

Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na sastav hlapljivih spojeva djevičanskog maslinovog ulja

Smajić, Edina

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:159:984480>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Edina Smajić

**UTJECAJ UBRZANOG
TOPLINSKOG TRETMANA NA
SASTAV HLAPLJIVIH 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.

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 HLAPLJIVIH SPOJEVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Edina Smajić, dipl.sanit.ing., 1003021841

Sažetak: Aroma maslinovog ulja sastoji se od složene mješavine hlapljivih spojeva nastale iz višestruko nezasićenih masnih kiselina lipoksigenaznim putem. Sastav hlapljivih spojeva u maslinovom ulju ovisi o sorti, stupnju zrelosti plodova i uvjetima prerade. Cilj rada je istražiti utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana kao predtretmana miješenju na sastav hlapljivih komponenata djevičanskog maslinovog ulja. Za potrebe istraživanja korištene su 4 autohtone hrvatske sorte maslina: istarska bjelica, oblica, rosulja i levantinka. Također, usporedilo se korištenje toplinskog tretmana i ubrzanog toplinskog tretmana kod sorte oblica, odnosno utjecaj odabranog tretmana na nastanak poželjnih (spojevi nastali lipoksigenaznim putem) i nepoželjnih (produkti oksidacije) spojeva te je na temelju rezultata predložen optimalni toplinski tretman.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje, ubrzani toplinski tretman, hlapljivi spojevi, lipoksigenazni put, oksidacija

Rad sadrži: 44 stranica, 8 slika, 4 tablica, 38 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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Sandra Balbino (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujna 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 HEAT TREATMENT ON THE VOLATILE PROFILE OF VIRGIN OLIVE OIL

Edina Smajic, dipl.sanit.ing., 1003021841

Abstract: The aroma of olive oil consists of a complex mixture of volatile compounds, formed from polyunsaturated fatty acids via lipoxygenase pathway. The composition of these volatile compounds in olive oil is subject to variation based on the olive variety, stage of fruit ripening, and processing conditions. The aim of this study is to investigate the impact of flash thermal treatment as a pre-treatment of the malaxation process on the volatile components of virgin olive oil. In order to conduct this research, four indigenous Croatian olive varieties, namely Istarska Bjelica, Oblica, Rosulja, and Levantinka, were employed. Furthermore, the application of thermal treatment and flash thermal treatment was analyzed in the Oblica variety. Specifically, the study examines the effects of these treatments on the formation of desirable (compounds produced by lipoxygenase) and undesirable (oxidation products) compounds, and based on the findings, recommends an optimal heat treatment.

Keywords: virgin olive oil, flash thermal treatment, volatile compounds, lipoxygenase pathway, oxidation

Thesis contains: 44 pages, 8 figures, 4 tables, 38 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

Reviewers:

1. Sandra Balbino, PhD, Full Professor (President)
2. Dubravka Škevin, PhD, Full Professor (Mentor)
3. Marko Obranović, PhD, Associate Professor (Member)
4. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate Professor (Substitute)

Thesis defended: September 22nd, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Nutritivna važnost djevičanskog maslinovog ulja	2
2.2. Izazovi vezani uz proizvodnju	3
2.3. Nusproizvodi proizvodnje	4
2.4. Inovativne tehnike u proizvodnji	5
2.5. Čimbenici utjecaja na kvalitetu ulja i sastav hlapljivih spojeva	6
2.6. Primjena ubrzanog toplinskog tretmana.....	9
2.7. Alternativni pristup provođenju ubrzanog toplinskog tretmana	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Materijali.....	15
3.2. Metode	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Mnoga istraživanja bave se utjecajem tehnoloških operacija prerade maslina (drobljenje i miješenje) koje imaju presudnu ulogu u određivanju prinosa i kvalitete ulja. Ovim eksperimentalnim radom, istražen je utjecaj uporabe toplinskog i ubranog toplinskog procesa na nastanak hlapljivih komponenti djevičanskog maslinovog ulja. Dok se razlike u okusima djevičanskog maslinovog ulja prvenstveno pripisuju fenolnim spojevima, utvrđeno je da su hlapljivi spojevi, odnosno, složena mješavina hlapljivih spojeva odgovorni za razvitak arome. Biosinteza hlapljivih spojeva arome direktno je ovisna o enzimskom potencijalu pojedinih sorti maslina koji je zapravo genetski uvjetovan, a počinje u trenutku razbijanja stanica tijekom drobljenja plodova masline. Nastavlja se tijekom miješenja tijesta masline, a odvija se u sklopu lipoksigenaznog puta gdje od višestruko nezasićenih masnih kiselina nastaju C6 i C5 hlapljivi spojevi, aldehidi i esteri. Prema prethodno utvrđenim saznanjima, raznolikost sorti maslina smatra se jednim od najvažnijih čimbenika, a stupanj sazrijevanja plodova i uvjeti prerade su također čimbenici koji značajno utječu na sastav hlapljivih spojeva te senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. (Brkić Bubola i sur., 2012). Obzirom na nebrojene zdravstvene efekte na ljudski organizam, pristupačnost i dostupnost, djevičansko maslinovo ulje drži primat među uljima dobivenim isključivo mehaničkim postupcima. Povećana potražnja za djevičanskim maslinovim uljem ne podrazumijeva samo potrebu za povećanom proizvodnjom, već podrazumijeva i potrebu za kontinuiranim unapređenjem proizvoda. Djevičansko maslinovo ulje je svakako ulje izbora uzimajući zdravstvene benefite koje konzumacija istog donosi. Usklađivanje parametara proizvodnje koji bi omogućili optimiziranje i iskorištavanje proizvodnog procesa, uz iskorištavanje genetski uvjetovanih potencijala ploda masline, omogućuje modifikaciju senzorskih karakteristika i prilagodbu krajnjeg proizvoda različitim potrošačkim grupama.

Cilj rada istražiti je utjecaj ubranog toplinskog tretmana kao predtretmana miješenju na sastav hlapljivih komponenata djevičanskog maslinovog ulja. Za potrebe istraživanja korištene su četiri autohtone hrvatske sorte maslina: istarska bjelica oblica, rosulja i levantinka. Također, usporedilo se korištenje toplinskog tretmana i ubranog toplinskog tretmana kod sorte oblica, odnosno utjecaj odabranog tretmana na nastanak poželjnih (spojevi nastali lipoksigenaznim putem) i nepoželjnih (produkti oksidacije) spojeva te je na temelju rezultata predložen optimalni toplinski tretman.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUTRITIVNA VAŽNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Nekadašnja potraga za zlatom, u današnje vrijeme, istovjetna je potrazi za zdravljem. Upravo u tom segmentu ubrzanih života današnjice, potraga za zdravljem vodi nas djevičanskom maslinovom ulju. Nebrojene studije ukazuju na sveobuhvatnu dobrobit konzumacije maslinovog ulja, pogotovo djevičanskog maslinovog ulja. Isto potvrđuju rezultati kohortnog istraživanja provedenog u Španjolskoj tijekom desetogodišnjeg perioda. Rezultati istraživanja zaključuju povezanost dnevne konzumacije djevičanskog maslinovog ulja sa čak upola manjim rizikom smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti te za jednu trećinu nižim rizikom smrtnosti od ostalih uzroka. Blagotvorni učinci djevičanskog maslinovog ulja na zdravlje rezultat su, među ostalim, bogatstva bioaktivnih spojeva različitih učinaka. Ističe se antitumorski učinak gdje dolazi do izražaja djelovanje fenola na inhibiciju proliferacije i promicanja apoptoze kod različitih tumorskih staničnih linija. Nadalje, djevičansko maslinovo ulje pokazalo je kardioprotektivne i protuupalne učinke, blagotvorno djelovanje na crijevnu mikrobiotu, kalcifikaciju i mineralizaciju kostiju, metabolizam lipida i glukoze, krvni tlak i sustave zgrušavanja krvi, i smanjenje oksidativnog stresa (Donat-Vargas C i sur., 2023). Nutritivna važnost djevičanskog maslinovog ulja očituje se i u visokim razinama oleinske, prisutnosti linolne kiseline, α -linolenske kiseline i tokoferola. Uzimajući isto u obzir, Garcia i suradnici (2023) ističu superiornost djevičanskog maslinovog ulja u odnosu na druga prehrambena ulja i masti čemu je svakako pridonijela i činjenica da djevičansko maslinovo ulje jedino sadrži polifenol hidroksitirozol u koncentracijama dostatnim da bi pokazale učinak na zdravlje. Naime, Europska agencija za sigurnost hrane potvrdila je doprinos djelovanja hidroksitirozola na zaštitu lipida u krvi od oksidativnog oštećenja uz preporuku o konzumaciji 5 mg hidroksitirozola i njegovih derivata (npr. oleuropein kompleks i tirozol) u maslinovom ulju dnevno (EFSA, 2011). Uz navedeno, zabilježena je učinkovitost djevičanskog maslinovog ulja na dugoročno upravljanje težinom kao i sam proces mršavljenja. Dijeta koja uključuje dnevno tri do četiri žlice djevičanskog maslinovog ulja može doprinijeti većem gubitku težine za razliku od dijete s niskim udjelom masnoća dok omogućuje veći ukupni unos energije za ekvivalentan gubitak težine. Poznat je i utjecaj djevičanskog maslinovog ulja na smanjeni rizik od metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2, kao i na poboljšanje osjetljivosti na inzulin (Flynn i sur., 2023).

Zaključno, djevičansko maslinovo ulje ukomponirano u dnevnu prehranu, predstavlja zaštitni faktor za ljudsko zdravlje na više razina stoga nije čudno da je, slijedeći svjetske trendove gdje je naglasak na prevenciji nezaraznih bolesti i unapređenju zdravlja i kvalitete života, potražnja za kvalitetnim djevičanskim maslinovim uljem stalno u porastu.

2.2. IZAZOVI VEZANI UZ PROIZVODNJU

Kako bi industrija odgovorila zahtjevima tržišta gdje je zabilježen porast sklonosti potrošača visokokvalitetnom djevičanskom maslinovom ulju upravo zbog blagotvornih i senzorskih svojstava koja se pripisuju višem sadržaju fenolnih i hlapljivih spojeva, proučavaju se različite mogućnosti unapređenja proizvodnje (Perez i sur., 2021).

Tradicionalna postrojenja za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja glomazna su i spora, karakterizira ih diskontinuiran i nizak kapacitet napajanja kao i činjenica da ovakav sustav ne dopušta pravilan proces pranja maslina što je važan korak u osiguranju sigurnosti i kvalitete proizvoda. Operacije pranja i čišćenja postrojenja i strojeva su zbog dizajna vrlo otežani što može rezultirati daljnjim problemima vezanim uz higijenu postrojenja. Naposljetku, maslinovo tijesto je tijekom cijelog proizvodnog procesa kontinuirano izloženo kisiku što se negativno odražava na kemijske, fizikalne i senzorske karakteristike dobivenog ulja jer dolazi do značajnog pogoršanja kvalitete zbog oksidacije polifenola i masnih kiselina. Naravno, tradicionalna postrojenja u usporedbi s modernim postrojenjima imaju i svoje prednosti koje proizlaze iz sporog kretanja drobilica, a očituju se u smanjenom zagrijavanju maslinovog tijesta tijekom drobljenja (Cappelli i sur., 2023).

Modernizirana postrojenja mogu osigurati od 20 do 25 % veći prinos ulja uz značajno poboljšanje kvalitete. U ovom slučaju doticaj zraka sa maslinovim tijestom moguće je kontrolirati i uvoditi potrebnu količinu zraka putem sustava za mljevenje, a da bi se omogućila blaga oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina u lipoksigenaznom putu i dobivanje željenih okusa ulja po voću, artičokama i travi (Cappelli i sur., 2023). Kontroliranim dodavanjem kisika moguće je i moduliranje senzorskih karakteristika. Istraživanja utvrđuju smanjenje intenziteta "gorkih" i "oporih" osjetilnih nota povećanjem koncentracije kisika tijekom mljevenja. Optimalne rezultate moguće je postići dodatkom 0,2 L/min kisika što ima izravan utjecaj na koncentraciju hlapljivih komponenti, pogotovo na povećanje koncentracije aldehida i (E)-2-heksenala (Veneziani i sur., 2023).

Ovisno o tipu centrifugalnog ekstraktora proizvodnja rezultira dobivanjem ulja, vegetabilne vode i komine, ili ulja i mokre komine. Neki autori u ovom slučaju prednost daju upravo potonjem zbog manje količine proizvedenog nusprodukta - mokre komine i većeg sadržaja fenola i tvari okusa u proizvedenom ulju (Cappelli i sur., 2023).

2.3. NUSPROIZVODI PROIZVODNJE

2.3.1. Vegetabilna voda

Jedan od velikih problema proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja je činjenica da se tijekom proizvodnje određene količine ulja paralelno generira četverostruko veća količina otpada (Cappelli i sur., 2023). Prema podacima Uprave za poljoprivredu i ruralni razvoj Europske komisije, Europska unija kao vodeći proizvođač proizvodi otprilike 67 % svjetskog maslinovog ulja, a ujedno je i vodeći potrošač i izvoznik maslinovog ulja. Proizvodnja se odvija pretežno u zemljama Mediterana, najviše u Italiji i Španjolskoj (Europska Komisija, 2023). Imajući na umu navedenu količinu kao i visoko organsko opterećenje, fitotoksičnost i antimikrobni učinak nusproizvoda proizvodnje, zbrinjavanje istog predstavlja značajan ekološki problem mediteranskih zemalja. Fitotoksični elementi i najveći zagađivači potječu iz vegetabilne vode, koja isto tako predstavlja i najobilniji izvor bioaktivnih spojeva i u kojoj je koncentracija fenola viša nego što je u samom ulju. Najčešće korišteni sustavi za obradu vegetabilne vode uključuju različite fizikalne i kemijske metode, biološku inaktivaciju, kemijsku oksidaciju, filtraciju i membransku separaciju. Fizikalne metode su pokazale najslabiju iskoristivost jer njihovom uporabom nije moguće smanjiti toksične efekte do zadovoljavajućih granica dok je uporaba anaerobnih bioreaktora otvorila mogućnost za korištenje vegetabilne vode kao goriva za proizvodnju energije. Ipak, uzimajući u obzir iskoristivost, potrebna ulaganja, kao vrijednost i visoku koncentraciju fenola u vegetabilnoj vodi, filtracija, odnosno, membranska separacija pokazuje se kao metoda izbora. Pokušaji unapređivanja iskoristivosti ovog postupka uključuju uporabu mikro i nano filtracije te uporabu reverzne osmoze i membranske emulzifikacije. U ovom slučaju vegetabilna voda prvotno se zakiseljava u svrhu uklanjanja suspendiranih tvari, a potom prolazi nanofiltraciju koja rezultira stvaranjem koncentriranog polifenolnog retentata i permeata. Retentat zatim prolazi koncentriranje reverznom osmozom i koncentrirani polifenolni ekstrakt biva inkapsuliran u emulziji vode u ulju kroz proces emulzifikacije membrane. Ovom metodom moguće je iskoristiti 85 % polifenola iz vegetabilne vode (Cappelli i sur., 2023).

2.3.2. Komina

Uz vegetabilnu vodu, kao nusprodukt proizvodnje ostaje i komina, odnosno mješavina maslinovog tijesta i koštica koja ostaje nakon izdvajanja ulja. Najstarija tradicionalna metoda za iskorištavanje maslinove komine je ekstrakcija ulja koje se potom rafinira i u malom omjeru (obično oko 5 %) miješa sa ekstra djevičanskim maslinovim uljem (Cappelli i sur., 2023). Komina masline tipično ima blago kiseli pH, visoku koncentraciju organske tvari (uglavnom vlakana), bogata je kalijem i sadrži visoku koncentraciju fenolnih spojeva. U pulpi komine nalazi se još i 2,5 do 3 % maslinovog ulja. Koristi se kao izvor toplinske energije snage 23 MJ/kg, kao malč u masliniku i kao dodatak hrani za životinje. Kominu je potrebno pažljivo i pravilno skladištiti jer je vrlo zapaljiva, što zahtijeva utvrđivanje posebnih kriterija vezano za samo mjesto kao i okruženje skladišne lokacije (Alkhalidi i sur., 2023).

Razvojem inovativnih metoda, komina je postala iskoristivim izvorom za ekstrakciju fenola. Utvrđeno je da metode poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima značajno povećavaju učinkovitost procesa uz istovremeno smanjenu uporabu organskih otapala i smanjenje trajanja ekstrakcije. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom rezultira većim prinosima i povećanim sadržajem fenola u poređenju s tradicionalnim metodama te se smatra pogodnom za industrijsku primjenu uz jednostavnu integraciju u već postojeće pogone (Stramarkou i sur., 2023).

2.4. INOVATIVNE TEHNIKE U PROIZVODNJI

Inovativne tehnologije kojima je cilj omogućiti zadovoljavanje potražnje potrošača i postizanje čim bolje iskoristivosti procesa proizvodnje i kvalitete djevičanskog maslinovog ulja obuhvaćaju primjenu pulsirajućeg električnog polja, obradu visokim tlakom, primjenu ultrazvuka, tretman ultrazvukom velike snage i tretman mikrovalovima. Navedene tehnike temelje se na pucanju staničnih stijenci i membrana ploda masline i poticanju propusnosti membrane stvaranjem pora. Kao posljedica navedenog dolazi do poboljšanje ekstrakcije ulja tijekom miješenja i postizanje većih prinosa. Kritični parametri koji omogućuju postizanje optimuma kvalitete i antioksidacijskog potencijala djevičanskog maslinovog ulja su temperatura i trajanje procesa miješenja (Perez i sur., 2021).

2.5. ČIMBENICI UTJECAJA NA KVALITETU ULJA I SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA

Podaci govore da je iz djevičanskog maslinovog ulja do sada izolirano oko 280 hlapljivih spojeva. U tom raznolikom rasponu spojeva nalazimo aldehide, koji su najznačajnija frakcija odgovorna za mirisni dojam zelene arome, zatim alkohole, ketone, estere koji daju slatke i voćne note djevičanskom maslinovom ulju, etere, zasićene i nezasićene ugljikovodike i karboksilne kiseline. Uz navedeno, identificirani su i neki minorni spojevi u niskim koncentracijama, kao što su derivati tiofena, a utvrđeno je da pozitivno utječu na aromu djevičanskog maslinovog ulja. Važno je napomenuti da je samo 67 tih spojeva obično prisutno u koncentracijama koje premašuju njihov prag mirisa, što u konačnici utječe na aromu djevičanskog maslinovog ulja (Nardella i sur., 2023).

Hlapljivi spojevi djevičanskog maslinovog ulja uglavnom su rezultat lipoksigenaznog puta, mikrobiološke aktivnosti koja može biti rezultat nepravilnog skladištenja maslina prije drobljenja i tijekom skladištenja nefiltriranih ulja te autooksidacije i fotooksidacije masnih kiselina tijekom skladištenja (Cecchi i sur., 2021).

Sastav i koncentracija hlapljivih spojeva predstavljaju vrlo specifičan i varijabilan faktor u odnosu na različite sorte masline pa ih je moguće koristiti za karakterizaciju monokultivara. Tome-Rodríguez i suradnici (2021) navode rezultate dvaju studija gdje je provedena karakterizacija monokultivara. Specifičnost studija je uzgoj kultivara u istom voćnjaku, a ulja su dobivena tijekom dvije uzastopne berbe ili iz plodova ubranih u istom stadiju zrelosti te obrađena istim sustavom ekstrakcije i u istim uvjetima. U obje studije razlike među kultivarima zabilježene su u razlikama koncentracije hlapljivih komponenata C6 spojeva (Tome-Rodríguez i sur., 2021).

Takve prirodne varijacije u kompoziciji hlapljivih spojeva i profilima arome mogu se uz veliku genetsku raznolikost maslina pripisati i utjecaju režima navodnjavanja voćnjaka, stupnja zrelosti ploda, uvjete prerade maslina i razlika u načinima skladištenja maslinovog ulja. Manjak dostupne vode u voćnjaku reflektira se na senzorska svojstva ulja visokim intenzitetom gorčine, dok veća dostupnost vode utječe smanjenjem koncentracije određenih hlapljivih spojeva u plodu (trans-2-heksenal, cis-3-heksen-1-ol i heksanol). Dalje, veće koncentracije hlapljivih spojeva zamijećene su tijekom rane faze sazrijevanja plodova masline u usporedbi s kasnom fazom sazrijevanja. Naposljetku, optimalni skladišni uvjeti neizostavan su faktor kojim se osigurava zadržavanje karakteristika kvalitete proizvedenog ulje. Naime, utjecaj topline može

potpuno promijeniti sadržaj hlapljivih organskih spojeva gdje je zabilježen razvitak Z-2-decenala i 2-undekanala u grijanim ekstra djevičanskim maslinovim uljima. Sama sorta uz hlapljive spojeve direktno utječe i na sastav masnih kiselina, a zabilježen je i utjecaj zemljopisnog područja uzgoja. Žanetić i suradnici (2021) prijavljuju razlike u sastavu sorte oblica gdje je na hladnijim lokacijama veće nadmorske visine zabilježen veći udio fenolnih spojeva, a na toplijim lokacijama niže nadmorske visine niža razina voćnosti, gorčine i oporosti (Žanetić i sur., 2021).

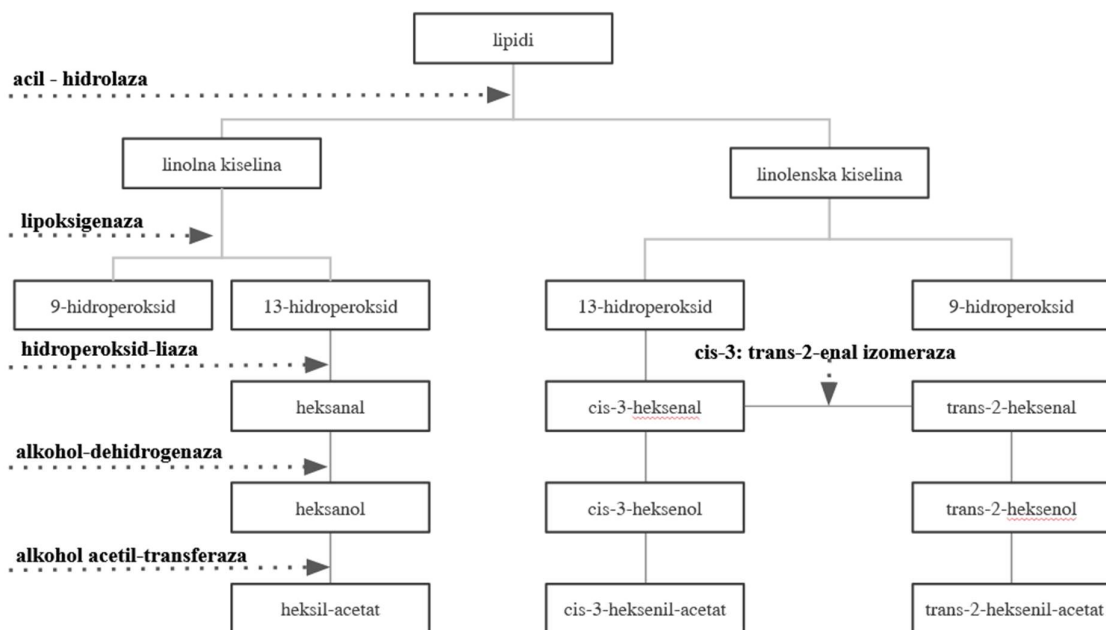
Malaksacija, odnosno miješenje tijesta, jedan je od tri glavne faze mehaničke ekstrakcije ulja, a to su usitnjavanje masline i odvajanje uljne faze, odnosno, prešanje ili centrifugiranje. Osim svojstva ploda masline i svaka od ovih tehnoloških operacija ima velik značaj za kvalitetu proizvoda. Priprema maslinovog tijesta započinje drobljenjem masline gdje je glavni cilj razbijanje biljnog tkiva kako bi se oslobodile kapljice ulja sadržane u stanicama mezokarpa (Clodoveo, 2012). Ovisno o vrsti mlina koji se koristi, zabilježene su promjene u sastavu hlapljivih tvari kao i sadržaju pigmenta. Ulja dobivena pomoću mlina s diskovima, u odnosu na ulja dobivena pomoću mlina čekićara, pokazala su značajno poboljšanje koncentracije hlapljivih spojeva 1-heksanal i trans-2-heksenal, a redukciju koncentracije alkohola 1-heksanala. Konačno, senzorska analiza pokazala je da su ulja dobivena iz mlina s diskovima, za razliku od onih dobivenih pomoću mlina čekićara, odlikovana povećanjem senzorskih atributa koji podsjećaju na pokošenu travu i cvijeće, te bolje senzorske karakteristike (Servili i sur., 2002).

Miješenjem maslinovog tijesta vrši se priprema za odvajanje ulja. Tradicionalno, malaksacija maslinovog tijesta odvija se miješenjem u brzini od 20 - 30 okretaja u minuti na pažljivo nadziranoj temperaturi. Ova faza proizvodnje je kritična za postizanje željenih prinosa i iskoristivost proizvodnog procesa. Tijekom miješenja tijesta dolazi do agregacije malih kapljica ulja koje su raspršene u maslinovom tijestu (Clodoveo, 2012). U trenutku kad kapljice ulja formirane tijekom drobljenja maslina dođu u kontakt s vegetabilnom vodom bogatom proteinima i fosfolipidima, bivaju okružene lipoproteinskim membranama koje zapravo priječe izmjenu metabolita između vodene i uljne faze. Fenomen koalescencije, odnosno, objedinjavanja malih kapljica u velike potaknut procesom miješenja podrazumijeva ponovno cijepanje tih lipoproteinskih membrana čime se omogućuje preraspodjela spojeva ovisno o njihovom koeficijentu raspodjele između uljne i vodene faze. To su zapravo trenutci koji određuju kemijska i senzorska svojstva, kao i kvalitetu ulja (Ranalli i sur., 2001). Agregacija kapljica dalje olakšava odvajanje ulja tijekom mehaničke ekstrakcije, odnosno, centrifugiranja.

Dolazi do razbijanja emulzije ulje/voda koja nastaje tijekom procesa drobljenja te do daljnje destrukcije stanica koje su ostale cijele tijekom procesa drobljenja što direktno utječe na prinos ulja (Clodoveo, 2012). Dakle, proces miješenja ne treba analizirati kao puko mehaničko djelovanje, već prepoznati kao višestruki slijed fizikalnih, fizikalno-kemijskih, kemijskih i biokemijskih promjena koje značajno utječu na kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja, posljedično utječući na njegove nutritivne i senzorske osobine. Od posebne važnosti su fenomeni koalescencije kapljica ulja, reološke modifikacije, difuzija, prijenos topline, kemijska oksidacija i aktivacija endogenih enzima (Nardella i sur., 2023).

Ubrzo nakon destrukcije stanice maslinovog tkiva dolazi do aktivacije sustava enzima lipoksigenaznog puta, čija je prisutnost genetski određena, a uključuje acil hidrolazu, lipoksigenazu, hidroperoksid liazu, alkohol dehidrogenazu i alkohol acil transferazu. Lipoksigenazni put podrazumijeva slijed biokemijskih reakcija kojim nastaje većina tvari arome, pogotovo C6 aldehidi, alkoholi i esteri, kao što je prikazano na slici 1. Niz reakcija započinje djelovanjem acil hidrolaze na trigliceride i fosfolipide uz oslobađanje slobodnih masnih kiselina koje potom lipoksigenaza oksidira do hidroperoksida. Dalje hidroperoksid liaza cijepa hidroperokside do aldehida i oksokiselina, a alkohol dehidrogenaza katalizira reverzibilnu redukciju alifatskih aldehida u alkohole. Naposljetku, alkohol acil transferaza katalizira stvaranje acetatnih estera iz alkohola. Acetatni esteri i esteri alkohola s drugim masnim kiselinama važni su sastojci u mnogobrojnom voću, dok u maslinovom ulju čine značajne komponente slatkih, voćnih nota (Kalua i sur., 2007).

Parametri procesa proizvodnje ključni za utjecaj na aktivnost enzima lipoksigenaznog puta je upravo temperatura. Za većinu proučavanih hlapljivih tvari uočena je pozitivna ovisnost o vremenu malaksacije, osim za 1-penten-3-on, za koji je uočeno jedno lagano smanjenje (Vidal i sur., 2018). Naravno, u odabiru parametara za ostvarenje optimalnih uvjeta za djelovanje endogenih enzima masline treba uzeti u obzir i razlike u kultivaru masline, stupanj zrelosti masline, lokalizaciju enzima unutar tkiva masline i afinitet enzima prema supstratima. Važnost kultivara i stupnja zrelosti masline leži u činjenici da su to posebno značajni čimbenici za enzimsku aktivnost povezane s razvojem, transformacijom i razgradnjom polifenolnih i hlapljivih spojeva, što je pogotovo zabilježeno za hidroperoksid liazu i alkohol dehidrogenazu (Kalua i sur., 2007). Uz navedeno, genetsko podrijetlo sirovine utječe ne samo na apsolutnu aktivnost svakog enzima uključenog u put lipoksigenaze, nego i na njihovu raspodjelu u sastavnim dijelovima ploda (Veneziani i sur., 2015).



Slika 1. Lipoksigenazni put razgradnje masnih kiselina (prema Kalua i sur., 2007)

2.6. PRIMJENA UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA

Obzirom da u lipoksigenaznom putu i transformaciji hlapljivihkomponenata sudjeluju različiti enzimi sa različitim optimalnim temperaturama (tablica 1), modulaciju procesa proizvodnje moguće je prilagoditi ovisno o rezultatu, odnosno, osjetilnim notama koje proizvođač želi istaknuti.

Kako je već rečeno, lipoksigenazni put započinje djelovanjem lipoksigenaze na slobodne masne kiseline. Optimalno djelovanje lipoksigenaze očituje se na temperaturama blizu 30 °C, no pokazala se kao termički nestabilna te joj se na 60 °C aktivnost smanjuje na manje od 10 % unutar 1 minute (Nardella i sur., 2023; Kalua i sur., 2007). Ridolfi i suradnici (2002) ustanovili su da lipoksigenaza pokazuje čak oko 80 % svoje maksimalne aktivnosti na temperaturnim rasponima između 20 i 40 °C. Temperatura od 80 °C inhibira ju 80 - 90 % u kraćem vremenskom periodu obrade dok je tretman od 15 minuta potpuno eliminira. Uz navedeno, temperatura od 50 °C inhibira djelovanje lipoksigenaze otprilike oko 40 % za sortu Kalamata, a 60 - 70 % za sortu Ascolana Tenera i FS17 (Ridolfi i sur., 2002). Suprotno tome Georgalaki i suradnici (1998) zabilježili su značajnu aktivnost lipoksigenaze sve do 55 °C, zaključujući

kako je vjerovatno to razlog zašto ovaj enzim može barem djelomično opstati kroz cijeli proces proizvodnje maslinova ulja (Georgalaki i sur., 1998).

Tablica 1. Parametri temperature i pH vrijednosti potrebnih za enzimatsku aktivnost (*prema Kalua i sur., 2007*)

Enzim	Temperatura	pH
acil hidrolaza	-	8 - 9 (8,5 optimum)
lipoksigenaza	30 °C (optimum) 55 °C (maksimum)	5,2 – 6,6 5,5 – 6,0 5,0 – 7,5 (6,0 – 6,1 optimum)
hidroperoksid liaza	15 °C (optimum) 35 °C (maksimum)	5,0 – 7,0 6,0 (optimum) 5,7 (optimum)
alkohol dehidrogenaza	–	5,0 – 8,5 6,8 (optimum)
alkohol acetil transferaza	35 °C (optimum)	8,0 (optimum) 7,5 (optimum) 6,8 (optimum)

Hidroperoksid liaza također je toplinski labilna i aktivnost joj se može brzo smanjiti na nekoliko postotaka izvorne aktivnosti na povišenim temperaturama. Maksimalna aktivnost primijećena je na 15 °C s jasnim padom na 35 °C. Pokazuje optimalnu aktivnost u blago kiselim uvjetima. Zabilježeno je da toplinski tretmani između 60 i 68 °C potiču djelomičnu deaktivaciju enzimskog sustava lipoksigenaza/hidroperoksid liaza smanjujući sintezu spojeva C6 i C5 (Kalua i sur., 2007).

Alkohol dehidrogenazi pogoduju temperaturre od 22 °C što rezultira maksimalnom proizvodnjom aldehida (heksanal i (E)-2-heksenal) i razvojem zelenih i lisnatih nota povezanih s (E)-2-heksenalom, a smanjenjem voćnih i slatkih nota. Istraživanja su pokazala da povećanje temperature u zadnjem dijelu miješenja dovodi do smanjenja aldehida i povećanja alkohola i to pogotovo na 30 °C. Naravno, opisani mehanizmi nisu bili izraženi kod svih kultivara podjednako (Nardella i sur., 2023).

Aktivnost alkohol acil transferaze pokazuje maksimum na 35 °C, iznad koje dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti. Uočeni su različiti temperaturni rasponi gdje je aktivnost alkohol acil transferaze bila omogućena. Aktivnost enzima praćena je kroz koncentraciju

produkata reakcija koje taj enzim katalizira - hlapljivih esterskih spojeva. Toplinski tretmani između 60 i 68 °C nisu utjecali na aktivnost alkohol acil transferaze tako da je sadržaj C6 estera u maslinovom ulju ostao gotovo konstantan (Perez et al., 2003). Međutim, došlo je do nakupljanja alkohola kada je aktivnost alkohol acil transferaze bila niža od enzima koji joj u lipoksigenaznom putu prethode čime je došlo da disbalansa koncentracije supstrata i raspoloživosti enzima. Povećanje aktivnosti alkohol acil transferaze može povećati proizvodnju hlapljivih estera koji su odgovorni za voćnu i slatku aromu u maslinovom ulju. Aktivnost alkohol acil transferaze može se poboljšati odabirom kultivara i modificiranjem procesa ekstrakcije, kao što je rad na nižim temperaturama kako bi se spriječila inaktivacija enzima i potaknula povećana aktivnost esterifikacije (Kalua i sur., 2007).

U procesima tradicionalne proizvodnje miješenja tijesta i toplinsko kondicioniranje odvijaju se u isto vrijeme. Ipak, vrijeme trajanja toplinskog kondicioniranja u ovom slučaju je relativno dugo zbog slabe učinkovitosti prijenosa temperature. Kod odabira neprikladnih parametara malaksacije, tj. duljeg procesa i/ili više temperature od optimalne može se aktivirati i put pretvorbe aminokiselina, što u konačnici rezultira povišenim razinama 2- i 3-metil butanala, koji odgovaraju tipičnim senzorskim notama povezanim s zagrijanim uljem. Dakle, niže temperature miješenja potiču razvoj aldehida, dok više temperature potiču pretvorbu u alkohole koji se dalje mogu transformirati u estere. Primjena temperature od 18 °C kroz cijeli postupak miješenja pokazala je povećan sadržaj C6 aldehida kroz poboljšanu aktivnost hidroperoksid liaze i to unatoč dokazima da hidroperoksid liaza ima maksimalno djelovanje na 15 °C (Nardella i sur., 2023).

Metoda primjene ubrzanog toplinskog procesa je inovativan pristup rješavanju ovog problema kojim se toplinsko kondicioniranje maslinovog tijesta primjenjuje prije samog miješenja. Na taj način moguće je utjecati i na trajanje miješenja, a posljedično i na trajanje cijelog procesa proizvodnje kao i kvalitetu i prinos ulja. Prema literaturim navodima Veneziani i suradnici (2015), svi uzorci djevičanskog maslinovog ulja tretirani ubrzanom toplinskim procesom pokazali su značajne izmjene u pogledu hlapljivih spojeva i to zbog aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta tijekom obrade. Ubrzani toplinski tretman maslinovog tijesta primijenjen na industrijskom mlinu s ciljem poboljšanja kapaciteta proizvodnje, omogućio je značajno povećanje hlapljivih spojeva odgovornih za pozitivna mirisna svojstva u usporedbi s tradicionalnim postupkom miješenja. Provedena istraživanja obuhvatila su uzorke različitih talijanskih sorti masline podvrgnutih ubrzanom toplinskom tretmanu na 25 i 30 °C.

U usporedbi s maslinovim tijestom tretiranim tradicionalnim postupkom, rezultati su pokazali:

- značajno povećanje C6 aldehida tj. (E)-2-heksenala i to do čak preko 32 % kod tretmana sa 25 °C, a 12 % kod tretmana sa 30 °C,
- smanjenje C6 zasićenih i nezasićenih alkohola,
- blagi porast C5 nezasićenih alkohola,
- porast vrijednosti koncentracije estera, točnije heksil acetata i to za 56,2 kod tretmana sa 25 °C i 62,8 % kod 30 °C, te (Z)-3-heksenil acetata za 61,5 % na 25 °C i 63,4 % na 30 °C.

Ovi rezultati omogućili su promatranje varijabilnosti u stvaranju hlapljivih spojeva tijekom obrade određene sorte. Varijabilnosti su rezultat različitih razina aktivnosti svakog enzima uključenog u lipoksigenazni put. Uz navedeno, ubrzani toplinski tretman doprinosi i lomljenju stanica parenhima i agregacijama kapljica ulja i prije samog procesa miješenja (Esposito i sur., 2013).

Ubrzani toplinski tretman bio bi od posebnog značaja kao metoda izbora u onim geografskim zonama gdje masline karakteriziraju vrlo niske temperature prije njihove prerade. Niske temperature ploda prije obrade predstavljaju prepreku u tehnološkom procesu jer je potrebno produljiti postupak miješenja da bi se postigle optimalne temperature potrebne za preradu maslinovog tijesta. Primjenom ubrzanog toplinskog tretmana tijesta nakon drobljenja, razlika između temperature pulpe masline i optimalnog procesa ekstrakcije djevičanskog maslinovog ulja temperatura u kratkom vremenu bi se smanjila (Esposito i sur., 2013).

Važno je znati da upotreba ubrzanog toplinskog tretmana nije pokazala utjecaj na udio slobodnih masnih kiselina ili na peroksidne vrijednosti. Navedeno dovodi do zaključka da toplinsko moduliranje mehaničke ekstrakcije ne utječe na uobičajene kemijske i biokemijske procese razgradnje masti, odnosno aktivnost lipaze. Dalje, istraživanja su pokazala da porast razine fenola nakon upotrebe ubrzanog toplinskog tretmana prati povećanje duljine vremena miješenja. Isto se očitovalo u većim koncentracijama fenola u uljima ekstrahiranim nakon 15 minuta miješenja, a pogotovo nakon 20 minuta miješenja. S druge strane procesi miješenja u trajanju od 10 minuta nisu dali slične rezultate u poređenju s tradicionalnim postupkom. Zaključno, postupak miješenja nakon ubrzanog toplinskog tretmana potrebno je provoditi u trajanju od minimalno 15 minuta. To je potrebno kako bi se postigla poboljšana ekstrakcija fenola u djevičansko maslinovo ulje i vegetabilnu vodu, a kao rezultat poboljšane razgradnje

stanične stijenke endogenim depolimerizirajućim enzimima. Iako je utjecaj sorte na razinu fenola neupitan, objavljeni rezultati ukazuju na konzistentnost u rezultatima istraživanja utjecaja ubranog toplinskog tretmana na fenolni sastav djevičanskog maslinovog ulja (Veneziani i sur., 2015).

2.7. ALTERNATIVNI PRISTUP PROVOĐENJU UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA

Cilj uporabe ubranog toplinskog tretmana je prevladavanje nedostataka i bolje iskorištenje tradicionalnog procesa miješenja. Industrija je prepoznala benefite toplinskog tretiranja maslinovog tijesta te na tržištu trenutno postoje u ponudi izmjenjivači topline u tu svrhu (Pieralisi Protoreattore, Pieralisi, Jesi, Italija; Alfa Laval EVO-line, Alfa Laval, Lund, Švedska), a u pripreмноj fazi za proizvodnju je i kombinirani izmjenjivač topline sa ultrazvukom. Treba imati na umu da uvođenje u pogon novih tehnologija na ovom nivou ipak podrazumijeva ne samo financijsku investiciju, već i potrebne zahvate u adaptaciji postrojenja a dugoročno gledajući i veću potrošnju energenata. Kao alternativu takvoj investiciji Plasquy i suradnici predlažu prilagođavanje temperature maslinovog ploda toplinskim tretmanom prije drobljenja (Plasquy i sur., 2021).

Naime, preporuka je procesirati masline unutar 24 sata od berbe što ponekad nije moguće zbog podkapacitiranost pogona, odnosno u situacijama kada ubrana količina voća premašuje kapacitete prerade raspoloživih mlinova što iziskuje određeno vrijeme skladištenja maslina do prerade. Tijekom duljeg perioda skladištenja u maslini dolazi do razvoja hidrolitičkih i oksidativnih procesa. Uz navedeno, razvoj relativno visokih temperatura, odnosno sobnih temperatura, tijekom skladištenja pogoduje i razvoju različitih mikroorganizama, truljenju maslina, anaerobnoj fermentaciji što dovodi do štetnih promjena u fizikalno-kemijskim svojstvima masline i narušavanja senzorskih karakteristika ulja. S tim razlogom, provedeno je istraživanje o mogućnostima skladištenja maslina na nižim temperaturama točnije na 4 °C. Rezultati su pokazali da je skladištenje u navedenim uvjetima omogućilo potrebno očuvanje kvalitete ploda masline. Senzorska kvaliteta ulja dobivenog iz tako skladištenih maslina najbližnja je kvaliteti svježeg ulja iz kontrole koje je odgovaralo najvišoj kategoriji kvalitete, ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Brkić Bubola i sur., 2020).

Mljevenjem temperatura maslina, odnosno maslinovog tijesta podiže se za najmanje 5 °C. Posljedično, postizanje optimuma temperature maslinovog tijesta od 25 do 30 °C predstavlja izazov ako plodovi masline dolaze u uljaru na temperaturi višoj od 25 °C. To je dodatni razlog koji idu u prilog hlađenju maslina prije drobljenja, a najoptimalnije odmah nakon berbe da bi se usporilo djelovanje enzima uključenih u kvarenje. Hlađenje ploda masline moguće je izvesti i unutar pogona strujanjem hladnog zraka ili hidro-hlađenjem. Niže temperature jesu pogodne za skladištenje maslina, ali nisu pogodne za ekstrakciju ulja iz masline. Optimizacija procesa miješenja podrazumijeva podešavanje temperature tijesta prije ulaska u malakser. Plasquy i suradnici (2021) ispitali su utjecaj pranja maslina prije drobljenja uporabom tople vode na temperaturu maslinovog tijesta uzimajući u obzir raspon temperatura miješenja od 25 do 30 °C kao optimalne. Laboratorijskim pokusima kasnije preslikanim u pilot postrojenju ispitali su izvedivost zagrijavanja masline na 10 °C ili manje tijekom potapanja u kadu za pranje s ciljem postizanja temperature maslinovog tijesta od oko 27 °C prije samog ulaska u malakser. Uspješne rezultate ostvarili su potapanjem maslina u vodu temperature od 35 do 40 °C u vremenu od 15 do 20 sekundi. Na temelju tih rezultata zaključeno je da je optimizaciju malaksacije moguće postići upotrebom grijane kade za pranje uz manje investicijske troškove i lakšu integraciju u postojeće sustave. Kadu za pranje potrebno je opremiti sigurnim i učinkovitim sustavom grijanja kojim bi se mogla osigurati stabilna temperatura vode tijekom obrade. Sustav grijanja trebao bi biti povezan sa termostatom koji prati temperaturu maslinovog tijesta prije ulaska u malakser da bi povratnom informacijom mogao regulirati paljenje i gašenje grijača, odnosno, kontrolirati temperaturu vode za pranje (Plasquy i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Tijekom izrade ovog diplomskog rada korišteni su uzorci djevičanskog maslinovog ulja (tablica 2) proizvedeni laboratorijskim postupkom uz ubrzani toplinski tretman, a u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja korištene sorte su istarska bjelica, oblica, rosulja i levantinka.

Tablica 2. Lista uzoraka

Broj uzorka	Sorta	Temperatura	Primjenjeni proces obrade
1	bjelica	kontrola	Ubrzani toplinski tretman (UTT)
2	bjelica	15	
3	bjelica	20	
4	bjelica	25	
5	bjelica	30	
6	bjelica	35	
7	bjelica	40	
8	levantinka	kontrola	
9	levantinka	15	
10	levantinka	20	
11	levantinka	25	
12	levantinka	30	
13	levantinka	35	
14	levantinka	40	
15	oblica	kontrola	
16	oblica	15	
17	oblica	20	
18	oblica	25	
19	oblica	30	
20	oblica	35	
21	oblica	40	
22	rosulja	kontrola	Toplinski tretman (TT)
23	rosulja	15	
24	rosulja	20	
25	rosulja	25	
26	rosulja	30	
27	rosulja	35	
28	rosulja	40	
29	oblica	30	
30	oblica	35	
31	oblica	40	

Skladištenje uzoraka djevičanskog maslinovog ulja nakon proizvodnje osigurano je u bočicama od tamnog stakla volumena od 50 mL, 100 mL i 500 mL, pod dušikom te na temperaturama od oko 20 °C.

Reagensi korišteni za analizu hlapljivih komponenti su:

- 4-metil-2-pentanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- n-heksan- (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- heptan (Fluka Chemie AG, Buchs, Švicarska)

Oprema korištena za analizu hlapljivih komponenti:

- analitička vaga
- mehanička pipeta
- SPME aparatura za mikroekstrakciju na krutoj fazi (Supelco 57330-U, Bellefonte, SAD)
- termostat s magnetskom miješalicom (Pierce, Reacti-Therm heating/stirring module)
- plinski kromatograf (8890 GC System, Santa Clara, SAD)
- kolona (HP-5ms, Agilent 19091S-433)
- spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (7000D GC/TQ, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD).

3.2. METODE

3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja uz ubrzani toplinski tretman

Djevičansko maslinovo ulje proizvedeno je u laboratorijskim uvjetima na laboratorijskoj pilot uljari Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska) sastavljenoj od:

1. mlina čekićara (MM-100)
2. termomiješalice s vodenom kupelji (TM-100)
3. centrifuge (CF-100).

Prije meljave plodova maslina, isti su očišćeni i oprani, a nakon mljevenja tijesto plodova maslina je podvrgnuto ubrzanom toplinskom tretmanu pri sljedećim temperaturnim režimima: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, i 40 °C.

Zagrijavanje maslinovog tijesta na temperature od 25 °C, 30 °C, 35 °C, i 40 °C, odnosno ubrzani toplinski tretman, provodi se u termostatu s vodenom kupelji (GRANT, SUB Aqua Pro, model: SAP12). Tijesto se raspoređuje u plastične posudice obložene aluminijskom folijom s gornje strane u svrhu ravnomjerne raspodjele topline. Toplina se prenosi kondukcijom preko vode, a temperaturu maslinovog tijesta potrebno je kontinuirano pratiti ubodnim termometrom (Quartz). Za postizanje temperature tijesta od 40 °C, voda u vodenoj kupelji zagrijava se na 52 °C, dok je za niže temperature tijesta od 25 do 35 °C dovoljno postići temperaturu vode od 50 °C. Proces zagrijavanja tijesta do postizanja željenih temperatura traje od 1 do 3 minute, a ne smije trajati više od 10 minuta. Drugi način zagrijavanja maslinovog tijesta, odnosno toplinski tretman, provodi se raspoređivanjem maslinovog tijesta na pladnjeve od inoxa. Maslinovo tijesto u količini od otprilike 800 g raspoređuje se na pladnjeve od inoxa slojevito u visini 1 – 1,5 cm. Zagrijavanje na 45 °C provodi se u termostatu, a prijenos topline odvija se konvekcijom.

U svrhu hlađenja maslinovo tijesto raspoređeno je na pladnjeve od inoksa gdje se toplinska energija odvodi konvekcijom, a proces hlađenja provodi se u uređaju za ubrzano hlađenje (Blast chiller TECNODOM ATT05 ATTILA ABB) na temperaturi od – 18 °C. Željena temperatura maslinovog tijesta od 15 °C i 20 °C postiže se u periodu od 1 do 3 minute, a postupak hlađenja prati se ubodnim termometrom (Quartz) i ne smije biti duži od 10 minuta.

Toplinski predtretirano maslinovo tijesto podvrgava se postupcima miješenja na temperaturi od 27 °C kroz 40 minuta, zatim centrifugiranja na laboratorijskoj pilot-uljari Abencor gdje se ulje izdvaja uz 3500 okr/min kroz 90 sekundi, i naposljetku izbistravanja finim

centrifugiranjem pri 18 °C na centrifugi sa sustavom hlađenja Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka) pri 5000 okr/min kroz 4 minute.

3.2.2. Određivanje hlapljivih komponenti

U uzorcima djevičanskog maslinovog ulja određen je sastav i udio hlapljivih komponenata korištenjem plinske kromatografije uz spektrometriju masa (GC/MS). Izolacija komponenti izvršena je „headspace“ mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME) gdje je korišteno 2 cm dugo divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksansko (DVB/CAR/PDMS) vlakno, debljine omotača polimera 50/30 µm.

Za pripremu uzorka korištena je staklena vijala od 20 mL u koju je prvo odvagano 0,015 g internog standarda (0,15 %-tna otopina 4-metil-2-pentanolu u suncokretovom ulju), a zatim dodan uzorak djevičanskog maslinovog ulja do odvage od 10 g. Nakon vaganja u vijalu je dodan magnet za miješanje sadržaja, a vijala je zatvorena pomoću čepa sa silikonskim septumom. Vijala je potom smještena u kućište termostata s magnetskom miješalicom na 40 °C uz konstantno miješanje. Nakon 10 minuta termostatiranja uzorka, iglom SPME držača probijen je silikonski septum čepa vijale, vlakno je izvučeno iz igle te počinje proces adsorpcije hlapljivih komponenti iz zračnog prostora iznad uzorka na vlakno u trajanju od 30 minuta. Po završetku adsorpcije, vlakno je uvučeno natrag u iglu prije vađenja igle iz vijale, a SPME držač je u što kraćem vremenu manualno injektiran u plinski kromatograf gdje se dalje odvija desorpcija hlapljivih komponenti ekstrahiranih na vlakno u „splitless“ načinu rada kroz 1 minutu.

Radni uvjeti plinskog kromatografa:

- plin nosioc: helij
- protok plina nosioca: 1.5 mL/min
- temperatura injekcijskog bloka: 260 °C
- početna temperatura peći: 30 °C, izotermno zadržana 3 minute
- brzina povećanja temperature:
 - 5 °C / min do 150 °C
 - 20 °C / min do 250 °C
- konačna temperatura peći: 250 °C, izotermno zadržana 5 minuta
- trajanje mjerenja: 37 minuta.

Razdvajanje spojeva izvršeno je kapilarnom kolonom (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s 5 %-tnim fenilmetilpolisiloksanom kao stacionarnom fazom, dok je identifikacija spojeva izvršena uspoređivanjem retencijskog vremena i masenih spektara detektiranih hlapljivih spojeva s vrijednostima standarda te spektrima masa dostupnim u bazama podataka u NIST-u (engl. *National Institute of Standards and Technology*). Kvantificiranje spojeva izvršeno je uporabom dobivenih kromatograma računajući odziv i koncentraciju internog standarda (4-metil-2-pentanol) za svako injektiranje.

Koncentracija spojeva računa se prema sljedećoj formuli:

$$\gamma (x) (mg/kg) = \frac{A (x) \cdot m (is) \cdot \gamma (is)}{A (is) \cdot m (uz) \cdot 1000}$$

gdje je :

$\gamma (x)$ – masena koncentracija spoja

$A (x)$ – površina pika spoja

$m (is)$ – masa internog standarda

$\gamma (is)$ – koncentracija internog standarda

$A (is)$ – površina pika internog standarda

$m (uz)$ – masa uzorka (masa ulja + masa internog standarda)

1000 – korekcija za izračun u mg/kg

3.2.3. Statističke metode

Za analizirane uzorke provedena je i statistička obrada podataka, točnije analiza varijance (ANOVA) s razinom vjerojatnosti 95 %, $p \leq 0,05$. Analizirane su dvije nezavisne varijable; temperatura i sorta te njihova interakcija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sastav hlapljivih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju ključan je aspekt koji određuje kvalitetu ulja i značajno utječe na njegove senzorske karakteristike. Korištenjem inovativnih tehnologija proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja pokušava se optimirati iskoristivost proizvodnog procesa te modulirati parametre od značaja za kvalitetu finalnog proizvoda.

Primarni cilj ovog istraživanja bio je provesti sveobuhvatnu analizu sastava hlapljivih spojeva, s posebnim naglaskom na ispitivanje utjecaja primjene ubrzanog toplinskog tretmana kao nove tehnologije na aktivaciju i popratne biokemijske procese endogenih enzima masline. Nadalje, kako bismo osigurali cjelovito razumijevanje utjecaja različitih temperaturnih režima na proizvodni proces, uzeli smo u obzir i potencijalne štetne posljedice koje mogu nastati primjenom takvih tretmana, procijenivši utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana ne samo na sastav hlapljivih komponenata dobivenih putem lipoksigenaze nego i oksidacijskim mehanizmima.

Istraživanje je provedeno analizom uzoraka te provođenjem kvantifikacije i identifikacije hlapljivih komponenti u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenih od autotoni hrvatskih sorti istarske bjelice, oblice, rosulje i levantinke. Dobiveni rezultati analize koncentracije hlapljivih komponenti dodatno su podvrgnuti statističkoj obradi podataka, odnosno analizi varijance. Ti su rezultati prikazani tablično za jednostavnu referencu i interpretaciju. Dodatno, predviđen je grafički prikaz kako bi se vizualno ilustrirala usporedba koncentracija hlapljivih spojeva u odnosu na različite čimbenike kao što su različite sorte, vrsta primijenjenog toplinskog tretmana ili biokemijsko podrijetlo spojeva, posebno naglašavajući razliku između lipoksigenaznog puta i oksidacijskih procesa.

Prema literaturnim podacima (Koprivnjak, 2006) preduvjet za razvitak poželjnih hlapljivih komponenata djevičanskog maslinovog ulja, koje obuhvaćaju pikantnost, umjerenu gorčinu, i miris po plodu masline kao i različitom zelenilu, voću, povrću, čine zdrav i optimalno zreo plod masline te proces prerade odrađen na korektan način. Ispunjeni preduvjeti rezultiraju sastavom hlapljivih komponenata koje čine 60 do 80 % aldehidi, alkoholi i esteri koji nastaju u nizu enzimskih reakcija zvanih lipoksigenazni put koje se odvijaju u vrijeme mljevena maslina i miješenja maslinovog tijesta, i to su:

1. C5 komponente arome:
 - a. 2-pental
 - b. 1-penten-3-on
 - c. 1-penten-3-ol
 - d. Z-2-penten-1-ol
 - e. E-2-penten-1-ol

2. C6 aldehidi:
 - a. Heksanal,
 - b. Z-3-heksenal
 - c. 2-heksenal

3. C6 alkoholi:
 - a. 1- heksanol
 - b. (Z)-3-heksen-1-ol
 - c. 2-heksen-1-ol

4. C6 esteri:
 - a. Heksil acetat
 - b. Z-3-heksenil acetat

Uz navedene spojeve kao produkt lipoksigenaznog puta Cecchi i sur. (2021) navode i 2-heksenil acetat. Dalje, prema Silva i sur. (2022) 2-heksen-1-ol i (Z)-3-heksen-1-ol imaju slična retencijska vremena kao i 2-hexenal što može predstavljati zapreku u procesu identifikacije uzimajući u obzir činjenicu da je (E)-2-heksenal najzastupljenija komponenta hlapljivih tvari visoko kvalitetnih djevičanskih maslinovih ulja. Slijedeći navedeno, analiza uzoraka djevičanskog maslinovog ulja bjelice, oblice, rosulje i levantinke pokazala je podudaranje sa literaturom osim u slučaju heksanala, (Z)-3-heksen-1-ola i Z-3-heksenil acetata koji nisu detektirani, a rezultati analize prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije hlapljivih komponenata u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja

Sorta: Bjelica							
Broj uzorka:	1	2	3	4	5	6	7
Spoj / Uzorak*	kontrola	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1-penten-3-ol	1,88±0,23	1,55±0,15	1,42±0,27	1,96±0,11	1,67±0,05	1,42±0,09	1,32±0,08
1-penten-3-on	5,78±0,60	3,87±0,44	4,39±0,84	5,13±1,21	5,12±0,29	4,80±0,41	4,67±0,36
(E)-2-penten-1-ol	0,18±0,01	0,12±0,02	0,12±0,03	0,21±0,06	0,16±0,01	0,14±0,02	0,13±0,01
(Z)-2-penten-1-ol	1,81±0,22	1,42±0,20	1,23±0,27	1,85±0,10	1,61±0,06	1,30±0,11	1,26±0,05
Z-3-heksenal	2,84±0,32	2,23±0,23	1,85±0,45	2,23±0,23	2,21±0,12	1,94±0,16	2,35±0,11
3-heksen-1-ol	1,55±0,24	1,20±0,16	0,95±0,18	1,76±0,75	1,42±0,22	0,91±0,13	1,21±0,05
2-heksen-1-ol	0,10±0,01	0,08±0,01	0,08±0,02	0,05±0,05	0,11±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01
1-heksanol	0,48±0,06	0,36±0,03	0,31±0,07	1,11±1,12	0,46±0,02	0,35±0,03	0,38±0,05
4-Oksoheks-2-enal	0,41±0,06	0,31±0,21	0,34±0,07	0,29±0,09	0,35±0,05	0,34±0,05	0,40±0,04
3-heksenil acetate	5,29±2,69	5,02±0,35	3,71±1,14	3,34±0,12	5,44±0,36	4,06±0,93	3,34±0,48
heksil acetate	1,99±0,24	1,60±0,18	1,45±0,41	1,66±0,04	1,81±0,08	1,52±0,20	1,37±0,14
2-heksenil acetate	0,13±0,02	0,05±0,06	0,01±0,03	nd	0,10±0,01	0,05±0,04	0,02±0,04
3-metilbutanal	0,04±0,03	0,01±0,02	0,04±0,02	0,16±0,01	0,07±0,00	0,07±0,01	0,08±0,01
2-metilbutanal	0,08±0,01	0,06±0,01	0,08±0,02	0,28±0,01	0,11±0,01	0,11±0,02	0,13±0,01
pentanal	0,69±0,26	0,37±0,05	0,54±0,09	1,92±1,14	0,58±0,14	0,70±0,13	0,49±0,20
2-pentenal	0,20±0,04	0,13±0,02	0,14±0,05	0,17±0,06	0,20±0,02	0,18±0,03	0,19±0,02
2-metil-4-pentenal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-heksenal	6,77±0,62	5,38±0,91	4,06±0,74	11,50±1,37	6,36±0,28	4,75±0,48	5,87±0,63
2,4-heksadienal	0,75±0,13	0,67±0,11	0,49±0,19	0,65±0,20	0,55±0,17	0,51±0,21	0,56±0,17
(E) 2-heptenal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nonanal	0,15±0,02	0,13±0,02	0,17±0,05	0,11±0,01	0,20±0,03	0,16±0,01	0,19±0,03

*opis uzoraka nalazi se u tablici 2

Sorta: Levantinka							
Broj uzorka:	8	9	10	11	12	13	14
Spoj / Uzorak*	kontrola	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1-penten-3-ol	1,49±0,05	1,40±0,08	1,41±0,15	1,51±0,13	1,50±0,11	1,60±0,18	1,31±0,14
1-penten-3-on	4,52±0,12	4,37±0,28	3,83±0,56	3,63±1,16	4,50±0,27	3,44±1,41	4,16±0,52
(E)-2-penten-1-ol	0,14±0,01	0,13±0,01	0,24±0,20	0,19±0,07	0,13±0,01	0,30±0,21	0,12±0,02
(Z)-2-penten-1-ol	1,52±0,02	1,58±0,07	1,52±0,15	1,67±0,19	1,53±0,10	1,53±0,11	1,40±0,15
Z-3-heksenal	5,62±0,99	7,85±2,96	7,58±3,35	5,85±1,32	5,97±0,44	4,92±3,27	6,11±1,05
3-heksen-1-ol	1,72±0,72	1,62±0,80	1,54±1,41	5,12±5,96	1,86±0,61	2,00±2,83	2,41±0,52
2-heksen-1-ol	0,05±0,03	0,03±0,03	0,06±0,05	0,04±0,04	0,07±0,04	5,70±7,12	0,10±0,02
1-heksanol	0,02±0,03	0,09±0,01	0,10±0,07	0,06±0,05	0,07±0,01	0,60±0,63	0,11±0,03
4-Oksoheks-2-enal	2,50±0,13	2,98±0,42	1,99±1,19	2,20±0,51	2,41±0,17	1,68±1,21	2,58±0,40
3-heksenil acetate	0,24±0,07	0,94±1,04	0,31±0,06	0,30±0,08	0,83±1,04	0,25±0,08	0,32±0,11
heksil acetate	0,08±0,01	0,10±0,03	0,13±0,02	0,11±0,04	0,06±0,03	0,10±0,01	0,12±0,04
2-heksenil acetate	0,17±0,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-metilbutanal	0,06±0,01	0,00±0,00	0,03±0,03	0,03±0,03	0,04±0,03	0,03±0,04	0,05±0,03
2-metilbutanal	0,06±0,00	0,01±0,02	0,02±0,03	0,04±0,03	0,06±0,03	0,05±0,04	0,06±0,03
pentanal	0,53±0,46	0,34±0,08	0,79±0,70	0,70±0,60	0,35±0,06	1,13±0,91	0,39±0,05
2-pental	0,39±0,03	0,41±0,10	0,23±0,12	0,27±0,21	0,39±0,09	0,23±0,18	0,31±0,08
2-metil-4-pental	2,45±0,22	2,14±1,06	0,40±0,94	2,02±1,12	2,30±0,20	1,28±1,11	2,10±0,10
2-heksenal	23,74±0,85	23,45±1,14	20,25±1,44	21,40±5,83	23,91±0,66	20,59±3,95	19,94±2,18
2,4-heksadienal	2,92±0,35	2,41±0,40	2,27±1,10	2,38±0,79	2,62±0,23	1,45±1,43	2,74±0,42
(E) 2-heptenal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nonanal	0,15±0,02	0,19±0,02	0,19±0,02	0,13±0,02	0,18±0,02	0,20±0,03	0,22±0,04

*opis uzoraka nalazi se u tablici 2

Sorta: Oblica							
Broj uzorka:	15	16	17	18	19	20	21
Spoj / Uzorak*	kontrola	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1-penten-3-ol	1,42±0,30	1,59±0,12	1,62±0,10	1,40±0,05	1,52±0,12	1,41±0,03	1,33±0,08
1-penten-3-on	4,92±0,36	4,56±0,46	4,50±0,28	3,44±1,10	4,79±0,28	5,34±0,29	4,95±0,34
(E)-2-penten-1-ol	0,14±0,06	0,12±0,01	0,35±0,55	0,12±0,02	0,13±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01
(Z)-2-penten-1-ol	1,30±0,09	1,44±0,11	2,80±3,25	1,29±0,06	1,29±0,05	1,41±0,02	1,30±0,09
Z-3-heksenal	8,07±2,08	12,45±2,17	9,19±3,53	7,00±2,08	6,49±1,00	8,23±0,53	6,71±0,59
3-heksen-1-ol	2,32±0,94	1,30±0,41	1,64±0,46	4,41±3,99	1,63±0,26	1,25±0,34	1,01±0,12
2-heksen-1-ol	nd	nd	nd	0,34±0,53	0,00±0,00	nd	nd
1-heksanol	nd	nd	nd	0,43±0,66	0,04±0,05	0,06±0,04	0,04±0,04
4-Oksoheks-2-enal	4,87±1,91	5,17±0,62	4,11±0,08	2,67±0,62	2,95±0,17	3,12±0,35	2,37±0,20
3-heksenil acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
heksil acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-heksenil acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-metilbutanal	0,01±0,02	0,04±0,03	0,05±0,02	0,08±0,01	nd	nd	nd
2-metilbutanal	0,03±0,03	0,07±0,04	0,07±0,01	0,12±0,02	nd	nd	nd
pentanal	0,24±0,12	0,17±0,06	0,40±0,13	0,62±0,55	0,48±0,03	0,49±0,04	0,46±0,04
2-pental	0,38±0,07	0,34±0,06	0,32±0,06	0,23±0,10	0,34±0,05	0,33±0,03	0,39±0,03
2-metil-4-pental	3,41±0,89	3,25±0,22	2,37±1,16	2,89±0,25	2,27±0,16	2,44±0,12	2,17±0,22
2-heksenal	7,77±1,65	9,98±0,86	7,42±0,58	7,80±1,45	6,96±0,21	7,02±0,29	6,32±0,72
2,4-heksadienal	5,35±0,84	5,47±0,82	4,53±0,31	3,96±0,82	3,52±0,59	3,65±0,34	3,09±0,24
(E) 2-heptenal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nonanal	0,15±0,05	0,13±0,05	0,19±0,02	0,15±0,02	0,14±0,02	0,15±0,00	0,12±0,01

*opis uzoraka nalazi se u tablici 2

Sorta: Rosulja							
Broj uzorka:	22	23	24	25	26	27	28
Spoj / Uzorak*	kontrola	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C **	35 °C **	40 °C **
1-penten-3-ol	1,13±0,11	1,36±0,13	1,41±0,08	1,22±0,12	1,20±0,09	1,13±0,09	0,93±0,05
1-penten-3-on	4,90±0,19	5,67±0,19	4,71±0,80	4,61±0,53	3,45±0,32	2,23±0,16	2,15±0,51
(E)-2-penten-1-ol	0,12±0,01	0,14±0,02	0,14±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01	0,13±0,01	0,14±0,07
(Z)-2-penten-1-ol	1,25±0,06	1,55±0,10	1,51±0,12	1,35±0,14	1,22±0,08	1,14±0,07	0,95±0,05
Z-3-heksenal	5,70±0,89	7,67±1,03	5,17±1,69	4,32±0,89	1,44±0,11	3,27±0,11	2,47±0,80
3-heksen-1-ol	3,00±0,46	2,86±0,59	3,75±0,79	4,22±0,71	3,21±0,24	3,33±0,33	3,36±0,61
2-heksen-1-ol	0,00±0,00	0,00±0,00	0,14±0,27	0,04±0,04	0,13±0,04	0,34±0,03	0,59±0,91
1-heksanol	0,77±0,04	2,23±3,26	1,11±0,30	1,16±0,19	0,65±0,08	0,79±0,07	0,76±0,10
4-Oksoheks-2-enal	1,89±0,10	2,59±0,38	1,72±0,60	1,48±0,25	0,45±0,03	0,20±0,06	0,46±0,18
3-heksenil acetate	1,28±0,07	1,48±0,25	1,41±0,46	1,65±0,25	0,76±0,06	0,37±0,02	0,75±0,13
heksil acetate	0,33±0,02	0,40±0,08	0,38±0,10	0,43±0,06	0,24±0,01	0,10±0,01	0,17±0,03
2-heksenil acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-metilbutanal	0,01±0,02	0,01±0,02	0,07±0,05	0,09±0,02	0,23±0,04	0,33±0,04	0,12±0,03
2-metilbutanal	0,07±0,03	0,04±0,05	0,12±0,04	0,13±0,03	0,40±0,06	0,58±0,05	0,18±0,04
pentanal	0,62±0,06	0,60±0,07	0,68±0,09	0,63±0,12	0,58±0,14	0,63±0,24	0,74±0,43
2-pental	0,25±0,02	0,29±0,02	0,29±0,07	0,29±0,03	0,25±0,02	0,28±0,02	0,26±0,09
2-metil-4-pental	2,26±0,21	2,81±0,50	2,76±0,19	2,15±0,21	2,08±0,21	nd	1,89±1,48
2-heksenal	5,42±0,88	7,04±3,90	15,43±6,07	11,40±0,24	19,34±2,14	20,75±1,19	6,50±0,95
2,4-heksadienal	2,54±0,27	2,38±1,07	2,10±0,61	2,06±0,42	1,24±0,19	0,82±0,37	0,98±0,30
(E) 2-heptenal	nd	nd	nd	nd	nd	0,08±0,05	0,04±0,03
nonanal	0,20±0,02	0,25±0,06	0,40±0,06	0,34±0,02	0,41±0,03	0,95±0,04	0,58±0,06

*opis uzoraka nalazi se u tablici 2

**uzorci proizvedeni uz toplinski tretman

Sorta: Oblica			
Broj uzorka:	29	30	31
Spoj / Uzorak*	30 °C **	35 °C **	40 °C **
1-penten-3-ol	1,42±0,12	1,29±0,11	0,92±0,42
1-penten-3-on	2,46±0,93	3,31±0,42	2,30±0,71
(E)-2-penten-1-ol	0,17±0,05	0,09±0,02	0,11±0,05
(Z)-2-penten-1-ol	1,39±0,11	1,26±0,14	1,05±0,09
Z-3-heksenal	5,12±1,89	5,25±0,57	2,55±0,46
3-heksen-1-ol	7,49±5,23	2,41±0,46	2,23±0,53
2-heksen-1-ol	1,73±1,61	0,00±0,00	0,39±0,62
1-heksanol	0,24±0,29	0,01±0,02	nd
4-Oksheks-2-enal	1,86±0,56	1,98±0,27	1,12±0,18
3-heksenil acetate	nd	nd	nd
heksil acetate	nd	nd	nd
2-heksenil acetate	nd	nd	nd
3-metilbutanal	0,09±0,05	0,10±0,01	0,10±0,03
2-metilbutanal	0,16±0,05	0,15±0,01	0,14±0,03
pentanal	0,81±0,59	0,29±0,04	0,58±0,65
2-pental	0,19±0,11	0,27±0,04	0,24±0,04
2-metil-4-pental	2,55±0,68	2,68±0,06	2,82±0,24
2-heksenal	7,72±2,75	8,23±0,57	10,26±1,83
2,4-heksadienal	3,03±0,96	3,37±0,17	2,46±0,37
(E) 2-heptenal	nd	nd	0,08±0,07
nonanal	0,13±0,01	0,19±0,03	0,22±0,03

*opis uzoraka nalazi se u tablici 2

**uzorci proizvedeni uz toplinski tretman

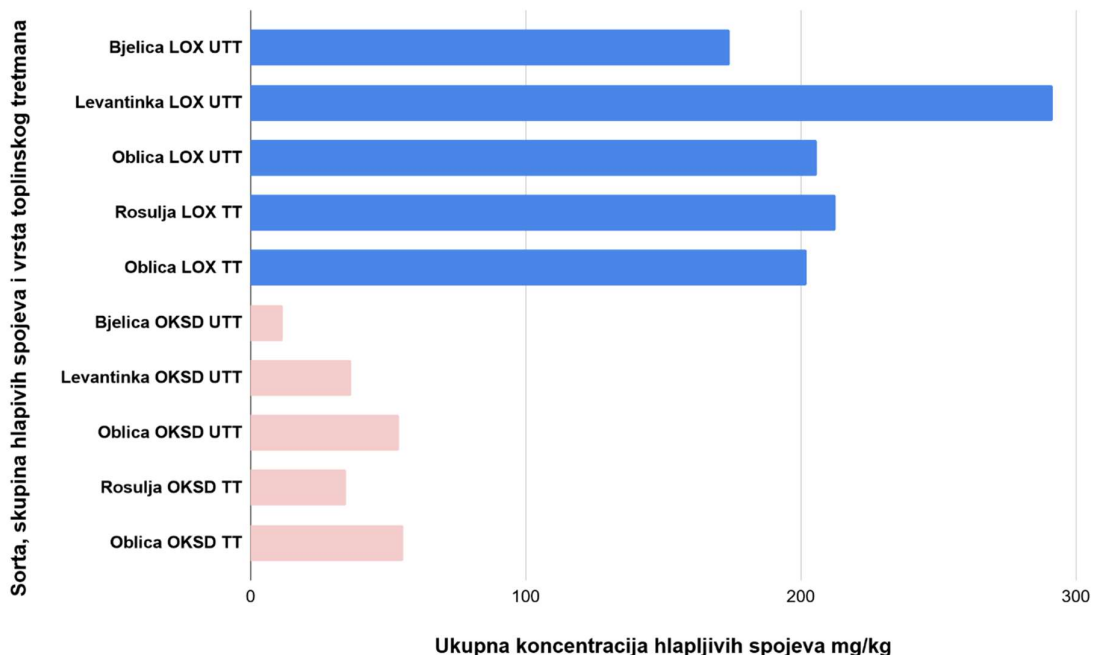
Lipoksigenazni put nije jedini sustav reakcija odgovornih za nastanak hlapljivih komponenti djevičanskog maslinovog ulja, već su to i oksidativni procesi kao i mikrobiološka aktivnost koja je većinom rezultat nepravilnog skladištenja maslina prije obrade ili skladištenja nefiltriranog djevičanskog maslinovog ulja. Tako 2-metilbutanal nastaje kao produkt enzimske aktivnosti iz izoleucina dok 3-metilbutanal potječe iz leucina. Put nastajanja tih aldehida objašnjen je upravo kao rezultat mikrobiološke aktivnosti plijesni i drugih mikroorganizama

tijekom anaerobne fermentacije u periodu prije samog mljevenja maslina tijekom predugog čekanja maslina na sam proces mljevenja. Takva ulja dakle imaju manu koja se očituje mirisom i okusom po talogu. (Cecchi i sur., 2021). Angerosa i sur. (2004.) pak navode da proizvodnja 2-metilbutanala i 3-metilbutanala može biti i rezultatom razvoja temperature tijekom malaksacije koja pogoduje pretvorbi aminokiselina.

Eventualni problem u razlučivanju neželjenih procesa poput oksidacije koja se može odvijati u ulju nastaje promatranjem komponenti koje nisu kao produkt specifične samo za jednu od reakcija. Kao primjer možemo navesti heksanal koji je produkt lipoksigenaznog puta, ali može nastati i kao produkt oksidacije. Navedena nespecifičnost također može biti i razlog dvojakog djelovanja određenih hlapljivih komponenti na aromu djevičanskog maslinovog ulja pa tako heksanol (koje nastaje djelovanjem alkohol dehidrogenaze na već navedeni heksanal) može imati pozitivan ili negativan utjecaj na aromu (Cecchi i sur., 2021).

Razvitak poželjnih mirisnih svojstava nije određen samim prisustvom nekog od navedenih spojeva već ovisi o više faktora kao što su maseni udjeli spoja koji ovise o sorti, vrsta i koncentracija enzima u plodu masline, koncentracije pragova detekcije te sinergistički učinak ostalih prisutnih hlapljivih tvari. U pogledu utjecaja na aromu, možemo reći da neki spojevi imaju značajniji doprinos i u tu grupu pripadaju heksanal, Z-3-heksenal i heksenal. Heksanol pak ima manji značaj, dok spojevi poput C6 estera i C5 komponenti imaju sinergističku ulogu u izgradnji arome ulja uz izuzetak 1-penten-3-ona koji samostalno pridonosi poželjnoj aromi ulja (Koprivnjak O, 2006).

Kako bi se usporedile ukupne koncentracije nastalih hlapljivih spojeva za pojedinu sortu i način toplinskog tretmana, izrađen je graf (slika 2) gdje je vidljivo kako ubrzanim toplinskim tretmanom za sortu bjelica, oblica i levantinka nastaje neznatno više spojeva lipoksigenaznog puta, u odnosu na sorte tretirane toplinskim procesom (rosulja, oblica), osim u slučaju bjelice. Može se pretpostaviti da je razlog tomu činjenica da je bjelica sorta koja kasnije dozrijeva pa su enzimi lipoksigenaznog puta slabije aktivni. Također, u slučaju oblice tretirane toplinskim procesom nastaje manje spojeva lipoksigenaznog puta u odnosu na rosulju tretiranu toplinskim procesom zbog razlike u njihovom geografskom podrijetlu. Naime, oblica je dalmatinska sorta, a rosulja istarska. Dalmatinsko područje karakteriziraju više prosječne temperature kroz godinu nego Istru (DHMZ a, 2023), a viša temperatura tijekom razvoja ploda masline negativno će utjecati na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta, kako je opisano u radovima Inglese i sur., (2010) te Romero i sur. (2016).



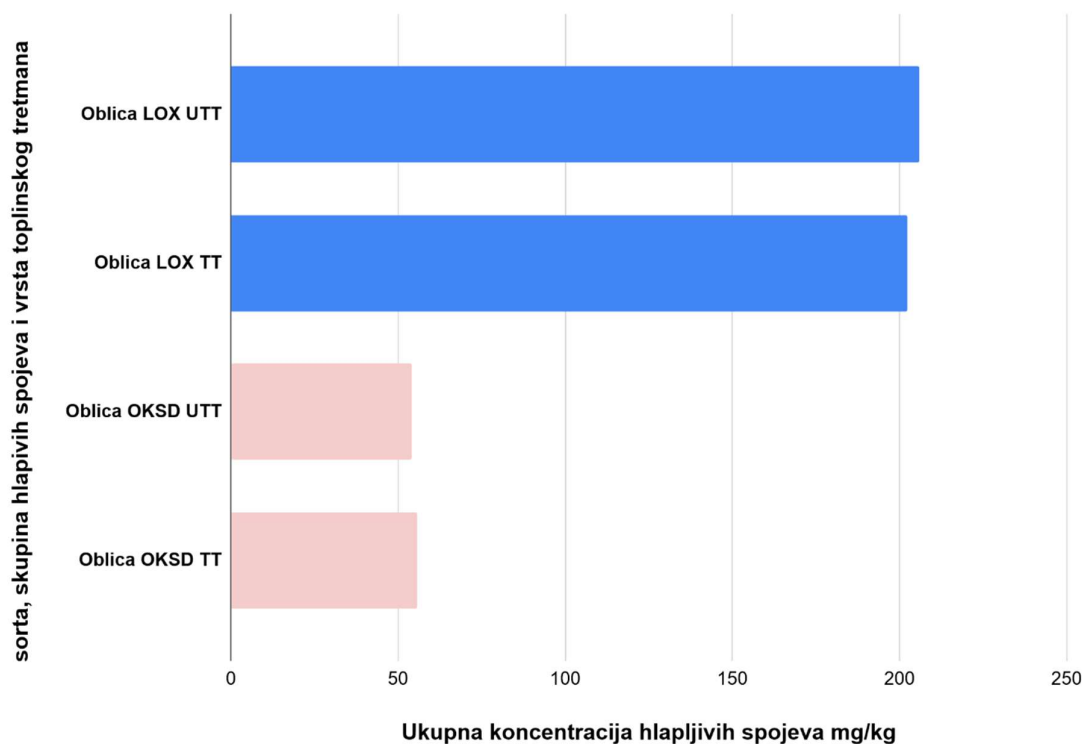
LOX – produkti lipoksigenaznog puta, OKSD – produkti oksidacije, UTT – ubrzani toplinski tretman, TT – toplinski tretman

Slika 2. Prikaz ukupnih koncentracija hlapljivih spojeva ovisno o sorti i toplinskom tretmanu

Prikazani rezultati podudaraju se s rezultatima istraživanja Lukić i sur. (2019) gdje je navedeno kako sorta ima utjecaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta. Odnosno, istarske sorte rosulja i bjelica imaju više koncentracije hlapljivih spojeva lipoksigenaznog puta u odnosu na dalmatinsku oblicu, no rosulja ima veće vrijednosti koncentracija u odnosu na bjelicu. Zaključno, upotreba ubrzanog toplinskog procesa, više će pogodovati nastanku spojeva lipoksigenaznog puta, osim u slučaju rosulje, sorte koja zbog svojeg geografskog područja uzgoja ima veću tendenciju za stvaranje produkata lipoksigenaznog puta. No, razlika između primjenjenog toplinskog tretmana i ubrzanog toplinskog procesa nije toliko značajna da bi se predložila proizvodnja isključivo ubrzanim toplinskim procesom, pogotovo kada se uzme u obzir odabir prave sorte koja neovisno o tretmanu pokazuje veće ukupne koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta u odnosu na sorte tretirane ubrzanim toplinskim procesom. Objašnjenje ukupne koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta koja je nastala kod sorte levantinka nije spomenuto u istraživanjima, pa se ne može sa sigurnošću zaključiti zbog čega kod nje nastaju naveće koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta, osim zbog primjenjene metode ubzanog toplinskog procesa. Kako bi se to sa sigurnošću moglo zaključiti, potrebno je provesti

istraživanje gdje će se koristiti sorta levantinka koja će biti tretirana ubrzanim toplinskim procesom i toplinskim procesom te usporediti vrijednosti koncentracija hlapljivih spojeva.

Nadalje, iz grafa je vidljivo kako je upotreba ubrzanog toplinskog procesa rezultirala niskim koncentracijama produkata oksidacije u odnosu na sorte koje su tretirane toplinskim procesom. Kako istraživanje nije provedeno primjenom obje vrste toplinskih tretmana na svim sortama, upitno je da li su ti rezultati ovisni o samom toplinskom tretmanu ili o sorti. Ipak, posebno je vidljiva razlika između istarske bjelice tretirane ubrzanim toplinskim tretmanom i rosulje i oblice koje su tretirane toplinskim procesom, prema čemu bi bilo moguće pretpostaviti da će upotreba ubrzanog toplinskog procesa smanjit vjerojatnost nastanka produkata oksidacije u odnosu na toplinski tretman. Kako bi se pobliže usporedila isplativost oba tretmana, konstruiran je graf (slika 3) kojim se uspoređuju ukupne koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta i produkata oksidacije sorte oblica, koja je tretirana ubrzanim toplinskim procesom i toplinskim procesom.

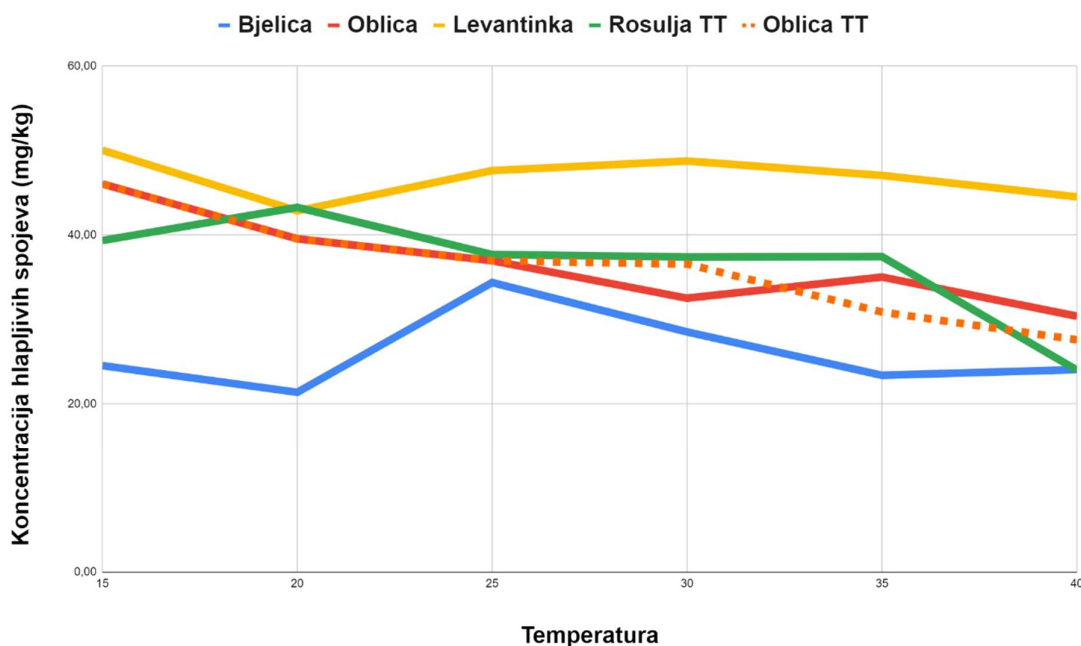


LOX – produkti lipoksigenaznog puta, OKSD – produkti oksidacije, UTT – ubrzani toplinski tretman, TT – toplinski tretman

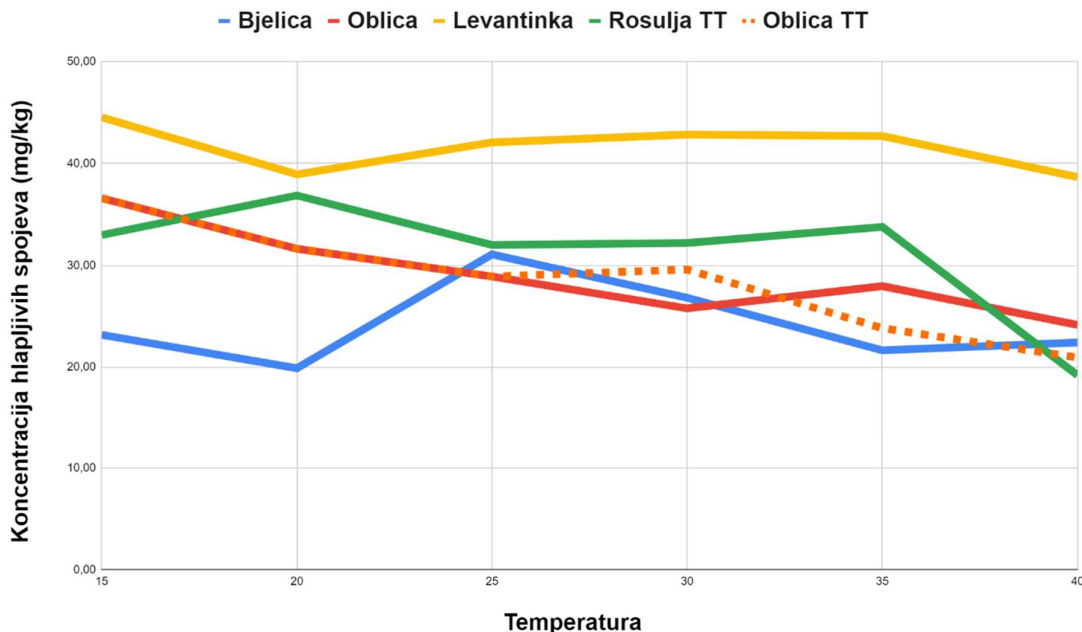
Slika 3. Usporedba utjecaja toplinskog tretmana na nastanak hlapljivih spojeva sorte oblica

Iz grafa je vidljivo kako pri ubrzanom toplinskom tretmanu nastaje za 1,74 % više spojeva lipoksigenaznog puta u odnosu na toplinski tretman. Također, toplinskim tretmanom nastaje 3.06 % više produkata oksidacije, s obzirom da se tijekom toplinskog tretmana tijesto zagrijava dulje vrijeme na pojedinoj temperaturi, što i pogoduje nastanku produkata oksidacije. No, razlika ukupnih koncentracija spojeva nastalih lipoksigenaznim putem te spojeva oksidacije nije toliko značajna da bi se moglo sa sigurnošću zaključiti da je ubrzani toplinski tretman poželjniji i isplativiji. Potrebno je provesti daljnje istraživanje gdje bi se utjecaj nastanka hlapljivih spojeva ubrzanim i toplinskim procesom ispitao kod ostalih sorti maslina.

Kako bi se utvrdila optimalna temperatura toplinskog tretmana tijesta tijekom proizvodnje ulja, te kako bi se vidjelo na kojoj temperaturi nastaje najviše hlapljivih spojeva, odnosno spojeva lipoksigenaznog puta te produkata oksidacije, izrađeni su grafovi (slika 4, 5 i 6).



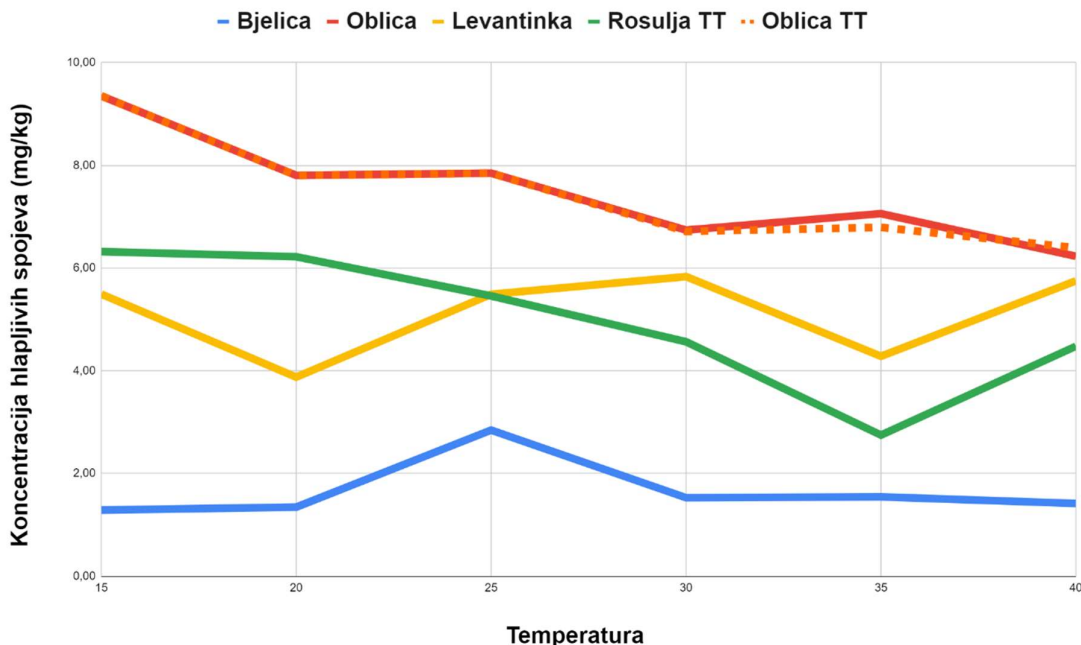
Slika 4. Ovisnost ukupne koncentracije hlapljivih spojeva o temperaturi za pojedinu sortu (bjelica, oblica i levantinka, te rosulja i oblica proizvedene toplinskim tretmanom)



Slika 5. Ovisnost ukupne koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta o temperaturi za pojedine sorte (bjelica, oblica i levantinka, te rosulja i oblica proizvedene toplinskim tretmanom)

Iz grafa možemo zaključiti kako je optimalna temperatura za tretman tijesta bjelice 25 °C, jer nam na toj temperaturi nastaje najviše hlapljivih spojeva, odnosno najviše spojeva lipoksigenaznog puta (slika 5). Kod oblice se može vidjeti kako najviše spojeva lipoksigenaznog puta nastaje pri 15 °C. Porastom temperature koncentracija spojeva lipoksigenaznog puta pada kod primjene toplinskog tretmana dok kod primjene ubrzanog toplinskog tretmana pokazuje lagani rast što je i najvidljivije na temperaturi od 30 °C. Za proizvodnju ulja od sorte levantinka, prema dobivenim rezultatima najpogodnija je temperatura od 35 °C, a za sortu rosulja 20 °C jer pri tim temperaturama nastaje najviše spojeva lipoksigenaznog puta.

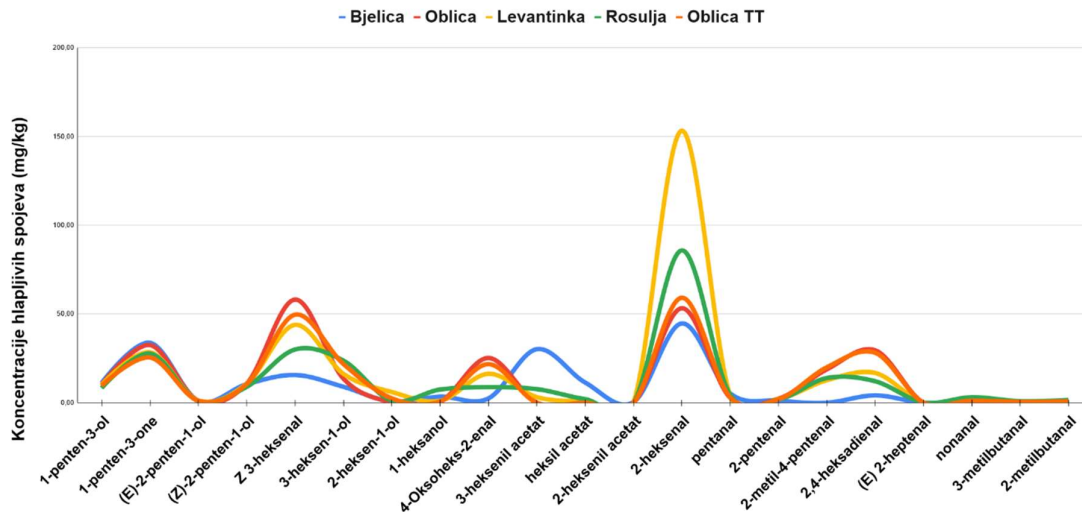
Na slici 6 prikazana je ovisnost ukupne koncentracije produkata oksidacije o temperaturi za ispitivane sorte bjelica, oblica, levantinka, te rosulja i oblica proizvedene toplinskim tretmanom.



Slika 6. Ovisnost koncentracije ukupnih produkata oksidacije o temperaturi za sorte bjelica, oblica, levantinka te rosulja i oblica proizvedene toplinskim tretmanom

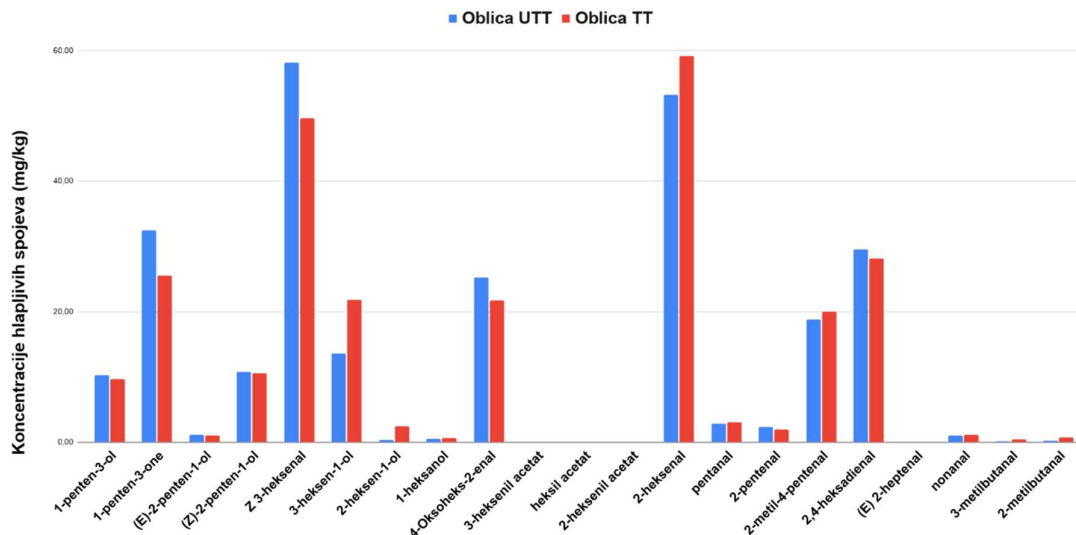
Iz prikazanog grafa (slika 6) vidljivo je kako se kod bjelice razvilo najmanje produkata oksidacije. Obzirom da je prilikom ispitivanja korišten ubrzani toplinski tretman koji pogoduje nastanku spojeva lipoksigenaznog puta, a smanjuje vjerojatnost nastanka produkata oksidacije, moguće je da je isto razlog takvim rezultatima. Prema navedenim rezultatima može se zaključiti da je od svih sorti djevičansko ulje bjelice najstabilnije. Nadalje, vidljivo je kako se povećanjem temperature tretmana kod oblice u oba slučaja (UTT i TT) smanjuje koncentracija nastalih produkata oksidacije. Kod sorte levantinka najmanja koncentracija produkata oksidacije nastaje pri temperaturi od 20 °C. Sorta rosulja pokazuje trend smanjenja nastanka produkata oksidacije sve do 35 °C, a na 40 °C ponovo raste.

Rezultati nastalih ukupnih koncentracija u ovisnosti o sorti i toplinskom tretmanu prikazani su grafički (slika 7 i 8).



Slika 7. Ovisnost ukupne koncentracije hlapljivih spojeva o sorti i toplinskom tretmanu (bjelica, oblica, levantinka, te rosulja i oblica proizvedene toplinskim tretmanom)

Na prikazanom grafu (slika 7) vidljive su ukupne koncentracije hlapljivih komponenata u odnosu na sve korištene sorte. Iz prikazanog, moguće je zaključiti kako je koncentracija 2-heksenala najviša u odnosu na sve analizirane spojeve, kod sve 4 ispitane sorte, a najveća koncentracija je izmjerena kod levantinke. Prema literaturi (Silva i sur., 2021) visoka koncentracija 2-heksenala je indikator kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja. Kod oblice je izmjerena najviša koncentracija Z 3-heksenala. Najveća ukupna koncentracija 1-penten-3-ona te estera 3-hexenil acetata i heksil acetata izmjerena je kod bjelice, što se podudara s rezultatima rada Lukić i sur. (2019). Najviša koncentracija spojeva oksidacije 2-metil-4-penterala i 2,4-heksadienala izmjerena je kod oblice, a nešto viša koncentracija nastala je kod oblice tretirane toplinskim tretmanom u odnosu na oblicu tretiranu ubrzanim toplinskim tretmanom. Ukupno je najviša koncentracija estera detektirana kod sorte istarska bjelica, što se podudara s podacima iz rada Lukić i sur. (2019), gdje je uspoređivana koncentracija estera kod sorti istarska bjelica, buža, oblica, lastovka, rosinjola i leccino.



Slika 8. Ovisnost ukupne koncentracije hlapljivih spojeva o toplinskom tretmanu (oblica tretirana ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom)

Usporedbom dva toplinska procesa, iz rezultata (slika 8) možemo zaključiti kako će primjenom ubrzanog toplinskog procesa nastati više spojeva lipoksigenaznog puta (1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, (E)-2-penten-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol, Z-3-heksenal, 3-heksen-1-ol, 2-heksen-1-ol, 1-heksanol, 4-Oksiheks-2-enal, 3-heksenil acetate, heksil acetate, 2-heksenil acetat, 2-heksenal), osim u slučaju 3-heksen-1-ola i 2-hexenala čija je izmjerena koncentracija viša kod oblice koja je tretirana toplinskim tretmanom. Važno je napomenuti kako esteri 3-heksenil acetat, heksil acetat i 2-heksenil acetat nisu detektirani kod oblice. Dobiveni rezultati ne podudaraju se s istraživanjem Lukić i sur. (2019), gdje su detektirane koncentracije heksil acetata, 3-heksenil acetata i 2-heksenil acetata, no od svih analiziranih sorti (buža, istarska bjelica, oblica, rosinjola, lastovka i leccino), kod oblice su najmanje. Također, primjenom toplinskog procesa nastaje veća koncentracija spojeva oksidacije u odnosu na primjenu ubrzanog toplinskog procesa.

Tablica 4. Utjecaj primjene različitih toplinskih tretmana na ukupne koncentracije hlapljivih spojeva u sortama bjelica, oblica, levantinka i rosulja

Spoj	Ubrzani toplinski tretman				Toplinski tretman			
	bjelica	oblica	levantinka	značaj	rosulja	značaj	oblica	značaj
1-penten-3-ol	11,21	10,28	10,21	<i>cgk</i>	8,37	<i>cgl</i>	9,65	<i>bm</i>
1-penten-3-on	33,76	32,49	28,44	<i>afl</i>	27,70	<i>chl</i>	25,49	<i>do</i>
(E)-2-penten-1-ol	1,06	1,14	1,25	<i>dhl</i>	0,90	<i>dhl</i>	1,10	<i>bm</i>
(Z)-2-penten-1-ol	10,47	10,82	10,74	<i>dhl</i>	8,97	<i>dhl</i>	10,54	<i>bms</i>
Z 3-heksenal	15,65	58,13	43,90	<i>agl</i>	30,03	<i>cgl</i>	49,64	<i>bo</i>
3-heksen-1-ol	8,99	13,56	16,27	<i>dhl</i>	23,73	<i>dhl</i>	21,81	<i>dm</i>
2-heksen-1-ol	0,59	0,34	6,05	<i>dhl</i>	1,23	<i>dhl</i>	2,46	<i>dp</i>
1-heksanol	3,44	0,56	1,05	<i>dgl</i>	7,47	<i>dgl</i>	0,68	<i>dp</i>
4-Oksheks-2-enal	2,43	25,24	16,33	<i>bgi</i>	8,79	<i>cgi</i>	21,77	<i>bo</i>
3-heksenil acetat	30,20	nd	3,18	<i>agl</i>	7,68	<i>cgk</i>	nd	
heksil acetat	11,40	nd	0,71	<i>agi</i>	2,05	<i>cgk</i>	nd	
2-heksenil acetat	0,37	nd	0,17	<i>cfi</i>	nd		nd	
2-heksenal	44,68	53,26	153,28	<i>bgi</i>	85,86	<i>cgk</i>	59,18	<i>dm</i>
pentanal	5,29	2,84	4,23	<i>bel</i>	4,47	<i>del</i>	3,09	<i>dp</i>
2-pentenal	1,21	2,32	2,21	<i>dgl</i>	1,89	<i>dhl</i>	1,96	<i>do</i>
2-metil-4-pentenal	nd	18,80	12,69	<i>bgi</i>	13,94	<i>bgi</i>	19,97	<i>dm</i>
2,4-heksadienal	4,16	29,55	16,79	<i>bgi</i>	12,12	<i>cgl</i>	28,16	<i>dp</i>
(E) 2-heptenal	nd	nd	nd		0,12	<i>chj</i>	0,08	<i>amr</i>
nonanal	1,11	1,03	1,25	<i>bff</i>	3,12	<i>cgk</i>	1,16	<i>ans</i>
3-metilbutanal	0,47	0,17	0,23	<i>cgk</i>	0,86	<i>cgk</i>	0,47	<i>do</i>
2-metilbutanal	0,83	0,29	0,30	<i>cgk</i>	1,53	<i>cgk</i>	0,74	<i>do</i>

a – $p < 0,05$ za parametar temperature, **b** – $p < 0,01$ za parametar temperature, **c** – $p < 0,001$ za parametar temperature, **d** – $p > 0,05$ za parametar temperature, **e** – $p < 0,05$ za parametar sorte, **f** – $p < 0,01$ za parametar sorte, **g** – $p < 0,001$ za parametar sorte, **h** – $p > 0,05$ za parametar sorte, **i** – $p < 0,05$ za parametar interakcije temperature i sorte, **j** – $p < 0,01$ za parametar interakcije temperature i sorte, **k** – $p < 0,001$ za parametar interakcije temperature i sorte, **l** – $p > 0,05$ za parametar interakcije temperature i sorte, **m** – $p < 0,05$ za parametar načina zagrijavanja, **n** – $p < 0,01$ za parametar načina zagrijavanja, **o** – $p < 0,001$ za parametar načina zagrijavanja, **p** – $p > 0,05$ za parametar načina zagrijavanja, **r** – $p < 0,05$ za interakciju temperature i načina zagrijavanja, **s** – $p < 0,01$ za interakciju temperature i načina zagrijavanja ***nd** – nije detektirano.

U tablici 4 prikazani su rezultati provedene analize varijance za sorte tretirane ubrzanim toplinskim procesom (bjelica, oblica i levantinka), toplinskim procesom (rosulja, oblica) te usporedba ubrzanog toplinskog procesa i toplinskog procesa za sortu oblica.

Iz analize podataka za sorte tretirane ubrzanim toplinskim procesom zaključeno je sljedeće: parametar temperature pokazuje dvojak utjecaj na produkte lipoksigenaznog puta u sortama tretiranim ubrzanim toplinskim tretmanom gdje možemo primjetiti statistički značajan utjecaj na spojeve 1-penten-3-on, Z 3-heksenal, 3-heksenil acetat, heksil acetat, visoko statistički značajan utjecaj na spojeve 4-oksoheks-2-enal, 2-heksenal, pentanal, 2-metil-4-pentenal, 2,4 heksadienal, nonanal gdje su većinom zastupljeni spojevi oksidacije, zatim visoko statistički značajan utjecaj na visokoj razini za spojeve 1-penten-3-ol, 2-heksenil acetat i 3-metilbutanal te 2-metilbutanal. Dakle na produktima oksidacije primjećen utjecaj temperature može se okarakterizirati kao visoko značajan do visoko statistički značajan na visokoj razini. Drugim riječima, stvaranje spojeva oksidacije izravno je rezultat utjecaja temperature. Isto potvrđuju rezultati analiza sorti rosulja i oblica koje su tretirane toplinskim tretmanom gdje je maslinovo tijesto dulje bilo izloženo utjecaju temperature.

Parametar sorte koje su tretirane ubrzanim toplinskim procesom ne pokazuje statistički značaj na utjecaj nastanka spojeva lipoksigenaznog puta (2-heksen-1-ola, 3-heksen-1-ola, (Z)-2-penten-1-ola i (E)-2-penten-1-ola). Analizirani parametar pokazuje statistički značajni utjecaj na nastanak produkta oksidacije i to pentanala. Statistički visok značaj ima za spojeve lipoksigenaznog puta: 1-penten-3-on, 2-heksenil acetat i glavnog indikatora oksidacije nonanala, a statistički visok značaj na visokoj razini za: 1-heksanol, Z-3-heksenal, 1-penten-3-ol, 4-oksoheks-2-enal, 3-heksenil acetat, heksil acetat i 2-heksenal, te produkte oksidacije 2-metil-4-pentenal, 2-pentenal, 2,4-heksadienal i produkte anaerobne fermentacije 2-metilbutanala i 3-metilbutanala. Zaključujemo da sorta ima utjecaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta te produkata oksidacije.

Interakcija između temperature i sorte nije pokazala statistički značaj za nastanak 1-heksanola, 2-heksen-1-ola, 3-heksen-1-ola, Z-3-heksenala, (Z)-2-penten-1-ola, (E)-2-penten-1-ola, 1-penten-3-ona i 3-heksenil acetata i produkata oksidacije 2-pentanala, pentanala. Nadalje, interakcija je pokazala statistički značaj za nastanak produkata oksidacije 2-heksenal, 2-metil-4-pentenal, 2,4-heksadienala te produkata LOX 4-oksoheks-2-enal i 2-heksenil acetat. Nastanak heksil acetata i nonanala pokazao je statistički visok značaj za analiziran parametar interakcije, a statistički visok značaj na visokoj razini za spojeve 1-penten-3-ol, 2-metilbutanal

i 3-metilbutanal. Prisutnost (E) 2-heptenala nije detektirana. Interakcija između analizirana dva parametra pokazuje utjecaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta i produkata oksidacije.

Iz rezultata analize varijance za sorte tretirane toplinskim tretmanom proizlazi kako temperatura nema statistički značajan utjecaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta 1-heksanol, 2-heksen-1-ol, 3-heksen-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol, (E)-2-penten-1-ol te za produkte oksidacije 2-pentenal i pentenal. Temperatura ima visoki statistički značaj za koncentraciju 2-metil-4-pentenala i 2—heksenala. Koncentracija 2-heksenala se povećava povećanjem temperature kod toplinskog tretmana oblice i rosulje, a koncentracija 2-metil-4-pentenala je konstantna pri svim temperaturama kod obje sorte. Temperatura ima visok statistički značaj na visokoj razini na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta (Z-3-heksenal, 1-penten-3-on, 1-penten-3-ol, 4-oksoheks-2-enal, 3-heksenil acetat, heksil acetat) te produkata oksidacije 2,4-heksadienal, (E) 2-heptenal i nonanal te produkate fermentacije 2-metilbutanal i 3-metilbutanal. No, koncentracija spojeva lipoksigenazog sustava je veća pri nižim temperaturama, a koncentracija produkata oksidacije je veća na višim temperaturama kod obje sorte. Nadalje, parametar sorte nema statistički značaj za spojeve 2-heksen-1-ola, 3-heksen-1-ola, (Z)-2-penten-1-ola, (E)-2-penten-1-ola, 1-penten-3-ona (lipoksigenazni put) te za produkt oksidacije (E)-2-heptenal, dok je statistički značajan za nastanak pentanala koji je također produkt oksidacije. Visok statistički značaj na visokoj razini pokazuje za nastanak spojeva lipoksigenaznog puta, a to su 1-heksanol, Z-3-heksenal, 1-penten-3-ol, 4-oksoheks-2-enal, 3-heksenil acetat, heksil acetat i 2-heksenal te produkata oksidacije: 2-metil-4-pentenal, 2-pentenal, 2,4-heksadienal i nonanal te 2-etilbutanal i 3-metilbutanal. Dakle, geografsko podrijetlo sorti rosulje (Istra) i oblice (Dalmacija), zbog različitih klimatskih uvjeta tijekom dozrijevanja ploda, značajno utječe na koncentraciju nastalih spojeva lipoksigenaznog puta. Za područje Istre karakteristične su niže temperature tijekom godine, u odnosu na Dalmaciju (DHMZ b, 2023). U radovima Inglese i sur. (2010) te Romero i sur. (2016) navedeno je kako viša temperatura kroz godinu tijekom uzgoja maslina ima negativan učinak na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta. Interakcija između temperature i sorte ne pokazuje statistički značaj za nastanak spojeva lipoksigenaznog puta (1-heksanola, 2-heksen-1-ola, 3-heksen-1-ola, Z-3-heksenala, (Z)-2-penten-1-ola, (E)-2-penten-1-ola, 1-penten-3-ona, 1-penten-3-ola) te 2-pentenala, pentenala i 2,4-heksadienala što su produkti oksidacije. Za nastanak 2-metil-4-pentenala (oksidacija) i 4-oksoheks-2-enala (LOX), interakcija pokazuje statistički značaj. Parametar pokazuje visok statistički značaj za nastanak produkta oksidacije (E) 2-heptenala, a visok statistički značaj na visokoj razini za nastanak 2-metilbutanala, 3-metilbutanala i glavnog

indikatora oksidacije nonanala te produkata lipoksigenaznog puta heksil acetata 3-heksenil acetata i 2-heksenala. Koncentracija 2-heksenil acetata nije detektirana. Više temperature pogodovat će nastanku produkata oksidacije, te imati negativan učinak na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta. Također, geografsko podrijetlo oblice uvjetovat će ukupno manjom koncentracijom spojeva lipoksigenaznog puta u odnosu na rosulju.

Analiza varijance za sortu oblice koja je tretirana ubrzanim toplinskim tretmanom i toplinskim tretmanom pokazuje razinu statističkog značaja za individualne parametre temperature i načina zagrijavanja. Iz rezultata proizlazi kako temperatura nema statistički značajan utjecaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta (1-heksanol, 2-heksen-1-ol, 3-heksen-1-ol i (E)-2-penten-1-ol, 2-heksenal) niti na nastanak produkata oksidacije (2-metil-4-pental, 2-pental, 1-penten-3-on i 2,4-heksadienal) kada uspoređujemo utjecaj temperature kod iste sorte tretirane različitim režimom zagrijavanja. No, temperatura ima statistički značajni utjecaj na nastanak spojeva oksidacije nonanala i (E)-2-heptenala, što bi značilo da je vjerojatnost njihova nastanka s obzirom na parametar temperature viša od 95 %. Spojevi lipoksigenaznog puta, kao što su Z-3-heksenal, (Z)-2-penten-1-ol, 1-penten-3-ol i 4-oksoheks-2-enal, nastaju u više od 99,99 % slučajeva s obzirom na parametar temperature prilikom usporedbe analize sorte oblica tretirane ubrzanim toplinskim procesom i toplinskim procesom. Kada govorimo o statističkoj razini nastanka spojeva lipoksigenaznog puta i produkata oksidacije, tada parametar načina toplinskog procesa kojim je tretirana analizirana sorta oblica proizlaze sljedeći zaključci: režim toplinskog tretmana nema statistički značaj i utjecaj na nastanak spojeva 1-heksanol, 2-heksen-1-ol, (E)-2-penten-1-ol koji su nastali lipoksigenaznim putem, te na nastanak spojeva pentenal i 2,4-heksadienal, produkti oksidacije. Toplinski režim ima statistički značaj na nastanak spojeva lipoksigenaznog puta, a to su: 3-heksen-1-ol i 2-heksenal kojih više nastaje pri toplinskom tretmanu. Spojevi LOX (Z)-2-penten-1-ol i 1-penten-3-ol nastaju u višim koncentracijama ubrzanim toplinskim tretmanom. Produkti oksidacije: 2-metil-4-pental i (E) 2-heptenal, više nastaju prilikom toplinskog tretmana kako je vidljivo iz tablice 4. Iz toga proizlazi da je veća vjerojatnost da će nastati spojevi oksidacije prilikom toplinskog tretmana tijesta, s obzirom da je njihov nastanak pogodovan dugotrajnijim zagrijavanjem tijesta prilikom obrade. S obzirom na statistički značaj nastanka nonanala ovisno o parametru temperature i visokom statističkom značaju ovisno o parametru režima toplinske obrade, možemo zaključiti da će se povećati vjerojatnost nastanka glavnog produkta oksidacije, nonanala, ovisno o temperaturi i toplinskom režimu proizvodnje maslinovog ulja. Iz rezultata je vidljivo kako je koncentracija nonanala viša u uzorcima oblice čije je tijesto tretirano

toplinskim tretmanom. Nadalje, produkti lipoksigenaznog puta (*Z*-3-heksenal, 1-penten-3-on, 4-oksoheks-2-enal) nastat će u 99,99 % slučajeva ovisno o korištenom toplinskom tretmanu kao i produkt oksidacije 2-pentenal. Također, vjerojatnost nastanka spojeva lipoksigenaznog puta veća je od količine nastalih produkata oksidacije, ovisno o temperaturi i odabranom toplinskom režimu, tj ukupno će više spojeva lipoksigenaznog puta nastati korištenjem ubrzanog toplinskog procesa (Tablica 4). Spojevi 3-heksenil acetat, heksil acetat i 2-heksenil acetat nisu detektirani prilikom analize sorte oblice na temperaturama od 30 °C, 35 °C i 40 °C kod oba korištena toplinska režima. Za spojeve 2-metilbutanal i 3-metilbutanal sama temperatura ne pokazuje statistički značaj, dok toplinski tretman, odnosno duljina izlaganja određenoj temperaturi, ima visok statistički značaj na visokoj razini.

5. ZAKLJUČCI

1. U pogledu ukupne koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta, korištenjem ubrzanog toplinskog tretmana nastaje više spojeva lipoksigenaznog puta, u odnosu na sorte tretirane toplinskim procesom.
2. Ubrzani toplinski proces rezultirao je većom koncentracijom određenih favorabilnih hlapljivih spojeva koji su nositelji poželjnih senzorskih atributa (na primjer poput Z-3-heksenala, i 1-penten-3-ona koji su nositelj „zelenih“ nota i za koje je zabilježena veća koncentracija kod UTT oblice u odnosu na TT oblicu). To potvrđuje potencijal korištenja ubrzanog toplinskog tretmana za modeliranje senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja.
3. Svojstvo sorte, odnosno geografskog područja uzgoja pokazalo se kao ključan čimbenik u pogledu ukupne koncentracije hlapljivih spojeva pa su istarske sorte rosulja i bjelica, pokazale su veću koncentraciju hlapljivih spojeva lipoksigenaznog puta u usporedbi s dalmatinskom oblicom. Tako apliciranje ubrzanog toplinskog tretmana ima potencijal za optimiranje proizvodnje sorti koje se uzgajaju u Dalmaciji.
4. Razlike među sortama vidljive su i u različitim optimalnim temperaturama za nastanak najveće koncentracije spojeva lipoksigenaznog puta (oblica 15 °C, rosulja 20 °C, bjelica 25 °C, levantinka 35 °C) što potvrđuje literarne navode o važnosti razmatranja genetskog potencijala masline kod odabira parametara procesa proizvodnje.
5. U odnosu na toplinski tretman, ubrzani toplinski tretman rezultira nižim koncentracijama produkata oksidacije čime se postiže bolja kvaliteta i stabilnost proizvedenog ulja što daje veliku vrijednost upotrebi ubrzanog toplinskog tretmana i potencijal za upotrebu i optimiranje proizvodnje i kod sorti bogatijih spojevima lipoksigenaznog puta kao što je bjelica.

6. LITERATURA

Alkhalidi A, Halaweh G, Khawaja M (2023) Recommendations for olive mills waste treatment in hot and dry climate, *J.Saudi Soc. Agric. Sci.* **22**, 361-373. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.03.002>

Angerosa F, Mostallino R, Basti C, Vito R (2000) Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds, *Food Chem.* **68**, 283–287. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00189-2)

Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, (2004) Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, *J. Chromatogr. A*, **1054**, 17–31. <https://doi:10.1016/j.chroma.2004.07.093>

Brkić Bubola K, Lukić M, Novoselić A, Krapac M, Lukić I (2020) Olive Fruit Refrigeration during Prolonged Storage Preserves the Quality of Virgin Olive Oil Extracted Therefrom *Foods* **9** 1445. <https://doi:10.3390/foods9101445>

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

Cappelli A, Lupori L, Cini E (2023) Should extra virgin olive oil production change the approach? A systematic review of challenges and opportunities to increase sustainability, productivity, and product quality, *J. Agric. Eng.* **54**. <https://doi:10.4081/jae.2023.1479>

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

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

Donat-Vargas C, Lopez-Garcia E, Banegas JR, Martínez-González MÁ, Rodríguez-Artalejo F, Guallar-Castillón P (2022) Only virgin type of olive oil consumption reduces the risk of

mortality. Results from a Mediterranean population-based cohort *Eur J Clin Nutr.* **77**, 226-234. <https://doi:10.1038/s41430-022-01221-3>

Državni hidrometeorološki zavod a (2023) Klimatološki podaci: Srednje mjesečne vrijednosti i ekstremi, podaci za Pazin. <https://meteo.hr/klima.php?section=klima_podaci¶m=k1&Grad=pazin> Pristupljeno 29. kolovoza 2023.

Državni hidrometeorološki zavod b (2023) Klimatološki podaci: Srednje mjesečne vrijednosti i ekstremi, podaci za Split Marjan. <https://meteo.hr/klima.php?section=klima_podaci¶m=k1&Grad=split_marjan> Pristupljeno 29. kolovoza 2023.

Europska Komisija, Poljoprivreda i ruralni razvoj, Poljoprivredna proizvodnja, Biljna proizvodnja i proizvodi biljnog podrijetla, Maslinovo ulje <https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/olive-oil_en> Pristupljeno 30. kolovoza 2023.

EFSA (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA Journal*, **9** 2033. <https://doi:10.2903/j.efsa.2011.2033>

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

Flynn MM, Tierney A, Itsiopoulos C (2023) Is Extra Virgin Olive Oil the Critical Ingredient Driving the Health Benefits of a Mediterranean Diet? A Review. *Nutrients.* **15**, 2916. <https://doi.org/10.3390/nu15132916>

Garcia-Gonzalez A, Quintero-Florez A, Ruiz-Mendez MV, Perona JS (2023) Virgin Olive Oil Ranks First in a New Nutritional Quality Score Due to Its Compositional Profile. *Nutrients.* **15**, 2127. <https://doi:10.3390/nu15092127>

- Inglese P, Famiani F, Galvano F, Servili M, Esposito S, Urbani S (2010) Factors affecting extra-virgin olive oil composition. U: Janick J, (ured.) Horticultural Reviews, JohnWiley & Sons Inc. New Jersey, str. 83–147.
- Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robard 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>
- Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH, Poreč, str. 34-38.
- Lukić I, Lukić M, Žanetić M, Krapac M, Godena S, Brkić Bubola K (2019) Inter-Varietal Diversity of Typical Volatile and Phenolic Profiles of Croatian Extra Virgin Olive Oils as Revealed by GC-IT-MS and UPLC-DAD Analysis, *Foods* **8**, 6-20.
- Nardella M, Moschetti R, Bedini G, Bandiera A, Sirisha Nallan Chakravartula S, Massantini R (2023) Impact of traditional and innovative malaxation techniques and technologies on nutritional and sensory quality of virgin olive oil – A review, *Food Chemistry Advances* **2**. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100163>
- Perez AG, Luaces P, Rios JJ, Garcia JM, Sanz C (2003) Modification of volatile compound profile of virgin olive oil due to hot-water treatment of olive fruit. *J. Agric. Food. Chem.* **51**(22), 6544–6549. <https://doi.org/10.1021/jf0346253>
- Perez M, Lopez-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Lamuela-Raventós RM, Martín-Belloso O, Vallverdú-Queralt A (2021) Impact of Emerging Technologies on Virgin Olive Oil Processing, Consumer Acceptance, and the Valorization of Olive Mill Wastes. *Antioxidants*. **10**, 417. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>
- Plasquy E, García Martos JM, Florido Fernandez MdC, Sola-Guirado RR, García Martín JF (2021) Adjustment of Olive Fruit Temperature before Grinding for Olive Oil Extraction. Experimental Study and Pilot Plant Trials, *Processes* **9**, 586. <https://doi.org/10.3390/pr9040586>
- Ranalli A, Contento S, Schiavone C, Simone N (2001) Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 228-238. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200104\)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200104)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7)

Romero N, Saavedra J, Tapia F, Sepúlveda B, Aparicio R (2016) Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage, *J. Sci. Food Agric.* **96**, 583–592.

Salvador MD, Aranda F, Gómez-Alonso S, Fregapane G (2003) Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons, *Food Chem.* **80**, 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00273-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00273-X)

Servili M, Piacquadio P, De Stefano G, Taticchi A, Sciancalepore V (2002) Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 483-489. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200208\)104:8<483::AID-EJLT483>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200208)104:8<483::AID-EJLT483>3.0.CO;2-M)

Silva K, Rodrigues N, Pereira JA, Ramalhosa E (2022) Characterisation of Olive Oils from the Douro Valley, Portugal: Study of the Volatile Fraction and Its Relationship with Sensory Characteristics, *Appl. Sci.* **12**, 9246. <https://doi.org/10.3390/app12189246>

Stramarkou M, Missirli T-V, Kyriakopoulou K, Papadaki S, Angelis-Dimakis A, Krokida M (2023) The Recovery of Bioactive Compounds from Olive Pomace Using Green Extraction Processes, *Resources.* **12**, 77. <https://doi.org/10.3390/resources12070077>

Tome-Rodríguez S, Ledesma-Escobar CA, Penco-Valenzuela JM, Priego-Capote F (2021) Cultivar influence on the volatile components of olive oil formed in the lipoxygenase pathway. *LWT* **147**. <https://doi:10.1016/j.lwt.2021.111485>

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

Veneziani G, García-González DL, Esposto S, i sur. (2023) Effect of Controlled Oxygen Supply during Crushing on Volatile and Phenol Compounds and Sensory Characteristics in Coratina and Ogliarola Virgin Olive Oils, *Foods.* **12**, 612. <https://doi:10.3390/foods12030612>

Vidal AM, Alcalá S, Ocaña MT, De Torres A, Espínola F, Moya M (2018) Modeling of Volatile and Phenolic Compounds and Optimization of the Process Conditions for Obtaining Balanced Extra Virgin Olive Oils, *Grasas Y Aceites* **69**, 250. <https://doi.org/10.3989/gya.1220172>

Žanetić M, Jukić Špika M, Ožić MM, Brkić Bubola K (2021) Comparative Study of Volatile Compounds and Sensory Characteristics of Dalmatian Monovarietal Virgin Olive Oils, *Plants*. **10**, 1995. <https://doi.org/10.3390/plants10101995>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis