

# Utjecaj inovativnih tehnologija na sastav i udio tokoferola djevičanskih maslinovih ulja

---

Grujin, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:735015>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Antonio Grujin

**UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNOLOGIJA  
NA SASTAV I UDIO TOKOFEROLA  
DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA**

Rad je izrađen u Kabinetu za tehnološko projektiranje na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandra Balbino, te uz pomoć Katarine Filipan, mag. ing. techn. aliment.



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina" (HRZZ CROInEVOO, IP-2020-02-7553) čija je voditeljica prof. dr. sc. Dubravka Škevin.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Sandri Balbino na mentorstvu i svim stručnim savjetima tijekom izrade ovoga diplomskoga rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima na pruženoj podršci tijekom cijelog studija, kao i svim prijateljima koji su bili uz mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Kabinet za tehnološko projektiranje

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

### UTJECAJ INOVATIVNIH TEHNOLOGIJA NA SASTAV I UDIO TOKOFEROLA DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

*Antonio Grujin, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113146490*

#### **Sažetak:**

Djevičanska maslinova ulja koja su korištena u ovom radu proizvedena su od hrvatskih sorti maslina (rosulja, oblica, levantinka i bjelica), uz pulsirajuće električno polje (PEP) i ultrazvuk (UZV) kao predtretman miješanju, s ciljem utvrđivanja utjecaja takvih inovativnih tehnologija na sastav i udio tokoferola. Utvrđeno je da u svim sortama najveću koncentraciju imaju  $\alpha$ -tokoferoli. Prema rezultatima ispitivanja predtretmanom UZV i PEP, najveća koncentracija  $\alpha$ -tokoferola je kod sorte levantinka, dok su ostali tokoferoli ( $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u znatno manjim količinama zastupljeni. Rezultati pokazuju kako izbor sorte ima najveći utjecaj na sastav i udio tokoferola. Jakost električnog polja kao i amplituda i vrijeme predtretmana imaju veoma mali utjecaj na udio i sastav tokoferola za razliku od sorte.

**Ključne riječi:** djevičansko maslinovo ulje, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, tokoferoli, hrvatske autohtone sorte maslina

**Rad sadrži:** 44 stranica, 6 slika, 11 tablica, 87 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Sandra Balbino

**Pomoć pri izradi:** Katarina Filipan, mag. ing. techn. aliment.

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 27.9.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology Engineering  
Laboratory for technological design

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### THE INFLUENCE OF INNOVATIVE TECHNOLOGIES ON THE COMPOSITION AND PROPORTION OF TOCOPHEROL IN VIRGIN OLIVE OILS

*Antonio Grujin, univ. bacc. ing. techn. Aliment. 0113146490*

#### **Abstract:**

The virgin olive oils used in this work were produced from Croatian olive varieties (rosulja, oblica, levantinka and bjelica), with pulsed electric field (PEP) and ultrasound (UZV) as a pre-treatment to mixing, with the aim of determining the impact of such innovative technologies on the composition and tocopherol content. It was found that  $\alpha$ -tocopherols have the highest concentration in all varieties. According to the results of tests with pre-treatment with UZV and PEP, the highest concentration of  $\alpha$ -tocopherol is in the levantinka variety, while the other tocopherols ( $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -) are represented in significantly smaller amounts. The results show that the choice of variety has the greatest influence on the composition and proportion of tocopherols. The strength of the electric field as well as the amplitude and time of the pretreatment have a very small effect on the proportion and composition of tocopherols, unlike the variety.

**Keywords:** Virgin olive oil, ultrasound, pulsed electric field, tocopherols, Croatian Autochthonous olive varieties

**Thesis contains:** 44 pages, 6 figures, 11 tables, 87 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Sandra Balbino

**Technical support and assistance:** Katarina Filipan, mag. ing. techn. aliment

#### **Reviewers:**

1. Dubravka Škevin, PhD, Full professor (president)
2. Sandra Balbino, PhD, Full professor (mentor)
3. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (member)
4. Maja Repajić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 27.9.2024.



<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE .....	2
2.2. AUTOHTONE SORTE U HRVATSKOJ .....	5
2.3. PROCES PROIZVODNJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA.....	6
2.3.1. Čišćenje i pranje maslina.....	6
2.3.2. Mljevenje i miješenje tijesta masline .....	7
2.3.3. Prešanje .....	8
2.3.4. Zbrinjavanje otpada .....	9
2.3.5. Skladištenje ulja.....	9
2.4. SASTAV TOKOFEROLA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	10
2.5. PRIMJENA PEP-a i UZV-a U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	12
2.5.1. Primjena PEP-a u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja .....	12
2.5.2 Primjena UZV-a u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1. MATERIJALI .....	14
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja .....	14
3.2.2. Određivanje tokoferola.....	16
3.3. OBRADA PODATAKA .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
4.1. Tretman pulsirajućim električnim poljem (PEP) .....	21
4.1.1. Modeliranje utjecaja PEP-a .....	24
4.2. Tretman ultrazvukom (UZV) .....	27
4.2.1. Modeliranje utjecaja UZV-a.....	30
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>34</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>35</b>

# 1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje osim veoma izraženih i povoljnih senzorskih svojstava također ima i veoma pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi, pa je i potražnja za ovom vrstom ulja velika (Jones i Smith, 2022). Ovakvo biljno ulje koje se odlikuje po svojim senzorskim i nutritivnim svojstvima, se najčešće dobiva iz zrelih maslina pod mehaničkim postupcima obrade. Sadrži visok udio mononezasićene oleinske masne kiseline kao i monoacilglicerole, diacilglicerole, ugljikovodike, sterole, alifatske alkohole, tokoferole, pigmente i fenolne spojeve (Cecchi i Alfei, 2013).

Zbog specifičnog kemijskog sastava odlikuje se po velikim prehrambenim vrijednostima i senzorskim svojstvima. Sadrži antioksidanse kao što su fenoli, tokoferoli i klorofili. Tokoferoli djeluju protuupalno te imaju antioksidacijsko i vitaminsko djelovanje (Kalogianni i sur., 2019).

U faze kojima se vrši priprema maslinovog tijesta za odvajanje ulja i lipofilnih spojeva od ostalih komponenti iz maslinovog tijesta spadaju mljevenje, drobljenje te miješenje. Produkt koji se dobiva nakon ovakvog procesa, mora biti ulje odlične kvalitete te bogate nutritivne vrijednosti uz maksimalno iskorištenje procesa (Goldsmith i sur., 2014).

Zbog veoma ograničenih konvencionalnih postupaka prerade, a s ciljem unaprjeđenja proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja posljednjih godina pribjegava se upotrebi novih tehnologija kao što su ultrazvuk (UZV) i pulsirajuće električno polje (PEP). Primjena ovakvih tehnologija temelji se na principu razaranja stanične stijenke i membrane, uslijed čega dolazi do nastanka pora i povećanja permeabilnosti membrane te učinkovitije ekstrakcije ulja. Uvođenjem ovih novih tehnologija nastoji se povećati prinos ulja te očuvanje što većeg broja sekundarnih bioaktivnih komponenti (Clodoveo, 2019).

Ovaj rad ima za cilj istražiti utjecaj predtretmana ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem na maslinovo tijesto tijekom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja te utjecaj na sastav i udio tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim iz hrvatskih autohtonih sorti maslina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE

Djevičansko maslinovo ulje je biljno ulje koje se ekstrahira iz svježih i čitavih plodova masline (*Olea europeae L.*) mehaničkim i drugim fizikalnim metodama (pranje, dekantiranje, centrifugiranje ili filtracija). Danas je dobro poznato da se redovita konzumacija u prehrani očituje u zdravstvenim dobrobitima povezanim s mediteranskom prehranom (Cecchi i Alfei, 2013). Za razliku od većine sjemenskih ulja, djevičansko maslinovo ulje se dobiva pomoću niza mehaničkih operacija pri ograničenoj temperaturi (do 28 °C) čija je namjena ekstrakcija kapljica ulja iz stanica pulpe masline. Dobiveno ulje je masnoća prirodno stvorena u plodu masline koja ima jedinstven kemijski sastav te specifičnu i ugodnu aromu. Stoga se može konzumirati izravno bez daljnje obrade rafiniranjem. Danas njegovi biološki, prehrambeni i zdravstveni učinci su znanstveno i stručno poznati širom svijeta (Šarolić i sur., 2014).

Djevičansko maslinovo ulje sadrži dvije glavne frakcije: osapunjivu gliceridnu frakciju i neosapunjivu negliceridnu frakciju. Osapunjivu frakciju čine triacilgliceroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, slobodne masne kiseline i fosfolipidi, a oni predstavljaju gotovo 98,5 - 99,5 % kemijskog sastava ulja. Negliceridna frakcija koja se sastoji od ugljikovodika, tokoferola, pigmentata, sterola, fenola, triterpena i drugih spojeva koji doprinose oko 0,5 % do 1,5 % sastava ulja. Odražavaju veliki značaj na antioksidacijska djelovanja, utjecaj na boju ulja, aromu i miris.

Glavne komponente maslinovog ulja su triacilgliceroli. Trigliceridi ili triacilgliceroli čine važnu skupinu djevičanskog maslinovog ulja. Formirani su od masnih kiselina koje su vezane za glicerol esterskom vezom. Njihov sastav u ulju najviše ovisi o podrijetlu ulja, a najčešće su prisutne masne kiseline sa 16 i 18 ugljikovih atoma, dok se mogu naći i one s 12 do 14 ugljikovih atoma (Espejo, 2005).

Djevičansko maslinovo ulje sadrži i visok udio mononezasićenih masnih kiselina (65 - 83 %) kao što je oleinska kiselina koja je ujedno i najzastupljenija u njegovom sastavu, zajedno s malim količinama zasićenih, posebice palmitinske kiselina (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Upravo visok udio oleinske masne kiseline razlikuje djevičansko maslinovo ulje od ostalih ulja. Karakterizira je velika prehrambena i biološka vrijednost kao i laka probavljivost. Uz navedene masne kiseline, u sastav djevičanskog maslinovog ulja ubrajamo i esencijalne masne kiseline od kojih su najznačajnije linolna te linolenska (Carretto i sur., 2002).

Fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju najviše su zaduženi za njegove biološke aktivnosti poput antihipertenzivnog djelovanja, protuupalnog, antimikrobnog i antitumorskog te antialergijskog (Chávez Ramos i sur., 2019; Veneziani i sur., 2016; Ghanbari i sur., 2012). Ovi spojevi imaju utjecaj na gorčinu i pikantnost koji su tipične senzorske karakteristične za ulje iz

zelenih plodova maslina. Karakteristična pikantnost djevičanskog maslinovog ulja potječe od spoja oleuropeina (Inarejos-García i sur., 2010). Polarni fenolni spojevi pripadaju različitim skupinama kao što su: fenolne kiseline, fenolni alkoholi, hidroksi-izokromani, flavonoidi, lignani i sekoiridoidi (Bendini i sur., 2007). Količina polarnih fenola i hlapljivih spojeva ovisi o mnogim čimbenicima kao što su agronomska praksa, indeks zrelosti, sorta, skladištenje i uvjeti pod kojima se skladišti plod te ekstrakcija (Inarejos-García i sur., 2010).

Polifenolne tvari prisutne su u sastavu djevičanskog maslinovog ulja, a u ovoj skupini dominiraju fenolni alkoholi, hiroksitirozol i tirozol. Ekstra djevičansko maslinovo ulje ih sadrži oko 50 - 1000 mg/kg. Sadržaj fenolnih spojeva važan je čimbenik koji treba uzeti u obzir pri procjeni kvalitete, budući da ti spojevi pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost i značajno pridonose izvanrednoj oksidacijskoj stabilnosti djevičanskog maslinovog ulja (Lerma-Garcia i sur., 2009).

Voskovi su spojevi koji su u stalnom sastavu djevičanskim maslinovih ulja, no čine vrlo mali udio u njima. Oni su esteri koji nastaju reakcijom masnih kiselina i dugolančanih alkohola. Koncentracija voskova koje možemo naći u ovim uljima obično je oko 250 mg/kg. Što je manji njihov udio, veća je i kvaliteta ulja, te se obično smatra i indikatorom kvalitete i stupnja obrade ulja. Nemaju prevelik značaj na senzorska svojstva maslinovog ulja (Samaniego-Sánchez i sur., 2010; Boskou, 2002).

U manjem udjelu u sastavu djevičanskog maslinovog ulja prisutni su i određeni ugljikovodici. Najprisutniji od svih njih jesu terpenki ugljikovodici, a najvažniji je skvalen. Skvalen je nezasićeni ugljikovodik sa značajnim biološkim te umjerenim antioksidativnim djelovanjem što za cilj ima povećanje stabilnosti ulja. Njegova koncentracija u ovim uljima ne prelazi granicu od 350 mg/kg (Žanetić i Gugić, 2006).

Steroli predstavljaju važnu bioaktivnu komponentu u djevičanskim maslinovim uljima. Pripadaju skupini fitosterola te imaju veoma značajne doprinose u nutritivnoj vrijednosti i kvaliteti maslinovog ulja. Najvažniji je  $\beta$ -sitosterol koji se očituje u velikoj sposobnosti snižavanja kolesterola u krvi inhibiranjem njegove apsorpcije u crijeva. Također posjeduje još i protuupalna djelovanja kao i inhibicije kvarenja ulja. Ukupni sadržaj sterola u djevičanskom maslinovom ulju se kreće od 1000 do 1800 mg/kg (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Fosfolipidi u djevičanskom maslinovom ulju prisutni su u malim koncentracijama te se njihov udio kreće od 20 do 156 mg/kg. Među njima najzastupljeniji su fosfatidilkolin koji je i najpoznatiji, fosfatidiletanolamin i fosfatidilinozitol. Iako su prisutni u veoma niskim koncentracijama sudjeluju u stabilnosti maslinovog ulja te njegovoj kvaliteti (Jiménez i sur., 2007; Boskou i sur., 2006).

Aroma djevičanskog maslinovog ulja najviše ovisi o hlapljivim spojevima. Njihova koncentracija je jako važna pri određivanju mirisa i okusa maslinovog ulja. Veliki broj hlapljivih spojeva je prisutan u sastavu djevičanskih maslinovih ulja, ali samo određeni manji dio utječe

na njegovu aromu. Ostali spojevi su prisutni u veoma niskim koncentracijama (Boskou i sur., 2006). Od najznačajnijih hlapljivih spojeva djevičanosko maslinovo ulje sadrži aldehide, ketone, ugljikovodike, derivate furana, kiseline i alkohole. Kvaliteta ploda, način njihove berbe kao i prerada utječu na sastav i udio hlapljivih spojeva (Kaftan i Elmac, 2011). Zelena i voćna aroma maslinovog ulja upravo proizlazi iz njihovog djelovanja. Do nepoželjne arome ulja mogu dovesti i pojedine faze u procesu proizvodnje kao što su: izdvajanje ulja, drobljenje, miješenje i skladištenje (Kaftan i Elmaci, 2011; Boskou i sur., 2006).

Boja je faktor koji općenito utječe na percepciju potrošača prehrambenih proizvoda. Lipofilna priroda pigmenata kloroplasta (klorofil i karotenoidi) određuje njihov afinitet prema uljnoj fazi, a utjecaj na boju najviše imaju pigmenti i to u nijansama žuto-zelena do zeleno-zlatne (Criado i sur., 2008). Prirodni pigmenti među kojima su klorofil, feofitin i karotenoidi imaju veoma velik utjecaj u procesu proizvodnje maslina tako i u kvaliteti završnog proizvoda. Prirodni pigmenti koji su prisutni u maslinovom ulju su sivo-zeleni klorofil a i žuto-zeleni klorofil b, te feofitini a i b smeđe boje. U djevičanskom maslinovom ulju, klorofil ima važnu ulogu, no njegovo djelovanje ovisi o uvjetima poput svjetla i tame. Djelovanjem klorofila može doći do pojave oksidacije koja izaziva promjenu boje samoga ulja te nepoželjnog okusa, no u uvjetima mraka bez prisustva kisika klorofil doprinosi stabilnosti okusa ulja stoga je skladištenje iznimno važan korak u proizvodnji. Djelovanje klorofila na svjetlosti može dovesti do fotooksidacije gdje klorofil veže na sebe svjetlosnu energiju, prenoseći ju na molekule kisika. Produkt ove reakcije je oksidacija masnih kiselina u ulju te nastanak užeglosti i pogoršanja okusa ulje te njegove kvalitete (Lukić i sur., 2017). Prisutnost klorofila i karotenoida u maslinovom ulju ovisi o sorti ploda, stupnju zrelosti ploda, okolišnim uvjetima, godini proizvodnje, postupku ekstrakcije i uvjetima skladištenja. Oksidativnu stabilnost maslinovih ulja, sinergističko antioksidativno i antikarcinogeno djelovanje u fiziološkim koncentracijama pripisujemo karotenoidima, polifenolima i tokoferolima. Važno je napomenuti da boja maslinovog ulja ne utječe na senzorsku ocjenu kvalitete ulja (Giuffrida i sur., 2011). Udio klorofila u maslinovom ulju je između 10 do 30 mg/kg, dok je karotenoida od 1 do 20 mg/kg. Karotenoidi spadaju u grupu ugljikovodika gdje je najznačajniji  $\beta$ -karoten, a ostali spojevi su u manjim udjelima. Najvažnije svojstvo im je inhibicija fotooksidacije ulja (Del Carlo i sur., 2006).

Djevičansko maslinovo ulje može sadržavati tragove metala koji dolaze iz različitih izvora tijekom prerade, berbe, uzgoja ili skladištenja ploda. Prisutni su u malim količinama no mogu imati veliki utjecaj na kvalitetu i stabilnost ulja. Najprisutniji koji se mogu naći u uljima su željezo, bakar, olovo, cink i mangan. Za sprječavanje kontaminacije izbjegavaju se nepotrebni kontakti s metalnim površinama tijekom proizvodnog procesa ili se koristi oprema i spremnici od nehrđajućeg čelika (Lorent-Martínez i sur., 2014; Boskou, 2011).

Kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja određuje se prema peroksidnom broju, udjelu slobodnih masnih kiselina, senzorskim analizama, koncentraciji specifičnih spojeva kao i

specifičnoj apsorpciji u spektru ultraljubičastog zračenja te ovisi također i o proizvodnim procesima i uvjetima skladištenja ulja. Na kvalitetu djevičanskog ulja utječu čišćenje i pranje, procesi u proizvodnji koji služe za uklanjanje nečistoća, stranih materijala kao prašine, lišća ili kamenja, klimatski uvjeti, način berbe i transport ploda, kvaliteta tla i stanje ploda. Upotreba odgovarajuće opreme kao i izloženost neprikladnoj temperaturi, kisiku i svjetlu te prisutnost prisutnosti vode u ulju ili organskih ostataka također mogu utjecati na kvalitetu. Očuvanje kvalitete i biološke vrijednosti ovisi o vremenu i uvjetima skladištenja. Tek kada su svi agrobiotehnički čimbenici optimizirani tada je kvaliteta ulja reprezentativna za pojedinu sortu (Kalogianni i sur., 2019; Gugić, 2010).

Nutritivna vrijednost kao i senzorska svojstva proizlaze iz visoke razine oleinske masne kiseline kao i prisutnosti fenolnih spojeva, tokoferola i hlapljivih organskih spojeva (Tarapoulouzi i sur., 2022; Cecchi i sur., 2021).

## **2.2. AUTOHTONE SORTE U HRVATSKOJ**

Maslinarstvo i proizvodnja maslinovog ulja su stoljećima poznati na jadranskom području. Oko 6 milijuna stabala maslina je posađeno duž jadranske obale i na hrvatskim otocima, a većina njih predstavljaju autohtone sorte maslina (Šarolić, 2014).

Prema Međunarodnom vijeću za masline, u posljednjih petnaestak godina proizvodnja i potrošnja maslinova ulja u Hrvatskoj se povećala više od tri puta (Međunarodno vijeće za masline, 2012). Podaci za 2017. godinu iz Državnog zavoda za statistiku (2017) pokazuju da je u Hrvatskoj proizvedeno oko 28947 tona maslina, te 37463 hL maslinovog ulja za istu godinu (Ministarstvo poljoprivrede RH, 2017).

Proizvodnja maslina ima veliki potencijal i predstavlja izrazito relevantnu poljoprivrednu djelatnost na hrvatskom priobalju. Za očuvanje raznolikosti autohtonih kultivara pribjegava se proizvodnji ulja od jedne sorte, gdje se pridonosi povećanju tržišne vrijednosti kao i ostalim granama poslovanja u turizmu (Brkić Bubola i sur., 2012). U Hrvatskoj postoji oko 30 autohtonih sorti maslina. Najzastupljenija sorta u Hrvatskoj je oblica (Šarolić, 2014).

U Hrvatskoj je ukupno 4,5 milijuna stabala u punoj rodnosti, a 31 % svih maslinika smješteno je u Srednjoj Dalmaciji. Od autohtonih sorti 75 % također čini sorta oblica. Ostale dominantne sorte u ovoj regiji su levantinka i lastovka koje se uglavnom uzgajaju na kršu (Žanetić i sur., 2010).

Oblica je ime dobila po okruglom obliku ploda. List je tamno zelene boje, dok se boja ploda mijenja od svijetlozelene do ružičaste do tamnoljubičaste tijekom zrenja. Jezgra je elipsoidnog i izduženog oblika. Udio ulja je oko 21 %, što je svrstava u uljne sorte, ali zbog relativno velike mase ploda (oko 5 g) služi i kao stolna sorta. Ulje proizvedeno iz ovakve sorte odlikuje se

voćnim okusom s laganom notom zelene trave, te izraženom i uravnoteženom gorčinom i pikantnosti (Žanetić i sur., 2021; Zeiner i sur., 2010).

Levantinka pripada dalmatinskoj sorti maslina, ima veoma gustu zaobljenu krošnju sa srednje krupnim plodovima koji su izduženog eliptičnog oblika. Plodovi su prema vrhu blago uvijeni. Težina ploda joj je oko 4,5 g s 20 % udjela ulja, te ima srednje razdoblje zrenja. Ulje proizvedeno iz ovakve sorte odlikuje se aromom badema koja je popraćena laganim voćnim okusom. Posjeduje dobro izbalansiranu gorčinu i pikantnost (Žanetić i sur., 2021).

Bjelica je autohtona sorta koju vežemo za područje Istre. Karakterizira ju kasno dozrijevanje, otpornost na vjetar i niske temperature te kvalitetno ulje s visokim prinosima. Tijekom zrenja kod ove sorte ne dolazi do prepoznatljive promjene u boji u tamnije nijanse već ostaje zeleno-žuta (Poljuha i sur., 2008). Visok udio fenolnih spojeva vezan je za ovu sortu. Iz njega proizlazi i intenzivna gorčina kao i izraženi zeleni i voćni mirisi koji se vežu za bjelicu. Sva spomenuta senzorska svojstva daju na značaj i doprinos nutritivnoj vrijednosti ulja (Lukić i sur., 2017).

Najuzgajanija sorta na području Istre je Rosulja. Oblik ploda je jajolik srednje težine, te zaobljenog vrha. Ovu sortu karakterizira otpornost na slanoću te se najviše koristi kao sirovina za proizvodnju ulja (Godena i sur., 2009).

## **2.3. PROCES PROIZVODNJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

Djevičansko maslinovo ulje dobiva se od svježih maslina koje se ekstrahiraju mehaničkim postupcima. Dva su glavna procesa ekstrakcije maslinovog ulja: konvencionalni postupci u tradicionalnim uljarama i relativno novi proces ekstrakcije poznat i po kontinuiranim mlinovima i karakteriziran s dvije ili tri faze (Gullón i sur., 2020). Svi procesi imaju za cilj dobivanje dviju faza, krutu koju nazivamo komina te tekuću fazu koja se sastoji od vegetabilne vode i ulja. Isto tako, masline treba preraditi što je brže moguće nakon berbe kako bi se smanjila oksidacija i očuvala njihova kvaliteta. Konvencionalna proizvodnja djevičanskih maslinovih ulja sastoji se od faza kao što su: čišćenje, pranje, mljevenje, miješenje i separacija ulja. Proizvodni proces započinje nakon branja plodova, sa zdravim i čistim te cjelovitim maslinama (Souilem i sur., 2017).

### **2.3.1. Čišćenje i pranje maslina**

Čišćenje i pranje kao jedni od osnovnih i važnih početnih koraka u procesu proizvodnje služe za uklanjanje nečistoća te ostataka lišća, nakon čega se masline peru vodom. Pranje ima za cilj uklanjanje nečistoća i stranih materijala, a prvenstveno se provodi zbog dobivanja

veće kvalitete ulja. Pošto se djevičansko maslinovo ulje ne podvrgava procesu rafinacije, potrebno je provesti pranje radi uklanjanja nečistoća i drugih kontaminanata. Faza odstranjivanja kontaminanata i nečistoća, a posebice lišća je veoma važna jer pri drobljenju ploda s ostacima lišća može doći do pojave povećanja inteziteta zelene boje, te povećanja senzorskih svojstava koje je karakteristično za lišće, a nije poželjno u finalnom proizvodu (Kalogianni i sur., 2019; Kapellakis i sur., 2008).

### 2.3.2. Mljevenje i miješenje tijesta masline

Što se tiče tradicionalne metode prešanja, plodovi masline se peru, drobe pomoću mlinskog kamenja i melju u pastu koja sadrži krutu tvar (ostatke jezgre, epidermu, stanične stijenke itd.) i tekućine (ulje i vegetacijsku vodu sadržanu u stanicama od maslina) (Goldsmith i sur., 2014). Mljevenje spada pod mehaničke procese gdje se pri usitnjavanju maslina razaraju i oštećuju stanične stijenke i ispuštaju kapljica ulja iz stanica. Pri procesu mljevenja osim razaranja pulpe dolazi i do drobljenja sjemenki. Ovakvi postupci se izvode uz odgovarajuću opremu. U fazi miješenja veliku ulogu imaju temperatura, trajanje procesa, sastav zraka te dodatak vode. Promjena temperature kao što je povećanje, može dovesti do pojave manje viskoznosti ulja i većeg iskorištenja, ali i do negativnih promjena vezanih za hlapljive spojeve, boju i kiselost (Kalogianni i sur., 2019; Kapellakis i sur., 2008).

Uređaji koji se koriste pri ovim prethodno opisanim procesima su metalni mlinovi u što spadaju mlin čekičar, mlin s diskovima i mlin s konusima ili na kameni mlinovi. Odabir vrste mlina koji se koristi kao i njegova snaga značajno utječu na senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja. U većini pogona najviše se koriste mlinovi čekičari zbog svoje kompaktnosti, pristupačnosti i visokog kapaciteta. Unatoč svim prednostima njihovom upotrebom može doći i do stvaranja emulzije zbog brzog i snažnog djelovanja. Također mogu imati negativan utjecaj na okus ulja. Rješenje ovakvih nedostataka je upotreba kamenih mlinova koji se odlikuju poboljšanjem senzorskih svojstava ulja kao i zadržavanja tradicionalnih načina proizvodnje. Unatoč tome takvi mlinovi su značajno sporiji u proizvodnji, glomazniji, skuplji, smanjuju prinos ekstrakcije te je manja mogućnost zagrijavanja tijesta i pojava emulzije, dok je ekstrakcija ulja lakša (Di Giovacchino, 2013).

Miješenje je ključna fazu u ovome proizvodnom postupku. U ovom dijelu procesa događa se povećanje udjela slobodnog ulja, kao poticanje spajanja malih kapljica u veće (Leone i sur., 2014). Faza miješenja tijesta masline odvija se oko 30 minuta pri laganom i neprestanom miješanju. Doprinos faze miješenja je u lakšem izdvajanju kapljica ulja te smanjenju viskoznosti maslinovog tijesta (Kiritsakis i Sakellaropoulos, 2017).



### 2.3.3. Prešanje

Proces prešanja je najstariji način dobivanja maslinovog ulja. Zbog niže proizvodne učinkovitosti i visokih troškova rada, tijekom posljednjeg desetljeća diskontinuirani sustavi prešanja uvelike su zamijenjeni kontinuiranim sustavima, zajedno s razvojem tehnologije centrifuga (Hocaoglu i sur., 2018). Hidrauličke preše otvorenog tipa koje se koriste trenutno u industrijama, imaju za cilj odvajanje tekuće od krute faze maslina. Zatvoreni tip takvih preša više nije u upotrebi zbog brojnih nedostataka kao što su visoka otkupna cijena i trošak održavanja. Nakon procesa miješenja slojevi maslinovog tijesta debljine 1,25 cm se nanose na naslagane filtrirajuće slojnice. Upravo njihov nizak radni kapacitet i održavanje mogu dovesti do smanjenja kvalitete djevičanskog maslinovog ulja. Za održavanje kvalitete ulja potrebno je voditi računa o metalnim dijelovima koji su u direktnom kontaktu s maslinovim tijestom koji mogu biti izvor kontaminacije. Često mijenjanje i pravilno skladištenje takvih dijelova dovodi do sprječavanja prijenosa metala u ulje te inhibicije svih fermentacijskih procesa. Bitno je da metalni dijelovi koji su u direktnom kontaktu s maslinovim tijestom budu izrađeni od nehrđajućeg čelika (Servili i sur., 2012).

Uz prešanje u industriji se češće koriste noviji postupci, koji uključuju izdvajanje ulja centrifugiranjem. Ovakav način ekstrakcije doprinosi smanjenju troškova i povećanju proizvodnog kapaciteta (Souilem i sur., 2017). U horizontalnim separatorima ili dekanterima vrši se proces odvajanja ulja. Uređaji korišteni u ovom dijelu procesa mogu biti dvofazni ili trofazni. Na početku se koristio trofazni centrifugalni separator. Njegova primjena bila je kompleksna i uz brojne nedostatke. Da bi se dobilo tekuće tijesto masline prije početka rada bilo je potrebno dodati vodu, na taj bi se način poboljšalo odvajanje ulja kao i prinos. Produkti koji su nastajali na separatoru bili su ulje, vegetabilna voda te kruti otpad zvan komina. Najveća zamjerka ovakvom separatoru su velike količine otpadne vode koje su se stvarale tijekom procesa kao i gubitak antioksidansa topivih u vodi. S druge strane u upotrebu dolazi novi dvofazni centrifugalni separator. Za razliku od trofaznog gdje su se stvarale velike količine otpadnih voda, ovdje je taj problem riješen (Doosselaere, 2013).

Tekućina koja se dobije putem ekstrakcije naziva se uljni mošt te se sastoji od djevičanskog maslinovog ulja s vegetabilnom vodom (Petrakis, 2006).

U završnoj fazi proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja potrebno je odvojiti djevičansko maslinovo ulje od vegetabilne vode. Takav proces se provodi na vertikalnim centrifugalnim separatorima. Ulje je nakon takvog procesa potrebno izbistriti procesom filtriranja ili pažljivim taloženjem prije punjenja u boce od tamnog stakla ili drugu odgovarajuću ambalažu (Doosselaere, 2013).

#### 2.3.4. Zbrinjavanje otpada

Nakon proizvodnog procesa potrebno je pravilno i sigurno zbrinuti nastali otpad. U procesu proizvodnje maslinovog ulja nastane više nusproizvoda nego ulja. Nusproizvodi u procesu izdvajanja ulja su vegetabilna voda i komina (Espadas-Aldana i sur., 2019). Otpadna i vegetabilna voda te komina predstavljaju najveći izazov pri zbrinjavanju i daljnjoj obradi. Ispuštanje takve vode putem kanalizacije u okoliš bi imao vrlo negativan utjecaj te se primjenjuju razne metode i tretmani prije ispuštanja vode u kanalizaciju. Ona se pročišćava primjenom bioloških i fizikalnih tretmana. Ostali kruti nusproizvodi kao što je komina predstavljaju veliki problem pri zbrinjavanju zbog velike fitotoksičnosti. Svi postupci zbrinjavanja i obrade su skupi (Medouni-Haroune i sur., 2018).

#### 2.3.5. Skladištenje ulja

Među zadnjim, ali veoma bitnim koracima u očuvanju kvalitete je skladištenje ulja. Potrebno je voditi računa o pravilnom i sigurnom skladištenju kako bi se smanjili i izbjegli svi negativni utjecaji koji se mogu odnositi na kvalitetu ulja. Nastale promjene koje se razvijaju tijekom ovog koraka su nepovratne te ih se ne mogu ukloniti rafinacijom budući da navedeni postupak nije dopušten u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja. Sve promjene koje se mogu razviti tijekom ovoga koraka ovise o uvjetima čuvanja ulja. Promjene koje se događaju su hidrolitičke (lipoliza), započinju odmah u plodu, a zatim i proces oksidacije kojeg uočavamo nakon prerade ili pri skladištenju. Uz oksidaciju moguća je i pojava fermentacije dijelova nečistoća koje su zaostale tijekom filtracije. Važnost njihovog uklanjanja pripisuje se postojanosti šećera u kontaminantima koji mogu ubrzati fermentaciju. Zbog utjecaja hidrolitičkih promjena, moguće su promjene u okusu u ulju. Ovakvu promjenu vežemo za veći udio slobodnih masnih kiselina. Glavni čimbenici koji utječu na hidrolitičke promjene kao i na oksidaciju su temperatura, utjecaj enzima i mikroorganizama, vlaga, utjecaj svjetla te kontakt s kisikom. Fenolni spojevi, tokoferoli i steroli smatraju se svojevrsnim inhibitorima u procesu oksidacije. Produkti ovakvih promjena utječu na senzorska i nutritivna svojstva ulja, stvarajući mu neugodan miris i okus (Žanetić i Gugić, 2005).

Djevičansko maslinovo ulje skladišti se u posebnim spremnicima. Spremnici u kojima se prvotno ulje čuva mora biti izrađena od nehrđajućeg čelika, a ambalaža u kojima se čuva ulje izrađena je od tamnog stakla. Plastična ambalaža bi utjecala negativno na senzorska svojstva ulja. Svi materijali koji se koriste u procesu rukovanja i skladištenja ulja moraju biti izrađeni od materijala koji je fizikalno i kemijski inertan prema ulju. Trajnost ulja se produžuje primjenom inertnog plina kao što je dušik. Dobro rukovanje i skladištenje djevičanskim maslinovim uljem pozitivno utječe na prisutnost tokoferola, posebice  $\alpha$ -tokoferola (Shendi i sur., 2018).

Svi koraci nakon proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja su bitni, u protivnom dolazi do narušavanja njegove kvalitete (Peri, 2014).

## 2.4. SASTAV TOKOFEROLA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Brojni čimbenici poput sorte, zrelosti ploda, metoda uzgoja i prerade ploda imaju utjecaj na sastav i okus djevičanskih maslinovih ulja (Caporaso, 2016).

U poglavlju 2.1. obrađene su sve komponente u sastavu djevičanskog maslinovog ulja, osim tokoferola koji će biti opisani u ovome poglavlju.

Tokoferoli su jedna od najznačajnijih skupina prisutnih u djevičanskom maslinovom ulju. Prisutni su u više različitih oblika s veoma izraženom biološkom važnosti kao prirodnih antioksidansa. Građeni su od kromatskog prstena te hidrofobnih bočnih lanaca. Prisutni su u  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - obliku tokoferola (Žanetić i Gugić, 2006).

Od svih tokoferola najznačajniji antioksidacijski učinak imaju  $\delta$ -tokoferoli, zatim  $\gamma$ -,  $\beta$ - i  $\alpha$ -tokoferol. Biološko djelovanje koje je i jedno od važnih svojstava vezano za tokoferole, najviše se vezuje uz  $\alpha$ -tokoferol, a zatim ga slijede  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferoli, dok je ono najslabije izraženo kod  $\delta$ - tokoferola (Seppanen i sur., 2010).

Tokoferoli nazivamo još i vitaminom E koji spada u vitamine topive u mastima. Njihovu antioksidacijsku ulogu vežemo za povećanje stabilnosti ulja tijekom procesiranja hrane na način da sprječavaju termooksidaciju. Također njihovo djelovanje je značajno i kod fotooksidacije tijekom skladištenja ulja (Ghanbari i sur., 2012).

Tokoferole karakterizira zasićeni bočni lanac, a tokotrienoli sadrže tri dvostruke veze u bočnom lancu. Razlikujemo tokoferole po broju i položajima metilnih supstituenata na prstenu. Najaktivniji i najprisutniji oblik tokoferola,  $\alpha$ -tokoferol posjeduje tri metilne skupine na fenolnom prstenu,  $\beta$ -tokoferol ima dvije metilne skupine na fenolnom prstenu,  $\gamma$ -tokoferol pak posjeduje jednu metilnu skupinu na fenolnom prstenu, te  $\delta$ -tokoferol s jednom metilnom skupinom. Svaki od tokoferola ima tri kiralna centra na C2', C4' i C8' ugljikovim atomima, koji mogu imati R ili S konfiguraciju, što rezultira s osam mogućih stereoizomera. Prirodni oblik  $\alpha$ -tokoferola je RRR- $\alpha$ -tokoferol. Kemijski sintetizirani  $\alpha$ -tokoferol je racemična smjesa svih mogućih izomera  $\alpha$ -tokoferola u ekvimolarnim koncentracijama. Samo je  $\alpha$ -tokoferol priznat kao nutrijent (vitamin) koji može zadovoljiti potrebe za vitaminom E kod ljudi. Osim toga, razlike u antioksidativnom djelovanju oblika vitamina E relativno su male (Niki i Abe, 2019).

Udio ukupnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju iznosi 100 - 300 mg/kg, no njegov udio varira ovisno o brojnim faktorima (Baccouri i sur., 2008).

$\alpha$ -tokoferoli čine oko 90 % ukupnih tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju te se svrstavaju u najzastupljenije tokoferole u djevičanskim maslinovim uljima. Ostale koncentracije

tokoferola koji su prisutni u uljima su u znatno nižim vrijednostima. Koncentracije prisutnih tokoferola ovise o različitim čimbenicima kao što su sorta masline, geografsko porijeklo, način i vrijeme berbe, te sam proces prerade (Özcan i sur., 2019). Također veliki utjecaj može imati skladištenje ulja te utjecaj svjetlosti i neadekvatna temperatura (Deiana i sur., 2002).

Najznačajniji problem u prehrambenoj industriji povezujemo s oksidacijom lipida. Promjene do kojih može doći kao što su pogoršanje senzorskih svojstava, promjena nutritivnog sastava te generalno nastanak neželjenih spojeva u ulju, povezujemo s njegovim kvarenjem. Upravo zbog svih tih promjena koje su navedene, navedeni antioksidansi topivi u mastima imaju značajnu ulogu u postizanju i održavanju kvalitete ulja, na način da inhibiraju oksidacijske promjene (Barouh i sur., 2021).

$\alpha$ -tokoferol možemo naći u membranama i lipoproteinima sisavaca. Uz svoje brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudi, vitamin E dovodi do smanjenja degenerativnih bolesti te djeluju protupalno (Rizvi i sur., 2014). Antioksidativno djelovanje tokoferola proizlazi iz 2 mehanizma. Prvi je doniranje elektrona, odnosno tokoferol donira atom vodika iz svoje fenolne skupine lipidnim radikalima. S druge strane mehanizam broj dva se bazira na uklanjanju singletnog kisika. Oksidacijske reakcije su izazvane pobuđenim stanjem singletnog kisika te upravo takvim mehanizmom njegovog uklanjanja dolazi do inhibicije oksidacijskih reakcija (Boskou, 2008; Brigelius-Flohé, 2006).

Na razinu tokoferola u djevičanskim maslinovima uljima utječu mnogobrojni faktori, među kojima su najznačajniji sorta masline koja se koristi u proizvodnji te sam proces proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Primarno sorta masline igra veliku ulogu u udjelu tokoferola. Prirodno neke sorte sadrže veće udjele tokoferola, primarno  $\alpha$ -tokoferola. Udio fenolnih tvari koji također može imati značaj, gdje sorte s većim udjelom fenolnih tvari, imaju i veću antioksidativnu aktivnost. Uz to možemo navesti i geografski položaj sorte te okolišne uvjete u kojima je uzgajana (Pérez i sur., 2019).

Uvjeti proizvodnje mogu također utjecati na udio tokoferola. Rana berba dovodi do sorti s većom koncentracijom tokoferola od onih branih u kasnoj berbi zbog mogućnosti pretvorbe i razaranja tokoferola u druge komponente. Filtracijske metode također utječu na razinu tokoferola. Nefiltrirano ili minimalno filtrirano ulje zadržava veće količine tokoferola i ostalih bioloških komponenti. Zadnji korak u procesu proizvodnje je skladištenje gdje se mora voditi računa o utjecaju svjetlosti i kisika na što su tokoferoli iznimno osjetljivi kao i način pakiranja u ambalažu i njihovo skladištenje (Malheiro i sur., 2013).

## 2.5. PRIMJENA PEP-a i UZV-a U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Ultrazvuk i pulsirajuće električno polje kao inovativne tehnologije u proizvodnim procesima imaju za cilj njihovo unapređenje i poboljšanje. Glavni im je zadatak proizvesti hranu poboljšanih svojstava i nutritivne vrijednosti. Visoka cijena, skupo održavanje i nepovjerenje potrošača su glavni nedostaci ovakvih tehnologija (Pérez i sur., 2021).

### 2.5.1. Primjena PEP-a u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja

Primjena ove tehnologije u proizvodnji djevičanskih maslinovih ulja bazira se na upotrebi kratkih impulsa struje koji imaju visok napon, a djeluju na poremećaj stanične stijenke stvarajući pore. Jačina ovakvoga tretmana ovisi o veličini same stanice, jačini električnog polja, broju impulsa koji djeluju na stanicu i njihovom trajanju (Clodoveo i sur., 2014).

Razlika između primjene PEP visokog inteziteta i niskog je u tome što se tijekom tretiranja visokim intezitetom inaktiviraju mikroorganizmi te se takav način primjene poistovjećuje s alternativnim konvencionalnim postupkom konzerviranja hrane, dok se s niskim intezitetom postiže permeabilizacija tkiva i povećanje propusnosti stanične membrane (Pérez i sur., 2021). Usporedno s konvencionalnim postupkom, primjenom PEP-a može doći do zagrijavanja, ali uz vrlo malo povećanje temperature koje ne šteti nutritivnoj vrijednosti hrane (Clodoveo i sur., 2014; Clodoveo, 2013).

Elektroporacija je proces koji uključuje privremeno stvaranje pora u staničnim membranama maslina pod djelovanjem električnog polja što za cilj ima oslobađanje ulja i drugih bioaktivnih komponenti. Način djelovanja ovog procesa očituje se u izlaganju maslinovog tijesta kratkim i snažnim impulsima električnog polja. S ovim procesom postiže se povećanje prinosa ulja, poboljšanje kvalitete ulja, smanjenje vremena i temperature ekstrakcije te ekološka održivost (Luengo i sur., 2013).

Primjena PEP-a u proizvodnim procesima prehrambene industrije se smatraju veoma inovativnom tehnologijom koja za cilj ima poboljšanje nutritivne vrijednosti i svojstava hrane. Uz poboljšanje svojstava hrane, ova tehnologija ima za cilj i povećanje fenolnih spojeva, fitosterola i tokoferola. Primjenom ove tehnologije u proizvodnim procesima ne dolazi do narušavanja kvalitete, senzorskih svojstava ulja ili oksidacijske stabilnosti (Pérez i sur., 2021; Kalogianni i sur., 2019). Utjecaj navedenog tretmana očituje se i u aktivnosti enzima prisutnih u maslini (Huang i sur., 2012).

Primjena ovakve nove tehnologije u procesiranju hrane i dalje nije apsolutno prihvaćena kod potrošača. Iako ova tehnologija ne uključuje nikakvu kemijsku obradu, te tretirani proizvodi

ne izazivaju nikakve alergijske reakcije i dalje postoji strah od negativnih posljedice primjene električne energije u procesiranju hrane (Pérez i sur., 2021).

### 2.5.2 Primjena UZV-a u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja

Ultrazvuk je zvučni val koji ima frekvenciju raspona od 20 kHz do 100 MHz. Prema intezitetu ga možemo podijeliti na ultrazvuk visokog i niskog inteziteta. Promjene koje ultrazvuk visokog inteziteta uzrokuje očituju se u razaranju membrane gdje dolazi do otpuštanja velike količine energije kroz nastanak i rast te na kraju implozije mjehurića. Takva pojava se naziva kavitacija (Nardella i sur., 2021). Razaranjem stanične stijenke primjenom ove tehnologije omogućuje se poboljšana ekstrakcija bioaktivnih spojeva, veći prijenos mase, inaktivacija patogena, te utječe na enzimsku aktivnost (Clodoveo, 2019).

U proizvodnom procesu tijekom tretmana ultrazvukom razlikujemo dva glavna mehanizma, mehanički i toplinski učinak. Uslijed procesa kavitacije zbog kojeg dolazi do razaranja stanične stijenke i prijenosa mase događa se mehanički utjecaj, dok se toplinski učinak očituje u apsorpciji ultrazvučne energije zbog kojeg dolazi i do zagrijavanja materijala (Veneziani i sur., 2016).

Miješenje je kritična faza u proizvodnji maslinovog ulja te zahtjeva veliki oprez. Primjena ultrazvuka u ovome koraku proizvodnje omogućava poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije ulja i kvalitetniji konačni proizvod. Koriste se ultrazvučni valovi od 20 do 40 kHz, koji prolaze kroz maslinovo tijesto stvarajući mjehuriće u tekućoj fazi (Bejaoui i sur., 2016).

Primjena ultrazvučnog tretmana u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja pozitivno utječe na udio tokoferola, gdje uslijed razaranja staničnih struktura dolazi do otpuštanja veće količine tokoferola u ulje te samim time i povećanja njegovog udjela u istom (Samaram i sur., 2015). Prema istraživanju Clodoveo (2013) pokazalo se da upotreba tretmana ultrazvuka na tijesto masline omogućava dobivanje djevičanskog maslinovog ulja s većim ukupnim sadržajem tokoferola, a posebice  $\alpha$ -tokoferola. Rezultati ovoga istraživanja kazuju da ovaj tretman nije utjecao na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja, ali primijećeno je da su količine ukupnih tokoferola, karotenoida i klorofila porasle, dok se količina ukupnih fenola smanjila. Primjena tretmana ultrazvuka je prema rezultatima iznimno preporučljiva sortama bogatim polifenolima, koji imaju karakteristična senzorska svojstva, puninu okusa i gorčine (Clodoveo, 2013).

Posebna upotreba ultrazvuka koristi se i kod obrade otpadnih voda koje se dobivaju u procesu proizvodnje. Uz brojne pogodnosti ovakva tehnologija ima veliku energetska važnost gdje predstavlja proces ekstrakcije bez dodatnom potrebom za toplinskom obradom, očuvana je kvaliteta proizvoda kao i smanjenje vremena i energije. Ekološki je održiviji proces bez pretjeranih kemijskih dodataka (Bejaoui i sur., 2016).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

U ovom diplomskom radu korišteni su uzorci djevičanskog maslinovog ulja dobiveni laboratorijskom preradom iz 4 autohtone sorte, a to su dvije dalmatinske sorte oblica i levantinka, te dvije istarske sorte istarska bjelica i rosulja. Masline su brane ručno u listopadu 2022. godine. Masline istarskih sorti pobrane su na OPG Vandelić (Bale) pri indeksu zrelosti za istarsku bjelicu 0,82, a za rosulju 2,19. Dalmatinske sorte pobrane su u masliniku Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša na području Kaštela pri indeksu zrelosti 2,11 za oblicu i 2,01 za levantinku.

Uzorci djevičanskog maslinovog ulja proizvedeni laboratorijskim postupkom skladišteni su u bocama tamnog stakla uz propuhivanje dušikom na temperaturi od 15 do 20 °C, nakon proizvodnje. U svim uzorcima djevičanskog maslinovog ulja određeni su sastav i koncentracija tokoferola.

Reagensi koji su korišteni tijekom analize sastava i koncentracije tokoferola su:

- Metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Engleska)
- Heptan (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Heksan (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Izopropanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- $\alpha$ -tokoferol (LGC, DR EHRENSTORFER, Augsburg, Njemačka)
- $\beta$ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)
- $\gamma$ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)
- $\delta$ -tokoferol (Millipore, Calbiochem, Billerica, SAD)

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Laboratorijska proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja

Nakon čišćenja i pranja maslina uslijedilo je mljevenje plodova te se dobiveno tijesto podvrgnulo PEP ili UZV tretmanu u različitim kombinacijama vremena i intenziteta dobivenim prema centralnom kompozitnom planu pokusa, a uvjeti su prikazani u tablici 1.

**Tablica 1.** Uvjeti PEP i UZV tretmana maslinovog tijesta

PEP		UZV	
Jakost el. Polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (s)	Amplituda (%)	Vrijeme tretmana (s)
kontrolni uzorak		kontrolni uzorak	
1	60	40	10
2	30	50	5
2	90	50	15
4,5	18	70	3
4,5	60	70	10
4,5	60	70	10
4,5	60	70	10
4,5	60	70	10
4,5	60	70	10
4,5	102	70	17
7	30	90	5
7	90	90	15
8	60	100	10

Za potrebe laboratorijske proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja uz primjenu PEP-a korištena je sljedeća oprema:

- uređaj za tretman PEP, HVG60/1 PEF (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Reaktor u kojem se provodi PEP tretman je promjera 23 cm, a udaljenost visokonaponskih elektroda od nehrđajućeg čelika iznosi 2,5 cm
- mlin čekičar, Oleum 30 Compact (Enotecnica Pillan Oleum 30 Compact, Camisano, Italija)
- miješalica, Velp Scientifica (Usmate, Italija)
- vodena kupelj, Stuart SBS80 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD)
- Centrifuga, Hettich Rotina 380 (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- centrifuga, Hettich Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)

U pokusima s primjenom UZV uzorci su tretirani u ultrazvučnoj kupelji Sonorex digiplus (Bandelin electronic, Berlin, Njemačka) maksimalne snage 640 W, napona 120 – 240 V i frekvencije 20 kHz te pripremljeni na laboratorijskoj pilot uljari Abencor MC2 (Ingenieria y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska).

Nakon tretmana PEP-om ili UZV-om slijedio je proces miješenja u trajanju od 40 min pri temperaturi 27 °C, a zatim se ulje izdvojilo centrifugiranjem.



### 3.2.2. Određivanje tokoferola

U uzorcima djevičanskih maslinovih ulja sastav i koncentracija tokoferola određeni su prema standardnoj metodi (HR EN ISO 9936, 2016) primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) uz fluorescentnu detekciju (FD), izokratskom metodom normalnih faza.

#### *Priprema matične otopine standarda*

Za pripremu matične otopine standarda ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola) izvagano je  $5 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$ , na vagi Kern ABP 200-5DM (KERN & SOHN, Balingen, Njemačka), u odmjernu tikvicu od 25 ml, te se tikvica do oznake napunila n-heptanom. Odmjerna tikvica s matičnom otopinom standarda umotana je u aluminijsku foliju te se skladištila pri temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  maksimalno tjedan dana od korištenja i otvaranja tikvice. Matičnoj otopini  $\alpha$ -tokoferola također je dodatno koncentracija određena i spektrofotometrijski kako bi se omogućilo izražavanje koncentracije detektiranih tokoferola. Pri tome se 10 mL otopine uparilo do suha na rotacijskom evaporatoru (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri temperaturi od  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  i sniženom tlaku, čime se n-heptan uklonio u cijelosti, a nakon propuhivanja dušikom u tikvicu se pipetiralo 10 mL metanola. Absorbancija dobivene otopine mjerena je na spektrofotometru UviLine 9400 (SECOMAM, Ales, Francuska) pri valnoj duljini od 292 nm. Koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u metanolu, izraženu u  $\mu\text{g/mL}$ , računa se da se dobivena apsorbancija podijeli s 0,0076. Dobivena koncentracija se množi s 2 kako bi se dobila koncentracija u matičnoj otopini standarda.

#### *Pripreme otopine standarda za injektiranje*

Otopina standarda koje se injektira u HPLC priprema se svaki dan te se skladišti na temperaturi od  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Za pripremu otopine standarda potrebno je odpipetirati 100  $\mu\text{L}$  matične otopine standarda u odmjernu tikvicu od 5 mL i tikvicu do oznake napuniti n-heptanom.

#### *Priprema uzorka*

Otopina uzorka se priprema tako da se u odmjernu tikvicu od 10 mL izvaže  $0,1 \text{ g} \pm 1 \text{ mg}$  uzorka, te se otopi u n-heptanu do oznake. Otopina uzorka se skladišti na tamnom mjestu bez pristupa svjetlosti te se analiza mora provesti na dan pripreme otopine uzorka.

#### *HPLC analiza*

U HPLC (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) je injektirano 20  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka. Na koloni LiChroCART, Silica 60 kolonom ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ;

Merck, Darmstadt, Njemačka) je provedeno razdvajanje tokoferola, pri temperaturi 25 °C. Smjesa heksan/izopropanol (99,3/0,7) je upotrijebljena kao mobilna faza uz protok od 0,9 mL/min u vremenskom trajanju analize od 25 minuta. Na fluorescentnom detektoru je namještena valna duljina eksitacije od 295 nm i valna duljina emisije od 330 nm.

Za identifikaciju pikova  $\alpha$ -tokoferola,  $\beta$ -tokoferola,  $\gamma$ -tokoferola i  $\delta$ -tokoferola u uzorku, korištena su retencijska vremena navedenih komercionalno dostupnih standarda. Otopina standarda je injektirana na isti način kao i uzorci. Otopina  $\alpha$ -tokoferola priprema se svaki dan te injektira u HPLC. Koncentracija svakog pojedinog tokoferola u uzorku ( $w$ ), izražena je preko koncentracije  $\alpha$ -tokoferola, u mg/kg, a računa se prema formuli [1]:

$$W = \frac{\rho \cdot \bar{A}_t \cdot V}{\bar{A}_s \cdot m} \quad [1]$$

Gdje je:  $\rho$  koncentracija u  $\mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -tokoferola u otopini standarda,  $A_s$  očitana površina pika  $\alpha$ -tokoferola u otopini standarda,  $A_t$  je očitana površina pika pojedinog tokoferola u otopini uzorka,  $m$  masa u gramima testnog uzorka,  $V$  volumen pripremljene otopine uzorka koji iznosi 10 mL.

### 3.3. OBRADA PODATAKA

Statistička analiza je provedena kako bi se utvrdio utjecaj sorte i načina proizvodnje na sastav tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju. Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD) uz upotrebu centralni kompozitnog dizajna. U ovom dizajnu svaki se faktor varira na pet razina ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ), a centralna točka je ispitana u 5 ponavljanja. Svi analitički podaci prikupljeni su u dva paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standarda devijacija. Kao zavisne varijable u pokusima s PEP-om varirani su jakost električnog polja i vrijeme, a u pokusima s UZV-om amplituda i vrijeme. Rezultati modeliranja prikazani su konturnim dijagramima koji prikazuju utjecaj dva faktora. Prikladnost modela ispitana je i provjerena pomoću nekoliko uobičajenih statističkih parametara tj. određivanjem koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) i nedostatka modela (eng. lack of fit) provođenjem F-testa. Za utvrđivanje značajnosti modela i utjecaja pojedinih faktora provedena je analiza varijance (ANOVA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada i istraživanja bio je prikazati utjecaj inovativnih tehnologija kao što su tretman ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem na sastav i udio tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju. Ispitivanje je provedeno na uzorcima ulja proizvedenim iz četiri različite autohtone sorte maslina (istarske rosulja i istarska bjelica te dalmatinskih oblica i levantinka). Prije procesa miješenja maslinovo tijesto je podvrgnuto predtretmanima ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem, te je nakon miješenja i odvajanja ulja na centrifugi u dvije faze određen sastav i udio tokoferola u dobivenom ulju.

Tokoferoli predstavljaju značajnu i važnu skupinu spojeva u sastavu djevičanskih maslinovih ulja. Spadaju u vitamine topive u mastima s vrlo velikim antioksidacijskim djelovanjem, imaju iznimnu biološku aktivnost, koji daju ulju stabilnost i štite ga od oksidacije. Ispitivani uzorci su uzeti od četiri autohtone hrvatske sorte maslina, oblica koja je i najzastupljenija sorta, dalmatinska sorta levantinka, te istarska bjelica i rosulja. Ovo istraživanje bazirano je na koncentracijama  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferola. Na udio tokoferola u maslinovom ulju utječu razni čimbenici među kojima su sorta, proizvodni procesi, geografski položaj, vrijeme i način berbe. Na udio tokoferola u ulju utječu i rukovanje te skladištenje, pošto su tokoferoli veoma osjetljivi na svjetlost i udio kisika. Ambalaža koja se koristi mora biti izrađena od tamnog stakla (Pérez i sur., 2019).

Inovativne tehnologije koje se koriste u proizvodnji djevičanskih maslinovih ulja kao što su tretman ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem imaju za cilj poboljšanje svih nutritivnih i senzorskih svojstava. Prednost ovih tehnologija očituje se u ekološkoj prihvatljivosti i energetske važnosti gdje je smanjeno vrijeme trajanja procesa kao i utrošak energije. Nedostatak je u visokoj cijeni te skupom održavanju opreme, ali i relativnom nepovjerenju potrošača prema ovakvim postupcima. Pulsirajuće električno polje uspoređuje se s konvencionalnim procesima konzerviranja hrane zbog blagog povećanja temperature tijekom procesa odnosno zagrijavanja, no bez narušavanja nutritivne vrijednosti hrane. Cilj upotrebe ovakvog postupka u industriji je poboljšanje nutritivne vrijednosti i senzorskih svojstava hrane kao i povećanje fenolnih spojeva, fitosterola i tokoferola. Primjena ultrazvučne tehnologije bazira se na razaranju stanične membrane tkiva. Time se utječe na poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih komponenti, veći prinos mase kao i enzimске aktivnosti. U prehrambenoj industriji primjena ove tehnologije pozitivno utječe na udio tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima. Odlikuje se ekološkom održivosti procesa, energetske očuvanosti te doprinosi očuvanju kvalitete proizvoda (Pérez i sur., 2021).

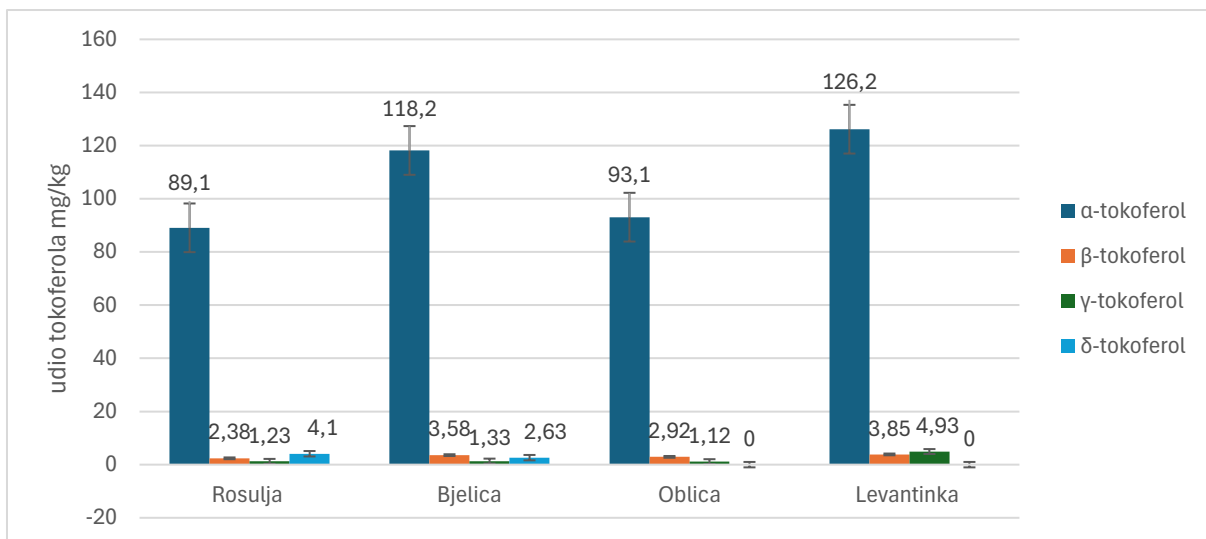
Uzorci maslinovog tijesta prethodno su tretirani ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem te je potom provedena klasična laboratorijska prerada. Koncentracija tokoferola u

uzorcima određena je standardnom metodom pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Ovakva metoda je brza i selektivna za mjerenje pojedinačnih tokoferola u biljnim uljima. Uzorci se analiziraju neposredno nakon otapanja u mobilnoj fazi.  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferoli se kvantificiraju na temelju njihovih pikova u odnosu na standardne kalibracijske krivulje (Özcan i sur., 2019). Dobiveni podaci uspoređuju se s ukupnim sadržajem tokoferola utvrđenim standardnim kolorimetrijskim postupkom. Rezultati pokazuju da je HPLC metoda pouzdanija u mjerenju uzoraka s visokim razinama  $\alpha$ -tokoferola. Ovom metodom ispitivana su ulja soje, šafranike, suncokreta, sjemena pamuka, kukuruza, kikirikija i maslinova ulja (Acar i Aslan, 2017).

Korištenje HPLC metode pri određivanju tokoferola, a posebice  $\alpha$ -tokoferola je veoma poželjno. Rezultati dobiveni kazuju da je upravo HPLC metoda najbolja za određivanje tokoferola. Za određivanje  $\alpha$ -tokoferola posebice je važno upotrebljavati metode koje ne iziskuju puno vremena te one koje su jednostavne za primjenu. Ovo je metoda koja ne zahtjeva previše vremena te nije kompleksna za izvođenje. Početak ove metode zasniva se na osapunjavanju uzorka gdje se oslobađaju svi slobodni tokoferoli zatim se uklanjaju masti te se provodi sukladno tome postupak hidrolize estera tokoferola pri čemu se na kraju dobiva slobodni tokoferol. U daljnjoj fazi se oslobađaju  $\alpha$ -tokoferoli, s time da postoji mogućnost za odvajanjem i sva četiri tokoferola. Zbog određene brzine koja se mora postići u postupku koristi se i veoma visok tlak te određena suvremena punila (Lee i sur., 2018).

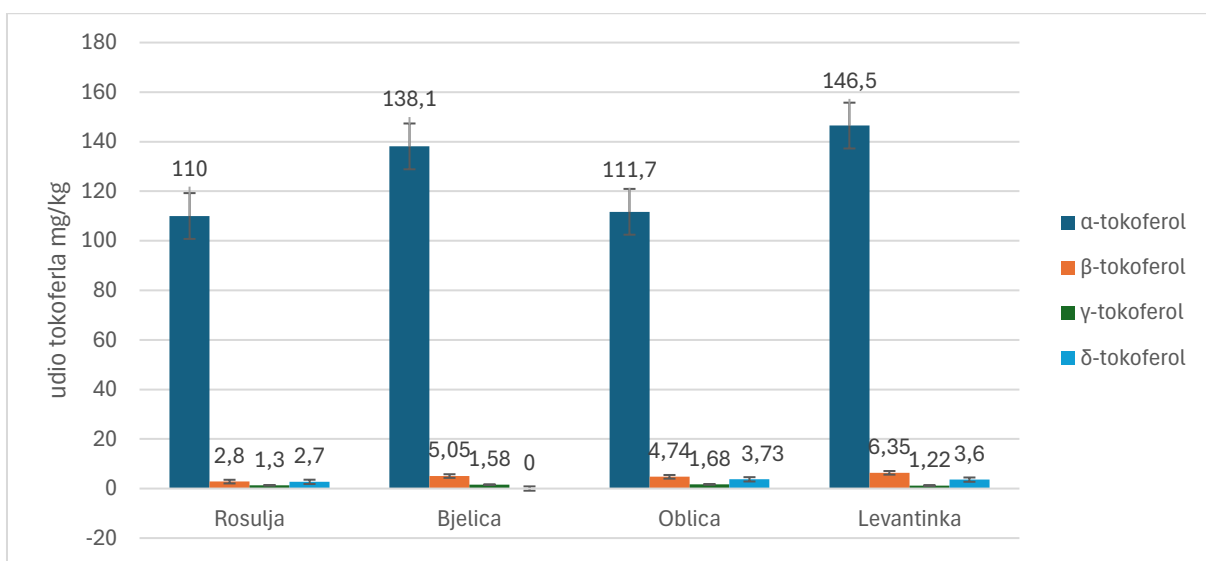
Kako je već rečeno u istraživanju uz HPLC metodu korišten je fluorescentni detektor koji je postavljen iza kolone s funkcijom detekcije ciljanih molekula koje se eluiraju iz kolone. Signali koji se dobiju su ujedno i koncentracije pojedinih komponenata analita. Ovakvi detektori koriste princip mjerenja emitirane svjetlosti, jedni su od najosjetljivijih detektora (Reuhs, 2017). Prednosti ovakvih detektora su velika osjetljivost te visoka selektivnost, dok su neki od nedostataka utjecaj okolišnih uvjeta, temperature, otapala, pH i viskoznosti. Stoga najbolje rezultate postižu u analizi spojeva u tragovima, kao što su razni vitamini u hrani i dodacima, aflatoksine u žitaricama te aromatskih ugljikovodika u otpadnim vodama (Raut i Charde, 2014).



**Slika 1.** Grafički prikaz udjela tokoferola u kontrolnim uzorcima pokusa s primjenom PEP-a

Slika 1. prikazuje udio tokoferola u kontrolnim uzorcima djevičanskog maslinovog ulja iz 4 sorte. Iz prikaza je vidljivo da je najveći udio  $\alpha$ -tokoferola u svim sortama.

Kao što je vidljivo iz rezultata udjeli svih ostalih tokoferola su u znatno nižim koncentracijama. Najveći udio  $\alpha$ -tokoferola nalazi se kod sorte levantinka, a najmanji kod sorte rosulja. Također je udio  $\beta$ -tokoferola najveći kod sorte levantinka, a najmanji kod sorte rosulja.  $\gamma$ -tokoferol ima najveći udio kod sorte levantinka, a najmanji kod sorte oblica. Za sorte levantinka i oblica nisu detektirani  $\delta$ -tokoferoli.



**Slika 2.** Grafički prikaz udjela tokoferola u kontrolnim uzorcima pokusa s primjenom UZV-a

Slika 2. prikazuje udio tokoferola u kontrolnim uzorcima djevičanskog maslinovog ulja iz 4 sorte. Iz prikaza je vidljivo da je najveći udio  $\alpha$ -tokoferola u svim sortama.

Kod sorte rosulja prema dostupnoj literaturi udio ukupnih tokoferola iznosi oko 211 mg/kg za 2010. godinu dok su za 2011. godinu zabilježene više koncentracije ukupnih tokoferola oko 351 mg/kg. U literaturi se navodi da se u ovoj sorti maslinovog ulja većinski nalaze  $\alpha$ -tokoferoli dok su  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferoli prisutni u znatno nižim koncentracijama (Koprivnjak i sur., 2012). Prema rezultatima iz ove literature može se zaključiti da oni odgovaraju rezultatima u ovome radu. Kod sorte rosulja u oba radi su utvrđene najveće koncentracije  $\alpha$ -tokoferola, dok su ostali tokoferoli u znatno nižim koncentracijama.

Šarolić i sur. (2015) ispitivanjima su utvrdili da djevičansko maslinovo ulje sorte oblica sadrži oko 213 mg/kg  $\alpha$ -tokoferola, dok su koncentracije  $\gamma$ -tokoferola 33 mg/kg. Jukić Špika i sur. (2016) utvrdili su koncentracije ukupnih tokoferola oko 443 mg/kg (Jukić Špika i sur., 2016). Također i kod ove sorte utvrđena je najveća koncentracija  $\alpha$ -tokoferola, zatim ga slijedi  $\beta$ -tokoferol, dok su ostale koncentracije u znatno nižim udjelima.

Koncentracija  $\alpha$ -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju iz sorte levantinka iznose oko 222 mg/kg. Koncentracije  $\gamma$ -tokoferola u ovoj sorti kreću se oko 31 mg/kg (Šarolić i sur., 2015). Kao i kod ovoga istraživanja sorta levantinka posjeduje najveće koncentracije svi tokoferola, a posebno udio  $\alpha$ -tokoferola.

Najveći udio  $\alpha$ -tokoferola je kod sorte levantinka, dok je najmanji kod sorte rosulja.  $\beta$ -tokoferola je najviše kod sorte levantinka, a najmanje kod sorte rosulja. Udio  $\gamma$ -tokoferola u najvećoj je koncentraciji kod sorte oblica, a najmanjoj kod sorte levantinka.  $\delta$ -tokoferol nije detektiran u sorti bjelica.

#### **4.1. Tretman pulsirajućim električnim poljem (PEP)**

Pri upotrebi ovakve metode u procesiranju hrane koriste se kratki plusevi visokog napona koji djeluje na različite promjene u staničnoj membrani. Tretman pulsirajućim električnim poljem tretira se kao netermalna tehnologija obrade hrane, tijekom koje dolazi do značajnog porasta temperature (Clodoveo i sur., 2014). Primjena ovakvog predtretmana u proizvodnom procesu ima za cilj veliki utjecaj na vrijeme trajanja te temperaturu miješenja. Utječe pozitivno na senzorska i nutritivna svojstva ulja kao i na očuvanje njegove kvalitete (Leone i sur., 2022; Clodoveo i sur., 2014).

Dobiveni rezultati koncentracija  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferola, prisutnih u djevičanskim maslinovim uljima proizvedeni uz tretiranje ultrazvukom, podijeljeni su prema sortama i prikazani u sljedećim tablicama. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$

standardna devijacija masenih koncentracija. Prikazane vrijednosti su masene koncentracije pojedinih tokoferola izraženih u miligramu po kilogramu djevičanskog maslinovog ulja.

Prema kontrolnim uzorcima koji nisu tretirani djelovanjem pulsirajućeg električnog polja, najveći udio ispitivanih tokoferola dobiven je u dalmatinskoj sorti levantinka, dok su istarske sorte pokazale znatno manje udjele tokoferola.

**Tablica 2.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja uz PEP tretman

Rosulja		mg/kg			
Jakost el. polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
1	60	101,9 ± 1,81	3,05 ± 0,22	1,35 ± 0,01	7,40 ± 2,25
2	30	102,6 ± 2,36	3,00 ± 0,26	1,40 ± 0,04	3,70 ± 0,42
2	90	96,3 ± 2,23	2,50 ± 0,29	1,30 ± 0,02	2,80 ± 1,05
4,5	18	92,1 ± 5,16	2,60 ± 0,12	1,20 ± 0,15	3,30 ± 0,74
4,5	60	93,7 ± 4,00	2,55 ± 0,23	1,35 ± 0,00	4,95 ± 0,56
4,5	60	97,1 ± 1,65	2,65 ± 0,11	1,35 ± 0,00	4,50 ± 0,24
4,5	60	97,7 ± 1,15	2,60 ± 0,10	1,25 ± 0,13	4,60 ± 0,26
4,5	60	100,8 ± 1,06	2,80 ± 0,00	1,40 ± 0,03	4,65 ± 0,37
4,5	60	98,2 ± 0,83	2,70 ± 0,10	1,45 ± 0,15	4,3, ± 0,07
4,5	102	95,7 ± 2,66	2,65 ± 0,12	1,30 ± 0,03	3,50 ± 0,58
7	30	102,3 ± 2,19	2,90 ± 0,16	1,6 ± 0,29	3,20 ± 0,81
7	90	105,4 ± 4,36	3,05 ± 0,20	1,35 ± 0,00	3,85 ± 0,31
8	60	106,8 ± 5,37	3,15 ± 0,30	1,45 ± 0,10	4,70 ± 0,32

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

**Tablica 3.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte bjelica uz PEP tretman

Bjelica		mg/kg			
Jakost el. polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
1	60	95,9 ± 8,90	3,70 ± 0,31	1,30 ± 1,15	nd*
2	30	104,5 ± 2,81	4,00 ± 0,52	1,45 ± 1,04	2,70 ± 0,11
2	90	103,6 ± 3,45	3,95 ± 0,49	1,35 ± 1,11	nd
4,5	18	97,3 ± 7,91	3,25 ± 0,01	1,30 ± 1,15	3,00 ± 0,11
4,5	60	90,4 ± 12,78	3,00 ± 0,18	2,15 ± 0,54	nd
4,5	60	89,8 ± 13,21	2,90 ± 0,25	3,00 ± 0,06	nd
4,5	60	93,1 ± 10,84	3,50 ± 0,17	2,20 ± 0,51	nd
4,5	60	122,2 ± 9,74	2,55 ± 0,50	4,50 ± 1,12	nd
4,5	60	118,0 ± 6,77	2,55 ± 0,55	4,00 ± 0,76	nd
4,5	102	123,0 ± 10,30	3,25 ± 0,01	4,30 ± 0,98	nd
7	30	123,8 ± 10,83	2,85 ± 0,29	4,25 ± 0,94	nd
7	90	124,1 ± 11,08	4,15 ± 0,63	4,15 ± 0,87	nd
8	60	124,2 ± 11,15	2,70 ± 0,40	4,05 ± 0,80	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

**Tablica 4.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica uz PEP tretman

Oblica		mg/kg			
Jakost el. polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
1	60	98,8 ± 4,30	3,05 ± 0,20	1,20 ± 0,23	nd
2	30	96,4 ± 2,64	3,05 ± 0,20	1,20 ± 0,23	3,00 ± 0,16
2	90	100,7 ± 5,68	3,00 ± 0,16	1,35 ± 0,12	4,20 ± 0,69
4,5	18	84,7 ± 5,64	2,45 ± 0,23	1,10 ± 0,30	2,55 ± 0,48
4,5	60	90,0 ± 1,92	2,50 ± 0,19	1,10 ± 0,30	nd
4,5	60	102,1 ± 6,67	2,85 ± 0,06	1,30 ± 0,16	3,10 ± 0,09
4,5	60	102,1 ± 6,67	2,90 ± 0,09	1,30 ± 0,16	3,50 ± 0,19
4,5	60	100,6 ± 5,61	2,80 ± 0,02	1,25 ± 0,19	3,10 ± 0,09
4,5	60	82,5 ± 7,19	2,70 ± 0,05	5,50 ± 2,81	3,45 ± 0,16
4,5	102	85,8 ± 4,86	2,80 ± 0,02	1,05 ± 0,33	3,20 ± 0,02
7	30	87,2 ± 3,90	2,60 ± 0,12	1,10 ± 0,30	2,95 ± 0,20
7	90	86,5 ± 4,40	2,70 ± 0,05	1,10 ± 0,30	2,55 ± 0,48
8	60	87,6 ± 3,62	2,65 ± 0,08	1,15 ± 0,26	3,90 ± 0,47

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

**Tablica 5.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka uz PEP tretman

Levantinka		mg/kg			
Jakost el. polja (kV/cm)	Vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
1	60	143,5 ± 10,27	3,35 ± 0,13	5,45 ± 0,30	nd
2	30	138,1 ± 6,81	4,60 ± 1,01	5,15 ± 0,09	nd
2	90	142,3 ± 9,39	3,55 ± 0,27	5,45 ± 0,30	nd
4,5	18	141,1 ± 8,58	6,95 ± 2,67	5,60 ± 0,41	nd
4,5	60	130,2 ± 0,83	2,90 ± 0,19	6,95 ± 1,36	2,30 ± 0,56
4,5	60	135,7 ± 4,76	3,55 ± 0,27	4,65 ± 0,26	2,00 ± 0,77
4,5	60	109,5 ± 13,77	2,30 ± 0,62	4,00 ± 0,72	4,80 ± 1,21
4,5	60	115,8 ± 9,35	2,05 ± 0,79	4,40 ± 0,44	1,55 ± 1,09
4,5	60	119,4 ± 6,77	2,10 ± 0,76	4,50 ± 0,37	2,25 ± 0,59
4,5	102	123,9 ± 3,59	2,15 ± 0,72	4,90 ± 0,08	2,80 ± 0,21
7	30	130,1 ± 0,80	1,35 ± 1,29	4,80 ± 0,16	5,35 ± 1,60
7	90	127,1 ± 1,36	2,30 ± 0,62	4,85 ± 0,12	4,75 ± 1,17
8	60	119,6 ± 6,63	4,00 ± 0,59	4,60 ± 0,30	2,05 ± 0,74

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

U tablicama 2, 3, 4 i 5 prikazane su koncentracije tokoferola u različitim sortama u djevičanskom maslinovom ulju. Uzorci su tretirani prethodno pulsirajućim električnim poljem,



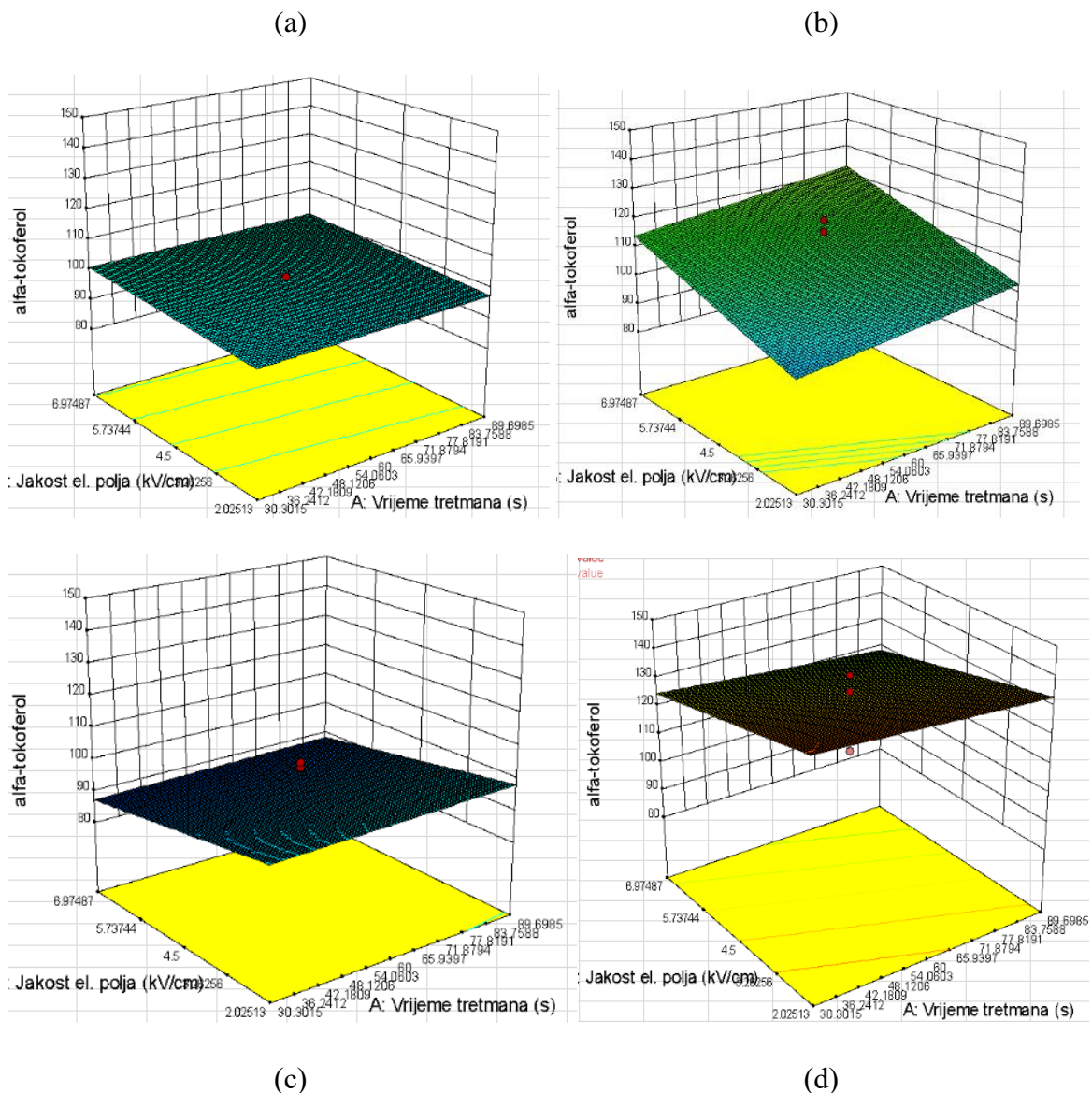
pri različitim uvjetima. Jakost električnog polja kretala se od 1 do 8 kV/cm dok je vrijeme tretmana od 30 do 102 sekunde. Prema navedenim rezultatima uočavamo najveće udjele tokoferola prisutnih u dalmatinskoj sorti levantinka, dok su najniže koncentracije tokoferola, a posebice  $\alpha$ -tokoferola prisutne kod istarske sorte rosulja. Brojčano najviša koncentracija  $\alpha$ -tokoferola iznosi 143,5 mg/kg te pripada sorti levantinka. Koncentracije  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola su u značajno nižim udjelima ili nisu detektirani u pojedinim uzorcima. Koncentracije  $\beta$ -tokoferola u svim sortama se kreću u rasponu 1-5 mg/kg,  $\gamma$ -tokoferola 1-7 mg/kg, dok su koncentracije  $\delta$ -tokoferola u rasponu 1-8 mg/kg ili nisu detektirane.

#### 4.1.1. Modeliranje utjecaja PEP-a

**Tablica 6.** Statistički prikaz utjecaja vremena tretmana, jakosti električnog polja i sorte na koncentraciju tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju pri tretmanu PEP-om

Izvor	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
					Prob > F
Model	11412.59	12	951.049	11.834	$1.515 \times 10^{-9}$
A-Vrijeme tretmana	11.25	1	11.252	0.140	$7.103 \times 10^{-1}$
B- Jakost el. polja	0.05	1	0.050	0.001	$9.802 \times 10^{-1}$
C-Sorta	9744.43	3	3248.142	40.419	$4.791 \times 10^{-12}$
AB	0.06	1	0.062	0.001	$9.779 \times 10^{-1}$
AC	221.19	3	73.730	0.917	$4.414 \times 10^{-1}$
BC	1435.61	3	478.537	5.955	$1.915 \times 10^{-3}$
Rezidual	3134.14	39	80.363		
Nedostatak modela	1312.63	23	57.071	0.501	0.93631321
Std. Dev.	8.96		R-kvadrat	0.7845	
Srednje	107.33		Prilagođeni R-kvadrat	0.7183	
C.V. %	8.35		Predviđeni R-kvadrat	0.6714	

Tablica 6 prikazuje različite utjecaje čimbenika kao što su jakost električnog polja, vrijeme tretmana i sorta na udio tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima različitih sorti. Rezultati provedeni ANOVA statističkom analizom, sa 95 %-tnom značajnosti ( $p \leq 0,05$ ). P vrijednost predstavlja pojedini faktor kao što su sorta, jakost električnog polja i vrijeme tretmana. Sorta pokazuje najveći statistički značaj na udio  $\alpha$ -tokoferola ( $p < 0,001$ ). Vrijeme tretmana i jakost električnog polja nemaju statistički značaj na udio  $\alpha$ -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju ( $p > 0,05$ ). Međusobne interakcije između vremena tretmana, sorte ili jakosti električnog polja također nemaju statistički značaj na udio  $\alpha$ -tokoferola.



**Slika 3.** Dijagram utjecaja vremena tretmana (s) i jakosti električnog polja (kV/cm) na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u različitim sortama djevičanskih maslinovih ulja: rosulja (a), bjelica (b), oblica (c) i levantinka (d)

Na slici 3 prikazani su utjecaj vremena tretmana i jakosti električnog polja na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u maslinovim uljima različitih sorti maslina.

Dijagram a predstavlja utjecaj jakosti električnog polja i vremena tretmana na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u sorti rosulja. Iz ovog prikaza uočavamo da je relativna koncentracija  $\alpha$ -tokoferola poprilično konstantna. Uočavamo da i u prikazanom rasponu vremena tretmana i jakosti električnog polja nema velikog statističkog značaja, gdje je koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola je konstanta. Zaključujemo da tretman pulsirajućim električnim poljem između ovih prikazanih parametara ne mijenja udio  $\alpha$ -tokoferola u ovoj sorti djevičanskog maslinovog ulja. Ovakav utjecaj možemo prikazati i jednadžbom: Rosulja =  $95,05883838 + 0,01098905724 \cdot (\text{vrijeme}$

tretmana) + 0,8348383838 · (jakost električnog polja) – 0,00083333333333 · (vrijeme tretmana · jakost električnog polja).

Dijagram b također predstavlja utjecaj jakosti električnog polja i vremena tretmana na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u sorti bjelica. Iz ovog dijagrama uočavamo uzlazne trendove. Postoji određena varijabilnost u podacima vezanima za koncentraciju. Zaključujemo da povećanjem utjecaja jakosti električnog polja se povećava i koncentracija  $\alpha$ -tokoferola, kao i povećanjem vremena tretmana povećava se koncentracija ovoga tokoferola. Ovakvi uzlazni trendovi ukazuju da povećanjem ispitivanih čimbenika pozitivno utječe na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Također ovaj prikaz jednadžbe nam opisuje navedene promjene: Bjelica =  $81,16000389 + 0,1531607744 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) + 4,067171717 \cdot (\text{jakost električnog polja}) - 0,00083333333333 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{jakost električnog polja})$ .

Iz dijagrama c sorte oblica koji prikazuje utjecaj jakosti električnog polja i vremena tretmana na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola, zaključujemo da povećanjem utjecaja jakosti električnog polja dovodi do smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola. Povećanjem vremena tretmana utječe se i na povećanje koncentracije  $\alpha$ -tokoferola. Prema ovome zaključujemo da oba čimbenika utječu na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Navedena jednadžba potvrđuje ove promjene: Oblica =  $100,0546426 + 0,02538299663 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) - 1,928787879 \cdot (\text{jakost električnog polja}) - 0,00083333333333 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{jakost električnog polja})$ .

Dijagram d prikazuje jakost električnog polja i vremena tretmana na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Na temelju podataka iz dijagrama zaključujemo da porastom jakosti električnog polja dolazi do smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola, dok vrijeme tretmana ne utječe na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola, koja je konstanta. Prema ovome zaključujemo da jedino jakost električnog polja od ova dva čimbenika imaju utjecaj na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u sorti levantinka. Jednadžba koja opisuje navedene promjene je: Levantinka =  $147,6644328 + 0,02538299663 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) - 1,928787879 \cdot (\text{jakost električnog polja}) - 0,00083333333333 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{jakost električnog polja})$ .

Pema svim navedenim podacima utjecaja ovih čimbenika, vrijeme tretmana i jakost električnog polja na ispitivane sorte, dolazimo do zaključka da su se najveće promjene u koncentraciji  $\alpha$ -tokoferola događale kod sorte bjelica. Kod ove sorte najvidljivije su promjene u koncentraciji utjecajem ovih čimbenika. Najmanje promjene djelovanjem navedenih čimbenika uočene su kod sorte rosulja čija se koncentracija  $\alpha$ -tokoferola nije značajno mijenjala.

Uz sve ostale rezultate valja napomenuti i utjecaj sorte na udio tokoferole koji može biti veoma značajan. Vidljivo je da najveći udio  $\alpha$ -tokoferola pripisujemo dalmatinskoj sorti levantinka, dok se manje vrijednosti koncentracije ovoga tokoferola pripisuju istarskim sortama kao što su rosulja i bjelica.

## 4.2. Tretman ultrazvukom (UZV)

Tijekom tretmana ultrazvuka nastaju longitudinalni valovi koji u tekućem mediju stvaraju naizmjenične kompresije i ekspanzije. Ova područja promjene tlaka uzrokuju kavitaciju uslijed ove promjene dolazi razaranja staničnih stijenki uljnih stanica čime dolazi do povećanja prijenosa mase te oslobađanja njihovog sadržaja. Toplinski učinak apsorbira se kao kinetička energija valova. Porastom temperature tijekom procesa miješanja pod tretmanom ultrazvuka dolazi do smanjenja viskoznosti ulja i poboljšava se ekstrakcija ulja.

U sljedećim tablicama prikazane su koncentracije  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola u različitim sortama čiji su uzorci tretirani tretmanom ultrazvuka pri različitim čimbenicima. Prema navedenim rezultatima kontrolnih uzoraka koji nisu bili tretirani UZV tretmanom vidljivo je da su koncentracije povećane u odnosu na kontrolne uzorke iz slike 2. Najveće koncentracije opet se pripisuju dalmatinskoj sorti levantinka, dok su uzorci ostalih sorti u nižim koncentracijama.

**Tablica 7.** Koncentracije tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte rosulja uz UZV tretman

Rosulja		mg/kg			
Amplituda (%)	vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
40	10	111,2 ± 6,21	3,00 ± 0,19	1,30 ± 0,08	2,50 ± 0,67
50	5	114,3 ± 3,98	3,20 ± 0,05	1,45 ± 0,02	2,80 ± 0,46
50	15	113,2 ± 4,76	3,20 ± 0,05	1,40 ± 0,01	nd
70	3	127,4 ± 5,25	3,50 ± 0,16	1,30 ± 0,08	2,20 ± 0,88
70	10	122,7 ± 1,92	3,35 ± 0,06	1,50 ± 0,06	2,80 ± 0,46
70	10	130,2 ± 7,26	3,40 ± 0,09	1,40 ± 0,01	3,10 ± 0,25
70	10	118,5 ± 1,01	3,20 ± 0,05	1,40 ± 0,01	3,30 ± 0,11
70	10	118,4 ± 1,12	3,55 ± 0,20	1,95 ± 0,37	3,35 ± 0,07
70	10	109,8 ± 7,16	3,00 ± 0,19	1,20 ± 0,16	nd
70	17	124,5 ± 3,20	3,35 ± 0,06	1,35 ± 0,05	6,00 ± 1,80
90	5	126,9 ± 4,93	3,15 ± 0,08	1,40 ± 0,01	nd
90	15	129,8 ± 6,94	3,45 ± 0,13	1,40 ± 0,01	nd
100	10	112,5 ± 5,29	3,15 ± 0,08	1,40 ± 0,01	5,00 ± 1,10

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;  
\*nije detektirano

**Tablica 8.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte bjelica uz UZV tretman

Bjelica		mg/kg			
Amplituda (%)	vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
40	10	109,8 ± 8,80	4,10 ± 0,45	1,30 ± 0,78	nd
50	5	136,4 ± 10,08	5,55 ± 0,58	1,45 ± 0,67	nd
50	15	114,9 ± 5,09	4,60 ± 0,09	1,30 ± 0,78	nd
70	3	130,1 ± 5,66	5,05 ± 0,23	1,40 ± 0,71	nd
70	10	113,9 ± 5,80	5,05 ± 0,23	1,35 ± 0,74	nd
70	10	124,2 ± 1,45	5,45 ± 0,51	1,45 ± 0,67	3,30 ± 0,0
70	10	135,4 ± 9,37	5,15 ± 0,30	1,35 ± 0,74	nd
70	10	122,8 ± 0,49	4,25 ± 0,34	1,20 ± 0,85	nd
70	10	118,3 ± 2,72	4,65 ± 0,06	1,15 ± 0,88	nd
70	17	115,9 ± 4,42	4,45 ± 0,20	1,20 ± 0,85	nd
90	5	118,3 ± 2,69	4,65 ± 0,06	5,50 ± 2,19	nd
90	15	139,8 ± 12,48	4,70 ± 0,02	2,90 ± 0,35	nd
100	10	107,8 ± 10,15	3,80 ± 0,66	9,65 ± 5,13	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

**Tablica 9.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica uz UZV tretman

Oblica		mg/kg			
Amplituda (%)	vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
40	10	121,1 ± 8,66	4,20 ± 0,13	1,35 ± 0,86	3,70 ± 0,38
50	5	126,0 ± 12,09	4,30 ± 0,20	1,35 ± 0,86	4,95 ± 0,50
50	15	112,1 ± 2,26	3,55 ± 0,33	1,20 ± 0,97	3,50 ± 0,52
70	3	111,2 ± 1,63	4,05 ± 0,02	1,35 ± 0,86	3,60 ± 0,45
70	10	111,7 ± 1,98	4,00 ± 0,01	1,40 ± 0,83	3,40 ± 0,59
70	10	100,2 ± 6,15	6,20 ± 1,54	2,10 ± 0,33	4,50 ± 0,18
70	10	98,3 ± 7,46	3,10 ± 0,65	9,25 ± 4,72	6,00 ± 1,24
70	10	104,0 ± 3,46	3,85 ± 0,12	5,65 ± 2,18	2,85 ± 0,98
70	10	101,9 ± 4,91	3,55 ± 0,33	1,05 ± 1,07	5,70 ± 1,03
70	17	105,5 ± 2,37	3,45 ± 0,40	5,45 ± 2,04	nd
90	5	111,1 ± 1,59	4,00 ± 0,01	1,05 ± 1,07	nd
90	15	103,2 ± 4,03	3,90 ± 0,08	1,05 ± 1,07	nd
100	10	109,1 ± 0,14	4,15 ± 0,09	1,15 ± 1,00	nd

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

**Tablica 10.** Koncentracija tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja sorte levantinka uz UZV tretman

Levantinka		mg/kg			
Amplituda (%)	vrijeme tretmana (s)	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
40	10	150,5 ± 10,08	6,75 ± 0,78	1,10 ± 2,12	nd
50	5	151,7 ± 10,92	6,95 ± 0,93	5,55 ± 1,03	nd
50	15	121,4 ± 10,50	3,95 ± 1,20	1,35 ± 1,94	4,40 ± 0,56
70	3	142,5 ± 4,42	6,40 ± 0,54	5,35 ± 0,88	2,40 ± 0,86
70	10	145,4 ± 6,47	6,50 ± 0,61	1,45 ± 1,87	2,80 ± 0,57
70	10	141,5 ± 3,71	5,95 ± 0,22	5,35 ± 0,88	1,75 ± 1,32
70	10	119,1 ± 12,13	5,65 ± 0,01	4,35 ± 0,18	1,55 ± 1,46
70	10	134,1 ± 1,52	4,65 ± 0,70	7,85 ± 2,65	1,80 ± 1,28
70	10	124,1 ± 8,59	5,65 ± 0,01	7,70 ± 2,55	1,35 ± 1,60
70	17	128,0 ± 5,87	3,70 ± 1,37	6,95 ± 2,02	5,65 ± 1,44
90	5	130,1 ± 4,35	6,45 ± 0,57	1,40 ± 1,91	5,80 ± 1,55
90	15	148,5 ± 8,63	4,20 ± 1,02	3,75 ± 0,25	6,45 ± 2,01
100	10	134,5 ± 1,24	6,55 ± 0,64	1,10 ± 2,12	5,75 ± 1,51

sve vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija;

\*nije detektirano

U tablicama 7, 8, 9 i 10 prikazane su koncentracije tokoferola u različitim sortama u djevičanskom maslinovom ulju. Uzorci su prethodno tretirani tretmanom ultrazvuka. Amplituda i vrijeme tretmana su čimbenici koji su utjecali na sortu. Amplituda se kretala u rasponu od 40 do 100 %, dok je vrijeme tretmana bilo od 3 do 17 sekundi. Prema navedenim rezultatima najveće udjele tokoferola sadrži dalmatinska sorta levantinka, dok su najniže koncentracije, posebno  $\alpha$ -tokoferola prisutne kod sorte oblica. Brojčano najveća koncentracija  $\alpha$ -tokoferola iznosi 151,7 mg/kg koju sadrži sorta levantinka. Koncentracije  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola su u značajno nižim udjelima ili nisu detektirani u pojedinim uzorcima.  $\beta$ -tokoferol je u svim sortama prisutan u rasponu 2-7 mg/kg,  $\gamma$ -tokoferol 1-10 mg/kg, a  $\delta$ -tokoferoli 1-7 mg/kg ili nisu detektirani u pojedinim uzorcima.

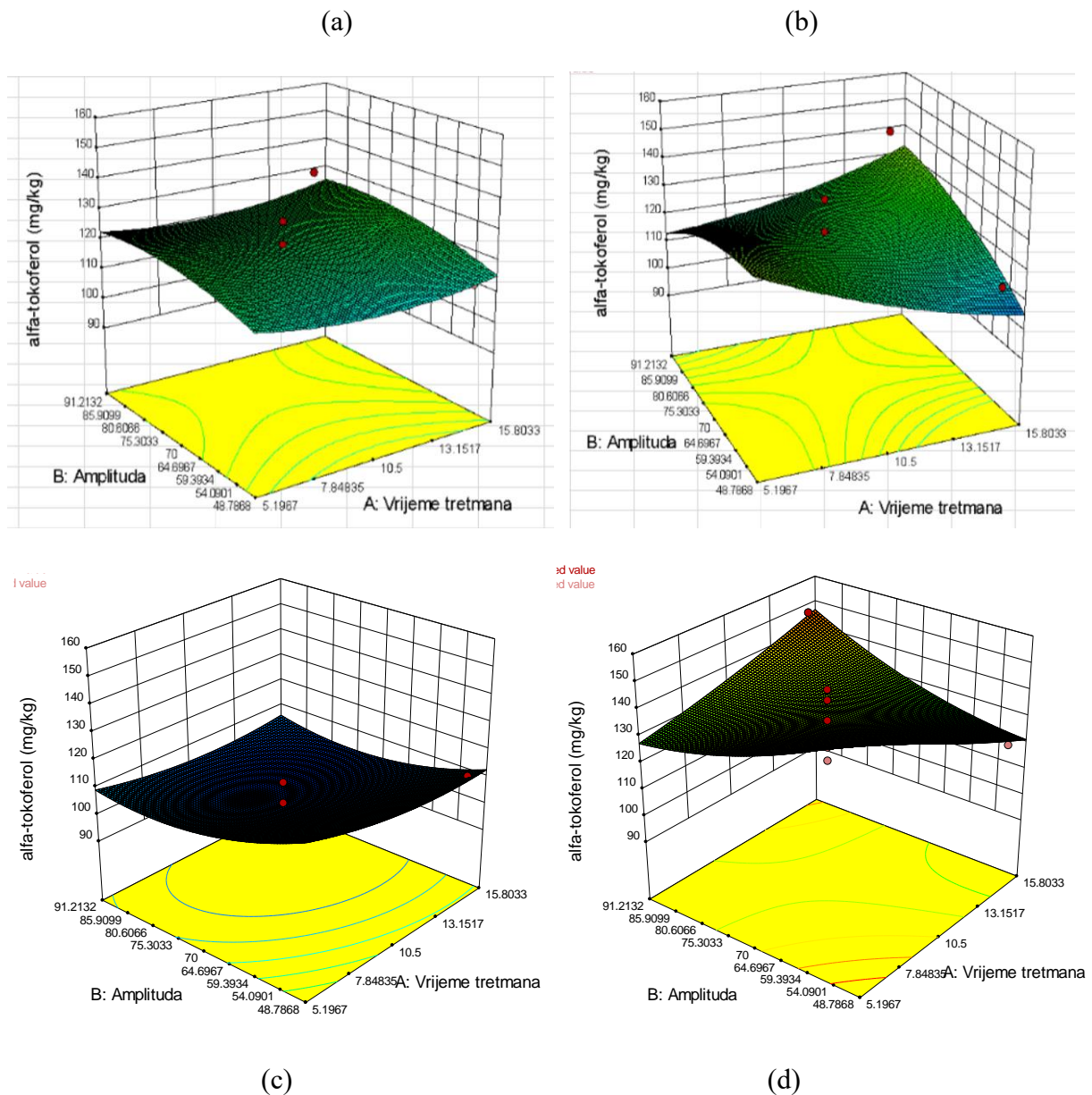
Brzim zagrijavanjem tijesta masline moguće je i smanjenje koncentracije  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferola u odnosu na primjenu standardnog postupka. Dužina tretmana i porast temperature nisu utjecali na parametre kvalitete ulja, isto tako primjena ultrazvuka nije promijenila lipidni sastav, sastav fenola, tokoferola i pigmenta, no povećanjem temperature došlo je do smanjenja koncentracije hlapljivih spojeva (Pérez i sur., 2021; Clodoveo, 2019; Clodoveo i sur., 2014). Prema rezultatima u ovome radu svi uzorci sorti su tretirani prema istim uvjetima, no udjeli  $\alpha$ -tokoferola se razlikuju ovisno o sorti, gdje zaključujemo da upravo ona ima najveći utjecaj na koncentraciju tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima.

#### 4.2.1. Modeliranje utjecaja UZV-a

**Tablica 11.** Statistički prikaz utjecaja vremena tretmana, amplitude i sorte na koncentraciju tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju pri tretmanu UZV-om

Izvor	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
					Prob > F
Model	7549.28	23	328.229	5.603	0.000
A-Vrijeme tretmana	224.53	1	224.534	3.833	0.060
B-Amplituda	19.20	1	19.200	0.328	0.572
C-Sorta	4944.04	3	1648.012	28.131	0.000
AB	643.26	1	643.256	10.980	0.003
AC	70.11	3	23.370	0.399	0.755
BC	342.51	3	114.169	1.949	0.145
A <sup>2</sup>	187.19	1	187.191	3.195	0.085
B <sup>2</sup>	12.49	1	12.494	0.213	0.648
ABC	421.30	3	140.434	2.397	0.089
A <sup>2</sup> C	22.69	3	7.564	0.129	0.942
B <sup>2</sup> C	639.13	3	213.045	3.637	0.025
Residual	1640.35	28	58.584		
Nedostatak modela	554.65	12	46.221	0.681	0.747
Std. Dev.	7.65		R-kvadrat	0.8215	
Srednje	121.78		Prilgođeni R-kvadrat	0.6749	
C.V. %	6.29		Predviđeni R-kvadrat	0.3784	

U tablici 11 prikazani su utjecaj vremena tretmana i amplitude na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Provedena je analiza varijance (ANOVA), sa 95 %-tnom značajnosti ( $p \leq 0,05$ ). P vrijednost predstavlja značajnost utjecaja za pojedini faktor kao što su sorta, amplituda i vrijeme tretmana. Statistički gledano sorta ima visok utjecaj na udio  $\alpha$ -tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju ( $p < 0,001$ ). Vrijeme i amplituda nemaju statistički gledano značaj na udio tokoferola u djevičanskom maslinovom ulju ( $p > 0,05$ ). Međusobne interakcije između vremena tretmana i amplitude imaju veliki statistički značaj na udio  $\alpha$ -tokoferol.



**Slika 4.** Dijagram utjecaja vremena tretmana (s) i amplitude (m) na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola u različitim sortama djevičanskih maslinovih ulja: rosulja (a), bjelica (b), oblica (c) i levantinka (d)

Dijagram a na slici 4 predstavlja utjecaj vremena tretmana i amplitude na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola kod sorte rosulja. Iz ovog prikaza uočavamo da povećanjem amplitude dolazi do povećanja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola, dok povećanjem vremena tretmana dolazi do smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola. Iz navedene jedndžbe vidimo opisane promjene: Rosulja =  $88,58087119 - 3,549747192 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) + 1,228237432 \cdot (\text{amplituda}) + 0,009875 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{amplituda}) + 0,1400081929 \cdot (\text{vrijeme tretmana})^2 - 0,00817175897 \cdot (\text{amplituda})^2$ .



Dijagram b također predstavlja utjecaj vremena tretmana i amplitude u ovom slučaju na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola sorte bjelica. Iz dijagrama uočavamo da povećanjem amplitude kod kraćeg vremena tretmana, slično kao i kod oblice, dolazi do snižavanja koncentracija  $\alpha$ -tokoferola, dok kod dužeg vremena tretmana povećanjem ovoga čimbenika dolazi do povećanja njegove koncentracije. Navedeni opisi možemo vidjeti i iz jednadžbe: Bjelica =  $161,9883328 - 10,28032106 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) + 0,4073460417 \cdot (\text{amplituda}) + 0,10725 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{amplituda}) + 0,1134516591 \cdot (\text{vrijeme tretmana})^2 - 0,01041381626 \cdot (\text{amplituda})^2$ .

Dijagram c prikazuje utjecaj vremena tretmana i amplitude na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola kod sorte oblica. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se povećanjem vremena tretmana snižava koncentracija  $\alpha$ -tokoferola, te se povećanjem amplitude također snižava koncentracija  $\alpha$ -tokoferola. Oba čimbenika utječu negativno na koncentracije ispitivanog tokoferola, smanjuju ga. Sve opisane promjene vidimo iz jednadžbe: Oblica =  $220,3982374 - 4,301483436 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) - 2,379855141 \cdot (\text{amplituda}) + 0,014875 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{amplituda}) + 0,1254359142 \cdot (\text{vrijeme tretmana})^2 + 0,001417911235 \cdot (\text{amplituda})^2$ .

Dijagram d predstavlja utjecaj vremena i amplitude na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola kod sorte levantinka. Povećanjem vremena tretmana dolazi do znatnog smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola, isto kao i povećanje amplitude koje uzrokuje značajan porast koncentracije ispitivanog tokoferola. Oba čimbenika pokazuju veliki statistički utjecaj na koncentraciju ovoga tokoferola. Sve opisane promjene vidimo iz jednažbe: Levantinka =  $289,7116544 - 10,21168794 \cdot (\text{vrijeme tretmana}) - 2,797759169 \cdot (\text{amplituda}) + 0,121625 \cdot (\text{vrijeme tretmana} \cdot \text{amplituda}) + 0,04408881606 \cdot (\text{vrijeme tretmana})^2 + 0,0105170823 \cdot (\text{amplituda})^2$ .

Prema navedenim podacima u svim sortama koji su tretirani ultrazvukom zamijećene su velike promjene u koncentracijama  $\alpha$ -tokoferola. Čimbenici koji su bili ispitivani vrijeme tretmana i amplituda imaju veliki utjecaj na njegovu koncentraciju. Najveće promjene u koncentraciji zamijećene su kod sorte levantinka, velika odstupanja također pokazuju i sorte bjelica i oblica.

Uz navedena istraživanja treba napomenuti i utjecaj sorte na koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Vidljivo je iz rezultata da najveće koncentracije ovoga tokoferola nalazimo u dalmatinskoj sorti levantinka, dok su kod istarskih sorti te koncentracije znatno niže. Uspoređujući oba tretmana korištena na ovim sortama i dalje dalmatinska sorta ima veću koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola od istarskih.

Prema dobivenim rezultatima o udjelu tokoferola u kontrolnim uzorcima tretiranim UZV-om i PEP-om može se zaključiti da su u svim uzorcima najveće koncentracije  $\alpha$ -tokoferola. Uspoređujući koncentracije  $\alpha$ -tokoferola između svih sorti u oba postupka, vidimo da su  $\alpha$ -tokoferoli u puno većoj koncentraciji kod sorte koja je tretirana ultrazvukom. Sorta levantinka

u oba postupka ima najveću koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola. Općenito koncentracije svih mjerenih tokoferola su puno veće kod sorti tretiranih UZV-om, nego onih tretiranih PEP-om.

Na ovakve rezultate utjecali su brojni čimbenici među kojima možemo izdvojiti miješenje. U tom dijelu procesa dolazi do povećanja udjela slobodnog ulja. Doprinos faze miješanja je u lakšem izdvajanju kapljica ulja te smanjenju viskoznosti maslinovog tijesta (Leone i sur., 2014). Razlika u koncentraciji tokoferola u uzorcima tretiranim PEP-om i UZV-om očituju se u razlikama u proizvodnji. Miješalica na kojoj su proizvedeni uzorci koji su tretirani PEP-om sastavljena je od miješala i vodene kupelji. Dok se kod uzoraka tretiranim UZV-om koristio Abencor sustav koji je razvijen i namijenjen isključivo za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja u laboratorijskim uvjetima. Ovaj sustav sastoji se od mlinskog uređaja koji služi za mljevenje maslina, miješalice u kojem se maslinovo tijesto miješa te dolazi do nastanka sitnih kapljica ulja te njihovo spajanje i centrifuge gdje se odvajaju tekuća i kruta faza. Prednost ovog uređaja očituje se u njegovoj iznimnoj analitičkoj preciznosti, u ispitivanju malih količina uzoraka pošto je namijenjen za laboratorijsku upotrebu te simulaciji stvarnih uvjeta kakvi i jesu u industrijskim pogonima za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja (Ferro i sur., 2023).

## 5.ZAKLJUČCI

Ovaj rad bazirao se na ispitivanju inovativnih tehnologija kao što su primjena ultrazvuka i pulsirajućeg električno polja na udio i sastav tokoferola djevičanskih maslinovih ulja iz autohtonih hrvatskih sorti. Sukladno provedenoj raspravi i dobivenim rezultatima može se zaključiti sljedeće:

Ispitivana djevičanska maslinova ulja autohtonih sorti sadrže najviši udio  $\alpha$ -tokoferola, neovisno o sorti i načinu proizvodnje. Sljedeći najzastupljeniji tokoferol kod većine sorti bio je  $\beta$ -tokoferol, nakon njega  $\gamma$ -tokoferol.  $\delta$ -tokoferol je bio prisutan samo u nekim uzorcima dok kod većine nije detektiran.

1. Sorte tretirane ultrazvukom sadrže više koncentracije  $\alpha$ -tokoferola od onih tretiranih PEP-om što je posljedica uvjeta proizvodnje. Sorte tretirane PEP-om proizvedene su pomoću mješalice, dok su uzorci tretirani UZV-om primjenjuje Abencore sustav.
2. Utjecaj jakosti električnog polja pri predtretmanu PEP-om imao je negativan utjecaj na udio  $\alpha$ -tokoferola kod sorti oblica i levantinka, na sortu rosulja nije imao veliki značaj, dok je kod sorte bjelica djelovao pozitivno. Vrijeme tretmana imalo je pozitivan utjecaj na sorte bjelica i oblica, a na sorte rosulja i levantinka nije utjecalo.
3. Utjecaj amplitude pri predtretmanu UZV-om imao je negativan utjecaj na koncentracije  $\alpha$ -tokoferola kod sorti bjelica i oblica, a pozitivan utjecaj kod sorti rosulja i levantinka. Utjecaj vremena tretmana kod svih ispitivanih sorti imao je negativan utjecaj.
4. Ulja proizvedena iz dalmatinskih sorti (levantinka) imala su značajno veći udio  $\alpha$ -tokoferola u oba provedena tretmana, nego ulja proizvedena iz istarskih sorti.
5. Inovativne tehnologije imaju veliki potencijal u proizvodnji djevičanskih maslinovih ulja. Prema svemu navedenom UZV i PEP tehnologije pozitivno utječu na sastav i udio tokoferola kao i na samu nutritivnu vrijednost ulja, ne utječući negativno na kvalitetu samoga maslinovoga ulja.

## 6. LITERATURA

Acar A, Arslan D (2017) Some technological pretreatments applied during olive oil extraction: impacts on quality parameters and minor constituents. *Glob J Agric Innov Res Dev* **4**, 47-57. <https://doi.org/10.15377/2409-9813.2017.04.6>

Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G (2008) Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.* **109**, 743-754. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.034>

Barouh N, Bourlieu-Lacanal C, Figueroa-Espinoza MC, Durand E, Villeneuve P (2021) Tocopherols as antioxidants in lipid-based systems: The combination of chemical and 29 physicochemical interactions determines their efficiency. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **21**, 642-688. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12867>

Bejaoui MA, Beltran G, Sánchez-Ortiz A, Sanchez S, Jimenez A (2016) Continuous high power ultrasound treatment before malaxation, a laboratory scale approach: Effect on virgin olive oil quality criteria and yield. *Eur J Lipid Sci Tech* **118**, 332-336. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500020>

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. *An overview of the last decade. Molecules* **12**, 1679–1719. <https://doi.org/10.3390/12081679>

Boskou D (2002) Olive oil. U: Gunstone FD (ured.) *Vegetable oils in food technology: Composition properties and uses*, Oxford/Copenhagen/Victoria/Berlin/Paris, str. 244-277.

Boskou D (2006) *Olive oil chemistry and technology*, 2<sup>nd</sup> ed., Champaign, Illinois: AOCS Press

Boskou D (2008) Phenolic compounds in olives and olive oil. U: Boskou D (ured.) *Olive oil: Minor constituents and health*, CRC Press, Boca Raton, str. 12-36.

Boskou D (2011) Olive oil. U: Gunstone FD (ured.) Vegetable oils in food technology Composition, properties and uses, 2 izd., Blackwell Publishing, Chichester/Oxford/Ames, str. 243-272

Brigelius-Flohé R (2006) Bioactivity of vitamin E. *Nutr Res Rev* **19**, 174-186. <https://doi.org/10.1017/S0954422407202938>

Brkić Bubola K, Koprivnjak O, Sladonja B, Škevin D, Belobrajčić I (2012) Chemical and sensorial changes of Croatian monovarietal olive oils during ripening. *Eur J Lipid Sci Technol* **114**, 1400-1408. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200121>

Caporaso N (2016) Virgin olive oils: Environmental conditions, agronomical factors and processing technology affecting the chemistry of flavor profile. *J Food Chem Nanotechnol* **2**, 21-31. <http://dx.doi.org/10.17756/jfcn.2016-007>

Carretto, MV, Cuerdo MP, Dirienzo MG, Di Vito MV (2002) Aceite de oliva: Beneficios en la salud. *Inevenio* **5**, 141-149.

Cecchi T, Alfei B (2013) Volatile profiles of Italian monovarietal extra virgin olive oils via HS-SPME-GC-MS: Newly identified compounds, flavors molecular markers, and terpenic profile. *Food Chem* **141**, 2025–2035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.090>

Cecchi L, Migliorini M, Mulinacci N (2021) Virgin olive oil volatile compounds: Composition, sensory characteristics, analytical approaches, quality control, and authentication. *J Agr Food Chem* **69**, 2013-2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07744>

Chávez Ramos K, Olguín Contreras LF, del Pilar Cañizares Macías M (2019) Lab-on-a-chip extraction of phenolic compounds from extra virgin olive oil. *Food Anal Method* **13**, 21-34. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01492-w>

Clodoveo ML (2013) An overview of emerging techniques in virgin olive oil extraction process: Strategies in the development of innovative plants. *J Agr Eng* **44**, <https://doi.org/10.4081/jae.2013.302>

Clodoveo ML, Dipalmo T, Schiano C, La Notte D, Pati S (2014) What's now, what's new and what's next in virgin olive oil elaboration systems A perspective on current knowledge and future trends. *J Agr Eng* **45**, 49-59. <https://doi.org/10.4081/jae.2014.193>

Clodoveo ML (2019) Industrial ultrasound applications in the extra-virgin olive oil extraction process: History, approaches, and key questions. *Foods* **8**, 121. <https://doi.org/10.3390/foods8040121>

Criado MN, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ (2008) Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chem* **110**, 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.075>

Državi zavod za statistiku, Statistički godišnjak RH, <http://www.dzs.hr/> Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Deiana M, Rosa A, Cao CF, Pirisi FM, Bandino G, Dessi MA (2002) Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of  $\alpha$ -tocopherol concentration. *J Agric Food Chem* **50**, 4342-4346. <https://doi.org/10.1021/jf020033t>

Del Carlo M, Ritelli E, Procida G, Murmura F, Cichelli A (2006) Characterization of extra virgin olive oils obtained from different cultivars. *Pomologia Croatica*, **12**, 29-4. <https://hrcak.srce.hr/3645>

Di Giovacchino L (2013) Technological aspects. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of olive oil: Analysis and properties, 2 izd., New York, str. 57-96. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5371-4>

Doosselaere P (2013) Production of oils. U: Hamm W, Hamilton RJ, Calliauw G (ured.) Edible oil processing, 2 izd., John Wiley & Sons, Oxford/Chichester/Hoboken, str. 55-96.

Espadas-Aldana G, Vialle C, Belaud JP, Vaca-Garcia C, Sablayrolles C (2019) Analysis and trends for Life Cycle Assessment of olive oil production. *Sustain Prod Consum* **19**, 216-230. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2019.04.003>

Espejo Maqueda, Jesús (2005) Estudio anlítico comparado entre el aceite de acebuchina y el aceite de oliva virgen. Doktorska disertacija, Sveučilište u Sevilli, Španjolska.

Ferro MD, Cabrita MJ, Herrera JM, Duarte MF (2023) A New Laboratory Scale Olive Oil Extraction Method with Comparative Characterization of Phenolic and Fatty Acid Composition. *Foods* **12**, 380. <https://doi.org/10.3390/foods12020380>

Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N (2012) Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *Int J Mol Sci* **13**, 3291-3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>

Giuffrida D, Salvo F, Salvo A, Cossignani L, Dugo G (2011) Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various Italian olive varieties. *Food Chem.*, **124**, 1119–1123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.012>

Godena S, Damijanić K, Milotić A (2009) Morfološke karakteristike masline sorte Rosinjola u Istri. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **15**, 27-36. <https://hrcak.srce.hr/50634>

Goldsmith CD, Stathopoulos CE, Golding JB, Roach PD (2014) Fate of the parolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *International Food Research Journal*.

Gugić M (2010) Biološka vrijednost i kvaliteta ulja masline sorte Oblica u odnosu na područje uzgoja. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

Gullón P, Gullón B, Astray G (2020) Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International* **137**, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109683>

Hocaoglu, S. M., Haksevenler, B. H. G., Basturk, I., Talazan, P., Aydoner, C. (2018.) Assessment of technology modification for olive oil sector through mass balance: A case study for Turkey. *J Clean Prod* **188**, 786-795. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.020>

HRN EN ISO 9936:2016 Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje sadržaja tokoferola i tokotrienola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Huang K, Tian H, Gai L, Wang J (2012) A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. *J Food Eng* **111**, 191-207. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.007>

Inarejos-García AM, Santacatterina M, Salvador MD, Fregapane G, Gómez-Alonso S (2010) PDO virgin olive oil quality-Minor components and organoleptic evaluation. *Food Res. Int.* **43**, 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.027>

International Olive Council (2012) World Olive Figures – Production and consumption, February [www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-oliveoil-figures](http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-oliveoil-figures).

Jiménez A, Beltrán G, Uceda M (2007) High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrason Sonochem* **14**, 725-731. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.006>

Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ i sur. (2020) Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* **9**, 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>

Jones A, Smith B (2022). Health benefits and sensory properties of virgin olive oil. *Food Chemistry*, **367**, 132655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132655>

Jukić Špika M, Kraljić K, Škevin D (2016) Tocopherols: Chemical structure, bioactivity, and variability in Croatian virgin olive oils. U: Boskou D, Clodoveo M (ured.) Products from olive tree, *InTech*, Rijeka, str. 317-329.

Kaftan A, Elmaci Y (2011) Aroma characterization of virgin olive oil from two Turkish olive varieties by SPME/GC/MS. *Int J Food Prop* **14**, 1160-1169. <https://doi.org/10.1080/10942910903453371>

Kalogianni EP, Georgiou D, Hasanov JH (2019) Olive oil processing: Current knowledge, literature gaps, and future perspectives. *J Am Oil Chem Soc* **96**, 481-507. <https://doi.org/10.1002/aocs.12207>

Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC (2008) Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Bio* **7**, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>

Kiritsakis A, Sakellaropoulos N (2017) Olive fruit harvest and processing and their effects on oil functional compounds. U: Kiritsakis A, Shahidi F (ured.) Olives and olive oil as functional foods: Bioactivity, chemistry and processing, John Wiley & Sons, Chichester/ Hoboken, str. 127-146.



Koprivnjak O, Vrhovnik I, Hladnik T, Prgomet Ž, Hlevnjak B, Matejić Germek V (2012) Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža, Istarska bjelica, Leccino i Rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, 172-178.

Lee MJ, Feng W, Yang L, Chen YK, Chi E, Liu A, Yang CS (2018) Methods for efficient analysis of tocopherols, tocotrienols and their metabolites in animal samples with HPLC-EC, *J. Food Drug Anal* **26**, 318-329. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.012>

Leone A, Tamborrino A, Romaniello R, Zagaria R, Sabella E (2014) Specification and implementation of a continuous microwave-assisted system for paste malaxation in an olive oil extraction plant. *Biosyst Eng* **125**, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.06.017>

Leone A, Tamborrino A, Esposto S, Berardi A, Servili M (2022) Investigation on the effects of a pulsed electric field (PEF) continuous system implemented in an industrial olive oil plant. *Foods* **11**, 2758. <https://doi.org/10.3390/foods11182758>

Lerma-García, MJ, Lantano C, Chiavaro E, Cerretani L, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF (2009) Classification of extra virgin olive oils according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Res. Int.* **42**, 1446–1452. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.027>

Luengo E, Álvarez I, Raso J (2013). "Improving the pressing extraction of virgin olive oil by pulsed electric fields." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **17**, 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>

Lorent-Martínez EJ, Fernández-de Córdova ML, Ortega-Barrales P, Ruiz-Medina A (2014) Quantitation of metals during the extraction of virgin olive oil from olives using ICP-MS after microwave-assisted acid digestion. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 1823-1830. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2511-5>

Lukić I, Krapac M, Horvat I, Godena S, Kosić U, Bubola KB (2017) Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. *Lwt* **87**, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.082>

Lukić, M., Žanetić, M., Ljubenković, I., Lukić, I., Koprivnjak, O., & Bubola, K. B. (2017). "Complex interactive effects of polyphenols and pigments on oxidative stability of virgin olive oil." *Food Chemistry* **232**, 715-723.

Malheiro R, Casal S, Teixeira H (2013) Effect of Olive Leaves Addition during the Extraction Process of Overmature Fruits on Olive Oil Quality. *Food Bioprocess Technol* **6**, 509–521. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0719-z>

Medouni-Haroune L, Zaidi F, Medouni-Adrar S, Kecha M (2018) Olive pomace: From an olive mill waste to a resource, an overview of the new treatments. *J Crit Rev* **5**, 1-6. <http://dx.doi.org/10.22159/jcr.2018v5i5.28840>

Međunarodno vijeće za masline (2012) Olive oil and Health. IOC - International Olive Council, <<https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#country>> Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Ministarstvo poljoprivrede RH (2017) Maslinarstvo. <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute teme/poljoprivreda-173/poljoprivreda-175/maslinarstvo/194>. Pristupljeno 28. kolovoza 2024.

Nardella M, Moschetti R, Nallan Chakravartula SS, Bedini G, Massantini R (2021) A review on high-power ultrasound-assisted extraction of olive oils: effect on oil yield, quality, chemical composition and consumer perception. *Foods* **10**, 2743. <https://doi.org/10.3390/foods10112743>

Niki E, Abe K (2019) Vitamin E: Structure, Properties and Functions. In: Niki E., editor. *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits*. Royal Society of Chemistry; 1–11. <https://doi.org/10.1039/9781788016216-00001>

Özcan MM, Al Juhaimi F, Uslu N, Ghafoor K, Ahmed IAM, Babiker EE (2019) The effect of olive varieties on fatty acid composition and tocopherol contents of cold pressed virgin olive oils. *J Oleo Sci* **68**, 307-310. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18251>

Pérez AG, León L, Pascual M, Belaj A, Sanz C (2019) Analysis of Olive (*Olea Europaea L.*) Genetic Resources in Relation to the Content of Vitamin E in Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **8**, 242. <https://doi.org/10.3390/antiox8080242>

Pérez M, López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Lamuela-Raventós RM, Martín-Belloso O (2021) Impact of emerging technologies on virgin olive oil processing, consumer acceptance, and the valorization of olive mill wastes. *Antioxidants* **10**, 417. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>

Peri C (2014) Extra-virgin olive oil storage and handling. U: Peri C (ured.) The extra-virgin olive oil handbook, John Wiley & Sons, Oxford/Chichester/Hoboken, str. 165-178.

Petrakis C (2006) Olive oil extraction. U: Boskou D (ured.) Olive oil chemistry and technology, 2 izd., AOCS Publishing, New York, str. 191-225.

Poljuha D, Sladonja BS, Milotic A (2008) DNA fingerprint of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Sci. Hort* **115**, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.018>

Raut PP, Charde SY (2014) Simultaneous estimation of levodopa and carbidopa by RP-HPLC using a fluorescence detector: its application to a pharmaceutical dosage form. *Luminescence* **29**(7), 762-771. <https://doi.org/10.1002/bio.2618>

Reuhs BL (2017) High-performance liquid chromatography. *Food analysis*, 213-226. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13)

Rizvi S, Raza SZ, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F (2014) The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* **14**, 157-165.

Samaniego-Sánchez C, Quesada-Granados JJ, López-García de la Serrana H, López-Martínez MC (2010)  $\beta$ -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *J Food Compost Anal* **23**, 671- 676. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.010>

Samaram S, Mirhosseini H, Tan CP, Ghazali HM, Bordbar S, Serjouie A (2015) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chem* **172**, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.068>

Seppanen CM, Song Q, Saari Csallany A (2010) The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *J Am Oil Chem Soc* **87**, 469–481. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1526-9>

Servili M, Taticchi A, Esposto S, Sordini B, Urbani S (2012) Technological aspects of olive oil production. U: Muzzalupo I (ured.) Olive germplasm - The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy, *InTechOpen*, Rijeka, str. 151-172.

Shendi EG, Ozay DS, Ozkaya MT, Ustunel NF (2018) Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *OCL - Oilseeds fats Crops Lipids* **25**, 602. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018052>

Souilem S, El-Abbassi A, Kiai H (2017) Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges in Olive mill waste. In: Galanakis CM, editor. London: *Academic Press*, 1-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00001-7>

Šarolić M, Gugić M, Marijanović Z, Šuste M (2014) Virgin olive oil and nutrition. *Journal food in health and disease* **3**, 38-43. <https://hrcak.srce.hr/126239>

Šarolić, M (2014) Characterisation of Oils Derived from Dalmatian Varieties of Olives. Doctoral Thesis, Faculty of Food Technology, Osijek, Croatia <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:450916>

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

Šarolić M, Gugić M, Tuberoso C, Jerković I, Šuste M, Marijanović Z (2014b) Volatile Profile, Phytochemicals and Antioxidant Activity of Virgin Olive Oils from Croatian Autochthonous Varieties Mašnjača and Krvavica in Comparison with Italian Variety Leccino. *Molecules* **19**, 881–895. <https://dx.doi.org/10.3390/molecules19010881>

Tarapoulouzi M, Agriopoulou S, Koidis A, Proestos C, Enshasy HAE, Varzakas T (2022) Recent advances in analytical methods for the detection of olive oil oxidation status during storage along with chemometrics, authenticity and fraud studies. *Biomolecules* **12**, 1180. <https://doi.org/10.3390/biom12091180>

Veneziani G, Sordini B, Taticchi A, Esposto S, Selvaggini R, Urbani S i sur. (2016) Improvement of olive oil mechanical extraction: New technologies, process efficiency, and extra virgin olive oil quality. U: Boskou D, Clodoveo M (ured.) Products from olive tree, InTech, Rijeka, str. 21-42.

Zeiner M, Juranović-Cindrić I, Škevin D (2010) Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. *Eur J Lipid Sci Tech* **112**, 1248-1252. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000006>

Žanetić M, Gugić M (2005) Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. *Pomol Croat* **11**, 31-41. <https://hrcak.srce.hr/1928>

Žanetić M., Gugić M., (2006). Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja, *Pomologia Croatica*, **12**, 159-173. <https://hrcak.srce.hr/4509>

Žanetić M, Štrucelj D, Perica S, Rade D, Škevin D, Serraiocco A (2010) Chemical composition of Dalmatian virgin olive oils from autochthonous olive cultivars Oblica, Lastovka and Levantinka. *Riv Ital Sostanze Grasse* **86**, 24-33.

Žanetić M, Jukić Špika M, Ožić MM, Brkić Bubola K (2021) Comparative study of volatile compounds and sensory characteristics of dalmatian monovarietal virgin olive oils. *Plants* **10**, 1995. <https://doi.org/10.3390/plants10101995>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis