

# Utjecaj skute i tofua na fenole djevičanskog maslinovog ulja određene Fast Blue BB testom

---

**Franjković, Doris**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:089817>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Doris Franjković

**UTJECAJ SKUTE I TOFUA NA FENOLE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA  
ODREĐENE FAST BLUE BB TESTOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Doris Franjković

**UTJECAJ SKUTE I TOFUA NA FENOLE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA  
ODREĐENE FAST BLUE BB TESTOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.

Diplomski rad obranjen je dana 6.7.2023. na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing. (predsjednica Povjerenstva)
2. izv. prof. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.
3. prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.

Rad sadrži 40 stranica, 12 slika, 5 tablica i 43 literaturna navoda.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh. na nesebično uloženom trudu i vremenu, stručnom vodstvu, strpljenju, motiviranju i udijeljenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Valeriji Majetić Germek, dipl. sanit. ing. i Bojani Lukić, mag. sanit. ing. na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom cijelog obrazovanja!*

## SAŽETAK

Djevičansko maslinovo ulje tradicionalno se koristi kao naljev za konzerviranje različitih vrsta namirnica. Pri tome može doći do migracije i međusobnih interakcija sastojaka kao što su npr. proteini iz skute i tofua te fenolne tvari iz djevičanskog maslinovog ulja, uz promjene u nutritivnim, senzorskim i funkcionalnim svojstvima obiju skupina tvari. Kao indirektni pokazatelj interakcija, u ovom su radu istražene promjene udjela ukupnih fenola djevičanskog maslinovog ulja tijekom njegovog višednevnog kontakta sa skutom i tofuom. Ukupni fenoli određeni su kolorimetrijskom metodom i reagensom visoko specifičnim za ove tvari. Simuliran je tradicionalni postupak čuvanja komadića skute i tofua u naljevu (7, 14 i 21 dan u hladnjaku, uz omjer masa materijal/ulje 1,3). Udio vode u ulju porastao je s početnih 0,06 % na konačnih 0,23 % (kontakt sa skutom) te 0,67 % (kontakt s tofuom). Pokazatelji hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja ulja blago su se ali statistički značajno smanjili, vjerojatno zbog njihovog amfifilnog karaktera i porasta udjela vode u ulju. Do značajnog smanjenja ukupnih fenola u ulju došlo je već nakon sedam dana čuvanja pri  $2 \pm 2$  °C (za 48 % pod utjecajem skute i za 53 % pod utjecajem tofua), a nakon 21 dana za 65 % (utjecaj skute) te za 73 % (utjecaj tofua). Utvrđen je logaritamski pad udjela fenola pod utjecajem tofua ( $R^2 = 0,96$ ) te čvrsta negativna linearna povezanost omjera masa tofu/ulje i udjela fenola u ulju tijekom sedam dana čuvanja pri  $6 \pm 2$  °C ( $r = -0,98$ ). Razlike između materijala vjerojatno proizlaze iz različitih karakteristika i udjela proteina u suhoj tvari, te različitih udjela vode i drugih sastojaka u matriksu hrane. Rezultati pružaju korisne informacije za evaluaciju tradicionalnih postupaka čuvanja hrane u djevičanskom maslinovom ulju kao naljevu, budući da ukazuju na dinamiku interakcija fenola i proteina koje mogu rezultirati smanjenjem bioraspoloživosti i biodostupnosti obiju skupina tvari.

**Ključne riječi:** djevičansko maslinovo ulje, skuta, tofu, interakcije protein-fenol

## SUMMARY

Virgin olive oil is traditionally used as a marinade for the preservation of various types of food. This can lead to migration and mutual interactions of ingredients such as proteins from whey cheese and tofu and phenolic substances from virgin olive oil, with changes in the nutritional, sensory and functional properties of both groups of substances. As an indirect indicator of interactions, this work investigated changes in the proportion of total phenols of virgin olive oil during its several-day contact with whey cheese and tofu. Total phenols were determined using a colorimetric method and a highly specific reagent for these substances. The traditional procedure of keeping pieces of whey cheese and tofu in an infusion was simulated (7, 14 and 21 days in the refrigerator, with a mass ratio of material/oil of 1.3). The proportion of water in the oil increased from the initial 0.06 % to the final 0.23 % (contact with whey cheese) and 0.67 % (contact with tofu). Indicators of hydrolytic and oxidative deterioration of oils decreased slightly but statistically significantly, probably due to their amphiphilic character and the increase in the proportion of water in the oil. A significant reduction of total phenols in the oil occurred after only seven days of storage at  $2 \pm 2$  °C (by 48 % under the influence of whey cheese and by 53 % under the influence of tofu), and after 21 days by 65 % (influence of whey cheese) and by 73 % (influence of tofu). A logarithmic decrease in the proportion of phenol under the influence of tofu ( $R^2 = 0,96$ ) and a strong negative linear relationship between the mass ratio of tofu/oil and the proportion of phenol in oil during seven days of storage at  $6 \pm 2$  °C ( $r = -0,98$ ) were determined. The differences between the materials probably stem from different characteristics and the proportion of protein in the dry matter, and different proportions of water and other ingredients in the food matrix. The results provide useful information for the evaluation of traditional food preservation procedures in virgin olive oil as an infusion, since they indicate the dynamics of phenol-protein interactions that can result in a decrease in the bioaccessibility and bioavailability of both groups of substances.

**Key words:** virgin olive oil, whey cheese, tofu, protein-phenol interactions

## SADRŽAJ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Skuta .....   | 2         |
| 1.2. Tofu .....  | 3         |
| 1.3. Djevičansko maslinovo ulje .....  | 4         |
| 1.4. Fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju .....  | 5         |
| 1.5. Interakcije između proteina i fenolnih tvari .....  | 8         |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>  | <b>10</b> |
| 3.1. Materijali .....  | 10        |
| 3.1.1. Skuta .....   | 10        |
| 3.1.2. Tofu .....  | 10        |
| 3.1.3. Djevičansko maslinovo ulje .....  | 11        |
| 3.1.4. Kemikalije i reagensi .....   | 11        |
| 3.1.5. Uređaji i pribor .....  | 11        |
| 3.2. Metode .....  | 12        |
| 3.2.1. Priprema materijala .....   | 12        |
| 3.2.2. Određivanje fenola u djevičanskom maslinovom ulju .....   | 13        |
| 3.2.2.1. Priprema FBBB reagensa .....  | 14        |
| 3.2.2.2. Izrada baždarnog pravca .....   | 14        |
| 3.2.3. Određivanje slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju .....                            | 15        |
| 3.2.4. Određivanje $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju .....                                | 16        |
| 3.2.5. Određivanje udjela vode u djevičanskom maslinovom ulju .....  | 16        |
| 3.2.6. Određivanje udjela vode u skuti i tofuu .....   | 17        |
| 3.2.7. Statistička obrada podataka .....   | 17        |
| <b>4. REZULTATI .....</b>  | <b>18</b> |
| 4.1. Udio vode u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom .....                      | 18        |
| 4.2. Udio slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom ..... | 19        |
| 4.3. $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom .....          | 20        |
| 4.4. Udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom .....                    | 22        |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>   | <b>27</b> |
| 5.1. Udio vode u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom .....                      | 27        |
| 5.2. Udio slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom ..... | 27        |



|  |           |
|--|-----------|
| 5.3. Vrijednosti $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom..... | 28        |
| 5.4. Udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom ..                         | 29        |
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>Popis tablica .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>Popis slika.....</b>  | <b>40</b> |

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Ljudi su od davnina na različite načine konzervirali hranu kako bi je mogli konzumirati tijekom cijele godine (Sicari i sur., 2021). U mediteranskim zemljama tradicionalno se kao prirodni konzervans koristi djevičansko maslinovo ulje. Djevičansko maslinovo ulje usporava kvarenje jer smanjuje izloženost hrane kisiku, a ujedno je obogaćuje prirodnim antioksidansima, uglavnom fenolima iz skupine sekoiridoida. Na taj način može se konzervirati širok spektar različitih proizvoda. Najčešće su to riblji proizvodi ili sezonsko povrće, ali mogu se konzervirati i mliječni proizvodi poput sira (Sicari i sur., 2021; Klisović i sur., 2022).

U Francuskoj se tradicionalni sir „Picodon“ čuva u maslinovom ulju sa začinima radi usporavanja zrenja te kako bi se mogao konzumirati mjesecima kasnije (Walker, 2003). „Ladotyri“ (grč. *ladi* = maslinovo ulje, grč. *tyri* = sir) je grčki tvrdi sir konzerviran u maslinovom ulju. Najpoznatija vrsta je „Ladotyri Mytilinis“ koji se proizvodi na otoku Lezbosu i nosi zaštićenu oznaku izvornosti (Da Cruz, Vieira, 2017; Donnelly, 2016). U Hrvatskoj se spominje „brački sir iz maslinovog ulja“ koji se do dva mjeseca skladišti u posudama s ekstra djevičanskim maslinovim uljem. Nakon vađenja iz posuda, povremeno se premazuje maslinovim uljem da bi se zaštitio od plijesni, ali i stvorio sjajnu i meku koricu (Pavičić, 2006).

Međutim, između maslinovog ulja i namirnice koja se konzervira može doći do migracije sastojaka i međusobnih interakcija. Sicari i sur. (2021) izvijestili su da je djevičansko maslinovo ulje koje su koristili kao medij za konzerviranje sušenih rajčica, nakon 6 mjeseci skladištenja sadržavalo fitokemikalije iz rajčica. U istraživanju Klisović i sur. (2022), dvije vrste zrelih kazeinskih sireva i jedan albuminski sir (skuta) skladišteni su u djevičanskom maslinovom ulju tijekom dva mjeseca te je uočena ubrzana hidrolitička i oksidacijska razgradnja maslinovog ulja. Također, smanjio se udio fenolnih tvari u maslinovom ulju, što prema autorima upućuje na njihovu interakciju s proteinima iz sira.

## 1.1. Skuta

Skuta je tradicionalni hrvatski proizvod koji se dobiva od sirutke tj. nusprodukta u proizvodnji sira (Antunac i sur., 2011). Naziva se još i albuminski sir ili sir od sirutke i spada u skupinu mekih sireva. Uglavnom je blagog, slatkog okusa, a boja joj varira od bijele do svijetlih nijansi žućkaste boje (Tratnik i Božanić, 2012).

Tehnološki proces proizvodnje skute temelji se na zagrijavanju sirutke i koagulaciji proteina. Svježa sirutka zagrijava se odmah nakon sirenja ili se čuva do tri dana zbog postizanja kiselosti. Kako bi se proteini sirutke bolje izdvojili, zakiseljavanje se provodi dodatkom kisele sirutke, limunske ili octene kiseline. Sirutka se postupno zagrijava u kadi za sirenje uz neprestano miješanje. Može se dodati do 10 % punomasnog ili obranog mlijeka radi bolje kvalitete i većeg prinosa skute. Koagulacija proteina sirutke počinje na 70 °C pri čemu nastaje gusta pjena koju je potrebno odstraniti. Temperatura se povećava te se sirutka zagrijava 10-20 min na 90-95 °C što dovodi do lomljenja gruša. Tada se gruša vadi iz sirne kade pomoću cjedila i prebacuje u kalupe ili sirne maramice. U kalupima cijedenje traje 4-6 h, a u sirnim maramicama 6-8 h. Proces soljenja može se provesti tijekom zagrijavanja ili tijekom cijedenja sirutke (Antunac i sur., 2011; Tratnik i Božanić, 2012).

Skuta ima visoku prehrambenu vrijednost jer su proteini sirutke lako probavljivi i imaju visok stupanj iskorištenja u organizmu. U sirutku prelazi 50 % suhe tvari mlijeka. Voda čini najveći dio sirutke (oko 94 %), a u suhoj tvari nalaze se laktoza (oko 75 %), proteini (oko 14 %) te mliječna mast i mineralne tvari (oko 11 %) (Antunac i sur., 2011). Sirutkini proteini ili proteini mliječnog seruma zauzimaju 18-20 % ukupnih proteina mlijeka, a čine ih  $\beta$ -laktoglobulini (50 %),  $\alpha$ -laktoalbumini (22 %), imunoglobulini (12 %), proteaze-peptoni (10 %) i albumini krvnog seruma (5 %). Najzastupljeniji je  $\beta$ -laktoglobulin koji se sastoji od dva peptidna lanca, od kojih svaki sadrži 162 aminokiseline, jednu -SH skupinu i dvije (-S-S-) veze.  $\alpha$ -laktoalbumin sastoji se od jednog lanca sa 123 aminokiseline i 4 stabilne disulfidne veze (S-S). Proteini sirutke imaju veću biološku vrijednost od kazeina (glavnog proteina mlijeka) zbog većeg udjela aminokiseline lizina i tioaminokiselina. Osim toga, bioiskoristivosti proteina u organizmu doprinosi i omjer aminokiselina cisteina i metionina, koji je u proteinima sirutke oko 10 puta veći od onog u kazeinu. Proteini sirutke hidrofilniji su od kazeina te su stoga otporniji na utjecaj enzima i kiselina tijekom koagulacije mlijeka. Međutim, većina proteina sirutke osjetljiva je na visoke temperature pa oni denaturiraju pri temperaturi većoj od 60 °C. Sastav skute može biti vrlo varijabilan s obzirom na vrstu sirutke koja se koristi kao sirovina i

način proizvodnje (Tratnik i Božanić, 2012). Osim proteina, skuta je dobar izvor nezasićenih masnih kiselina (oleinske i linolne) te kalija (Tudor Kalit, 2019).

## 1.2. Tofu

Tofu je tradicionalni istočnjački proizvod od soje koji potječe iz Kine, gdje se proizvodi već više od dvije tisuće godina (Shalini i sur., 2021). Danas je stekao popularnost diljem svijeta zbog svoje nutritivne kvalitete i zdravstvenih dobrobiti (Jooyandeh, 2011). Također, učestala je namirnica u vegetarijanskoj prehrani jer je jeftin izvor biljnog proteina visoke kvalitete (Pal i sur., 2019).

Tehnološki proces proizvodnje tofua započinje namakanjem očišćenih zrna soje u vodi 9-10 h na 22 °C ili 4-6 h na 32 °C. Kada zrna nabubre, voda se baca i zamjenjuje svježom u omjeru vode i soje 10:1. Zrna se zatim sitno melju pa filtriraju pri čemu nastaje sojino mlijeko. Slijedi kuhanje mlijeka i dodavanje koagulansa (npr. kalcijev i magnezijev klorid ili sulfat, limunska kiselina, glukono-delta-lakton) koji uzrokuje koagulaciju proteina u sojinom mlijeku pri čemu se izdvaja gruš. Sljedeći korak je prešanje. Gruš se stavlja u drvenu kutiju obloženu tkaninom za filtriranje te pritišće utegom kako bi voda istekla kroz rupe na kutiji. Kada otjecanje prestane, kutija se stavlja u spremnik s vodom, a zatim preokreće kako bi tofu ispao iz kalupa. Nakon kratkog odležavanja u vodi, tofu se reže na prikladne veličine i oblike za prodaju (Shalini i sur., 2021; Macrae i sur., 1993).

Tekstura tofua može biti mekana, tvrda ili svilenkasta (Mateljan, 2018). Rezervni proteini soje, glicinin (11S) i  $\beta$ -konglicinin (7S), utječu na formiranje trodimenzionalne mrežne strukture tofua, a posljedično tome i na teksturu tofua (Shalini i sur., 2021). Glicinin (11S) je heksamer sastavljen od kiselih i bazičnih peptida povezanih disulfidnim vezama, a  $\beta$ -konglicinin (7S) trimer koji se sastoji od podjedinica  $\alpha$ ,  $\alpha'$  i  $\beta$ . Različite sorte soje imaju različit sastav i omjer proteina 11S/7S. Veći udio 11S proteina rezultira tvrdim tofuom (Guan i sur., 2021).

Tofu je namirnica s visokim udjelom proteina, a obuhvaća svih devet esencijalnih aminokiselina. Sadrži brojne vitamine (A, C, D, E, K vitamin te vitamine B kompleksa: tiamin, riboflavin, niacin, pantotenska kiselina, biotin, folna kiselina, piridoksin i kobalamin), minerale (kalcij, bakar, selen, fosfor, kalij, magnezij, željezo, cink, mangan) i fitonutrijenate (izoflavonidi, fenolne kiseline, fitoaleksini, fitosterol, saponini) (Mateljan, 2018; Pal i sur., 2019). Zbog brojnih hranjivih tvari, tofu ima višestruke blagodati za zdravlje. Uključivanje

tofua u prehranu smanjuje rizik od raznih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, hipertenziju, dijabetes, osteoporozu i karcinom (Shalini i sur., 2021; Jooyandeh, 2011). Izoflavoni iz soje smanjuju razinu kolesterola čime se smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Također, djeluju antikancerogeno i protuupalno. Antocijani djeluju kao antioksidansi i antidijabetici, a utječu na prevenciju Alzheimerove i kardiovaskularnih bolesti (Chen i sur., 2023). S druge strane, tofu može uzrokovati neke neželjene učinke na zdravlje. Naime, soja je alergen, a oksalati i goitrogene supstance (ometaju proizvodnju hormona štitnjače) mogu predstavljati problem za pojedince (Mateljan, 2018).

Budući da je tofu po udjelu makronutrijenata i konzistenciji sličan skuti, ali uz kvalitativno različit sastav pojedinih makronutrijenata, on predstavlja prikladan materijal za usporedbu utjecaja skute na fenole djevičanskog maslinovog ulja.

### **1.3. Djevičansko maslinovo ulje**

Prema Uredbi EU 1308/2013 o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda, djevičansko maslinovo ulje dobiva se iz ploda masline (*Olea europea* L.) bez uporabe pomoćnih kemijskih sredstava, koristeći isključivo mehaničke ili fizikalne postupke (pranje, centrifugiranje, dekantacija, filtracija) koji ne dovode do promjene sastojaka ulja. Prvi korak u procesu proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja je priprema sirovine. Plodovi masline čiste se od grančica i lišća te peru vodom da se ukloni zemlja i ostale nečistoće. Tako pripremljeni plodovi, melju se kamenim ili metalnim mlinovima da se iz stanica usplođa oslobodi što više ulja. U tom procesu nastaje maslinovo tijesto koje se miješa kako bi se razbila emulzija i kapljice ulja bolje povezale. Slijedi ekstrakcija ulja iz maslinovog tijesta koja se može provesti na tri načina: prešanjem, centrifugiranjem ili procjeđivanjem. Ekstrakcijom se dobiva uljni mošt, tj. mješavina ulja i biljne vode. Vertikalnim centrifugama iz uljnog mošta se izdvaja biljna voda i čvrste čestice, a ostaje svježe ulje. Dobiveno ulje mutno je zbog zaostalih čestica biljnog tkiva i kapljica biljne vode, koji se s vremenom talože na dnu spremnika. Talog se uklanja redovitim pretakanjem ili se ulje podvrgava filtriranju. Nakon bistrenja, ulje se najčešće puni u boce od tamnog stakla kako bi bilo zaštićeno od svjetlosti (Koprivnjak, 2006).

Prema Delegiranoj uredbi EU 2022/2104 o dopuni Uredbe EU 1308/2013, na tržištu se djevičanska maslinova ulja razvrstavaju na temelju fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava u dvije kategorije kvalitete („ekstra djevičansko maslinovo ulje“ i „djevičansko maslinovo

ulje“), dok se u kategoriju „maslinovo ulje lampante“ uvrštavaju ona ulja koja nisu jestiva jer ne udovoljavaju nekom od propisanih minimalnih zahtjeva kvalitete.

Djevičansko maslinovo ulje najviše se proizvodi u mediteranskim zemljama te doprinosi zdravstvenim dobrobitima mediteranske prehrane kao jedan od njenih temeljnih sastojaka tj. kao glavni izvor masti (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Epidemiološka istraživanja dokazala su manju učestalost kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze i pojedinih vrsta karcinoma te dulji životni vijek na području Mediterana. Navedeni zdravstveni učinci djelomično se pripisuju visokom udjelu nezasićenih masnih kiselina (oleinske) i antioksidacijskim svojstvima fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju (Tripoli i sur., 2005).

Djevičansko maslinovo ulje uglavnom se sastoji od triglicerida (97-99 %), a ostatak čine tvari poput fenola, fitosterola, tokoferola i karotena koji su odgovorni za funkcionalna i senzorska svojstva. Maslinovo ulje ima visok sadržaj mononezasićenih masnih kiselina (70-85 %) koje uglavnom čini oleinska kiselina (C18:1). Višestruko nezasićene masne kiseline predstavlja linolna kiselina (C18:2), dok mali udio čine zasićene masne kiseline kao što su palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0). Ovakav lipidni profil, uz visok omjer  $\omega 6/\omega 3$  masnih kiselina, povezan je sa zaštitnim učincima na koronarne, autoimune i upalne poremećaje. Lipofilni pigmenti klorofil i karotenoidi odgovorni su za karakterističnu boju maslinovog ulja (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Tokoferoli su najvažniji lipofilni fenoli u maslinovom ulju jer inhibiraju autooksidacijsko kvarenje ulja. Najzastupljeniji je  $\alpha$ -tokoferol ili vitamin E, a prisutni su još  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  oblici (Pejović i sur., 2014). Od fitosterola najzastupljeniji je  $\beta$ -sitosterol čija je biološka funkcionalnost smanjenje crijevne apsorpcije viška kolesterola (Žanetić i Gugić, 2006). Od ugljikovodika najznačajniji je skvalen, koji ima antikancerogeno djelovanje. Glavnu skupinu antioksidansa u maslinovom ulju čine hidrofilni fenoli (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

#### **1.4. Fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju**

Fenolni spojevi hidrofilnog karaktera u velikoj mjeri utječu na kvalitetu djevičanskih maslinovih ulja. Osim što svojim antioksidacijskim djelovanjem produžuju vijek trajanja ulja, pridonose i njegovim senzorskim svojstvima dajući mu gorčinu i pikantnost (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Koncentracija fenola u maslinovom ulju ovisi o brojnim čimbenicima kao što su sorta masline, regija uzgoja, poljoprivredne tehnike, zrelost ploda, metoda prerade i način skladištenja ulja (Cicerale i sur., 2010).

Hidrofilne fenolne tvari koje se nalaze u sastavu djevičanskog maslinovog ulja prikazane su u tablici 1, dok je struktura glavnih predstavnika skupina prikazana na slici 1. Fenolne kiseline u maslinovom ulju mogu se razvrstati u derivate benzojeve kiseline i derivate cimetine kiseline. Fenolni alkoholi imaju hidroksilnu skupinu vezanu za aromatsku ugljikovodičnu skupinu (Cárdeno i sur., 2013). Od fenolnih alkohola najzastupljeniji su tirosol i hidroksitirosol koji mogu biti prisutni u slobodnom ili esterificiranom obliku. Najčešće su esterificirani elenolnom kiselinom, na koju se veže glukoza pa nastaju glukozidi, tj. sekoiridoidi. Oleuropein je sekoiridoid koji je nastao esterifikacijom hidroksitirosola enolnom kiselinom s vezanom glukozom (Pejović i sur., 2014). Tijekom mljevenja i miješanja maslinovog tijesta, hidrolitički enzimi odcjepljuju glukozu pa sekoiridoidi prelaze u aglikone (npr. oleuropein aglikon). Osim toga, događaju se i druge strukturne promjene pri čemu nastaju dimetilirani i deacetonski spojevi te dialdehidni oblici fenolnih tvari (Koprivnjak, 2006). Flavoni sadrže dva benzenska prstena spojena linearnim lancem od tri ugljika, dok se kemijska struktura lignana temelji na kondenzaciji aromatskih aldehida (Cárdeno i sur., 2013).

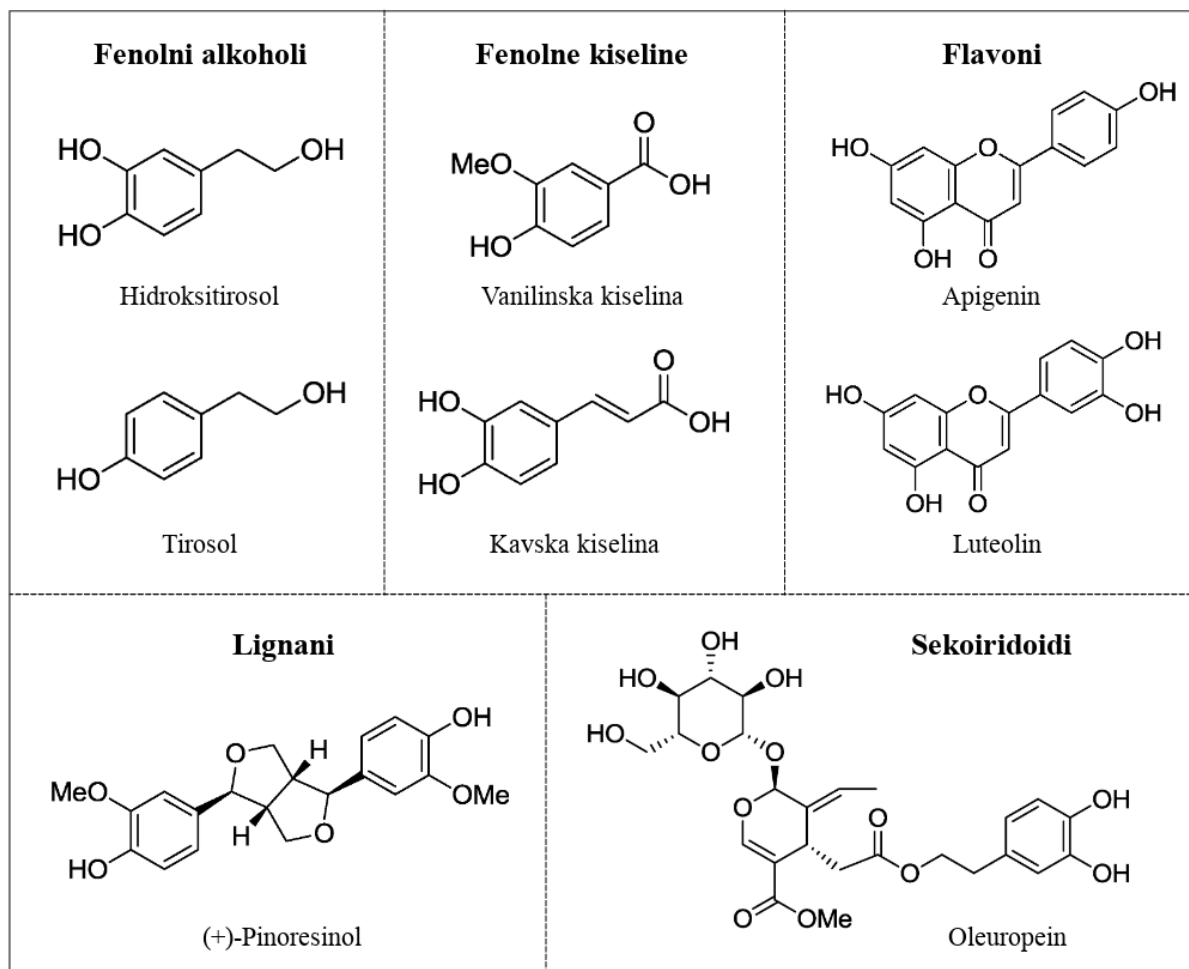
**Tablica 1.** Hidrofilne fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju (Koprivnjak, 2006).

| Fenolne kiseline  | Sekoiridoidi   | Fenolni alkoholi  |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• vanilinska</li> <li>• siringinska</li> <li>• p-kumarinska</li> <li>• o-kumarinska</li> <li>• galna</li> <li>• kavaska</li> <li>• protokatehunska</li> <li>• p-hidroksibenzojeva</li> <li>• ferulna</li> <li>• cimetna</li> <li>• benzojeva</li> <li>• 4-(acetoksietil)-1,2-dihidroksibenzen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• oleuropein</li> <li>• oleuropein aglikon (3',4,-DHPEA-EA)</li> <li>• ligstrozid aglikon (p-HPEA-EA)</li> <li>• dialdehidni oblik elenolne kiseline vezane na hidroksitirosol (3'4'-DHPEA-EDA)</li> <li>• dialdehidni oblik elenolne kiseline vezane na tirosol (p-HPEA-EDA)</li> <li>• derivati tirosola</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• tirosol (p-HPEA)</li> <li>• hidroksitirosol (3',4'-DHPEA)</li> <li>• hidroksitirosol glukozid</li> </ul> |
|   |  | <b>Lignani</b>  |
|   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• (+)-1-acetoksipinorezinol</li> <li>• (+)-pinorezinol</li> <li>• (+)-1-hidroksipinorezinol</li> </ul>     |
|   |  | <b>Flavoni</b>  |
|   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• apigenin</li> <li>• luteolin</li> </ul>  |

Tijekom prerade, iz ploda masline u ulje prelazi samo 0,5 do 1 % hidrofilnih fenolnih tvari. Najveći udio predstavljaju derivati oleuropein aglikona (90-95 %), zatim derivati ligstrozid aglikona (5-10 %) te fenolni alkoholi i kiseline (1-1,5 %) (Koprivnjak, 2006).

Fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju imaju pozitivne učinke na zdravlje koji proizlaze iz njihove kemijske strukture, a očituju se antioksidacijskim i protuupalnim

djelovanjem. Zbog prisutnosti hidroksilne skupine na benzenskoj jezgri, imaju sposobnost gašenja slobodnih radikala predajući im atom vodika. Stoga se fenolni spojevi povezuju sa smanjenim rizikom od bolesti karakteriziranih oksidacijskim stresom i upalom, poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, probavnih poremećaja i metaboličkog sindroma (Rodríguez-López, 2020).



**Slika 1.** Strukturne formule predstavnika različitih fenolnih skupina (Rodríguez-Morato i sur., 2015).



## 1.5. Interakcije između proteina i fenolnih tvari

Proteini su složeni polimeri koji mogu biti sastavljeni od 20 različitih aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Sastavni su dio mnogih namirnica kao što su mlijeko, meso, jaja, žitarice, mahunarke i uljarice. Proteini mogu tvoriti komplekse s drugim komponentama hrane, uključujući fenolne spojeve, pri čemu dolazi do promjena u njihovim strukturnim, funkcionalnim i nutritivnim svojstvima. Parametri koji utječu na te interakcije su temperatura i pH medija, te vrsta i koncentracija proteina i fenolnih spojeva, s time da postoji linearni odnos između veličine molekule fenola i kapaciteta vezanja za proteine (Ozdal i sur., 2013). Fenolne tvari i proteini međusobno mogu tvoriti četiri vrste veza: hidrofилne, ionske, kovalentne te vodikove veze (Han i sur., 2019).

Zbog interakcija s proteinima, neke aktivnosti ili senzorska svojstva fenolnih tvari mogu biti „maskirane“, poput njihove antioksidacijske aktivnosti te gorčine i pikantnosti. Studije su pokazale mogući nepovoljan utjecaj interakcija proteina i polifenola na obostranu bioraspoloživost tj. na dio ukupnog sadržaja tvari u hrani koji može biti apsorbiran (engl. *bioaccessibility*), te na biodostupnost (engl. *bioavailability*) koja rezultira bioaktivnošću te tvari nakon gastrointestinalne razgradnje, apsorpcije, metabolizma i distribucije do ciljnih tkiva (Pinarli, 2020). S druge strane, pretpostavlja se da proteini, uz ostale makromolekule u hrani, mogu biti prijenosnici polifenola kroz gastrointestinalni trakt i štititi ih od oksidacijskih reakcija (Jakobek, 2015).

Han i sur. (2019) izvijestili su da prirodni polifenolni spojevi iz čaja, grožđa i brusnice stupaju u interakcije s kazeinom, dok su interakcije s proteinima sirutke zanemarive. Međutim, Peyrot des Gachons i sur. (2021) dokazali su da proteini sirutke značajno smanjuju gorčinu i pikantnost djevičanskog maslinovog ulja što, prema autorima, podupire pretpostavku o interakcijama između ovih proteina i fenolnih spojeva djevičanskih maslinovih ulja. Također, Rawel i sur. (2002) zaključili su da i proteini soje reagiraju s fenolnim spojevima pri čemu blokiraju ostatke lizina, triptofana i cisteina u proteinskim molekulama.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja bio je ispitati promjene udjela ukupnih hidrofilnih fenolnih tvari djevičanskog maslinovog ulja tijekom trojednog skladištenja u kontaktu sa skutom odnosno tofuom pri niskim temperaturama. Praćenje takvih promjena može poslužiti kao indirektni pokazatelj interakcija između hidrofilnih fenolnih tvari i ostalih sastojaka skute odnosno tofua, u prvom redu proteina. Dodatni ciljevi bili su utvrditi utjecaj prisutnosti skute i tofua na oksidacijsko i hidrolitičko kvarenje djevičanskog maslinovog ulja te na udio vode u djevičanskom maslinovom ulju.

Plan istraživanja temeljen je na sljedećim polaznim hipotezama:

1. Višednevni kontakt skute i tofua s djevičanskim maslinovim uljem uzrokovat će smanjenje udjela fenolnih tvari u ulju tijekom skladištenja pri niskim temperaturama.
2. Veća količina tofua u djevičanskom maslinovom ulju uzrokovat će veće smanjenje udjela fenolnih tvari u ulju tijekom skladištenja.
3. Višednevni kontakt skute i tofua s djevičanskim maslinovim uljem uzrokovat će povećanje udjela vode u ulju i slobodnih masnih kiselina tijekom skladištenja pri niskim temperaturama.
4. Višednevni kontakt skute i tofua s djevičanskim maslinovim uljem neće uzrokovati značajne promjene K-vrijednosti u ulju tijekom skladištenja pri niskim temperaturama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Skuta

Skuta korištena u ovom istraživanju proizvedena je u jednoj od mini mljekara na području Hrvatske, a nabavljena je na maloprodajnom mjestu u Rijeci. Proizvedena je od sirutke kravljeg mlijeka. Rok trajanja bio je naveden oznakom „upotrijebiti do“ 10. 4. 2023., uz uvjet čuvanja na temperaturi od +4 do +8 °C. Prosječna hranjiva vrijednost proizvoda prikazana je u tablici 2, što ukazuje na deklarirani prosječan udio suhe tvari od 18,5 %. Analitički utvrđen udio suhe tvari bio je  $35,26 \pm 1,25$  %.

**Tablica 2.** Prosječne hranjive vrijednosti skute u 100 g

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| Energija                          | <b>424 kJ/101 kcal</b> |
| Masti                             | 5,9 g                  |
| -od kojih zasićene masne kiseline | 4,1 g                  |
| Ugljikohidrati                    | 3,5 g                  |
| -od kojih šećeri                  | 3,5 g                  |
| Bjelančevine                      | 8,6 g                  |
| Sol                               | 0,5 g                  |

##### 3.1.2. Tofu

Tofu korišten u ovom istraživanju nabavljen je u jednom od supermarketa u Rijeci. Rok trajanja bio je naveden oznakom „najbolje upotrijebiti do kraja“ 2. 2024. Njegova prosječna hranjiva vrijednost prikazana je u tablici 3, temeljem čega proizlazi da je deklarirani prosječan udio suhe tvari 22,8 %. Analitički utvrđen udio suhe tvari bio je  $28,82 \pm 0,58$  %.

**Tablica 3.** Prosječne hranjive vrijednosti tofua u 100 g

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| Energija                          | <b>507 kJ/122 kcal</b> |
| Masti                             | 7,1 g                  |
| -od kojih zasićene masne kiseline | 1,2 g                  |
| Ugljikohidrati                    | 3,7 g                  |
| -od kojih šećeri                  | 0,5 g                  |
| Bjelančevine                      | 12 g                   |
| Sol                               | 0 g                    |

### 3.1.3. Djevičansko maslinovo ulje

Djevičansko maslinovo ulje korišteno u ovom istraživanju deklarirano je u kategoriji kvalitete „ekstra djevičansko maslinovo ulje“, a nabavljeno je od lokalnog proizvođača s područja Istre.

### 3.1.4. Kemikalije i reagensi

Pri provedbi istraživanja korištene su sljedeće kemikalije i reagensi:

- a) za određivanje fenola:
  - *Fast Blue BB* sol hemi (cink klorid) sol, Sigma-Aldrich, SAD
  - etanol 96 % v/v, Panreac, Španjolska
  - natrijev hidroksid zrnca 1-2,5 mm, p.a., T.T.T d.o.o., Hrvatska
  - kavaska kiselina, čistoća 99 %, Panreac, Španjolska
- b) za određivanje slobodnih masnih kiselina:
  - etanol 96 % p.a., Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
  - dietil eter, Macron Fine Chemicals, Njemačka
  - otopina fenolftaleina (Riedel-de Haën, Njemačka) u etanolu, 1 % m/V
  - otopina kalijevog hidroksida pripremljena iz volumetrijskog standarda kalijevog hidroksida, 0,1 mol/L (Gram-mol d.o.o., Hrvatska) u etanolu 0,2 mol/L
- c) za određivanje  $K_{232}$  i  $K_{268}$ :
  - izooktan (2,2,4-trimetilpentan), BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo.

### 3.1.5. Uređaji i pribor

Za provedbu analitičkih postupaka, korišteni su sljedeći uređaji:

- spektrofotometar HACH DR/400, Colorado, SAD
- centrifuga Hettich, SAD
- Vortex, IKA, GENIUS 3, Njemačka
- magnetska miješalica, IKA, Njemačka
- semimikro analitička vaga Mettler Toledo, Švicarska
- digitalna vaga Kern & Sohn, Njemačka
- vlagomjer HE73, Mettler Toledo, Švicarska
- ratocioni vakuumski uparivač RV 10 digital, IKA, Njemačka
- tresilica, IKA KS 130 basic, Njemačka
- sterilizator – sušionik ST 80, INKO, Hrvatska.

Također, korišten je i sljedeći pribor:

- automatska pipeta, Eppendorf Research, Njemačka
- automatska bireta, BRAND GMBH, Njemačka
- stakleno laboratorijsko posuđe: Erlenmeyerove tikvice od 250 mL, odmjerne tikvice od 25 mL i 10 mL, menzura od 100 mL, staklene čaše od 50 mL, kruškolike tikvice od 25 mL, stakleni lijevci, stakleni štapići, satna stakalca, Pasteur-pipete, kivete (od kvarcnog i optičkog stakla), eksikator
- plastični pribor: plastične epruvete s čepom na navoj od 15 mL, šprica s iglom od 2 mL, nastavci za automatsku pipetu
- metalni pribor: metalna žlica, špatula, pinceta, cjedilo
- ostali pribor: plitice za vlagomjer, magnet, magnetni štapić, aluminijska folija, vata.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema materijala

Za prvi dio eksperimenta, skuta i tofu narezani su na komadiće u obliku kvadra, dimenzija  $1,5\text{ cm} \times 1,0\text{ cm} \times 1,0\text{ cm}$ . U staklenke od 170 mL dodano je prosječno 97 g skute, odnosno tofua i naliveno djevičanskim maslinovim uljem (prosječno 75 g) do grla staklenke, koja je zatim zatvorena metalnim poklopcem s navojem. Pripremljena je ukupno 21 staklenka: 9 sa skutom i uljem, 9 s tofuom i uljem te 3 s uljem bez dodataka koje je služilo kao kontrolni uzorak (slika 2). Napunjene staklenke čuvane su u hladnjaku na  $2 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon vađenja iz hladnjaka, staklenke su ostavljene jedan do dva sata na sobnoj temperaturi radi otapanja nastalih ugrušaka ulja. Neposredno prije uzimanja alikvota ulja za analizu, sadržaj sviju staklenki je homogeniziran njihovim blagim preokretanjem tri do četiri puta.



**Slika 2.** Staklenke napunjene materijalom: A - skuta s uljem (omjer masa skuta/ulje = 1,3), B - tofu s uljem (omjer masa tofu/ulje = 1,3), C - ulje bez dodataka

U drugom dijelu eksperimenta korišten je tofu narezan na komadiće u obliku kvadra, dimenzija 1,5 cm × 1,0 cm × 1,0 cm. Staklenke od 170 mL punjene su tofuom do određene razine te nadopunjene djevičanskim maslinovim uljem. Pripremane su tri varijante punjenja: u prvoj varijanti razina punjenja staklenke komadićima tofua iznosila je 100 % (staklenka napunjena do vrha), u drugoj varijanti 66 %, a u trećoj varijanti 33 %. Omjer masa tofua i ulja za svaku od varijanti punjenja naveden je u tablici 4. Pripremljene su tri staklenke za svaku varijantu te dvije staklenke s uljem bez tofua kao kontrola. Napunjene staklenke čuvane su u hladnjaku sedam dana na  $6 \pm 2$  °C. Neposredno prije uzimanja alikvota ulja za analizu, sadržaj sviju staklenki homogeniziran je njihovim blagim preokretanjem tri do četiri puta.

**Tablica 4.** Plan punjenja staklenki tofuom i uljem

| Razina punjenja staklenki tofuom (%) | Masa tofua (g) | Masa ulja (g) | Omjer masa tofua i ulja |
|--------------------------------------|----------------|---------------|-------------------------|
| 100                                  | 97,0           | 75,0          | 1,3                     |
| 66                                   | 60,0           | 100,0         | 0,6                     |
| 33                                   | 27,4           | 120,6         | 0,2                     |

### 3.2.2. Određivanje fenola u djevičanskom maslinovom ulju

Fenoli u djevičanskom maslinovom ulju određeni su prilagođenim *Fast Blue BB* (FBBB) testom koji su predložili Siano i sur. (2021). Metoda se temelji na spektrofotometrijskom određivanju azo derivata koji nastaju spajanjem fenolnih spojeva s FBBB diazonijevom soli u alkalnom pH.

U plastičnu epruvetu s čepom na navoj odvagano je 0,7000 g ulja koje je prethodno filtrirano kroz sloj celulozne vate radi uklanjanja primjesa (čestica skute ili tofua te kapljica vode). Dodano je 2,0 mL reagensa FBBB (0,1 % m/V u etanolu spektrofotometrijske čistoće) i 2,0 mL 5 % (m/V) vodene otopine NaOH. Epruvete su stavljene 20 min na vorteks mješalicu sa spužvastim nosačem koja je namještena na najjaču trešnju (razina 6). Nakon toga centrifugirane su 5 min na 6000 okretaja u minuti. Iz centrifugiranih epruveta automatskom pipetom preneseno je u čiste epruvete 3,0 mL vodenog sloja, koji je također centrifugiran 5 min na 6000 okretaja u minuti. Centrifugirani vodeni ekstrakt izvučen je iz epruvete špricom od 2 mL s iglom te prenesen u kivetu od optičkog stakla. Izmjerena je apsorbancija spektrofotometrom na 420 nm. Kao slijepa proba korištena je mješavina 2,0 mL FBBB reagensa (0,1 % m/V u etanolu spektrofotometrijske čistoće) i 2,0 mL 5 % (m/V) vodene otopine NaOH.

### 3.2.2.1. Priprema FBBB reagensa

U staklenu čašu odvagano je 0,05 g *Fast Blue BB* soli, dodano 30-35 mL etanola te stavljeno na magnetsku miješalicu na 800 okretaja u minuti u mraku. Nakon otapanja, reagens je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjen etanolom do oznake.

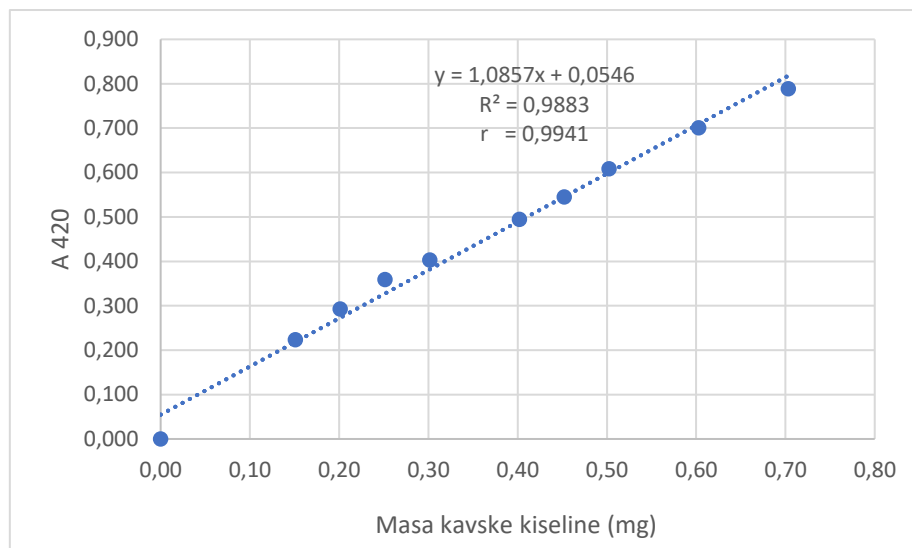
### 3.2.2.2. Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca korištena je kavaska kiselina. Pripremljena je otopina kavske kiseline u etanolu koncentracije 1 mg/mL. U devet kruškolikih tikvica od 25 mL pipetirani su volumeni otopine kavske kiseline prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Plan izrade baždarnog pravca i rezultati apsorbancije

| Oznaka tikvice | Volumen otopine (mL) | Masa kavske kiseline (mg) | Apsorbancija (420 nm) |
|----------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| 0 (SP)         | 0,000                | 0,0000                    | 0,000                 |
| 1              | 0,150                | 0,1507                    | 0,224                 |
| 2              | 0,200                | 0,2009                    | 0,293                 |
| 3              | 0,250                | 0,2512                    | 0,359                 |
| 4              | 0,300                | 0,3014                    | 0,403                 |
| 5              | 0,400                | 0,4018                    | 0,495                 |
| 6              | 0,450                | 0,4521                    | 0,545                 |
| 7              | 0,500                | 0,5023                    | 0,609                 |
| 8              | 0,600                | 0,6028                    | 0,701                 |
| 9              | 0,700                | 0,7032                    | 0,789                 |

Tikvice su stavljene na rotavapor s temperaturom vodene kupelji 30 °C. Nakon uparavanja, u tikvicu je dodano 2 mL FBBB reagensa (0,1 % m/V u etanolu spektrofotometrijske čistoće) i 2 mL 5 % (m/V) vodene otopine NaOH. Tikvice su vorteksirane 2 min pa stavljene na tresilicu 20 min na 480 okretaja u minuti. Sadržaj tikvica prebačen je u kivete od optičkog stakla te je izmjerena apsorbancija na 420 nm. Kao slijepa proba korištena je mješavina 2,0 mL FBBB reagensa (0,1 % m/V u etanolu spektrofotometrijske čistoće) i 2,0 mL 5 % (m/V) vodene otopine NaOH. Uvrštavanjem vrijednosti masa kavske kiseline na os x, a apsorbancija na os y, izrađen je baždarni pravac jednadžbe  $y = 1,0857x + 0,0546$  (slika 3).



**Slika 3.** Baždarni pravac za određivanje fenola

Maseni udio fenola (mg/kg) dobiven je uvrštavanjem vrijednosti apsorbancija fenola u dobivenu jednadžbu pravca te preračunavanjem na alikvot ekstrakta i masu analiziranog ulja.

### 3.2.3. Određivanje slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju

Slobodne masne kiseline u djevičanskom maslinovom ulju određene su prema metodi *Međunarodnog vijeća za masline* (IOC, 2017). U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL odvagano je 7,50 g uzorka ulja prethodno filtriranog kroz sloj celulozne vate radi uklanjanja primjesa (čestica skute ili tofua te kapljica vode). U drugu tikvicu dodano je 100 mL prethodno pripremljene mješavine otapala etanol:dietil eter u omjeru V:V = 1:1. Otapalo je neutralizirano 0,1 M otopinom KOH uz dodatak 150  $\mu$ L otopine fenolftaleina u etanolu (10 g/L) kao indikatora. Neutralizirano otapalo dodano je uzorku ulja. Otopina ulja titrirana je 0,1 M otopinom KOH u etanolu do promjene boje. Za usporedbu i lakše uočavanje promjene boje korištena je netitrirana otopina ulja na bijeloj podlozi. Udio slobodnih masnih kiselina izražen je kao postotak slobodne oleinske kiseline, a izračunan je prema sljedećem izrazu:

$$SMK (\%) = \frac{V * c * M}{10 * m},$$

gdje je: V – volumen otopine KOH potrošen u titraciji (mL)

c – točna koncentracija otopine KOH (mol/L)

M – molekulska masa oleinske kiseline (M = 282 g/mol)

m – masa uzorka ulja (g).



### 3.2.4. Određivanje $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju

K-vrijednosti u djevičanskom maslinovom ulju određene su prema metodi *Međunarodnog vijeća za masline* za spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području (IOC, 2019). Radi prethodnog uklanjanja primjesa (čestica skute ili tofua te kapljica vode), uzorak ulja filtriran je na sobnoj temperaturi kroz sloj celulozne vate. Za određivanje apsorbancije na 232 nm, u odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano je 0,0700 – 0,0800 g uzorka. Za određivanje apsorbancije na 268 nm, u odmjernu tikvicu od 10 mL odvagano je 0,2500 g uzorka. Tikvice su izooktanom (2,2,4 trimetilpentan) dopunjene do oznake i promućkane. Otopine su prebačene u kvarcne kivete te im je izmjerena apsorbancija spektrofotometrom na 232, odnosno 268 nm. Kao slijepa proba korišten je izooktan spektrofotometrijske čistoće. Koeficijent apsorbancije na određenim valnim duljinama izračunan je prema sljedećem izrazu:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c * s},$$

gdje je:  $K\lambda$  – koeficijent apsorbancije na valnoj duljini  $\lambda$ ,

$E\lambda$  – apsorbancija mjerena na valnoj duljini  $\lambda$ ,

$c$  – koncentracija otopine u g/100 mL

$s$  – duljina puta kroz kvarcnu kivetu (cm).

### 3.2.5. Određivanje udjela vode u djevičanskom maslinovom ulju

Udio vode u djevičanskom maslinovom ulju određen je sušenjem ulja u sušioniku na  $103 \pm 2$  °C do konstantne mase. Zabilježena je masa praznih Petrijevih zdjelica koje su prethodno sušene 40 min u sušioniku na  $103 \pm 2$  °C te ohlađene u eksikatoru. Odvagano je oko 10 g ulja te je zabilježena masa Petrijevih zdjelica s uljem. Navedene zdjelice postavljene su u sušionik na  $103 \pm 2$  °C. Nakon 1 h, zdjelice su izvađene iz sušionika, stavljene u eksikator te nakon hlađenja izvagane i ponovno vraćene u sušionik. Postupak je ponavljan do postizanja konstantne mase. Udio vode izračunan je prema sljedećem izrazu:

$$\text{voda (\%)} = 100 - \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100,$$

gdje je:  $m_0$  – masa prazne Petrijeve zdjelice (g),

$m_1$  – masa Petrijeve zdjelice s uljem prije sušenja (g),

$m_2$  – masa Petrijeve zdjelice s uljem nakon sušenja do konstantne mase (g).

### **3.2.6. Određivanje udjela vode u skuti i tofuu**

Udio vode u skuti i tofuu određen je vlagomjerom. Na pliticu je postavljeno oko 2,5 g uzorka skute, odnosno tofua te je pokrenut postupak sušenja do postizanja konstantne mase. Po završetku sušenja, postotak vode očitao je sa zaslona vlagomjera.

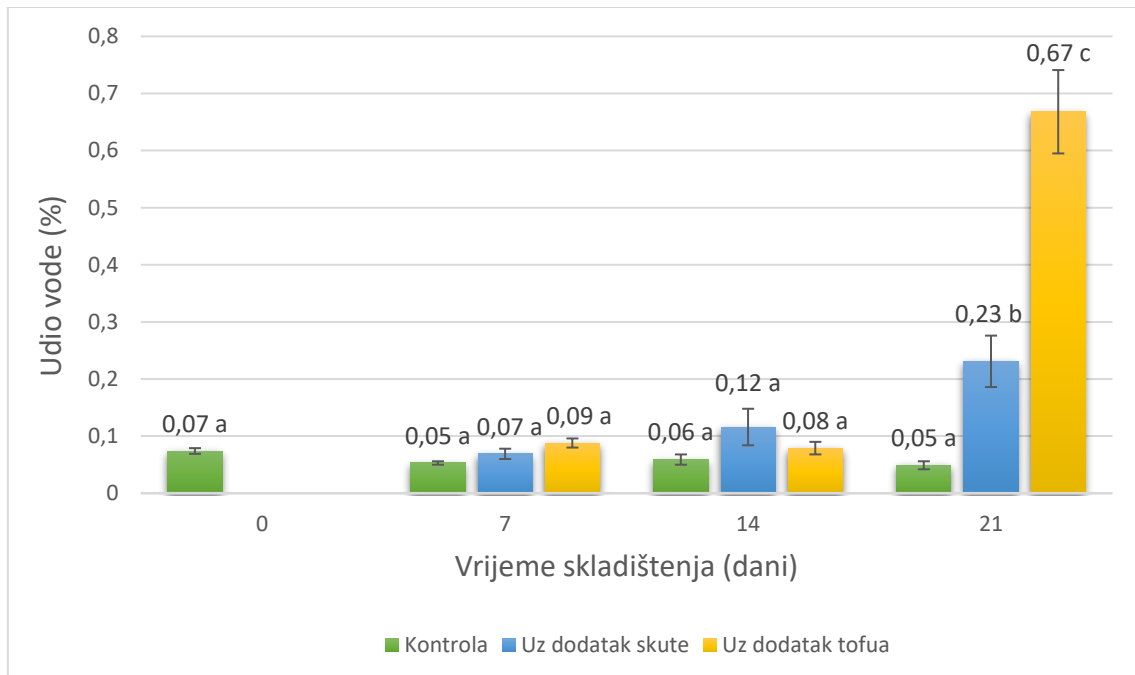
### **3.2.7. Statistička obrada podataka**

Rezultati istraživanja statistički su obrađeni u programu *Statistica* (TIBCO Software Inc, verzija 14.0.0.15). Podaci su testirani jednosmjernom analizom varijance (*one-way ANOVA*) na intervalu pouzdanosti 95 % ( $p < 0,05$ ). Homogenost varijance provjerena je testovima Levene i Brown-Forsythe. Za pojedine točke pokusa, srednje vrijednosti paralelnih određivanja uspoređene su Tukeyjevim testom značajne razlike za nejednake veličine uzorka (*Tukey's HSD for unequal N*). Priprema rezultata za statističku obradu, izrada grafičkih prikaza te određivanje jednadžbi korelacija s koeficijentima determinacije ( $R^2$ ) te Pearsonovim koeficijentima linearne korelacije ( $r$ ) obavljani su programom *Microsoft Office Excel*.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Udio vode u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

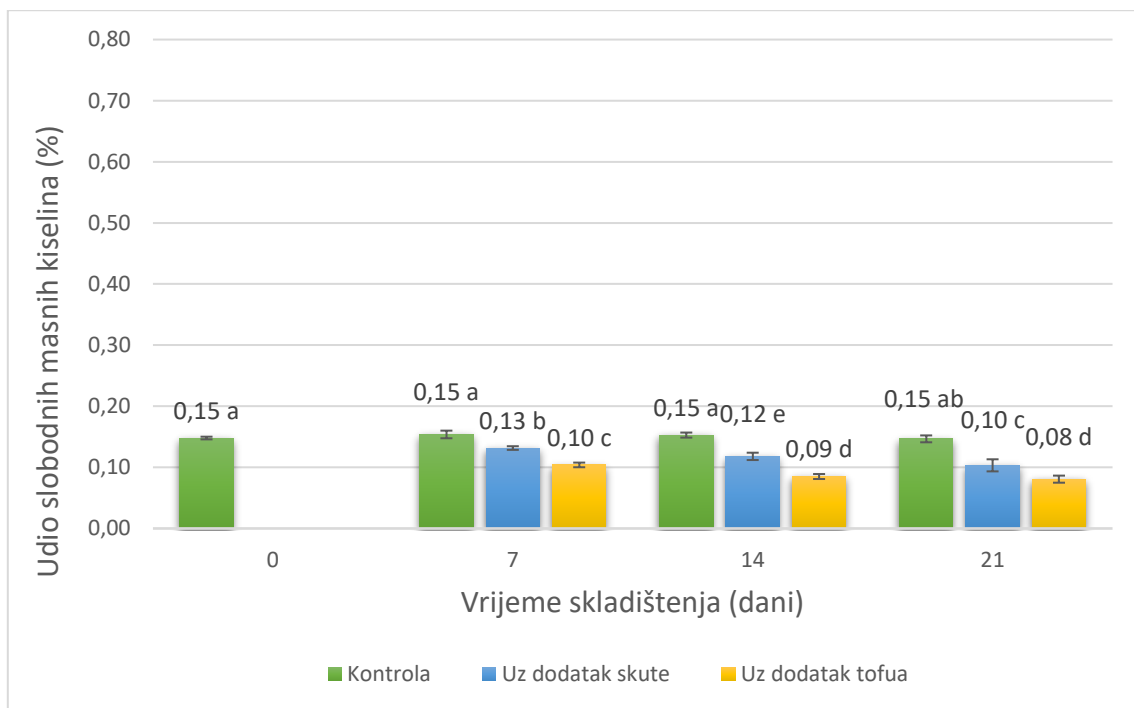
Udio vode u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua postupno se povećavao u odnosu na kontrolni uzorak nakon 7 i 14 dana skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Međutim, do statistički značajnog porasta došlo je tek nakon 21 dana skladištenja (slika 4).



**Slika 4.** Udio vode (%) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija tri paralelna određivanja za kontrolu, odnosno po šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak skute ili tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Udio slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

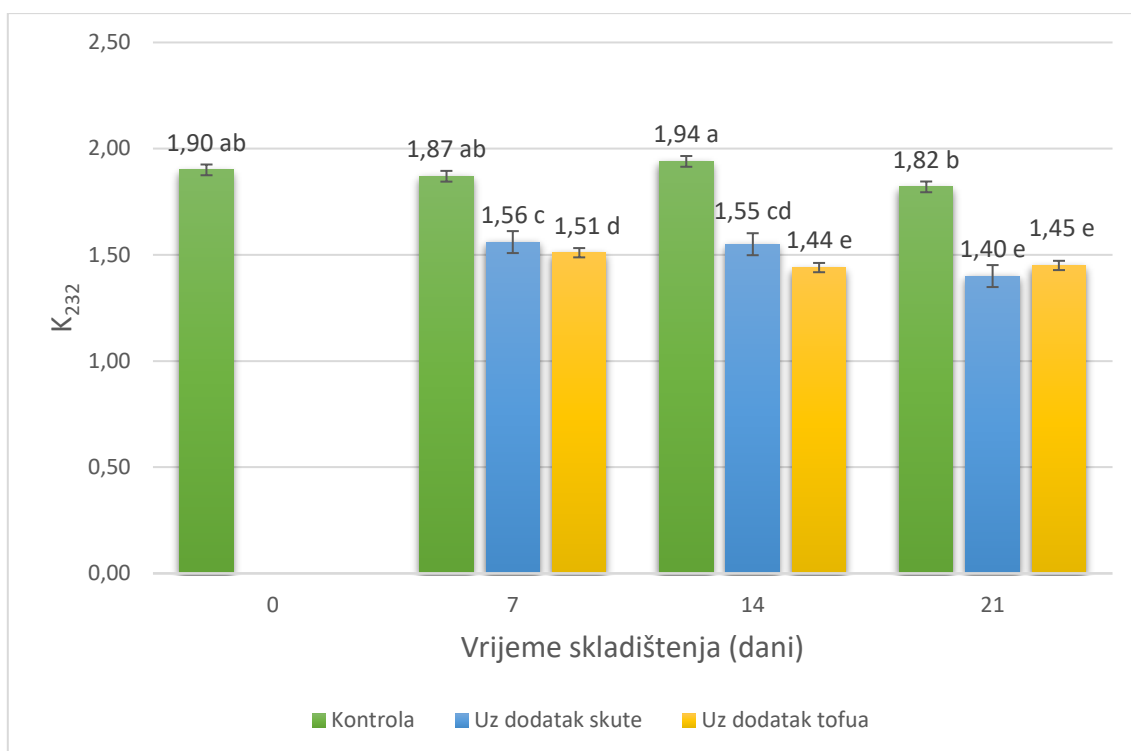
Udio slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C prikazan je na slici 5. Već nakon sedam dana čuvanja evidentiran je statistički značajan pad udjela slobodnih masnih kiselina u uzorcima ulja koji su čuvani u kontaktu sa skutom, te još značajniji pad u kontaktu s tofuom.



**Slika 5.** Udio slobodnih masnih kiselina (%) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija tri paralelna određivanja za kontrolu, odnosno po šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak skute ili tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

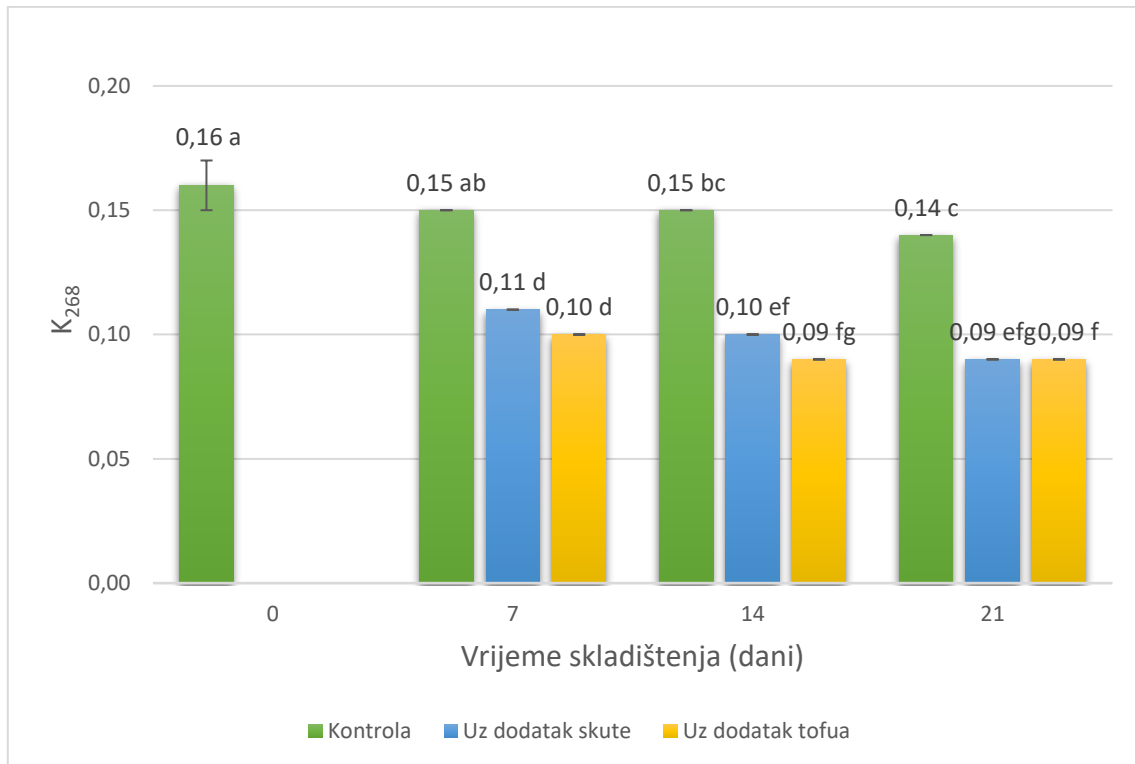
### 4.3. $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

Na slici 6 prikazan je pad vrijednosti  $K_{232}$  u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dana skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C.



**Slika 6.** Vrijednosti  $K_{232}$  u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti tri paralelna određivanja za kontrolu, odnosno po šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak skute ili tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

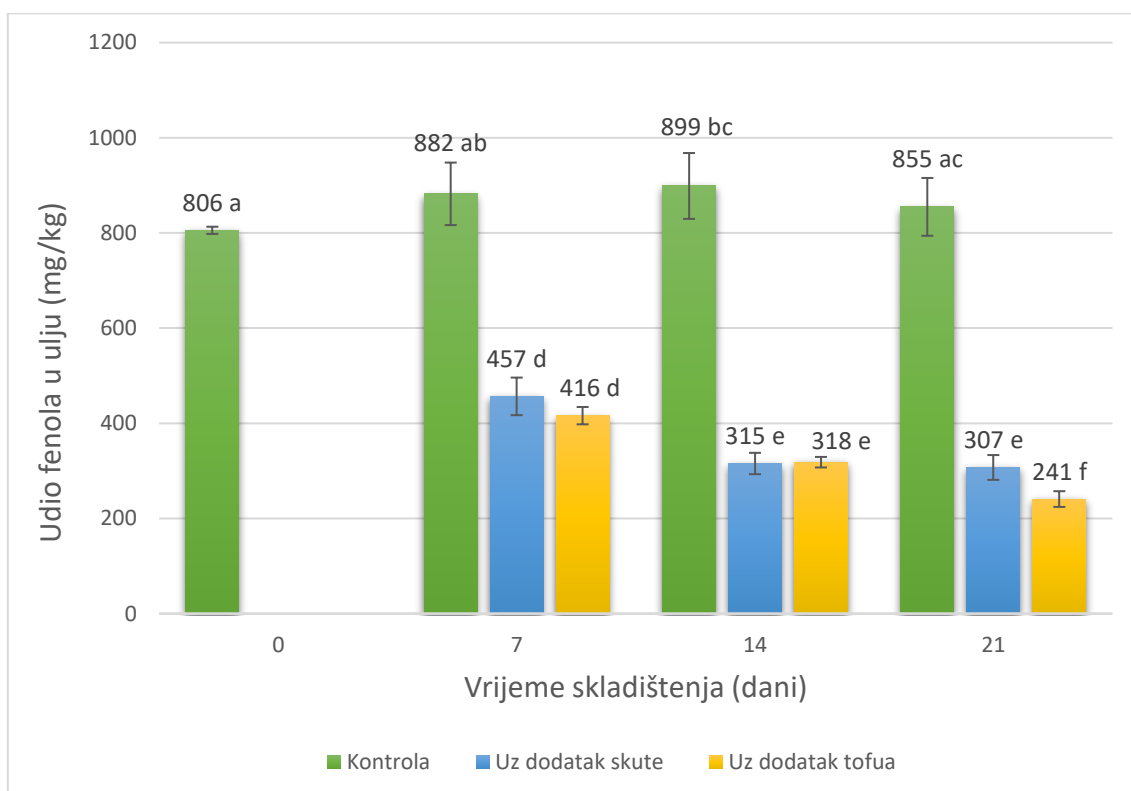
Na slici slici 7 prikazan je pad vrijednosti  $K_{268}$  u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dana skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C.



**Slika 7.** Vrijednosti  $K_{268}$  u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti tri paralelna određivanja za kontrolu, odnosno po šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak skute ili tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

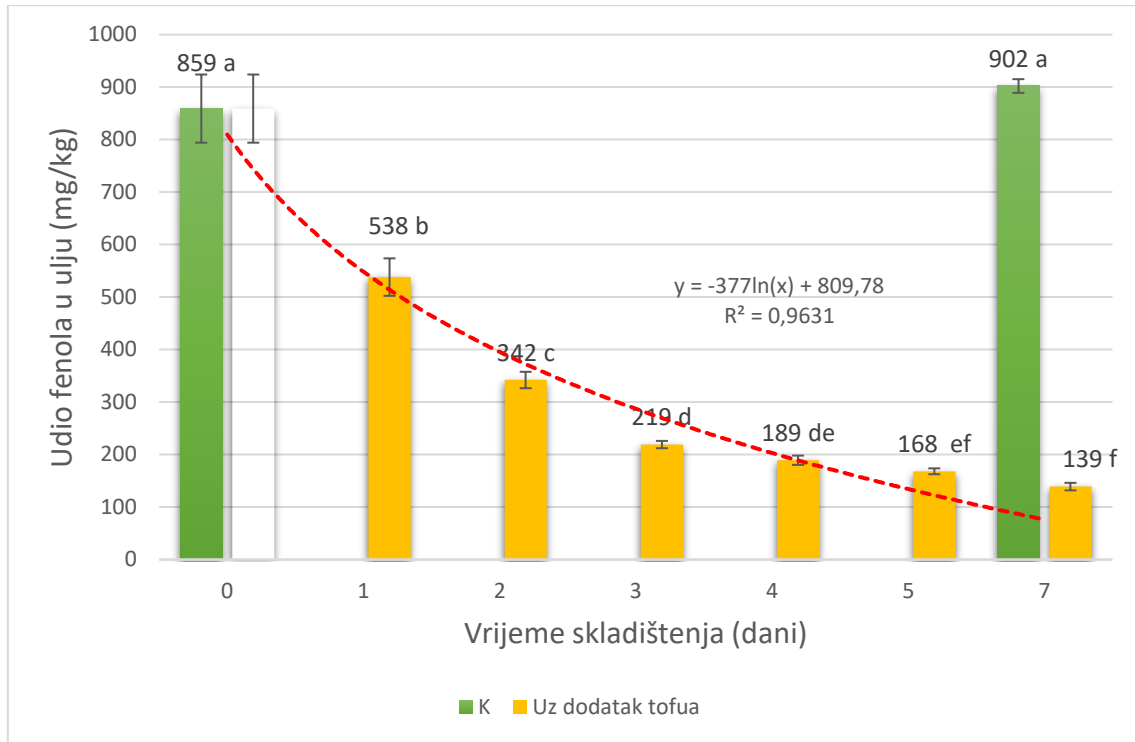
#### 4.4. Udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

Na slici 8 prikazane su promjene udjela ukupnih hidrofilnih fenola u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua, tijekom trodnevnog skladištenja u hladnjaku na  $2 \pm 2$  °C. Udio fenola u kontrolnom uzorku ulja uglavnom se nije statistički značajno mijenjao tijekom tog razdoblja, dok je prisutnost skute odnosno tofua rezultirala značajnim padom već nakon sedam dana skladištenja.



**Slika 8.** Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija četiri paralelna određivanja za kontrolu, odnosno po devet određivanja (3 staklenke  $\times$  3 paralelna određivanja) za dodatak skute ili tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

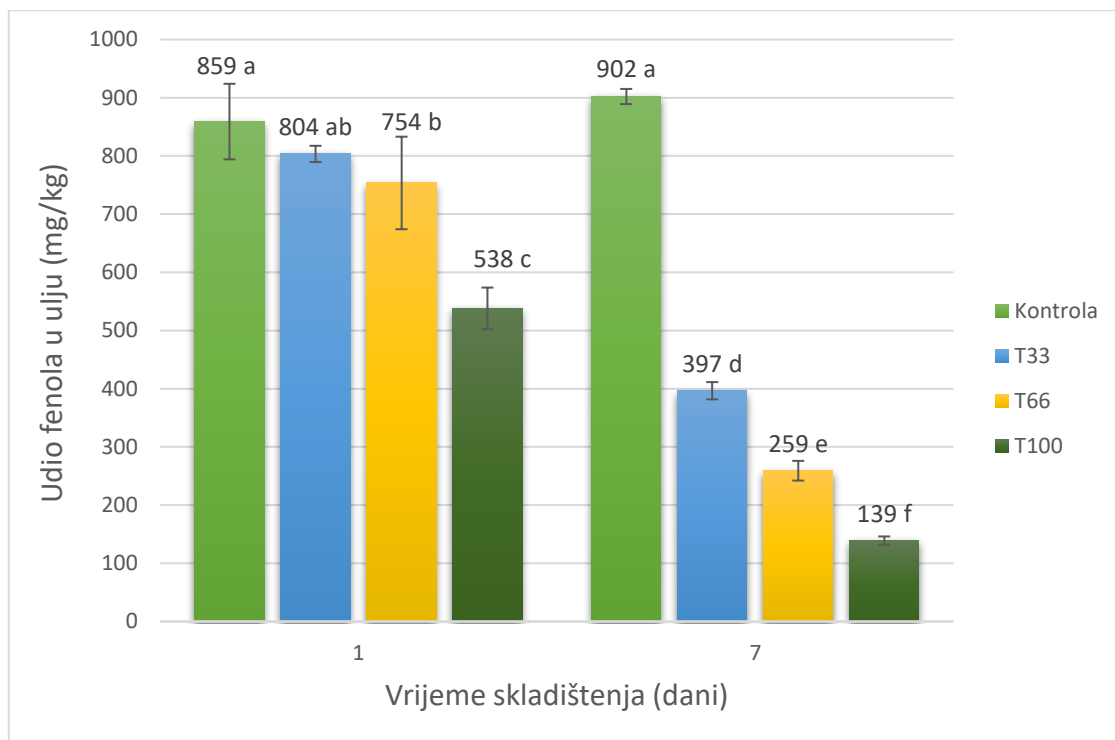
U drugom dijelu eksperimenta korišten je tofu kao model, te je u odnosu na prvi dio eksperimenta primijenjeno kraće čuvanje (sedam dana) pri nešto višim temperaturama ( $6 \pm 2$  °C). Promjene udjela fenola u ulju prikazane na slici 9 ukazuju na brži pad pri višim u odnosu na niže temperature čuvanja.



**Slika 9.** Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak tofua tijekom sedam dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija četiri paralelna određivanja za kontrolu (K), te šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

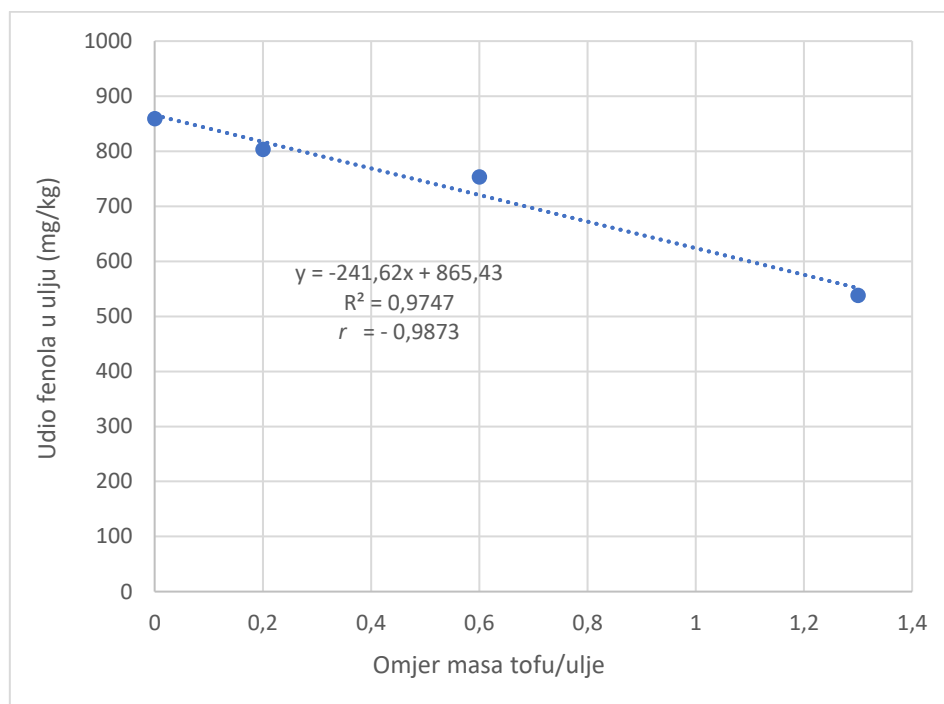


U drugom dijelu eksperimenta istražen je i utjecaj razine punjenja staklenki tofuom na udio fenola u ulju nakon prvog te nakon sedmog dana čuvanja pri  $6 \pm 2$  °C. Iz rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da je nakon kratkotrajnog čuvanja od jednog dana samo 100 %-tna razina punjenja dovela do statistički značajnog pada udjela ukupnih fenola. Nakon sedam dana čuvanja statistički značajan učinak zabilježen je kod svih razina punjenja staklenki tofuom.



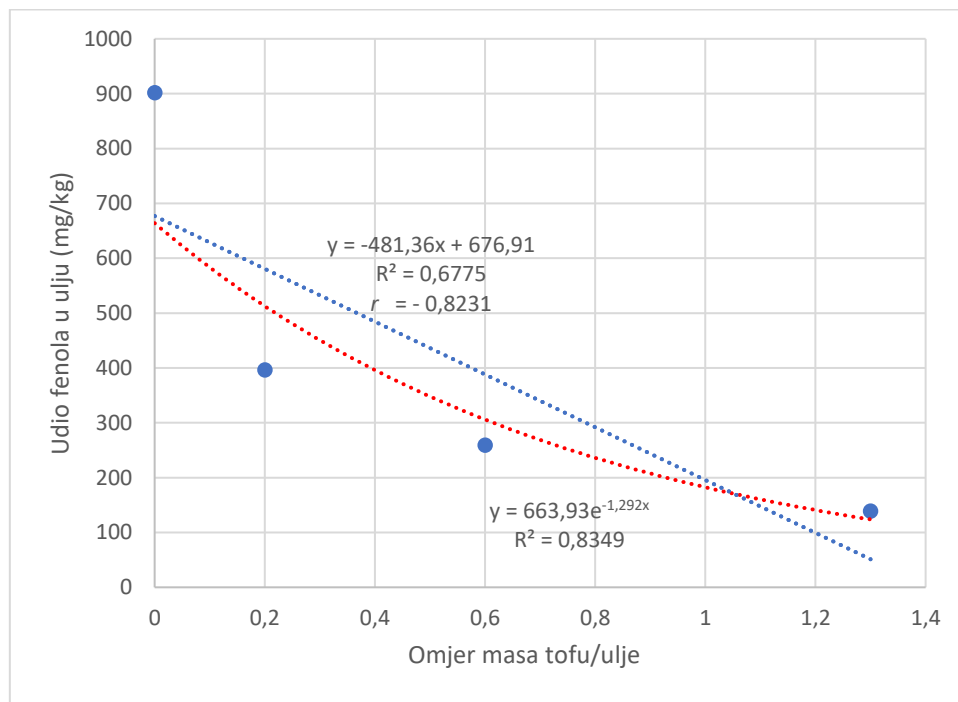
**Slika 10.** Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz različite razine punjenja staklenki tofuom: 33 % (T33), 66 % (T66) i 100 % (T100) nakon prvog i sedmog dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija četiri paralelna određivanja za kontrolu, te šest određivanja (3 staklenke  $\times$  2 paralelna određivanja) za dodatak tofua. Srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

Na slici 11 prikazan je dijagram rasipanja udjela fenola u ulju (zavisna varijabla) u odnosu na omjer masa tofua i ulja u staklenkama (nezavisna varijabla) nakon prvog dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C. Pearsonov koeficijent linearnosti korelacije ukazuje na čvrstu negativnu linearnu povezanost ovih dvaju parametara ( $r > -0,80$ ).



**Slika 11.** Linearna korelacija između udjela fenola u djevičanskom maslinovom ulju (mg/kg) i omjera masa tofua i ulja u staklenkama nakon prvog dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C.

Na slici 12 prikazan je dijagram rasipanja udjela fenola u ulju (zavisna varijabla) u odnosu na omjer masa tofua i ulja u staklenkama (nezavisna varijabla) nakon sedmog dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C. Vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) upućuju na to da je logaritamska povezanost udjela fenola u ulju i omjera masa tofua i ulja nakon sedmog dana skladištenja čvršća od linearne povezanosti.



**Slika 12.** Linearna i logaritamska korelacija između udjela fenola u djevičanskom maslinovom ulju (mg/kg) i omjera masa tofua i ulja u staklenkama nakon sedmog dana skladištenja pri  $6 \pm 2$  °C.

## 5. RASPRAVA

U ovom radu primarno su praćene promjene udjela hidrofilnih fenolnih tvari u djevićanskom maslinovom ulju uslijed njegovog kontakta sa skutom odnosno tofuom. Skuta i tofu odabrani su kao modeli istraživanja zbog sličnog udjela, ali različitog sastava pojedinih makronutrijenata, osobito proteina za koje je poznato da ulaze u interakcije s fenolima. Uz ovaj primarni cilj, plan istraživanja obuhvatio je i određivanje onih pokazatelja sastava i kvalitete djevićanskog maslinovog ulja za koje se očekivalo da će se mijenjati u uvjetima provedbe pokusa (udio vode u ulju te udio slobodnih masnih kiselina kao pokazatelji hidrolitičkog kvarenja), odnosno da se neće mijenjati (K-vrijednosti kao pokazatelji oksidacijskog kvarenja).

### 5.1. Udio vode u djevićanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

Djevićanska maslinova ulja sadrže vrlo malu količinu vode koja se prema Bendini i sur. (2007) kreće u rasponu od 0,05 – 0,3 % a koja je u pravilu viša kod nefiltriranih u odnosu na filtrirana ulja. Višak vode može potaknuti hidrolitičku razgradnju tijekom skladištenja ulja što uzrokuje smanjenje kvalitete i senzorskih svojstava (Peri, 2014). Djevićansko maslinovo ulje koje je u ovom pokusu poslužilo kao tekući medij za čuvanje skute odnosno tofua, u startu je sadržavalo 0,07 % vode što ga svrstava u djevićanska maslinova ulja s vrlo niskom razinom vode. Budući da su i skuta i tofu materijal izrazito bogat vodom, pretpostavljeno je da će tijekom njihovog višednevnog kontakta s uljem doći do migracije vode u ulje. Dobiveni rezultati (slika 4) potvrdili su tu hipotezu – udio vode u ulju uz dodatak skute i tofua isprva se neznatno povećavao u odnosu na kontrolu, da bi to povećanje nakon 21 dana skladištenja bilo statistički značajno i u odnosu na kontrolu i u odnosu na prethodne intervale skladištenja. Nakon 21 dana skladištenja zabilježena je i statistički značajna razlika u udjelu vode u ulju uz dodatak tofua (0,67 %), u odnosu na ulje uz dodatak skute (0,23 %). To se može pripisati većem udjelu vode u tofuu (71,2 %) u odnosu na udio vode u skuti (64,7 %).

### 5.2. Udio slobodnih masnih kiselina u djevićanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom

Slobodne masne kiseline pokazatelj su hidrolitičkog kvarenja djevićanskog maslinovog ulja. Prvenstveno nastaju u oštećenim plodovima masline djelovanjem endogenih lipaza koje dolaze u kontakt s uljem iz vakuola te uzrokuju hidrolizu triglicerida cijepanjem esterske veze između glicerola i masnih kiselina (Peri, 2014). Prema Delegiranoj uredbi EU 2022/2104, propisana granica udjela slobodnih masnih kiselina za ekstra djevićansko maslinovo ulje je  $\leq 0,80$  %. U kontrolnom ulju iz ovog istraživanja taj je udio iznosio 0,15 % te je ostao konstantan tijekom cijelog trodnevnog razdoblja skladištenja.

Hidroliza esterske veze može se odvijati uz prisutnost vode u ulju i bez aktivnosti lipaza, iako znatno sporije. Stoga se pretpostavilo da će višednevni kontakt skute i tofua s djevičanskim maslinovim uljem uzrokovati povećanje udjela vode u ulju te udjela slobodnih masnih kiselina tijekom skladištenja na niskim temperaturama. Međutim, što se tiče slobodnih masnih kiselina utvrđeno je suprotno – njihov se udio u ulju uz dodatak skute, odnosno tofua, statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolu nakon sedam, te dodatno nakon 14 i 21 dana skladištenja pri  $2 \pm 2$  °C (slika 5). Ovi rezultati nisu u skladu s onima iz sličnih istraživanja. Tako su Al-Ismael i sur. (2018) izvijestili o povećanju slobodnih masnih kiselina u ekstra djevičanskom maslinovom ulju skladištenom s procijeđenim kuglicama jogurta tijekom dva mjeseca. Klisović i sur. (2022) također su dokazali povećanje udjela slobodnih masnih kiselina u djevičanskom maslinovom ulju pohranjenom sa skutom nakon jednog mjeseca, a naročito nakon dva mjeseca čuvanja. Autori su zaključili da je do toga došlo zbog otpuštanja vode iz skute koja je uzrokovala hidrolizu triglicerida. Nadalje, dokazali su da je porast udjela slobodnih masnih kiselina bio u pozitivnoj korelaciji s udjelom vlage u siru. To je također u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja u kojem je udio slobodnih masnih kiselina u ulju uz dodatak tofua (koji je sadržavao 71,2 % vode) bio statistički značajno manji od udjela u ulju uz dodatak skute (koja je sadržavala 64,7 % vode). Obrazloženje ovakvih rezultata može ležati u činjenici da su slobodne masne kiseline bipolarnog karaktera, da se mogu smjestiti na granici vodene i uljne faze, te zbog toga biti uklonjene s kapljicama vode tijekom obrade djevičanskog maslinovog ulja (Mailer i Beckingham, 2006). U ovom istraživanju, moguće je da su slobodne masne kiseline djelomično uklonjene tijekom pripreme uzorka ulja za analizu filtriranjem kroz celuloznu vatu zajedno s vodom koja je migrirala iz skute ili tofua. U spomenutim sličnim istraživanjima Al-Isamila i sur. (2018) te Klisović i sur. (2022) nije navedeno jesu li uzorci ulja pripremani za analizu filtriranjem, pa bi izostanak tog koraka mogao biti razlog za nepodudarnost s rezultatima ovog istraživanja.

### **5.3. Vrijednosti $K_{232}$ i $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom**

Spektrofotometrijsko određivanje K-vrijednosti u ultraljubičastom području omogućuje procjenu oksidacijskog kvarenja djevičanskog maslinovog ulja. Do oksidacije uglavnom dolazi tijekom skladištenja ulja, a pogoduje joj dostupnost kisika te izloženost svjetlosti i visokoj temperaturi (Sanmartin, 2018). U procesu fotooksidacije, pobuđeni kisik veže se za dvostruke veze u nezasićenim masnim kiselinama pri čemu nastaju hidroperoksidi. Tada dolazi do premještanja dvostruke veze iz izoliranog u konjugirani položaj pa iz linolne

kiseline nastaju konjugirani dieni, a iz linolenske konjugirani trieni. Konjugirani dieni i primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi) imaju maksimum apsorpcije kod 232 nm, a konjugirani trieni i sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni) kod 268 nm (Koprivnjak, 2006).

Vrijednosti  $K_{232}$  i  $K_{268}$  u kontrolnom ekstra djevičanskom maslinovom ulju na početku eksperimenta iznosile su 1,90, odnosno 0,16, što je bilo unutar propisanih granica za ekstra djevičansko maslinovo ulje ( $K_{232} \leq 2,50$ ,  $K_{268} \leq 0,22$ , Uredba 2022/2104) i ukazivalo na vrlo niski stupanj oksidacijskog kvarenja. Pretpostavilo se da višednevni kontakt skute i tofua s djevičanskim maslinovim uljem u uvjetima koji ne potiču oksidaciju (minimalni prostor ispunjen zrakom u staklenki, čuvanje u tami i pri niskoj temperaturi) neće uzrokovati značajne promjene K-vrijednosti u ulju. Međutim, vrijednosti  $K_{232}$  i  $K_{268}$  u ulju uz dodatak skute ili tofua bile su čak i statistički značajno niže u odnosu na kontrolno ulje u svakom od intervala trojednog skladištenja (slika 6 i slika 7). Ono što bi moglo biti povezano s ovim neočekivanim smanjenjem K-vrijednosti je isto obrazloženje ponuđeno za smanjenje udjela slobodnih masnih kiselina. Primarni, a osobito sekundarni produkti oksidacijskog kvarenja, polarnije su tvari od triglicerida, te također mogu djelomično biti uklonjene s kapljicama vode tijekom pripreme uzorka ulja za analizu filtriranjem. Uz to, zabilježena je i blaga ali statistički značajna razlika između  $K_{232}$  ulja uz dodatak skute (nešto više vrijednosti) i ulja uz dodatak tofua (nešto niže vrijednosti) nakon 7 i 14 dana skladištenja, što je izostalo nakon 21 dana skladištenja. Između vrijednosti  $K_{268}$  ulja s dodatkom skute i ulja s dodatkom tofua nije bilo statistički značajnih razlika ni u jednom od intervala trojednog skladištenja.

Treba napomenuti da se i u nekim drugim istraživanjima pokazao sličan trend i velike varijabilnosti u K-brojevima tijekom skladištenja djevičanskog maslinovog ulja (Shendi i sur., 2019). U istraživanju Klisović i sur. (2022),  $K_{232}$  u ekstra djevičanskom maslinovom ulju s dodatkom skute statistički se značajno smanjio nakon jednog mjeseca skladištenja, dok se nakon dva mjeseca povećao iznad propisane granice za ekstra djevičansko maslinovo ulje. Vrijednost  $K_{268}$  statistički se značajno smanjila nakon jednog mjeseca te ostala nepromijenjena nakon dva mjeseca.

#### **5.4. Udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju nakon kontakta sa skutom ili tofuom**

U ovom istraživanju udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju prije kontakta sa skutom ili tofuom iznosio je 806 mg/kg što je visoka vrijednost s obzirom na uobičajeni raspon od 40 do 900 mg/kg (Bakarić i sur., 2007). Tijekom trojednog skladištenja u hladnjaku na  $2 \pm 2$  °C ta je vrijednost uglavnom ostala konstantna tj. bez statistički značajnih odstupanja (slika

8). Pretpostavka o tome da će višednevni kontakt djevičanskog maslinovog ulja sa skutom ili tofuum uzrokovati smanjenje fenolnih tvari u ulju tijekom skladištenja pri niskim temperatura temelji se na rezultatima niza dosadašnjih istraživanja koji ukazuju na interakcije između fenola i proteina iz različitih namirnica (Ozidal i sur., 2013; Jakobek, 2015; Han i sur., 2019; Peyrot des Gachons i sur., 2021; Rawel i sur., 2002). Rezultati ovog istraživanja prikazani na slici 8 potvrđuju takvu pretpostavku. Vidljivo je da se udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak obje vrste materijala statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolu već nakon sedam dana skladištenja u hladnjaku na  $2 \pm 2$  °C. Pod utjecajem skute udio fenola u ulju smanjio se za 48 %, a pod utjecajem tofua za 53 % u odnosu na kontrolu. Klisović i sur. (2022) proveli su slično istraživanje (dugotrajni kontakt skute s djevičanskim maslinovim uljem pri 4 °C) te su nakon mjesec dana također dobili smanjenje ukupnih hidrofilnih fenola u ulju. U njihovom slučaju taj je pad bio manje izražen (za 35 % u odnosu na kontrolu) unatoč duljem vremenu skladištenja (30 dana u odnosu na sedam dana) te većem omjeru skuta/ulje (1,8 u odnosu na 1,3 iz ovog istraživanja). Razlog za takve kvantitativne razlike može biti višestruk, od činjenice da su koristili djevičansko maslinovo ulje s nižom početnom razinom ukupnih fenola (311 mg/kg), da je udio vode u uzorku skute bio veći (74 % u odnosu na 65 % u ovom istraživanju) te da su ukupni fenoli određeni drugačijom metodom (po Folin-Ciocalteu). Za ovo istraživanje korišten je *Fast blue BB* test koji je specifičniji za fenolne tvari od metode po Folin-Ciocalteu kod koje postoji mogućnost za niz interferencija s drugim komponentama u uzorku hrane, kao što su proteini, aminokiseline, šećeri, aromatski amini, organske kiseline i dr. (Pico i sur., 2020).

Uspoređujući utjecaj skute i tofua na udio fenola u ulju (slika 8), tek se nakon 21 dana skladištenja može uočiti statistički značajna razlika između ovih dvaju matriksa. Pad udjela fenola pod utjecajem skute zaustavljen je nakon 14 dana skladištenja, dok se pod utjecajem tofua nastavio do 21. dana skladištenja. Uz pretpostavku da su proteini u oba matriksa glavne komponente koje mogu vezati fenole iz djevičanskog maslinovog ulja, mogao se očekivati čak i jače izražen utjecaj tofua. Naime, prema podacima iz tablica 2 i 3, udio proteina u suhoj tvari tofua kretao se oko 42 %, a u suhoj tvari skute samo oko 25 %. S druge strane, Rawel i sur. (2002) ukazali su na to da na interakcije fenolnih tvari i proteina značajno utječe aminokiselinski sastav te sekundarna i tercijarna struktura proteinskih molekula. Stoga je moguće objašnjenje za disproporciju u sadržaju ukupnih proteina i učinku skute odnosno tofua na udio fenola u ulju upravo u različitim karakteristikama proteina seruma mlijeka i proteina soje. Uz to, sukladno onom što su zaključili Klisović i sur. (2022), ne može se sa sigurnošću isključiti i mogućnost da i drugi sastojci u matriksu hrane (npr. ugljikohidrati) ulaze u

interakcije s fenolnim tvarima u djevičanskom maslinovom ulju. Prema podacima iz tablica 2 i 3, skuta i tofu imali su slične prosječne vrijednosti ukupnih ugljikohidrata na 100 g proizvoda, no uz značajne kvalitativne razlike - kod skute su to u cijelosti bili šećeri (laktoza), dok su kod tofua jednostavni šećeri činili svega 13 % ukupnih ugljikohidrata. Treba naglasiti da uklanjanje hidrofilnih fenola iz djevičanskog maslinovog ulja može biti povezano i s količinom vode koja je tijekom skladištenja migrirala iz komadića hrane u ulje. S obzirom na visoki afinitet tih fenola prema vodenoj fazi, vjerojatna je njihova migracija iz ulja u kapljice vode. Stoga se tom pojavom može djelomično objasniti dodatni pad udjela fenola u ulju nakon 21 dana skladištenja uz dodatak tofua (udio vode 0,67 %), koji nije bio zabilježen u uzorku s dodatkom skute i udjelom vode 0,23 %.

Budući da su se značajne promjene u sadržaju fenola pod utjecajem kontakta sa skutom ili tofuom dogodile već nakon sedam dana, u drugom dijelu eksperimenta vrijeme skladištenja tofua skraćeno je na sedam dana a promjene su praćene iz dana u dan. Uz to, temperatura čuvanja povišena je na  $6 \pm 2$  °C da se izbjegne skrućivanje ulja. Pad udjela fenola u takvim uvjetima tijekom sedam dana skladištenja ulja uz dodatak tofua nije bio linearan već je imao logaritamski tok. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosio je 0,96, što ukazuje na visoku reprezentativnost logaritamske regresije (slika 9). Nakon jednog dana skladištenja, udio fenola statistički se značajno smanjio za 37 % što može ukazivati na to da pojedini fenoli iz maslinovog ulja vrlo brzo ostvaruju interakcije s određenim proteinima tofua. Nakon sedam dana skladištenja, udio fenola u djevičanskom maslinovom ulju s dodatkom tofua smanjio se za čak 84 %. Velika razlika u smanjenju fenola između sedmog dana prvog dijela eksperimenta (za 53 %) i sedmog dana drugog dijela eksperimenta (za 84 %) može se barem djelomično pripisati tomu što je u prvom dijelu eksperimenta materijal čuvan na nižoj temperaturi ( $2 \pm 2$  °C). Niža temperatura dovela je do djelomične promjene agregatnog stanja ulja iz tekućeg u kruto, što je vrlo vjerojatno otežalo migraciju fenolnih tvari iz udaljenijih slojeva ulja prema površini komadića tofua.

U drugom dijelu eksperimenta praćen je i utjecaj različite razine punjenja staklenki tofuom na udio fenola pri čemu je pretpostavljeno da će veća količina tofua u djevičanskom maslinovom ulju (tj. veći omjer masa tofu/ulje) uzrokovati veće smanjenje udjela fenolnih tvari u ulju tijekom skladištenja. Na slici 10 uočava se da je smanjenje udjela fenola u odnosu na kontrolu nakon prvog dana skladištenja bilo statistički značajno za razine 100 % i 66 %, ali ne i za razinu 33 % punjenja staklenki tofuom. Iz dijagrama rasipanja prikazanog na slici 11 vidljivo je da se u tom slučaju radilo o čvrstoj negativnoj linearnoj povezanosti omjera masa



tofu/ulje s udjelom fenola u ulju ( $r = -0,98$ ). Tijekom tako kratkog kontakta s površinom uronjenog materijala, uglavnom su u prilici reagirati fenoli iz slojeva ulja u neposrednoj blizini. Kod viših razina punjenja bliski su slojevi ulja više zastupljeni nego kod niskih razina, pa je spomenuta čvrsta negativna linearna povezanost nakon jednog dana čuvanja razumljiva. Nakon sedam dana skladištenja, sve su se razine punjenja staklenki tofuom statistički značajno razlikovale po udjelu fenola (slika 10), pri čemu je, očekivano, najmanji pad fenola zabilježen kod razine 33 %, a najveći kod razine 100 %. Iz dijagrama rasipanja prikazanog na slici 12 može se zaključiti da je negativna linearna povezanost omjera masa tofu/ulje i udjela fenola u ulju bila značajna i nakon sedam dana skladištenja ( $r = -0,82$ ). Međutim, usporede li se koeficijenti determinacije linearne ( $R^2 = 0,68$ ) i logaritamske povezanosti ( $R^2 = 0,83$ ), proizlazi da nakon sedam dana skladištenja logaritamska regresija bolje opisuje međuovisnost omjera masa tofu/ulje i udjela fenola u ulju. To ukazuje na dodatni faktor koji utječe na dinamiku promjena fenolnih tvari djevičanskog maslinovog ulja koje se koristi kao naljev. Radi se o kretanju molekula iz udaljenijih prema bližim slojevima ulja uslijed koncentracijskog gradijenta, a koje kod nižih razina punjenja traje duže zbog veće dužine puta. Takva se situacija kod tradicionalnog načina čuvanja hrane u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja može dogoditi kad se komadići hrane u više navrata vade iz naljeva radi konzumiranja, čime se sukcesivno smanjuje omjer masa hrana/ulje.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju simulacije tradicionalnog postupka čuvanja komadića skute i tofua u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja te provedenog pokusa, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Tijekom čuvanja voda migrira iz skute i tofua u djevičansko maslinovo ulje uz značajan porast udjela vode u ulju nakon 21 dana - za oko tri puta kod skute te deset puta kod tofua u odnosu na početnu vrijednost.
2. Pokazatelji hidrolitičkog kvarenja ulja blago se ali statistički značajno smanjuju uslijed trodnevnog kontakta s materijalom u naljevu, uz nešto veći pad pod utjecajem tofua nego pod utjecajem skute.
3. Pokazatelji oksidacijskog kvarenja ulja statistički se značajno smanjuju već nakon sedam dana čuvanja uz minimalne razlike između dvaju materijala, pad K-vrijednosti se nakon toga usporava, a promjene  $K_{268}$  (sekundarni produkti oksidacije) više su izražene od promjena  $K_{232}$  (primarni produkti oksidacije).
4. Udio fenola u ulju statistički se značajno smanjuje već nakon sedam dana čuvanja pri  $2 \pm 2$  °C, uz minimalne razlike između dvaju materijala (za 48 % u kontaktu sa skutom i 53 % u kontaktu sa tofuom u odnosu na kontrolu); pad udjela fenola se nakon toga blago usporava.
5. Pad udjela fenola u ulju uslijed kontakta s tofuom tijekom sedam dana čuvanja pri  $6 \pm 2$  °C statistički je značajan i slijedi logaritamski tok - pad je najizraženiji tijekom prva dva dana čuvanja (za 37 % odnosno 60 % u odnosu na početnu vrijednost).
6. Udio fenola u ulju i omjer masa tofu/ulje u čvrstoj su negativnoj linearnoj povezanosti nakon prvog dana čuvanja pri  $6 \pm 2$  °C; nakon sedam dana čuvanja jače je izražena negativna logaritamska povezanost što ukazuje na to da je dužina puta molekula dodatni faktor u dinamici promjena udjela fenola u djevičanskom maslinovom ulju koje se koristi kao naljev.
7. Iako se ne može sa sigurnošću isključiti utjecaj vode te drugih sastojaka u matriksu hrane koji mogu ući u interakcije s fenolima u djevičanskom maslinovom ulju, rezultati ovog istraživanja doprinose razumijevanju dinamika promjena sastava ulja, a primjenom *Fast Blue BB* testa mogu se dobiti korisne informacije za evaluaciju ovog tradicionalnog postupka čuvanja hrane.

## 7. LITERATURA

1. Al-Ismail, K., Al-Awamleh S.A., Saleh, M, Al-Titi, H. (2018). Impacts of Oil Types and Storage Conditions on Milk Fat Quality of Strained Yogurt Immersed in Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96, 171-178.
2. Antunac, N., Hudik, S., Mikulec, N., Maletić, M., Horvat, I., Radeljević, B., Havranek, J. (2011). Proizvodnja i kemijski sastav Istarske i Paške skute. *Mljekarstvo*, 61(4), 326-335.
3. Bakarić, P., Bjeliš M., Brekalo, B., Bulimbašić-Botteri, M., Duić-Pribičević, V., Džidić, L., Elezović, D., Goreta, S., Gugić, J. i sur. (2008). Maslina i maslinovo ulje: A-Ž. Zagreb, Split, Naklada Zadro; Institut za jadranske kulture i melioraciju krša.
4. Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (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(8), 1679–1719.
5. Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Alarcón-de-la-Lastra, C. (2013). An up-date of olive oil phenols in inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4758–4776.
6. Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 458–479.
7. Da Cruz, R. M. S.; Vieira, M. M. C., ur. (2017). Mediterranean Foods: Composition and Processing. Florida: CRC Press
8. Donnelly, C. W., ur. (2016). The Oxford Companion to Cheese. New York: Oxford University Press.
9. EU (2013). Uredba 1308/2013 o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda.
10. EU (2021). Delegirana uredba 2022/2104 o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje.
11. Guan, X.; Zhong, X.; Lu, Y.; Du, X.; Jia, R.; Li, H.; Zhang, M. (2021). Changes of Soybean Protein during Tofu Processing. *Foods*, 10(7), 1594.

12. Han, J., Chang, Y., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Fustier, P., Lacroix, M. (2019). Interactions of phenolic compounds with milk proteins. *European Food Research and Technology*, 245(9), 1881-1888.
13. IOC – International Olive Council (2017). COI/T.20/Doc. No 34. Determination of free fatty acids, cold method.
14. IOC – International Olive Council (2019). COI/T.20/Doc. No 19. Spectrophotometric investigation in the ultraviolet.
15. Jakobek L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567.
16. Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9(8), 1014.
17. Jooyandeh, H. (2011). Soy Products as Healthy and Functional Foods. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7(1), 71-80.
18. Klisović, D.; Koprivnjak, O.; Novoselić, A.; Pleadin, J.; Lešić, T.; Brkić Bubola, K. (2022). Compositional Changes in the Extra Virgin Olive Oil Used as a Medium for Cheese Preservation. *Foods*, 11(15), 2329.
19. Koprivnjak, O. (2006). Djevičansko maslinovo ulje - od masline do stola. MIH, Poreč.
20. Macrae R., Robinskon R. K., Sadler M. J. (1993). Encyclopedia of food sciences and nutrition; volume 6: pH-Soya Milk. London: Academic Press.
21. Mailer, R., Beckingham, C. (2006). Testing olive oil quality: chemical and sensory methods. *Primefact*, 231.
22. Mateljan, G. (2018). Najzdravije namirnice svijeta. Zagreb: Mozaik knjiga i Zdravi grad Split.
23. Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970.
24. Pal, M., Devrani M., Ayele Y., (2019). Tofu: A Popular Food with High Nutritional and Health Benefits. *Food & Beverages Processing*, 5(4), 54-55.
25. Pavičić, Ž. (2006). Mlijeko od mužnje do sira. Zagreb: Gospodarski list, 110-111.

26. Pejović, J., Barbarić, M., Jakobušić Brala, C. (2014). Maslinovo ulje – sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva. *Farmaceutski glasnik*, 70(2), 69-86.
27. Peri, C. (2014). *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. Chichester: John Wiley & Sons.
28. Peyrot des Gachons, C., O'Keefe, A. J., Slade, L., & Beauchamp, G. K. (2021). Protein suppresses both bitterness and oleocanthal-elicited pungency of extra virgin olive oil. *Scientific Reports*, 11(1), 11851.
29. Pico, J., Pismag, R.Y., Laudouze, M., Martinez, M. M. (2020). Systematic evaluation of the Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds. *Food & Function*, 11, 9868-9880.
30. Pinarli B., Karliga E.S., Ozkan G., Capanoglu E. (2020). Interaction of phenolics with food matrix: In vitro and in vivo approaches. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 13, 63–74.
31. Rawel, H. M., Czajka, D., Rohn, S., & Kroll, J. (2002). Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(3-4), 137–150.
32. Rodríguez-López, P., Lozano-Sanchez, J., Borrás-Linares, I., Emanuelli, T., Menéndez. J.A., Segura-Carretero, A. (2020). Structure–Biological Activity Relationships of Extra-Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Health Properties and Bioavailability. *Antioxidants*, 9(8), 685.
33. Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., de la Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655–4680.
34. Sanmartin, C., Venturi, F., Sgherri, C., Nari, A., Macaluso, M., Flamini, G., Quartacci, M. F., Taglieri, I., Andrich, G., Zinnai, A. (2018). The effects of packaging and storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oil. *Heliyon*, 4(11), e00888.
35. Shalini, K.V., Sanjitha, S., Santhiya, S., Vasuki, V., Senthil, K. (2021). An overview of Tofu: History, Types, manufacturing process and health benefits. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 23(10), 505-514.

36. Shendi, E.G., Özyay, D.S., Özkaya, M.T. i Üstünel, N.F. (2019). Chemical characterization and storage stability of extra virgin olive oil extracted from Derik Halhalı cultivar. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 52-58.
37. Siano, F., Vasca, E., Picariello, G. (2022). Accurate determination of total biophenols in unfractionated extra-virgin olive oil with the fast blue BB assay. *Food Chemistry*, 370, 130990.
38. Sicari, V., Leporini, M., Romeo, R., Poiana, M., Tundis, R., Loizzo, M.R. (2021). Shelf-Life Evaluation of “San Marzano” Dried Tomato Slices Preserved in Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 10(8), 1706.
39. Tratnik, L.J., Božanić, R. (2012). Mlijeko i mliječni proizvod. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga.
40. Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98–112.
41. Tudor Kalit, M. (2019). Skuta – nježni biser mliječnih proizvoda. *Mljekarska revija Mlijeko i ja 2* (30), 22-23.
42. Walker, H., ur. (2003). The Fat of the Land: Proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cooking 2002. Oxford: Oxford Symposium.
43. Žanetić, M., Gugić, M. (2006). Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica*, 12(2), 159-173.

## 8. ŽIVOTOPIS

Doris Franjković rođena je 3. 11. 1999. u Ogulinu. Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja u Oštarijama, upisala je Gimnaziju Bernardina Frankopana u Ogulinu, smjer opća gimnazija. Srednju školu završila je 2018. godine i upisala preddiplomski stručni studij Sanitarno inženjerstvo na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Završila ga je 2021. godine i stekla titulu prvostupnice sanitarnog inženjerstva. Iste godine upisala je diplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Proglašena je najboljom studenticom 1. godine diplomskog sveučilišnog studija Sanitarno inženjerstvo u akademskog godini 2021./2022. te je osvojila Dekanovu nagradu za izvrsnost. Bila je članica organizacijskog odbora 5. i 6. Studentskog kongresa zaštite zdravlja „Sanitas“. Tijekom studiranja osvojila je državnu STEM stipendiju, stipendiju za darovite studente Karlovačke županije i stipendiju za izvrsnost Sveučilišta u Rijeci. Od studentskih poslova radila je kao administrator na cijepljenju protiv COVID-19.

## **Popis tablica**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablica 1.</b> Hidrofilne fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju ..... | 6  |
| <b>Tablica 2.</b> Prosječne hranjive vrijednosti skute u 100 g .....            | 10 |
| <b>Tablica 3.</b> Prosječne hranjive vrijednosti tofua u 100 g .....            | 10 |
| <b>Tablica 4.</b> Plan punjenja staklenki tofuom i uljem .....                  | 13 |
| <b>Tablica 5.</b> Plan izrade baždarnog pravca i rezultati apsorbancije.....    | 14 |



## Popis slika

|   |    |
|---|----|
| <b>Slika 1.</b> Strukturne formule predstavnika različitih fenolnih skupina. ....   | 7  |
| <b>Slika 2.</b> Staklenke napunjene materijalom: A - skuta s uljem (omjer masa skuta/ulje = 1,3), B - tofu s uljem (omjer masa skuta/ulje = 1,3), C - ulje bez dodataka.....  | 12 |
| <b>Slika 3.</b> Baždarni pravac za određivanje fenola.....  | 15 |
| <b>Slika 4.</b> Udio vode (%) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri $2 \pm 2$ °C. ....   | 18 |
| <b>Slika 5.</b> Udio slobodnih masnih kiselina (%) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri $2 \pm 2$ °C. ....  | 19 |
| <b>Slika 6.</b> Vrijednosti $K_{232}$ u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri $2 \pm 2$ °C. ....   | 20 |
| <b>Slika 7.</b> Vrijednosti $K_{268}$ u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri $2 \pm 2$ °C. ....   | 21 |
| <b>Slika 8.</b> Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak skute, odnosno tofua nakon 7, 14 i 21 dan skladištenja pri $2 \pm 2$ °C. ....   | 22 |
| <b>Slika 9.</b> Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz dodatak tofua tijekom 7 dana skladištenja pri $6 \pm 2$ °C.....   | 23 |
| <b>Slika 10.</b> Udio fenola (mg/kg) u djevičanskom maslinovom ulju uz različite razine punjenja staklenki tofuom: 33 % (T33), 66 % (T66) i 100 % (T100) nakon prvog i sedmog dana skladištenja pri $6 \pm 2$ °C..... | 24 |
| <b>Slika 11.</b> Linearna korelacija između udjela fenola u djevičanskom maslinovom ulju (mg/kg) i omjera masa tofua i ulja u staklenkama nakon prvog dana skladištenja pri $6 \pm 2$ °C. ....                        | 25 |
| <b>Slika 12.</b> Linearna i logaritamska korelacija između udjela fenola u djevičanskom maslinovom ulju (mg/kg) i omjera masa tofua i ulja u staklenkama nakon sedmog dana skladištenja pri $6 \pm 2$ °C.....         | 26 |