, diacilgliceroli i monoacilgliceroli nastaju hidrolizom triacilglicerola i oni su pokazatelji hidrolitičkog kvarenja djevičanskog maslinovog ulja. Vrsta masnih kiselina prisutnih u ulju te broj dvostrukih veza određuje vrstu i opseg kemijskih reakcija koje se događaju tijekom skladištenja (Morelló i sur., 2004).

Tablica 1. Sastav masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju (IOC, 2015.)

MASNA KISELINA	Broj C atom i položaj nezasićene veze	UDIO (% od ukupnih masnih kiselina)
Miristinska	14:0	≤0,03
Palmitinska	16:0	7,5-20,00
Palmitoleinska	16:1	0,3-3,5
Heptadekanska	17:0	≤0,3
Heptadecenska	17:1	≤0,3
Stearinska	18:0	0,5-5,0
Oleinksa	18:1	55,0-83,0
Linolna	18:2	2,5-21,0
Linoelnska	18:3	≤1
Arhainska	20:0	≤0,6
Gadoleinska	20:1	≤0,4
Behenska	22:0	≤0,2
Lignocerinska	24:0	≤0,2

2.2.2. Neosapunjivi dio

Ugljikovodici

Ugljikovodici čine oko 60% neosapunjivog djela djevičanskog maslinovog ulja. Najznačajniji su skvalen i β- karoten. Od ukupne količine prisutnih ugljikovodika, značajnih 90% odnosi se na skvalen koji je prekursor u biokemijskoj sintezi sterola. Osim ta dva značajna spoja, manji udio preostalih ugljikovodika čine i diterpeni, triterpeni, izopren poliolefini i n-parafini (Lanzón i sur., 1994).

Tokoferoli

Tokoferoli, fenolni spojevi lipofilnog karaktera, glavni su antioksidansi ulja i masti. Njihov veliki značaj je i što doprinose kvaliteti i autentičnosti djevičanskog maslinovog ulja, a imaju i visoku nutritivnu vrijednost (Sayago i sur., 2007). Prosječni udio tokoferola u maslinovom ulju iznosi 150-330 mg kg^{-1}. Najviše je prisutan α–oblik (vitamin E), koji ima najznačajniju biološku aktivnost (Žanetić i Gugić, 2006).

Alifatski i aromatski alkoholi

Alifatski alkoholi su prisutni u maslinovom ulju kao slobodni i esterificirani, a najvažniji od njih su alkoholi masnih kiselina i diterpenski alkoholi. Najbitniji alkoholi masnih kiselina su dokosanol, oktakosanol te u najvećem udjelu tetrakosanol i heksakosanol. Njihova koncentracija u djevičanskom maslinovom ulju najčešće nije veća od 250 mg kg^{-1} (Grob i sur., 1990; Ranalli i Angerosa, 1996).

U skupinu diterpenskih alkohola ubrajaju se fitol i geranilgeraniol. Njihova koncentracija koristi se u izračunavanju alkoholnog indeksa, pomoću kojeg se utvrđuje patvorenja djevičanskog maslinovog ulja s uljem proizvedenim ekstrakcijom organskim otapalima (Boskou, 2006).

Steroli

Steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi koji se u maslinovom ulju pojavljuju u 4 skupine: obični ili opći steroli, 4α-metilsteroli , triterpenski alkoholi i triterpenski dialkoholi.

Najvažniji steroli prve skupine su β-sitosterol, Δ5-avenasterol i kampesterol (Itoh i sur., 1973a; Boskou i Morton, 1975). Ostali steroli prisutni u izuzetno malim koncentracijama su stigmasterol, kolesterol, brasikasterol, klerosterol, ergosterol, sitostanol, kampestanol, Δ7-avenasterol, Δ7-kolestenol, Δ7-kampestenol, Δ7-stigmastenol, Δ5,23-stigmastadienol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7,22-ergostadienol, Δ7,24-ergostadienol, 24-metilen-klesterol, i 22,23-dihidrobrasikasterol (Itoh i sur., 1981; Calapaj i sur., 1993).

4-metilsteroli su u maslinovom ulju prisutni u malim koncentracijama. Najznačajniji su gramisterol, cikloeukalenol i citrostadienol (Itoh i sur., 1973b; Boskou i Morton, 1975).

Najznačajniji predstavnici triterpenskih alkohoal su β-amirin, butirospermol, 24-metilenecikloartanol, dok su eritrodiol i uvaol predstavnici triterpenskih dialkohola.

Određivanjem sastava sterola danas je moguće potvrditi autentičnost proizvoda. Sirova i rafinirana lampante ulja sadrže sitosteril-C18-estere u značajno višim udjelima nego što je to karakteristično za djevičanska maslinova ulja. Osim toga, tijekom rafinacije ulja dolazi do dehidratacije β-sitosterola i formiranje stigmastadiena koji inače nisu prisutni u djevičanskom maslinovom ulju (Amelotti, 1985). U djevičankom maslinovom ulju β-sitosterol čini između 75 i 90% od ukupnog udjela sterola, zatim Δ5-avenasterol i niske udjeli kampesterola i stigmasterola (Itoh i sur., 1981; Calapaj i sur., 1993).

Hlapljivi spojevi i arome

U djevičanskom maslinovom ulju je detektirano više od 280 hlapljivih spojeva, od kojih su u najvećem udjelu prisutni ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, ketoni i esteri. To su tvari koje tijekom mljevenja i miješenja maslinovog tijesta nastaju u nizu biokemijskih reakcija poznatih kao lipoksigenazni put. Međutim, svojstvo hlapljivosti nije dovoljan preduvjet da neka tvar izazove doživljaj mirisa, kao što ni visoka koncentracija nije uvijek znak da tvar ima veliku važnost za aromu ulja (Koprivnjak, 2006).

Najznačajniji spojevi za aromu djevičanskog maslinovog ulja su heksanal, Z-3-heksenal, heksenal i heksanol. Ove su hlapljive komponente odgovorne za zelenu i voćnu percepciju arome.

Osim hlapivih komponenti koje su odgovorne za pozitivne senzorske karakteristike, u malim koncentracijama prisutne su i komponente koje uzrokuju pojavu negativnih senzorskih svojstava. Takve tvari najčešće su produkti oksidacijskih procesa pa ulje ima svojstvo "užeglo". Ostali nepoželjni spojevi nastaju djelovanjem mikroorganizama tijekom nepravilnog skladištenja ploda. Oštećeno i razgrađeno tkivo je prikladna podloga za mikroorganizme koji troše hranjive sastojke i izlučuju svoje metabolite. Tako npr. vlaga i više temperature pogoduju razvoju kvasaca koji će proizvoditi etanol i etil acetat. Ti spojevi daju aromu vina i octa. Bakterije iz roda *Clostridium* i *Pseudomonas* daju nepoželjne produkte kao butanska kiselina, heptanska kiselina i 2-metilpropil butanoat koji daju nepoželjne mirise po upaljenom plodu. U slučaju dužeg čuvanja ploda, moguća je pojava rasta plijesni koji će svojim produktima, kao što su 1-okten-3-ol i E-2-heptenal dati svojstvo pljensnivo i vlažno (Koprivnjak, 2006).

Fosfolipidi

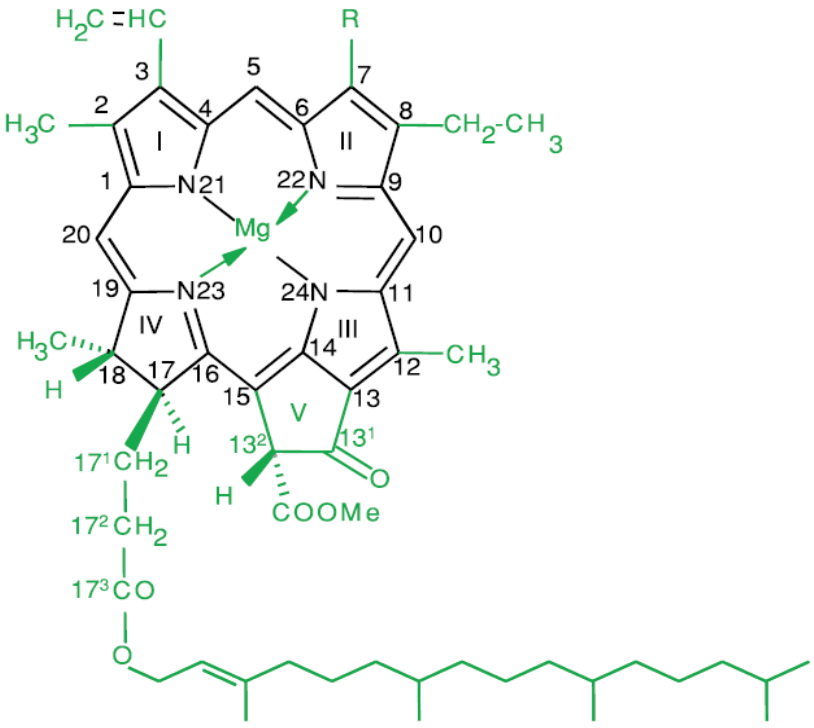
Djevičanska maslinova ulja sadrže skromne koncentracije fosfolipida, što ovisi o biološkim i tehnološkim čimbenicima, a osobito o starosti ulja. Najzastupljeniji su fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol i fosfatidilserin. Ovi spojevi mogu imati važnu ulogu kao sinergisti jer sudjeluju u regeneraciji antioksidanasa (Pokorny i sur., 2001).

Pigmenti

Pigmenti u maslinovom ulju su klorofili i karotenoidi. Oni su odgovorni za karakterističnu boju maslinovog ulja. Prisutnost pigmenata ovisi o čimbenicima kao što su sorta, tlo, klimatske prilike, stupanj zrelosti ploda, te prerada ploda masline. U tami ovi pigmenti djeluju kao antioksidansi, vjerojatno jer daju vodikov atom slobodnom radikalu kako bi zaustavili lančanu reakciju autooksidacije (Endo i sur.,1984). Međutim, u prisutnosti svjetla, djeluju kao promotori

fotooksidacijskih procesa u djevičanskom maslinovom ulju. Oni su akceptori energije koju zatim prenose na kisik (o čemu će više biti riječ kasnije u poglavlju o fotooksidaciji). Na taj način započinje proces oksidacije i degradacije djevičanskog maslinovog ulja, što je vidljivo i promjenom boje ulja.

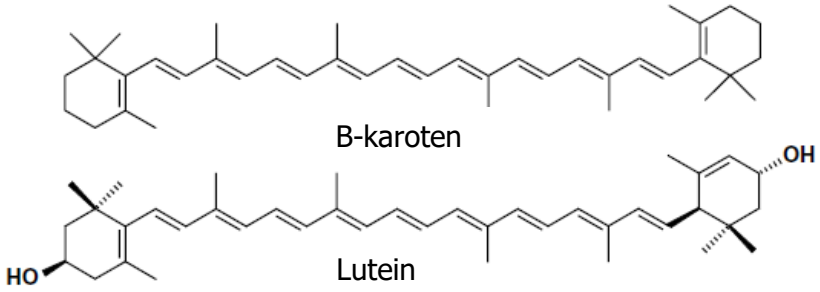
Klorofili spadaju u skupinu porfirina. Metalni ion u središtu, koji tvori kompleks je Mg^{2+}. Kao dodatne supstituente, osnovni spoj također sadrži lanac modificirane propionske kiseline u obliku cikličkog beta-ketoestera te lanac esterificirane propionske kiseline s diterpenskim alkoholom od 20 ugljikovih atoma, fitolom. Razlika između klorofila a i b je u supstituentu C-7, klorofil a ima metilnu skupinu dok klorofil b ima formilnu skupinu (Slika 1). Od ukupnog udjela klorofila u djevičanskom maslinovom ulju, udio klorofila a je 80% a klorofila b 20% (Roca i Mínguez- Mosquera, 2001).



Slika 1. Strukturna formula porfina (crno) i klorofila (zeleno) R=CH3 za klorofil a, R=CHO za klorofil b. (Aparicio i Harwood, 2013)

Po svojoj strukturi, karotenoidi pripadaju skupini terpenoida i većina ima središnji položaj kostura od 40 ugljikovih atoma, formiranih od osam izoprenoidnih jedinica. Karotenoidi su podijeljeni u dvije osnovne grupe a to su karoteni i ksantofili.

Glavni predstavnici karotena (ksantofila) u maslinovom ulju su lutein i β-karoten (Slika 2) (Mínguez-Mosquera i sur., 1990).



Slika 2. Strukturne formule ksantofila u maslinovom ulju (Aparicio i Harwood, 2013)

Fenolni spojevi

Fenolni spojevi glavni su antioksidansi djevičanskih maslinovih ulja. Osnovna podjela fenola djevičanskog maslinovog ulja je na flavonoide, sekoiridoide, fenolne kiseline i alkohole te lignane.

Najznačajniji predstavnici fenolnih kiselina prisutnih u djevičanskim maslinovim uljima su kavska, vanilinska, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska, protokatehinska i *p*-hidroksibenzojeva. Fenolni alkoholi, kao što su 3,4-dihidroksifenil etanol ili hidroksitirosol (3,4-DHPE) i p-hidroksifenil etanol ili tirosol (p-HPEA) su prisutni u izuzetno malim koncentracijama u djevičanskom maslinovom ulju, ali tijekom skladištenja njihova koncentracija raste, (Montedoro i sur., 1992) dok se ukupna koncentracija polifenola smanjuje (Tripoli i sur., 2005). Najznačajniji flavonoidi su luteolin i apigenin. Lignani, (+)-1-acetoksipinoresinol i (+)-1-pinoresinol su najzastupljeniji su pulpi ploda masline i u koštici, te u ulje prelazi tijekom mehaničke ekstrakcije. Njihova koncentracija u različitim uljima manje varira u usporedbi sa sekoiridoidima, jer njihov udio prvenstveno ovisi o načinu pripreme ploda dok način ekstrakcije tijekom procesa proizvodnje mnogo manje utječe.

Sekoiridoidi su najvažniji fenolni spojevi djevičanskog maslinovog ulja. Glavni predstavnici su oleuropein, dimetiloleuropein i ligstrozid. Karakteristični su po dialdehidnoj formi dekarboksimetil eleonolne kiseline. Derivati tih spojeva, a ujedno i prvi otkriveni sekoiridoidi bili su 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA, 3,4-DHPEA-Ea i *p*-HPEA-EA (Slika 3) (Montedoro i sur., 1992). Koncentracija sekoiridoida ovisi o agronomskim i tehnološkim uvjetima tijekom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Sorta, vrijeme berbe plodova, navodnjavanje i porijeklo masline su najvažnije agronomske značajke, dok su mljevenje,

miješenje i način ekstrakcije ulja najvažnije tehnološke značajke o kojima ovisi koncentracija sekoiridoida u djevičanskom maslinovom ulju (Servili i sur., 2004). Dok su tokoferoli, fenolne kiseline, fenolni alkoholi i flavonoidi prisutni u mnogobrojnom voću i povrću, sekoiridoidi su značajni po tome što se javljaju isključivo u biljkama iz porodice Oleaceae, kao što je maslina.

Važnost fenolnih sastojaka je u tome što su oni glavni, prirodni antioksidansi, te su zbog tog svojstva izuzetno bitna komponenta ulja za ljudsko zdravlje. Osim toga, oni utječu na miris i okus djevičanskog maslinovog ulja.

Djeluju kao primarni antioksidansi jer imaju sposobnost predaje atoma vodika slobodnom radikalu, pri čemu nastaju stabilne molekule i radikali vrlo niske aktivnosti. Istraživanje je pokazalo da *o*-difenoli, kao što su 3,4-DHPEA i 3,4-DHPEA-DEA imaju jače antioksidacijsko djelovanje od *p*-HPEA i α-tokoferola (Baldioli i sur.,1996).

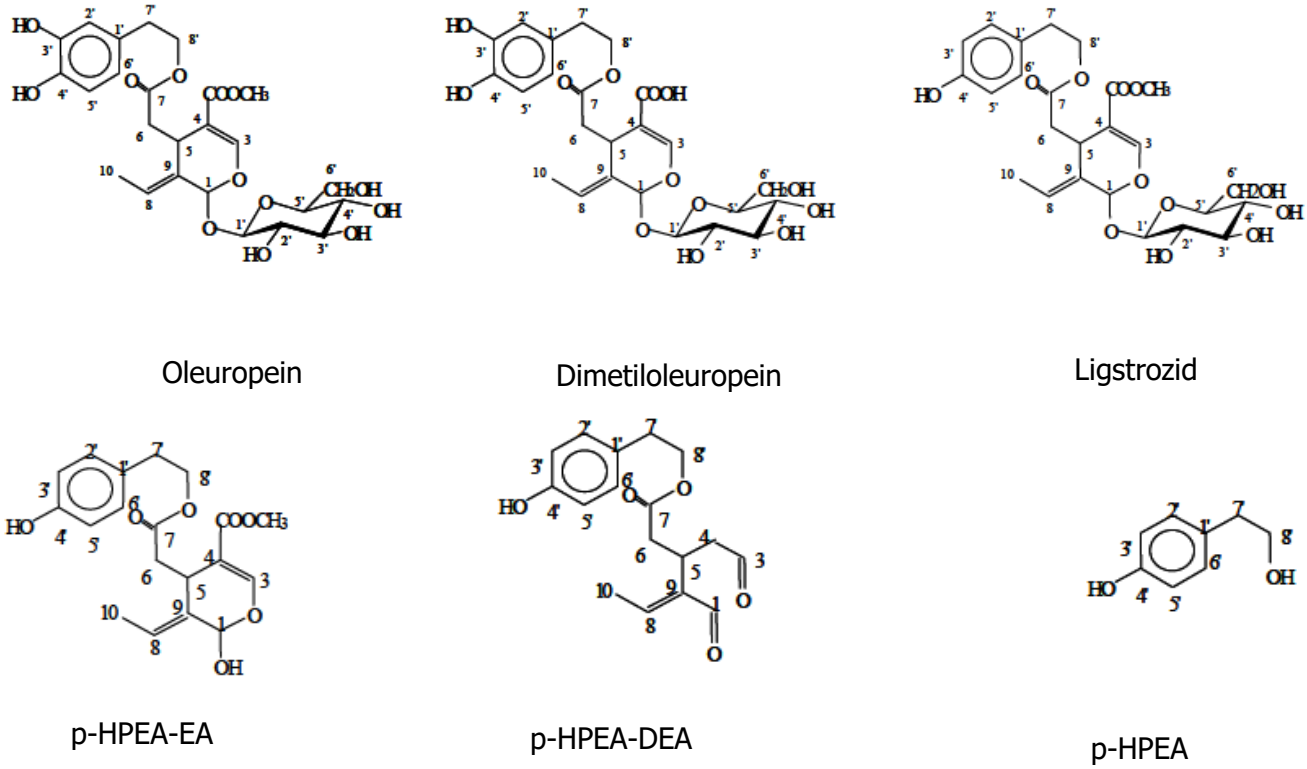
U mnogobrojnim istraživanjima dokazano je da se konzumacijom djevičanskog maslinovog ulja može smanjiti rizik od karcinoma dojke, pluća, prostate i debelog crijeva. Isto tako, dokazano je da 3,4-DHPEA može spriječiti nepravilnosti kao što su kidanje veza u molekuli DNA koju mogu uzrokovati spojevi, kao što je hidrogen peroksid (Nousis i sur., 2005). Međutim, veoma je teško objasniti vezu između kemijske strukture fenolnih spojeva i njihovog utjecaja na zdravlje čovjeka. To dokazuje i istraživanje u kojem je dokazano da 3,4-DHPEA pokazuje veliku aktivnost u induciranju apoptoze u tumorskim stanicama, dok je u istoj koncentraciji *p*-HPEA potpuno inaktivna.

Osim toga, dokazano je još jedno svojstvo *p*-HPEA-EDA, a to je protuupalno i antikoagulacisko svojstvo. Spoj, nazvan oleokantal, djeluje kao neselektivni inhibitor obiju ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2), što znači da djeluje poput lijekova za ublažavanje boli kao što je ibuprofen (Servili i sur., 2009).

Kao što je već napomenuto, uz učinak na zdravlje, fenolni spojevi imaju veliki utjecaj na organoleptička svojstva ulja. Gorčina, pikantnost i oštrina djevičanskog maslinovog ulja potječu od fenola (Servili i sur., 2004). Jednostavni fenoli, tj. fenolni alkoholi i kiseline, nemaju gorak okus, već su pretežito odgovorni za trpkost. Gorčina i pikantnost odlika je složenijih fenola tj. aglikona (Koprivnjak, 2006). Upravo oleokantal doprinosi najsnažnijem „osjećaju" pikantnosti i žarenja. Okusna svojstva ulja jednim djelom ovise o koncentraciji ukupnih sekoiridoida u plodu masline, a drugim djelom ovise o omjeru koncentracija njihovih derivata koji nastaju tijekom prerade ili skladištenja ulja. Hlapivi fenolni sastojci kao vanilin doprinose mirisu maslinovog ulja, ali također mogu utjecati i na njegov okus (Romero i sur., 2002).

Zbog značajnog antioksidacijskog potencijala, fenolni spojevi su bitni za održavanje stabilnosti ulja tijekom skladištenja. Istraživanje provedeno na 24 uzoraka grčkih djevičanskih maslinovih ulja pokazalo je da su ulja s višim udjelom polifenola otpornija na autooksidaciju,

jer im je potreban dulji vremenski period da postignu određeni peroksidi broj (Tsimidou i sur., 1992).



Oleuropein | Dimetiloleuropein | Ligstrozid

p-HPEA-EA | p-HPEA-DEA | p-HPEA

Slika 3. Fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju (Servili i sur., 2009)

2.3. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja

Djevičansko maslinovo ulje je definirano kao ulje dobiveno izravno iz ploda maslina isključivo mehaničkim postupcima (Uredba 2568/91). Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja visoke kvalitete podrazumijeva mnogobrojne procese, koji započinju već od tretiranjem maslina u masliniku do pravilnog skladištenja proizvedenog ulja.

Kvalitetnija ulja dobivamo iz ploda koji je ubran nešto prije optimalne zrelosti jer će takvo ulje sadržavati veći udio polifenola i klorofila koji su važni za stabilnost ulja.

Nakon berbe jako je važno da se masline odmah prenose u uljaru na proces prerade. U suprotnom slučaju, potrebno je plod skladištiti na pravilan način tako da kvaliteta ploda ostane sačuvana. Trajanje skladištenja mora biti vrlo kratko jer za to vrijeme dolazi do mnogih biokemijskih reakcija koje mogu uzrokovati degradaciju ulja. Nečistoće mogu negativno

utjecati na kakvoću ulja, oštećivati dijelove opreme ili umanjiti ekstrakciju ulja iz ploda. Lišće i sitne grančice uklanjaju se strujom zraka, a ostale nečistoće na površini ploda ispiru se vodom.

Mljevenje je jedan od najvažnijih koraka jer tijekom procesa mljevenja dolazi do izravnog kontakta ulja i ostalih sastojaka uslijed razaranja stanične strukture. U tom je koraku bitno izbjeći proces stvaranja emulzija koje dovode do velikih gubitaka. Tijekom mljevenja, kapljice ulja iz vakuole se obaviju lipoprotinskom ovojnicom. Ona se svojim polarnim djelom orijentira prema vodi a nepolarnim djelom prema kapljici ulja. Ako su privlačne sile dovoljno jake između kapljica ulja, a to je u slučaju većih kapljica, tada dolazi do olakšanog izdvajanja ulja iz samljevene mase. Uloga koštice je veoma važna jer prilikom usitnjavanja dobiveni fragmenti predstavljaju abrazivno sredstvo kroz koje se ulje bolje izdvaja iz tijesta.

Mlinovi kojima se vrši mljevenje ploda dijele se na kamene i metalne. Kameni mlinovi su u obliku zdjele u kojoj se nalaze dva ili tri kamena valjka. Često se njihova uporaba kombinira s metodom separacije ulja. Ukoliko proces mljevenja traje kraće tada se ulje odvaja prešanjem, a ukoliko se ono odvaja centrifugiranjem tada je potrebno vršiti dugotrajnije mljevenje. Općenito, mali broj okretaja, blago miješanje i drobljenje omogućuje spajanje kapljica ulja u veće nakupine što omogućuje bolju separaciju ulja. Za razliku od kamenih mlinova, plod se metalnim mlinovima čekićarima drobi udaranjem i pritiskivanjem kroz rupice koša. Prednost metalnih mlinova s diskovima je što se plod ne usitnjava samo uslijed sile udarca nego i sile rezanja, pa se oslobađa manje topline. Međutim, kod mljevenja plodova različitih veličina postoji moguće da masline budu nedovoljno ili pretjerano usitnjene, pa je prethodno potrebno vršiti sortiranje maslina po veličini.

Ulje proizvedeno metalnim mlinovima u konačnici sadrži veći udio fenolnih tvari koje daju gorčinu i pikantnost ulju. Veći stupanj usitnjavanja koji se postiže rotirajućim metalnim dijelovima dolazi do boljeg kontakta kapljica ulja s fenolnim spojevima i klorofilom. Međutim, to dovodi do veće mogućnosti stvaranja emulzija, zbog čega je nužno nakon korištenja metalnih mlinova provoditi proces miješenja tijesta.

Cilj miješenja je razbijanje emulzije kako bi se izdvojio što više ulja u sljedećem koraku proizvodnje. Ono se provodi metalnim mješačima u koritima koji sadrže plašt kroz koji struju topla voda da se smanji viskoznost smjese. Mješači razbijaju cijele stanice i lipoproteinske membrane. Miješenje je jako bitan korak jer dolazi do raspodjele tvari u vodenu i uljnu fazu. Za kakvoću ulja je najvažnije kako se raspodjeljuju i kako reagiraju pigmenti, triacilgliceroli, masne kiseline te fenoli i enzimi. Važna je aktivnost enzima koji su bitni za razgradnju stanične stjenke, a to su pektolitički i hemicelulolitički enzimi. Lipaze, fosfolipaze i galaktolipaze omogućuju nastajanje slobodnih masnih kiselina. Uz prethodno navedene enzime, lipoksigenaza i hidroperoksid liaza su ključni enzimi za nastajanje arome ulja. Glukozidaze i

esteraze su bitni za provođenje fenolnih spojeva u oblike koji su topljiviji u ulju. Međutim uz poželjne enzime, aktiviraju se i oni koji će uzrokovat procese oksidacijskog kvarenja ulja, kao što su peroksidaza i polifenoloksidaza. Iz tog je razloga proces mješenja provoditi na nižim temperaturama kako bi se umanjila aktivnost peroksidaza i polifenoloksidaza, a omogućilo bolje nakupljanje fenola u ulju.

Za izdvajanje ulja iz pripremljenog maslinovog tijesta primjenjuju se tri osnovna postupka a to su prešanje, centrifugiranje i procjeđivanje. Glavni su nedostaci preša isprekidan rad, značajan udio ljudskog rada i teškoće s održavanjem higijene filtrirajućih slojnica. Stoga su centrifugalni sustavi povoljnija opcija za održavanje kvalitete ulja.

Ovi se sustavi neprestano usavršavaju, pa su danas u primjeni sustavi s tri izlaza gdje se posebno separira komina, ulje i vegetabilna voda. Primjenjuje se i sustav s dva izlaza gdje se odvajaj ulje te komina i vegetabilna voda zajedno. Njihova je prednost u odnosu na sustave s tri izlaza što ne zahtijevaju dodatak vode u tijesto, zbog čega ulje sadrži veći udio fenolnih tvari koje se korištenjem centrifuge s tri izlaza ispiru s vodom. U primjeni su i opcijske centrifuge s 2 ili 3 izlaza. Proces izdvajanja ulja procjeđivanjem temelji se na različitim fizikalnim svojstvima ulja i vode.

Nakon izdvajanja ulja iz maslinovog tijesta, ulje je mutno jer su u suspenziji zaostale čestice biljnog tkiva te sitne kapljice biljne vode emulgirane u ulju. Bistrenje ulja se postiže taloženjem prirodnim putem ili filtracijom. Ukoliko se bistri pretakanjem, važno je da se ono provede u pravo vrijeme, kako ne bi došlo do pojave neugodnih mirisa. Mikroorganizmi i enzimi iz taloga mogu početi razgrađivati proteine i šećere, te dobiveni produkti mogu narušiti senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja (Koprivnajk, 2006).

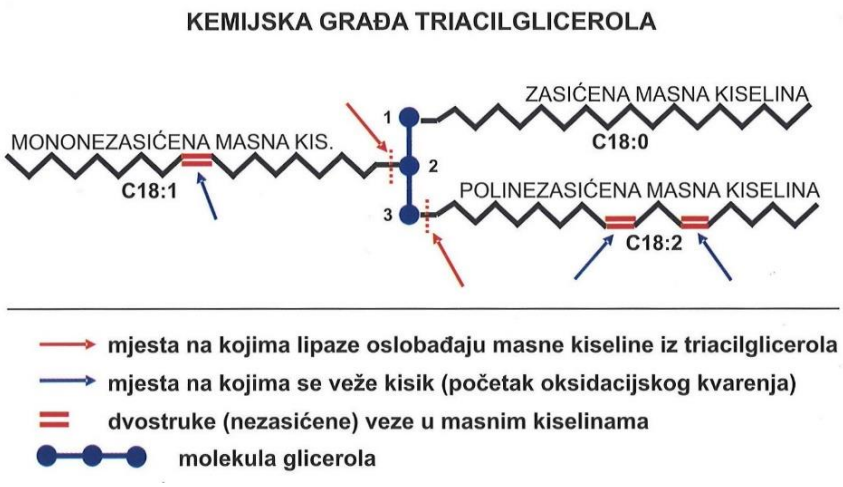
2.4. Skladištenje ulja i utjecaj skladištenja na kvarenje

Po završetku prerade ulje je potrebno pravilno skladištiti kako ne bi došlo do nepovratnog gubitka kvalitete proizvoda. Moguće negativne osobine koje ulje ima ili koje poprima za vrijeme skladištenja nemoguće je eliminirati ni ispraviti. Stoga je skladištenju ulja potrebno posvetiti veliku pažnju kako bi što duže sačuvalo one karakteristike koje je imalo po izlazu iz separatora (Žanetić i Gugić, 2005).

Djevičansko maslinovo ulje je veoma stabilno zahvaljujući velikom udjelu mononezasićenih masnih kiselina i grupi prirodnih antioksidanasa. Upravo su ti antioksidacijski spojevi važni za sprječavanje kvarenja ulja. Na isti način djeluju i u našem organizmu gdje reagiraju sa slobodnim radikalima i tako sprječavaju starenje i smrt stanica. Međutim, niz

drugih spojeva, kao što su slobodne masne kiseline, pigmenti, nezasićeni ugljikovodici, enzimi i tragovi metala će, u manjoj mjeri, pozitivno ili negativno utjecati na oksidacijsku stabilnost ulja. Na kvarenje ulja i gubitak njegovih bioaktivnih komponenti utječu i brojni vanjski faktori. Najznačajniji su utjecaj kisika, temperature, svjetla i ambalaže u kojoj se ulje skladišti. Iz tih je razloga potrebno očuvati ulje od gubitaka antioksidacijskih spojeva i spriječiti njegov doticaj s prooksidansima.

Postoje dvije osnovne vrste kvarenja ulja (Slika 4), to su hidroliza i oksidacija (Boskou, 2006).



Slika 4. Mjesta hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja u molekuli triacilglicerola (Koprivnjak, 2006)

2.4.1. Hidroliza

Hidroliza je proces koji započinje već u samom plodu prije procesa prerade jer je osnovni preduvjet prisustvo vode. To je enzimski proces u kojem lipaze razgrađuju triacilglicerole i povećava se udio slobodnih masnih kiselina. Problem sa slobodnim masnim kiselinama je što one smanjuju oksidacijsku stabilnost ulja i imaju prooksidacijsko djelovanje. One svojom karboksilnom skupinom ubrzavaju razgradnju hidroperoksida i fenolnih sastojaka. Slobodne masne kiseline, pogotovo linolna i linolenska, glavni su supstrati lipoksigenazi koja u aerobnim uvjetima stvara hidroperokside. Oni su supstrat za druge enzime u nizu kemijskih reakcija nastajanja glavnih tvari arome kao što su 1-penten-3-on, E-2-pentenal i dr. Međutim, lipoksigenaze mogu provoditi reakcije razgradnje nastalih hidroperoksida pa tada nastaju

slobodni radikal koji ulaze međusobno u reakcije dajući hidroperoksi i alkoksi radikale (Feussner i sur., 2001).

2.4.2. Oksidacija

Kao što je napomenuto, oksidacija započinje već prilikom procesa prerade ploda, ali je intenzitet kvarenja ulja u toj fazi zanemariv u odnosu na promjene koje nastaju uslijed neodgovarajućeg čuvanja i skladištenja ulja (Koprivnjak, 2006.).

Autooksidacija

Autooksidacija je lančana reakcija koja započinje fazom inicijacije na položaju α u odnosu na dvostruku vezu u masnoj kiselini. Uz pomoć slobodnih radikala, svjetla, temperature ili metala dolazi do izdvajanja vodika i nastanka alkil radikala te masne kiseline. U fazi propagacije dolazi do izomerizacije dvostruke veze i slobodni se elektron premješta na jedan od susjednih C atoma. Tada nastaju peroksi radikali koji ulaze u daljnje reakcije s masnim kiselinama dajući lipid radikale i hidroperokside.

Nastali hidroperoksidi nisu stabilni i uzrokuju nastajanje hlapivih i nehlapivih spojeva koji se mogu oksidirati u sekundarne produkte. U fazi terminacije radikali reagiraju jedan s drugim ili sa stabilnim molekulama. Istraživanje je pokazalo da je odnos raspada hidroperoksida povezan s brojem dvostrukih veza u masnoj kiselini. Hidroperoksid linolenske kiseline se najbrže raspada, zatim slijedi hidroperoksid linolne pa oleinske masne kiseline (Frankel, 1962).

Reakcija koja blokira daljnju propagaciju prooksidansa, ili ukloni slobodni radikal, ključna je za terminacijski mehanizam. Tako reakciju može zaustaviti primarni antioksidans koji reagira direktno sa slobodnim radikalima (Šimić i sur., 1992).

Fotooksidacija

Većina ulja sadrži prirodne spojeve osjetljive na svjetlost. Izlaganje ulja svjetlu može dovesti do nastanka hidroperoksida kada dolazi do pobuđivanja kisika u prisutnosti fotosenzibilizatora. To je tvar koja ima sposobnost apsorpcije i prenošenja energije svjetlosti na druge tvari. Energija svjetla se prenosi na fotosenzibilizator, koji može reagirati direktno s masnom kiselinom, tvoreći radikale čime započinje proces autooksidacije.

Ipak, češće dolazi do prijenosa energije na kisik što uzrokuje nastajanje pobuđenog kisika. Prijenos te energije na nezasićenu masnu kiselinu uzrokuje nastajanje hidroperoksida.

Takav pobuđeni kisik može 1500 puta brže reagirati sa linolnom kiselinom nego obični kisik (Rawls i Van Santen, 1970).

U djevičanskom maslinovom ulju, poznati fotosenzibilizator je klorofil koji prenosi energiju na kisik. Prilikom vezanja kisika na višestruko nezasićene masne kiseline dolazi do premještanja dvostruke veze iz izoliranog u konjugirani položaj (Koprivnajk, 2006). Takve veze apsorbiraju energiju zbog čega je moguće izvršiti procjenu stupnja oksidacijskog kvarenja mjerenjem apsorpcije. Konjugirani dieni, koji nastaju iz linolne kiseline pokazuju maksimum apsorbancije na 232 nm, dok konjugirani trieni, nastali iz linolenske, pokazuju maksimum na 270 nm. Uz konjugirane diene i triene, sekundarni produkti oksidacije kao što su aldehidi i ketoni isto povećavaju apsorbanciju na 270 nm.

U navedene specifične apsorbancije određene spektrofotometrijski u UV području, ostali osnovni pokazatelji kvalitete su slobodne masne kiseline i peroksidni broj. Ti se parametri bitno mijenjaju s načinom i dužinom čuvanja proizvoda (De Leonardis i Macciola,1998).

2.4.3. Utjecaj ambalaže na kvalitetu ulja

Znanje o ambalažnom materijalu i njegove interakcije s uljem te razumijevanje oksidacijskih puteva u određenim uvjetima čuvanja, omogućuju potrebne informacije koje su ključne za pravilno skladištenja ulja i održavanja njegove kvalitete (Kanavouras i sur., 2006).

U novije vrijeme za čuvanje ulja se koriste se materijali od nehrđajućeg čelika (inoks). Otporni su na mehanička oštećenja i koroziju, te su inertni prema ulju. Uglavnom se koriste kao materijal za spremnike i tankere za prijevoz maslinovog ulja. Posebni spremnici od inoksa imaju ugrađeni tzv. plovak, koji se spušta kako se u spremniku smanjuje volumen skladištenog ulja i na taj načina onemogućava kontakt ulja sa zrakom (Žanetić i Gugić, 2005). Takvi su spremnici prigodni za čuvanje velikih volumena i najčešće se koriste se do prebacivanja ulja u prodajnu ambalažu.

Najčešći materijali koji se koriste kao prodajna ambalaža su plastika i staklo. Korištenje stakla smanjuje oksidacijske procese u ulju. Međutim, Kiritsakis i Dugan (1985) navode kako prozirno staklo olakšava fotooksidaciju djevičanskog maslinovog ulja i tako se ipak smanjuje njegova oksidacijska stabilnost. U istraživanju koje je proveo Mastrobattista (1990) maslinovo ulje skladišteno na tri mjeseca u bezbojnom staklu, izgubilo je sav klorofil i oko 70% karotena, dok značajnih promjena u okusu ulja nije bilo. Ipak, uporaba obojanog stakla tijekom skladištenja će te proces usporiti.

Polimerni materijali, poznati kao plastika, u najširoj su uporabi. Tako se, primjerice, u Italiji oko 70% ambalaže za djevičanska maslinova ulja koristi upravo polivinil klorid (PVC). Međutim, takvi materijali nisu najbolje rješenje za čuvanje ulja. Ambalaže od polietilentereftalata , polivinil klorida i polistirena (PET, PVC i PS) imaju ograničenu zaštitu od kisika i kemijskih migracija u odnosu na čelik i staklo (Kanavouras i sur.,2006).

Kako bi se poboljšala svojstva PVC ambalaže, tijekom proizvodnje dodaju se različiti aditivi kao što su ftalat, dietil-ftalat, dioktil adipat. Korištenjem tehnologije kao NMR i MS dokazana je prisutnost tih spojeva u maslinovom ulju. Osim toga, dokazano je i da se PVC ambalaže tijekom skladištenja i djelovanja visokih temperatura oštećuju, što rezultira oslobađanjem HCl (Castle i sur., 1991) Migracija spojeva iz PET ambalaže ovisi o kiselosti maslinovog ulja, prisutnosti alkohola i masnih kiselina, temperaturi i vremenu izlaganja. Kada ulje dođe u doticaj s polimernom ambalažom dolazi do prijenosa aditiva u ulje i ulaska tekućine u polimer. Tekućina ulazi u polimer, otapa kontaminante koji difuzijom izlaze u ulje. Posljedica toga je zagađenje ulja i smanjenje mehaničke stabilnosti ambalaže (Vergnaud, 1998). Sorpcija masti u ambalažu, osobito olefina, uzrokuje oticanje polimera, što dodatno povećava migraciju (Kanavouras i sur., 2006).

Kao novija alternativa za skladištenje ulja predložena je aktivna ambalaža za uklanjanje kisika, kao i difuzni materijali za pakiranje (Tawfik i Huyghebaert, 1999). Uz to, skladištenje ulja pod dušikom može produljiti rok trajanja, što su dokazeli Di Giovacchino i suradnici u svom istraživanju (2002).

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Kao materijal u ovom radu korišteno je djevičansko maslinovo ulje proizvedeno u Istri iz miješanih sorti. Među njima prevladavaju pretežito strane sorte maslina Moraiolo, Leccino, Pendolino, Frantoio te autohtona sorta Istarska bjelica. Ulje, pod *brandom* Vela Grota, proizvedeno je iz berbe maslina 2016. godine. Masline su prerađene hladnim postupkom, a kao tehnika separacije ulja korišteno je centrifugiranje u kombinaciji sa mlinom čekićarom. Do provedene analize ulje je skladišteno u manjim bačvama od inoks materijala. Nakon početnih analiza ulje je napunjeno u boce od 250 mL izrađene od zelenog stakla, prozirnog stakla te PET-a. Ulje je skladišteno tri mjeseca na svijetlu pri sobnoj temperaturi.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda

Udio slobodnih masnih kiselina određen je prema ISO metodi za određivanje kiselinskog broja i kiselosti za životinjske i biljne masti ulja (HRN EN ISO 660, 2010).

10 g ulja otopi se u 50 mL neutralizirane smjese dietil etera i etanola (1:1, V:V). Prisutne slobodne masne kiseline titriraju se otopinom natrijeva hidroksida (0,1 mol L^{-1}) uz fenolftalein kao indikator do ružičastog obojenja koje se zadržava najmanje 10 sekundi. Analiza se provodila se u dvije paralele.

Udio slobodnih masnih kiselina je izražen kao postotak oleinske masne kiseline i izračunat prema formuli [1].

$$SMK(\%\ oleinske) = \frac{V*c*M}{10*m} \qquad [1]$$

gdje je:

V- volumen standardizirane otopine kalij hidroksida upotrjebljen pri titraciji, u mL;

c- točna koncentracija standardizirane otopine natrijeva hidroksida, u mol L^{-1};

M- molarna masa, u g mol^{-1}, oleinske masne kiseline;

m-masa uzorka u g.

3.2.2. Određivanje peroksidnog broja

Za određivanje peroksidnog broja korištena je HRN EN ISO 3960 metoda (2010).

U tikvicu se izvaže oko 1 g uzorka koji se zatim otopi u 50 mL mješavine octene kiseline i izooktana (3:2, V:V). U otopinu se doda 0,5 mL zasićene vodene otopine kalij jodida nakon čega se tikvica začepi i miješa točno 1 minutu. Reakcija se prekida dodatkom 30 mL vode nakon čega se oslobođeni jod titrira otopinom natrij tiosulfata uz 0,5 mL otopine škroba kao indikatora i snažno mućkanje. Prije analize uzorka potrebno je odrediti utrošak natrijeva tiosulfata za slijepu probu.

Peroksidni broj se izražava u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, a izračunava se prema izrazu [2].

$$PB = \frac{(V_1 - V_2) * 5}{m} \qquad [2]$$

gdje je:

V_1- volumen standardizirane otopine natrijeva tiosulfata utrošen za titraciju uzorka, izražen u mL

V_0- volumen standardizirane otopine natrijeva tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe, izražen u mL

m- masa analiziranog ulja, izražen u g

3.2.3. Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području

Uzorak je pripremljen i analiziran metodom propisanom hrvatskom normom za određivanje apsorbancije u ultraljubičastom spektru izraženih kao specifična UV ekstinkcija koja se koristi za životinjske i biljne masti i ulja (HRN EN ISO 3656, 2011).

Od pripremljenog homogenog uzorka, bez nečistoća odvaže se 0,1 g u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se zatim do oznake napuni s izooktanom spektrofotometrijske čistoće, koji se odlikuje propusnošću emitiranog zračenja od najmanje 60% pri 220 nm te najmanje 95% pri 250 nm u odnosu na destiliranu vodu. S priređenom otopinom napuni se kvarcna kiveta s duljinom prolaza zrake 1 cm te se mjere ekstinkcije pri valnim duljinama od 232 nm do 276 nm.

Koeficijenti ekstinkcije pri raznim valnim duljinama računaju se prema izrazu [3].

$$K_\lambda = \frac{E_\lambda}{c*s} \quad [3]$$

gdje je:

K_λ-specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ

E_λ-izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini λ

c- koncentracija otopine u g $(100\ mL)^{-1}$

s- duljina puta zrake u cm

Izračunavanje vrijednosti ΔK provodi se prema izrazu [4].

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4}+K_{m+4}}{2} \quad [4]$$

gdje je:

K_m - specifična ekstinkcija pri valnoj duljini m tj. valnoj duljini oko 270 (±2) nm na kojoj je zabilježen max. apsorbancije

3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju

Polifenoli su određeni prema modificiranoj metodi međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2009). Metoda se temelji na direktnoj ekstrakciji polarnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja pomoću metanolne otopine i kvantifikaciji korištenjem HPLC-a uz UV detekciju.

U epruvetu od 15 mL izvaže se 4 g djevičanskog maslinovog ulja. U epruvetu se doda se 5 mL otopine metanol:voda 80:20 (V:V) te se otopina promiješa točno 1 minutu. Fenoli se ekstrahiraju u ultrazvučnoj kupelji pri sobnoj temperaturi kroz 15 minuta i zatim hidrofobni dio od ulja odvoji centrifugiranjem pri 5000 o min^{-1} kroz 25 minuta. Alikvot supernatanta profiltrira se kroz 0,2 µm PVDF filter i 5 µL pripremljenog ekstrakta injektira se u HPLC sustav.

Određivanje fenolnih spojeva je provedeno na C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na Agilent Technologies HPLC 1200 Series sustav s binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom. Analiza je provedena pri 30°C, sa stalnim protokom otapala od 0,9 mL min^{-1}. Za razdvajanje fenolnih spojeva korištena je gradijentna kromatografija prema eluacijskom gradijentu prikazanom u tablici 2.

Tablica 2. Eluacijski gradijent za određivanje polifenola:

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

Otopina A – 0,1% mravlja kiselina u vodi; otopina B – 0,1% mravlja kiselina u metanolu

Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su na 280, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom djelu spektra (od 200 do 400 nm). Spektri komercijalno dostupnih standarada fenolnih spojeva (galna kiselina, hidroksitirosol, protokatehinska kiselina, tirosol, 4-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, vanilin, *p*-kumarinska kiselina, sinapinska kiselina, *trans*-cimetna kiselina, klorogenska kiselina, kavska kiselina, siringaldehid, ferulinska kiselina, oleuropein, kvercetin i pinoresinol) korišteni su za izradu interne knjižnice UV spektara. Identifikacija fenolnih spojeva analiziranog maslinovog ulja provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja korištenih standarada, te usporedbom njihovih spektara s onima iz knjižnice.

Koncentracije detektiranih polifenolnih spojeva izračunata je koristeći baždarnu krivulju tirosola koristeći formule [5] i [6].

$$x = \frac{\mathrm{A}+0{,}5151}{0{,}6050} \qquad [5]$$

gdje je:

x – koncentracija fenolnog spoja u analiziranom ekstraktu (mg mL^{-1})

A – površina ispod pika fenolnog spoja

$$Konc.\,fenolnog\,spoja = \frac{x \cdot 5}{m} \qquad [6]$$

gdje je:

x – koncentracija fenolnog spoja u analiziranom ekstraktu (mg mL^{-1})

m – masa uzorka uzetog za analizu u g

3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH• metodom

Antioksidacijska aktivnost određivana je metodom koju su prethodno opisali Kalantzakis i suradnici (2006).

1 mL otopine ulja u etil-acetatu (10% m V^{-1}) doda se u 4 mL otopine DPPH˙ u etil-acetatu tako da koncentracija DPPH˙ u reakcijskoj smjesi bude 0,0001 mol L^{-1}. Otopina se snažno protrese te se ostavi u mraku 30 minuta. Istovremeno se pripremi slijepa proba sačinjena od 4 mL etil-acetata i 1 mL ulja. Reakcijskoj smjesi mjeri se apsorbancija na 515 nm u nultoj i u tridesetoj minuti koristeći spektrofotometar.

Prije provođenja analiza izrađen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o molarnoj koncentraciji DPPH˙ od 0,001 do 0,1 mol L^{-1}, pomoću kojeg se u uzorcima određuje koncentracija DPPH˙.

$$x = \frac{(y-0{,}0009)}{11{,}27} \qquad [7]$$

gdje je:

x = koncentracija DPPH˙(mmol L^{-1})

y = apsorbancija otopine izmjerena na 515 nm

Iz izračunatih koncentracija, izračunat je i % redukcije koncentracije DPPH˙ radikala prema izrazu [8]:

$$\%\ red\ DPPH^{\bullet} = 100 \cdot \left(1 - \frac{[DPPH^{\bullet}]_{30}}{[DPPH^{\bullet}]_{0}}\right) \qquad [8]$$

gdje je:

$[DPPH^{\cdot}]_{30}$ = koncentracija DPPH˙ u tridesetoj minuti (mmol L^{-1}),

$[DPPH^{\cdot}]_{0}$ = koncentracija DPPH˙ u nultoj minuti (mmol L^{-1})

4.REZULTATI I RASPRAVA

Djevičansko maslinovo ulje poznato je po svojoj visokoj nutritivnoj vrijednosti i dobroj oksidacijskoj stabilnosti, međutim nepravilnim skladištenjem i čuvanjem dolazi do pojave kvarenja. Veliku ulogu u brzini kvarenja igra i odabir ambalaže za skladištenja. U literaturi se za čuvanje ulja predlaže se inertna ambalaža koja će zaštititi ulje od zraka i svijetlosti. Stoga je cilj ovog završnog rada bio odrediti utjecaj ambalažnog materijala na kvalitetu i oksidacijsku stabilnost ulja.

Za skladištenje ulja korištene su boce od 250 mL od zelenog i prozirnog stakla te polietilena (PET). U uzorcima ulja prije i nakon skladištenja na svijetlu i pri sobnoj temperaturi određen je udio ukupnih polifenola HPLC metodom uz UV detekciju i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Osim toga, određeni su i osnovni parametri kvalitete kako bi uzorak mogli svrstati u jednu od kategorija djevičanskog maslinovog ulja.

Maslinovo ulje, ovisno o načinu proizvodnje i o samoj kvaliteti proizvoda može biti svrstano u nekoliko kategorija. Ako se radi o djevičanskom maslinovom ulju ono se na tržište može stavljati kao ekstra djevičansko ili kao djevičansko maslinovo ulje. Kategoriju ulja određuju brojni parametri koji ukazuju na hidrolitičke i oksidacijske procese koji se odvijaju u plodu i tijekom tehnološkog postupka prerade, ali i u ulju tijekom skladištenja. Također, legislativom su propisani brojni parametri kojima se utvrđuje autentičnost ulja (Angerosa, 2002).

Tablica 3. Osnovni parametri kvalitete djevičanskog maslinovog ulja

Uzorak	SMK (% oleinske kiseline)	Peroksidni broj (mmol O_2 kg^{-1})	K brojevi		
			K_{232}	K_{270}	ΔK
Početni uzorak	0,2	3,37	1,75	0,12	0,00
Zeleno staklo	0,2	10,29	1,53	0,14	0,00
Prozirno staklo	0,2	6,56	1,63	0,17	0,00
PET	0,2	8,51	1,81	0,19	0,00

Osnovni parametri kvalitete analiziranog djevičanskog maslinovog ulja prije i nakon skladištenja prikazani su u tablici 3. Dobiveni rezultati uspoređeni su s vrijednostima propisanima Uredbom europske komisije 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina. Treba napomenuti kako senzorska analiza ulja, koju provodi stručni panel, nje odrađena.

Ulja proizvedena iz zdravih plodova, bez obzira na sortu, ako su prerađena neposredno nakon berbe, pokazuju vrlo nizak udio slobodnih masnih kiselina. Ali ako su plodovi bili oštećeni ili podvrgnuti produljenom čuvanju prije prerade, hidrolitički enzimi postaju aktivni i udio slobodnih masnih kiselina raste (Koprivnjak, 2006).

Udio slobodnih masnih kiselina u početnom uzorku djevičanskog maslinovog ulja iznosio je 0,2%. Ta se vrijednost zadržala i nakon skladištenja u svim uzorcima. Dobiveni podaci označavaju da je postupak odvajanja ulja od vode u procesu ekstrakcije dobro proveden, te da hidrolitički enzimi nisu bili u doticaju s triacilglicerolima. Uredbom 2568/91 maksimalna propisana vrijednost za ekstra djevičanska maslinova ulja iznosi 0,8 %, što nam govori da uzorak ulja zadovoljava kriterije za navedenu kategoriju i nakon skladištenja.

Do značajnog oksidacijskog kvarenja ulja dolazi tijekom skladištenja ulja, ali ono može biti ubrzano zbog izloženosti ulja zraku, svjetlu i toplini. Procjena stupnja oksidacije maslinovog ulja temelji se na određivanju primarnih i sekundarnih produkata oksidacije. Primarni stupanj oksidacije odnosi se na stvaranje hidroperoksida iz višestruko nezasićenih masnih kiselina kroz radikalni mehanizam. Hidroperoksidi su nestabilne molekule koje se vrlo brzo razgrade na sekundarne produkte reakcije koje uljima daju miris užegnutog (Koprivnjak, 2006).

U početnom uzorku određen je peroksidini broj (PB) 3,37 mmol O_2 kg^{-1} što govori da je vrijednost unutar granica za kategoriju ekstra djevičanskog maslinovog ulja, propisanih Uredbom 2568/91, odnosno manji je od 10 mmol O_2 kg^{-1}. U svim se uzorcima nakon skladištenja PB povećao. Za ulje skladišteno u tamnom staklu iznosi 10,29 mmol O_2 kg^{-1}, u prozirnom staklu 6,56 mmol O_2 kg^{-1} a u plastičnoj ambalaži 8,51 mmol O_2 kg^{-1}. Iz rezultata možemo zaključiti da je došlo do značajnog oksidacijskog kvarenja u svim uzorcima. Ipak, za zeleno staklo uočavamo nelogičnosti s obzirom na očekivane rezultate. U ulju skladištenom u zelenom staklu određen je PB koji je viši od vrijednosti utvrđenih u preostale dvije ambalaže. Moguće objašnjenje je nastajanje primarnih produkata oksidacije koji se nisu uspjeli razgraditi, stoga je PB ostao značajno visok. Kako lipidi oksidiraju, oni tvore hidroperokside, koji su podložni daljnjoj oksidacije ili razgradnji u sekundarne produkte reakcije kao što su aldehidi, ketoni, kiseline i alkoholi koji se ne mogu odrediti primijenjenom metodom. U mnogim slučajevima, ovi spojevi negativno utječu na aromu, okus, nutritivnu vrijednost i ukupnu

kvalitetu (Vercellotti i sur., 1992). U ostala dva uzorka nakon skladištenja PB je niži a mogući razlog je nastajanja navedenih sekundarnih produkata oksidacije.

Kao dodatni pokazatelj stupnja oksidacijskog kvarenja provodi se i mjerenje specifičnih apsorbancija, označenih kao K vrijednosti. Mjere se u UV području pri valnim duljinama koje odgovaraju najvećoj apsorpciji konjugiranih diena i triena. Kao što je već istaknuto, oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do stvaranja konjugiranih diena i hidroperoksida, kao primarnih produkata reakcije koji pokazuju svoj maksimum pri 232 nm, a sekundarni produkti oksidacije na 270 nm (Koprivnjak, 2006).

Uredbom 2568/91 propisano je da K_{232} za ekstra djevičanska maslinova ulja mora biti manji ili jednak 2,50. Nadalje, vrijednost K_{270} za ekstra djevičanska maslinova ulja iznosi 0,22 a gornja granica za ΔK je 0,01 za ekstra djevičanska maslinova ulja. Sve K vrijednosti ulaze unutar navedenih granica za ekstra djevičanska maslinova ulja.

Iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da se skladištenjem K_{232} smanjuje za zeleno i prozirno staklo, dok za PET ambalažu raste u odnosu na početni uzorak ulja. Smanjenje vrijednosti K_{232} može se objasniti raspadanjem primarnih produkata oksidacije na sekundarne koji se detektiraju na valnom duljinama oko 270 nm. K_{270} nakon skladištenja raste u svim uzorcima ali ipak najveće povećanje uočavamo u PET ambalaži. Uspoređujući sve tri ambalaže zaključujemo da PET ambalaža ima najlošije karakteristike u odnosu na staklo.

Tablica 4. Sastav i udjel polifenola djevičanskog maslinovog ulja prije i nakon skladištenja

Fenolni spoj (mg kg^{-1} ulja)	Početni uzorak	Zeleno staklo	Prozirno staklo	PET
Hidroksitirosol	23,84	39,48	40,28	28,70
Tirosol	23,45	29,45	29,26	26,04
Aglikoni oleuropeina	938,63	889,18	924,13	911,60
Grupa sekoiridoida	68,48	56,74	61,33	65,13
Luteolin	42,09	69,42	38,40	37,00
Nije identificirano	120,48	72,16	54,24	61,36
UKUPNO	1216,98	1156,43	1147,6	1129,83

Djevičanska maslinova ulja razlikuju se po koncentraciji ukupnih polifenola. Ti su rasponi najčešće od 50-1000 mg kg^{-1} ali vrijednosti su obično između 100 i 300 mg kg^{-1} (Tsimidou, 1998). Udio ukupnih polifenola u početnom uzorku iznosio je 1216,98 mg kg^{-1} što je više od navedenog raspona (Tablica 4). Sorta, stupanj zrelosti ploda, sustav ekstrakcije i uvjeti prerade su kritični čimbenici koji utječu na konačnu koncentraciju ukupnih polifenola u ulju (Cinquanta i sur., 1997). Visoka koncentracija polifenola u uzorku može se objasniti ranom berbom maslina u kojima se sadržao veliki udio polifenola i način prerade plodova prešanjem i centrifugalnom ekstrakcijom u dvije faze uz minimalno dodavanje vode. Najveći udio polifenola u uzorku prije skladištenja pripada grupi aglikona oleuropeina, nešto manji udio grupi sekoiridoida a slijede luteolin, tirosol i hidroksitirosol. Osim identificiranih, u uzorku oko 10% polifenola nije identificirano (Tablica 4).

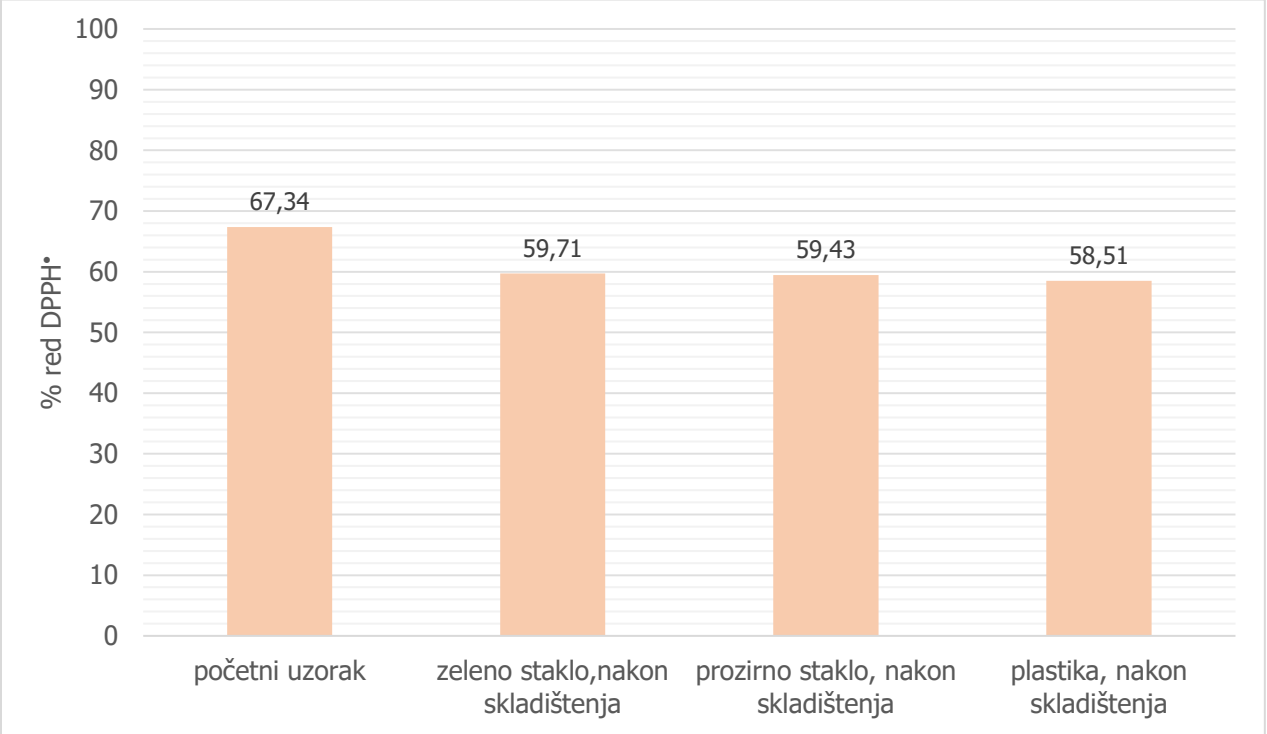
Uspoređujući koncentracije pojedinih polifenola, uviđamo nepravilnosti. Tako npr. koncentracija tirosola u početnom uzorku iznosila je 23,45 mg kg^{-1}, a u uzorcima nakon skladištenja iznosila je 29,45 mg kg^{-1} za zeleno staklo, 29,26 mg kg^{-1} za prozirno staklo i 26,04 mg kg^{-1} za PET. Ipak, rezultati su u skladu s onima koje navode Cinquanta i sur. (1997). Tipičan trend porasta i pada koncentracije tirosola objašnjen je hidrolizom kompleksnih fenolnih spojeva na jednostavnije spojeve, vjerojatno zbog djelovanja viših temperatura tijekom kratkotrajnog skladištenja (Cinquanta i sur., 1997). Ipak, isti autori su dokazali da se nakon duljeg vremenskog perioda skladištenja (12 i 18 mjeseci) taj udio smanjuje.

Smanjenje koncentracije nakon skladištenja bilo je značajnije za derivate sekoiridoida što ukazuje na njihovo aktivno sudjelovanje u početnim oksidacijskim procesima te njihovim raspadom na jednostavnije polifenole. Antioksidacijska aktivnost tih spojeva već je bila dokazana brojnim radovima (Baldioli i sur., 1996), te je utvrđena i dobra korelacije s oksidacijskom stabilnošću ulja (Tovar i sur., 2001).

U literaturi se navodi kako se, ovisno o trajanju skladištenja djevičanskog maslinovog ulja, koncentracija ukupnih polifenola smanjuje. Razlog smanjenja koncentracije ukupnih polifenola nakon duljeg skladištenja je rezultat oksidacije i hidrolitičke aktivnosti koja raste tijekom tog razdoblja (Angerosa i sur., 1995).

Tijekom tromjesečnog skladištenja, udio fenolnih spojeva prisutnih u manjim koncentracijama ne smanjuje se značajno. Koncentracija ukupnih polifenola u ulju skladištenom u zelenom staklu iznosila je 1156,43 mg kg^{-1}, u prozirnom staklu 1147,6 mg kg^{-1} a u PET ambalaži 1129,83 mg kg^{-1}. Iz rezultata zaključujemo da je koncentracija ukupnih polifenola najviša u uzorku skladištenom u zelenom staklu, a smanjuje se za prozirno staklo i plastiku. Dobiveni rezultati u dobroj su korelaciji s antioksidacijskom aktivnošću određenom DPPH metodom. Najveću antioksidacijsku aktivnost zadržao je uzorak

skladišten u zelenom staklu a najmanju aktivnost pokazuje uzorak ulja skladišten u plastičnoj ambalaži. No rezultati pokazuju kako nema značajne razlike u koncentraciji ukupnih polifenola i u antioksidacijskoj aktivnosti nakon čuvanja ne razlikuju značajno za različite ambalaže.



Slika 5. Antioksidacijska aktivnost uzoraka djevičanskog maslinovog ulja

Glavni mehanizam djelovanja fenolnih antioksidansa smatra se da je uklanjanje slobodnih radikala doniranjem vodikovog atoma. Antioksidansi prisutni u maslinovom ulju s 1,1-dipfenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·) radikalom stvaraju stabilan kompleks te na taj način utječu na izbjeljivanje otopine ulja i radikala koje se detektira spektrofotometrijski. Protokol treba uključiti najmanje 20-minutni period reakcije i prilagođen omjer uzorka i radikala koji omogućuje postizanje 60-80% antioksidcijske aktivnosti za najsnažniji antioksidans (Nenadis i Tsimidou, 2002). Test se temelji na smanjenju apsorbancije otopine nakon reakcije.

Početni uzorak maslinovog ulja prije skladištenja pokazuje visoki udio od 67.34 % red DPPH·, što je u navedenom intervalu koji opisuje pravilno provedenu metodu. Ulje čuvano u staklenoj tamnoj ambalaži pokazuje antioksidacijsku aktivnost od 59.71 % red DPPH·, u staklenoj prozirnoj ambalaži 59.43 % red DPPH·, dok najlošiji rezultat pokazuje ulje skladišteno u PET ambalaži, svega 58.51 % red DPPH·, što možemo vidjeti iz grafičkog prikaza (Slika 5). Rezultati pokazuju da se antioksidacijska aktivnost maslinovog ulja smanjuje tijekom skladištenja i da ovisi o materijalu u kojoj je uzorak skladišten. Dobivene vrijednosti o smanjenju atioksidacijske aktivnosti tijekom skladištenja djevičanskog maslinovog ulja u skladu

su rezultatima koje navode Irmak i suradnici (2017). Isti autori navode da se antioksidacijska aktivnost značajnije smanjuje tijekom skladištenja ulja kroz 8 mjeseci nego nakon 4 mjeseca.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Na temelju fizikalno kemijskih parametara kvalitete, analizirano početno ulje možemo uvrstiti u kategoriju ekstra djevičanskih ulja prema Uredbi 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina.
2. Koncentracija ukupnih polifenola u ulju prije skladištenja iznosila je 1216,98 mg kg^{-1}, dok je antioksidacijska aktivnost istog tog uzorka iznosila 67.34 % red $DPPH^{\cdot}$.
3. Nakon skladištenja od 3 mjeseca, u uzorcima nije došlo do hidrolitičkog kvarenja, a parametri oksidacijskog kvarenja bili su povećani su svim skladištenim uzorcima. Uje skladišteno u staklenoj ambalaži sadržavalo značajno je više primarnih produkata oksidacije dok je ono skladišteno u PET ambalaži sadržavalo značajnije količine sekundarnih produkata oksidacije.
4. Koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost ulja najveća je u ulju skladištenom u zelenom staklu, dok je za PET ambalažu ta koncentracija nešto niža, no razlika nakon tromjesečnog skladištenja nije značajna.

6. LITERATURA

Amelotti G. (1985) Problematiche inerenti la valutazione della frazione sterolica*. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* **62**: 337 – 344.

Angerosa F., d'Alessandro N., Konstantinou P., Di Giacinto L. (1995) GC–MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 1802 – 1807.

Angerosa F. (2002) Influence of Volatile Compounds on Virgin Olive Oil Quality Evaluated by Analytical Approaches and Sensory Panels. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**: 639 - 660.

Aparicio R., Harwood J. (2013) Handbook of Olive Oil, 2.izd, Springer.

Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G. F. (1996) Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society* **11**: 1589 – 1593.

Boskou D. (2006) Olive oil: chemistry and technology, 2.izd, American Oil Chemists' Society.

Boskou D., Morton I. (1975) Changes in the Sterol Composition of Olive Oil on Heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **26**: 1149 – 1153.

Calapaj R., Chiricosta S., Saija G., Biovona V. (1993) Evaluation of Gas Chromatographic and Spectrophotometric Analytical Results to Check the Presence of Seed Oils in Olive Oil Samples. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* **70**: 585 – 594.

Castle L., Mercer A.J., Gilbert J. (1991) Migration from plasticized films into Foods. 5. Identification of individual species in a polymeric plastisizer and their migration into foods. *Food Additives and Contaminants* **8**: 565 – 576.

Cinquanta L., Esti M., La Notte E. (1997) Evolution of Phenolic Compounds in Vergin Olive Oil During Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**: 1259 – 1264.

De Leonardis A., Macciola V. (1998) Evaluation of the shelf-life of virgin olive oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **8-9:** 391 – 396.

Di Giovacchino L., Mucciarella M. R., Costantini N., Ferrante M.L., Surricchio G. (2002) Use of Nitrogen to Improve Stability of Virgin Olive Oil During Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **4**: 339 – 344.

Endo Y., Usuki R., Kaneda T. (1984) Prooxidant Activities of Chlorophylls and Their Decomposition Products on the Photo-oxidation of Methyl Linoleate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**: 781 – 784.

Feussner I., Kühn H., Wasternack C. (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plants Science* **6**: 268 – 273.

Frankel E.N. (1962) Hydroperoxides. U: Symposium on foods: lipids and their oxidation, Schultz H.W., Day E.A., Sinnhuber R.O., ur., AVI Publishing Co. Str. 51–78.

Grob K., Lanfranchi M.L., Mariani C. (1990) Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **67**: 626 – 634.

HRN EN ISO 660:2010, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti.

HRN EN ISO 3656:2011, Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje apsorbancija u ultraljubičastom spektru izraženih kao specifična UV ekstinkcija.

HRN EN ISO 3960:2010, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje peroksidnog broja.

IOC (2009) COI/T.20/Doc.29 - Determination of biophenols in olive oils by HPLC. IOC - International Olive Oil Council, <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods> Pristupljeno 26. siječnja 2017.

IOC (2015) COI/T.15/NC No 3/Rev. 8 -Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. IOC – International Olive Oil Council < http://www.internationaloliveoil.org/estaticos /view/224-testing-methods> Pristupljeno 26. lipnja 2017.

Irmak Ş., Kadiroğlu P., Ötleş S. (2017) Evaluation of Olive Preservation Methods on Bioactive Constituents and Antioxidant Properties of Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **94**: 595 – 609.

Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. (1973a) Sterol Composition of 19 Vegetable Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **50**: 122 – 125.

Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. (1973b) Sterol Composition of 19 Vegetable Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **50**: 300 – 303.

Itoh T., Yoshida K., Yatsu T., Tamura T., Matsumoto T., Spencer G. F. (1981) Triterpene Alcohols and Sterols of Spanish Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **58**: 545 – 550.

Kalantzakis G., Blekas G., Pegklidou K., Boskou D. (2006) Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **4**: 329 – 335.

Kanavouras A., Hernandez-Munoz P., Coutelieris F. A. (2006) Packaging of Olive Oil: Quality Issues and Shelf Life Predictions. *Food Reviews International* **22**: 381 – 404.

Kiritsakis A.K., Dugan L.R. (1985) Studies in photooxidation of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **62**: 892 – 896.

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

Lanzón A., Albi T., Cert A. Gracian J. (1994) The Hydrocarbon Fraction of Virgin Olive Oil and Changes Resulting From Refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**: 285 – 291.

Mastrobattista G. (1990) Effect of light on extra virgin olive oils in different types of glass bottles. *Italian Journal of Food Science* **3**: 191 – 195.

Minguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B., Garrido-Fernandez J., Gallardo-Guerrero L. (1990) Pigments Present in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **3**: 192 – 196.

Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E. (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1.Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 1571 – 1576.

Morelló J., Motilva M., Tovar M., Romero M. (2004) Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry* **85**: 357 – 364.

Nenadis N., Tsimidou M. (2002) Observations on the Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using Rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) Tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**: 1191 – 1195

Nousis L., Doulias P. T., Aligiannis N. S. (2005). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Research* **39**, 787 – 795.

Pokorny J., Korczak J., Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001) Antioxidants in food, CRC Press, str 311 - 330.

Ranalli A., Angerosa F. (1996) Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 417 – 422.

Rawls H.R., Van Santen P.J. (1970) A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **47**: 121 – 124.

Roca M., Mínguez-Mosquera M.I. (2001) Change in the Natural Ratio Between Chlorophylls and Carotenoids in Olive Fruit During Processing for Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**: 133 – 138.

Romero C., García P., Brenes M. (2002) Phenolic Compounds in Natural Black Spanish Olive Varieties. *European Food Research and Technology* **215**: 489 - 496.

Sayago A., Marín M.I., Aparicio R., Morales M.T. (2007) Vitamin E and vegetable oils. *Grasas y Aceites* **58**: 74 – 86.

Servili, M., Selvaggini R., Esposto S. (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurence in the oil. *Journal of Chromatography A* **1054**: 27 – 113.

Servili M., Esposto S., Fabiani R., Urbani S., Taticchi A., Mariucci F., Selvaggini R., Montedoro G. F. (2009) Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* **17**: 76 – 84.

Šimić M. G., Jovanovic S.V., Etsuo N. (1992) Mechanisms of Lipid Oxidative Processes and Their Inhibition. U: Lipid Oxidation in Food, St. Angelo A.J. ur., American Chemical Society. str. 14–32.

Tawfik M.S., Huyghebaert A. (1999) Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chemistry* **64**: 451 – 459.

Tovar M. J., Motilva M. J., Romero M.P. (2001) Changes in the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil from Young Trees (Olea europea L. cv. Arbequina) Grown under Linear Irrigation Strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5502 - 5508.

Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews* **18**: 98 – 112.

Tsimidou M. (1998) Polyphenols and Quality of Virgin Olive Oil in Retrospect. *Italian Journal of Food Science* **10**: 99 – 116.

Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D. (1992) Phenofic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chemistry* **45**: 141 – 144.

Uredba komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te odgovarajućim metodama analize (1991) *Službeni list Europske Unije* **248**, Strasbourg.

Vercellotti J.R., St. Angelo A.J., Spanier A.M. (1992) Lipid oxidation in food: an overview. U: Lipid oxidation in foods, St. Angelo A.J., ur., American Chemical Society. str. 1–11

Vergnaud J.M. (1998) Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical exchange, recycling. *Advances in Colloid and Interface Science* **78**: 267 – 297.

Žanetić M., Gugić M. (2005) Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. *Pomologia Croatica* **1-2**: 31 – 41.

Žanetić M., Gugić M. (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica* **2**: 159 -173.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonija Brajković

ime i prezime studenta