

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
FENOLNE SPOJINE V OLJKI IN OLJČNEM OLJU

ANDREJA GROBIŠA

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Fenolne spojine v oljki in oljčnem olju**

(Phenolic compounds in olive tree and olive oil)

Ime in priimek: Andreja Grobiša

Študijski program: Sredozemsko kmetijstvo

Mentor: doc. dr. Ana Miklavčič Višnjevec

Koper, avgust 2017

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Andreja GROBIŠA

Naslov zaključne naloge: Fenolne spojine v oljki in oljčnem olju

Kraj: Koper

Leto: 2017

Število listov: 32      Število slik: 4      Število tabel: 1

Število referenc: 58

Mentor: doc. dr. Ana Miklavčič Višnjevec

Ključne besede: fenolne spojine, oljka, oljčno olje, *Olea europaea*

Izvleček: Plodovi oljke so se že od starodavnih časov uporabljali za pridobivanje oljčnega olja v različne namene in sicer kot prehrana, za verske obrede, za gorivo v oljnih svetilkah, kot sestavina za kozmetiko in v zdravilne namene. Pomembno vlogo pri blagodejnih učinkih oljčnega olja na zdravje ljudi imajo fenolne spojine. To so kompleksne spojine, ki jih oljka tvori v času svoje rasti in dozorevanja plodov. Pravzaprav so fenolne spojine odgovor rastline na stresne okoljske razmere in imajo ključno vlogo pri varovanju rastlin. Fenolne spojine so antioksidanti, ki pozitivno delujejo tudi na naše telo, saj varujejo pred škodljivim oksidativnim stresom, srčnimi boleznimi, pred široko paleto revmatskih obolenj ter celo pred različnimi oblikami raka. Senzorično jih v plodovih oljke zaznamo kot značilen trpek okus, oljčnemu olju pa dajejo pikantnost in grenkobo.

### Key words documentation

Name and SURNAME: Andreja GROBIŠA

Title of the final project paper: Phenolic compounds in olive tree and olive oil

Place: Koper

Year: 2017

Number of pages: 32      Number of figures: 4      Number of tables: 1

Number of references: 58

Mentor: Assist. Prof. Ana Miklavčič Višnjevec, PhD

Keywords: phenolic compounds, olive tree, olive oil, *Olea europaea*

Abstract: Olive fruits have been used since ancient times to produce olive oil for various purposes: as part of regular diet, for religious rituals, for fuel in oil lamps, as an ingredient for cosmetics and for medicinal purposes. The beneficial effect of olive oil on people's health is mainly due to the presence of phenolic compounds. These are complex compounds which olives form in the course of their growth and fruit ripening. In fact, phenolic compounds are a response of the plant to any unwanted environmental conditions and play a key role in protecting the plant. Phenolic compounds are antioxidants that positively affect our body too as they protect us against harmful oxidative stress, heart diseases, a wide range of rheumatic diseases and even different types of cancer. Their sensory properties are felt in olive fruit as a typical astringent taste and they give olive oil bitterness and pungency.

## **ZAHVALA**

Za izkazano pomoč pri izdelavi zaključne naloge se zahvaljujem mentorici doc. dr. Ani Miklavčič Višnjevce. Za pomoč in napotke hvala tudi izr. prof. dr. Dunji Bandelj in dr. Matjažu Hladniku.

Zahvala gre tudi vsem predavateljem in zaposlenim na UP Famnit za nudeno znanje in pomoč v celotnem času študija. V največje veselje mi je bilo sodelovati s tako prijaznim kadrom, kot ga premore naša fakulteta. Hvala še sošolcem in kolegom iz UP Famnit za spodbudo v času študija in prijateljici Taji za motivacijo in pomoč v obdobju pisanja zaključne naloge.

Še posebej hvala staršema, da sta mi privzgojila ljubezen do kmetijstva in dela ter nudila potrpljenje in pomoč v času študija. Hvala še bratu Andražu za moralno podporo.

## KAZALA

### KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	OLJKA NEKOČ IN DANES .....	2
3	FENOLNE SPOJINE .....	3
3.1	Definicija fenolnih spojin .....	3
3.2	Delitev fenolnih spojin.....	4
3.3	Metode določanja fenolnih spojin.....	5
3.3.1	Spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu reagentom .....	5
3.3.2	HPLC določitev .....	6
3.4	Antioksidativno delovanje fenolnih spojin .....	7
4	FENOLNE SPOJINE V PLODOVIH TER LISTIH OLJKE IN OLJČNEM OLJU ...	8
4.1	Fenolne spojine, značilne za oljko .....	8
4.1.1	Lignani.....	9
4.1.2	Flavonoidi.....	10
4.1.3	Sekoiridoidi .....	11
4.2	Fenolne spojine v listih oljke .....	12
4.3	Fenolne spojine v plodovih oljke.....	13
4.4	Fenolne spojine v oljčnem olju .....	13
5	OKSIDACIJSKE PRETVORBE IN SPREMEMBE FENOLNIH SPOJIN .....	16
6	ZAKLJUČEK.....	18
7	LITERATURA IN VIRI.....	20

### KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Razdelitev fenolnih spojin glede na število ogljikovih atomov v molekuli (Veberič, 2010).....	4
---	---

### KAZALO SLIK

Slika 1: Predstavnik lignanov - pinoresinol in atoksipinoresinol (Lopez-Biedma in sod. 2016).....	9
Slika 2: Splošna struktura in številčenje pri flavonoidih v prehrani (Veberič 2010) .....	10
Slika 3: Strukturni obliki luteolina in apigenina (Murkovic in sod. 2004) .....	11
Slika 4: Struktura oleuropeina (Omar, 2010) .....	11

## **SEZNAM KRATIC**

F-C	Folin-Ciocalteu
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

## 1 UVOD

Soobstoj oljke s človekom ocenjujejo na 5000 do 6000 let z začetkom v bronasti dobi (3150 do 1200 let pr.n.št.). Njen izvor je v Sredozemlju, glede na današnjo razdelitev držav pa to predstavlja južno Turčijo, Sirijo, Libanon, Palestino in Izrael (Vossen, 2007). Plodovi oljke so se že takrat uporabljali za pridobivanje oljčnega olja v različne namene: kot na primer za prehrano, za verske obrede, za gorivo v oljnih svetilkah, kot sestavina za kozmetiko in v zdravilne namene.

Oljka je bila ob vinski trti in žitih ena od temeljnih agrarnih kultur antičnega gospodarstva. Širjenje feničanske, grške in rimske kulture je tesno povezano s širjenjem oljkarstva. Rimskodobna proizvodnja oljčnega olja je dosegala polovico sodobne. Bila je del državne politike in je v oskrbi vojske s prehrano igrala pomembno vlogo (Vidrih-Perko, 2004).

V 6000 letih se je pridelava oljk razširila najbolj v Sredozemlju, kjer se jo danes prideluje na več kot 9,4 milijonih hektarov. V zadnjih desetih letih so največ olja pridelali v Španiji (36%), Italiji (24%), Grčiji (17%), Tuniziji (7,2%), Turčiji (4%), Siriji (3,7%), Maroku (2,5%) in Portugalski (1,6%). Med preostale 4 odstotke sodijo še Slovenija, Hrvaška, Črna Gora, Libija, Egipt, Izrael, Jordanija, Libanon, Francija, ZDA, Mehika, Argentina, Čile, Brazilija, Peru, Južna Afrika, Nova Zelandija (Vossen, 2007).

V zadnjem času se poraba oljčnega olja pri nas povečuje zaradi vse večjega zavedanja o pomenu oljke in oljčnega olja. Vedno bolj smo ozaveščeni tudi glede kakovosti oljčnega olja, zaradi česar oljčno olje raje kupimo pri domačih pridelovalcih (Počkaj, 2007).

Pomembno vlogo pri lastnostih oljčnega olja imajo fenolne spojine, ki so pretvorbeni produkti bolj kompleksnih spojin in jih oljka tvori v času svoje rasti in dozorevanja plodov (Bandelj in sod. 2014).

Pravzaprav so fenolne spojine odgovor rastline na neželene okoljske razmere in imajo ključno vlogo pri varovanju rastlin pred vremenskimi razmerami, rastlinojedci in drugimi rastlinami ter pri privabljanju oprashačevalcev in raznašalcev semen (Veberič, 2010). V plodovih oljke jih občutimo kot značilen trpek okus, oljčnemu olju pa dajejo senzoričen profil, predvsem grenko in pikantno značilnost in v sinergiji z vitaminom E preprečujejo oksidacijske procese tako v olju kot tudi v človeškem organizmu (Bučar-Miklavčič, 2010).



## 2 OLJKA NEKOČ IN DANES

Oljka je bila v Sredozemlju sveto drevo. Veličastna starost, ki jo drevesa lahko dosežejo in njena neobičajna trdoživost, sta ljudi od pradavnine navdajali z občudovanjem. Stara ljudstva so pripisovala drevesu nesmrtnost. Nedvomno je s tem občudovanjem oljčnega drevesa povezana tudi uporaba oljčnega olja v ritualne in sakralne namene. Olja so v ta namen služila pri obredih maziljenja ter pri balzamiranju trupel (Vidrih-Perko, 2004).

V preteklosti so to zeleno tekoče zlato, kot ga v raznih zapisih večkrat poimenujejo, uporabljali tako v prehrani, kot tudi za verske namene, kot zdravilo in kozmetiko. Tako v tradicionalni kot tudi v sodobni medicini se izvlečki plodov oljke, oljčnega olja, lubja, lesa, koščice ter listov oljke uporabljajo v različnih oblikah sami ali v kombinaciji z drugimi rastlinami. Na naše telo naj bi le-ti delovali blagodejno, saj imajo antibakterijski učinek, učinek pri zdravljenju astme, žolčnih kamnov, driski, respiratornih boleznih, okužbah sečil, izpadanju las ter delujejo protivnetno (Hashmi in sod. 2015).

Najslabše olje so v preteklosti uporabili za razsvetljavo. Od tu se je tudi še ohranil izraz »lampante« za najslabšo kakovost oljčnega olja. Oljčna vejica je bila tudi simbol zmage in miru in so jo v antičnih časih podarjali zmagovalcem olimpijskih iger.

Iz starorimskih zapisov vemo, da je bilo najbolj cenjeno oljčno olje iz južne Italije, takoj za njim pa so bila po kakovosti enakovredna olja iz Španije in Istre. Istrsko olje je slovelo po prijetni aromi in lepi zelenkasti barvi (Vidrih-Perko, 2004).

Do nedavnega je veljalo, da so bili v rimski dobi nasadi oljk predvsem v Istri. Novejša arheološka odkritja na obronkih Goriških Brd pa pričajo, da je bilo gojenje oljke razširjeno verjetno tudi v Vipavski dolini (Vidrih-Perko, 2004). Manjše površine zasajene z oljko v Goriških Brdih in na Vipavskem so posledica oljki nenaklonjenih razmer v 19. stoletju in hude pozebe leta 1929, ki je uničila skoraj vse slovenske oljčne nasade (Adamič, 1998; Ogrin, 2004). Z razvojem vinogradništva v drugi polovici 19. stoletja je začelo oljkarstvo nazadovati. Po pozebi leta 1929 se je število dreves zmanjšalo s 300.000 na 120.000. Po političnih in družbenih spremembah po 2. svetovni vojni, z delno zamenjavo prebivalstva in močno deagrarizacijo in depopulacijo zaledja Slovenske Istre, se je število dreves zmanjšalo na 50.000 do 60.000 (Ogrin, 2004).

Po podatkih iz evidence dejanske rabe kmetijskih in gozdnih zemljišč (RABA) Ministrstva za kmetijstvo iz leta 2013 je razvidno, da je v Sloveniji z oljko zasajenih 1.968 ha površin, pri čemer 95,5% površin odpade na Slovensko Istro. Skupno se v Sloveniji pridelava od 500-630 ton oljčnega olja, uvozimo pa ga 1500 ton, večinoma iz držav članic Evropske unije.

### 3 FENOLNE SPOJINE

Rastline proizvajajo obsežen in raznolik izbor organskih spojin, od katerih večina ne sodeluje neposredno pri rasti in razvoju (Croteau in sod. 2000).

Na svetu poznamo približno 300.000 dokumentiranih vrst višjih rastlin, ki sintetizirajo ogromno število kemičnih spojin različnih struktur in razredov. Te spojine so lahko nadalje razvrščene med primarne in sekundarne metabolite (Lattanzio 2013). Poznanih je veliko definicij obeh tipov metabolizma. Večina od njih opisuje primarni metabolizem kot spojine, ki imajo bistveno vlogo povezano s fotosintezo, dihanjem, rastjo in razvojem. Sekundarni metabolizem pa nima neposredne vloge pri rasti in vzdrževanju celice, ampak ima pomembno ekološko in zaščitno vlogo proti različnim oblikam stresa (Veberič 2010).

V zadnjih letih se nekaterim sekundarnim metabolitom pripisuje pomembno vlogo v prehrani, ker varovalno delujejo na zdravje in se jih zato veliko raziskuje. V nasprotju z vitamini fenolne spojine niso nujno potrebne. Kljub temu narašča število dokazov o tem, da dolgoročno blagodejno vplivajo na zdravje ljudi, npr. proti raku, proti kroničnim in kardiovaskularnim boleznim (Crozier in sod. 2006).

#### 3.1 Definicija fenolnih spojin

Različni avtorji so različno definirali fenolne spojine.

»Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in vse, razen flavonoidov, nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikiminske kisline.« (Ryan in sod. 2002; Abram in Simčič 1997)

»So spojine, ki imajo eno ali več hidroksilnih skupin vezanih direktno na aromatski obroč.« (Vermerris 2008)

»Rastline proizvedejo na tisoče fenolnih spojin kot sekundarne metabolite. Nujno so potrebne za fiziologijo rastlin, saj so vključene v različne funkcije kot so: lignifikacija in struktura, pigmentacija, opráševanje, alelopatija, odpornost na patogene in predatorje ter rast.« (Haslam 1998)

### 3.2 Delitev fenolnih spojin

Fenolne spojine so lahko razvrščene v razrede na različne načine. Glede na funkcijsko skupino, ki je vezana na fenol ali glede na število fenolnih enot v molekuli (Kutchan M.T. in sod. 2015). Crozier in sod. (2006) navajajo, da med fenolne spojine lahko uvrščamo enostavne fenole nižjih molekularnih mas, sestavljene iz enega aromatskega obroča, kot tudi velike in kompleksne tanine in derivate fenolnih spojin. Priporočajo razdelitev glede na število in ureditev ogljikovih atomov. Pogosto so vezani s sladkorji in organskimi kisljinami. Lahko se jih deli še na flavonoide in ne-flavonoide.

Veberič (2010) podaja razdelitev glede na število ogljikovih atomov v molekuli, ki je prikazana na spodnji tabeli (Tabela 1).

**Tabela 1: Razdelitev fenolnih spojin glede na število ogljikovih atomov v molekuli (Veberič, 2010)**

<b>Struktura</b>	<b>Razred</b>
<b>C<sub>6</sub></b>	preprosti fenoli
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub></b>	fenolne kisline in sorodne spojine
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub></b>	acetofenoni in fenilavinska kislina
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>	cimetne kisline, cimetni aldehidi, cimetni alkoholi
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>	kumarini, izokumarini in kromoni
<b>C<sub>15</sub></b>	halkoni, auroni in dihidrohalkoni
<b>C<sub>15</sub></b>	flavani
<b>C<sub>15</sub></b>	flavoni
<b>C<sub>15</sub></b>	flavanoni
<b>C<sub>15</sub></b>	flavanoli
<b>C<sub>15</sub></b>	antocianidi
<b>C<sub>15</sub></b>	antociani
<b>C<sub>30</sub></b>	biflavonili
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub></b>	stilbeni
<b>C<sub>6</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub></b>	kinoni
<b>C<sub>18</sub></b>	betaciani
<b>Lignani, neolignani</b>	dimeri ali oligomeri
<b>Lignini</b>	polimeri
<b>Tanini</b>	oligomeri ali polimeri

### 3.3 Metode določanja fenolnih spojin

Najbolj uporabljeni metodi za določevanje fenolnih spojin sta spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu (F-C) reagentom (Visioli in sod. 2001)

in metoda določanja skupnih fenolnih spojin s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ki jo je objavil Mednarodni svet za oljke (IOC 2009).

#### 3.3.1 Spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu reagentom

Spektrofotometrična določitev fenolnih spojin s F-C reagentom je metoda, ki temelji na reakciji pri kateri pride do prenosa elektronov. Med F-C reagentom in elektroni antioksidantov pride do oksidacije, kar se pokaže kot sprememba barve. F-C reagent se obarva modro, zaradi tega je možno izmeriti absorbanco in s pomočjo umeritvene krivulje določiti koncentracijo fenolnih spojin (Huang in sod. 2005). F-C metoda se uporablja že vrsto let za določanje vsebnosti skupnih fenolov v naravnih produktih (Prior in sod. 2005). Singleton in sod. (1999) navajajo, da so analize, narejene s F-C reagentom priročne, enostavne, zahtevajo samo osnovno opremo, ter dajo primerljive podatke ostalim metodam. Visioli in sod. (2001) potrjujejo, da je metoda zelo ekonomična, so pa prepoznali pomanjkljivost metode v tem, da ima določene omejitve, kot sta nizka specifičnost reagenta za fenolne spojine ter dejstvo, da s pomočjo te metode ni možno zagotoviti informacij o vrsti fenolnih spojin. Do iste ugotovitve so prišli Prior in sod. (2005), saj navajajo, da je slabost metode v tem, da se lahko zaradi nespecifičnosti določitve med rezultate o vsebnosti fenolnih spojin pomešajo tudi ostale spojine kot so na primer sladkorji, in so zato potrebne korekcije in uporaba pravega referenčnega standarda. Spektrometrija spada med optične metode. Je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod v analitiki (v klinični kemiji, analitiki okolja, analizi živil). Med spektrometrične (spektrofotometrične) metode prištevamo vse metode, kjer izkoriščamo svetlobo za določanje koncentracij snovi. Spektrofotometrične meritve lahko izvajamo v infrardečem, vidnem in ultravijoličnem spektru svetlobe. Izbira valovne dolžine je odvisna od številnih faktorjev inštrumentov, ki so na razpolago, obarvanosti analita ali možnosti, da ga prevedemo v obarvan derivat, vsebnosti funkcijskih skupin, ki absorbirajo v UV ali IR spektru in prisotnosti drugih snovi, ki absorbirajo v raztopini (Hmeljak-Gorenjak, 2010). Po Uredbi komisije (EGS) št. 2568/91 (1991) lahko spektrofotometrično merjenje na UV območju da še podatke o kakovosti maščob, njenem stanju ohranitve in spremembah, ki so jih v njej povzročili tehnološki procesi.

### 3.3.2 HPLC določitev

Kromatografija je separacijski proces. Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (Žorž 1991).

Kromatografija je tako skupen izraz za vrsto separacijskih fizikalnih tehnik, ki temeljijo na različnem zadrževanju topljencev, ki se gibljejo v toku tekočine ali plina (mobilna faza) preko mirujoče podlage (stacionarna faza). Kromatografske tehnike lahko uvrščamo med zelo enostavne in hitre analizne metode, ki ne zahtevajo drage opreme (primer papirna in tankoplastna kromatografija). Z razvojem sodobne instrumentalne opreme, pa so bile razvite tudi zelo zahtevne kromatografske tehnike (tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti - HPLC, plinska kromatografija – GC), ki zahtevajo drago opremo, ustrezno znanje za interpretacijo rezultatov in se uporabljajo kot najzahtevnejše analitične metode (Hmelak-Gorenjak, 2010).

HPLC je zelo občutljiva in specifična metoda, toda vzame veliko časa in ne zagotavlja informacij o vsebnosti fenolnih molekul, za katere ni danih referenčnih podatkov (Visioli in sod. 2001). Kot pri ostalih kromatografskih tehnikah se tudi pri tekočinski kromatografiji ločijo posamezne komponente v vzorcu s porazdeljevanjem med dve fazi, stacionarno in mobilno. Mobilna faza pronica skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljajočega se dejanja sorpcije in desorpcije s stacionarno fazo med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih konstantah posameznih komponent vzorca. Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina nizke viskoznosti. Podobno kot pri ostalih kromatografskih tehnikah tudi pri tej analizni tehniki dobimo informacije o kompleksnosti vzorca (število pikov), kvalitativni sestavi vzorca (položaj pikov) in količini posamezne komponente v vzorcu (površina pikov). Cilj kromatografije je učinkovita separacija. Kvalitetna separacija je definirana z ločljivostjo dveh pikov (Hmelak-Gorenjak, 2010).

Pri HPLC je instrument oblikovan za delo pri visokih tlakih. S črpalko pri visokem tlaku potiskamo mobilno fazo s spojinami, ki jih analiziramo, skozi kolono z gosto pakirano stacionarno fazo (majhni delci v stacionarni fazi). Velika površina majhnih delcev v gosto pakirani koloni omogoča učinkovito ločevanje snovi. Kolone, uporabljene pri HPLC so v primerjavi s kolonami, ki jih uporabljamo pri klasični tekočinski kromatografiji, kjer se mobilna faza premika skozi stacionarno zaradi gravitacije, kratke. Sorazmerno z dolžino kolone je pri HPLC krajši tudi čas kromatografskega postopka. Delo z visokimi tlaki zahteva nekoliko drugačno izvedbo instrumenta v primerjavi z običajno tekočinsko kromatografijo (Šegatin in sod. 2011).

Metoda, ki jo je objavil Mednarodni svet za oljke, temelji na ekstrakciji fenolnih spojin iz oljčnega olja s pomočjo raztopine metanola in določitve s HPLC. S tekočinsko kromatografijo poteče separacija, detekcija fenolnih spojin pa s pomočjo UV detektorja pri 280 nm. Kot notranji standard je uporabljena siringinska kislina. Z metodo je mogoče določiti naravni in oksidirani oleuropein, derivate ligstrozida in fenolne kisline, ki se jih izrazi v mg/kg tirosola.

HPLC metoda določevanja se v zadnjem času vse pogosteje uporablja, saj poleg vrednosti za vsoto skupnih fenolov, poda tudi njihove relativne deleže. Spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu reagentom namreč pokaže v primeru oljčnega olja še vedno veliko vsebnost skupnih fenolnih spojin, četudi je olje proti koncu pretvorbene poti že pusto (Bandelj in sod. 2014).

### **3.4 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin**

Fenolne spojine so zelo učinkoviti antioksidanti. To so kemijske spojine, ki zaradi svoje specifične elektronske konfiguracije preprečujejo ali upočasnjujejo oksidacijo drugih življenjsko pomembnih spojin v živih tkivih, ki so izpostavljena prostim radikalom. Prosti radikali, kot npr. superoksidni ali peroksidni anioni, so zelo reaktivne molekule, ki s svojo aktivnostjo poškodujejo celice, ker v njih tvorijo nove proste radikale. Največkrat povzročajo oksidativne spremembe lipidov, proteinov in deoksiribonukleinske kisline. Po reakciji z molekulami antioksidantov prosti radikali pridobijo manjkajoče elektrone in se pretvorijo v stabilno stanje ter tako ne morejo več povzročati degenerativnih sprememb v celicah (Kozjan in Zule, 2008).

Antioksidante oljčnih olj tvorita dve glavni spojini, in sicer fenolne spojine in tokoferoli. Glavni predstavnik tokoferolov je alfa-tokoferol (vitamin E). Antioksidati v oljčnih oljih so spojine, ki olje varujejo pred kvarom zaradi napak, ki jih je olje prevzelo od oljk, iz katerih je bilo predelano, kot tudi zaradi posledic neustreznega skladiščenja (avtooksidacija). Antioksidanti iz oljčnih olj tudi varujejo naš organizem pred škodljivim oksidativnim stresom (Bandelj in sod. 2014).

## 4 FENOLNE SPOJINE V PLODOVIH TER LISTIH OLJKE IN OLJČNEM OLJU

### 4.1 Fenolne spojine, značilne za oljko

Oljka (*Olea europaea* L.) je vir vrste fenolnih spojin s pomembnimi lastnostmi (Ryan in sod. 2002). Oljčne fenolne spojine so izjemno pomembne, ker oblikujejo senzoričen profil olja in v sinergiji z vitaminom E preprečujejo oksidacijske procese tako v olju kot v človeškem organizmu. Zanje je značilno, da zavirajo hidrolizo triacilglicerolov in preprečujejo oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin (v triacilglicerolu) (Bučar-Miklavčič in sod. 2016).

Fenolne spojine predstavljajo v oljčnem olju eno izmed skupin znotraj minornih spojin. Te prispevajo k stabilnosti olja, antioksidativni sposobnosti, grenkobi, in drugim pomembnim biološkim značilnostim (Boskou 2015).

Oljčno olje vsebuje 98-99% triacilgliceridov z visokim deležem zelo stabilne oleinske kisline (enkrat nenasičene) in 1-2% minornih sestavin, ki niso triacilglicerolnega izvora (Mariotti in Peri 2014). Minorne spojine deviškega oljčnega olja so razdeljene v dve skupini in sicer na minorne spojine triacilglicerolskega porekla in minorne spojine, ki niso triacilglicerolskega porekla. Minorne spojine triacilglicerolnega izvora so delni in popolni razpadni produkti triacilglicerolov ali pa nepopolni produkti pri sintezi triacilglicerolov v obdobju rasti plodov (Bučar-Miklavčič in sod. 2016). Spojine triacilglicerolskega porekla so glicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol in proste maščobne kisline. Minorne spojine oljčnega olja, ki niso triacilglicerolskega porekla, pa se nadaljnje delijo med spojine, ki so netopne v vodi in tiste topne ali delno topne v vodi. Spojine, netopne v vodi so terpenski ogljikovodiki (skvalen), karotenoidi (betakaroten, lutein), triterpenski dialkoholi (uvaol, eritrodiol), alifatski alkoholi, steroli (beta-sitosterol, delta-5-avenasterol in kampesterol), tokoferoli (največ je alfa-tokoferola) in aromatske spojine. Topne ali delno topne v vodi so fenolne spojine in maščobne kisline (Vesel in sod. 2009).

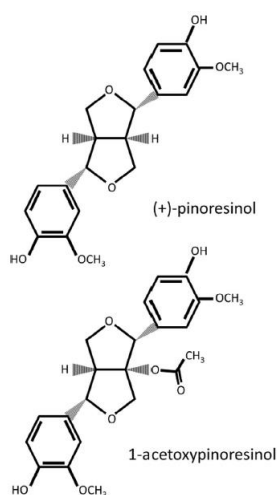
Med najpomembnejše minorne sestavine uvrščamo topne oblike vitaminov A, D, E, K, aromatske spojine in fenolne spojine (Bučar-Miklavčič in sod. 2010). Kljub temu, da so triacilgliceridi zastopani v tako visokih procentih, so minorne sestavine tiste, ki dajejo zelo pomemben prispevek k senzoričnim lastnostim oljčnega olja in lastnostim, ki varovalno delujejo na zdravje ljudi. V glavnem je prisotnost teh komponent tista, ki razlikuje ekstra deviško oljčno olje od vseh drugih jedilnih olj (Mariotti in Peri 2014). Deviško oljčno olje namreč vsebuje spojine kot so fenolne spojine, ki so po navadi izločene iz drugih jedilnih olj v mnogih postopkih rafiniranja (Brenes in sod. 1999).

Glavni razredi fenolnih spojin, ki so prisotni v oljčnem olju so fenolne kisline in njihovi derivati (npr. galna kislina, ferulna kislina, cimetna kislina, benzojska kislina), fenolni alkoholi (npr. tirozol, hidroksitirozol), flavonoidi (luteolin in apigenin), lignini (acetoksinoresinol, pinoresinol, 1-hidroksipinoresinol) ter sekoiridoidi (npr. oleuropein in aglikon oleuropeina, aglikon ligstrozida, dialdehidne oblike elenolne kisline). Sekoiridoidi so značilnost oljčnih fenolnih spojin, ki jih ni mogoče najti v drugih živilih (Servili in Montedoro, 2002; Bandelj in sod. 2014).

#### 4.1.1 Lignani

Lignani so polifenolne spojine, derivati fenilalanina, ki nastanejo z dimerizacijo substituiranih hidoksilnih skupin.

Lignani v deviškem oljčnem olju se uvrščajo v skupino t.i. fitoestrogenov (vsebujejo jih tudi bučna in lanena semena). Ti se po vnosu v organizem pretvorijo v enterolignane (Bučar-Miklavčič in sod. 2009).



Slika 1: Predstavnika lignanov - pinoresinol in atoksinoresinol (Lopez-Biedma in sod. 2016)

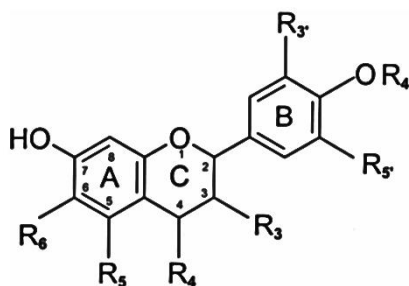
Owen in sod. (2000) so v svoji raziskavi izolirali glavne fenolne antioksidante v ekstra deviškem oljčnem olju. Poleg določitve fenolnih spojin in preverjanja njihove antioksidativne sposobnosti so del svoje raziskave namenili primerjavi ekstra deviških oljčnih olj z olji iz semen. Podatki so pokazali, da sta se poleg že dokazanih sekoiridoidov in enostavnih fenolov, v olju pojavljala še lignana 1-acetoksinorezinol in pinorezinol kot glavni komponenti fenolne frakcije oljčnega olja. Ugotovili so tudi, da oba lignana nista prisotna v drugih oljih iz semen in v rafiniranih oljih. Nahajata se samo v ekstra deviškem oljčnem olju.



Ravno tako so pinorezinol in 1-acetoksinorezinol izolirali Brenes in sod. (2000). Oba sta bila najdena v vseh analiziranih vzorcih olja sort 'Arbequina', 'Empeltre', 'Picual' in 'Picudo'. Vsebnost pinorezinola je bila v vseh analiziranih vzorcih podobna. Vsebnost 1-acetoksinorezinola pa je bila višja v vzorcih sorte 'Arbequina' in 'Empeltre', in nižja v vzorcih sort 'Picual' in 'Picudo'. Pinorezinol in 1-acetoksinorezinol verjetno predstavljata večino fenolnih spojin, ki jih je moč najti v oljih sort 'Arbequina' in 'Empeltre'.

#### 4.1.2 Flavonoidi

Flavonoidi so spojine, ki imajo skupaj 15 C-atomov in osnovno strukturo (C6-C3-C6), ki se imenuje flavan oz. 2-fenilbenzopiran. Flavonoidi so zelo razširjena skupina vodotopnih fenolnih spojin. Nekateri viri navajajo, da je poznanih več kot 5000 flavonoidov. Od teh je največ antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov (Abram in sod. 1997).



Slika 2: Splošna struktura in številčenje pri flavonoidih v prehrani (Veberič 2010)

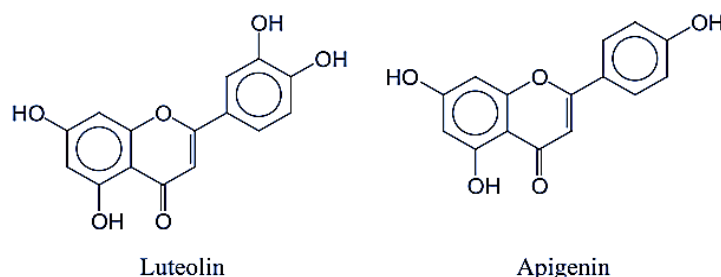
Flavonoide je Veberič (2010) razdelil v glavne podrazrede: flavanoli, flavan-3-oli, flavanoni, flavoni, isoflavoni in antociani.

Luteolin in apigenin spadata med flavone (Crozier in sod. 2006). V raziskavah o flavonoidih v oljki in oljčnem olju se pojavljata kot edina predstavnika tega razreda.

Heimler in sod. (1996) so v svoji raziskavi iz oljčnih listov določili flavonoide kot so luteolin, quercitrin, luteolin-7-glikozid, luteolin-4'-glukozid in apigenin.

Luteolin je pogost flavonoid, ki ga je moč najti v različnih rastlinskih vrstah, tako med sadnimi vrstami, kot tudi med zelenjavo in zdravilnimi rastlinami. Rastline, ki so bogate z luteolinom, so bile uporabljene v kitajski tradicionalni medicini za zdravljenje različnih bolezni. Rastline, ki so bogate z vsebnostjo luteolina, so bile uporabljene v tradicionalni kitajski medicini za zdravljenje bolezni, kot so hipertenzija, vnetne motnje in rak. Protivnetno delovanje, protialergijsko delovanje in delovanje proti raku je povezano s tem, da biokemijsko luteolin lahko deluje kot antioksidant ali pro-oksidant. Lastnost njegovega delovanja proti raku je povezana z indukcijo apoptoze, ki vključuje redoks regulacijo, DNA poškodbe in protein kinaze v inhibiciji proliferacije rakavih celic, metastaze in angiogeneze. Poleg tega luteolin senzibilizira različne rakave celice na terapevtsko

povzročeno citotoksičnost z zatiranjem preživetja celic in spodbujanjem apoptoze (Lin in sod. 2008).



**Slika 3: Strukturni obliki luteolina in apigenina (Murkovic in sod. 2004)**

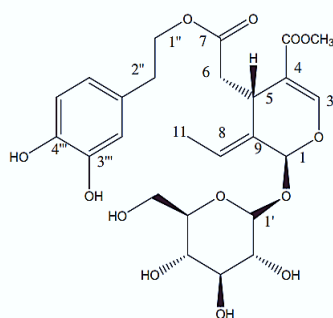
Prav tako delovanje proti raku opisujeta Shukla in Gupta (2010), ki v svoji raziskavi navajata, da ima apigenin potencial pri razvoju kemopreventivnega sredstva pri preprečevanju rakavih obolenj.

#### 4.1.3 Sekoiridoidi

Najpomembnejša sekoiridoida v oljki sta ligstrozid in oleuropein, ki nastaneta kot estra elenolne kisline z 2-(3,4-sihidrofenil)etanol (3,4-DHPEA) in 2-(4-hidroksifenil)etanol (*p*-HPEA) (Ryan in sod. 2002).

Brenes in sod. (1999) navajajo, da so najbolj značilni predstavniki fenolnih spojin, ki jih najdemo v oljčnem olju, ravno aglikoni oleuropeina in ligstrozida ter dialdehidne oblike elenolne kisline, ki je povezana s hidroksitirosolom in tirosolom.

Oleuropein je najpomembnejša fenolna spojina v oljki (Ryan in sod. 2002) in je glikozid, spojina hidroksitirosolnega estra elenolne kisline z beta-D-glukopiranozo (Butinar in sod. 1999). Je antioksidant, diuretik, znižuje hiperglikemijo, deluje protivnetno, ima protivirusno in protibakterijsko delovanje, inhibira združevanje trombocitov, v bioloških sistemih upočasnjuje spremembe biomolekul, do katerih pride zaradi delovanja prostih radikalov (Bučar-Miklavčič in sod. 2016). Številne raziskave so pokazale, da deluje zaščitno tudi v primeru srčno-žilnih bolezni ter bolezni živčevja (Omar 2010).



**Slika 4: Struktura oleuropeina (Omar, 2010)**

Shamshoum in sod. (2017) so ugotavljali učinek oleuropeina na delovanje proti raku in priskrbeli dokaze o tem, da hidroksitirosol blagodejno vpliva pri zaviranju razvoja različnih vrst raka. Študije so pokazale, da je povečan vnos oljčnega olja povezan z zmanjšanim tveganjem za raka. Učinke oleuropeina so ugotavljali tudi na živalih in ugotovili, da oleuropein zavira proliferacijo in povzroča apoptozo različnih rakov, kot so rak dojke, rak prostate, rak debelega črevesja, rak ščitnice, kožni rak, rak trebušne slinavke, rak na jeziku in drugi.

Butinar in sod. (1999) so ugotavljali vsebnost tirosola in hidroksitirosola, ki sta končna produkta oksidacije sekoiridoidov v oljčnem olju na 16 vzorcih oljčnih olj letnika 1996 in na 21 vzorcih letnika 1997. Vzorci so bili pridelani v Slovenski Istri in različne sortne sestave: 'Istrska belica', 'Istrska belica' cepljena na 'Črnico', 'Leccino' in mešani vzorci. Za standardizacijo pri določevanju količine skupnih fenolnih spojin so uporabili Folin-Ciocalteu reagent. Koncentracije tirosola so določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na osnovi retenzijskih časov uporabljenega standarda in znane umeritvene koncentracije. Koncentracijo hidroksitirosola pa so v vzorcih določili na osnovi primerjave podatkov retenzijskega časa iz literature in privzetega odgovora detektorja za tirosol. Ugotovili so, da so vzorci oljčnega olja, ki so bili iztisnjeni iz sorte 'Istrska belica', vsebovali višje koncentracije fenolnih spojin od ostalih vzorcev. Za vsebnost hidroksitirosola so ugotovili, da je le-ta praviloma nižja od vsebnosti tirosola. Iz primerjave podatkov za koncentracije skupnih fenolnih spojin in za koncentracije tirosola in hidroksitirosola so ugotovili, da ostaja delež vsote tirosola in hidroksitirosola glede na vsoto skupnih polifenolov približno enak. Zabeležili so še odvisnost med ekspozicijo obranih plodov v polarnih topilih (slanica, skladiščenje pred predelavo) in količino skupnih fenolnih spojin. Plodovi, ki so bili hitro predelani v olje, so namreč imeli višjo vsebnost fenolnih spojin.

## 4.2 Fenolne spojine v listih oljke

Briante in sod. (2002) so v svoji raziskavi ugotavljali prisotnost fenolnih spojin v oljčnih listih sorte 'Moraiolo'. Zabeležili so prisotnost tirosola, hidroksitirosola, oleuropeina, oleuropein aglikona, galne in ferulne kisline. Izmerjena količina skupnih fenolov je potrdila hipotezo, da je glavni kompleksni fenol, ki je prisoten v listih oljke, ravno oleuropein.

Vsebnost fenolnih spojin v listih so ugotavljali tudi Romani in sod. (2016). Namen raziskave je bil primerjava vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih iz svežih listov, skladiščenih v hladilniku, posušenih, zmrznjenih in iz liofiliziranih listov za namen izdelave prehranskih dopolnil in kategorizacija vzorcev ekstraktov po različnih sortah in

pod različnimi pogoji ekstrakcije. Pri določevanju fenolnih spojin so uporabili HPLC metodo. Razlike so našli v vsebnosti skupnih fenolov v odvisnosti od sorte, območja pridelave, časa vzorčenja (ob rezi ali ob obiranju), fiziološkega in zdravstvenega stanja listov. Še posebej se je vsebnost oleuropeina razlikovala glede na način sušenja vzorcev in glede na temperaturo pri postopku ekstrakcije.

Butinar in sod. (2012) so z določevanjem prisotnosti oleuropeina in fenolnih spojin v oljčnih listih pokazali, da je mogoče z relativno enostavno ekstrakcijsko platformo in na osnovi HPLC analitskega pripomočka uspešno razlikovati med posameznimi fenolnimi spojinami v oljčnih listih. Poleg prevladujočega sekoiridoidnega oleuropeina in njegovega izomera oleuropeina so dokazali prisotnost neflavonoidnega verbaskozida ter flavonoidne glukozide, predvsem luteolin-7-O-glukozid in v manjši meri apigenin-7-O-glukozid. Z analizo različnih vzorcev so ugotovili, da količina fenolnih spojin zelo niha, kar so pripisali tako sorti, podnebjju, načinu sušenja ter času obiranja.

### 4.3 Fenolne spojine v plodovih oljke

Glavne fenolne spojine, ki jih najdemo v plodovih oljke sta Servili in Montedoro (2002) razdelila v naslednje razrede: antocianidi, flavonoli, flavoni, fenolne kisline, fenolni alkoholi, sekoiridoidi in derivati hidroksicimetne kisline.

### 4.4 Fenolne spojine v oljčnem olju

Garcia in sod. (2002) so ugotavljali vsebnost fenolnih spojin in tokoferolov v deviškem oljčnem olju sorte 'Picual' v letnikih pridelave 1999/2000 in 2000/20001 in z različnih pridelovalnih področij južne Španije. Fenolne spojine so določili s pomočjo HPLC metode. Ugotovili so, da so vzorci olja, pridobljeni v začetnem obdobju vsake sezone imeli višjo vsebnost fenolnih spojin kot tisti, pridobljeni na koncu. Izmed fenolnih spojin je bil v najvišjih koncentracijah prisoten aglikon oleuropeina, za njim pa predstavniki drugih aglikonov sekoiridoidov. Vsebnost lignanov ni pokazala odvisnosti med sezonama ali od časa obiranja. Posebnih razlik v vsebnosti fenolnih spojin niso zasledili med različnimi pridelovalnimi območji. 'Picual' so prepoznali kot sorto oljke, ki daje zelo stabilno oljčno olje, saj se je vsebnost fenolnih spojin po skladiščenju v steklenicah po dveh letih, znižala samo za 30%. Vsebnost enostavnih fenolov (hidroksitirosola in tirosola) se je v tem času zvišala.

Leta 2010 so Bianco in sod. v okviru projekta Uelije II ocenjevali spremembe (nihanje) koncentracij fenolnih spojin med skladiščenjem. Ugotovili so, da so se koncentracije sekoiridoidov po dveh letih močno zmanjšale, koncentracije končnih oksidativnih

produktov tirosola in hidroksitirosola pa so se povečale. Koncentracije posameznih fenolnih spojin, še posebej pa sekoiridoidov, so se značilno razlikovale glede na sorto oljke. V italijanskih oljih so se koncentracije skupnih fenolnih spojin tudi razlikovale na letni ravni, medtem ko razlike v koncentracijah hidroksitirosola in tirosola niso bile vidne. To so pripisali dejstvu, da fenolne spojine, kot sta hidroksitirosol in tirosol, po navadi niso prisotni v svežih oljih, ampak se sčasoma sintetizirajo s pomočjo kompleksne fenolne hidrolize. V okviru istega projekta so Bučar-Miklavčič in sod. (2016) v svoji raziskavi ugotavljali profil fenolnih spojin in senzorične lastnosti oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in jih še nadaljnje primerjali z drugimi sortami, kot sta 'Leccino' in 'Maurino'. Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je po enem in dveh letih znižala, medtem ko je vsebnost tirosola in hidroksitirosola narasla. 'Istrska belica' je po enem letu skladiščenja ohranila podobno intenziteto grenkobe in pikantnosti ter nivo vsebnosti derivatov oleuropeina in ligstrozida. V nasprotju z drugimi olji je intenziteta grenkobe in pikantnosti pri 'Istrski belici' upadla šele po dveh letih skladiščenja.

Bayram in sod. (2012) so v svoji raziskavi analizirali 8 fenolnih spojin (tirosol, hidroksitirosol, oleuropein, pinoresinol, ter kafeinsko, ferulno, vanilino in p-kumerično kislino) v 55-ih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja z uporabo HPLC metode v kombinaciji z ECD (coulometric liquid chromatography). Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih se je razlikovala v odvisnosti od geografskega izvora in sorte oljke. Vzorce so namreč zbrali v devetih državah in na štirih celinah. Fenolne spojine, ki so bile prisotne v najvišjih koncentracijah, so bile tirosol, hidroksitirosol in pinoresinol. Potrdili so, da ima hidroksitirosol najmočnejšo antioksidacijsko aktivnost v oljčnih oljih.

Gutierrez-Rosalec in sod. (2013) so v svoji raziskavi ugotavljali povezavo intenzivnosti zaznanega grenkega okusa v vzorcih deviških oljčnih olj z ugotovljeno koncentracijo posameznih fenolov. Pri tem so uporabili različne metode, med drugim tudi HPLC. Ugotovili so, da so dialdehidne in aldehidne oblike dekarboksimetilnega oleuropeina aglikona in dialdehidne oblike dekarboksimetil-ligstrozida aglikona tiste spojine, ki so v glavnem odgovorne za grenek okus oljčnih olj.

Na koncentracijo fenolnih spojin v plodovih oljke, oljčnih listih in oljčnem olju vplivajo različni dejavniki, kot so sorta in območje rasti, agrotehnični ukrepi, starost drevesa, zrelost plodov oljk v času obiranja, postopki predelave oljk in oljčnega olja, shranjevanje olja, temperatura pri kuhi oz. uporabi olja in metode določanja vsebnosti fenolnih spojin (Cicerale in sod. 2009). Medtem ko na nekatere dejavnike, kot sta npr. vreme in podnebje, ne moremo vplivati, se na čim boljši pridelek in vsebnost fenolnih spojin, da vplivati s pravnimi agrotehničnimi ukrepi, predelavo oljk in olja ter načinom shranjevanja oziroma skladiščenja olja.

Bučar-Miklavčič in sod. (2016) svetujejo, da se agrotehnične ukrepe izvaja tako, da se izbere sorte z višjimi vsebnostmi antioksidantov, da se izvaja ustrezno varstvo in zaščito in tako zagotovi zdrave in nepoškodovane plodove, da se obira pridelek ročno ali s pripomočki, ki ne poškodujejo plodov, in to ob primerni zrelosti s spremljanjem oljevitosti, strukture in barve plodov ter prisotnosti antioksidantov. Čas skladiščenja plodov do predelave pa naj bi bil čim krajši in v primerni embalaži. Med predelavo plodov v oljčno olje je dobro zagotoviti, da mletje ni preveč agresivno, da mesenje poteka čim krajši čas ter da je separacija čim hitrejša. Navajajo še, da se za primerno kakovost oljčnega olja priporoča shranjevanje v posodah iz nerjavečega jekla pod inertnim plinom, stekleničenje pa naj bo izvedeno v temne steklenice in hranjeno pri konstantni temperaturi od 14 do 20° C.

## 5 OKSIDACIJSKE PRETVORBE IN SPREMEMBE FENOLNIH SPOJIN

Ekstra deviška oljčna olja so relativno stabilna na oksidacijo zaradi visoke vsebnosti oleinske kisline in vsebnosti antioksidantov, kot so fenolne spojine. Problem se pojavi pri ekstra deviških oljčnih oljih iz uvoza, ki na deklaraciji nimajo označenega datuma pridelave oz. stekleničenja in so neprimerno skladiščena. Taka olja oksidirajo in razvijejo visoko stopnjo žarkosti in dobijo neželjeno aromo in okus (Frankel, 2010). Oljčno olje namreč v stiku s kisikom oksidira, četudi so v rastlinskem tkivu prisotni antioksidanti. Esencialne maščobne kisline, kot sta linolenska in linolejska, so uničene, in ravno tako določeni vitamini, topni v maščobi, ob oksidaciji oljčnega olja izginejo. Postopek oksidacije se začne s hidrolizo gliceridov. Nenasičene maščobne kisline so primarni produkti, katere lipoksigenaza pretvori v hidroperoksidi, večinoma 9- in 13-izomere, ki so nestabilni. Liaza, izomeraza in dehidrogenaza nato delujejo na hidroperoksidi linolenske in linolejske kisline in jih pretvorijo v sekundarne produkte, ki so alkani, alkeni, aldehidi, alkoholi in ketoni (Morales in Przybylski, 2000).

Pokazatelj oksidiranosti oljčnega olja je peroksidno število. Visoka vrednost le – tega je lahko posledica neprimerne hranjenja olja (svetloba, temperatura) oziroma starosti olja (Bučar-Miklavčič in sod. 2010). Bešter (2007) navaja, da je metoda za določevanje peroksidnega števila uporabna za proučevanje zgodnjih stopenj oksidacije, saj meri količino primarnih produktov oksidacije, vendar dodaja, da se peroksidno število z nadaljnjim potekom oksidacije zmanjša, saj hidroperoksidi pri povišani temperaturi hitro razpadajo. Iz tega razloga se za merjenje oksidacije pri raziskavah odločajo, da poleg meritev peroksidnega števila, izvajajo še druge metode, kot sta merjenje napredovanja oksidacije s p-anisidinskim testom in določevanje specifične absorpcije pri 232 nm ( $K_{232}$ ) in 270 nm ( $K_{270}$ ).

Cinquanta in sod. (2001) so ugotavljali oksidacijsko stabilnost oljčnih olj sort 'Gentile (Larino)', 'Gentile (Colletorto)', 'Coratina' in 'Leccino' različnih zrelosti. Pri ugotavljanju oksidacijske stabilnosti so si pomagali z merjenjem peroksidnega števila, vrednosti  $K_{232}$  in  $K_{270}$  po enem, šestih, dvanajstih in osemnajstih mesecih skladiščenja v zelenih steklenicah, v temi in z variacijo temperatur med 6 in 12 °C. Dodaten vzorec so shranili v pečici na 75 °C in analizirali proces oksidacije vsak teden z uporabo istih oksidacijskih parametrov. Ugotovili so, da so manj zrele oljke dale olje, ki je bilo bolj odporno na siljeno oksidacijo. Skupna vsebnost fenolnih spojin v oljih je bila neposredno povezana z vsebnostjo oleuropeina in obratno povezana z vsebnostjo (3,4-dihidroksifenil)etanola. Med izbranimi sortami je olje sorte 'Coratina' pokazalo najvišjo odpornost na siljeno oksidacijo zaradi visoke vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

Bešter (2007) je proučevala spremembe v oljčnem olju Slovenske Istre (vzorci so bili sort 'Leccino' in 'Istrska belica') med skladiščenjem pri različnih pogojih ter spremembe v oljčnem olju med segrevanjem olja. Ugotovili so zelo tesne pozitivne korelacije med oksidacijsko stabilnostjo in karotenoidi ter klorofilnimi pigmenti ter negativno korelacijo med vsebnostjo  $\alpha$ -tokoferola in oksidacijsko stabilnostjo. Vpliv maščobnokislinske sestave in fenolnih spojin na oksidacijsko stabilnost je prevladal nad vplivom količine  $\alpha$ -tokoferola. Podobno kot za antioksidacijsko aktivnost tudi za oksidacijsko stabilnost torej velja, da tesneje korelira s fenolnimi spojinami iz razgradne poti oleuropeina kot z njihovimi ligstrozidnimi analogi.

Fenolne spojine imajo precej kompleksne metabolne poti, ki se razlikujejo glede na tkivo, rastne pogoje in glede na dražljaje iz okolice (Ryan in sod. 2002).

Ligstrozid in oleuropein lahko pri sami predelavi oljk ali zaradi poškodovanih plodov vstopita v več možnih pretvorbno-reakcijskih poti. Encimska ali kemijska pretvorba ligstrozida ali oleuropeina poteka do aldehidne ali hidroksi oblike. Antioksidativen razpad je posledica zaščite fenolnih spojin proti škodljivim oksidativnim spremembam. Pretvorba od aglikonov do nadaljnjih kemijskih oblik kot so dialdehidne oblike oleuropein aglikona in prevladujoče dialdehidne oblike dekarboksimetil oleuropein aglikona je postopna in stalno poteka tudi pri pravilno pridelanemu in skladiščenemu olju. Identične pretvorbe veljajo za ligstrozid. Vse dokler sekoiridoidi ne zreagirajo do svojih končnih oblik (aromatskih alkoholov tirosole in hidroksitirosole), so olja lahko senzorično bogata in skladna. Ko se pretvorbena pot približa koncu, je vsebnost skupnih fenolnih spojin še vedno lahko relativno visoka (sprektrofotometrična določitev s F-C reagentom), vendar je olje že pusto in po navadi tudi antioksidativno šibko, saj so fenolne spojine že reagirale v končne produkte, kot je tirozol (Bandelj in sod. 2014; Miklavčič-Višnjevec in sod. 2016).



## 6 ZAKLJUČEK

Že v starodavnih časih so ljudje poznali dobre lastnosti oljke in oljčnega olja, saj so ga častili in uporabljali tako v prehrani, kot tudi v verske namene, kot zdravilo in lepotilo, istrsko oljčno olje je že takrat slovelo kot zelo kakovostno. Države, ki danes pridelajo največ oljčnega olja so Španija, Italija in Grčija in samo te štiri države pridelajo skupno pridelajo 77% vsega oljčnega olja.

Skupine fenolnih spojin, ki jih najdemo v oljki in oljčnem olju so lignani (pinorezinol, 1-acetoksipinorezinol, hidroksipinorezinol), flavonoidi (luteolin, apigenin) in sekoiridoidi. Lignani spadajo v družino fitoestrogenov. V oljčnem olju najdemo pinorezinol, 1-acetoksipinorezinol in hidroksipinorezinol. Najbolj značilne fenolne spojine za oljko in oljčno olje so sekoiridoidi, saj jih v drugih živilih ni. Predstavnik sekoiridoidov sta oleuropein in ligstrozid. Oleuropein je prisoten v plodu in koščici oljke, v oljčnem olju pa najdemo derivate sekoiridoidov, med drugim tudi končna oksidacijska produkta sekoiridoidov kot sta hidroksitirozol in tirozol. Do pretvorbe pride ravno med predelavo oljk ali zaradi poškodovanih plodov, pri čemer iz oleuropeina nastane hidroksitirozol in iz ligstrozida nastane tirozol. Med flavonoide spadata luteolin in apigenin.

Metodi, ki se ju največ uporablja pri določevanju fenolnih spojin sta spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu reagentom in metodo, ki temelji na HPLC ločbi. Spektrofotometrična določitev s F-C reagentom temelji na reakcije prenosa elektronov. F-C reagent se obarva modro, s pomočjo izmerjene absorbance in umeritvene krivulje pa se lahko določi vsebnost fenolnih spojin. Glavna pomanjkljivost te metode je v tem, da lahko poleg fenolnih spojin prepozna še druge spojine in potemtakem ni dovolj natančna. Na drugi strani je mogoče s HPLC dovolj natančno določiti skupne fenolne spojine v oljčnem olju, vendar vzame več časa in je dražja. Vedno bolj se v praksi uporablja zato, ker poleg koncentracije skupnih fenolnih spojin določi tudi deleže posameznih fenolnih spojin.

Številne raziskave so pokazale, da je vsebnost fenolnih spojin v oljki in oljčnem olju odvisna od sorte, starosti drevesa, pridelovalnega območja, podnebja in vremenskih dejavnikov, časa obiranja, časa skladiščenja plodov pred postopki predelave v olje, od postopkov predelave in načina ter časa skladiščenja olja.

Kljub temu, da oljčno olje vsebuje antioksidante, ki dvigajo raven odpornosti oljčnega olja na oksidacijo, le-to v prisotnosti kisika oksidira. Na to najbolj vpliva način skladiščenja (temperatura in svetloba). Primarni produkti oksidacije so hidroperoksidi, ko oksidacija napreduje, pa nastanejo sekundarni produkti: alkani, alkeni, aldehidi, alkoholi in ketoni. Ti se pokažejo kot žarkost oljčnega olja in dajejo olju neprijetno aromo in okus.

Pokazatelji oksidiranosti oljčnega olja so peroksidno število, K232 in K270. Pri ugotavljanju oksidacijske stabilnosti oljčnega olja je v uporabi tudi p-anisidinski test.

Fenolne spojine iz plodov oljke, listov in oljčnega olja se zadnja leta vedno bolj preučuje, ker imajo velik potencial v farmaciji in v živilski industriji, saj so močni antioksidatni, ki delujejo proti prostim radikalom in zaščitniško proti mnogim boleznim. Poleg tega fenolne spojine pripomorejo k edinstvenosti oljčnega olja. Samo s pravilnimi postopki v času obiranja, med predelavo in načinom skladiščenja se lahko zagotovi visoko kakovostno oljčno olje, ki blagodejno vpliva na zdravje ljudi. V Sloveniji smo lahko še posebej ponosni na našo avtohtono sorto oljke 'Istrska belica', ki je po mnenju pridelovalcev visoko rodna in ima visoko vsebnost olja ter dobro prenaša nizke temperature in jo pridelovalci Goriškega okoliša ravno zaradi tega izberejo za svoje severnejše nasade. Po mnenju raziskovalcev je to tudi sorta, ki odlično ohrani senzorične lastnosti tudi po daljšem času skladiščenja in kljub morebitni nižji vsebnosti skupnih fenolnih spojin ohranja deleže glavnih sekoiridoidov. Menim, da se v kmetijstvu izbira avtohtonih sort izkaže kot najboljša, saj so take sorte najbolj prilagojene na svoje okolje in pogoje, v katerih rastejo že toliko let, in se nam kot pridelovalcem avtohtona sorta lahko tudi najbolj obrestuje.

## 7 LITERATURA IN VIRI

Abram, V., Simčič, M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48:573-589.

Adamič F. 1982. *Oljka v slovenski Istri: raziskave in strokovne osnove za modernizacijo pridelovanja oljk in oljčnega olja*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 127 str.

Bandelj, D., Bešter, E., Bučar-Miklavčič, M., Butinar, D., Kanjir, Ž., Levanič, T., Valenčič, V., & Mazi, Ž. (2014). ABC o 'Istrski belici' = Factsheet on the olive variety 'Istrska belica' = L' ABC della varietà 'Bianca Istriana'. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče: Labs.

Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J., Rimbach, G. (2012). Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods Nutr* 67: 326-336

Bešter, E. (2007). *Oksidacijska stabilnost ekstra deviških oljčnih olj Slovenske Istre*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani.

Bianco, D., Castelluccio M. D., Conte L., Knez, S., Miklavčič, M., Mozetič, B., Parmagiani P., Prinčič D., Scarbolo, E., Sivilotti, P., Vesel, V., Vrščaj, B. (2009). *Uelje II – oljčno olje. Simbol kakovosti v čezmejnem prostoru*. [S.I.], Deželna agencija za razvoj podeželja – ERSA: 360 str.

Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535-3540.

Brenes, M., Hidalgo, F. J., García, A., Rios, J. J., García, P., Zamora, R., & Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 715-720.

Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., & Nucci, R. (2002). *Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4934-4940.

Boskou, D. (2009). *Olive oil (Minor Constituents and Health)*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.

Boskou, D. (2015). *Olive and Olive oil Bioactive Constituents*. AOCS Press, Urbana, Illinois.

Buchanan, B. B., Grisse, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.

Bučar-Miklavčič, M., Bešter, E., Butinar, B., Čalija, D., Valenčič, V. (2016). *Oljčno olje, oljke in senzorično ocenjevanje*. Koper, Univerzitetna založba Annales.

Bučar-Miklavčič, M., Bešter, E., Butinar, B., Čalija, D., Volk, S., Valenčič, V. (2010). *ABC o oljčnem olju*. Ljubljana, T&e d.o.o.

Butinar, B., Bučar-Miklavčič M., Čalija D. 1999b. Skupni polifenoli hidroksitirozol in tirozol v oljčnih oljih Slovenske Istre v dveh zaporednih letih (1996, 1997). *Annales Series Historia Naturalis*, 9: 27-36.

Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Bešter, E., Valenčič, V. (2012). *Oleuropein in biofenoli v oljčnih listih. V: Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu: zbornik znanstvenih prispevkov z mednarodnega posveta = Novi pristupi istraživanja u maslinarstvu: zbornik znanstvenih radova sa međunarodnog susreta.* (ur. Bandelj, D., Podgornik, M., Arbeiter, A. (ur.)). Koper, Univerzitetna založba Annales.

Cicerale S., Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RSJ. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 218-236.

Cinquanta, L., Esti, M., Di Matteo, M. (2001). *Oxidative Stability of Virgin Olive Oils*. *JAOCS*, Vol. 78, št. 12, AOCS Press, 1197-1202.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants* (ur. Buchanan, B., Grisse, W. & Jones, R.L.). American Society of Plants Physiologists, Beltsville, MD, USA, 1250-1319.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *V: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (ur. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H.). Blackwell Publishing Ltd.

EUR-Lex: Access to European Union law. Uredba komisije (EGS) št. 2568/91 z dne 11. julija 1991 o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih analiznih metodah (UL. L. 248, 5.9.1991)

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:01991R2568-20140101&from=SL> (datum dostopa: 7.8.2017)

Frankel, N. E. (2010). Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants. J. Agric. Food Chem, 58., Department of Food Science and Tehnology, University of California, Davis, California. 5991-6006

Garcia, A., Brenes, M., Romero, C., Garcia, P., Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the Picual variety. European Food Research and Tehnology. Springer-Verlag. 215: 407-412.

Gutierrez-Rosales, F., Luque de Castro, M.D. 2003. Main Polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, J. Agric. Food Chem. 6021-6025.

Haslam, E. (1998). Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge: Cambridge University Press.

Heimler, D., Cimato, A., Alessandri, S., Sani, G., Pieroni, A. (1996). Seasonal trend of flavonoids in olive (*Olea Europea L.*) leaves. Agr. Med., Vol. 126, 205-209

Hmelak-Gorenjak, A. (2010). Živilska kemija z analizo živil in Analiza živil. Ljubljana, Zavod IRC.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6: 1841-1856

IOC – International Olive Council (2009). Determination of Biophenols in olive oils by HPLC. Principe de Vergara, Madrid.

Kozjan, G., Zule, J. (2008). Polifenoli v različnih vrstah macesna (*Larix spp.*). Zbornik gozdarstva in lesarstva, številka 86, str. 51-58.

Kutchan, M. T., Gershenzon, J., Moller, L. B., Gang, R. D. (2015). Natural Products v: Biochemistry & Molecular Biology of Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley & Sons.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction, Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, 1543-1580. Springer Berlin Heidelberg.

Lin, Y., Shi, R., Shen, H.M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 8(7): 634-646

Lopez-Biedma, A., Sanchez-Quesada, C., Delgado-Rodriguez, M., Gaforio, J.J. (2016). The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. *Journal of Functional Foods* 26: 36-47

Mariotti, M., Peri, C., (2014). The composition and nutritional properties of extra-virgin olive oil. v: *The extra-virgin olive oil handbook*. John Wiley & Sons.Ltd.

Miklavčič-Višnjevec, A., Bučar-Miklavčič, M., Golob, T., Valenčič, V., Bešter, E., Butinar, B. (2016). Variations of phenolic compounds and sensory properties of virgin olive oils from variety 'Istrska belica'. *ACTA IMECO*. Volume 5, št. 1, 22-31.

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Oljčno olje. ([http://www.mkgp.gov.si/si/delovna\\_podrocja/kmetijstvo/kmetijski\\_trgi/oljcno\\_olje/](http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/oljcno_olje/)) (datum dostopa 8.8.2017)

Morales, M.T., Przybylski, R. (2000). Olive oil oxidation V: *Handbook of Olive Oil*. Harwood in sod. (ur.). Springer Science+Business, Media New York.

Ogrin, D. (2004). Oljka v Slovenskem Primorju. *Geografski obzornik*, letnik 51, številka 2, str. 4-10.

Omar, S.H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 111-121

Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976-988.

Počkaj, B. (2007). Strategija trženja oljčnega olja v Sloveniji. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302

Romani, A., Mulas, S., Heimler, D. (2016). Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europea* L. leaves) and commercial food supplements. *European Food Research and Tehnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.

Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Tehnology*. 104(9-10), 602-613.

Shamshoum, H., Vlaveciski, F., Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors*. Wiley Online Library. Oxford, England.

Shukla, S., Gupta, S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*. 27(6): 962-978.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, 152-178.

Šegatin, N., Rudan-Tasič, D., Poklar Ulrih, N. (2011). *Fizikalno kemijske metode v živilstvu: laboratorijske vaje*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Veberič, R. (2010). *Bioactive compounds in fruit plants*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Vermerris W., Nicholson R. (2008) *Families of Phenolic Compounds and Means of Classification v: Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht.

Vesel, V., Valenčič, Jančar, M., Čalija, D., Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M. (2009). *Oljka-živilo, zdravilo, lepotilo*. Ljubljana, ČZD Kmečki glas d.o.o.: 141 str.

Vickery, M. L., Vickery B. (1981). *Secondary plant metabolism*. London: MacMillan.

Vidrih-Perko, V. (2004). Oljka in olje v antiki. *Annales. Series historia et sociologia*, letnik 14, številka 2, str. 243-256.

Visioli, F., Galli, C., Poli, A. (2001). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.

Vossen, P. (2007). Olive oil: History, production, and characteristics of the World's classic oils. *HortScience*. Vol. 42(5).

Žorž, M. (1991). HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 154 str.