

# Utjecaj endogenih enzima ploda na kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja

---

Žanetić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*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:159:673645>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Karla Žanetić**

7731

**UTJECAJ ENDOGENIH ENZIMA PLODA NA KEMIJSKI  
SASTAV DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

ZAVRŠNI RAD

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** 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" (IP-2020-02-7553)

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

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju ulja i masti**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**Utjecaj endogenih enzima ploda na kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja**

**Karla Žanetić, 0058214795**

**Sažetak:** Cilj ovog preglednog rada je istražiti utjecaj endogenih enzima ploda masline na kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja. U radu je opisana građa i sastav ploda masline, kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja te prisutni endogeni enzimi. Prikazane su sve faze tehnološkog procesa prerade maslina u ulje te opisano djelovanje enzima u ovisnosti o različitim uvjetima tijekom prerade. Enzimskim reakcijama kataliziranim oksidoreduktazama PPO i POD narušava se kvaliteta maslinovog ulja oksidacijom triacilglicerola i fenolnih komponenti. Kvalitetnom kemijskom sastavu doprinose hidrolaze glukozidaze koje prevode hidrofilne fenolne tvari u manje hidrofilne oblike koji su topljivi u ulju i povećaju antioksidacijsku stabilnost ulja. Hidrolaze lipaze koje hidroliziraju triacilglicerole povećaju koncentraciju slobodnih masnih kiselina, di- i monoacilglicerola koji su supstrati za oksidoredukcijski enzim lipoksigenazu. U tehnološkom procesu proizvodnje endogeni enzimi su pod utjecajem različitih parametara što uvjetuje njihovu aktivnost te posljedično i kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja.

**Ključne riječi:** djevičansko maslinovo ulje, endogeni enzimi

**Rad sadrži:** 26 stranice, 13 slika, 2 tablice, 27 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane:** rujan, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Oil and Fat Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Influence of endogenous enzymes from fruit on chemical composition of virgin olive oil**

**Karla Žanetić, 0058214795**

**Abstract:** The aim of this review is to investigate the influence of endogenous enzymes of olive fruit on the chemical composition of virgin olive oil. The structure and composition of the olive fruit, the chemical composition of virgin olive oil and the endogenous enzymes is presented. The activity of enzymes is described depending on different processing conditions. Enzymatic reactions catalyzed by oxidoreductases, PPO and POD impair the quality of olive oil by oxidation of triacylglycerol and phenols. Glycoside hydrolases contribute to quality of oil chemical composition by converting hydrophilic phenols into smaller forms soluble in oil and increase antioxidant stability of oil. Lipase hydrolases that hydrolyze triacylglycerols increase the concentration of free fatty acids, di- and monoacylglycerols, which are substrates for the oxidoreducing enzyme lipoxygenase. In the technological process of production, endogenous enzymes are influenced by various parameters, which determines their activity and, consequently, the chemical composition of virgin olive oil.

**Keywords:** endogenous enzymes, virgin olive oil

**Thesis contains:** 26 pages, 13 figures, 2 tables, 27 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

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

**Technical support and assistance:**

**Defence date:** September, 2021.

## **SADRŽAJ:**

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Građa i sastav ploda masline	2
2.1.1. <i>Kožica ploda masline</i>	2
2.1.2. <i>Pulpa ploda masline</i>	3
2.1.3. <i>Sjemenka ploda masline</i>	3
2.2. Enzimi ploda masline	4
2.2.1. <i>Hidrolaze</i>	5
2.2.2. <i>Oksidoreduktaze</i>	7
2.3. Utjecaj postupaka proizvodnje na aktivnost endogenih enzima masline	9
2.3.1. <i>Utjecaj mljevenja i drobljenja</i>	10
2.3.2. <i>Utjecaj miješenja</i>	12
2.4. Kemijski sastav maslinovog ulja	17
2.4.1. <i>Osapunjivi dio</i>	17
2.4.2. <i>Neosapunjivi dio</i>	18
3. Zaključak	23
4. Literatura	24

# 1. UVOD

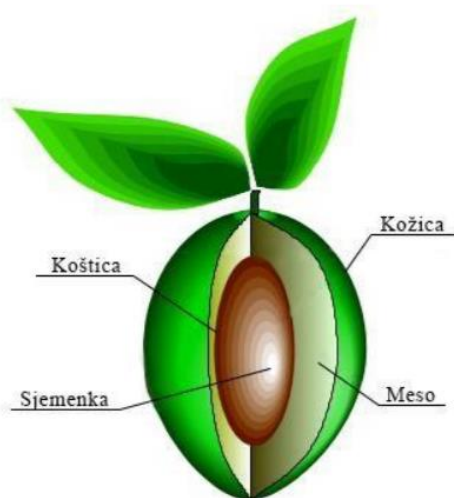
Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena biljka od davnina poznata po svojim blagodatima i korištena u brojne svrhe, a prvenstveno uzgajana zbog maslinovog ulja. Mediteranska klima, koja prevladava u umjerenom pojasu, optimalna je po temperaturi, količini sunčeve svjetlosti i količini vlage za ovu biljku, a otpornost masline prema niskim temperaturama i olujni vjetrovi jedini su ograničavajući faktori u njenom uzgoju (Večernik, 1994). Maslinovo ulje je jedna od glavnih i prepoznatljivih namirnica mediteranske prehrane s dokazanim pozitivnim utjecajem na zdravlje (Žanetić, 2006). Prerada maslina u ulje provodi se isključivo mehaničkim postupkom te se može provesti tradicionalnim ili, danas prihvatljivijim, modernim putem. Tradicionalna prerada podrazumijeva izdvajanje ulja prešanjem upotrebom otvorenih hidrauličkih preša, čemu vrlo često prethodi čuvanje maslina u morskoj ili pitkoj vodi, što dokazano umanjuje kvalitetu ulja. Moderan način prerade uključuje korištenje kontinuiranih centrifugalnih ekstraktora za dobivanje ulja, uz što manje vrijeme skladištenja ploda (Koprivnjak, 2006). Ono što maslinovo ulje čini posebnijim od ostalih biljnih ulja jest izostanak rafinacije u proizvodnji (neutralizacija, bijeljenje, deodorizacija) i moguće direktno konzumiranje prirodnog soka masline u kojem su što više očuvani poželjni sastojci koji karakteriziraju ekstra djevičansko maslinovo ulje kao najkvalitetniju kategoriju maslinovog ulja (Kiritsakis, 2000). U plodu masline događaju se brojne promjene te biokemijske reakcije pod utjecajem endogenih enzima koje tijekom dozrijevanja, branja, prerade te čuvanja ulja određuju kakvoću konačnog proizvoda. Kako bi se očuvale komponente koje pridonose senzorskim karakteristikama i antioksidacijskoj stabilnosti ulja treba obratiti pažnju na različite parametre u proizvodnji.

Cilj ovog preglednog rada bio je istražiti kakav je utjecaj endogenih enzima ploda masline na kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Građa ploda masline

Sirovina za dobivanje maslinovog ulja je bobičasti plod masline koji može bit okruglog ili eliptičnog oblika te različite veličine i prosječne težine od 2-12 grama, ovisno o sorti. U procesu dozrijevanja boja ploda se mijenja od zelene, preko žućkaste i crvenkaste do tamno crvene i konačne plavo-crne ili crne boje. Dijelovi ploda su kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) koja čini najveći udio ploda i koštica (endokarp) unutar koje je zaštićena sjemenka (endosperm), prikazani su na slici 1.



Slika 1. Dijelovi ploda masline (Baccioni, 2014)

#### 2.1.1. Kožica ploda masline

Kožica ili epikarp čini 1,5-3,5% mase ploda, obavija mesnati plod i štiti ga od vanjskih utjecaja. Kožica je presvučena masnom voštanom kutikulom sastavljenom od triacilglicerola, triterpenskih kiselina, alifatskih i triterpenskih alkohola te voskova i drugih tvari. U najvećoj količini sadrži pigmente ploda, a to su lipofilni klorofili, karoteni i ksantofili, čija koncentracija tijekom zriobe opada i boja ploda prelazi iz zelene u žuto-zelenu nijansu, te hidrofilne antocijane, čija je sinteza vidljiva pojavom crvenkasto-ljubičastih nijansi na zreлом ploda. Antocijani se ne nalaze u ulju i nemaju utjecaja na njegovu kakvoću. U preradi maslina kožica se ne odvoja već dolazi u kontakt s uljem pa tako voštana kutikula i lipofilni pigmenti postaju sastavni dio ulja (Koprivnjak, 2006).

### 2.1.2. Pulpa ploda masline

Mesnati dio ploda (pulpa ili mezokarp), koji čini 70-81% mase ploda, sadrži najveći postotak ulja u odnosu na druge dijelove ploda, a uz to sadrži i veliku količinu vode. Stanice mezokarpa obavijene su staničnom stjenkom građenom od celuloze, pektoceluloze i hemiceluloze. Pektin se nalazi i u međustaničnom prostoru kao središnja lamela te služi za međusobno povezivanje stanica i čvrstoću tkiva. Kapljice ulja se tijekom zrenja nakupljaju u mjehurićima vakuola koji dosegnu i više od 80% volumena stanice. Sastav vakuola u uljnim stanicama čine triacilgliceroli (98%) i u manjem postotku ugljikovodici, alkoholi, steroli i voskovi. Citoplazmu stanice čini vodeni dio u kojem se nalaze šećeri, organske kiseline, enzimi, fenoli i druge tvari topljive u vodi. Prilikom prerade u procesu mljevenja i razaranja stanične strukture, kapljice ulja iz vakuola lako se povezuju u veće kapljice dok dio ostaje fino dispergiran u vodenoj fazi, a dolazi i do kontakta s koloidnim tvarima (pektini) koji s vodom daju strukturu gela i tako otežavaju izdvajanje ulja. Enzimi koji se nalaze u vodenom dijelu stanica pulpe postaju aktivni prilikom razaranja stanične strukture te mogu ili narušiti kvalitetu ulja (lipaze, lipoksigenaze, peroksidaze) ili pojedini zbog svoje uloge tijekom dozrijevanja pridonose lakšem izdvajanju ulja (celulaze, poligalakturonaze, pektin metilesteraze) (Koprivnjak, 2006).

### 2.1.3. Sjemenka ploda masline

Sjemenka se nalazi u drvenastoj koštici (11-24,5% masenog udjela ploda), čini 2-4% mase ploda te sadrži mali udio ulja koji ne pridonosi znatno ukupnoj količini ulja. Ulje je najviše sadržano u raspršenom obliku u citoplazmatskom dijelu sjemenke pa stoga i to ometa njegovo izdvajanje. Karakteristike ulja sjemenke su bogatstvo tokoferolima, specifične fenolne tvari, veći udio linolne kiseline i sterola, te veća aktivnost enzima lipoksigenaze i peroksidaze naspram njihove aktivnosti u ostalim dijelovima ploda (Koprivnjak, 2006).



## 2.2. Enzimi ploda masline

Veliku ulogu u formiranju mirisnih i okusnih svojstava te u iskorištenju procesa prerade imaju endogeni enzimi masline. Tijekom tehnološkog procesa mljevenja oslobađaju se tvari iz vakuola i membrana stanice ploda te dolazi do aktivacije bioloških puteva endogenih enzima masline. Vrste enzima u maslini možemo podijeliti na hidrolaze i oksidoreduktaze. U skupinu hidrolaza, koje provode reakcije cijepanja esterske veze između glicerola i masnih kiselina, ubrajamo: lipaze, glukozidaze, celulaze, poligalakturonaze i pektin-metilesteraze. Oksidoreduktaze provode reakcije oksidacije i redukcije, tj. napada kisika na jednostruku nezasićenu oleinsku, dvostruko nezasićenu linolnu te rijetko na trostruko nezasićenu linolensku kiselinu. U procesu oksidacije formiraju se slobodni radikali masnih kiselina te primarni produkti oksidacije: peroksidi i hidroperoksidi koji potiču daljnju oksidaciju kao prooksidansi. Ovu skupinu enzima čine polifenoloksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze (Koprivnjak, 2006). Raspodjela enzima u sastavu ploda masline prema Gugiću i Ordulju (2006) uz određene modifikacije prikazana je u tablici 1. U nastavku su opisani endogeni enzimi masline koji su aktivni za vrijeme procesa ekstrakcije ulja iz masline.

Tablica 1. Raspodjela enzima u plodu masline (%) (Gugić i Ordulj, 2006)

	<b>pokožica</b>	<b>pulpa</b>	<b>sjemenka</b>
<b><u>Hidrolaze</u></b>			
Lipaze	-	većina	većina
Glukozidaze	0,0-5,0	73,0-97,5	0,5-7,0
Celulaze	6,0-12,5	66,5-88,0	5,5-22,0
Poligalakturonaze	9,0-24,5	66,5-83,0	8,0-12,0
Pektin-metilesteraze	-	98,0-99,5	0,5-2,0
<b><u>Oksidoreduktaze</u></b>			
Polifenoloksidaze	-	98,0-99,5	0,5-2,0
Lipoksigenaze	3,5-15,5	42,5-82,0	12,5-50,5
Peroksidaze	-	34,5-56,5	34,5-76,5

### 2.2.1. Hidrolaze

Enzimi hidrolaze provode hidrolitičke i reverzne reakcije cijepanja kovalentnih veza uz molekulu vode. Supstrati su biološki polimeri, primjerice peptidne veze u proteinima, glikozidne veze u ugljikohidratima i esterske veze u lipidima (Whitaker, 2003). U tehnologiji proizvodnje maslinovog ulja od najvećeg značaja su lipaze te glukozidaze.

Lipaze su najzastupljenije u pulpi i koštici masline, a njihova posljedica djelovanja je hidroliza triacilglicerola i oslobađanje slobodnih masnih kiselina (Koprivnjak, 2006). Područje djelovanja je između vodene i uljne faze te su prvi enzimi odgovorni za razgradnju triacilglicerola na di- i monoacilglicerole, glicerol i slobodne masne kiseline. Produkti hidrolitičkih reakcija lipaza su supstrati za daljnje reakcije lipoksigenaznog puta i proizvodnju hidroperoksida (Peres, 2015). Maksimalna aktivnost lipaze dokazana je pri pH 5,0 te se uz kalcij povećava dok se uz prisustvo bakra smanjuje i za 75%. Studije su pokazale da stupanj zrelosti, očitovan bojom pokožice, definira aktivnost lipaze te se povećava tijekom ranog razvoja ploda dok opada u trenutku zrelosti i ljubičaste boje ploda. Osim pH vrijednosti definirana je i optimalna temperatura između 25 i 45°C te maksimalna aktivnost pri 35°C (Panzanaro i sur., 2010). Uz endogene lipaze na hidrolizu triacilglicerola utječu i egzogene lipaze koje potječu od mikrobioma ploda (mliječne bakterije, gljive, *Pseudomonas*). *Penicillium* se u istraživanjima pokazao kao najveći proizvođač enzima lipaze. Aktivnost lipaze kontrolira se vremenom, načinom berbe i proteklom vremenom nakon berbe te kontrolom mikrobioma ploda masline (Peres, 2015).

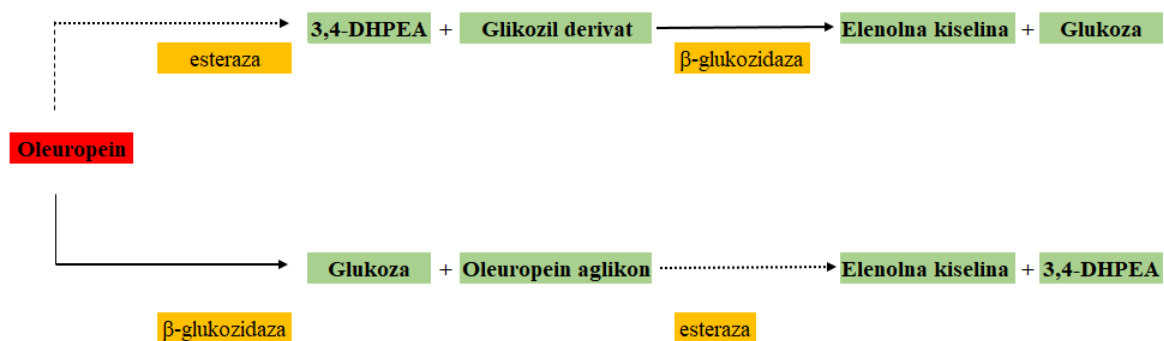
Glukozidaze su enzimi koji provode hidrolizu između dva glukozna ostatka ili između glukoze i arilnog ili alkilnog aglikona. Njihovo djelovanje podrazumijeva odvajanje šećera iz fenolnih glukozida čime nastaju fenolni aglikoni topljivi u ulju. U plodu masline nalaze se u pulpi (Koprivnjak, 2006). Skupina glukozidaza obuhvaća esteraze koje se dijele u podskupine ovisno o tome koje veze napadaju. Tako esteraze mogu djelovati na karboksilne estere, zatim razlikujemo tioester hidrolaze, fosforne monoester hidrolaze (fosfataze), fosfodiester hidrolaze, trifosforne monoester hidrolaze, sulfataze, difosforne monoesteraze i fosforne triester hidrolaze. Esteraze su zaslužne za razgradnju složenih fenolnih spojeva na jednostavnije fenolne kiseline i alkohole. Enzimi glukozidaze se u biljnom materijalu nalaze u obliku mješavine kompleksnih i jednostavnih glukozidaza. Dok jedna vrsta glukozid hidrolaza provodi razgradnju polisaharida stanične stijenke, neke vrste imaju mogućnost hidrolize veze između polisaharida, lignina i proteina (Peres, 2015).

U procesu degradacije stanične stjenke uključeni su brojni enzimi koji djeluju na celulozne i necelulozne biopolimere, hemicelulozu, pektinske polisaharide i bjelančevine. Razgradnju polisaharida stanične stjenke provode celulaze egzopolisaharidaze, endopolisaharidaze i druge hidrolaze koje ne pripadaju ovim dvjema grupama već cijepaju neugljikohidratne grupe, kao što su O-acetil, O-metil i druge, vezane za polisaharide stjenke. Egzopolisaharidaze hidroliziraju vezu na nereducirajućem kraju lanca, a endopolisaharidaze napadaju veze na bilo kojem položaju u lancu. Pektinski polisaharidi bogati su arabinozom, glukuronoksilanima, celulozom i manje s komponentama poput ksiloglukana, manana i glikoproteina. Tijekom sazrijevanja više enzima doprinosi degradaciji kompleksa polisaharida stanične stjenke. Tu su uključeni enzimi glukozid hidrolaze poligalakturonaze i razne glukozidaze (Minic, 2008).

Enzimi stanične stjenke odgovorni za promjene na pektinskim frakcijama tijekom zrenja i procesiranja ploda su pektinaze, koje hidroliziraju pektin različitim mehanizmima. Dije se u dvije skupine: pektinesteraze (PE) i pektin depolimeraze. Pektinesteraze imaju različite izomerne oblike koji omogućuju modifikaciju stanične stjenke biljaka i posljedičnu degradaciju. One kataliziraju reakciju deesterifikacije metoksilne skupine pektina i tvore pektinsku kiselinu. Pektin depolimeraze lako razdvajaju glavni lanac i dalje se klasificiraju kao poligalakturonaze (PG) i pektinliaze (PL). Depolimeraze kataliziraju cijepanje glikozidne veze hidrolizom ili  $\beta$ -eliminacijom (liazom). Progresivno mekšanje tkiva je rezultat postupnog otapanja protopektina u staničnim stijenama i nastajanje pektina i drugih proizvoda. Nakon otapanja počinje depolimerizacija i deesterifikacija pektinskih polisaharida. Taj proces se odvija tijekom sazrijevanja brojnih plodova poput masline.

Identificirano je sedam glukozidaza u pulpi masline:  $\beta$ -glukozidaza,  $\alpha$ -galaktozidaza,  $\beta$ -galaktozidaza,  $\alpha$ -arabinozidaza,  $\alpha$ -manozidaza,  $\beta$ -ksilozidaza i  $\beta$ -N-acetilglukozamidaza, kroz četiri faze zrenja. Različite specifične glukozidaze su zaslužne za procese potpune ili djelomične degradacije. Većina ovih enzima je prisutna u jako niskim količinama tijekom cijelog razvoja i dozrijevanja plodova. Međutim, općenito sve hidrolaze imaju povećanu aktivnost sazrijevanjem, a osobito stanične hidrolaze koje pokazuju najveću aktivnost u klimakterijskoj fazi razvoja. Važnost ovih enzima je u različitim fiziološkim funkcijama: obrana biljaka, signalizacija, metabolizam stanične stjenke i lignifikacija. Primjerice čest je napad raznih insekata prije i nakon branja ploda, koje zatim dovode do ozbiljnih narušavanja u kvaliteti maslina. Plodovi maslina osjetljivi su na napad maslinine muhe što bi moglo biti povezano sa sposobnošću  $\beta$ -glukozidaze za razgradnju oleuropeina i proizvodnju vrlo reaktivne molekule u oštećenim tkivima (Peres, 2015).

Djelovanje enzima  $\beta$ -glukozidaze predmet je brojnih istraživanja jer ima kritičnu ulogu u oblikovanju fenolnog profila djevičanskog maslinovog ulja (Garcia-Rodriguez i sur., 2015). Esteraze i  $\beta$ -glukozidaze prirodno su prisutne u pulpi masline te oba enzimska puta razgradnje oleuropeina dovedu do istih produkata, to su hidroksitirozol (3,4-DHPEA), glukoza i elenolna kiselina (slika 5). Osim fenolnih alkohola i kiselina, nastaje i aglikon oleuropeina, a na isti način glukozidaze djeluju i na sekoiridoid ligstrozid. Hidrolizom ligstrozida nastaje ligstrozid aglikon i fenolni alkohol tirozol (*p*-HPEA) koji imaju slabiju antioksidacijsku aktivnost od derivata oleuropeina (Koprivnjak, 2006).



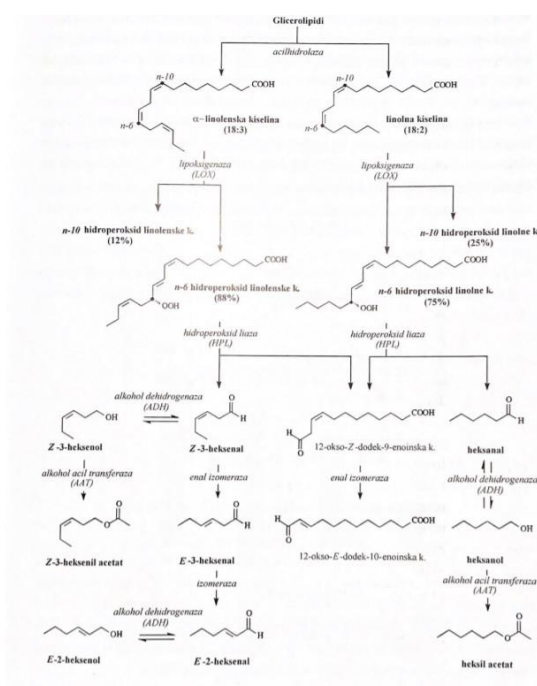
Slika 5. Djelovanje enzima esteraze i  $\beta$ -glukozidaze (Peres, 2015)

### 2.2.2. Oksidoreduktaze

Enzimi oksidoreduktaze također djeluju na fenolne spojeve i na taj način oblikuju fenolni profil djevičanskog maslinovog ulja te su preteča enzimskim reakcijama koje oblikuju poželjne tvari arome ulja. Oksidoreduktaze (poput polifenoloksidaza i peroksidaze), uz prisutnost kisika, degradiraju fenolne tvari što uzrokuje narušenu kvalitetu konačnog proizvoda tehnološkog procesa proizvodnje. S druge strane, za nastanak poželjne arome ulja zaslužan je enzim lipoksigenaza (Škevin, 2016).

Biljna lipoksigenaza u stanici se nalazi u citoplazmi i vezana je za membrane staničnih organela. Nizom biokemijskih reakcija u koje je uključen ovaj enzim nastaju hlapljive tvari s poželjnim mirisnim svojstvima. Taj složeni proces naziva se lipoksigenazni put (LOX put). Enzimski LOX put započinje enzimom acil-hidrolazom koja oslobađa masne kiseline iz glicerolipida, a zatim lipoksigenaza provodi oksidaciju dvostruke i višestruko nezasićene masne kiseline do hidroperoksida iz kojeg nastaju hlapivi aldehidi cijepanjem hidroperoksid-liazom

(HPL). Aldehidi se reduciraju alkohol-dehidrogenazom (ADH) u alkohole koje zatim acil-transferaza (AAT) prevodi u odgovarajuće estere (Soldo, 2016) (slika 6.). Visoke razine aktivnosti LOX puta otkrivene su u ranim fazama razvoja masline, dok je u uznapređovalom stadiju, kada je plod spreman za branje, aktivnost smanjena (Salas i sur., 1999). Aroma konačno dobivenog ulja uvjetovana je i mljevenjem i miješenjem maslinovog tijesta gdje se također aktivira lipoksigenazni put. Produkti LOX puta primjerice heksanal, heksanol i heksil-acetat i njihovi cis i trans izomeri daju glavnu zelenu notu ulja koja može biti slatkasta ili gorka, ovisno o prisutnim izomerima (Morales i sur., 1999). Aktivnost lipoksigenaze, hidroperoksid liaze te dostupnost supstrata, neesterificiranih polinezasićenih masnih kiselina, a osobito linolne kiseline, glavni su čimbenici za biosintezu komponenata arome (Peres, 2015).



Slika 6. Shematski prikaz LOX puta (Koprivnjak, 2006)

Peroksidaze (POD) su enzimi koji su visoko specifični za katalizu redukcije vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), a pri tome oksidiraju različite organske tvari kao što su fenoli, aromatski amini, aminofenoli, diamini i drugi spojevi koji se ponašaju kao donori vodika. Ovim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama nastaju visoko reaktivne molekule, slobodni radikali i međuprodukti koji lako polimeriziraju. Oksidacija fenola peroksidazama ograničena je dostupnom količinom vodikovog peroksida, dok je njihova autooksidacija u oštećenom tkivu moguća i tako pridonosi povećanju koncentracije  $H_2O_2$ . Ovdje je vidljivo sinergističko djelovanje peroksidaze i polifenol oksidaze na oksidacijsku degradaciju fenolnih spojeva. Ova dva enzima imaju različite aktivnosti tijekom sazrijevanja kako bi mogli oksidirati glavne glukozide prisutne u plodu te

fenolne spojeve dobivene u ulju, a posebno sekoiridoidne komponente dobivene iz oleuropeina (Peres, 2015). Peroksidaze se nalaze u različitim dijelovima biljke, a posebno u koštici (98%) gdje imaju najveću aktivnost (Luaces i sur., 2007). Značajne su im uloge u fiziološkim procesima, primjerice u sintezi lignina u staničnoj stjenki, uklanjanju oksidacijskih tvari (viška vodikovog peroksida) kao odgovor na oksidacijski stres, u obrani organizma od napada patogena (maslinine muhe) te za katabolizam nekih fitohormona.

Polifenol oksidaze (PPO) su enzimi široko rasprostranjenu u biljnim i životinjskim organizmima te gljivama i bakterijama. Zbog njihove različitosti i kompleksnosti reakcija razlikuje se mnogo vrsta: tirozinaza, fenolaza, katehol oksidaza, kateholaza, o-difenol oksidaza, monofenol oksidaza i krezolaza. Poput peroksidaza, oni djeluju tijekom zrenja, kao odgovor na ubod muhe i neke druge abiotičke stresove. Posljedica oksidacije fenolnih komponenti od strane PPO i POD je reducirani gorki okus ulja što je prema nekim istraživanjima i blagotvorni učinak ovisno o kojem prehrambenom proizvodu je riječ (Laane i sur., 2003).

### **2.3. Utjecaj postupaka proizvodnje na aktivnost endogenih enzima masline**

Proizvodnja kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja zahtijeva pomno praćenje svih koraka propisanog tehnološkog procesa. Prvi korak je određivanje stupnja zrelosti ploda i trenutka branja ploda. Kada je trećina plodova crne boje, a dvije trećine još uvijek zelene započinje berba te se plodovi u što kraćem vremenu dopremaju u uljaru. Skladištenje plodova mora biti kratkotrajno jer se tijekom čuvanja odvijaju kemijske i biokemijske reakcije koje posljedično mogu dovesti do kvarenja i degradacije ulja (Škevin, 2016). Potrebno je ukloniti fizičke nečistoće kao što je lišće, grančice, kamenje i zemlja, tako što se masline usipavaju u koš kroz rešetke gdje zaostaju veće čestice a zatim se propuhuju strujom zraka i odvajaju sitnije nečistoće (Koprivnjak, 2006). Zatim se masline kratko peru u vodi i ispiru mlazom kako bi se očistili eventualni zaostaci zemlje nakon čega su spremne za slijedeći postupak mljevenja (Škevin, 2016). Ključan trenutak za aktivnost endogenih enzima ploda su procesi mljevenja i miješenja u kojima se podešavanjem raznih parametara može djelovati na aktivnost enzima i posljedično na sastav dobivenog ulja.

### 2.3.1. Utjecaj mljevenja i drobljenja

Prvotni cilj mljevenja je razaranje stanične strukture i oslobađanje kapljica maslinovog ulja iz vakuola koje se nalaze u citoplazmi stanica. Pritom se provodi drobljenje pulpe, koštice masline te kožice čime se omogućava kontakt ulja i specifičnih tvari koje se nalaze u svim dijelovima ploda. U ovoj fazi dolazi do novih kemijskih i biokemijskih reakcija koje mogu više ili manje doprinijeti svojstvima konačno proizvedenog ulja. Neželjena pojava koja se može pojaviti tijekom mljevenja je stvaranje emulzije, uslijed koje, svaku kapljicu ulja okruži lipoproteinska ovojnica (Koprivnjak, 2006). Takve ovojnice imaju bipolarni karakter te se jedan dio okreće prema kapljici ulja, a polarni dio se otapa u vodi i na taj način se stvaraju sitnije kapljice ulja među kojima su slabije privlačne sile. To otežava izdvajanje ulja i teži se tome da se ulje što manje rasprši kako bi se spriječilo stvaranje ovakve stabilne emulzije. Važan je i stupanj samljevenosti koštice jer njeni fragmenti omogućavaju stvaranje drenažnog efekta i stvaranje kanalića u samljevenom tijestu kako bi se lakše izdvojilo ulje (Škevin, 2016).

Mljevenje se može provesti različitim izvedbama mlinova: kamenim mlinovima koji predstavljaju tradicionalni postupak ili metalnim mlinovima koji se danas najviše koriste u modernoj proizvodnji. Kameni mlinovi ili kolergangi bili su jedini uređaji za mljevenje maslina do 1960-ih godina. Građeni su od 2 ili 3 granitna valjaka, koji mogu biti različitog promjera (1,2-1,4 m), različite debljine (30-40 cm) i mase (1-3 t). Valjci se nalaze na granitnoj podlozi okruženoj ogradom koja oblikuje zdjelu u kojoj se nalazi samljeveni materijal koji se strugačima i lopaticama usmjeruje ispod valjaka. Brzina okretanja valjaka je 12-15 o/min, a vrijeme mljevenja ovisi o daljnjem načinu izdvajanja ulja. Ako se ulje izdvaja procesom prešanja onda se mljevenje odvija 20-30 min, a ukoliko maslinovo tijesto ide na centrifugalnu ekstrakciju potrebno je mljevenje provesti 40-50 min kako bi se dobilo finije i homogenije tijesto (Koprivnjak, 2006). Prednost kamenih mlinova je što ne dolazi do stvaranja emulzija zbog male brzine okretanja kamenih valjaka, ne zagrijava se tijesto, ostvaruje se učinkovito razaranje stanične strukture te su očuvana prirodna svojstva ploda u tijestu. Također, prednost je što djelomično zamjenjuje ulogu mjesilice jer dolazi do spajanja manjih kapljica u veće te u slučaju mljevenja kamenim mlinovima nije neophodno provesti miješenje. Neki od nedostataka su zauzimanje velikog prostora, visoka cijena, teško održavanje i čišćenje stroja te spor ne kontinuirani rad (Drljepan, 2014).

U pogledu na enzime, prednost kamenih mlinova je što nema zagrijavanja koje bi denaturiralo enzim lipoksigenazu. S druge strane maslinovo tijesto je dugo izloženo kisiku iz zraka pa dolazi do gubitka nekih komponenti lipoksigenaznog puta, te reduciranja fenolnih komponenti

djelovanjem polifenol oksidaza i peroksidaza za vrijeme dugog mljevenja. To rezultira smanjenom oksidacijskom stabilnosti ulja, smanjenim okusom gorčine i oporog mirisa (Peres, 2015). Zbog toga studije sugeriraju ovaj tradicionalni postupak mljevenja za neke gorče sorte, primjerice talijansku sortu Coratina (Clodoveo, 2013). Hlapljive tvari koje pridonose zelenim notama ulja i poželjnim mirisnim svojstvima više su izražene u uljima dobivenim preradom kamenim mlinovima, ali unatoč tome treba sagledati i faze koje slijede nakon mljevenja, primjerice miješenje, pri čemu se kemijski sastav i svojstva maslinovog ulja mijenjaju (Koprivnjak, 2006).



Slika 7. Kameni mlin (Večernji list, 2013)

U današnje vrijeme kamene mlinove zamijenili su metalni mlinovi koji mogu biti različitog tipa izvedbe: fiksni ili pokretni čekićari, s diskovima, zupčasti, konusni i drugi. Metalni mlinovi okreću se puno većom brzinom od kamenih. Čekićari i mlinovi s diskovima imaju čak 1000-3000 o/min, dok konusni postižu 400 o/min. Konstruiraju se od pokretnog metalnog dijela koji se okreće velikom brzinom i drobi plodove uz fiksnu, rupičastu fiksnu ili pokretnu površinu. Iako su danas češće korišteni zbog niže cijene, manjih dimenzija i automatiziranog rada, mana ovih mlinova je stvaranje emulzije zbog velikih brzina okretaja. Kako bi se taj problem riješio neizostavna faza u proizvodnji maslinovog ulja je miješenje maslinovog tijesta (Drljepan, 2014).



Odabirom vrste metalnog mlina čekićara može se podesiti željena lomljenost sjemenke i utjecati na kemijski sastav tokoferola. Mljevenjem s mrežicama većih otvora postiže se mala lomljenost što rezultira malim koncentracijama tokoferola, dok se mljevenjem s mrežicama manjih otvora postiže velika lomljenost sjemenke i doprinosi povećanim koncentracijama tokoferola (Gugić i Ordulj, 2006). Razlika u dobivenom maslinovom ulju mljevenom metalnim mlinovima je ta što je ulje zelenije boje nego ono mljeveno tradicionalnim kamenim mlinovima. Metalni mlinovi (osim konusnih) usitnjavaju kožicu masline u kojoj se nalazi glavina klorofila koja daje zelenu boju dok kameni samo kidaju kožicu na manje fragmente (Giovacchino, 1996). Uporabom metalnih mlinova proizvodi se više topline zbog velike brzine okretaja što poboljšava aktivnost peroksidaza pa i oksidaciju fenolnih komponenti. Peroksidaze koje se nalaze u koštici masline su oslobođene te mogu katalizirati oksidaciju. Zbog toga je danas novi pristup odvojeno mljevenje dijelova plodova masline, primjerice odvajanje koštice od ploda i posebno odvojeno mljevenje. Time se odvajaju peroksidaze iz koštice od fenolnih tvari u pulpi čime se reducira njihova degradacija (Peres, 2015). Parametar temperature utječe na već spomenuti endogeni enzim  $\beta$ -glukozidazu koja u procesu mljevenja katalizira reakcije nastajanja hidrofилnih fenolnih komponenti kao što su aglikoni sekoiridoida oleuropeina, dimetiloleuropeina i ligstrozida. U formi aglikona ovi spojevi se lakše otapaju u uljnoj fazi te tako povećaju koncentraciju fenola u ekstra djevičanskom maslinovom ulju. Značajno je prilagoditi uvjete miješenja, poput temperature i vremena, kako se  $\beta$ -glukozidaza ne bi inaktivirala čime bi veliki dio fenolnih komponenti bio izgubljen u otpadnoj vodi (Clodoveo i sur, 2014).



Slika 8. Metalni mlinovi; čekićar (Drljepan, 2014), s diskovima, konusni (Koprivnjak, 2006)

### 2.3.2. Utjecaj miješenja

Slijedeća faza kojoj se može ili ne mora podvrgnuti samljeveno maslinovo tijesto jest miješenje. Tijekom miješenja dolazi do razbijanja emulzije ulje/voda nastale kao posljedica

mljevenja metalnim mlinovima zbog prevelike brzine okretaja, stoga je pri tom načinu proizvodnje ono neizbježno. Miješenjem dolazi do spajanja manjih kapljica ulja u veće te omogućava lakše odvajanje čvrstog od tekućeg dijela u kasnijim fazama proizvodnje. Maslinovo tijesto se mijesi u inoks koritima s metalnim mješačima u seriji od 2 do 3 uređaja (slika 9). Korita su okružena plaštem u kojem struji topla voda kojom se kontrolira temperatura procesa. Za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja visoke kvalitete temperatura tijesta ne smije preći 28°C te je optimalno vrijeme miješenja 60 minuta. Kako bi se postigla odgovarajuća temperatura tijesta, temperatura vode u plaštu mora biti 5-6 °C viša od željene temperature tijesta. Za optimizaciju procesa moguće je dodati i određenu količinu tople vode u maslinovo tijesto kako bi se smanjila viskoznost i time omogućilo veće iskorištenje (Škevin, 2016). Postupak miješenja ovisi o sorti maslina i omjeru količine vode, ulja i koloidnih tvari u samljevenom tijestu. Moguće je stvaranje tzv. teških tijesta ukoliko tijesto ima veće količine vode i koloidnih tvari kao što su bjelančevine, pektini i hidrofilni koloidi, stoga veliku ulogu ima tehnolog koji svojim iskustvom prepoznaje karakterističnu konzistenciju tijesta i određuje vrijeme i uvjete miješenja kako bi se optimalno stvorila kontinuirana uljna faza. Tijekom miješenja maslinovog tijesta dozvoljeno je dodati i pomoćna sredstva u cilju povećanja iskoristivosti, primjerice mikronizirani talk (magnezijev silikat hidrat). On je građen od molekula lipofilnih svojstava te velike specifične površine i djeluje tako da veže ulje i razbija emulziju pa se smanjuje gubitak ulja koji zaostaje u biljnoj vodi dok se količina ulja vezana za kominu povećava. Također se mogu dodati tvari na biljnoj bazi kao što je silvagel, što je hidrofilna tvar velike površine i za razliku od talka ne utječe na sastav ulja (Koprivnjak, 2006).



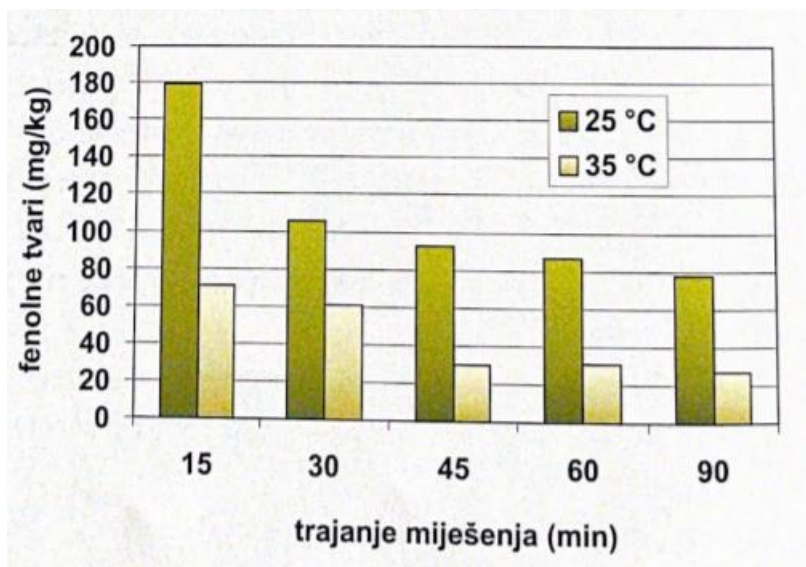
Slika 9. Miješenje maslinovog tijesta (Nostalgia travel, 2021)

## UTJECAJ PARAMETARA MIJEŠENJA NA ENDOGENE ENZIME

Operacija miješenja je ključna za razvoj pozitivnih i negativnih senzorskih svojstava ulja jer dolazi do aktivacije enzima i njihovog doticaja s tvarima iz svih dijelova ploda te preraspodjele tvari između uljne i vodene faze. Promjena u sastavu triacilglicerola i masnih kiselina, pigmentata, fenolnih tvari i enzima te reakcije u koje su uključeni tijekom miješenja određuju senzorsku kakvoću maslinovog ulja. Kako bi se enzimski procesi odvijali ispravno potrebno je poznavanje vremena potrebnog za pokretanje enzimskih reakcija, te ključnih parametara koji održavaju ravnotežu između uljne i vodene faze. Kritični parametri koji se mogu podesiti tijekom miješenja su temperatura, vrijeme, brzina miješenja i atmosfera u mijesilici (Peres, 2015). Posljedica aktivnosti endogenih enzima je oslobađanje fenolnih komponenti te njihova raspodjela između uljne (1-2% ukupnih grupa antioksidanasa u plodu) i vodene faze (približno 53% ). Veliki dio fenolnih tvari ostaje zarobljeno u komini masline, čak 45% (Clodoveo, 2012). Pored fenolnih tvari, oslobađaju se i hlapive tvari kao rezultat lipoksigenaznog puta koji je započeo u procesu mljevenja i tijekom miješenja se nastavlja.

Negativni utjecaj procesne temperature na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja istraživano je u više studija. Utjecaj temperature se najviše očituje u koncentraciji fenola i hlapivih tvari te njihovom doprinosu senzorskim karakteristikama (Peres, 2015). Fenolne tvari su pod utjecajem endogenih enzima glukozidaza, koje se odlikuju najbržim djelovanjem te su aktivne već pri mljevenju. Osim glukozidaza, aktivne su i esteraze koje razgrađuju složene fenolne spojeve na jednostavnije, a zajednički rezultat je bolja topljivost fenolnih aglikona, fenolnih alkohola i kiselina u uljnoj fazi. Na grafičkom prikazu na slici 10. vidljivo je da prijelazu fenolnih tvari u ulje pogoduje kraće miješenje pri nižim temperaturama jer se na taj način sprječava njihova oksidacija pod utjecajem peroksidaza i polifenoloksidaza. Povećanje temperature maslinove paste do 35°C dovodi do aktivacije enzima oksidoreduktaze. Peroksidaze također oksidiraju i slobodne masne kiseline pa do oksidacijskog kvarenja može doći i prije izdvajanja ulja. Djelovanje enzima lipoksigenaze optimalno je pri 25°C, a rezultira oslobađanjem hidroperoksida linolne i linolenske kiseline koje dalje cijepa hidroperoksid liaza i nastaju hlapljivi aldehidi. Hidroperoksid liaza djeluje pri nižim temperaturama, 15°C, stoga više temperature znatno umanjuju aktivnost ovih dvaju enzima i proizvodnju poželjnih hlapljivih komponenti. Osim toga, postoji mogućnost nastanka i neželjenih mirisa po upaljenom plodu razgradnjom amino-kiselina pri višim temperaturama. Može doći i do indirektno oksidacije sekoiridoida produktima lipoksigenaznog puta, hidroperoksidima, a sve reakcije oksidacije odvijaju se uz prisutnost kisika (Koprivnjak, 2006).

Iako veći utjecaj na aktivnost enzima ima temperatura, i vrijeme miješenja utječe na promjene u sastavu fenolnih i hlapljivih tvari. Duže vrijeme miješenja negativno utječe na koncentraciju fenolnih tvari i potiče njihovu oksidacijsku degradaciju te stvaranje nepoželjnih hlapljivih tvari. Povećanjem vremena miješenja uočeno je blago smanjenje koncentracije derivata sekoiridoida hidroksitirosola (5-10%) dok se koncentracija tirosola povećala (15-30%) tijekom trajanja miješenja od 30 do 60 minuta. U pogledu na hlapljive komponente, vrijeme miješenja odrazilo se osobito na heksanal koji doprinosi okusu maslinovog ulja. Neovisno o podešavanju temperature, heksanal se znatno razvijao nakon 45 minuta provedenog miješenja (Angerosa i sur., 2001).



Slika 10. Maseni udio fenolnih tvari u ulju ovisno o temperaturi i trajanju miješenja (Koprivnjak, 2006).

Tijekom procesa miješenja maslinova pasta je izložena atmosferi, odnosno kisiku koji se nalazi u prostoru iznad tijesta. Enzimske reakcije koje se odvijaju uz prisutnost kisika su katalizirane oksidoreduktazama i enzimima lipoksigenaznog puta. Dolazi do već spomenute degradacije fenolnih tvari i njihovog gubitka. Kako bi se taj problem riješio osmišljavaju se zatvorene mijesilice koje omogućavaju regulaciju količine zraka i kisika iznad tijesta, također mijesilice u kojima je prostor iznad tijesta ispunjen plinom CO<sub>2</sub>, koji nastaje prirodno iz samog tijesta, ili nekim inertnim plinom. Redukcijom koncentracije kisika utječe se i na smanjenje koncentracije lipoksigenaznih hlapljivih produkata, a time i na pojavu poželjnih okusa i mirisa artičoke, svježeg voća i pokošene trave u djevičanskom maslinovom ulju (Peres, 2015).

Izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta može se provesti na tri načina. Tradicionalni način podrazumijeva izdvajanje ulja prešanjem u otvorenoj hidrauličkoj preši i najčešće slijedi iza tradicionalnog mljevenja kamenim mlinom. Pripremljeno maslinovo tijesto se ravnomjerno raspoređuje na filtrirajuće slojnice koje se slažu jedna na drugu i nakon svakih 5 slojnica stavlja se metalni disk koji omogućava ravnomjerno raspoređivanje tlaka pri prešanju. Uljni mošt se filtrira kroz vlakna slojnica i fragmenata koštice kroz tri faze. Danas je prešanje zamijenio moderan centrifugalni način prerade zbog nedostataka kao što su mali kapacitet i potrebna radna snaga, učestalo čišćenje slojnica zbog mogućeg začepjenja, onečišćenja dobivenog ulja te habanje slojnica. Drugi način izdvajanja ulja koristi centrifugalnu silu te razdvaja uljnu fazu, vegetabilnu vodu i kominu masline na temelju razlike u gustoći. Provodi se u centrifugalnim dekanterima ili horizontalnim separatorima koji mogu biti u izvedbi s dvije ili tri faze tj. izlaza. Klasična centrifuga s tri izlaza sastoji se od bubnja i pužnice koja potiskuje maslinovo tijesto kroz cilindrični i konusni dio dekantera. U konusnom dijelu odvaja se kruta komina od tekućeg dijela, a u središnjem cilindričnom dijelu se izdvaja uljna faza od vodene. Nedostatak ovog postupka je obavezno dodavanje vode kako bi se smanjila viskoznost tijesta, a pritom nastaju velike količine otpadne vode i ispiranje poželjnih fenolnih tvari. Kako bi se taj problem riješio koristi se integralna centrifuga s dva izlaza pri čemu se odvaja ulje kao jedna faza te komina i vegetabilna voda kao druga. U ovom slučaju voda se ne dodaje ili samo u malim količinama pa je nedostatak vlažna komina koju treba zbrinuti na odgovarajući način. Zbog toga su optimalne opsijske centrifuge sa 2 ili 3 izlaza gdje se dodaje malo vode i može se odabrati način rada. Još jedan način izdvajanja ulja je procjeđivanje koje se temelji na površinskoj napetosti i adhezijskim svojstvima ulja i vegetabilne vode. Koristi se za tijesta s malim udjelom vode, ali i tada rijetko zbog visoke cijene investicije te velike izloženosti ulja oksidacijskom kvarenju jer je kontaktna površina ulja, na pločicama koje se uranjaju, i zraka velika. Tijekom izdvajanja ulja potrebno je konačno provesti tekuće faze kroz vertikalni separator gdje se odvoji čisto maslinovo ulje od vegetabilne vode.

## 2.4. Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje sastoji se najvećim dijelom od osapunjivog (98,5%-99,5%) i neosapunjivog dijela (0,5%-1,5%) (Škevin, 2016). Osapunjivi spojevi su oni koji u reakciji s lužinom tvore sapune, u maslinovom ulju to su većinski triacilgliceroli, zatim slobodne masne kiseline i fosfolipidi. Neosapunjivu frakciju čine fenoli, ugljikovodici, steroli, tokoferoli, triterpenski i alifatski alkoholi te drugi spojevi koji su u pravilu sekundarni metabolički produkti biljke i ploda. Iako u malom udjelu, navedeni spojevi su važni za kemijske i biokemijske reakcije koje će oblikovati aromu ulja, neki imaju terapijski učinak, a jedna grupa spojeva djeluje kao prirodni antioksidans i štiti ulje od kvarenja. Neosapunjivi spojevi definiraju maslinovo ulje i njegovu različitost od ostalih ulja (Žanetić, 2006).

### 2.4.1. Osapunjivi dio

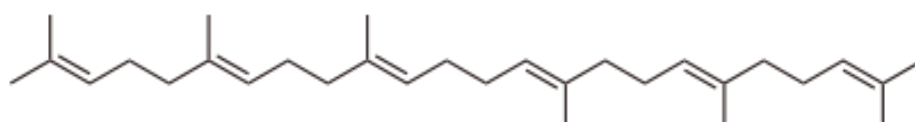
Sastavni dijelovi osapunjive frakcije su triacilgliceroli, koji su esteri masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola. Dugi lanci masnih kiselina čine 95% ukupnih masnih kiselina te se uglavnom sastoje od 18 i 16 ugljikovih atoma. Ovisno o tome je li triacilglicerol građen od tri jednake masne kiseline ili kombinacijom različitih, govorimo o jednostavnim i mješovitim triacilglicerolima. Triacilgliceroli biljnih ulja u strukturi su građeni u tipu ZNZ, ZNN i NNN (Z-zasićena, N-nezasićena) te se razlikuju od strukture životinjskih ulja po tome što na položaju 2 molekule glicerola najčešće imaju nezasićenu masnu kiselinu, u više od 90% slučajeva (Škarica i sur., 1996). Masne kiseline koje prevladavaju u maslinovom ulju su: oleinska, linolna, palmitinska, stearinska i palmitoleinska. Ostale masne kiseline koje se mogu naći u tragovima su arahinska, behenska, lignocerinska i eikosenska (gadoleinska). Prikaz dozvoljenih raspona navedenih masnih kiselina naveden je u Tablici 2 (Uredba komisije (EEZ) br. 2568/91). Prema Fedeliu (1977.) glavni triacilgliceroli u maslinovom ulju su POO (18,4%), SOO (5,1%), POL (5,9%), OOO (43,5%), OOL (6,8%) (P, palmitinska kiselina; O, oleinska kiselina; S, stearinska kiselina; L, linolna kiselina). Triacilgliceroli građeni isključivo od zasićenih masnih kiselina, primjerice PPP, SSS, PSP, SPS, nisu pronađeni u maslinovom ulju. Kao posljedica hidrolize ulja ili zbog nepotpune biosinteze, u ulju mogu biti prisutni i monoacilgliceroli i diacilgliceroli, a takvo ulje je loše kvalitete. Sastav masnih kiselina uvjetovan je klimatskim uvjetima, zemljopisnim područjem, sortom masline i stupnjem zrelosti masline u trenutku branja. Ispitivanjem sastava masnih kiselina može se točno odrediti podrijetlo maslinovog ulja (Škevin, 2016).

Tablica 2. Sastav masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja (Uredba 2568/91.)

MASNE KISELINE	(% od ukupnih)
14:0 miristinska	≤ 0,03
16:0 palmitinska	7,5 – 20,0
16:1 palmitoleinska	0,3 -3,5
17:0 heptadekanska	≤ 0,3
17:1 heptadecenska	≤ 0,3
18:0 stearinska	0,5 – 5,0
18:1 oleinska	55,0 – 83,0
18:2 linolna	2,5 – 21,0
18:3 linolenska	≤ 1,00
20:0 arahinska	≤ 0,6
20:1 eikozenska	≤ 0,4
22:0 behenska	≤ 0,2
24:0 lignocerinska	≤ 0,2

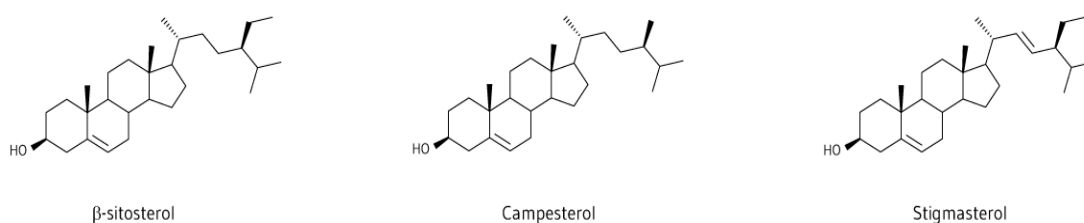
#### 2.4.2. Neosapunjivi dio

Glavninu ugljikovodika neosapunjive frakcije u maslinovom ulju čini triterpenski ugljikovodik skvalen, a zauzima i do 40% mase neosapunjive frakcije. Molekula skvalena građena je s 6 nezasićenih veza, a kemijska formula joj je  $C_{30}H_{50}$  prikazana na slici 11. Maslinovo ulje sadrži najveći udio skvalena od svih biljnih ulja, u rasponu od 200-1200 mg/kg ulja, što ovisi o sorti, skladištenju i rafinaciji. Skvalen je važan biološki prekursor sterola po kojima se prepoznaje autentičnost ulja. Također djeluje i kao antioksidans. Ostatak ugljikovodika čine zasićene alifatske molekule i policiklički aromatski ugljikovodici kao što su fenantren, pirin, flourantren, 1,2-benzantracen, krizen, perilen (Kiritsakis, 1990).



Slika 11. Kemijska formula skvalena  $C_{30}H_{50}$  (Wikipedija, 2021)

Steroli su po kemijskoj strukturi prikazanoj na slici 12. visokomolekularni ciklički alkoholi građeni od 3 prstena cikloheksana i prstena ciklopentana. U kemijskom sastavu biljaka uljarica steroli imaju specifični, različiti sastav koji je prepoznatljiv za svaku uljaricu te se analizama sterola lako može utvrditi radi li se o patvorenju. Steroli u maslinovom ulju ubrajaju se u skupinu fitosterola. Iako usporedbom s ostalim biljnim uljima imaju najmanji udjel ukupnih sterola, najzastupljeniji steroli u djevičanskom maslinovom ulju su  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol i kampasterol.  $\beta$ -sitosterol se u najvećem udjelu nalazi u maslinovom ulju i to ga razlikuje od ostalih biljnih ulja. U tehnološkom procesu rafinacije koncentracija  $\beta$ -sitosterola se smanjuje jer dolazi do dehidracije i prevođenja u stigmastadien što je pokazatelj patvorenja djevičanskog maslinovog ulja drugim rafiniranim uljima (Škevin, 2016).



Slika 12. Kemijske strukture sterola u maslinovom ulju (Oregon State University, 2021)

U usporedbi s ostalim biljnim uljima, maslinovo sadrži najmanje tokoferola. Najzastupljeniji oblik je  $\alpha$ - tokoferol (88,5%) poznat i kao vitamin E, koji ima najznačajniju biološku aktivnost. Uz  $\alpha$ - tokoferol pronalazimo i  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ - oblik tokoferola, a svi imaju antioksidacijsko djelovanje i usporavaju proces oksidacijskog kvarenja ulja. Udjel tokoferola ovisi o sorti, načinu prerade (tradicionalno ili moderno), skladištenju i drugim uvjetima, a tijekom skladištenja i procesa rafinacije gubi se i do 50%. Istraživanja su pokazala da ulje komine masline ima veći postotak tokoferola od ulja dobivenog iz pulpe masline (Škevin, 2016).

Prirodno prisutni spojevi neosapunjive frakcije su i triterpenski alkoholi koji čine 20-26 % frakcije. Najzastupljeniji su eritrodiol i uvaol, a ostali prisutni su  $\alpha$  - i  $\beta$ -amirin, eufol, tarakserol i damaradienol. Udjel eritridiola i uvaola prevladava u kožici masline, a u procesu prerade veća količina se prevede u ulje postupkom ekstrakcije organskim otapalom komine masline. Ta činjenica omogućuje prepoznavanje maslinovih ulja dobivenih isključivo mehaničkim postupcima od onih dobivenih pomoću otapala, tj. ulje slabije kvalitete sadrži veći udio najzastupljenijih triterpentskih alkohola. Alifatski alkoholi mogu biti slobodni ili esterificirani,



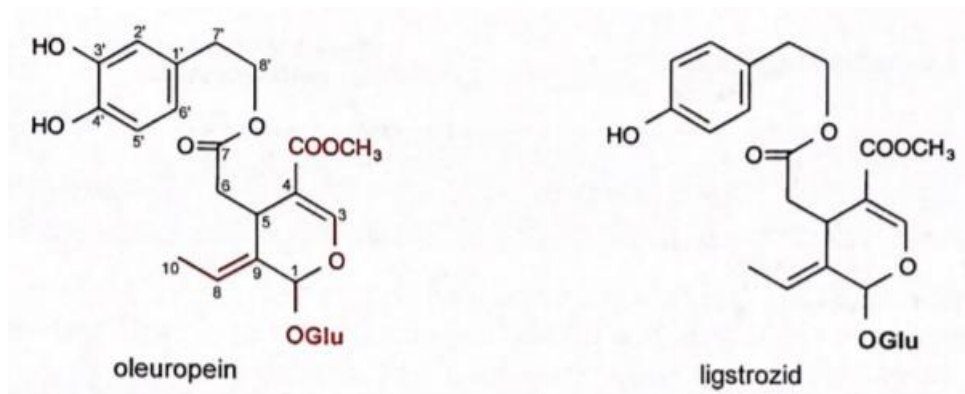
pretežno su građeni od zasićenih ugljikovih lanaca s parnim brojem C atoma (od C<sub>18</sub> do C<sub>30</sub>). Ukupan sadržaj u ulju se kreće između 10-20 mg/100 g ulja. Tijekom dozrijevanja se količina alifatskih alkohola smanjuje sve do trenutka kada je u plodu najveća koncentracija ulja, nakon čega se količina povećava (Škarica i sur., 1996).

Pigmenti koji daju zelenu boju maslinovom ulju su klorofili koji se lako razgrađuju u feofitine smeđe boje. Prisutan je oblik klorofila *a* i *b* te feofitina *a* i *b*. Svježe maslinovo ulje sadrži 0-10 mg/kg klorofila i od 0,2-24 mg/kg feofitina, a tijekom zrenja se udjel klorofila smanjuje (Žanetić, 2003). Klorofili djeluju kao antioksidansi u tami, dok u prisutnosti svjetla potiču fotooksidaciju pa je bitno ulje čuvati u tamnoj ambalaži. Osim klorofila, prisutni su karotenoidi lutein, β- karoten, violaksantin i neoksantin. Udio karotenoida u maslinovom ulju je između 1-20 mg/kg ulja, a prevladava β- karoten. Kao i klorofili oni imaju antioksidacijski učinak te djeluju kao "hvatači" reaktivnog kisika ili se oksidiraju i tako štite ulje od oksidacije (Škevin, 2016).

## FENOLI

U mezokarpu ploda masline u vodenoj frakciji nalazimo biološki važne molekule fenola. Iako u malim količinama, fenoli ipak doprinose njegovu oksidacijsku stabilnost. U procesu prerade veliki dio fenola se nepovratno izgubi otopljen u vegetabilnoj vodi masline. Količine fenola u ulju uvjetovane su sortom, prirodnim faktorima, stupnjem zrelosti u kojem su ubrane te primijenjenim procesima prerade (Kiritsakis, 1990). Fenolni spojevi ili polifenoli naziv je za niz spojeva koji u strukturi sadrže benzenski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Porodica *Oleaceae* (jorgovan, jasmin, maslina) je specifična jer osim fenolnih kiselina, fenolnih alkohola i flavonoida, jedina sadrži i sekoiridoide. Najzastupljeniji sekoiridoide u maslini su oleuropein, demetiloleuropein i ligstrozid koji su u svim dijelovima ploda, te nūzenid koji je detektiran samo u koštici i verbaskozid koji se u tragovima nalazi u lišću. Glukozid oleuropein je ester glukozilirane elenolne kiseline i *orto*-difenolnog alkohola hidroksitirosola, dok je ligstrozid ester glukozilirane elenolne kiseline i fenolnog alkohola tirosola, prikaz strukturnih formula je na slici 13. Zbog molekule šećera u njihovoj strukturi, izrazito su hidrofilni i gotovo se ne otapaju u ulju. Potrebno ih je prevesti u manje hidrofilni oblik kako bi se preveli u ulje. Ključni procesi su mljevenje i miješenje jer će pod utjecajem enzima hidrolaza izgubiti molekulu šećera i preći u aglikone koji su topljiviji u ulju. Osim hidrolitičkih reakcija dolazi i do promjena na elenolnoj kiselini pri čemu nastaju demetilirani, deacetoksi i dialdehidni oblici, a

mogu se osloboditi i molekule fenolnih alkohola hidroksitirosola i tirosola cijepanjem esterskih veza. Od ukupne količine fenolnih tvari u plodu, procesiranjem u ulje prijeđe samo 0,5 do 1,5% ukupnih fenolnih tvari iz ploda masline. Ovisno o sorti, uvjetima uzgoja, stupnju zrelosti i kakvoći ploda, načinu prerade te svježini ulja, maseni udio fenolnih tvari u ulju kreće se od 40 do 900 mg/kg ulja (Koprivnjak, 2006). Fenoli općenito imaju ulogu u zaštiti od oksidacije nezasićenih masnih kiselina, zaštitu od degenerativnih procesa, štite plod od nametnika i biljojeda (uloga sekoiridoida), te povećaju održivost maslinovog ulja (Cimato, 2001). Antioksidacijsko djelovanje pojedinih fenolnih frakcija je jače od drugih. Derivati oleuropein aglikona i hidroksitirosol (3',4'-DHPEA) pokazuju veću antioksidacijsku moć jer su *ortho*-difenolne tvari dok derivati ligstrozid aglikona i tirosol (p-HPEA) kao monofenolne tvari imaju manju efikasnost (Koprivnjak, 2006). Specifične senzorske karakteristike maslinovog ulja, gorčina i pikantnost, potječu od pojedinih fenolnih spojeva i njihovih derivata. Brojnim istraživanjima pokazalo se da fenolne tvari imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje pa tako preventivno djeluju na razvoj krvožilnih bolesti te na neke vrste raka i neuro-degenerativne bolesti (Škevin, 2016).



Slika 13. Strukturne formule oleuropeina i ligstrozida (Koprivnjak, 2006)

## HLAPLJIVE TVARI AROME

Tvari arome koji direktno djeluju i na senzorska svojstva ulja su aldehidi, ketoni, esteri, eteri furani, derivati tiofena, alifatski i aromatski ugljikovodici, alifatski i triterpenski alkoholi. To su hlapljivi spojevi koji ovise o sorti, klimi, načinu uzgoja, zrelosti ploda, načinu prerade te uvjetima skladištenja ploda i ulja (Škevin, 2016). Razlikujemo hlapljive tvari s poželjnim i nepoželjnim mirisnim svojstvima koje su prisutne u natprostoru maslinovog ulja. Djevičansko maslinovo ulje koje je proizvedeno od zdravog ploda, ubranog u optimalno vrijeme te prerađeno po pravilima tehnološke proizvodnje u natprostoru sadrži 60-80% hlapljivih tvari koju čine C6 aldehidi (heksanal, Z-3-heksenal, E-2-heksenal), C6 alkoholi (heksanol, Z-3-heksanol, E-2-heksanol), te C6 esteri (heksil acetat i Z-3-heksenil acetat). Oni nastaju kao produkti lipoksigenaznog puta te više ili manje doprinose aromi ulja. Ukoliko su u proizvodnji maslinovog ulja učinjene greške u skladištenju i preradi ploda ili skladištenju dobivenog ulja pojavit će se neželjene hlapljive tvari. Uslijed porasta temperature i vlage doći će do biokemijskih reakcija te autolize tkiva ploda masline, koje će biti prikladno stanište za razvoj mikroorganizama. Karakteristični defekti koji se javljaju pri senzorskoj analizi su svojstva po upaljenom plodu, vinski-octikavo, pljesnivo-vlažno, užeglost.

### 3. Zaključak

Maslina u svom kemijskom sastavu sadrži tvari koje su značajne za blagotvorni zdravstveni učinak, za oksidacijsku stabilnost, a ujedno i karakterizaciju senzorskih svojstava maslinovog ulja. Brojni su endogeni enzimi koji imaju ključnu ulogu u razvoju kemijskog sastava maslinovog ulja. Enzimskim reakcijama i složenim enzimskim putevima oksidoreduktaza i hidrolaza nastaju spojevi koji mogu pozitivno ili negativno utjecati na sastav dobivenog finalnog proizvoda. Od hidrolaza najzastupljeniji enzimi su lipaze koje hidroliziraju triacilglicerole i povećaju koncentraciju slobodnih masnih kiselina te glukozidaze koje hidroliziraju  $\beta$ -glikozidne veze i time odvajaju šećere iz fenolnih glukozida. Upravo hidrolizom fenolnih glukozida oleuropeina i ligstrozida nastaju njihovi aglikoni koji su manje hidrofилni i lakše se prevode u ulje. Osim toga, produkt cijepanja esterskih veza je razlaganje na fenolne alkohole hidroksitirozol i tirozol. Oksidoreduktaze PPO i POD, s druge strane, mogu narušiti kvalitetu ulja oksidacijom poželjnih fenolnih komponenti, a enzim lipoksigenaza će nizom biokemijskih reakcija sintetizirati hlapljive tvari primjerice heksanal, heksanol i heksil-acetat te njihove cis i trans izomere koji će ulju dati prepoznatljive zelene note.

Tehnološki proces proizvodnje je jedan od značajnih koraka u postupku dobivanja maslinovog ulja visoke kvalitete jer znatno utječe na aktivnost endogenih enzima. Mnogo je varijabli (temperatura, pH, vremenska izloženost postupku, dodirne površine, brzine miješnja itd.) koje uvelike mijenjaju sastav maslinova ulja. Postupci mljevenja i miješenja potiču aktivnost enzima pa se odabirom prikladnih parametara temperature i vremena te uređaja može utjecati na razvoj produkata enzimskih reakcija. Pažljivim proučavanjem sastava ploda masline i prilagodbom procesa prerade teži se dobiti djevičansko maslinovo ulje s traženim kvalitetama. Uslijed velikog broja varijabli na koje je moguće utjecati ostaje velik prostor za istraživanje optimizacije procesa čime bi se poboljšala i kvaliteta, oksidacijska stabilnost i senzorske karakteristike proizvedenog maslinovog ulja.

## 4. Literatura

Angerosa F., Mostallino R., Basti C. and Vito R. (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*. **72**: 19 – 28.

Baccioni, L. (2014) Marketing as EVOO production driver 2009 <<https://www.slideshare.net/lambertobaccioni/marketing-as-evoo-production-driver2009>> Pristupljeno 9. kolovoza 2021.

Cimato A., Baldini A., Moretti R. (2001) L`olio di oliva: cultivar, ambiente e tecniche agronomiche, ARSIA, Firenze, str. 22 - 38.

Clodoveo M. L., Hbaieb R. H., Kotti F., Mugnozza G. S., Gargouri M. (2014) Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety* **13**: 135 – 154.

Drljepan, A. (2014) Postupci prerade maslina u ulje, završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek

Fedeli E. (1977) Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, [online] **15**(1): 57 – 74, doi:10.1016/0079-6832(77)90007-6.

Giovacchino L. (1996) Influence of extraction system on olive oil quality. *Olivae*, **63**: 62.

Gugić A., Ordulj I. (2006) Prerada plodova maslina i kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja, *Glasnik zaštite bilja* **6**: 16 - 17.

Kiritsakis A. (1990) Olive oil, American Oil Chemists' Society Champaign, Illinois, str. 32 - 33, 39.

Kiritsakis A., Christie, W.W. (2000) Handbook of Olive Oil, Harwood, J. i sur., ur., Springer, str. 129-158.

Koprivnjak O. (2006) Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola, MIH d.o.o., Poreč, str. 7 - 12, 29 - 39, 77 - 97.

Laane C., Bruggeman Y., Winkel, C. (2003) Applications of oxidoreductases in foods. U: Handbook of Food Enzymology. Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. i Wong, D. W. S., ur., Marcel Dekker, Inc., New York str. 264 - 270.

Luaces, P., Romero, C., Gutiérrez, F., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2007) Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 2721 – 2727.

Minic Z. (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases, *Planta*. **227**: 723 – 740.

Nostalgia travel (2021) Olives & Olive oil < <https://www.nostalgia.gr/activities-olives.html>> Pristupljeno 9. kolovoza 2021.

Oregon State University (2021) Phytosterols <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/phytosterols>> Pristupljeno 9. kolovoza 2021.

Panzanaro S., Nutricati E., Miceli A. and De Bellis, L. (2010) Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. **48**: 741 – 745.

Peres F., Martins L. L., Ferreira-Dias S. (2015) Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**(14): 3104 – 3126.

Škarica B., Žužić I., Bonifačić M. (1996) Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj, Tipograf d.d., Rijeka, str. 46 - 76, 142.

Škevin D. (2016) Procesi prerade maslina i kontrola kvalitete proizvoda, PBF, Zagreb str. 20 - 32, 43 - 47.

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

Večernik N. (1994) Maslina, 2 izd. „BRAMIL“ s p.o., Split, str. 17.

Večernji list (2013) Istarsko zeleno zlato, od stabla do kušaonice <<https://living.vecernji.hr/zelena-zona/istarsko-zeleno-zlato-od-stabla-do-kusaonice-910586>> Pristupljeno 9. kolovoza 2021.

Whitaker, J. R. (2003) What enzymes do and why they are highly specific and efficient catalysts. U: Handbook of Food Enzymology. Whitaker, J. R., Voraĝen, A. G. J. i Wong, D. W. S., ur., Marcel Dekker, Inc., New York. str. 351 - 370.

Wikipedija (2021) Skvalen < <https://sh.wikipedia.org/wiki/Skvalen>> Pristupljeno 31. Kolovoza 2021.

Žanetić M. (2003.) Svojstva djevičanskih maslinovih ulja autohtonih sorti oblica, levantinka i lastovka s područja srednje Dalmacije, magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb str. 18 - 29.

Žanetić M., Gugić M. (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja, *Pomologia croatica*, **12**(2): 160.

## Izjava o izvornosti

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



---

ime i prezime studenta