

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Tina Vidulin**

6864/BT

**UTJECAJ GODINE UZGOJA NA SASTAV POLIFENOLA**  
**DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA IZ ISTRE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Procesi prerade maslina i kontrola kvalitete proizvoda**

**Mentor: *Doc.dr.sc. Klara Kraljić***

**Zagreb, 2016.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

### UTJECAJ GODINE UZGOJA NA SASTAV POLIFENOLA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA IZ ISTRE

*Tina Vidulin, 6864/BT*

**Sažetak:** Fenolni spojevi su učinkoviti prirodni antioksidansi koji štite djevičansko maslinovo ulje od autooksidacijskih promjena te mu tako osiguravaju trajnost i kvalitetu. Osim njihovog važnog antioksidacijskog djelovanja treba napomenuti da su odgovorni i za specifična senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj godine uzgoja na sastav polifenola djevičanskog maslinovog ulja iz Istre. Sastav i udio polifenola u uzorcima ekstra djevičanskih maslinovih ulja iz 2014. godine i 2015. godine utvrđeni su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz UV detekciju. Udjeli polifenolnih spojeva ovih dvaju uzoraka sličnih su vrijednosti uz aglikone oleuropeina kao dominantne fenolne spojeve. Osim aglikona oleuropeina, u analiziranim uzorcima identificirana je skupina sekoiridoida te fenolni alkoholi, hidroksitirosol i tirosol. Takav rezultat posljedica je sličnih vremenskih uvjeta (količine oborina) u navedene dvije vegetacijske godine.

**Ključne riječi:** djevičansko maslinovo ulje, polifenoli, godina uzgoja

**Rad sadrži:** 31 stranica, 7 slika, 6 tablica, 40 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc.dr.sc. Klara Kraljić

**Rad predan:** srpanj, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

### INFLUENCE OF YEAR OF CULTIVATION ON POLYPHENOLS OF ISTRIAN VIRGIN OLIVE OIL

*Tina Vidulin, 6864/BT*

**Summary:** Phenolic compounds are effective natural antioxidants that protect virgin olive oil from autoxidation while ensuring its stability and quality. In addition to their antioxidant activity, they are also responsible for the specific organoleptic characteristics of virgin olive oil. The aim of this study was to determine the influence of cultivation year on the content and composition of polyphenols of Istrian virgin olive oils. Polyphenols of extra virgin olive oils from 2014. and 2015. were determined by using high performance liquid chromatography with UV detection. Content and composition of polyphenolic compounds of these two samples are similar with oleuropein aglycone as dominant phenolic compounds. In addition, group of secoiridoides and phenolic alcohol, hydroxytyrosol and tyrosol, were also identified in both analyzed oils. This results are consequence of similar weather conditions (precipitation) of these two vegetation years.

**Keywords:** virgin olive oil, polyphenols, cultivation year

**Thesis contains:** 31 pages, 7 figures, 6 tables, 40 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Klara Kraljić, Assistant professor

**Thesis delivered:** July, 2016

# SADRŽAJ

1.UVOD .....	1
2.TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Maslina u Istri.....	2
2.1.1. Leccino.....	2
2.1.2. Pendolino.....	3
2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja.....	3
2.2.1. Masne kiseline, triacilgliceroli, mono- i digliceridi .....	3
2.2.2. Ugljikovodici .....	5
2.2.3. Tokoferoli .....	5
2.2.4. Pigmenti.....	5
2.2.5. Alifatski i aromatski alkoholi.....	6
2.2.6. Steroli .....	6
2.2.7. Triterpenski alkoholi.....	8
2.2.8. Hlapljivi spojevi i arome .....	8
2.2.9. Fosfolipidi .....	9
2.2.10. Fenolni spojevi.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina (kiselost), hladna metoda.....	17
3.2.3. Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području.....	18
3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju.....	19
4.REZULTATI.....	22
5.RASPRAVA.....	23
6.ZAKLJUČAK .....	27
7.LITERATURA.....	28

## **1.UVOD**

Maslina je jedna od biljaka duge povijesti kultivacije o čemu svjedoče brojni zapisi sa samih početaka civilizacije na području Bliskog istoka i Mediterana. Ova skromna biljka, koja uspijeva na škrtim tlima u uvjetima suše, nudi mogućnost korištenja ne samo njezinog ploda nego i lisne mase i drva. Ipak, njezin najcjenjeniji dar je djevičansko maslinovo ulje koje je u današnje vrijeme steklo veliku popularnost zbog iznimno visoke prehrambene vrijednosti i pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje.

Blagotvorni učinci Mediteranske prehrane mogu biti pripisani omjeru zasićenih i nezasićenih masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja ali i antioksidacijskom djelovanju fenolnih spojeva koji se nalaze u njemu. U kategoriju polifenola spadaju brojni spojevi kao što su fenolne kiseline poput vanilinske, galne, *p*-kumarinske i kavske, zatim fenolni alkoholi tirozol (*p*-HPEA) i hidroksitirozol (3,4-DHPEA) i kompleksniji spojevi poput sekoiridoida (oleuropein i ligstrozid), flavonoida te lignana (1-acetoksinoresinol i pinoresinol).

Već je dugo poznato da ukupni udio fenola i pojedinačnih fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju ovisi o sorti (genetskoj osnovi), klimatskim prilikama tijekom dozrijevanja plodova, stupnju zrelosti plodova iz kojih se proizvodi ulje, te načinu ekstrakcije ulja. Osim toga i sustav uzgoja i primijenjene agrotehničke mjere i navodnjavanje, također mogu posredno ili neposredno utjecati na udio fenolnih tvari u plodovima maslina, pa tako i u maslinovim uljima.

Cilj ovog rada bit će utvrditi utjecaj godine uzgoja na sastav i udio polifenola u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja proizvedenih 2014. i 2015. godine na području Istre.

## **2.TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Maslina u Istri

O postupnom širenju masline, iz Palestine i iz Grčke prema obalama Jadranskog i Tirenskog mora osim vrlo važnih jezičnih oblika što ih je naveo De Candolle, još i danas postoje i ne manje jasni tragovi opstanka zajedničkih sorata masline od Istre, do središnje Italije, Tridenta, južne Francuske, Španjolske i Alžira. Šest stotina godina prije Krista Feničani su prenijeli maslinu u Marseille. U to doba maslina je prenijeta u Istru, i to posredovanjem Feničana koji su razmjenjivali jantar iz sjevernih zemalja za proizvode iz južnog Sredozemlja (Hugues, 1999).

Među istarskim maslinama prednjače sorte poznate pod nazivima: Rosulja (*Rossignolo*, 5,72%), Buga ili Buža (*Bugo*, 50,69%), i Crnica (*Carbogno*, 5,60%) Bjelica (*Beica*, 30,22%); kojima se pridružuju ove druge sorte: Morasola (*Morasolo*), Mata (*Matto*), Jabučica (*Pometti*), *Cronorelo*, Šljivača (*Susino*) itd., no novi nasadi podizani su pretežito stranim sortama (Leccino, Frantoio, Pendolino) (Pribetić, 2006).

### 2.1.1. Leccino

Leccino je talijanska sorta podrijetlom iz provincije Toscare. Uzgaja se u svim maslinarskim područjima svijeta, a u Istri je zastupljena s 80% u svim mladim nasadima. Plod je elipsoidnog oblika, srednje veličine, koji tijekom zriobe dobiva crnu boju (Slika 1). Odnos između težine ploda i koštice je 2,5:0,41 grama.

Autosterilna je sorta, a kao oprašivač najbolje se pokazala sorta Pendolino. Daje zadovoljavajuće prinose, rano dozrijeva, a udio ulja u plodu doseže 20 %. Ulje je visoke kakvoće, a plod se može koristiti i za proizvodnju stolnih maslina (Pribetić, 2006).



**Slika 1.** Leccino  
(Anonymus, 2016)



### 2.1.2. Pendolino

Pendolino je talijanska sorta, također porijeklom iz Toscanne. Sorta je značajna kao najbolji oprašivač sorte Leccino, pa je tako rasprostranjena u svim maslinarskim arealima gdje se uzgaja ta sorta te ga u nasadu ima od 5 do 10%. Plodovi su sitni, elipsoidno-izduženog oblika i u prosjeku sadrže 8 % ulja (Slika 2)(Pribeć, 2006).



Slika 2. Pendolino (Vis-á-vis, 2016)

## 2.2. Sastav djevičanskog maslinovog ulja

Djevičansko maslinovo ulje primarno se sastoji od triacilglicerola koji mogu činiti čak do 99% ulja. Osim njih u ulju su u manjoj mjeri zastupljene slobodne masne kiseline, mono- i digliceridi, steroli, alifatski alkoholi, tokoferoli, pigmenti i fenolni spojevi. Neke od ovih komponenata ključne su za jedinstvena nutritivna i senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja.

### 2.2.1. Masne kiseline, triacilgliceroli, mono- i digliceridi

Najzastupljenije masne kiseline u djevičanskom maslinovom ulju su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1) i linolenska (C18:3). Sastav masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju i njihovi udijeli prema Uredbi komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te odgovarajućim metodama analize (u danjem tekstu Uredba 2568/91) prikazani su u Tablici 1.

Udio pojedinih masnih kiselina može se razlikovati od uzorka do uzorka, ovisno o mjestu proizvodnje, klimi, stupnju zrelosti ploda itd. Provedena su istraživanja na uzorcima djevičanskih maslinovih ulja iz različitih zemalja nakon kojeg su masline klasificirane u dvije kategorije, one s niskim udjelom linolne i palmitinske kiseline i visokim udjelom oleinske

kiseline te na one s visokim udjelom linolne i palmitinske kiseline ali niskim udjelom oleinske masne kiseline (Boskou, 2006).

**Tablica 1.** Udio masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja (Uredba 2568/91)

MASNA KISELINA		(% od ukupnih)
miristinska	14:0	≤ 0,05
palmitinska	16:0	7,5-20,0
palmitoleinska	16:1	0,3-3,5
heptadekanska	17:0	≤ 0,3
heptadecenska	17:1	≤ 0,3
stearinska	18:0	0,5-5,0
oleinska	18:1	55,0-83,0
linolna	18:2	2,5-21,0
linolenska	18:3	≤ 0,9
arahinska	20:0	≤ 0,6
gadoleinska	20:1	≤ 0,4
behenska	22:0	≤ 0,2
lignocerinska	24:0	≤ 0,2

Sastav triacilglicerola djevičanskih maslinovih ulja ovisi o ukupnom sadržaju masnih kiselina u ulju (Santinelli i sur., 1992; Vlahov, 2005). Poput većine biljnih ulja, maslinovo ulje sadrži visoke udjele oleinske kiseline i male koncentracije palmitinske (≤ 2%) i stearinske kiseline na položaju 2 triacilglicerola. Triacetilgliceroli pronađeni u značajnim koncentracijama jesu OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) i SOO (3-7%) (Boskou, 2006).

Prisustvo mono- i diglicerida u maslinovom ulju može se pripisati ili nepotpunoj biosintezi triacilglicerola ili hidrolitičkim reakcijama. U djevičanskom maslinovom ulju, udio diacilglicerola (DG) iznosi 1-2,8% (Frega i sur., 1993; Kiosseoglou i Kouzounas, 1993). Monoacilgliceroli prisutni su u mnogo manjim udjelima (manje od 0,25%) gdje je veći udio onih koji sadrže jednu masnu kiselinu na položaju 1 od onih koji ju sadrže na položaju 2 (Paganuzzi, 1987; Paganuzzi, 1999).

### **2.2.2. Ugljikovodici**

Dva ugljikovodika su prisutna u značajnim koncentracijama u maslinovom ulju, skvalen i  $\beta$ -karoten (o kojem će biti više riječi u poglavlju o pigmentima). Skvalen je posljednji metabolit koji prethodi sintezi sterola i čini 90% ukupnih ugljikovodika djevičanskog maslinovog ulja. Njegovo prisustvo odgovorno je za blagotvorne zdravstvene učinke djevičanskog maslinovog ulja u kojem se nalazi u koncentracijama od 200 do 7500 mg po kilogramu ulja što će ovisiti o sorti i načinu ekstrakcije ulja.

Osim ova dva predstavnika, u skupinu ugljikovodika spadaju i diterpeni, terpeni i *n*-parafini (Perrin, 1992).

### **2.2.3. Tokoferoli**

Istraživanje udjela i sastava tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima pokazalo je da od osam poznatih „E-vitamina“,  $\alpha$ -tokoferol ima najveći udio (90%). Njegova koncentracija može biti povezana s visokim udjelom klorofila, ali ono što se zasigurno može ustvrditi je da rafinacija smanjuje njegov udio i to za značajnih 50% (Rabascall i Riera, 1987).

### **2.2.4. Pigmenti**

Boja djevičanskog maslinovog ulja rezultat je zelenih i žutih nijansi koje potječu od klorofila i karotenoida, a koji ujedno utječu na autooksidacijske i fotooksidacijske procese. Utjecaj na boju ulja imaju sorta maslina, stupanj zrelosti, mjesto uzgoja, način ekstrakcije i uvjeti skladištenja ulja.

Klorofile najčešće susrećemo u obliku feofitina (80%, a u ulju crnih maslina i do 100%). Među njima najdominantniji je feofitin  $\alpha$  čije se prisustvo povezuje s uvjetima proizvodnje ulja i enzimskim ili enzimski-sličnim reakcijama. Pod utjecajem dnevnog svjetla zeleni pigmenti degradiraju uzrokujući time izbjeljivanje ulja.

Glavni karotenoidi prisutni u ulju su lutein i  $\beta$ -karoten, a osim njih ulje može sadržavati i neke ksantofile. Omjer između dva glavna predstavnika karotenoida ovisi o sorti masline (Boskou, 2006; Minguez-Mosquera i sur., 1990).

### **2.2.5. Alifatski i aromatski alkoholi**

Alifatski i aromatski alkoholi prisutni u maslinovom ulju pronađeni su u slobodnom i esterificiranom obliku. Najvažniji predstavnici su alkoholi masnih kiselina i diterpenski alkoholi.

Alkoholi masnih kiselina linearni su lanci s više od 16 C atoma. U djevičanskom maslinovom ulju njihova ukupna koncentracija obično premašuje  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , a ovisi o sorti, godini uzgoja, stupnju zrelosti ploda i načinu procesiranja (Boskou, 2006).

Esteri viših alkohola s masnim kiselinama (voskovi) važan su dio maslinovog ulja jer mogu služiti kao kriterij razlikovanja različitih vrsta ulja. Voskovi prisutni u ulju najčešće su esteri palmitinske kiseline s 36, 38, 40, 42, 44 i 46 C atoma, koncentracija im prelazi  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ , a na koncentraciju i sastav utječu isti čimbenici kao i u slučaju alkohola masnih kiselina (Reiter i Lorbeer, 2001).

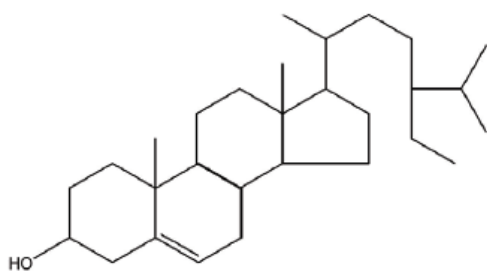
Predstavnici diterpenskih alkohola su fitol i geranilgeraniol koji su aciklički alifatski alkoholi prisutni u slobodnoj i esterificiranoj formi. Njihova koncentracija koristi se u izračunavanju alkoholnog indeksa, korisnog parametra u detekciji patvorenja djevičanskog maslinovog ulja s onim dobivenim ekstrakcijom organskim otapalima (Boskou, 2006).

### **2.2.6. Steroli**

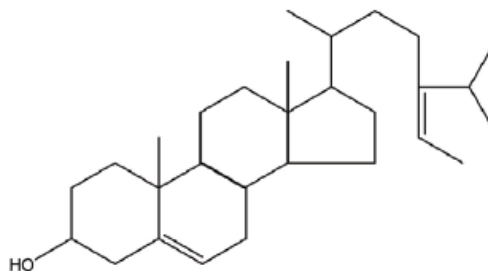
Steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi, važni lipidi povezani s kvalitetom ulja i često se koriste za provjeru njegove autentičnosti. U maslinovom ulju pojavljuju se u slobodnom i esterificiranom obliku. Glavni predstavnici sterola su kampesterol, kampestanol, stigmasterol, klerosterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostanol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^5$ -24 stigmastadienol,  $\Delta^7$ -stigmastenol,  $\Delta^7$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -kampesterol i kolesterol. Ukupni sadržaj sterola u djevičanskom maslinovom ulju varira uglavnom između  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ , što je donji limit određen Uredbom 2568/91, i  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Lampante ulja uglavnom sadrže više

koncentracije sterola, dok je obratno kod rafiniranih ulja gdje sama rafinacija može uzrokovati gubitke do 25 % (Morchio i sur., 1987).

Istraživanja sastava sterola u maslinovom ulju pokazuju da najveći udio sterola čini  $\beta$ -sitosterol (75-90%)(Slika 3) dok  $\Delta^5$ -avenasterol (Slika 4) uglavnom čini 5% do 20 %.



**Slika 3.**  $\beta$ -sitosterol (Boskou i sur., 2006)



**Slika 4.**  $\Delta^5$ -avenasterol(Boskou i sur., 2006)

Od ostalih sterola prisutnih u ulju treba još spomenuti kampasterol i stigmasterol koji čine 2% do 4% ukupnih sterola u ulju.

Važno je napomenuti da se autentičnost ulja može odrediti udjelom određenih formi sterola u njemu. Naime,  $\Delta^5$ -avenasterol i stigmasterol prisutni su u višim koncentracijama u slobodnom nego esterificiranom obliku. Za razliku od toga sirova i rafinirana lampante ulja sadrže sitosteril- $C_{18}$ -estere u značajno većim udjelima nego što je to karakteristično za djevičanska maslinova ulja. Stoga, postotak slobodnih  $\beta$ -sitosterola u ukupnom sadržaju  $\beta$ -sitosterola koristi se kao jedan od parametara u provjeri kvalitete i autentičnosti djevičanskog maslinovog ulja (Boskou, 2006).

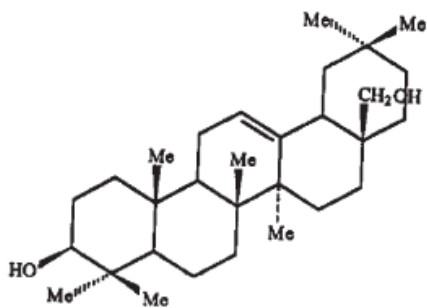
Sastav sterola kao i njihova ukupna koncentracija ovisi u sorti, godini uzgoja, stupnju zrelosti ploda, skladištenju ploda prije obrade, procesu ekstrakcije i geografskim faktorima. Fedeli i Cortesi (1993) tvrde kako je koncentracija stigmasterola značajno viša u plodovima maslinama koje su ubrane s tla.

### 2.2.7. Triterpenski alkoholi

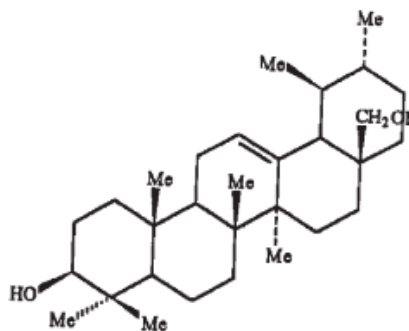
Eritrodiol (Slika 5) i uvaol (Slika 6) glavni su triterpenski alkoholi identificirani u maslinovom ulju. Eritrodiol prisutan je u slobodnoj i esterificiranoj formi, a na ukupnu koncentraciju utječe sorta masline (Aparicio i Luna, 2002).

Djevičanska maslinova ulja sadrže eritrodiol u koncentracijama od 19 do 69 mg kg<sup>-1</sup> od čega eritrodiol u slobodnoj formi čini manje od 50 mg kg<sup>-1</sup>. Razine ukupnih eritrodioila i onih u slobodnoj formi mnogo su više u uljima dobivenim ekstrakcijom otapalima.

Sadržaj triterpenskih alkohola ovisi o sorti i tehnološkom procesu (Boskou, 2006).



**Slika 5.** Eritrodiol (Boskou i sur., 2006)



**Slika 6.** Uvaol (Boskou i sur., 2006)

### 2.2.8. Hlapljivi spojevi i arome

U brojnim istraživanjima koja su provedena prilikom analize sastava djevičanskog maslinovog ulja čak je dvjesto osamdeset komponenti svrstano u kategoriju hlapljivih spojeva. U njih spadaju ugljikohidrati (više od 80 spojeva), alkoholi (45 spojeva), aldehidi (44 spoja), ketoni (26 spojeva), kiseline (13 spojeva), esteri (55 spojeva), po 5 spojeva etera, derivata furana, derivata tiofena te jedan tiol.

Od ovog velikog broja spojeva samo ih je 67 pronađeno u koncentracijama koje mogu doprinijeti mirisima djevičanskog maslinovog ulja tj. u koncentracijama višim od njihovog

mirisnog praga. Dvadesetak ovih spojeva doprinosi aromi djevičanskog maslinovog ulja sa senzorskim defektima.

Jasno je da je kvalitativni sastav aroma u većini djevičanskih maslinovih ulja sličan. Međutim, kvantitativni sastav se značajno razlikuje u uljima koja imaju različite karakteristike arome. Djevičansko maslinovo ulje proizvedeno od zdravih maslina, iz plodova optimalnog stupnja zrelosti i proizvedeno adekvatnim tehnološkim procesom sadrži hlapljive komponente i arome koje potječu od linolne i linolenske kiseline koje ulaze u lipoksigenazni put. Tako se u djevičanskom maslinovom ulju u najvećoj mjeri mogu pronaći heksanal, (E)-2-heksanal, (Z)-3-heksanal, heksan-1-ol, (Z)-3-heksan-1-ol, heksil acetat i (Z)-3-heksenil acetat. Ove su hlapljive komponente odgovorne za „zelenu i voćnu“ percepciju arome djevičanskog maslinovog ulja. Na formiranje ovih C<sub>6</sub> spojeva utječe sorta i stupanj zrelosti ploda, trajanje njegova skladištenja prije prerade i sam tehnološki proces (Boskou, 2006).

### **2.2.9. Fosfolipidi**

Identifikacija fosfolipida u brojnim je istraživanjima bila prilično ograničena te se svodi na primjenu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Na taj su način dobiveni rezultati koji kao fosfolipidne komponente djevičanskog maslinovog ulja ističu fosfatidilkolin, fosfatidilinozitol i fosfatidilserin (Boskou, 2006).

Koncentracija fosfolipida može biti bitna jer ove komponente imaju antioksidacijsku aktivnost. Prema rezultatima koje su objavili Pokorny i suradnici (2001), ovi lipidi mogu imati važnu ulogu kao sinergisti (regeneracija antioksidansa kao što su  $\alpha$ -tokoferol i ostali fenolni spojevi).

## 2.2.10. Fenolni spojevi

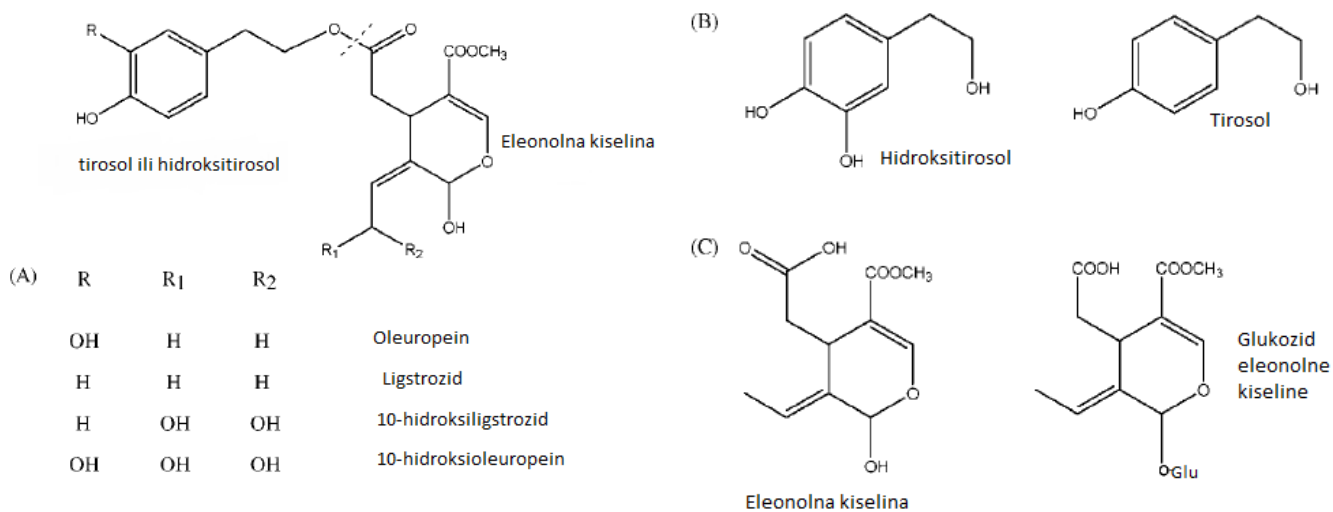
### 2.2.10.1. Kemijska struktura fenolnih spojeva

Glavni antioksidansi djevičanskog maslinovog ulja su fenolni spojevi. To su hidrofilne molekule u koje se ubrajaju flavonoidi, sekoiridoidi, fenolne kiseline i alkoholi te lignani.

Polifenoli mogu biti podijeljeni u dvije skupine : jednostavni i složeni. U prvoj skupini najzastupljeniji su 2-(3,4-dihidroksifenil)-etanol ili hidroksitirozol, *p*-2-(4-hidroksifenil)-etanol tj. tirozol uz manje zastupljenije fenolne kiseline s kemijskom strukturom C6-C1 (benzojeve kiseline) i C6-C3 (cimetne kiseline). Od fenolnih kiselina treba istaknuti kavsku, *o*-kumarinsku, *p*-kumarinsku, protokatehinsku, 4-hidroksibenzojevu, vanilinsku i siringinsku kiselinu.

Sekoiridoidi oleuropein, demetiloleuropein, ligstrozid i njihovi aglikoni glavni su predstavnici skupine složenih fenolnih spojeva. Sekoiridoidi su karakteristični po eleonolnoj kiselini u svojoj glikozidnoj ili aglikonskoj formi, u njihovoj kemijskoj strukturi (Slika 7). Sami sekoiridoidi produkt su sekundarnog metabolizma terpena kao prekursori sintezi nekoliko indolnih alkaloida (Tripoli i sur., 2005). To su spojevi s izrazito jakim antioksidacijskim djelovanjem. Dokazano je da hidroksitirozol, aglikon oleuropeina i dialdehidni oblik eleonolne kiseline povezan s hidroksitirozolom imaju jače antioksidacijsko djelovanje od tirozola i  $\alpha$ -tokoferola (Servili i sur., 1999).





**Slika 7.** (A) Kemijska struktura oleuropeina, ligstrozida, 10-hidroksiligstrozida i 10-hidroksioleuropeina. (B) Kemijska struktura hidroksitirosola i tirosola. (C) Kemijska struktura eleonolne kiseline i njezinog glukozida (Tripoli i sur., 2005)

#### 2.2.10.2. Sastav i koncentracija polifenola u djevičanskom maslinovom ulju

U posljednje vrijeme velik je trud uložen u pronalazak djevičanskih maslinovih ulja s višim udjelom polifenola zbog povoljnih učinaka koji im se pripisuju. Također je dokazano da antioksidacijsko svojstvo ovih spojeva produljuje trajnost djevičanskog maslinovog ulja što je posebno važno za njegove proizvođače, ali i kupce.

Podaci o koncentraciji fenolnih spojeva, koji su odgovorni za senzorska i antioksidacijska svojstva visokokvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja, ponekad se ne poklapaju. Manjak adekvatne analitičke metode glavni je razlog nesigurnosti i odstupanja podataka prilikom kvantitativne evaluacije fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju. Najčešće metode za određivanje polifenolnog sastava su Folin-Ciocalteu kolorimetrijski test i tekućinska kromatografija (Montedoro i sur., 1992). Prva metoda daje neprecizne rezultate

zbog male specifičnosti reagensa prema fenolnim spojevima. Osim toga, ova metoda ne pruža kvantitativne informacije o pojedinim skupinama fenolnih spojeva. Za razliku od toga, HPLC je vrlo osjetljiva i specifična metoda ali zahtjeva određeno vrijeme za provedbu analize (Tripoli i sur., 2005).

Unatoč ovim ograničenjima, mogu se utvrditi određeni principi. Kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja ovisi o količini oleuropeina i njegovih hidrolitičkih produkata (Limiroli i sur., 1995). Također, koncentracija fenolnih spojeva ovisi o mjestu uzgoja, klimi, stupnju zrelosti ploda i vremenu berbe. Njihov se udio smanjuje povećanjem zrelosti ploda, iako postoje i iznimke ovom pravilu. Primjerice, masline uzgojene u toplijim klimama, unatoč brzom dozrijevanju, proizvode ulje bogatije u polifenolima (Visioli i sur., 1998). Koncentracije ukupnih polifenola u djevičanskom maslinovom ulju variraju u širokom rasponu (50-1000 mg kg<sup>-1</sup>). Međutim, uobičajene vrijednosti kreću se između 100 i 300 mg kg<sup>-1</sup> (Boskou, 2006).

Koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva rezultat je kompleksnih interakcija nekoliko faktora: sorte, klime, stupnja zrelosti ali i tehnoloških postupaka proizvodnje maslinovog ulja. Sastav fenola ulja proizvedenog iz sorte Leccino prikazan je u Tablici 2 (Servili i Montedoro., 2002).

**Tablica 2.** Koncentracija fenolnih spojeva (mg kg<sup>-1</sup>) djevičanskog maslinovog ulja proizvedenog iz sorte Leccino (Servili i Montedoro., 2002).

<b>FENOLNI SPOJ</b>	<b>Koncentracija (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
hidroksitirozol	7,9 ± 10,8
tirozol	12,3 ± 15,6
Vanilinska kiselina	0,2 ± 0,1
Kavska kiselina	0,2 ± 0,2
dialdehidni oblik eleonolne kiseline povezan s hidroksitirozolom	67,6 ± 15,5
dialdehidni oblik eleonolne kiseline povezan s tirosolom	12,5 ± 6,2
aglikon oleuropeina	47,2 ± 15

Oleuropein je glavni polifenol pronađen u djevičanskim maslinovim uljima u svom osnovnom obliku, ali i kao aglikon. Akumulira se u plodu masline tijekom faze njegova rasta tj. inicijalne faze. Nasuprot tome, kako plod poprima tamno smeđu boju zahvaljujući porastu koncentracije antocijana, koncentracija oleuropeina se smanjuje. Dokazano je da je koncentracija oleuropeina viša u prvim stadijima zriobe ploda nego u crnim maslinama. Degradacijom oleuropeina dolazi do porasta koncentracije njegovih sekundarnih produkata koji svoj maksimum imaju u crnim maslinama.

U prirodi, koncentracije hidroksitirosola i tirosola povećavaju svoju vrijednost paralelno sa zrenjem ploda i hidrolizom ostalih komponenti veće molekulske mase dok ukupna koncentracija polifenola opada (Tripoli i sur.,2005).

Danas se koriste različite metode za ekstrakciju ulja: tradicionalno prešanje pomoću filterskih slojnica, kontinuirana centrifugalna ekstrakcija i procjeđivanje. Mljevenje plodova maslina, tlak koji se prenosi na maslinovo tijesto, ekstrakcija, odvajanje vegetabilne vode i na kraju filtracija, koraci su koji su zajednički ovim trima načinima ekstrakcije ulja. U tradicionalnom postupku, kameni mlinovi koriste se za mljevenje plodova dok se u kontinuiranom procesu koriste metalni čekići, diskovi i konusi koji pri velikim okretajima razbijaju plodove masline. Djevičansko maslinovo ulje proizvedeno procjeđivanjem mnogo je bogatije fenolima, *o*-difenolima, hidroksitirosolom i aglikonima tirosola te tokoferolima od ulja proizvedenog centrifugalnom ekstrakcijom (Tripoli i sur.,2005.).

Ukoliko se mljevenju maslina pristupa koristeći metalne mlinove vrlo je važna njihova vrsta. Mlin čekićar efikasan je u ekstrakciji fenolnih spojeva i treba ga koristiti za dobivanje ulja onih maslina koje imaju manji sadržaj polifenola (Alloggio i Caponio,1997).

Maslinova ulja dobivena centrifugalnom ekstrakcijom imaju niži sadržaj polifenola, vjerojatno zbog korištenja velikih količina tople vode koja uklanja značajne količine fenola. Izdvojena vegetabilna voda smatra se toksičnim ostatkom i zagađivačem za biljke jer fenolni spojevi, tirosol, hidroksitirosol i ostali polifenoli, imaju fitotoksičan učinak. Ipak, vegetabilna voda može se iskoristiti kao dobar izvor antioksidansa ili baktericid za ostale nasade napadnute parazitima (Limiroli i sur., 1996; Tripoli i sur., 2005).

Tijekom čuvanja ulja kroz razdoblja dulja od 12 mjeseci filtrirana i nefiltrirana ulja različito se ponašaju. Oslobođanje masnih kiselina iz triacilglicerola, te oslobođanje fenolnih alkohola (tirosola i hidroksitirosola) iz sekoiridoidnih aglikona (oleuropeina i ligstrozida),

brže i intenzivnije se odvija u nefiltriranim uljima. U nefiltriranim uljima nalaze se kapljice vode koje sadrže hidrolitičke enzime, a promjene koje nastupaju uzrokuju veću trpkost te smanjenu gorčinu i pikantnost ulja (Koprivnjak,2006).

Genetski sastav stabla masline određuje potencijal polifenolnog sastava budući da su geni uključeni u sintezu ovih spojeva u plodu. U Italiji se 2012. godine provelo istraživanje koje je objavilo detaljnu studiju o sadržaju polifenola tijekom zriobe počevši od inicijalne faze zrenja. Ekspresija nekoliko gena i sastav polifenola u plodu razlikovao se između visoko-fenolnih i nisko-fenolnih skupina. Naime, sorte masline podijeljene su u tri grupe s obzirom na ukupne polifenole – TPH (Total Polyphenols) u njihovim uljima. Tisu podaci bitnu prilikom planiranja nasada kako bi se sorte s niskim TPH kombinirale s onima umjerenog i visokog TPH.

Nastavkom istraživanja utvrđeno je da visoko-fenolne masline započinju svoju zriobu s visokim udjelom polifenola koji se vremenom smanjuje dok je obratno u slučaju nisko-fenolnih maslina.

Veliki broj sorata masline omogućuje maslinarima da odaberu onu sortu čije će ulje svojim karakteristikama najbolje zadovoljiti njihove potrošače. Daljnjim selekcijama i križanjima ali i primjenom metoda genetičkog inženjerstva, mogu se dobiti visokoproduktivne sorte sa zadovoljavajućim karakteristikama (Scarafia, 2013).

**Tablica 3.** Sorte maslina uzgajane u Kaliforniji, podijeljene u tri grupe s obzirom na sadržaj polifenola njihovih ulja (Scarafia, 2013)

<b>Niski TPH</b>	<b>Umjereni TPH</b>	<b>Visoki TPH</b>
<b>Arabequina</b>	Aglandau	Coratina
Casaliva	<b>Arbosana</b>	Cornicabra
Nocellara	Ascolano	<b>Koroneiki</b>
Picudo	Bouteillan	Manzanillo
Sevilliano	Carolea	Maurino
Tanche	Frantoio	Mission
	Hojiblanca	Moraiolo
	Itrana	Picual
	<b>Leccino</b>	Picholine

Na Sveučilištu u Milanu provedeno je istraživanje kojim se nastojalo utvrditi na koji način atmosferske prilike (količina oborina i temperatura zraka) utječu na karakteristike djevičanskog maslinovog ulja dviju sorti (Casaliva i Leccino) u sedamnaest maslinika u sjevernoj Italiji. Usporedbom ulja iz plodova istog stupnja zrelosti primijećeno je da temperatura tijekom dozrijevanja ploda ima značajan utjecaj: ulja iz godina koje su bile toplije ima značajno veći udio polifenola, tokoferola i hlapljivih komponenti. Također se ustvrdilo da su kasne sorte (Casaliva) više podložni utjecaju atmosferskih prilika nego oni raniji (Leccino)(Tura i sur., 2008).

### 2.2.10.3. Antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva

Kao rezultat metaboličkih procesa u organizmu formiraju se slobodni radikali koji oksidiraju i oštećuju stanične makromolekule što posljedično dovodi do razvoja degenerativnih bolesti (primjerice ateroskleroza, tumor, dijabetes, reumatoidni artritis, upalne bolesti). Antioksidansi koje unosimo hranom imaju dvojaku ulogu: štite hranu od oksidacije (posebice oksidacije lipida) produljujući time njezinu trajnost, dok istovremeno povećavaju količinu antioksidansa u organizmu koji ga štite od ranije spomenutih bolesti.

Fenolni spojevi mogu koristiti metale prijelaznih elemenata kao što su bakar i željezo te s njima tvoriti komplekse što sprječava njihovo sudjelovanje u Fenton reakcijama koje generiraju visoke koncentracije hidroksilnih radikala (Halliwell i Gutterige, 1990).

Najvažnija antioksidacijsko svojstvo polifenola je povezano s vezivanjem slobodnih radikala i razbijanjem lanca reakcija koje oni potiču. Antioksidacijsko svojstvo *o*-difenola je povezano s njihovom mogućnošću da formiraju intramolekulsku vodikovu vezu između hidroksilne skupine i fenolnog radikala. Stoga će stupanj antioksidacijskog djelovanja ovisiti o broju OH skupina u strukturi spoja kao i njihov položaj na prstenu flavonoida i polifenola. Tako su se *orto*- i *para*- položaj supstituenta pokazali kao najstabilniji.

Antioksidacijsko djelovanje oleuropeina i hidroksitirosola istraživano je korištenjem metala prijelaznih elemenata prilikom oksidacije LDL-a, formiranja slobodnih radikala, superoksida, triklormetilperoksidne i hipoklorne kiseline. Dokazano je kako neki polifenolni spojevi mogu sudjelovati i u regeneraciji vitamina E.

Međutim djelovanje polifenola ne treba ograničiti samo na njihovu ulogu antioksidansa jer se njihovo djelovanje proširuje i na interakcije s ostalim važnim enzimskim sustavima. Naime, oni inhibiraju agregaciju trombocita, smanjuju pro-upalno formiranje molekula kao što je tromboksan B2 i leukotrien B4, povećavaju produkciju NO makrofaga štakora izloženih endotoksinima što omogućuje regulacije imunološkog sustava (Tripoli i sur., 2005).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

Ulje koje je korišteno kao materijal u ovom radu proizvedeno je iz sorti maslina Leccino i Pendolino uzgojenih na području Vodnjana u Istri. Korištena su dva uzorka ulja od kojih je jedno proizvedeno 2014.godine, a drugo 2015. godine berbom plodova s istih stabala maslina. Ulja su proizvedena centrifugalnom ekstrakcijom na opsijskoj centrifugi s 2 izlaza i skladištena u inoks bačvama. Uzorak maslinovog ulja iz 2014. godine čuvan je u inoks bačvi ukupno 12 mjeseci nakon čega je pretočen u staklenu bocu tamnog stakla i čuvan u zatamnjenom prostoru još 3 mjeseca do trenutka analize. Ulje iz 2015. godine do trenutka analize čuvano je u inoks bačvi.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina (kiselost), hladna metoda

Udio slobodnih masnih kiselina određen je prema ISO normi za određivanje kiselinskog broja i kiselosti za životinjske i biljne masti ulja (HRN EN ISO 660:2004).

10 g uzorka ulja otopi se u 50 ml prethodno neutralizirane smjese otapala (dietil eter/etanol (1:1, V:V)). Prisutne slobodne masne kiseline titiraju se otopinom natrij hidroksida ( $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) uz fenolftalein kao indikator (ružičasta boja fenolftaleina zadržava se najmanje 10 sekundi). Analiza se provodila se u dvije paralele.

Udio slobodnih masnih kiselina (kiselost), izražen kao postotak oleinske kiseline

$$SMK(\% \text{ oleinske}) = \frac{V \cdot c \cdot M}{10 \cdot m} \quad [1]$$

gdje je :

V- volumen standardizirane otopine kalij hidroksida upotrijebljen pri titraciji, u ml;

c- točna koncentracija standardizirane otopine kalij hidroksida, u  $\text{mol l}^{-1}$ ;

M- molarna masa, u  $\text{g mol}^{-1}$ , kiseline koja se koristi za izražavanje rezultata;

m-masa uzorka u g.



### 3.2.2. Određivanje peroksidnog broja

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

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

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

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

gdje je:

$V_1$ - volumen standardizirane otopine natrij tiosulfata (0,01 M) potrošen za titraciju uzorka, izražen u ml

$V_0$ - volumen standardizirane otopine natrij tiosulfata potrošen za titraciju slijepa probe, izražen u ml

$m$ - masa analiziranog ulja, izražen u g

### 3.2.3. Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području

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

Od pripremljenog homogenog uzorka, bez nečistoća odvaže se 0,1 g u odmjernu tikvicu od 10 ml. Tikvica se zatim do oznake napuni s izooktanom spektrofotometrijske čistoće, koji se odlikuje propusnošću emitiranog zračenja od najmanje 60% pri 220 nm te

najmanje 95% pri 250 nm u odnosu na destiliranu vodu. S priređenom otopinom napuni se kvarcna kiveta s duljinom prolaza zrake 1 cm te se mjere ekstinkcije pri valnim duljinama od 232 nm do 276 nm.

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

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

gdje je :

$K_{\lambda}$ -specifična ekstinkcija pri valnoj duljini  $\lambda$

$E_{\lambda}$ -izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini  $\lambda$

c- koncentracija otopine u g/100ml

s- duljina puta zrake u cm

Izračunavanje vrijednosti  $\Delta K$  provodi se prema izrazu [4] :

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

gdje je:

$K_m$ -specifična ekstinkcija pri valnoj duljini m tj. valnoj duljini oko 270( $\pm 2$ ) nm na kojoj je zabilježena max. apsorbancija

### 3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju

Polifenoli su određeni prema modificiranoj metodi međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2009). Metoda se temelji na direktnoj ekstrakciji polarnih spojeva u maslinovom ulju pomoću metanolne otopine i kvantifikaciji korištenjem HPLC-a uz UV detekciju. Siringinska kiselina korištena je kao interni standard. Sadržaj prirodnih i oksidiranih oleuropeina i derivata ligstrozida, lignana, flavonoid i fenolnih kiselina izražen je u mg tirosola  $\text{kg}^{-1}$ ulja.

U epruvetu od 10 ml doda se 4 g maslinovog ulja. Zatim se doda 1 ml otopine internog standarda (0,015 mg siringinske kiseline  $\text{ml}^{-1}$ ) te se epruveta snažno protrese točno 30 sekundi. U epruvetu se doda se 5 ml otopine metanol:voda 80:20 (V:V) te se otopina

ponovno promiješa točno 1 minutu. Fenoli se ekstrahiraju u ultrazvučnoj kupelji pri sobnoj temperaturi kroz 15 minuta i zatim hidrofobni dio od ulja odvoji centrifugiranjem pri 5000 o min<sup>-1</sup>kroz 25 minuta. Alikvot supernatanta profiltrira se kroz 0,2 µm PVDF filter i 5 µl pripremljenog ekstrakta injektira se u HPLC sustav.

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

**Tablica 4.** Elucijski gradijent za određivanje polifenola:

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

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

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

Svakodnevno, prije samog određivanja polifenola djevičanskih maslinovih ulja, u sustav je pod istim uvjetima injektirana otopina eksternog standarda (0,015 mg ml<sup>-1</sup> siringinske kiseline i 0,030 mg ml<sup>-1</sup> tirosola). Dobivene površine ispod detektiranih pikova korištene su za izračunavanje faktora odziva. RF (response factors) za tirosol i siringinsku kiselinu te za izračunavanje omjera faktora odziva RRF<sub>sir/tir</sub> (formule[5-7])

Koncentracije identificiranih i neidentificiranih polifenolnih spojeva izražavaju se kao mg tirosola kg<sup>-1</sup> ulja i izračunate su prema formuli [8].

$$RF_{1\mu g}(\text{siringinske kiseline}) = \frac{\text{Površina siringinske kiseline}}{\mu g \text{ injektirane siringinske kiseline}} \quad [5]$$

$$RF_{1\mu g}(\text{tirosol}) = \frac{\text{Površina tirosola}}{\mu g \text{ injektiranog tirosola}} \quad [6]$$

$$RRF_{\text{sir/tir}} = \frac{RF_{1\mu g}(\text{siringinske kiseline})}{RF_{1\mu g}(\text{tirosol})} \quad [7]$$

Fenolni sastav izražen kao mg kg<sup>-1</sup>, računa se mjereći zbroj površina pikova određenih polifenolnih spojeva prema formuli [8].

$$(mg kg^{-1}) = \frac{A \times 1000 \times RRF_{\text{sir/tir}} \times (W_{\text{sir.kis.}})}{(A_{\text{sir.kis.}}) \times (W)} \quad [8]$$

gdje je :

A –površina ispod pika određenog polifenola

A<sub>sir.kis.</sub> - površina pika siringinske kiseline pri 280 nm

1000- faktor korišten da bi rezultat bio izražen u mg kg<sup>-1</sup>

W- masa korištenog uzorka ulja, u gramima

RRF<sub>sir/tir</sub>- koeficijent množenja korišten za izražavanje konačnog rezultata kao tirosola

W<sub>sir.kis.</sub> - masa, u mg, siringinske kiseline korištene kao unutarnji standard u 1 ml otopine koja je dodana u uzorak

## **4.REZULTATI**

U analiziranim maslinovim uljima iz 2014. (M 2014) i iz 2015. godine (M 2015) određeni su osnovni parametri kvalitete (udio slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj i K-vrijednosti), a rezultati su prikazani u tablici 5. Sastav i koncentracije fenolnih spojeva u analiziranim uljima određeni HPLC metodom prikazani su u tablici 6.

**Tablica 5.** Osnovni parametri kvalitete djevičanskog maslinovog ulja

uzorak	SMK (% oleinske)	Peroksidni broj (mmol O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )	K-vrijednosti		
			K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	ΔK
M 2014	0,2	7,1	2,28	0,14	0,00
M 2015	0,2	6,6	2,13	0,10	0,00

**Tablica 6.** Izračun polifenolnog sadržaja djevičanskog maslinovog ulja

Fenolni spoj (mg tirosola kg <sup>-1</sup> ulja)	M 2014	M 2015
Hidroksitirosol	n.d.**	5,8
Tirosol	2,1	11,9
Aglikoni oleuropeina	103,5	115,3
Grupa sekoiridoida I	68,9	42,5
n.i.*	50,1	23,4

\*nije identificirano

\*\*nije detektirano

Ukupno	224,5	198,9
--------	-------	-------

## **5.RASPRAVA**

Cilj ovog rada bio je odrediti udio i sastav fenolnih spojeva dva uzorka maslinovog ulja proizvedenih u različitim vegetacijskim godinama. Uljima su, osim sastava fenolnih spojeva, određeni i osnovni parametri kvalitete kako bi se mogli svrstati u jednu od kategorija maslinovog ulja.

Određivanjem osnovnih parametara kvalitete djevičanskog maslinovog ulja dobivene rezultate analize uzoraka možemo usporediti s vrijednostima propisanim Uredbom 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te odgovarajućim metodama analize. Treba napomenuti kako nam za potpunu klasifikaciju ovih ulja i svrstavanje u jednu od kategorija maslinovog ulja nedostaje senzorska analiza, budući da je za senzorsku analizu potrebno je oformiti panel od 8 do 12 educiranih ocjenjivača. Stoga ćemo se ovom prilikom osvrnuti samo na fizikalno-kemijska svojstva ulja. Također prilikom analize rezultata treba uzeti u obzir da je uzorak maslinovog ulja iz 2014. godine čuvan u inoks bačvi ukupno 12 mjeseci nakon čega je pretočen u staklenu bocu s tamnim staklom i čuvan u zatamnjenom prostoru još 3 mjeseca do trenutka analize. Ulje iz 2015. godine do trenutka analize čuvano je u inoks bačvi.

Udjel slobodnih masnih kiselina pokazatelj je hidrolitičkog kvarenja ulja djelovanjem lipolitičkih enzima uz prisustvo vode. Do ove vrste kvarenja dolazi dok je ulje još u plodu stoga nam ova vrijednost može dati podatak o zdravstvenoj ispravnosti ploda iz kojeg se ulje proizvelo (Koprivnjak, 2006). Udjeli slobodnih masnih kiselina u uzorku iz 2014.godine kao i u uzorku iz 2015.godine imaju istu vrijednost i iznose 0,2 % oleinske kiseline. Takva vrijednost je zadovoljavajuća budući da je Uredbom 2568/91 maksimalna propisana vrijednost za ekstra djevičanska maslinova ulja 0,8 %.

Do oksidacijskog kvarenja ulja dolazi skladištenjem ulja, no ono može biti ubrzano zbog neodgovarajućeg čuvanja ulja, tj. izloženosti ulja zraku, toplini i svjetlosti. Količina kisika koja će se otopiti u ulju ovisi o temperaturi, veličini dodirne površine te o parcijalnom tlaku kisika u ulju. Ulje treba čuvati na temperaturama višim od 10 °C jer u suprotnom dolazi do kristalizacije onih triacilglicerola koji sadrže pretežito zasićene masne kiseline. Zato je optimalna temperatura  $16 \pm 2$  °C. Bez obzira na sve mjere predostrožnosti određene količine kisika ostaju otopljene u ulju, ali s dovoljno prirodnih antioksidanasa, zaštićeno od svjetlosti, s inertnim plinom u nadprostoru, taj će se kisik utrošiti u reakcijama s antioksidansima i ulje će biti stabilno duže vremena.



Peroksidni broj označava razinu oksidacije masnih kiselina i pokazatelj je količine hidroperoksida, primarnih produkata oksidacijske razgradnje masti i ulja (Koprivnjak, 2006). Peroksidni broj ulja iz 2014. godine iznosi  $7,1 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}$  dok je za ono iz 2015. godine iznosio  $6,6 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}$ . Očekivano je da je PB za ulje iz 2014. godine veći budući da se ono dulje čuvalo, a pretakanjem u tamnu staklenu bocu došlo je u dodir s kisikom iz zraka što je ubrzalo reakcije oksidacije. Ipak, vrijednost peroksidnog broja i dalje je unutar granica propisanih Uredbom 2568/91, odnosno manji je od  $10 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}$ .

Osim kemijskom metodom, stupanj oksidacijskog kvarenja može se odrediti fizikalnom metodom spektrofotometrijske analize UV području. Takva metoda daje informaciju o kvaliteti, očuvanosti te promjenama u ulju uzrokovanih tehnološkim postupcima. Oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do stvaranja konjugiranih diena i hidroperoksida, kao primarnih produkata reakcije koji pokazuju svoj maksimum pri 232 nm, a sekundarni produkti oksidacije (konjugirani trieni, aldehidi, ketoni i dr.) na 270 nm (Koprivnjak, 2006). Uredbom 2568/91 propisano je da  $K_{232}$  za ekstra djevičanska maslinova ulja mora biti manja ili jednaka 2,50. Ta vrijednost u uzorku ulja iz 2014. godine iznosi 2,28, a u uzorku iz 2015. godine 2,13. Nadalje, vrijednost  $K_{270}$  za ulje iz 2014. godine iznosi 0,14, a za ulje iz 2015. godine 0,10 što je unutar propisane granice, a koja za ekstra djevičanska maslinova ulja iznosi 0,22. I posljednje,  $\Delta K$  vrijednost za oba uzorka ulja iznosi 0,00. Takva vrijednost također zadovoljava kriterije za ekstra djevičanska maslinova ulja gdje je gornja granica 0,01.

Koncentracija polifenola u ulju iz 2014. godine iznosi  $224,5 \text{ mg kg}^{-1}$  dok koncentracija u ulju iz 2015. iznosi  $198,9 \text{ mg kg}^{-1}$  što je unutar uobičajenih vrijednosti koje se kreću između 100 i  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  (Boskou, 2006).

Koncentracija tirosola u ulju iz 2014. godine iznosi  $2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , dok ona u ulju iz 2015. godine iznosi 11,9. Iako po svojim vrijednostima prilično različite, obje ulaze unutar granica koje su odredili Servili i Montedoro (2002), a iznose  $12,3 \pm 15,6$ . Hidroksitirosol u ulju iz 2014. godine nije detektiran, a u ulju iz 2015. godine njegova koncentracija iznosi  $5,8 \text{ mg kg}^{-1}$ . Razlog nedostatka hidroksitirosola u djevičanskom maslinovom ulju može biti dulje skladištenje prilikom kojeg je došlo do njegova oksidacije.

U oba slučaja dominantni fenolni spojevi su aglikoni oleuropeina koji u maslinovom ulju iz 2014. godine čine 46,1 % ( $103,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dok u maslinovom ulju iz 2015. godine čine 57,9 % ( $115,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ukupnih fenolnih spojeva. Obje koncentracije više su od koncentracija

za ulja iz sorte Leccino koje navode Servili i Montedoro (2002)( $47,2 \pm 15 \text{ mg kg}^{-1}$ ). S obzirom da su to spojevi čiji standardi nama nisu bili komercijalno dostupni, njihova je identifikacija provedena usporedbom rezultata s rezultatima iz diplomskog rada Velagić (2016) izrađenim u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti. To su spojevi koji posjeduju spektar oleuropeina, a u navedenom diplomskom radu dodatno su identificirani korištenjem masenog detektora koji nije pokazao da imaju svi ti spojevi posjeduju molekularni ion  $[M-H]^-$  377,2 koji odgovara molekularnoj masi aglikona oleuropeina. Grupa sekoiridoida je druga skupina fenolnih spojeva koja svojom koncentracijom značajno doprinosi njihovom sastavu u uzorcima. U uzorku iz 2014. godine sekoiridoidi čine 30,5 % polifenola ( $68,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ), a u uzorku iz 2015. godine 21,4 % ( $42,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Ova skupina posjeduje spektar koji odgovara spektru tirosola, a identificirana je usporedbom s diplomskim radom Velagić (2016).

Utjecaj na različite koncentracije fenolnih spojeva svakako može imati stupanj zrelosti plodova. Koncentracija oleuropeina, ali i ostalih fenolnih spojeva u plodu, postepeno raste zrenjem ploda te se u jednom trenutku naglo smanjuje na način da je njihova koncentracija najmanja u potpuno crnim plodovima. Salvador i suradnici (2001) proveli su istraživanje kojem su stupanj zrelosti ploda povezali s osnovnim parametrima kvalitete maslinova ulja. Za sortu Cornicarba najbolje je plodove ubrati i preraditi kad je stupanj zrelosti između 3,0 i 4,5 (što je izračunato pomoću metode Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje). Unatoč brojnim istraživanjima još je uvijek vrlo teško odrediti koji je generalno optimalni stupanj zrelosti plodova maslina budući da je potrebno još mnogo istražiti o svakom individualnom kultivaru. Uzorci iz 2014. i 2015. godine brani su prema vizualnoj procjeni maslinara pri čemu se nije računao indeks zrelosti kako je propisano metodom Međunarodnog vijeća za masline zbog čega postoji mogućnost da su plodovi masline bili u različitim stadijima zrenja što je uzrokovalo i različite koncentracije fenolnih spojeva.

Dostupnost vode u masliniku također može biti jedan od čimbenika koji utječu na razliku u sastavu polifenolnih spojeva. Kako je prije objašnjeno, razdoblje u kojem se može na ovaj način utjecati na povećanje ili smanjenje udjela fenolnih tvari u ulju prvenstveno je vrijeme od očvršćenja koštice do završetka inicijalne faze razvoja ploda (Stefanoudaki i sur., 2009). Potreba za navodnjavanjem direktno je povezana s vremenskim prilikama. Usporedbom ulja iz plodova istog stupnja zrelosti primijećeno je da temperatura tijekom dozrijevanja ploda ima značajan utjecaj. Ulja iz godina koje su bile toplije ima značajno veći udio polifenola, tokoferola i hlapljivih komponenti (Tura i sur., 2008). Maslinici koji nisu navodnjavani u svome će plodu imati više fenolnih spojeva od plodova maslinika koji su

redovito opskrbljivani vodom (Stefanoudaki i sur., 2009). Količine padalina u razdoblju dozrijevanja ploda tijekom 2014. i 2015. godine vrlo su slične. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda za 2014. godinu količina padalina za Pulu tijekom kolovoza, rujna i listopada ukupno iznosi 355,1 mm. Za isto područje i vremensko razdoblje 2015. godine količina padalina iznosi 319,2 mm (DHMZ, 2016). Masline iz čijih je plodova dobiveno ulje nisu navodnjavane tijekom te dvije godine, a slična količina oborina može objasniti slične koncentracije fenolnih spojeva u dva analizirana uzorka.

## **6.ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenog eksperimentalnog dijela te dobivenih i obrađenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Prema vrijednostima osnovnih parametara kvalitete oba uzorka analiziranog djevičanskog maslinovog ulja mogu se svrstati u kategoriju ekstra djevičanskog maslinovog ulja prema važećoj legislativi.
2. Koncentracija ukupnih polifenola u ulju iz 2014. godine iznosi  $225 \text{ mg kg}^{-1}$  dok u ulju iz 2015. iznosi  $199 \text{ mg kg}^{-1}$ .
3. Dominantni fenolni spojevi u oba analizirana ulja su aglikoni oleuropeina (od 46 do 58 %). Slijede ih spojevi iz skupine sekoiridoida (21-30 %), a detektirani su još hidroksitirozol i tirozol, no u značajno nižim koncentracijama.
4. Zbog sličnih vremenskih uvjeta (količine oborina) tijekom ove dvije vegetacijske godine, nema značajnijih razlika u udjelu i sastavu fenolnih spojeva analiziranih djevičanskih maslinovih ulja.

## **7.LITERATURA**

Alloggio, V., Caponio, F. (1997) The influence of olive paste preparation techniques on the quality of olive oil. II. Evolution of phenolic substances and of some quality parameters referred to the ripening of drupes in virgin olive oil from the Coratina cv. *Riv. Ital. Sostanze Gr.***74**, 443–447.

Anonymous (2016) Leccino, <<http://www.monocultivaroliveoil.com/project/siena/>>, Pristupljeno 9.lipnja 2016.

Aparicio R., Luna,G. (2002) Characterization of Monovarietal Virgin Olive Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.***104**, 614-627.

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

DHMZ (2016) Državni hidrometeorološki zavod, <[http://klima.hr/klima.php?id=k2&param=k2\\_1&elmet=oborina](http://klima.hr/klima.php?id=k2&param=k2_1&elmet=oborina)>. Pristupljeno 28. lipnja 2016.

Fedeli E., Cortesi, N. (1993) Quality, Origin and Technology of Virgin Olive Oils. *Riv. Ital. Sostanze Gr.***70**, 419-426.

Frega, N., Bocci, F., Lercker, G. (1993) Free Fatty Acids and Diacylglycerols as Quality Parameters for Extra Virgin Olive Oil. *Riv. Ital. Sostanze Gr.***70**, 153-156.

Halliwell, B., Gutterige, M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method. Enzymol.***186**, 1–85.

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

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

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

Hugues, C. (1999) Maslinarstvo Istre: usporedna stručna rasprava i atlas glavnih sorata maslina uzgajanih u Istri, Ceres, Zagreb.

IOOC - International Olive Oil Council (2009) COI/T.20/Doc.29 - Determination of biophenols in olive oils by HPLC. <<http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-ingles/corp/AreasActivitie/economics/AreasActivitie.html>> Pristupljeno 28. lipnja 2016.

Kiosseoglou V., Kouzounas, P. (1993) The Role of Diglycerides, Monoglycerides and Free Fatty Acids in Olive Oil Minor Surface-active Lipid Interaction With Proteins at Oil-water Interface. *J. Disper.Sci. Technol.* **14**, 527-531.

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

Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., Zetta, L. (1995) <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization of oleuropein aglycones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **115**, 1519–1523.

Limiroli, R., Consonni, R., Ranalli, A., Bianchi, G., Zetta, L. (1996) <sup>1</sup>H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *J. Agric.Food Chem.***44**, 2040–2048.

Minguez-Mosquera, I.M., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., Garrido-Fernandez, J. (1990) Pigments Present in Virgin Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.***67**, 192-196.

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

Morchio, G., De Anreis, R., Fedeli, E. (1987) Investigations of Total Sterols Content in the Olive Oil and Their Variation During Refining Process. *Riv. Ital. Sostanze Gr.***64**: 185-192.

Paganuzzi, V. (1987) Monoglycerides in Vegetable Oils. Note I: Monoglycerides in Vegetable Oils. *Riv. Ital. Sostanze Gr.***64**, 411-414.

Paganuzzi, V. (1999) Monoglycerides in Vegetable Oils. Note IV: Raw Oils of Low Unsaturation, *Riv. Ital. Sostanze Gr.***76**, 457-471.



Perrin, J. (1992) Minor Components and Natural Antioxidants of Olives and Olive Oils. *Rev. Fr. Corps Gras* **39**, 25-32.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001) Antioxidants in food: Practical Applications, CRC Press, Boca Raton, str. 311-330.

Pribetić, Đ. (2006) Sorte maslina u Istri, MIH, Poreč.

Rabascall, N.H., Riera, J.B. (1987) Variations of the Tocopherols and Tocotrienols Content in the Obtention, Refining and Hydrogenation Processes of Edible Oils. *Gracias Aceites* **38**, 145-148.

Reiter, B., Lorbeer, E. (2001) Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography-mass Spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 881-888.

Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G. (2001) Influence of fruit ripening on "Cornicabra" virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.* **73**, 45-53.

Santinelli, F., Damiani, P., Christie, W.W. (1992) The Triacylglycerol Structure of Olive Oil Determined by Silver Ion High Performance Liquid Chromatography in Combination With Stereospecific Analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 552-556.

Scarafia, L. (2013) Olive cultivars and oil polyphenols. U: West Coast Olive Guide, (Scott, J., ured), JCS Marketing, Fresno, str. 8-10.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., Montedoro, G.F. (1999) Phenolic compounds of olive fruit: one- and twodimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 12-18.

Servili, M., Montedoro, G. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **104**, 602-613.

Stefanoudaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K., Harwood, J. (2009) Effect of Irrigation on Quality Attributes of Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7048-7055.

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

Tura, D., Failla, O., Pedò, S., Gigliotti, C., Bassi, D., Serraiocco, A. (2008) Effects of Seasonal Weather Variability on Olive Oil Composition in Northern Italy. *Acta hortic.* **791**, 769-776.

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

Velagić, D. (2016) Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju. Diplomski rad.

Vis-á-vis (2016) <<http://islandvis.blogspot.hr/2015/10/odreen-dan-pocetka-prerade-maslina.html>>, Pristupljeno 9. lipnja 2016.

Visioli, F., Bellomo, G.F., Galli, C. (1998) Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **247**, 60–64.

Vlahov, G. (2005) <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Check 1,3-random, 2-random pattern of fatty acid distribution in olive oil triacylglycerols, *Spectroscopy* **19**, 109-117.