

# Promjene fenola i senzorskih svojstava tofua u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja

---

Repić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:184:070852>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Repić

**PROMJENE FENOLA I SENZORSKIH SVOJSTAVA TOFUA U NALJEVU OD  
DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Repić

**PROMJENE FENOLA I SENZORSKIH SVOJTAVA TOFUA U NALJEVU OD  
DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

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

Diplomski rad obranjen je dana 24. rujna. 2024. na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing. preh. teh. (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 46 stranica, 16 slika, 4 tablice i 35 literaturnih navoda.

## **Zahvala**

*Istraživanje za ovaj diplomski rad provedeno je u sklopu istraživačkog projekta „Fenoli i kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja kao medija za konzerviranje skute i tofua“ (uniri-iskusni-biomed-23-276) kojeg financira Sveučilište u Rijeci.*

*Zahvalila bih prije svega prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh., koja me inspirirala svojim znanjem, strpljivo usmjeravala, ispravljala i nesebično davala mnoge stručne i životne savjete kojih ću se uvijek rado sjećati.*

*Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Valeriji Majetić Germek, dipl. sanit. ing., koja mi je također bila velika potpora svojim iskustvom u laboratorijskom radu. Ovaj rad isto tako ne bi bio potpun bez zahvale Bojani Lukić, mag. sanit. ing. koja mi je uvijek rado pomagala u laboratoriju. Zahvaljujem i gospođi Ines Rossi iz Bajkina (Vižinada) koja je bez naknade obavila liofilizaciju tofua. Zahvaljujem i voditeljicama panela za senzorsku analizu djevičanskog maslinovog ulja iz Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču dr. sc. Karolini Brkić Buboli i dr. sc. Marini Lukić te članovima panela koji su bez naknade analizirali uzorke.*

*Zahvaljujem i svim sudionicima testa preferencije okusa koji su izdvojili svoje dragocjeno slobodno vrijeme kako bi kušali tofu i ispunili ocjenjivački listić. Zahvaljujem i obitelji i prijateljima (najviše Sari P.).*

## SAŽETAK

U ovom je radu simulirano čuvanje komadića tofua (svježeg i liofiliziranog) u naljevu od ekstra djevičanskog maslinovog ulja (EDMU-a) pri 8 °C tijekom sedam dana. Tofu je namirnica rastuće popularnosti zbog visokog sadržaja proteina, dok se EDMU tradicionalno koristi kao naljev za konzerviranje namirnica. EDMU sadrži hidrofilne fenole, a dosadašnja istraživanja ukazuju na moguće interakcije između proteina i fenolnih tvari. Pri kontaktu tofua i EDMU-a moguća je i migracija vode iz tofua u ulje te ulja u tofu. Posljedično, može se očekivati pad udjela hidrofilnih fenolnih tvari u ulju a porast u tofuu, te promjene senzorskih svojstava EDMU-a. Ukupni fenoli u ulju i liofiliziranom tofuu određeni su spektrofotometrijski primjenom reagensa Fast Blue BB, a kod ulja su određeni i standardni fizikalno-kemijski te senzorski pokazatelji kvalitete. Test preferencije okusa svježeg tofua proveden je s 47 sudionika metodom rangiranja. Tijekom sedam dana čuvanja udio fenola u EDMU-u statistički se značajno više smanjio u kontaktu sa svježim tofuom (za oko 56 %) u odnosu na kontakt s liofiliziranim tofuom (za oko 25 %), što ukazuje na važnu ulogu migracije vode iz tofua u ulje. Trend i dinamika porasta ukupnih fenola u liofiliziranom tofuu podudarni su s padom ovih tvari u EDMU-u korištenom kao naljev. Sedmodnevni kontakt ulja sa svježim tofuom nije doveo do nepovoljnih promjena fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće ulja ali je, zbog nastanka nepoželjnih senzorskih svojstava ulja blagog intenziteta te značajnog smanjenja poželjnih svojstava, rezultirao degradacijom u nižu tržišnu kategoriju kvalitete. Primjenom metode rangiranja nisu utvrđene preferencije potrošača prema okusu tofua koji je bio u kontaktu s EDMU-om. Poznavanje interakcija između proteina i fenola važno je zbog mogućeg utjecaja na bioraspoloživost fenola. Međutim, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da uzrok pada fenola u EDMU-u u kontaktu sa svježim tofuom nije samo vezanje fenola na proteine već i otapanje fenola u vodi koja migrira iz tofua u ulje.

**Ključne riječi:** tofu, djevičansko maslinovo ulje, fenoli, proteini

## CHANGES IN PHENOLS AND SENSORY PROPERTIES OF TOFU IMMERSSED IN VIRGIN OLIVE OIL

### ABSTRACT

This study simulated the preservation of tofu pieces (both fresh and freeze-dried) in an infusion of extra virgin olive oil (EVOO) at 8 °C for seven days. Tofu, known for its high protein content, is becoming increasingly popular, while EVOO is traditionally used as a medium for food preservation. EVOO contains hydrophilic phenols and previous studies suggest possible interactions between proteins and phenolic compounds. When tofu and EVOO come into contact with each other, water can migrate from the tofu into the oil and oil into the tofu, resulting in a decrease of hydrophilic phenols in the oil and an increase in the tofu. The sensory properties of the oil can also change. The total phenols in the oil and in the freeze-dried tofu were measured spectrophotometrically using the Fast Blue BB reagent and the physico-chemical and sensory quality indicators for the oil were determined. In addition, the taste preference test of fresh tofu was carried out with 47 participants using the ranking method. During the seven-day storage period, the phenolic content in EVOO in contact with fresh tofu decreased significantly more (approx. 56 %) than with freeze-dried tofu (approx. 25 %). This indicates that water migration from tofu to oil plays an important role. The trend and dynamics of the increase in total phenols in freeze-dried tofu were consistent with the decrease in phenols in the oil infusion. Although the seven-day contact with fresh tofu did not lead to unfavourable changes in the physico-chemical quality indicators of the oil, undesirable slight sensory changes and a reduction in desirable properties placed the oil in a lower market quality category. When applying the ranking method used in the consumer preference test, no preference was found for tofu that had been in contact with EVOO. Understanding the interactions between proteins and phenols is important due to their potential impact on the bioavailability of phenols. However, the results of this study suggest that the decrease in phenol content in EVOO upon contact with fresh tofu is not only due to the binding of the phenol to the proteins, but also to the dissolution of the phenol in the water that migrates from the tofu into the oil.

**Key words:** tofu, extra virgin olive oil, phenols, proteins

## Sadržaj:

1.	UVOD .....	1
	PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	2
1.1.	Tofu.....	2
1.1.1.	Proteini soje.....	3
1.2.	Djevičansko maslinovo ulje .....	4
1.2.1.	Fenolne tvari u ekstra djevičanskom maslinovom ulju .....	6
1.3.	Interakcije fenola i proteina .....	7
1.4.	Čuvanje hrane u naljevu od EDMU-a.....	8
2.	CILJEVI RADA.....	11
3.	MATERIJALI I METODE .....	12
3.1.	Materijali.....	12
3.1.1.	Tofu .....	12
3.1.2.	Ekstra djevičansko maslinovo ulje .....	12
3.1.3.	Kemikalije .....	12
3.1.4.	Instrumenti i pribor.....	13
3.2.	Metode .....	13
3.2.1.	Priprema tofua u naljevu od ekstra djevičanskog maslinovog ulja .....	13
3.2.2.	Određivanje fenola <i>Fast Blue BB</i> testom u uzorcima ulja.....	15
3.2.3.	Određivanje fenola <i>Fast Blue BB</i> testom u uzorcima odmašćenog lio-tofua .....	17
3.2.4.	Određivanje slobodnih masnih kiselina i peroksidnog broja u uzorcima ulja .....	20
3.2.5.	Određivanje $K_{232}$ i $K_{280}$ u uzorcima ulja .....	21
3.2.6.	Senzorska analiza djevičanskog maslinovog ulja.....	21
3.2.7.	Test preferencije okusa tofua.....	22
3.2.8.	Određivanje vlage u tofuu .....	22
3.2.9.	Statistička obrada podataka .....	23
4.	REZULTATI.....	24
5.	RASPRAVA .....	29
5.1.	Dinamika promjena sadržaja ukupnih fenola EDMU-a tijekom kontakta s tofuom.....	29
5.2.	Dinamika promjena sadržaja ukupnih fenola lio-tofua tijekom kontakta s EDMU-om .....	31
5.3.	Promjene standardnih fizikalno-kemijskih pokazatelja kvalitete i senzorskih svojstava EDMU-a tijekom kontakta s tofuom.....	32
5.4.	Preferencije potrošača prema okusnim svojstvima tofua iz naljeva od EDMU-a.....	34
6.	ZAKLJUČCI.....	36
7.	LITERATURA .....	37



8.	ŽIVOTOPIS.....	41
	POPIS TABLICA.....	42
	POPIS SLIKA.....	43

## 1. UVOD

Fenoli, kao jedna od najvažnijih i najkorisnijih biljnih sastavnica, prirodne su komponente hrane s raznolikim strukturama i funkcijama. Uglavnom sadrže jedan ili dva aromatska prstena s jednim ili više hidroksilnih supstituenata. Velike molekule poput lipida, proteina i ugljikohidrata mogu djelovati kao nosači fenola kroz gastrointestinalni trakt, čime štite fenole od oksidacijske razgradnje. Međutim, interakcije fenola s makromolekulama mogu utjecati na dostupnost fenola za apsorpciju i daljnje procese u organizmu. Kemijski sastav fenolnih spojeva varira među različitim biljkama, a maslina je poznata po visokom udjelu fenola. U proizvodnji hrane fenoli mogu utjecati na karakteristike kvalitete pojedinih proizvoda, uključujući nutritivnu vrijednost te senzorska svojstva poput okusa i izgleda. Prepoznatljiva gorčina i oporost pojedine hrane biljnog podrijetla najčešće potječu od fenola, što je slučaj i s ekstra djevičanskim maslinovim uljem (EDMU). Nutritivna vrijednost fenola povezana je s njihovim antioksidacijskim djelovanjem, a oni su najzastupljeniji prirodni antioksidansi u prehrani. Njihov povoljan učinak na funkcioniranje organizma temelji se na zaštiti različitih tkiva od oksidacije i time prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i različitih upalnih procesa.

Ekstra djevičansko maslinovo ulje poznato je po visokom udjelu fenola u svom sastavu, ali osim visokog udjela fenola, EDMU sadrži i druge blagotvorne sastavnice. Maslinovo ulje koristi se već stoljećima kao naljev za konzerviranje lako kvarljive hrane, no malo je podataka o interakcijama fenola iz maslinovog ulja s tvarima iz namirnica koje se tako konzerviraju.

Tofu ili „sir od soje”, svježi je proizvod dobiven koagulacijom sojinog napitka („sojinog mlijeka“) pomoću koagulanta. Tofu je često korištena namirnica u prehrani vegetarijanaca i vegana kao jedna od zamjena za mliječne proizvode. Osim kod vegana, popularnost tofua je u porastu i kod ostatka populacije zbog njegovog nutritivnog sastava bogatog biološki vrijednim proteinima. S obzirom na navedeno, razumljiv je interes za istraživanje mogućih interakcija fenola i proteina soje uz promjene molekulskih struktura, ali i za istraživanje time uzrokovanih promjena senzorskih svojstava ekstra djevičanskog maslinovog ulja te preferencija potrošača u odnosu na okusna svojstva tofua.

## PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

### 1.1. Tofu

Najpopularnija teorija o podrijetlu tofua tvrdi da ga je izumio Liu An, princ iz dinastije Han u sjevernoj Kini oko 164. godine p.n.e., iako su tehnike proizvodnje tofua vjerojatno postojale mnogo prije tog vremena. Prema drugoj teoriji, tofu je nastao slučajno kada je kaša od kuhanih mljevenih sojinih zrna bila pomiješana s nepročišćenom morskom soli koja sadrži kalcijeve i magnezijeve soli, što je uzrokovalo zgrušavanje sojine smjese i stvaranje gela. Stari su Kinezi sojin napitak od davnina konzumirali kao slanu juhu, a u trećoj se teoriji tvrdi da su do metode njegovog zgrušavanja došli oponašanjem mongolskih i istočnoindijskih tehnika zgrušavanja mlijeka muznih životinja. Primarni temelj za ovu teoriju leži u etimološkoj sličnosti između kineskog izraza za mongolsko fermentirano mlijeko (*rufu*, što doslovno znači „pokvareno mlijeko“) i izraza *doufu* ili tofu (New World Encyclopedia contributors, 2023.).

Tofu je tradicionalni sastojak kuhinja Indonezije, Japana, Koreje, Vijetnama, Singapura i Tajlanda. Bogat je izvor proteina, esencijalnih aminokiselina, kalcija, željeza i drugih minerala. Tofu se može praviti i od drugih mahunarki, a tofu od slanutka je dobra alternativa sojinom tofuu (Shalini i sur., 2021).

Priprema tofua (slika 1) započinje namakanjem suhih sojinih zrna 9 - 10 sati na nižim temperaturama (22 °C), dok na višim temperaturama (32 °C) proces traje 4 - 6 sati, nakon čega slijedi mljevenje soje. Ljuske soje se mogu ukloniti prije mljevenja, koristeći rotirajuće gumene valjke kako bi se poboljšala boja i ublažio nepoželjni okus mahunarki kod tofua. U svrhu ublažavanja okusa mahunarki kod tofua te povećanja njegove glatkoće, soja se može prethodno tretirati natrijevim bikarbonatom (Shalini i sur., 2021).



**Slika 1.** Proces dobivanja tofua iz soje (Guan i sur., 2021)

Nakon mljevenja, smjesa se odvaja na čvrstu pulpu (*okaru*) i sojin napitak tj. mlijeko. Potom se sojino mlijeko kuha na 100 °C do 110 °C tokom 3 - 10 minuta, čime se denaturiraju proteini i dodatno uklanja okus mahunarki. Zgrušavanje sojinog mlijeka postiže se dodavanjem soli koagulansa (poput kalcijevih i magnezijevih klorida i sulfata), a ponekad se koriste limunska kiselina ili glukono delta-lakton kao kiseli koagulansi. Gruš se oblikuje u bijele blokove različite mekoće koji se potom čuvaju za daljnju upotrebu. Konačni tofu proizvod dobiva se prešanjem gruš, a struktura i sadržaj sojinih proteina prolaze kroz brojne promjene tijekom cijelog procesa proizvodnje (Guan i sur., 2021).

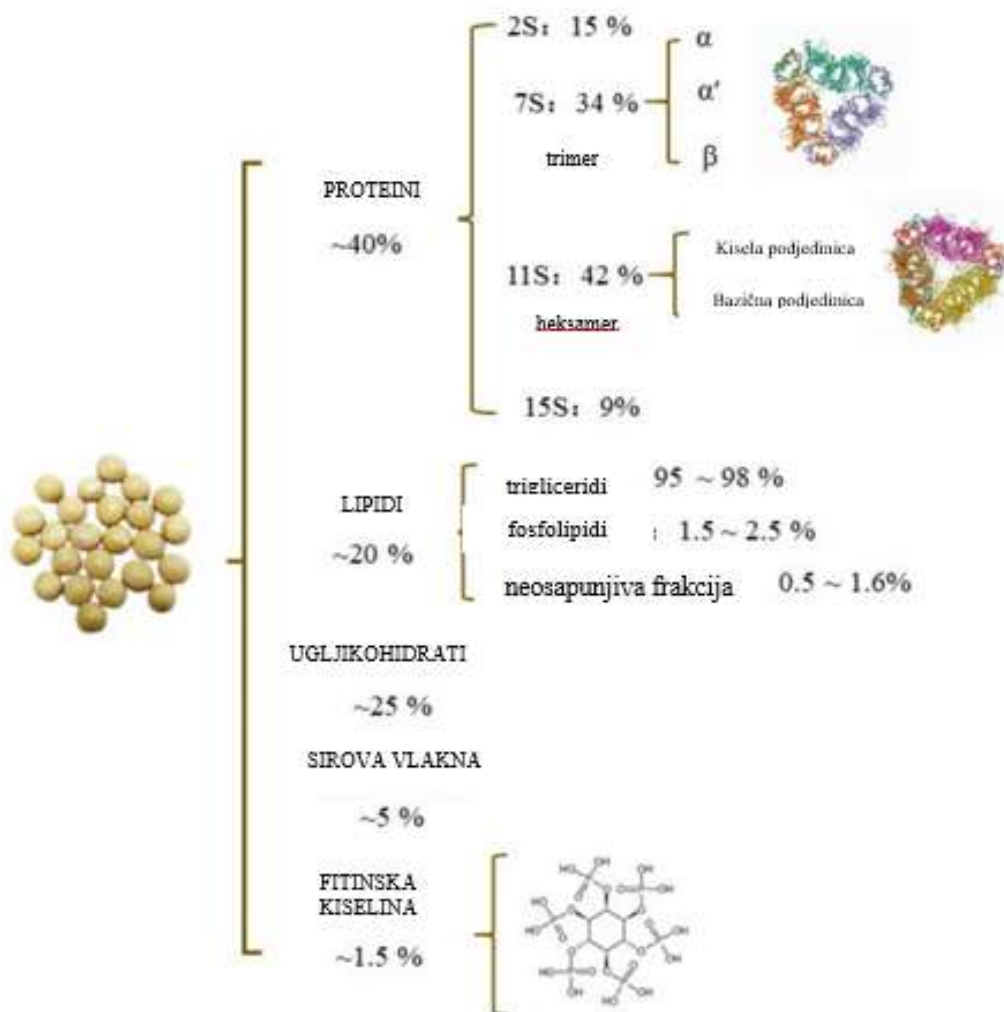
Na kvalitetu konačnog proizvoda utječu sorte soje, kvaliteta i uvjeti skladištenja sirovine, namakanje, mljevenje, predobrada sojinog mlijeka, vrste koagulansa, radni uvjeti, prešanje i pakiranje. Tekstura tofua može biti čvrsta, čvrsto-omekšana i omekšana (Guan i sur., 2021, Shalini i sur., 2021).

Tofu sadrži relativno visok udio proteina, lipida, vitamina, minerala i izoflavona. U proteinima je sadržano svih devet esencijalnih aminokiselina: histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin (Shalini i sur., 2021).

#### 1.1.1. Proteini soje

Soja se sastoji od otprilike 40 % proteina, 20 % lipida, 25 % ugljikohidrata i 5 % sirovih vlakana (slika 2). Također je bogat izvor izoflavona, minerala i drugih korisnih sastojaka.

Proteini soje mogu se klasificirati prema topljivosti, fiziološkoj funkciji i brzini centrifugalne sedimentacije. Prema topljivosti razlikuju se globulini i albumini. Na temelju fizioloških funkcija mogu biti skladišni i biološki aktivni proteini. Prema brzini centrifugalne sedimentacije postoje komponente 2S, 7S, 11S i 15S (S označava koeficijent sedimentacije, gdje je  $1S = 10^{-13} s = 1$  Svedberg), a svaka komponenta sastoji se od proteinskih molekula sličnih molekulskih masa (Han i sur., 2001.).



**Slika 2.** Nutritivni sastav soje (Guan i sur., 2021.)

Funkcionalna svojstva sojinih proteina uglavnom uključuju želiranje, emulgiranje i pjenjenje, od kojih je želiranje osnova za nastanak tofua. Tijekom proizvodnje tofua, sojini proteini prolaze kroz reakcije disocijacije ili asocijacije tijekom kiselinsko-bazne i toplinske obrade, što mijenja ionsku snagu otopine. Pri tome 11S glicinin polimerizira u dimere, oligomere ili multimere, ili disocira u 7S i 3S komponente (Guan i sur., 2021.).

## 1.2. Djevičansko maslinovo ulje

Prema Delegiranoj uredbi EU 2022/2104 o dopuni Uredbe EU 1308/2013, djevičanska maslinova ulja na tržištu razvrstavaju se na temelju fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava

u dvije kategorije kvalitete: „ekstra djevičansko maslinovo ulje“ i „djevičansko maslinovo ulje“. U kategoriju „maslinovo ulje *lampante*“ spadaju ulja koja nisu jestiva jer ne zadovoljavaju minimalne zahtjeve kvalitete te se mogu koristiti u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, no nikako za prehranu ljudi (Alnemer i sur., 2022).

Prema Uredbi EU 1308/2013 o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda, djevičansko maslinovo ulje dobiva se iz ploda masline (*Olea europaea* L.) isključivo mehaničkim ili fizikalnim postupcima, bez upotrebe pomoćnih kemijskih sredstava. Dok se sjemenska ulja često proizvode ekstrakcijom organskim otapalima, ekstra djevičansko maslinovo ulje (EDMU) dobiva se drobljenjem ploda masline koristeći samo vodu na sobnoj temperaturi tijekom malaksacije (gnječenja). Ovaj proces pomaže očuvanju prirodno prisutnih fenola u ulju. Dakle, maslinovo ulje je u biti sok od ploda masline. Da bi bilo klasificirano kao "ekstra djevičansko", mora zadovoljiti određene kemijske i senzorske standarde. Kvalitetu i čistoću EDMU-a regulira nekoliko međunarodnih organizacija, uključujući Europsku uniju (EU), Međunarodno vijeće za masline (*International Olive Council*, IOC) i *Codex Alimentarius* (Romani i sur., 2019.).

Proces proizvodnje počinje pripremom sirovine, gdje se plodovi masline očiste od grančica i lišća, zemlje i ostalih nečistoća te operu vodom radi potpunog uklanjanja nečistoća ili primjesa. Plodovi koji se koriste za dobivanje ekstra djevičanskih maslinovih ulja iznimne su kvalitete, bez oštećenja koja mogu potaknuti hidrolitičko kvarenje. Zatim se plodovi melju kamenim ili metalnim mlinovima kako bi se oslobodilo što je moguće više ulja iz stanica ploda. Ovaj proces stvara maslinovo tijesto koje se miješa radi razbijanja emulzije i boljeg povezivanja kapljica ulja (Flynn i sur., 2023., Koprivnjak, 2006.).

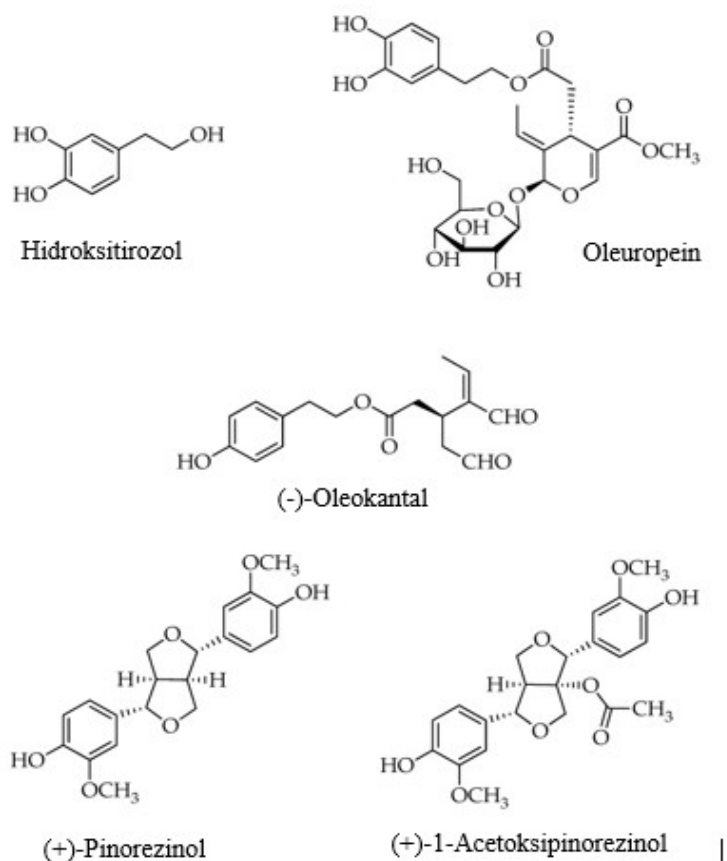
Nakon pripreme tijesta slijedi ekstrakcija ulja, koja se može provesti na tri načina: prešanjem, centrifugiranjem ili procjeđivanjem. Dobiveno ulje u pravilu je mutno zbog prisutnosti čestica biljnog tkiva i kapljica biljne vode, koje se s vremenom talože na dnu spremnika. Ovaj talog se uklanja redovitim pretakanjem ili filtriranjem (Koprivnjak, 2006.).

Djevičansko maslinovo ulje najviše se proizvodi u mediteranskim zemljama i značajan je dio mediteranske prehrane, ali i kulture, gdje je glavni izvor masti i doprinosi zdravstvenim dobrobitima. U usporedbi s drugim prehranbenim masnoćama, EDMU je superiorna namirnica u upravljanju kliničkim biomarkerima uključujući snižavanje krvnog tlaka i LDL-kolesterola, povećanje zaštitnog HDL-kolesterola, poboljšanje kontrole glikemije i reguliranje tjelesne mase. Stoga se redovita upotreba EDMU-a promovira u kontekstu zdravih prehranbenih

obrazaca kao što je mediteranska prehrana. Zaštitni učinci EDMU-a vjerojatno su više posljedica sadržaja fenolnih tvari, a manje sadržaja mononezasićenih masti (Flynn i sur., 2023).

### 1.2.1. Fenolne tvari u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

Plod *Olea europaea* sadrži visoke razine gliceridnih estera masnih kiselina koji nakon dobivanja ulja iz ploda čine čak 98 – 99 % mase EDMU-a. Osim gliceridnih estera masnih kiselina, u malim količinama (1 - 2 %) zastupljeni su i fenoli, fitosteroli, tokoferoli i skvalen. Među ovim manje zastupljenim komponentama, fenoli su posebno značajne molekule za



**Slika 3.** Kemijska struktura glavnih fenolnih spojeva pronađenih u *Olea europaea* (Romani i sur., 2019.)

ljudsko zdravlje, a kao antioksidansi igraju ključnu ulogu u produženju vijeka trajanja EDMU-a. Na slici 3 prikazane su kemijske strukture glavnih fenolnih spojeva iz ploda masline, koji kasnije opstaju i u EDMU-u. Primarni antioksidansi u EDMU-u su *orto*-difenoli koji inhibiraju

oksidacijske procese donirajući radikalni vodik alkilperoksidnim radikalima, nastalim oksidacijom lipida, te stvaranjem stabilnih derivata tijekom reakcije. Fenolna frakcija EDMU-a sastoji se od jednostavnih fenola, lignana i sekoiridoida, čija su antioksidacijska svojstva i aktivnost opsežno proučavana (Servili i sur., 2013.).

### 1.3. Interakcije fenola i proteina

Proteini mogu formirati veze s polifenolima i drugim fenolnim spojevima, a te interakcije su uglavnom nekovalentne prirode, uključujući hidrofobne interakcije koje se mogu dodatno stabilizirati vodikovim vezama. Nekovalentno vezanje uključuje i van der Waalsove te ionske interakcije. Ove su veze slabije od kovalentnih i uvijek su reverzibilne. Brojnim *in vitro* studijama dokazano je da su takve veze prvenstveno hidrofobne prirode, iako s nekim hidrofilnim karakteristikama. U *in vitro* istraživanju Kanakisa i suradnika (2011) proučavano je kompleksiranje polifenola iz čaja s  $\beta$ -laktoglobulinom i zaključeno je da vezanje uključuje hidrofilne i hidrofobne interakcije te da nekoliko aminokiselinskih ostataka  $\beta$ -laktoglobulina, koji razmotava svoju globularnu strukturu prilikom kompleksiranja s polifenolima, sudjeluje u stvaranju polifenol-proteinskih kompleksa.

Proučavanjem molekulskih interakcija između proteina mlijeka (kalcijevog kazeinata i proteina sirutke) i fenolnih spojeva utvrđeno je da su ne samo čisti fenolni spojevi (epigalokatehin galat i taninska kiselina), već i prirodni polifenoli (ekstrakti zelenog čaja, grožđa i brusnice) pokazali snažnu hidrofobnu vezu s kalcijevim kazeinatom. S druge strane, proteini sirutke i polifenoli gotovo da nisu međusobno djelovali. Visoki afinitet polifenola prema kazeinu može doprinijeti zadržavanju i pohranjivanju funkcionalnih fenola u siru (Han i sur., 2019.).

Kako navode Ozdal i suradnici (2013.) u svom preglednom radu, kovalentne veze između fenolnih i aminokiselinskih skupina nastaju zbog ireverzibilnih interakcija između proteina i fenola. U tom procesu fenoli se pretvaraju u kinone, koji zatim mogu reagirati s nukleofilnim skupinama na molekuli proteina. Najistaknutije karakteristike koje su se pokazale značajne prilikom vezanja proteina i fenola jesu molekulska masa, strukturna fleksibilnost i broj OH skupina u molekuli fenola. Polifenoli (poput tanina) s velikom molekulskom masom imaju veću sposobnost da se snažnije i trajnije vežu za proteine. Ipak, da bi fenolni spojevi imali visok afinitet prema proteinima, moraju biti dovoljno mali da mogu prodrijeti u međufibrilarne



regije proteinskih molekula, ali također dovoljno veliki da mogu umrežiti peptidne lance na više od jedne točke. U istom je preglednom radu istaknuto i da se strukturno fleksibilni polifenoli podjednako vežu za različite proteine (želatinu i goveđu serumski albumin) dok su manje fleksibilni polifenoli (elagitanini) pokazali jače vezanje za neke proteine (želatinu) a slabije vezanje s ostalim proteinima (goveđi serumski albumin). Što se tiče brojnosti OH-skupina, polifenoli s većim brojem OH skupina lakše vežu proteine i imaju veći kapacitet proteinsko-polifenolnog kompleksiranja.

U prisutnosti proteina, neke funkcije polifenola, poput njihove antioksidacijske aktivnosti, mogu biti „maskirane“. S druge strane, zahvaljujući tim interakcijama, proteini mogu djelovati kao nosači polifenola kroz gastrointestinalni trakt, štiteći ih od oksidacijskih reakcija (Jakobek i sur., 2014). Neka istraživanja (Green i sur., 2007, Qiu i sur., 2017, Keogh i sur., 2007, Neilson i sur., 2009) sugeriraju da interakcije između proteina i polifenola mogu utjecati na bioraspoloživost polifenola, tj. na to koliko fenola organizam uspije apsorbirati i dalje koristiti. Povećanje ili smanjenje bioraspoloživosti može varirati ovisno o raznim čimbenicima, kao što su koncentracija tvari u hrani, temperatura, pH vrijednost, vrsta tvari te hidrofилna ili hidrofobna svojstva. U raznim konditorskim proizvodima, uključujući napitke od kaka, tamnu čokoladu s visokim udjelom šećera i mliječnu čokoladu, Keogh i suradnici (2007) dokazali su da mliječni proteini ne utječu na biodostupnost i bioraspoloživost polifenola.

Povećanje broja *in vitro* i posebno *in vivo* studija o bioraspoloživosti fenolnih spojeva u kontaktu s različitim prehrambenim matricama pomoći će u dizajniranju funkcionalne hrane obogaćene fenolnim tvarima (Pinarli i sur., 2020).

#### 1.4. Čuvanje hrane u naljevu od EDMU-a

U mediteranskoj prehrani česta je praksa konzerviranje namirnica lako kvarljive prirode u naljevu od EDMU-a. Tradicionalni sirari na otocima Braču i Krku konzerviraju svoje sireve u maslinovom ulju. U južnoj Hrvatskoj, posebice u Dubrovniku i na otoku Mljetu, sir se često čuva u mješavini maslinovog ulja i komercijalnog suncokretovog ulja i to do dvije godine. Sirevi koji se potapaju u ulje i u njemu dozrijevaju mogu biti različitih konzistencija. Na primjer, sirevi iz Dubrovnika i Mljeta stave se u ulje nakon sedmodnevnog zrenja na zraku, dok sirevi s Brača i Krka dozrijevaju u ulju nakon najmanje dva mjeseca prethodnog zrenja na zraku (Levak i sur., 2023).

U istraživanju koje su proveli Klisović i suradnici (2022), ubrzana hidrolitička i oksidacijska razgradnja primijećena je u EDMU-u pohranjenom s uronjenim sirom u usporedbi s uljem pohranjenim bez sira. Određivanjem parametara kvalitete i analizom sastava masnih kiselina autori su u tom istraživanju pokazali da hidrofilni fenolni spojevi imaju zanemariv utjecaj na oksidacijsku stabilnost u uvjetima čuvanja u mraku na temperaturi od 12 °C ( $\pm 1$  °C). Promjene u sastavu ulja bile su uglavnom rezultat migracije spojeva između sira i ulja. K<sub>232</sub>, miristinska kiselina (C14:0) i transoleinska masna kiselina (C18:1t) premašile su najviše dopuštene granice za EDMU, što ukazuje na to da standardni analitički parametri nisu prikladni za ocjenjivanje kvalitete i autentičnosti djevičanskih maslinovih ulja koja su korištena kao naljev za sir (Klisović i sur., 2022).

S druge strane, konzerviranje, primjerice, kozjeg sira u ulju, pozitivno utječe na njegova senzorska svojstva. Zrenje u ulju smanjuje debljinu kore i općenito poboljšava okus, teksturu i izgled sira. Zrenje u ulju sprječava razvoj nepoželjne teksture i suhoće sira, što ne samo da produžuje njegovu trajnost u periodima kada nema dostupnog kozjeg mlijeka, već također smanjuje količinu otpada hrane (Levak i sur., 2023).

Migracija ulja između različitih faza u višekomponentnim prehrambenim sustavima predstavlja veliki problem za proizvođače hrane jer može dovesti do značajnih promjena u strukturi i funkcionalnosti prehrambenih proizvoda. Primjerice, u konditorskim proizvodima migracija ulja je dvosmjerni difuzijski proces, potaknut koncentracijskim gradijentom triacilglicerola između faze bogate uljem (poput mekog punjenja) i kristalne faze bogate mastima. Različite kemijske i fizikalne tehnike koriste se za praćenje i analizu migracije ulja. Ipak, nedovoljno je podataka koji govore o točnim interakcijama pojedinih molekula za vrijeme stajanja u naljevu (Maleky, 2018). Osim interakcije molekula između EDMU-a i u njemu konzervirane namirnice, ovisno o uvjetima čuvanja, može doći i do promjena standardnih pokazatelja kvalitete EDMU-a. Hidrolitička užeglost obično je posljedica lipolize triacilglicerola i fosfolipida lipazama koje oslobađaju mješavinu masnih kiselina različitih duljina lanca, uključujući kratke lance koji su odgovorni za takvu vrstu užeglosti. Masne kiseline oslobođene iz ulja za naljev obično su dugih lanca koji ne pridonose okusu proizvoda. Ipak, hlađenje značajno smanjuje lipolizu triacilglicerola jer niska temperatura inhibira aktivnost lipaza. Pri sobnoj temperaturi hidrolitička užeglost je više izražena, neovisno o tome je li naljev od EDMU-a skladišten u mraku ili na svjetlu (Al-Ismail i sur., 2018).

U istraživanju koje su proveli Castillo-Luna i suradnici (2024), proučavane su koncentracije fenola u namirnicama (riba, meki i tvrdi sir, povrće) u naljevu od EDMU-a kroz

trideset dana. Dva jednostavna fenola, tirozol i hidrokstirozol, te oleuropein aglikon bili su glavni fenoli EDMU-a koji su prešli u hranu. U mekom su siru koncentracije fenola hidrokstirozola i tirozola značajno porasle nakon tri i pet dana stajanja u naljevu. Tvrdi i meki sirevi pokazali su određene razlike u pogledu fenolnog obogaćivanja. U odnosu na preporučeni dnevni unos, meki sir dosegao je optimalnu razinu obogaćenja (5,8 mg fenola na 50 g) petog dana. Obogaćivanje tvrdog sira fenolima bilo je statistički značajno veće (7,9 mg fenola na 50 g) iako nešto kasnije tj. osmog dana stajanja u naljevu od EDMU-a. Svim je istraživanim namirnicama (ribi, povrću i sirevima) bilo zajedničko to što je hidrokstirozol dostigao najviše vrijednosti od druge polovice razdoblja stajanja. Istraživanjem je dokazano fenolno obogaćivanje hrane u naljevu od EDMU-a, a to se uklapa u strategiju povećanja funkcionalne vrijednosti takve hrane zbog bioaktivnih svojstava fenola. Ova tehnika konzerviranja, koja se i komercijalno primjenjuje, može biti strategija za poboljšanje zdravstvenih prednosti i antioksidacijskog potencijala hrane (Castillo-Luna i sur., 2024).

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

- 1) Utvrditi dinamiku promjena sadržaja ukupnih fenola EDMU-a tijekom kontakta s tofuom.
- 2) Istražiti ulogu vode u tofuu u promjeni sadržaja ukupnih fenola EDMU-a tijekom kontakta s tofuom.
- 3) Provjeriti dolazi li do vezanja fenolnih tvari iz EDMU-a na tofu zbog interakcija fenola i sastojaka tofua.
- 4) Utvrditi promjene standardnih pokazatelja kvalitete EDMU-a uslijed kontakta s tofuom te utvrditi preferencije potrošača premaokusnim svojstvima tofua iz naljeva od EDMU-a.

Polazne hipoteze na kojima se temeljio plan istraživanja bile su sljedeće:

- 1) Višednevni kontakt svježeg tofua i EDMU-a u većoj će mjeri uzrokovati smanjenje fenola u EDMU-u od kontakta liofiliziranog tofua i EDMU-a pri čuvanju pod jednakim uvjetima.
- 2) Udio fenola u liofiliziranom tofuu postupno će rasti tijekom višednevnog kontakta s EDMU-om.
- 3) Višednevni kontakt svježeg tofua i EDMU-a uzrokovat će degradaciju kvalitete EDMU-a.
- 4) Potrošači će u većoj mjeri preferirati tofu koji je duže vremena bio u kontaktu s EDMU-om.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Tofu

Sva pojedinačna pakiranja tofua korištena u istraživanju (slika 4) nabavljena su u jednom od supermarketa u Rijeci i bila su istog broja lota, s trajnošću od najmanje 9 mjeseci od početka pokusa („najbolje upotrijebiti do 15. 3. 2025.“), uz napomenu da se nakon otvaranja treba pohraniti u hladnjaku i konzumirati u roku od dva dana nakon otvaranja. Prosječna hranjiva vrijednost proizvoda prikazana je u tablici 1, iz koje računski proizlazi da je deklarirani prosječni udio suhe tvari bio 19,6 g u 100 g proizvoda, od čega su proteini činili oko 61 %.



**Slika 4.** Zapakirani tofu prije rezanja

**Tablica 1.** Prosječna hranjiva vrijednost 100 g tofua

Energija	507 kJ/ 122 kcal
Masti	7,1 g
od kojih zasićene masne kiseline	1,2 g
Ugljikohidrati	0,5 g
od kojih šećeri	0,5 g
Vlakna	3,2 g
Proteini	12 g
Sol	0 g

##### 3.1.2. Ekstra djevičansko maslinovo ulje

Ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiveno preradom maslina iz berbe 2023. godine dobavljeno je od lokalnog proizvođača s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva na području Istre.

##### 3.1.3. Kemikalije

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- izooktan (Spectrosol) spektrofotometrijske čistoće, Carlo Erba, Italija
- n-heksan, Carlo Erba, Italija

- etanol 96-postotni V/V p.a., Gram-Mol d.o.o., Hrvatska, natrijev hidroksid, zrnca 1-2,5 mm, p. a., T.T.T., Hrvatska
- Fast Blue BB reagens [4-benzoilamino-2,5-dietoksibenzendiazonijev klorid hemi (cink klorid)] sol, Sigma-Aldrich, SAD, udio boje  $\geq 80$  %

#### 3.1.4. Instrumenti i pribor

Od laboratorijskih uređaja korišteni su:

- liofilizator - Proizvođač: Kambič d.o.o., Metliška cesta 16, 8333 Semič (Slovenija)  
Model: FREEZE DRYER, model LIO-20 FP, godina proizvodnje 2024.
- spektrofotometar HACH DR/400, Colorado, SAD
- semimikro analitička vaga Mettler Toledo, Švicarska
- digitalna vaga Kern & Sohn, Njemačka
- centrifuga Hettich EBA 200, Njemačka
- Vortex, IKA, GENIUS 3, Njemačka
- magnetska miješalica, IKA, Njemačka
- analizator vlage/ vlagomjer HE73, Mettler Toledo, Švicarska
- rotacijski vakuumski uparivač RV 10 digital, IKA, Njemačka
- horizontalna tresilica, IKA KS 130 basic, Njemačka
- sterilizator – sušionik ST 80, INKO, Hrvatska.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema tofua u naljevu od ekstra djevičanskog maslinovog ulja

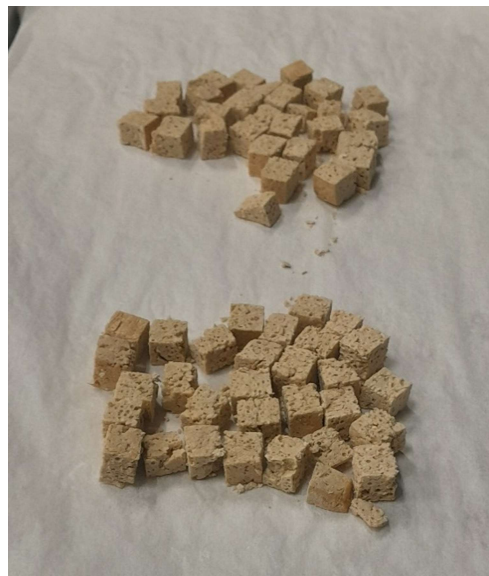
Svježi tofu izvađen je iz plastičnog vakuumiranog pakiranja, ocijeđen od vodene otopine te potom narezan nožem i pomagalom nastojeći da svi komadići budu približno istih dimenzija (1,5 cm × 1,2 cm × 1,2 cm). Tarirane staklenke volumena 170 mL napunjene su u prosjeku s po  $60,3 \pm 0,3$  g komadića tofua (maseni udio tofua 37,5 %) i  $100,2 \pm 0,2$  g EDMU-a (maseni udio ulja 62,5 %), zatvorene metalnim poklopcem i označene šiframa (slika 5). Po tri staklenke čuvane su 1, 3, 5 odnosno 7 dana u hladnjaku na  $8 \pm 1$  °C, čiji je sadržaj zatim korišten za određivanje kemijskih pokazatelja kod ulja i tofua. Na jednak način pripremljeno je i čuvano dodatnih pet staklenki čiji je sadržaj korišten za senzorsku analizu EDMU-a te za test

preferencije okusa tofua nakon sedam dana čuvanja. Petog dana pokusa pripremljeno je još pet dodatnih staklenki čiji je sadržaj korišten za senzorsku analizu EDMU-a te za test preferencije okusa tofua nakon dva dana čuvanja.



**Slika 5.** Tofu u naljevu od ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Za pripremu liofiliziranog tofua (u daljnjem tekstu: lio-tofu) primijenjen je isti postupak cijedenja i rezanja svježeg tofua na komadiće. Po 60 g komadića raspoređeno je na metalne police, držano 48 h u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zatim su police sa zaleđenim komadićima smještene u liofilizator (slika 6). Proces liofilizacije trajao je 48 sati, startna temperatura bila je  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uz postupni porast svakih 2 h do konačnih  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tarirane staklenke volumena 170 mL napunjene su u prosjeku s po  $16,7 \pm 0,5\text{ g}$  komadića lio-tofua dobivenih od 60 g komadića svježeg tofua (maseni udio lio-tofua 14,3 %) i  $100,2 \pm 0,1\text{ g}$  EDMU-a (maseni udio ulja 85,7 %), zatvorene metalnim poklopcem i označene šiframa. Po tri staklenke čuvane su pod istim uvjetima i vremenskim intervalima te istovremeno s komadićima svježeg tofua u ulju. Njihov je sadržaj zatim korišten za određivanje kemijskih pokazatelja kod ulja i tofua.



**Slika 6.** Liofilizator (lijevo) i liofilizirani tofu (desno)

Nakon isteka zadanog vremena čuvanja, staklenke su vađene iz hladnjaka i temperirane na 20 °C u vodenoj kupelji te je zatim kruti i tekući dio sadržaja staklenki odvojen procjeđivanjem kroz cjedilo. Izdvojeno ulje odmah je podvrgnuto postupcima određivanja fenola te pokazatelja hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja, dok su izdvojeni komadići liofiliziranog tofua podvrgnuti postupku odmašćivanja, ekstrakcije i određivanja fenola.

### 3.2.2. Određivanje fenola *Fast Blue BB* testom u uzorcima ulja

Metodu određivanja fenola izravno u EDMU-u korištenjem *Fast Blue BB* (FBBB) reagensa predložili su Siano i suradnici (2021), a u ovom istraživanju primijenjena je prilagođena varijanta prema Majetić Germek i suradnicima (2024).

Za pripremu otopine FBBB reagensa u staklenoj čaši od 100 mL vagano je 0,05 g reagensa u prahu, otapano u 30 mL etanola na magnetnoj miješalici kroz 30 minuta, uz zaštitu od svjetlosti te poklopljeno satnim stakalcem kako bi se spriječilo hlapljenje. Zatim je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL te je dodan etanol do oznake. Tako pripremljena otopina reagensa pohranjivana je u hladnjaku do najviše tri dana od trenutka pripreme, a prilikom upotrebe zaštićivana je od svjetla aluminijskom folijom.

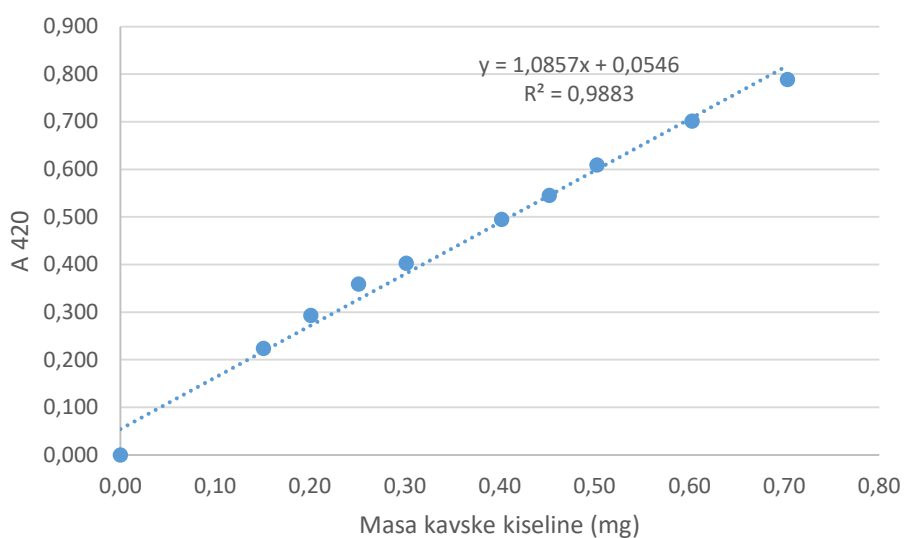
Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola u ulju određena je primjenom otopine kavske kiseline u etanolu koncentracije 1 mg/mL. Nakon pripreme otopine kavske kiseline, pipetom su odmjereni odgovarajući volumeni prikazani u tablici 2 te prebačeni u devet kruškolikih tikvica. Kruškolike tikvice s kavskom kiselinom prikopčane su na rotavapor te je sadržaj uparen na temperaturi kupelji od 30 °C. Nakon uparivanja, u svaku tikvicu dodano je 2,0 mL reagensa FBBB i jednak volumen NaOH. Potom su otopine vorteksirane dvije minute na najvećoj brzini, stavljene na tresilicu kroz 20 minuta (480 pokreta u minuti), prebačene u kivete te im 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 7). Maseni udio fenola izračunat je uvrštavanjem izmjerenih apsorbancija fenola u jednadžbu dobivenog pravca a rezultati su preračunati uzimajući u obzir volumen alikvota ekstrakta i masu analiziranog ulja, čime je dobivena vrijednost masenog udjela fenola iskazana u mg po kg ulja.



**Tablica 2.** Plan izrade baždarnog pravca s izmjerenim vrijednostima apsorbancija (EDMU)

Oznaka tikvice	Volumen otopine kavске kiseline (mL)	Volumen etanola (mL)	Masa kavске kiseline (mg)	Apsorbancija (420 nm)
0 (SP)	0	2,00	0	0
1	0,150	1,85	0,1507	0,224
2	0,200	1,80	0,2009	0,293
3	0,250	1,75	0,2512	0,359
4	0,300	1,70	0,3014	0,403
5	0,400	1,60	0,4018	0,495
6	0,450	1,55	0,4521	0,545
7	0,500	1,50	0,5023	0,609
8	0,600	1,40	0,6028	0,701
9	0,700	1,30	0,7032	0,789

SP= slijepa proba

**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje fenola iz EDMU-a

Prije uzimanja alikvota za analizu, uzorci ulja odvojeni od tofua procjeđivanjem centrifugirani su 5 minuta pri 6000 okretaja, radi odvajanja eventualno zaostalih mrvica ili kapljica vode. Uzorci ulja od približno 1,1 g odvagani su, s točnošću očitavanja četiri decimale, u plastičnu epruvetu s čepom na navoj. Nakon dodavanja po 2 mL otopine reagensa FBBB i 5-

postotne otopine NaOH, epruvete s uzorcima ulja stavljene su na vorteks (maksimalna brzina/20 minuta), centrifugirane (5 min/6000 okretaja), a potom je donji vodeni sloj (3 mL) kvantitativno prenesen u nove epruvete te ponovno centrifugiran (5 min/ 6000 okretaja) radi uklanjanja eventualno prisutnih kapljica ulja. Zatim je tako izbistren vodeni sloj injekcijskom štrcaljkom prenesen u kivete od optičkog stakla radi spektrofotometrijskog mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 420 nm u odnosu na slijepu probu (slika 9). Za svaku staklenku provedena su dva paralelna određivanja. Reakcija za slijepu probu (mješavina 2 mL otopine reagensa FBBB i 2 mL 5-postotne otopine NaOH) provedena je istovremeno s reakcijom za uzorke ulja.



**Slika 9.** Uzorci prebačeni u kivete od optičkog stakla

### 3.2.3. Određivanje fenola *Fast Blue BB* testom u uzorcima odmašćenog lio-tofua

Prije ekstrakcije fenola, liofilizirani tofu izdvojen iz naljeva od EDMU-a podvrgnut je postupku odmašćivanja. Nasumično je izdvojeno 10 komadića lio-tofua s čije je površine ulje najprije djelomično uklonjeno upijajućim papirom. Komadići su preneseni u Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim čepom, dodano je 40 mL heksana te mućkano na horizontalnoj tresilici (160 pokreta u minuti) kroz deset minuta (slika 10). Otopina ulja u heksanu je nakon mućkanja uklonjena pipetom, dok su izdvojeni komadići lio-tofua još tri puta podvrgnuti istom postupku (ukupno četiri uzastopne ekstrakcije s po 40 mL heksana). Nakon četvrte ekstrakcije, komadići

tofua ostavljeni su na papirnatom ubrusu pod digestorom do potpunog uklanjanja heksana hlapljenjem pod strujom zraka.



**Slika 10.** Prvo odmaščivanje tofua u heksanu

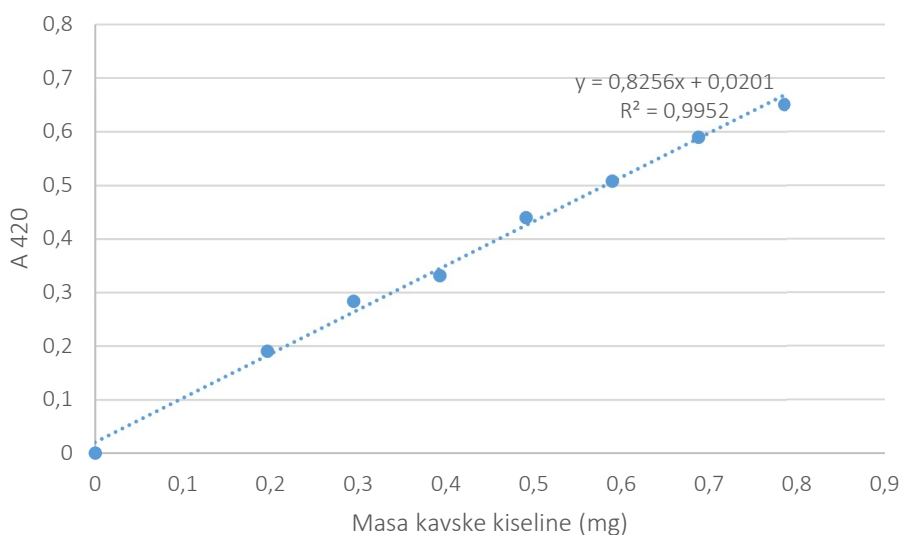
Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola u odmašćenom lio-tofuu određena je kako slijedi. Pripremljena je otopina kavske kiseline u etanolu koncentracije 1 mg/mL. U sedam epruveta pipetom su odmjereni odgovarajući volumeni pod A i B prikazani u tablici 3.

**Tablica 3.** Plan izrade baždnog pravca s izmjerenim vrijednostima apsorbancija (lio-tofu)

Oznaka tikvice	A Volumen otopine kavske kiseline (mL)	B Volumen 70 % etanola (ml)	Masa kavske kiseline (mg)	Apsorbancija (420 nm)
0 (SP)	0	2,00	0	0
1	0,200	1,80	0,1962	0,191
2	0,300	1,70	0,2944	0,284
3	0,400	1,60	0,3925	0,332
4	0,500	1,50	0,4906	0,440
5	0,600	1,40	0,5887	0,508
6	0,700	1,30	0,6868	0,590
7	0,800	1,20	0,7850	0,651

SP = slijepa proba

Nakon toga, u svaku je epruvetu dodano po 2,0 mL reagensa Fast Blue BB te jednak volumen NaOH. 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. Uzorci su vorteksirani kroz 20 minuta te prebačeni u kivete za mjerenje apsorbancija u odnosu na slijepu probu na valnoj duljini od 420 nm. Uvrštavanjem vrijednosti masa kavske kiseline na os x, a apsorbancija na os y, izrađen je baždarni pravac jednadžbe  $y = 0,8256x + 0,0201$  (slika 8). Maseni udio fenola u odmašćenom lio-tofuu izračunat je uvrštavanjem izmjerenih apsorbancija fenola u jednadžbu dobivenog pravca a rezultati su preračunati uzimajući u obzir volumen alikvota ekstrakta i masu suhe tvari liofiliziranog tofua, čime je dobivena vrijednost masenog udjela fenola iskazana u mg po kg suhe tvari odmašćenog lio-tofua.



**Slika 8.** Baždarni pravac za određivanje fenola iz lio-tofua

Uzorci lio-tofua usitnjeni su u tarioniku. U čaši je odvagano 2,5 g usitnjenog kontrolnog odnosno odmašćenog uzorka lio-tofua, dodano je 25 mL 70-postotnog etanola te mućkano na magnetnoj miješalici kroz 30 minuta (500 pokreta u minuti) zaštićeno od svjetlosti. Etanolni ekstrakt prenesen je iz čaše u plastičnu epruvetu s čepom na navoj i podvrgnut centrifugiranju (6000 okretaja/5 min). Supernatant je prebačen je u novu epruvetu i dodatno centrifugiran (6000 okretaja/5 min) te je s tako pripremljenim bistrim ekstraktom provedena FBBB-reakcija. U plastičnu epruvetu s čepom na navoj dodana su 2 mL ekstrakta, 2 mL FBBB-reagensa i 2 mL 5-postotne otopine NaOH te je reakcijska smjesa vorteksirana 20 minuta. Reakcijska smjesa je

zatim izravno prenesena u kivete od optičkog stakla te je izmjerena apsorbancija pri 420 nm u odnosu na slijepu probu. Za svaku staklenku provedena su dva paralelna određivanja. Reakcija za slijepu probu (umjesto 2 mL etanolnog ekstrakta dodano je 2 mL 70-postotnog etanola) provedena je istovremeno s reakcijom za ekstrakte lio-tofua.

#### 3.2.4. Određivanje slobodnih masnih kiselina i peroksidnog broja u uzorcima ulja

Pokazatelj hidrolitičkog kvarenja uzoraka ulja (udio slobodnih masnih kiselina) određen je prema metodi Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2017). Masa ulja od 3,5 grama odvagana je u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 mL. U zasebnoj tikvici neutralizirano je 75 mL mješavine otapala etanol:dietil eter u omjeru V:V = 1:1, titracijom 0,1 M otopinom KOH uz dodatak 75  $\mu$ L otopine fenolftaleina u etanolu (10 g/L) kao indikatora. Neutralizirano otapalo prebačeno je u tikvicu s uljem te je tako pripremljena otopina ulja titrirana automatskom biretom 0,1 M otopinom KOH u etanolu do zadržavanja boje u trajanju od najmanje 10 sekundi u stanju mirovanja. Rezultat je izražen kao postotak slobodne oleinske kiseline izračunat prema izrazu

$$SMK (\%) = V * c * M / (10 * m)$$

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).

Određivanje je obavljeno u startnoj točki pokusa (kontrolni uzorak EDMU-a) te u završnoj točki pokusa (uzorci EDMU-a koji su sedam dana bili u kontaktu s tofuom odnosno lio-tofuom). Za svaku od po tri staklenke koje su predstavljale pojedinu točku pokusa u tri ponavljanja provedeno je po jedno određivanje.

Određivanje peroksidnog broja obavljeno je od strane djelatnika Prehrambeno-biotehnološkog laboratorija Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču, prema metodi Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2017).

### 3.2.5. Određivanje $K_{232}$ i $K_{280}$ u uzorcima ulja

Pokazatelji oksidacijskog kvarenja uzoraka ulja (K-vrijednosti) određeni su prema metodi Međunarodnog vijeća za masline za spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području spektra (IOC, 2019). Za mjerenje apsorbancije na 232 nm, u odmjernu tikvicu od 25 mL dodano je 0,0700 – 0,0800 g uzorka. Za mjerenje apsorbancije na 268 nm, u odmjernu tikvicu od 10 mL dodano je 0,2500 g uzorka. Tikvice su potom do oznake dopunjene izooktanom (2,2,4 trimetilpentan) i promućkane. Otopine su zatim prebačene u kvarcne kivete i izmjerena im je apsorbancija spektrofotometrom na valnim duljinama 232 i 268 nm. Kao slijepa proba korišten je izooktan spektrofotometrijske čistoće. Koeficijent apsorbancije na određenim valnim duljinama izračunat je prema izrazu

$$K\lambda = c * s * E\lambda$$

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).

Određivanja su obavljena u startnoj točki pokusa (kontrolni uzorak EDMU-a) te u završnoj točki pokusa (uzorci EDMU-a koji su sedam dana bili u kontaktu s tofuom odnosno lio-tofuom). Za svaku od po tri staklenke koje su predstavljale pojedinu točku pokusa u tri ponavljanja provedeno je po jedno određivanje.

### 3.2.6. Senzorska analiza djevičanskog maslinovog ulja

Kontrolni uzorak EDMU-a te uzorci ulja koji su dva odnosno sedam dana bili u kontaktu s komadićima tofua čuvani su do provođenja senzorske analize 14 dana u bocama od tamnog stakla i pri sobnoj temperaturi. Analiza je provedena u Prehrambeno-biotehnološkom laboratoriju Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču koji je ovlašten od Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske za službene kontrole maslinovih ulja. U senzorskom ocjenjivanju sudjelovalo je osam članova službenog panela. U cilju postizanja maksimalne objektivnosti, senzorski analitičari nisu bili upoznati o detaljima pripreme uzoraka. Korištena

je metoda Međunarodnog vijeća za maslinu (IOC - *International Olive Council: Method for organoleptic assessment of virgin olive oil*, COI/T.20/Doc.15/Rev. 3, 2010), uz male dopune ocjenjivačkog listića (za potrebe ovog istraživanja dodana su svojstva „slatko“ i „trpko“ te opća ocjena kvalitete u rasponu od 0 do 9 bodova) (prilog 1).

### 3.2.7. Test preferencije okusa tofua

Preferencije okusa uzoraka tofua od strane potrošača testirane su zadnjeg dana pokusa, metodom rangiranja. Sudjelovalo je ukupno 47 osoba (od čega 79 % žena), uglavnom u dobi od 31 do 51 godine života. Sudionici su potpisom potvrdili informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju (prilog 2), nisu prošli nikakvu ciljanu obuku a 51 % njih nije imalo prethodno iskustvo konzumiranja tofua. Ponuđena su sljedeća tri uzorka:

- komadići tofua čuvani sedam dana u naljevu od EDMU-a te ocijedeći prije posluživanja
- komadići tofua čuvani dva dana u naljevu od EDMU-a te ocijedeći prije posluživanja
- svježe izrezani komadići tofua kratko uronjeni u EDMU te ocijedeći prije posluživanja.

Svaki od tri uzorka (po tri komadića podjednake veličine) nalazio se u bezbojnoj i prozirnoj plastičnoj čašici volumena 20 mL po šifrom, a redoslijed kojim su ponuđeni bio je randomiziran. Od sudionika se tražilo da na obrascu za ocjenjivače (prilog 3) rangiraju uzorak čiji im se okus najviše sviđa (rang 1) odnosno najmanje sviđa (rang 3) te da za to navedu razloge.

### 3.2.8. Određivanje vlage u tofuu

Uzorci tofua koji nisu bili u naljevu od EDMU-a (svježi tofu odnosno lio-tofu) usitnjeni su u tarioniku. Na aluminijskoj plitici jednoliko je raspoređeno 2,5 grama usitnjenog materijala, što je zatim postavljeno u ležište halogenog analizatora vlage te je spuštanjem poklopca s halogenom lampom pokrenuto sušenje pri 104 °C uz automatsko mjerenje gubitka mase. Nakon zvučnog signala kojim uređaj označava da je postignuta konstantna masa, s digitalnog ekrana očitan je rezultat. Za svaki od dvaju materijala postupak je proveden u tri paralelna određivanja.

### 3.2.9. Statistička obrada podataka

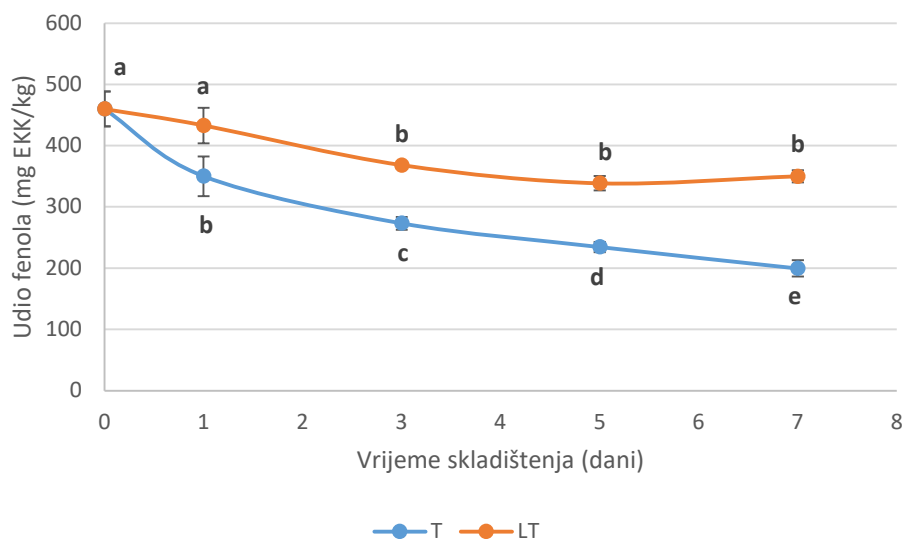
Rezultati fizikalno-kemijskih analiza obrađeni su statistički koristeći program Statistica (StatSoft, Inc verzija 14.0.0.15). Provedena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom te je ispitana homogenost varijance Brown-Forsytheovim testom. Statistička značajnost razlika srednjih vrijednosti paralelnih mjerenja za pojedine točke pokusa provjerena je Tukeyjevim testom značajne razlike za jednake ili nejednake veličine uzorka, ovisno o slučaju. Za pripremu i uređivanje rezultata za statističku analizu, izradu grafičkih prikaza te za provjeru statističke značajnosti razlika između suma nizova iz testa preferencije potrošača rangiranjem Friedmanovim testom (Meilgaard i sur., 2004) poslužio je programski paket Microsoft Office Excel (verzija 2016). Svi postupci statističke obrade provedeni su na nivou vjerojatnosti  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Promjene ukupnih fenola u ulju

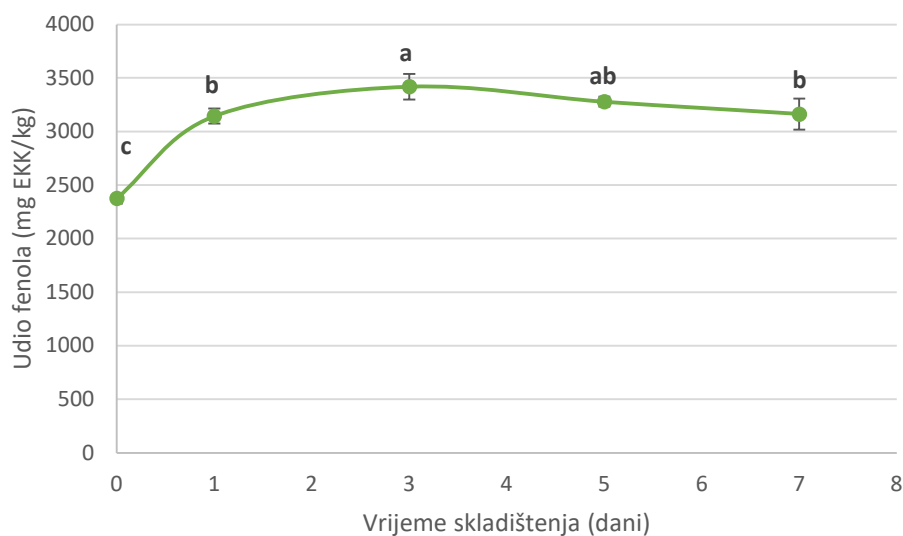
Na slici 11 prikazane su promjene u udjelu ukupnih fenola iz ulja u čijem je naljevu stajao svježi, odnosno lio-tofu u periodu od sedam dana. Vidljiv je pad fenola u ulju u kontaktu s obje varijante tofua, uz veći pad kod ulja u kojem je stajao svježi tofu.



**Slika 11.** Udio ukupnih fenola (EKK = ekvivalenti kavske kiseline) u ekstra djevičanskom maslinovom ulju korištenom kao naljev za tofu (T) odnosno liofilizirani tofu (LT) tijekom sedmodnevnog čuvanja pri 8 °C. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri određivanja za kontrolni uzorak (0 dana) te šest određivanja (3 staklenke × 2 ponavljanja) za ostale uzorke. Vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom, Brown-Forsytheov test homogenosti varijance, Tukeyjev test za nejednaki broj članova,  $p < 0,05$ ).

### 4.2. Promjene ukupnih fenola u lio-tofuu

Na slici 12 prikazane su promjene udjela ukupnih fenola u lio-tofuu koji je tijekom sedam dana stajao u naljevu od EDMU-a. Iz grafičkog prikaza vidljiv je značajan porast ukupnih fenola u prvom dijelu razdoblja čuvanja te stagnacija i blagi pad u završnom dijelu.



**Slika 12.** Udio ukupnih fenola (EKK = ekvivalenti kavske kiseline) u liofiliziranom tofuu tijekom sedmodnevnog čuvanja u naljevu od EDMU-a pri 8 °C. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri određivanja za kontrolni uzorak (0 dana) te šest određivanja (3 staklenke × 2 ponavljanja) za ostale uzorke. Vrijednosti označene različitim slovima statistički su značajno različite (analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom, Brown-Forsytheov test homogenosti varijance, Tukeyjev test za nejednaki broj članova,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Promjene pokazatelja hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja ulja

U tablici 4 prikazane su promjene u udjelu slobodnih masnih kiselina te promjene pokazatelja oksidacijskog kvarenja ulja. Vidljivo je da i nakon sedam dana u kontaktu sa svježim ili liofiliziranim tofuum nije došlo do hidrolitičke ili oksidacijske degradacije ulja te ono i dalje pripada kategoriji ekstra djevičanskih maslinovih ulja.

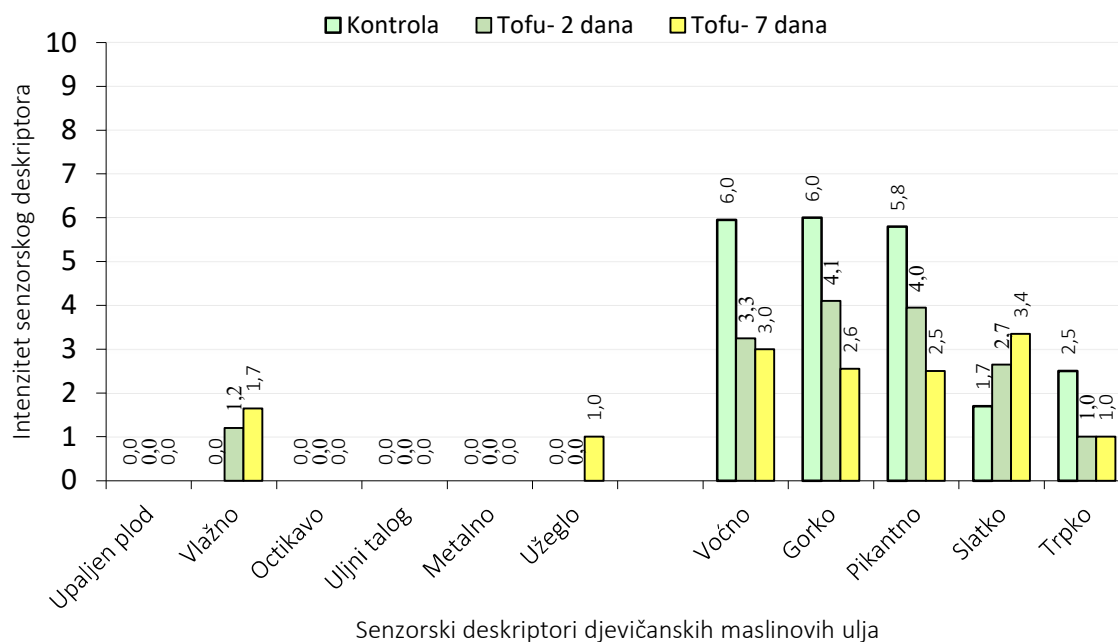
**Tablica 4.** Promjene pokazatelja hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja ulja nakon skladištenja u kontaktu s tofuom

Vrijeme skladištenja (dani)	Vrsta uzorka ulja	Udio SMK (%)	$K_{232}$	$K_{268}$	Peroksidni broj (meq O <sub>2</sub> /kg)
		Limiti za kategoriju ekstra djevičansko maslinovo ulje (ref.)			
		≤0.80	≤2.50	≤0.22	≤20
0	Kontrola	0,33±0,01 a	2,24±0,02 a	0,15±0,00 b	14,73±0,15 a
7	Kontakt s tofuom	0,31±0,01 b	1,96±0,02 b	0,11±0,00 c	14,67±0,06 a
	Kontakt s lio-tofuom	0,32±0,01 ab	2,24±0,03 a	0,19±0,00 a	*

\*nije određivano. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri određivanja (3 staklenke × 1 određivanje). Vrijednosti unutar istog stupca označene različitim slovima statistički su značajno različite (analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom, Brown-Forsytheov test homogenosti varijance, Tukeyjev test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Senzorska analiza djevičanskog maslinovog ulja

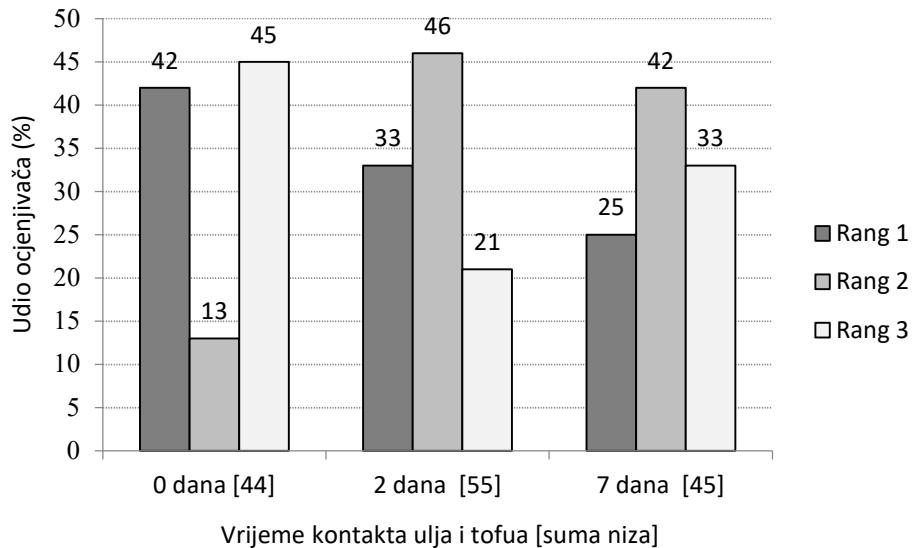
Slika 13 prikazuje rezultate senzorske analize EDMU-a korištenog kao naljev za tofu.



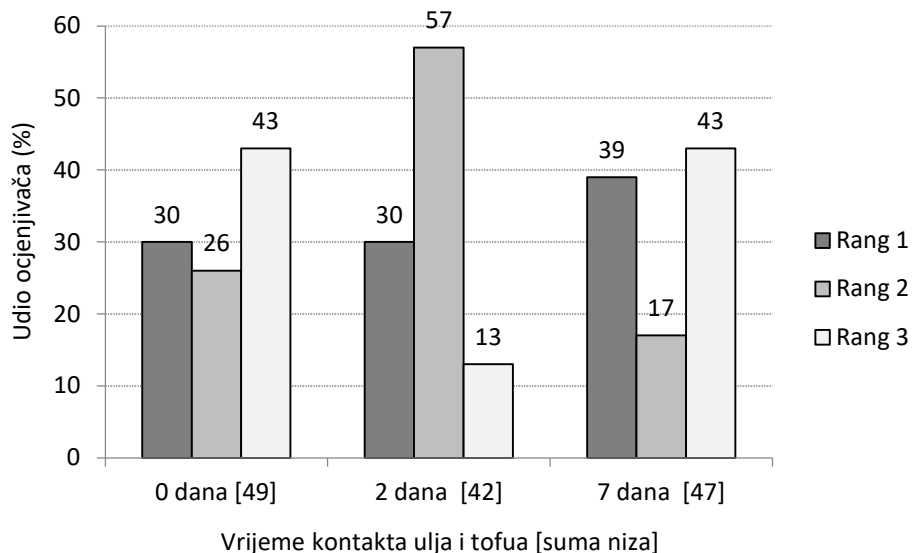
**Slika 13.** Senzorska svojstva EDMU-a ovisno o vremenu kontakta s tofuom. Intenziteti pojedinih deskriptora određeni su linijskom skalom prema metodi Međunarodnog vijeća za maslinu te predstavljaju medijane podataka osmero članova panela.

#### 4.5. Test preferencije okusa tofua

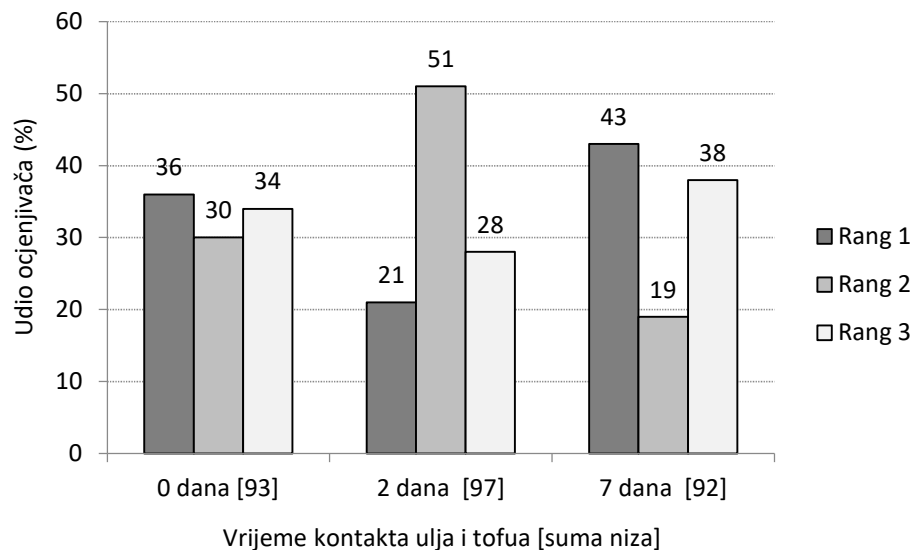
Rezultati testa preferencije okusa prikazani su odvojeno za dvije skupine ocjenjivača - jedna skupina bez prethodnog iskustva konzumiranja tofua (slika 14) a druga skupina s prethodnim iskustvom (slika 15), te ukupno za sve sudionike u ocjenjivanju (slika 16).



**Slika 14.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (ocjenjivači bez prethodnog iskustva konzumiranja tofua, N=24) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om. Sume niza pojedinih uzoraka, prikazane unutar uglatih zagrada pored dana kontakta, nisu statistički značajno različite (Friedmanov test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 15.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (ocjenjivači s prethodnim iskustvom konzumiranja tofua, N=23) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om. Sume niza pojedinih uzoraka, prikazane unutar uglatih zagrada pored dana kontakta, nisu statistički značajno različite (Friedmanov test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 16.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (svi ocjenjivači, N=47) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om. Sume niza pojedinih uzoraka, prikazane unutar uglatih zagrada pored dana kontakta, nisu statistički značajno različite (Friedmanov test,  $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

U do sada provedenim sličnim istraživanjima čuvanja namirnica u naljevu od EDMU-a (Castillo-Luna i sur., 2024, Majetić Germek i sur., 2024, Klisović i sur., 2022) utvrđeno je smanjenje udjela fenola u EDMU-u. Međutim, informacije o dinamici promjena u prvim danima kontakta ulja i hrane bogate proteinima još su uvijek vrlo oskudne. Istraživanje Klisović i suradnika (2022) na siru i skuti provedeno je u znatno dužim intervalima praćenja (nakon jednog i dva mjeseca čuvanja). S druge strane, iz istraživanja Majetić Germek i suradnika (2024) na tofuu i skuti te Castillo-Luna i suradnika (2024) na mekom i tvrdom siru, evidentno je da fenoli iz EDMU-a u najvećoj mjeri migriraju u takav tip namirnica u naljevu u vrlo kratkom roku. Stoga je planom pokusa u ovom istraživanju odabrano pet vremenskih točki unutar sedam dana čuvanja tofua u naljevu od EDMU-a. Odabrana je temperatura skladištenja od  $6\pm 2$  °C kako bi se izbjeglo moguće skrućivanje ulja pri temperaturama koje su niže od toga.

### 5.1. Dinamika promjena sadržaja ukupnih fenola EDMU-a tijekom kontakta s tofuom

Na slici 11 vidljivo je da je kontrolni uzorak ulja sadržavao relativno visoki udio fenola (460,1 mg/kg) te da se vrijednost izmjerena sedmog dana stajanja u naljevu sa svježim tofuom (199,5 mg/kg) smanjila u odnosu na kontrolni uzorak za oko 56 %. Vrijednosti izmjerene u svakoj od vremenskih točki pokusa (nulti, prvi, treći, peti i sedmi dan kontakta) uzastopce su se statistički značajno smanjivale. Ipak, najizraženiji pad fenola u EDMU-u (za oko 24 % u odnosu na kontrolni uzorak) zabilježen je već nakon prvog dana kontakta sa svježim tofuom. Sličan ishod zabilježen je u istraživanju Majetić Germek i suradnika (2024) nakon prvog dana kontakta svježeg tofua i EDMU-a, iako s još jače izraženim padom fenola (za 37 %). U istraživanjima Klisović i suradnika (2022) te Castillo-Luna i suradnika (2024) sadržaj fenola EDMU-a nije praćen u prvim danima kontakta sa sirom ili skutom nego je određen tek nakon 30 dana, kad je pad fenola u EDMU-u bio već iznimno visok (kretao se u rasponu od 83 % kod skute do 98 % kod tvrdog sira). Castillo-Luna i suradnici (2024) pripisuju takav pad kombiniranom utjecaju dvaju mehanizama: (1) migraciji hidrofilnih fenola iz ulja u hranu potaknutoj vodom sadržanom u hrani te (2) gubitku fenola zbog antioksidacijskog djelovanja ovih tvari. Gubitak fenola u reakcijama oksidacije u okolnostima u kojima je provedeno ovo istraživanje (kratko vrijeme i niske temperature čuvanja u tami, uz minimalni pristup kisika) ipak je vrlo malo vjerojatan. U većini istraživanja koja su se bavila interakcijama proteina i

fenola (Hasni i sur., (2011). Kanakis i sur. (2011.), Jakobek i sur., (2014), Han i sur., (2019)) dokazano je da namirnice s visokim proteinskim sadržajem, privlače na sebe fenole, a osobito ako u svom sastavu sadrže i vodu. Klisović i suradnici (2024) smatraju da se promjene u sastavu EDMU-a prvenstveno trebaju pripisati migraciji tvari između dvaju matriksa te da je zbog toga, u uobičajenim proizvodnim okolnostima, nemoguće izdvojeno promatrati interakcije fenola i proteina kao uzroka te pojave. Prema zaključcima Majetić Germek i suradnika (2024), pažnju bi prvenstveno trebalo usmjeriti na utjecaj migracije vode iz hrane u naljev od EDMU-a. Radi provjere te hipoteze, u plan ovog istraživanja uvršteno je paralelno praćenje promjena fenola u EDMU-u u kontaktu s liofiliziranim odnosno svježim tofuom pod jednakim uvjetima.

Jednaki uvjeti kontakta ostvareni su vodeći računa o okolnostima koje je omogućila tehnika liofilizacije: (1) dobivanje komadića svježeg i lio-tofua ujednačenih dimenzija i (2) izbjegavanje denaturacije proteina ili degradacije drugih sastojaka u lio-tofuu pri uklanjanju vode do razine vezane vode. Uz to je kod obje varijante tofua ostvaren podjednak omjer masa suhe tvari tofua i EDMU-a time što je punjenje staklenki bilo definirano jednakim brojem komadića svježeg odnosno lio-tofua (po 60 komada) i jednakom masom ulja (po 100 g ulja). Na slici 11 uočava se statistički značajno manji utjecaj lio-tofua na pad fenola EDMU-a u odnosu na utjecaj svježeg tofua u svim vremenskim točkama pokusa. Prvog dana kontakta s lio-tofuom pad fenola u EDMU-u nije bio statistički značajan (iznosio je svega 6 % u odnosu na kontrolni uzorak). S obzirom na visoki udio proteina u suhoj tvari tofua prema nutritivnoj deklaraciji proizvođača (61 %), u lio-tofuu bi vjerojatnost bliskih susreta fenolnih i proteinskih molekula (a time i njihovih interakcija) trebala biti visoka. Međutim, iako su Quintero-Flórez i suradnici (2015) izvijestili o vrlo brznoj reakciji (unutar jedne minute) između fenola iz EDMU-a i proteina mucina u vodenoj otopini, ovaj rezultat sugerira da su interakcije fenola i proteina značajno usporene u medijima poput ulja i liofiliziranih materijala koji gotovo da i ne sadrže vodu. U prilog tome govori činjenica da je statistički značajno smanjenje zabilježeno nakon trećeg dana kontakta te da se ono zadržalo na jednakom nivou (u rasponu 20 – 26 %) u preostalim dvjema vremenskim točkama pokusa.

Prema nutritivnoj deklaraciji proizvođača (tablica 1), izračunat je prosječni udio vode u svježem tofuu od oko 80 %. Taj se podatak razlikuje od onog koji je eksperimentalno određen (70 % vode) za lot proizvoda koji je korišten u istraživanju. To je sa stanovišta korektnosti informacije upućene potrošačima prihvatljivo, s obzirom na moguću godišnju, sortnu ili geografski uvjetovanu varijabilnost sastava soje kao sirovine za tofu. Migracija vode iz svježeg tofua u ulje tijekom skladištenja uočena je u vidu pojave vodenih inkluzija koje su se postupno

izdvajale u vodeni sloj na dnu staklenke. S obzirom na veliki afinitet fenola EDMU-a prema vodenoj fazi, vrlo je vjerojatno da je jedan dio fenola iz EDMU-a migrirao u tako nastale vodene inkluzije. Na to ukazuje statistički značajno manji pad fenola EDMU-a u kontaktu s lio-tofuom u odnosu na EDMU u kontaktu sa svježim tofuom. Udio vode u lio-tofuu bio je iznimno nizak (oko 5 %) a tako niske razine ukupnog sadržaja vode uglavnom predstavljaju vezanu vodu. Praktično, kod varijante s lio-tofuom izostala je migracija vode iz materijala u ulje. Ovdje treba istaknuti da uvjeti kontakta svježeg tofua odnosno lio-tofua s uljem ipak nisu bili sasvim identični. Naime, lio-tofu je porozan materijal (što sa svježim tofuom nije slučaj) pa se za lio-tofu može opravdano smatrati da je dodirna površina s uljem bila veća u odnosu na onu kod svježeg tofua. Stoga se pad fenola u rasponu 20 – 26 % u EDMU-u u kontaktu s lio-tofuom može smatrati rezultantom dvaju čimbenika suprotnih utjecaja. Velika dodirna površina omogućava više interakcija fenola s proteinima što doprinosi padu fenola u EDMU-u, dok niska razina vode i izostanak vodenih inkluzija doprinosi zadržavanju fenola u EDMU-u. Drugim riječima, razlike u učincima svježeg i lio-tofua bile bi i veće od utvrđenih da je bilo moguće postići ujednačenu dodirnu površinu ovih dviju varijanti tofua s uljem.

## 5.2. Dinamika promjena sadržaja ukupnih fenola lio-tofua tijekom kontakta s EDMU-om

Određivanje fenola bilo je provedeno samo na lio-tofuu, ne i na uzorcima svježeg tofua. Ekstrakcija fenola provedena je nakon odmašćivanja liofiliziranog materijala kako bi u potpunosti uklonili ulje. Naime, informacija koju se željelo dobiti jest jesu li se i kakvom dinamikom fenoli iz EDMU-a vezali na matriks sastavljen pretežito od proteina. Stoga je EDMU s preostalim fenolima morao biti uklonjen iz pora lio-tofua u kojima je zadržan. Određivanje fenola nije provedeno na uzorcima svježeg tofua zbog nemogućnosti da se iz komadića svježeg tofua izdvojenog iz naljeva adekvatno ukloni apsorbirano ulje a zatim i voda prije ekstrakcije fenolnih tvari.

Iz grafičkog prikaza na slici 12 vidljivo je da je nativni lio-tofu sadržavao značajan udio fenola koji su bili podložni ekstrakciji 70-postotnim etanolom. Yin i suradnici (2020) navode da tofu sadrži topljivu i netopljivu frakciju fenolnih tvari. Topljiva frakcija uglavnom je sastavljena od izoflavona u formi glukozida a manji dio čine fenolne kiseline kao što su vanilinska i siringinska. U navedenom istraživanju autori su utvrdili da je sadržaj topljivih fenola u uzorku bio oko 900 mg ekvivalenta galne kiseline po kg suhe tvari, dok je u našem istraživanju to bila vrijednost od oko 2.400 mg ekvivalenta kavske kiseline po kg suhe tvari.



Osim što su u sastavu dvaju uzoraka moguće značajne razlike, uzrok ovakvoj razlici u vrijednostima može biti i u otapalu korištenom za ekstrakciju (Yin i suradnici koristili su 80-postotni metanol umjesto 70-postotnog etanola) te u standardnoj tvari koja je poslužila za izračun ekvivalenta (galna kiselina umjesto kavske).

Statistički značajno povećanje sadržaja ukupnih hidrofilnih fenola u lio-tofuu utvrđeno je nakon prvog dana kontakta s EDMU-om (porast od 32 % u odnosu na kontrolni uzorak) te trećeg dana kontakta (porast od 44 %). Nakon toga vrijednosti uglavnom stagniraju, što ukazuje na to da je vjerojatno došlo do zasićenja većine potencijalnih mjesta vezanja fenola u lio-tofuu te da je uspostavljena dinamička ravnoteža između liofiliziranog materijala i ulja. Potvrda toga proizlazi iz činjenice da se trend i dinamika porasta fenola kod lio-tofua u velikoj mjeri podudaraju s trendom i dinamikom pada fenola kod EDMU-a u kontaktu s lio-tofuom (slika 11). Podaci nisu usporedivi s onima iz istraživanja Castillo-Luna i suradnika (2024) jer uzorci sireva iz naljeva od EDMU-a u tom istraživanju nisu bili odmašćeni prije ekstrakcije hidrofilnih fenola, a rezultati nisu iskazani na suhu tvar već po jedinici mase materijala s neodređenim sadržajem masti i vode.

### 5.3. Promjene standardnih fizikalno-kemijskih pokazatelja kvalitete i senzorskih svojstava EDMU-a tijekom kontakta s tofuom

Fizikalno-kemijski pokazatelji kvalitete EDMU-a (slobodne masne kiseline, peroksidni broj,  $K_{232}$  i  $K_{268}$ ) određivani su samo prvi i zadnji dan pokusa (tablica 4) jer nisu bile očekivane značajnije promjene ovih pokazatelja u kraćim intervalima kontakta ulja i tofua. Peroksidni broj nije se statistički značajno smanjio, međutim, uočeno je statistički značajno smanjenje drugog pokazatelja udjela primarnih produkata oksidacijskog kvarenja ( $K_{232}$ ) te sekundarnih produkata ( $K_{268}$ ) nakon sedam dana čuvanja svježeg tofua u naljevu. Majetić Germek i suradnici (2024) dobili su gotovo identične rezultate za sedmodnevno čuvanje svježeg tofua u kontaktu s EDMU-om. Slično vrijedi i za istraživanje Klisović i suradnika (2022) koji su nakon 30 dana čuvanja skute u EDMU-u zabilježili statistički značajno smanjenje  $K_{232}$  i  $K_{268}$ , iako uz statistički značajan porast peroksidnog broja. Udio slobodnih masnih kiselina također se smanjio statistički značajno iako zanemarivo u odnosu na gornji limit za kategoriju ekstra djevičansko maslinovo ulje. I u ovom je slučaju uočena podudarnost s rezultatima Majetić Germek i suradnika (2024), koji su kao obrazloženje naveli činjenicu da su i slobodne masne kiseline i produkti oksidacije masnih kiselina polarne tvari koje, poput hidrofilnih fenola, mogu migrirati

u vodene inkluzije unutar ulja. To obrazloženje podupiru rezultati koji su u ovom istraživanju dobiveni za kontakt EDMU-a i lio-tofua. U varijanti s lio-tofuom nije bilo vodenih inkluzija kao ni statistički značajnih razlika udjela SMK i vrijednosti  $K_{232}$  u odnosu na kontrolni uzorak, dok je vrijednost  $K_{268}$  čak i statistički značajno porasla. U slučaju dužeg trajanja kontakta (30 i više dana), kao u istraživanjima Klisović i suradnika (2022) sa skutom ili Al-Ismaila i suradnika (2018) s procijeđenim kuglicama jogurta u EDMU-u, zabilježeno je pojačano hidrolitičko kvarenje (značajan porast udjela SMK) te značajan porast pokazatelja primarnih produkata oksidacijskog kvarenja (peroksidnog broja i  $K_{232}$ ). Ako se uzme u obzir da su SMK prooksidansi te da u ulju istovremeno dolazi i do gubitka hidrofilnih fenola koji su antioksidansi (zbog migracije u vodene inkluzije), razumljivo je da produljeno vrijeme kontakta rezultira i porastom primarnih produkata oksidacijskog kvarenja.

Budući da EDMU mora zadovoljiti parametre kvalitete koji su direktno povezani s ocjenom senzorskih svojstava, bitno je da nakon kontakta sa svježim tofuom u ulju ne dođe do pojave defekata tj. neprirodnih i nepoželjnih okusno-mirisnih svojstava. U istraživanju koje su proveli Peyrot des Gachons i suradnici (2021), dokazano je da prisutnost proteina u hrani može uzrokovati smanjenje senzornog doživljaja okusa zbog interakcija između proteina i oleokantala (koji izaziva osjećaj pikantnosti u grlu) te gorkih spojeva EDMU-a. Ipak, Pripp i suradnici (2005) opisali su interakcije fenola ekstrahiranih iz djevičanskog maslinovog ulja s proteinima mlijeka kao slabe u slučaju skupine sekoiridoidnih fenola (kojoj pripadaju npr. oleokantal i oleuropein) dok u slučaju jednostavnih fenola (tirosola i hidrokstirosola) kao vrlo slabe ili nepostojeće. Unatoč tomu, s obzirom na to da se građa proteina soje razlikuje od građe proteina mlijeka, te s obzirom na značajan pad hidrofilnih fenola EDMU-a u kontaktu sa svježim tofuom (slika 11), iznesena je pretpostavka o gubitku intenziteta okusnih svojstava EDMU-a u uvjetima ovog istraživanja. Podaci na slici 13 ukazuju na opravdanost te pretpostavke – već nakon dvodnevnog kontakta ulja sa svježim tofuom došlo je do značajnog smanjenja intenziteta gorčine, pikantnosti i trpkosti, uz porast slatkoće. Nakon sedmodnevnog kontakta to je smanjenje bilo još izrazitije tako da je ulje od početnog srednjeg do jakog intenziteta (raspon 3 – 6 na linijskoj skali) poprimilo obilježja blagog intenziteta (< 3). Genovese i suradnici (2021) razvrstali su EDMU-e prema udjelu ukupnih fenola u tri kategorije intenziteta gorčine i pikantnosti, od čega su srednjim intenzitetom definirali ulja u rasponu od 220 do 340 mg/kg, a blagim intenzitetom ulja s manje od 220 mg/kg. Rezultati senzorske analize EDMU-a (slika 13) i udio ukupnih fenola u EDMU-u (slika 11) podudaraju se s kriterijima koje su predložili Genovese i suradnici (2021) – nakon dvodnevnog kontakta ulje je

sadržavalo oko 300 mg/kg ukupnih fenola (kategorija ulja srednjeg intenziteta gorčine i pikantnosti) a nakon sedmodnevnog kontakta oko 200 mg/kg ukupnih fenola (kategorija ulja blagog intenziteta gorčine i pikantnosti).

Osim slabljenja intenziteta okusnih svojstava, senzorskom analizom dokazano je i slabljenje intenziteta poželjnih mirisno-okusnih svojstava (voćnosti) EDMU-a, također od početnog srednjeg ili jakog intenziteta do blagog intenziteta nakon sedmodnevnog kontakta. Uz to, u ulju je došlo i do pojave blago zamjetljivih nepoželjnih senzorskih svojstava (vlažno i užeglo). Pojava mirisa po vlažnosti vjerojatno je posljedica migracije mirisnih tvari tofua u ulje, dok se slabljenje intenziteta voćnosti može pripisati otapanju hlapljivih tvari povezanih s voćnošću u vodi, ili čak i interakcijama tih tvari sa sastojcima tofua kao što su proteini i ugljikohidrati. Budući da medijan nepoželjnih svojstava za visoku kategoriju kvalitete (ekstra djevičansko maslinovo ulje) mora biti jednak nuli, nijedan uzorak osim kontrolnog nije pripao toj kategoriji. S obzirom da medijan nepoželjnih svojstava nije bio veći od 3,5, a voćnost je ostala veća od nule, prema Uredbi EU-a 2022/2104 uzorci koji su bili u kontaktu s tofuom zadovoljili su kriterije za nižu kategoriju kvalitete (djevičansko maslinovo ulje).

#### 5.4. Preferencije potrošača prema okusnim svojstvima tofua iz naljeva od EDMU-a

U ispitivanju senzorskih svojstava kozjeg sira koji je dozrijevaao u naljevu od EDMU-a, Levak i suradnici (2023) dokazali su da to poboljšava njegove senzorske osobine u odnosu na dozrijevanje na zraku u ukupnom trajanju od 60 dana. Poput većine namirnica dobivenih od soje, tofu nema osobito ugodan okus. Iako to nije proizvod koji se podvrgava dozrijevanju, pretpostavilo se da će i kratki kontakt s EDMU-om (od dva ili sedam dana) povoljno utjecati na prihvatljivost okusa tofua od strane potrošača. Međutim, rezultati dobiveni testom preferencije okusa u kojem je sudjelovalo 47 ispitanika (slika 16) pokazali su da između tri ponuđena uzorka ocijedeđenih komadića tofua (kratko uronjeni u EDMU prije posluživanja, čuvani dva dana u naljevu od EDMU-a te čuvani sedam dana u naljevu od EDMU-a) nije bilo statistički značajnih razlika u preferencijama potrošača. Iako se uočava da je najveći udio ispitanika (njih 43 %) na prvo mjesto preferencije rangirao tofu koji je najduže bio u kontaktu s uljem, može se reći da su preferencije bile prilično raspršene.

Razvrstavanjem ispitanika prema prethodnom iskustvu konzumiranja tofua (slike 14 i 15) također se nije uspjelo izdvojiti uzorak koji bi unutar pojedine skupine ispitanika bio

statistički značajnije prihvatljivog okusa. Dvije skupine ispitanika ipak su se međusobno razlikovale po tome što je najveći udio „neiskusnih“ sudionika (njih 42 %) na prvo mjesto preferencije rangirao tofu koji je bio samo kratko uronjen u ulje, dok se najveći udio „iskusnih“ sudionika (njih 39 %) opredijelio za tofu koji je najduže bio u kontaktu s uljem. Moglo bi se reći da su „iskusni“ potrošači bolje upoznati sa standardnim okusom tofua te da zahvaljujući tom „predznanju“ nešto lakše uočavaju doprinos EDMU-a povoljnim promjenama okusa ove namirnice.

Analizirajući razloge koje su sudionici naveli za odabir onoga što im se okusom najmanje sviđjelo, uočeno je da je najveći udio ispitanika (njih 49 %) isticao neutralan (bezukusan) ili bljutav okus. Za manji dio ispitanika (njih 17 %) razlog neprihvatljivosti bio je gorak okus koji je tofu poprimio od EDMU-a. Mali broj ispitanika (njih 12 %) osvrnuo se na teksturu tofua kao kriterij neprihvatljivosti, pri čemu su najčešće isticali grubu, zrnatu ili gumastu teksturu.

Od razloga koje su sudionici naveli za odabir onoga što im se okusom najviše sviđjelo, najveći udio ispitanika (njih 43 %) istaknuo je prepoznatljiv okus EDMU-a koji je tofu poprimio. Mali je udio ispitanika (njih 11 %) kao razlog veće prihvatljivosti izdvojio manje vodenast i slasniji okus, što je vjerojatno posljedica migracije vode iz tofua te ulja u tofu tijekom čuvanja u naljevu. I u ovom je slučaju vrlo mali udio ispitanika (njih svega 4 %) naveo teksturu kao kriterij prihvatljivosti i to prvenstveno zbog ublažavanja doživljaja gumaste strukture.

Iako ovim istraživanjem nije potvrđena hipoteza o većoj preferenciji potrošača prema okusu tofua koji je duže vrijeme bio u kontaktu s EDMU-om, treba istaknuti da je test proveden s minimalnim brojem sudionika za tu svrhu te da bi u eventualnom daljnjem istraživanju ove teme trebalo uključiti višestruko veći broj ispitanika. Osim toga, bilo bi preporučljivo da ispitanici budu ujednačena skupina ljudi s obzirom na prethodno iskustvo konzumiranja, ne samo tofua već i ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Uz to bi trebalo detaljnije razraditi ocjenjivački listić tako da se ispitanike usmjeri na pojedine aspekte okusa tofua, kao što su tekstura, gorčina, slasnost/vodenost i aroma.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Utjecaj svježeg tofua na pad fenola EDMU-a statistički je značajno veći u svim vremenskim točkama pokusa u odnosu na utjecaj liofiliziranog tofua tijekom sedmodnevnog kontakta s EDMU-om pod jednakim uvjetima.
2. Trend promjena pod utjecajem svježeg tofua može se opisati kao kontinuirani pad ukupnih fenola u EDMU-u dok se kod liofiliziranog tofua taj pad zaustavlja nakon tri dana kontakta.
3. Udio ukupnih fenola u liofiliziranom tofuu statistički značajno raste već nakon prvog dana kontakta s EDMU-om a nakon trećeg dana stagnira, što je u podudarnosti s trendom i dinamikom pada ukupnih fenola u EDMU-u u kontaktu s liofiliziranim tofuom.
4. Tijekom sedmodnevnog kontakta ulja sa svježim tofuom dolazi do smanjenja intenziteta svih poželjnih senzorskih svojstava djevičanskog maslinovog ulja, izuzev slatkoće, iz područja srednjeg intenziteta u područje blagog intenziteta.
5. Tijekom sedmodnevnog kontakta ulja sa svježim tofuom, u ulju nema nepovoljnih promjena fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće ali dolazi do pojave nepoželjnih senzorskih svojstava blagog intenziteta (vlažno i užeglo) zbog čega ono prestaje biti visoke kvalitete (ekstra djevičansko) i prelazi u standardnu kvalitetu (djevičansko maslinovo ulje).
6. Potrošači ne preferiraju okus tofua koji je duže vrijeme (sedam dana) bio u kontaktu s EDMU-om, u usporedbi s ostalim dvjema varijantama tofua (kratko uronjen u EDMU te čuvan dva dana).

## 7. LITERATURA

1. Al-Ismaïl K, Al-Awamleh SA, Saleh M, Al-Titi H. Impacts of Oil Types and Storage Conditions on Milk Fat Quality of Strained Yogurt Immersed in Oil. *American Oil Chemists' Society* 2019 Feb;96(2):171–8, <http://dx.doi.org/10.1002/aocs.12176>
2. Alnemer F, Aljohani R, Alajlan A, Aljohani M, Alozaib I, Masuadi E, et al. The use of olive oil for skin health in a Saudi population: A cross-sectional study. *Dermatology Reports* 2021 Dec 17;14(1), <https://doi.org/10.4081/dr.2022.9364>
3. Castillo-Luna A, Priego-Capote F. Phenolic enrichment of foods curated in olive oil: Kinetics and chemical evaluation. *Food Chemistry: X*. 2024 Jun;22:101398, <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101398>
4. Cayuela-Sánchez JA, Caballero-Guerrero B. Fresh extra virgin olive oil, with or without veil. *Trends in Food Science & Technology*. 2019 Jan;83:78–85, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.014>
5. Delegirana ureda Komisije EU 2022/2104 o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje i o stavljanju izvan snage Uredbe 2568/1991 i Provedene uredbe br. 29/2012
6. EU (2013). Uredba 1308/2013 o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda.
7. EU (2021). Delegirana uredba 2022/2104 o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje.
8. Flynn MM, Tierney A, Itsiopoulos C. Is Extra Virgin Olive Oil the Critical Ingredient Driving the Health Benefits of a Mediterranean Diet? A Narrative Review. *Nutrients*. 2023 Jun 27;15(13):2916, <https://doi.org/10.3390/nu15132916>
9. Genovese A, Caporaso N, Sacchi R. Flavor Chemistry of Virgin Olive Oil: An Overview. *Applied Sciences*. 2021 Feb 11;11(4):1639, <https://doi.org/10.3390/app11041639>
10. Goldner MC, Zamora MC. Effect of polyphenol concentrations on astringency perception and its correlation with gelatin index of red wine: polyphenol concentrations

- on astringency perception. *Journal of Sensory Studies*. 2010 Oct;25(5):761–77, <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2010.00304.x>
11. Green RJ, Murphy AS, Schulz B, Watkins BA, Ferruzzi MG. Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51(9):1152-62, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700086>
  12. Guan X, Zhong X, Lu Y, Du X, Jia R, Li H, et al. Changes of Soybean Protein during Tofu Processing. *Foods*. 2021 Jul 9;10(7):1594, <https://doi:10.3390/foods10071594>
  13. Han BZ, Rombouts FM, Nout MJR. A Chinese fermented soybean food. *International Journal of Food Microbiology*. 2001 Apr;65(1–2):1–10, [https://doi:10.1016/s0168-1605\(00\)00523-7](https://doi:10.1016/s0168-1605(00)00523-7)
  14. Han J, Chang Y, Britten M, St-Gelais D, Champagne CP, Fustier P, et al. Interactions of phenolic compounds with milk proteins. *European Food Research and Technology* 2019 Sep;245(9):1881–8, <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03293-1>
  15. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 2015; 175, 556–567, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
  16. Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*. 2011 Aug;127(3):1046–55, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.079>
  17. Keogh J, McInerney J, Clifton P. The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *Journal of Food Science*. 2007;72(3):S230-S233, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00314.x>
  18. Klisović D, Koprivnjak O, Novoselić A, Pleadin J, Lešić T, Brkić Bubola K. Compositional Changes in the Extra Virgin Olive Oil Used as a Medium for Cheese Preservation. *Foods*. 2022 Aug 4;11(15):2329, <https://doi.org/10.3390/foods11152329>
  19. Koprivnjak, O. (2006). *Djevičansko maslinovo ulje - od masline do stola*. MIH, Poreč.
  20. Majetić Germek V, Gobin I, Franjković D, Marković M, Koprivnjak O. Reduction of Total Phenols in Virgin Olive Oil as a Preservation Medium during Cold Storage of Whey Cheese and Tofu. *Food Technology and Biotechnology*, 2024 3;62 <https://doi.org/10.17113/ftb.62.03.24.8434>

21. Maleky F. Oil Migration Through Fats—Quantification and Its Relationship to Structure. In: Structure-Function Analysis of Edible Fats .Elsevier; 2018 p. 241–66, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814041-3.00008-3>
22. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. Sensory Evaluation Techniques. 3. Izd. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press, 2004;292, <https://doi.org/10.1201/9781439832271>
23. Neilson AP, George JC, Janle EM, Mattes RD, Rudolph R, Matusheski NV, Ferruzzi MG. Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;5720:9418-9426, <https://doi.org/10.1021/jf902919k>
24. New World Encyclopedia contributors, "Tofu," New World Encyclopedia, <https://www.newworldencyclopedia.org/p/index.php?title=Tofu&oldid=1111016>
25. Ozdal T, Capanoglu E, Altay F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. Food Research International. 2013 May;51(2):954–70, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
26. Peyrot Des Gachons C, O’Keefe AJ, Slade L, Beauchamp GK. Protein suppresses both bitterness and oleocanthal-elicited pungency of extra virgin olive oil. Scientific Reports, 2021 Jun 4;11(1):11851, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91046-0>
27. Pinarli B, Simge Karliga E, Ozkan G, Capanoglu E. Interaction of phenolics with food matrix: In vitro and in vivo approaches. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism.r 2020 Mar 6;13(1):63–74, <https://doi.org/10.3233/MNM-190362>
28. Pripp AH, Vreeker R, Van Duynhoven J. Binding of olive oil phenolics to food proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005 Feb;85(3):354–62, <https://doi.org/10.1002/jsfa.1992>
29. Qiu C, Wang B, Wang Y, Teng Y. Effects of colloidal complexes formation between resveratrol and deamidated gliadin on the bioaccessibility and lipid oxidative stability. Food Hydrocolloids. 2017;69:466-72, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.020>
30. Quintero-Flórez A, Sánchez-Ortiz A, Gaforio Martínez JJ, Jiménez Márquez A, Beltrán



- Maza G. Interaction between extra virgin olive oil phenolic compounds and mucin. *European Journal of Lipid science and Technology*, 2015 Oct;117(10):1569–77, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400613>
31. Rodis PS, Karathanos VT, Mantzavinou A. Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002 Jan 1;50(3):596–601, <https://doi.org/10.1021/jf010864j>
32. Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*. 2019 Aug 1;11(8):1776, <https://doi.org/10.3390/nu11081776>
33. Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, et al. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*. 2013 Dec 20;3(1):1–23, <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>
34. Shalini, KV, Sanjitha, S, Santhiya, S, Vasuki, V, Senthil, K. An overview of Tofu: History, Types, manufacturing process and health benefits. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2021;23(10), 505-514, <https://doi:10.51201/jusst/21/10778>
35. Yin L, Zhang Y, Wu H, Wang Z, Dai Y, Zhou J, et al. Improvement of the phenolic content, antioxidant activity, and nutritional quality of tofu fermented with *Actinomucor elegans*. *Food Science and Technology*. 2020 Nov;133:110087, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110087>

## 8. ŽIVOTOPIS

Ivana Repić rođena je 22. 12. 2000. u Zagrebu. Završila je OŠ Sveti Đurđ 2015. i paralelno iste godine završila OGŠ Ludbreg položivši završni ispit na flauti. Upisala je Prvu gimnaziju Varaždin. Nakon završene opće gimnazije 2019., upisala je preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci kojeg je 2021. završila te stekla titulu prvostupnice sanitarnog inženjerstva. Nakon završenog preddiplomskog studija, upisala je diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom studija, dobitnica je stipendije za 10 % najboljih studenata Sveučilišta u Rijeci i stipendije za uspješne studente Varaždinske županije. Od mnogobrojnih studentskih poslova, radila je na usmjeravanju i ispunjavanju testova na COVID-19 na NZZJZ Primorsko-goranske županije. Položila je časnički vatrogasni ispit 2024., a u slobodno vrijeme svira u orkestru, peče klipiće, pomaže u obiteljskom OPG-u i sudjeluje u aktivnostima lokalne zajednice.

## POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Prosječna hranjiva vrijednost 100 g tofua

**Tablica 2.** Plan izrade baždarnog pravca s izmjerenim vrijednostima apsorbancija (EDMU)

**Tablica 3.** Plan izrade baždarnog pravca i rezultati apsorbancije za (lio-tofu)

**Tablica 4.** Promjene pokazatelja hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja ulja nakon skladištenja u kontaktu s tofuom

## POPIS SLIKA

**Slika 1.** Proces dobivanja tofua iz soje

**Slika 2.** Nutritivni sastav soje (Guan i sur., 2021.)

**Slika 3.** Kemijska struktura glavnih fenolnih spojeva pronađenih u *Olea europaea* L. (Romani i sur., 2019.)

**Slika 4.** Zapakirani tofu prije rezanja

**Slika 5.** Tofu u naljevu od ekstra djevičanskog maslinovog ulja

**Slika 6.** Liofilizator (lijevo) i liofilizirani tofu (desno)

**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje fenola iz EDMU-a

**Slika 8.** Baždarni pravac za određivanje fenola iz lio- tofua

**Slika 9.** Uzorci prebačeni u kivete od optičkog stakla

**Slika 10.** Prvo odmašćivanje tofua u heksanu

**Slika 11.** Udio ukupnih fenola (EKK = ekvivalenti kavske kiseline) u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

**Slika 12.** Udio ukupnih fenola (EKK = ekvivalenti kavske kiseline) u liofiliziranom tofuu

**Slika 13.** Senzorska svojstva EDMU-a ovisno o vremenu kontakta s tofuom

**Slika 14.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (ocjenjivači bez prethodnog iskustva konzumiranja tofua, N=24) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om.

**Slika 15.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (ocjenjivači s prethodnim iskustvom konzumiranja tofua, N=23) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om.

**Slika 16.** Rezultati rangiranja uzoraka tofua prema preferenciji okusa (svi ocjenjivači, N=47) ovisno o vremenu kontakta s EDMU-om.

PRILOG 1. Prilagođeni ocjenjivački listić za senzorsku analizu djevičanskog maslinovog ulja

OCJENJIVAČKI LISTIĆ ZA DJEVIČANSKA MASLINOVA ULJA

PERCEPCIJA MIRISA	INTENZITET
UPALJEN PLOD	_____
PLJESNIVO/VLAŽNO	_____
OCTIKAVO	_____
ULJNI TALOG	_____
METALNO	_____
UŽEGLO	_____
OSTALO _____	_____

PERCEPCIJA OKUSNO-KINESTETIČKIH SVOJSTAVA

VOĆNO	_____
<input type="checkbox"/> zeleno <input type="checkbox"/> zrelo	
GORKO	_____
PIKANTNO	_____
SLATKO	_____
TRPKO	_____

OCJENA (0-9): \_\_\_\_\_

IME  
OCJENJIVAČA: \_\_\_\_\_

ŠIFRA UZORKA:

DATUM: \_\_\_\_\_

KOMENTARI:

\_\_\_\_\_

## PRILOG 2. Obrazac za informirani pristanak za sudjelovanje u testu preferencije



Katedra za tehnologiju i kontrolu namirnica  
Braće Brančetta 20 (Vukovarska 11)  
HR – 51000 Rijeka

Rijeka 26. 6. 2024.

### SUGLASNOST OCJENJIVAČA ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Ovaj test preferencije okusa provodi se u okviru izrade diplomskog rada pod naslovom „Promjene fenola i senzorskih svojstava tofua u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja“ studentice *Sveučilišnog diplomskog studija Sanitarnog inženjerstva* Ivane Repić na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na *Katedri za tehnologiju i kontrolu namirnica*, pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivere Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.

Cilj istraživanja je evaluirati tradicionalni postupak čuvanja hrane u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja, a Vaše će nam sudjelovanje pomoći zaključiti utječe li takav postupak čuvanja na bolju prihvatljivost tofua kao modela hrane bogate bjelančevinama.

Sudjelovanje u istraživanju je dobrovoljno i anonimno. Rezultati će biti prikazani skupno, koristit će se isključivo u istraživačke svrhe a cjelovit će rad po završetku postupka obrane biti javno dostupan u digitalnom repozitoriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (<https://repository.medri.uniri.hr/>).

Hvala što ste pročitali ovaj dokument te vlastoručnim potpisom potvrdili svoju suglasnost za sudjelovanje u ovom istraživanju.

IME I PREZIME ocjenjivača (upisati velikim tiskanim slovima)	Vlastoručni potpis ocjenjivača

## PRILOG 3. Obrazac za provedbu testa preferencije okusa



medri

Katedra za tehnologiju i kontrolu namirnica  
Braće Branchetta 20 (Vukovarska 11)  
HR – 51000 Rijeka

Rijeka, 26. 6. 2024.

### TEST PREFERENCIJE OKUSA TOFUA IZ NALJEVA OD DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA OBRAZAC ZA OCJENJIVAČE

(osmišljen za potrebe izrade diplomskog rada *Promjene fenola i senzorskih svojstava tofua u naljevu od djevičanskog maslinovog ulja*, Sveučilišni diplomski studij sanitarnog inženjerstva, ak. god. 2023./2024.)

Spol (zaokružite odgovarajuće slovo): **M** **Ž** Dob (upišite godine života): \_\_\_\_\_

Jeste li prethodno u bilo kojem obliku imali priliku konzumirati tofu? (zaokružite odgovarajuće): **DA** **NE**

#### Preporuka za način kušanja okusa:

- svaki pojedini od tri ponuđena uzorka tofua dobro sažvačite i raspršite u slini
- usredotočite se na dojam ugone koji pruža okus te postoje li razlike između ponuđenih uzoraka
- između kušanja uzoraka, možete popiti malo vode radi ispiranja usne šupljine

#### Nakon kušanja okusa sva tri ponuđena uzorka, upišite sljedeće:

1. Uzorak čiji Vam se okus najviše sviđa (upišite oznaku s čašice): \_\_\_\_\_

Vaš komentar zašto Vam se najviše sviđa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2. Uzorak čiji Vam se okus najmanje sviđa (upišite oznaku s čašice): \_\_\_\_\_

Vaš komentar zašto Vam se najmanje sviđa? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. Eventualni dodatni komentar: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Zahvaljujemo na susretljivosti i suradnji!**