

## Hladna i topla ekstrakcija ulja heksanom iz pulpe i sjemenke ploda maslina sorte Leccino

### Sažetak

U ovom radu istražena je učinkovitost hladne i tople (Soxhlet) ekstrakcije ulja iz suhe tvari liofiliziranih maslinovih tijesta (bez koštice i s košticom) te iz sjemenki ploda masline sorte Leccino. Istražen je i utjecaj ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenolnih tvari i orto-difenola u dobivenim uljima. U maslinovim tijestima i sjemenkama određen je udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ( $IC_{50}$ ). Hladna i topla ekstrakcija pokazale su se podjednako učinkovite u izdvajanju ulja iz liofiliziranih maslinovih tijesta, dok je topla ekstrakcija bila učinkovitija u izdvajanju ulja iz sjemenki. Maslinova tijesta bez koštice imala su najveći udio fenolnih tvari ( $12,9 \text{ mg g}^{-1}$  s.t.) od tri ispitivana biljna materijala. Stoga su i ulja dobivena iz njih, osobito ona dobivena toplom ekstrakcijom, sadržavala najveće udjele ukupnih fenola ( $396,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i orto-difenola ( $206,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). U odnosu na maslinova tijesta, sjemenke su imale statistički značajno niži udio ukupnih fenola te višestruko niži antioksidacijski kapacitet. Rezultati su potvrdili da se uklanjanjem koštice smanjuje negativni utjecaj peroksidaza iz sjemenki na fenolne tvari u tijestu i ulju, te upućuju da se primjenom tople ekstrakcije povećava topljivost fenolnih tvari iz biljnog materijala u ulju.

**Glavne riječi:** ekstrakcija ulja, udio ulja, fenolne tvari, antioksidacijski kapacitet, Leccino

### Uvod

Plod masline građen je od tri osnovna anatomska dijela: kožice (epikarpa), pulpe (mezokarpa) i koštice (endokarpa). Unutar koštice nalazi se sjemenka (endosperm) koja čini svega 2-4 % ukupne mase cijelog ploda (Servili i sur., 2012). Pulpa masline (70-80 % mase ploda) sadrži ulje unutar staničnih vakuola, te značajne količine fenolnih tvari, biološki aktivnih spojeva s izraženim antioksidacijskim djelovanjem. Fenolne tvari se u plodu nalaze u nakupinama smještenim neposredno uz staničnu stjenku. Servili i sur. (2012) navode da udio fenolnih tvari u plodu masline može iznositi od 0,5 do 2,5 % mase svježeg ploda i da značajno ovisi o sorti i stupnju zrelosti ploda. U pulpi i kožici sadržano je oko 95 % od ukupne količine fenolnih tvari ploda, dok je preostalih 5 % sadržano u sjemenci (Jerman Klen i sur., 2015). Zbog izrazite hidrofilitnosti, veliki se dio ovih spojeva (oko 98 %) izgubi tijekom prerade, putem nusproizvoda (komine i/ili vegetabilne vode), a u ulje prijeđe tek 1-2 % ukupnih fenola iz ploda (Rodis i sur., 2002). Fenolni spojevi doprinose održivosti ulja jer djeluju kao antioksidansi i poboljšavaju otpornost maslinovih ulja prema oksidaciji (Rodriguez i sur., 2008).

Sjemenka sadrži značajni udio ulja (22-27 % mase sjemenke), ali je doprinos ulja iz sjemenke ukupnoj količini ulja u plodu masline mali (oko 1,0-1,5 % mase svježeg ploda) u odnosu na pulpu (16,5-23,5 % mase svježeg ploda) (Servili i sur., 2012). Za sjemenku i ulje sjemenke karakteristično je da sadrži veći udio tokoferola i sterola od ulja iz pulpe te specifičan fenolni spoj nuzhenid. Sjemenka sadrži i nekoliko enzima bitnih za sintezu hlapivih mirisnih tvari te oblikovanje fenolnog sastava djevičanskog maslinova ulja tijekom prerade ploda (Koprivnjak, 2006). Lipoksigenaze iz sjemenke i pulpe sudjeluju u sintezi poželjnih mirisnih tvari djevičanskih maslinovih ulja (Reboredo-Rodriguez i sur., 2013). Aktivnost peroksidaza iz sjemenke tijekom prerade

<sup>1</sup>

Doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, Barbara Vuković, mag. sanit. ing., Bojana Lukić, mag. sanit. ing., prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Katedra za tehnologiju i kontrolu namirnica, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka, Hrvatska  
Autor za korespondenciju: valerija.majetic@medri.uniri.hr

maslina može smanjiti udio fenolnih tvari u ulju, zbog čega se pojedini proizvođači odlučuju za uklanjanje koštice na početku procesa prerade maslina u ulje. Rezultati dosadašnjih istraživanja o utjecaju otkoštivanja na fenolne tvari maslinovih ulja nisu potpuno podudarni. Prema istraživanjima Amirante i sur. (2006), Luaces i sur. (2007) te Montedoro i sur. (2001) maslinova ulja dobivena iz otkoštivena maslinova tijesta imaju veći udio fenolnih tvari zbog smanjene aktivnosti oksidativnih enzima. S druge strane, Del Caro i sur. (2006) utvrdili su da uklanjanje koštice ne dovodi do značajne promjene udjela fenolnih tvari u uljima.

Koštice uklonjene u procesu prerade maslina u ulje, kao i one uklonjene u proizvodnji stolnih maslina, predstavljaju potencijalni izvor ulja i biološki vrijednih spojeva za kozmetičku i farmaceutsku industriju (Rodrigues i sur., 2015) te za dobivanje energije iz fragmenata koštice (Rodrigeuz i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je usporediti učinkovitost primjene hladnog i toplog otapala (Soxhlet metoda) u ekstrakciji ulja iz suhe tvari tri vrste biljnog materijala tj. maslinova tijesta bez koštice, maslinova tijesta s košticom te sjemenki maslina sorte Leccino. Istražen je i utjecaj metode ekstrakcije na prelazak ukupnih fenolnih tvari i *orto*-difenola u ulje.

## Materijali i metode

### *Biljni materijal*

Maslinova tijesta i koštice sorte Leccino uzorkovana su iz proizvodnog procesa uljare tvrtke Agrolaguna d.d. (Poreč) početkom listopada 2016. godine (postrojenje Molinova Genius, Peralisi, Italija). Uzorkovane su dvije vrste maslinovih tijesta. Maslinovo tijesto dobiveno standardnim postupkom prerade mljevenjem cijelog ploda na mlinu čekičaru te maslinovo tijesto dobiveno nakon industrijskog uklanjanja koštice. Sjemenke su ručno izdvojene razbijanjem koštica.

### *Karakteristike ploda*

Stupanj zrelosti ploda masline sorte Leccino određen je prema metodi Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2011) koja se temelji na bodovanju boje kožice i pulpe ploda u rasponu od 0 do 7. Udjel pulpe, koštice i sjemenke u plodu određen je gravimetrijskom metodom. Iz homogenog uzorka ploda (2,5 kg) nasumce je odabrano 100 plodova iz kojih je ručno izdvojena pulpa ploda i koštice, dok je iz koštica izdvojena sjemenka. Na temelju mase 100 plodova, dobivene pulpe, koštica i sjemenki, izračunati su udjeli ovih anatomskih dijelova ploda, prosječna masa ploda i omjer pulpa/koštica.

### *Priprema i sušenje biljnog materijala*

Uzorci maslinovih tijesta protisnuti su kroz sito dimenzija 1 x 1 mm zbog uklanjanja fragmenata koštica, te dobivanja homogenih i usporedivih uzoraka. Maslinova tijesta i sjemenke čuvani su na -20 °C u zatvorenim staklenkama, prije i nakon sušenja u liofilizatoru (CoolSafe 55-4 Freeze dryer ScanVac, Labogene, Danska). Radni uvjeti sušenja bili su: temperatura -51 °C, vakuum <math>5 \times 10^{-3}</math> mbar, brzina nastanka vakuuma 5 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Maslinova tijesta sušila su se u na čeličnim policama, a sjemenke u staklenim bočicama za sušenje. Udio vode (%) u biljnom materijalu određen je iz razlike masa biljnog materijala prije i nakon sušenja u liofilizatoru.

### *Ekstrakcija i analize ulja iz biljnog materijala*

Ulje iz maslinovih tijesta i sjemenki ekstrahirano je hladnom ekstrakcijom n-heksanom koju su opisali Li i sur. (2007) te toplom tj. standardnom Soxhlet ekstrakcijom (HR EN ISO 659:2010). Hladna ekstrakcija provedena je miješanjem biljnog materijala i otapala (1:3, m:V) na električnoj miješalici u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja otapala, ekstrakcija



je ponovljena u još dva navrata, u trajanju od 2 te 1 sata, a dobiveni ekstrakti su spojeni. Soxhlet ekstrakcija provedena je u trajanju od 6 sati, nakon čega je materijal usitnjen u tarioniku i pomiješan s malom količinom kvarcnog pijeska, a ekstrakcija je nastavljena još 3 sata. Ekstrahirana ulja heksanom profiltrirana su preko grubog i finog filtarskog papira (plava vrpca, Filtrak 391). Otapalo je uklonjeno uparavanjem na rotacijskom vakuuromskom uparivaču (RV 10 digital, IKA, Njemačka) do postizanja konstantne mase ulja. Ekstrakcije ulja provedene su u tri ponavljanja za svaki uzorak. Udio ulja (%) izražen je na suhu tvar biljnog materijala.

Udio ukupnih fenolnih tvari u uljima određen je kolorimetrijskom reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom uz prethodnu ekstrakciju tekuće-tekuće (Koprivnjak i sur., 2010), a rezultati su iskazani u mg kavske kiseline  $\text{kg}^{-1}$  ulja. *Orto*-difenoli iz ulja ekstrahirani su i određeni prema metodi Certa i sur. (2007).

#### *Ukupne fenolne tvari i antioksidacijski kapacitet biljnog materijala*

Fenolne tvari iz maslinovih tijesta i sjemenki ekstrahirane su metanolom (Valenčić, 2010) i određeni su kolorimetrijskom reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom, a njihov maseni udio izražen je u mg kavske kiseline  $\text{g}^{-1}$  suhog uzorka.

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta korišten je slobodni DPPH radikal (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD) prema metodi koju je opisao Valenčić (2010). Iz polaznog metanolnog ekstrakta pripremljen je niz razrjeđenja koja su sadržavala od 0 do 300  $\mu\text{L}$  ekstrakta te 300 do 0  $\mu\text{L}$  metanola. U svako razrjeđenje dodano je 3 mL svježe pripremljene otopine DPPH radikala ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u metanolu) i homogenizirano 10 sekundi na Vortex uređaju. Apsorbancije su izmjerene na 515 nm (spektrofotometar HACH DR/400, Colorado, SAD) nakon 15 minuta reakcije u tami. Postotak preostalog DPPH radikala izračunat je u odnosu na kontrolni uzorak (300  $\mu\text{L}$  metanola i 3 mL DPPH radikala). Iz dobivenih rezultata, grafički je prikazana ovisnost masene koncentracije biljnog materijala ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) o preostaloj količini DPPH radikala (%), a iz jednadžbi pravaca izračunata je koncentracija biljnog materijala ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) potrebna za 50 %-tno smanjenje početne koncentracije DPPH radikala ( $\text{IC}_{50}$ ). Radi lakšeg razumijevanja rezultata, antioksidacijski kapacitet iskazan je kao recipročna vrijednost  $\text{IC}_{50}$ .

#### *Statistička analiza rezultata*

Statistička analiza rezultata provedena je računalnim programom Statistica 13 (StatSoftInc., Tulsa, SAD). Rezultati (udio ulja, fenolnih tvari i *orto*-difenola) su testirani pomoću jednosmjerne analize varijance. Homogenost varijance testirana je Levenovim testom, a srednje su vrijednosti rezultata uspoređene pomoću Tukeyevog testa značajnih razlika (Tukey's honest significant difference test - HSD). Srednje vrijednosti udjela vode i suhe tvari u biljnom materijalu uspoređene su pomoću Tukeyevog testa značajnih razlika za uzorke nejednakih veličina (Tukey's HSD for unequal N). Statistički značajne razlike izražene su na nivou vjerojatnosti od 95 % ( $p < 0,05$ ).

## **Rezultati i rasprava**

U istraživanju su korištene masline sorte Leccino, koje se uzgajaju isključivo za proizvodnju ulja. Plodovi su imali prosječnu masu 2,1 g te prosječni indeks zrelosti 3,3 (Tablica 1) što ukazuje na to da je kod većine plodova više od polovice površine poprimilo crvenkastu do ljubičastu boju dok je meso ploda ostalo svijetlo zeleno. Berba plodova u takvom stupnju zrelosti uobičajena je praksa koja omogućuje postizanje povoljnog odnosa prinosa i kvalitete ulja. U pravilu, što je veći indeks zrelosti to je veći prinos ulja ali i veća mogućnost gubitka kvalitete ulja (Conde i sur., 2008).

**Tablica 1.** Karakteristike plodova maslina sorte Leccino  
**Table 1.** Characteristics of olive fruits of Leccino cultivar

Stupanj zrelosti/ Maturity index	Prosječna masa ploda (g)/ Average fruit mass (g)	Omjer pulpa/koštica/ Pulp/pit ratio	Maseni udio u plodu (%) / Mass fraction in fruit (%)		
			Pulpa/ Pulp	Koštica/ Pit	Sjemenka/ Seed
3,3	2,1	2,5 / 1	71,6	24,7	3,7

Sadržaj vode u plodu masline značajno utječe na ekstraktabilnost ulja. Visoki sadržaj vode (>55 %) ima tendenciju stvaranja emulzije ulje–voda u maslinovom tijestu tijekom mljevenja ploda, otežavajući izdvajanje uljne faze tijekom centrifugiranja. Stoga je preporučen udio vode u plodu masline koji se prerađuje između 50 i 55 % (Canamasas, 2006). Kada se koštica masline ukloni, bez drobljenja, tijesto masline sadrži manje čvrstih čestica pa ono može sadržavati za 5 do 7 postotnih jedinica više vode u odnosu na integralno tijesto koje sadrži i zdrobljenu košticu (Boskou, 2006). Budući da su obje vrste tijesta u ovom istraživanju podvrgnute sušenju bez fragmenata koštice, razumljivo je da nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu vode (Tablica 2). Udio vode bio je veći od preporučenog za lako izdvajanje ulja, ali su vrijednosti od 61–62 % vode uobičajene za ovu sortu u agrometeorološkim uvjetima istarskog podneblja. Brkić i sur. (2006) navode da su plodovi sorte Leccino u 2004. i 2005. godini sadržavali 58–61 % vode, što je bilo više od Istarske bjelice, ali manje od tri preostale istraživane istarske sorte. Udio vode u uzorcima sjemenke Leccina bio je 31,1 % što je dvostruko manje u odnosu na maslinovo tijesto, a što je i očekivano s obzirom da se radi o endospermu bogatom uljem (Rodriguez i sur., 2008).

**Tablica 2.** Udio vode i suhe tvari u maslinovim tijestima i sjemenkama  
**Table 2.** Water and dry matter content of olive pastes and seeds

Uzorak / Sample	Udio vode (%) / Water content (%) <sup>4)</sup>	Udio suhe tvari (%) / Dry matter content (%) <sup>4)</sup>
Maslinovo tijesto bez koštice/ Olive paste without pit <sup>1)</sup>	61,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	38,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
Maslinovo tijesto s košticom/ Olive paste with pit <sup>2)</sup>	61,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	38,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
Sjemenke/ Seeds <sup>3)</sup>	31,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	68,9 ± 0,8 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Rezultati su srednje vrijednosti 3 određivanja ± standardna devijacija/  
 Results are means of 3 determinations ± standard deviation

<sup>2)</sup> Rezultati su srednje vrijednosti 5 određivanja ± standardna devijacija/  
 Results are means of 5 determinations ± standard deviation

<sup>3)</sup> Rezultati su srednje vrijednosti 2 određivanja ± standardna devijacija/  
 Results are means of 2 determinations ± standard deviation

<sup>4)</sup> Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima unutar istog stupca statistički se značajno razlikuju (Tukeyev test za uzorke nejednakih veličina,  $p < 0,05$ ) /  
 Means labelled by different lowercase letters in the same column are significantly different (Tukey's test for unequal samples,  $p < 0.05$ ).

Udjeli ulja u liofiliziranim maslinovim tijestima određeni hladnom ekstrakcijom u odnosu na toplu ekstrakciju aparaturom po Soxhletu nisu se statistički značajno razlikovali (Tablica 3). Ekstrakcije su bile jednako učinkovite, što se može povezati s visokom poroznosti liofiliziranog biljnog materijala koja osobito pogoduje hladnom postupku (Settle, 1997). Izrazita razlika u udjelu ulja između tijesta prerađenog s košticom (39–40 %) i onog bez koštice (51–52 %) nije bila očekivana, budući da su fragmenti koštice uklonjeni iz obje vrste tijesta prije podvrgavanja



ekstrakciji. Učinkovitost primijenjenih metoda ekstrakcije kod liofiliziranih sjemenki pokazala je statistički značajne razlike. Toplom ekstrakcijom dobiven je veći udio ulja (39,3 % s.t.) u odnosu na hladnu ekstrakciju (33,7 % s.t.). Razlog tomu može biti to što je ulje u citoplazmi sjemenki smješteno unutar vakuola stabiliziranih proteinom oleozinom (što nije slučaj kod mezokarpa) koje su i znatno manjih dimenzija (0,5–2,5  $\mu\text{m}$ ) u odnosu na vakuole u citoplazmi mezokarpa (10–25  $\mu\text{m}$ ) (Frandsen i sur., 2001). Moguće je da takve karakteristike uljnih vakuola u sjemenkama u većoj mjeri ometaju ekstrakciju ulja kada se ona provodi hladnim postupkom. Kod ekstrakcije ulja iz različitog sjemenja iz literature je također poznato da Soxhlet postupak daje veći prinos od hladnog postupka (Nadeem i sur., 2015).

**Tablica 3.** Udio ulja u maslinovim tijestima bez koštica (BK), s košticama (KO) i sjemenkama dobivenih hladnom i toplom (Soxhlet) ekstrakcijom, te udio ukupnih fenola i *orto*-difenola u dobivenim uljima

**Table 3.** Oil content in olive pastes without pits (WP), with pits (P) and seeds obtained by cold and hot (Soxhlet) extraction, and mass fraction of total phenols and *ortho*-diphenols in respective oils

Ekstrakcija/ Extraction	Uzorak/ Sample	Udio ulja (% u s.t.)/ Oil content (% d.m.) <sup>1)</sup>	Udio ukupnih fenola (mg kg <sup>-1</sup> ulja)/ Total phenols (mg kg <sup>-1</sup> of oil) <sup>1)</sup>	Udio <i>orto</i> -difenola (mg kg <sup>-1</sup> ulja)/ <i>Ortho</i> -diphenols (mg kg <sup>-1</sup> of oil) <sup>1)</sup>
Hladna/ Cold	Maslinovo tijesto BK/ Olive paste WP	51,0 ± 0,6 <sup>aA</sup>	110,5 ± 5,9 <sup>aA</sup>	21,5 ± 1,0 <sup>A</sup>
	Maslinovo tijesto KO/ Olive paste P	39,4 ± 0,2 <sup>bA</sup>	24,5 ± 1,1 <sup>bA</sup>	nd <sup>2)</sup>
	Sjemenke/ Seeds	33,7 ± 2,6 <sup>cA</sup>	12,5 ± 1,0 <sup>cA</sup>	nd
Soxhlet/ Soxhlet	Maslinovo tijesto BK/ Olive paste WP	52,3 ± 0,7 <sup>aA</sup>	396,7 ± 18,5 <sup>aB</sup>	206,3 ± 10,9 <sup>aB</sup>
	Maslinovo tijesto KO/ Olive paste P	39,9 ± 1,1 <sup>bA</sup>	261,3 ± 9,0 <sup>bB</sup>	55,1 ± 5,7 <sup>b</sup>
	Sjemenke/ Seeds	39,3 ± 1,0 <sup>bB</sup>	68,8 ± 12,4 <sup>cB</sup>	nd

<sup>1)</sup> Rezultati su srednje vrijednosti 3 određivanja (3 ekstrakcije × 1 analitički postupak) ± standardna devijacija. Mala slova unutar istog stupca i unutar istog načina ekstrakcije ukazuju na statistički značajne razlike između biljnog materijala, dok velika slova u istom stupcu za pojedini biljni materijal ukazuju na statistički značajne razlike između načina ekstrakcije (Tukeyev test,  $p < 0,05$ )./ Results are means of 3 determinations (3 extractions × 1 analytical determination) ± standard deviation. Different lowercase letters in the same column and within each type of extraction indicate statistically significant differences between plant materials while different uppercase letters in the same column and for each type of plant material indicate statistically significant differences between extraction methods (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

<sup>2)</sup> Nije detektirano/ Not detected

Udjeli ukupnih fenola u uljima dobivenim hladnom odnosno toplom ekstrakcijom iz maslinovih tijesta bez koštice, s košticom i iz sjemenke ploda statistički su se značajno razlikovali (Tablica 3). Toplom ekstrakcijom dobivena su ulja sa značajno višim vrijednostima ukupnih fenola, što se može pripisati primjeni visokih temperatura koje povećavaju topljivost tvari iz biljnog materijala u ulju (Nadeem i sur., 2015). Neovisno o načinu ekstrakcije, statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola postojala je između ulja dobivenih iz različitog biljnog materijala. Najveći udio dobiven je u uljima iz tijesta bez koštice, a najmanji u uljima iz sjemenki masline,

što je sukladno razlikama u masenim udjelima ukupnih fenola utvrđenim izravno u biljnom materijalu (Tablica 4). Slične rezultate kod istraživanja učinka otkoštivanja ploda na udio fenola u maslinovim uljima naveli su Amirante i sur. (2006) te Luaces i sur. (2007).

*Orto*-difenoli su skupina fenolnih tvari djevičanskih maslinovih ulja koje pokazuju najjaču antioksidacijsku aktivnost. Njihov udio u ulju bilo je moguće odrediti samo na onim uzorcima koji su sadržavali više od 100 mg kg<sup>-1</sup> ukupnih fenola (zbog ograničene količine uzoraka ulja). Maseni udio *orto*-difenola u uljima dobivenim hladnom ekstrakcijom iz tijesta bez koštice (21,5 mg kg<sup>-1</sup>) bio je statistički značajno niži od udjela u uljima dobivenim toplom ekstrakcijom (206,3 mg kg<sup>-1</sup>) (Tablica 3). Može se istaknuti da je ta razlika višestruko veća od one zabilježene kod ukupnih fenola za iste uzorke ulja. Osim toga, u uljima dobivenim toplom ekstrakcijom iz maslinovih tijesta bez koštice udjeli *orto*-difenola bili su značajno veći u odnosu na maslinova tijesta s košticom, što je također sukladno rezultatu koji se odnosi na ukupne fenole.

Uspoređujući udjele ukupnih fenola u maslinovim tijestima (Tablica 4), uočava se da je taj udio za približno 33 % veći u tijestu bez koštice (12,9 mg g<sup>-1</sup>) u odnosu na ono s košticom (8,6 mg g<sup>-1</sup>). Sukladno tomu, antioksidacijski kapacitet tijesta bez koštice bio je za oko 43 % viši u odnosu na antioksidacijski kapacitet tijesta s košticom. Takav rezultat je očekivan s obzirom da je poznato da peroksidaze iz sjemenke dovode do oksidacije fenolnih tvari (Servili i Montedoro, 2002; Romero-Segura i sur., 2012). Uklanjanjem koštice bez usitnjavanja sjemenke izbjegava se takav nepoželjan učinak peroksidaza.

U sjemenci masline, udio ukupnih fenolnih tvari bio je statistički značajno niži u odnosu na oba maslinova tijesta. Iznosio je 5,3 mg g<sup>-1</sup>, što je usporedivo s vrijednošću koju su Ben Mansour i sur. (2015) utvrdili u sjemenkama maslina sorte Chemlali putem tekućinske kromatografije (5,5 mg g<sup>-1</sup>). Antioksidacijski kapacitet iskazan recipročnom vrijednošću IC<sub>50</sub> (0,02) ipak je nerazmjerno nizak u odnosu na ono što bi se moglo očekivati s obzirom na udio ukupnih fenola u sjemenci, odnosno u maslinovim tijestima. To se može objasniti specifičnim fenolnim sastavom sjemenke u kojem prevladava monofenol nuzhenid (Ben Mansour i sur., 2015), dok u maslinovom tijestu prevladava oleuropein i njegovi derivati koji pripadaju skupini *orto*-difenola i imaju jače antioksidacijsko djelovanje od monofenola (Koprivnjak, 2006).

**Tablica 4.** Udjeli ukupnih fenola u maslinovom tijestima i sjemenkama te njihov antioksidacijski kapacitet (IC<sub>50</sub> i 1/IC<sub>50</sub>)

**Table 4.** Mass fraction of total phenols in olive pastes and seeds along with their antioxidative capacity (IC<sub>50</sub> and 1/IC<sub>50</sub>)

Uzorak/ Sample	Ukupni fenoli (mg g <sup>-1</sup> )/ Total phenols (mg g <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	IC <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )/ IC <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	1/IC <sub>50</sub> / 1/IC <sub>50</sub>
Maslinovo tijesto bez koštice/ Olive paste without pit	12,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,6	0,28
Maslinovo tijesto s košticom/ Olive paste with pit	8,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,3	0,16
Sjemenke/ Seeds	5,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	46,4	0,02

<sup>a</sup> Rezultati su srednje vrijednosti 4 određivanja ± standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim malim slovima unutar istog stupca statistički se značajno razlikuju (Tukeyev test,  $p < 0,05$ )./ Results are means of 4 determinations ± standard deviation. Means labelled by different lowercase letters in the same column are significantly different (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

## Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su hladna i topla ekstrakcija podjednako učinkovite u izdvajanju ulja iz liofiliziranih maslinovih tijesta, dok je topla ekstrakcija učinkovitija u izdvajanju ulja iz sjemenki. Iskazano na suhu tvar, maslinova tijesta bez koštice sadrže statistički značajno više ulja i više ukupnih fenolnih tvari u odnosu na maslinova tijesta s košticom. U odnosu na maslinova tijesta, sjemenke imaju statistički značajno niži udio ukupnih fenola te višestruko niži antioksidacijski kapacitet. Ulja dobivena toplom (Soxhlet) ekstrakcijom sadrže statistički značajno veće udjele ukupnih fenola i *orto*-difenola. Rezultati potvrđuju da se uklanjanjem koštice smanjuje negativni utjecaj peroksidaza iz sjemenki na fenolne tvari u tijestu i ulju, te upućuju na to da se primjenom tople ekstrakcije povećava topljivost fenolnih tvari iz biljnog materijala u ulju. Iz dobivenih rezultata proizlazi da su maslinova tijesta bez koštice matriks bogat fenolnim tvarima iz kojeg se u laboratorijskim uvjetima mogu dobiti ulja odabranih karakteristika.

## Zahvala

Istraživanje je djelomično financirano sredstvima znanstveno-istraživačke potpore Sveučilišta u Rijeci (projekt UNIRI-TEHNIK-18-294).

Autori se zahvaljuju Katji Gašparini i tvrtci Agrolaguna d.d. te Danijeli Poljuha s Instituta za poljoprivredu i turizam Poreč za tehničku pomoć u pripremi uzoraka.

## Literatura

- Amirante, P., Clodoveo, M.L., Dugo, G., Leone, A., Tamborino, A. (2006) Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned paste: influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality. *Food Chemistry*, 98 (4), 797-805. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.040
- Ben Mansour, A., Porter, E.A., Kite, G.C., Simmonds, M.S., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015) Phenolic profile characterization of Chemlali olive stones by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25: 63 (7), 1990-1995. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00353
- Boskou, D. (2006) Olive Oil: Chemistry and Technology. 2nd edition. Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Brkić, K., Radulović, M., Sladonja, B., Lukić, I., Šetić, E. (2006) Application of Soxtec apparatus for oil content determination in olive fruit. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 83 (3), 115-119.
- Canamasas, P. (2006) Use of coadjuvants in olive oil extraction, *Australian & New Zeland Olivegrower & Processor*, 3-4, 29-30.
- Cert, A., Romero, A., Cert, R. (2007) Colorimetric method for the determination of o-diphenolic compound in olive oils, revised method. Instituto de la Grasa, (CSIC), Sevilla, Španjolska.
- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165(15), 1545-1562. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.04.018
- Del Caro, A., Vacca, V., Poiana, M., Fenu, P., Piga, A. (2006) Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Boscana cv.) from whole and de-stoned fruits. *Food Chemistry*, 98 (2), 311-316. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.075>
- Frandsen, G.I., Mundy, J., Tzen J.T. (2001) Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum*, 112 (3): 301-307. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120301.x>
- HR EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).
- IOC – International Olive Council (2011) COI/OH/Doc. No 1. Guide for the determination of the characteristics of oil-olives.
- Jerman Klen, T., Golc Wondra, A., Vrhovšek, U., Sivilotti, P., Vodopivec, B.M. (2015) Olive fruit phenols transfer, transformation, and partition trail during laboratory-scale olive oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (18), 4570-4579. DOI: 10.1021/jf506353z
- Koprivnjak, O. (2006) Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola. Poreč: MIH.
- Koprivnjak, O., Majetić, V., Malenica Staver, M., Lovrić, A., Blagović, B. (2010) Effect of phospholipids on extraction of hydrophilic phenols from virgin olive oils. *Food Chemistry*, 119 (2), 698-702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.016>
- Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J., Drover, J.C.G. (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101, 1633-1639. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.04.033
- Luaces, P., Romero, C., Gutierrez, F., Sanz, C., Perez, A.G. (2007) Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (14), 2721-2727. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3049>
- Montedoro, G., Baldioli, M., Servili, M. (2001) Estrazione dell'olio vergine de paste denocciate. *Olivo & Olio*, 4, 28-32.
- Nadeem, R., Iqbal, A., Abid Zia, M., Anwar, F., Shahid, S.A., Mahmood, Z., Shafeeq, A., Akhtar, N. (2015) Effect of Cold-Pressing and Soxhlet Extraction on the Physico-Chemical Attributes of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed Oil.



*International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 7, 41-46.

Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. and Simal-Gándara, J. (2013) Aroma biogenesis and distribution between olive pulps and seeds with identification of aroma trends among cultivars. *Food Chemistry*, 141(1), 637-643. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.095

Rodis, P. S., Karathanos, V. J., Mantzavinou, A. (2002) Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (3), 596-601. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf010864j>

Rodrigues, F., Pimentela, F. B., Beatriz, M.M, Oliveira, P.P. (2015) Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops Products*, 70, 116-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.027>

Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jimenez, A., Guillen, R., Fernandez-Bolaños, J. (2008) Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5261-5269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027>

Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C., Pérez, A. G. (2012) The role of olive  $\beta$ -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 45 (1), 191-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.024>

Servili, M., Montedoro, G. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science Technology*, 104 (9-10), 602-13. DOI: [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X)

Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Sordini, B., Urbani, S. (2012) Technological aspects of olive oil production. U: Muzzalupo, I., ur. *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. Rijeka: InTech. DOI: 10.5772/52141

Settle, F. (1997) Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall PTR.

Valenčič, V. (2010). Vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk Slovenske Istre. Doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

Prispjelo/Received: 18.4.2019.

Prihvaćeno/Accepted: 3.6.2019.

Original scientific paper

## Cold and hot hexane extraction of oil from olive pulp and seeds of Leccino cultivar

### Abstract

In this work, the effectiveness of cold and hot (Soxhlet) extraction of oil from the dry matter of lyophilized olive pastes (without pit and with pit) and seeds of olive fruits of Leccino cultivar, was investigated. The effect of extraction on the content of total phenols and ortho-diphenols in the obtained oils was also investigated. Total phenols content and antioxidant capacity ( $IC_{50}$ ) were determined in olive pastes and seeds. Cold and hot extraction proved to be equally effective in extracting oil from lyophilized olive pastes, while hot extraction was more efficient in extracting oil from seeds. Olive pastes without pits had the highest total phenols content ( $12.9 \text{ mg g}^{-1}$  of dry mass) of the three investigated plant materials. Therefore, the oils obtained from them, particularly those obtained by Soxhlet extraction, contained the highest total phenols content ( $396.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and ortho-diphenols ( $206.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Compared to olive pastes, the seeds had a statistically significantly lower total phenols content and a multiple lower antioxidant capacity. The results confirmed that pits removal reduces the negative influence of peroxidases from seeds on the phenol compounds in the olive paste and in the oil, also suggesting that hot extraction increases the solubility of phenols from plant material in the oil.

**Key words:** oil extraction, oil content, phenolic compounds, antioxidant capacity, Leccino